



HAL
open science

L'ostéoprotégérine, nouvel acteur dans l'angiogenèse : Rôle dans la formation de nouveaux vaisseaux et mécanisme d'action

Zahia Benslimane Ahmim

► To cite this version:

Zahia Benslimane Ahmim. L'ostéoprotégérine, nouvel acteur dans l'angiogenèse : Rôle dans la formation de nouveaux vaisseaux et mécanisme d'action. Sciences agricoles. Université René Descartes - Paris V, 2013. Français. NNT : 2013PA05S005 . tel-00923171

HAL Id: tel-00923171

<https://theses.hal.science/tel-00923171v1>

Submitted on 2 Jan 2014

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.

UNIVERSITE PARIS DESCARTES (PARIS V)

ECOLE DOCTORALE DE BIOLOGIE ET BIOTECHNOLOGIE (B2T)

THESE DE SCIENCES

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Paris V

Spécialité : Pathologie Cardio-vasculaire

Zahia Benslimane-Ahmim

**L'ostéoprotégérine, nouvel acteur dans
l'angiogenèse : Rôle dans la formation de
nouveaux vaisseaux et mécanisme
d'action.**

Directrice de thèse : Dr C. BOISSON-VIDAL

Soutenance le lundi 22 Avril 2013

JURY:

Dr. Ebba Brakenhielm

(Rapporteur)

Pr. Thierry Couffignal

(Rapporteur)

Dr. Cécile Denis

(Examinatrice)

Pr. Anne-Marie Fischer

(Examinatrice)

Pr. Dominique Heymann

(Examineur)

Dr. Catherine Boisson-Vidal

(Directrice de thèse)

Remerciements

Je tiens à remercier chaleureusement :

Les directeurs de l'unité INSERM 765, le Pr. **Pascale Gaussem** et le Pr. **Joseph Emmerich** pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire.

Ma directrice de thèse le **Dr. Catherine Boisson-Vidal** pour toute la confiance qu'elle m'a accordée. Catherine, je tiens à t'exprimer ma profonde gratitude pour toute ta patience, ton encadrement, ta disponibilité, ton aide, tes conseils, ta gentillesse, ton soutien et ta bonne humeur au quotidien.

Le Pr **Anne-Marie Fischer** pour m'avoir accordé l'honneur de faire partie de mon jury de thèse, pour son soutien, ses précieux conseils, ses encouragements, sa bonne humeur qui met de la gaieté dans nos réunions GDR, sans oublier les chouquettes. Un grand merci !!!

Les membres du jury qui me font l'honneur de participer à l'évaluation de ce travail. Merci au Pr **Thierry Couffignal** et au Dr **Ebba Brakenhielm** d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Merci au Pr. **Dominique Heymann** et au Dr. **Cécile Denis** d'avoir accepté de l'examiner. Je vous remercie pour le temps consacré à son évaluation.

Merci au Pr. **Dominique Heymann** pour toute l'aide apportée, tout au long de cette thèse et pour ses précieux conseils.

Le **GEHT** pour m'avoir accordé la bourse qui m'a permis de mener à terme ce travail. Le Dr. **Emmanuel De Maistre**, le Pr. **Philippe Nguyen** et le Pr. **Thomas Le Compte** pour m'avoir facilité toutes les démarches administratives et d'avoir été à l'écoute.

Le Pr. **Catherine Marchand-Leroux** pour m'avoir permis de finir mes études en France en m'acceptant dans son Master 2 et pour m'avoir permis de rencontrer Catherine Boisson-Vidal.

Le Dr. **Dominique Helley** pour ses remarques constructives aux GDR et pour sa sympathique compagnie aux congrès.

Le Pr. **Didier Lutomski** du laboratoire de protéomique (CNRS CSPBAT, LBPS, UFR SMBH Léonard de Vinci) pour sa collaboration, ainsi que le Dr. **Florence Poirier** pour son aide précieuse à l'analyse protéomique, pour toute sa gentillesse et son implication.

Mme **Claudine Deloménie** de la plate forme de trans-prot (IFR-141-IPSIT, UMRS 996, Faculté de Pharmacie, Chatenay Malabry) pour m'avoir formé à la RT-qPCR, ses conseils, sa disponibilité et sa gentillesse.

Mme **Chantal Martin** et toute l'équipe de l'animalerie pour leur aide, leur disponibilité et leur amabilité.

Bruno, Virginie et René pour m'avoir initié à l'histologie et à la microscopie confocale. Merci pour vos précieux conseils.

Anna pour sa gentillesse, son aide au L2 et son sourire réconfortant. Merci à toi et à **Amel** pour les manips du flux.

Isabelle pour sa bonne humeur, pour toute son aide et ses précieux conseils. Merci pour mettre à jour ma biblio sur les PECs.

Françoise pour sa disponibilité, son aide et son expertise. Merci de m'avoir formé avec tant patience et de bonne humeur au Western blot et profite bien de ta retraite si méritée.

Sonia pour ses conseils en cytométrie et en pleins d'autres domaines.

Florence pour son aide dans toutes les démarches administratives, les congrès et les commandes.

Tahar, mon petit kabyle préféré, merci pour ta bonne humeur, tes bonnes blagues et ta disponibilité.

Zahera et Yasmine pour m'avoir ouvert leurs cœurs. Merci de tout mon cœur pour tout le soutien et le réconfort que vous m'aviez apportés et pour toutes vos petites attentions.

Ma brésilienne adorée, **Juliana**, qui m'a fait découvrir sa culture, m'a initié au portugais et m'a offert une amitié forte et sincère. Ma chérie, merci de tout mon cœur de m'avoir dédié une ligne dans tes remerciements de thèse, aujourd'hui j'ai le plaisir de faire autant pour toi.

Béregère, Audrey, Jessica, Marion, Claire, Julie, Hilda, Agnès, Tiphaine, Benoit... MERCI pour avoir rendu mon séjour à l'U765 si agréable, ces années n'auraient pas été les mêmes sans vous. Merci à tous pour nos petites pauses et pour avoir partagé mes hauts et mes bas.

Béregère, merci pour m'avoir offert ton amitié, tous les bons moments passés ensemble et toute ton aide au L2 et ailleurs.

Audrey, ton rire et ton sourire ont permis d'égayer ces journées parisiennes si pluvieuses. Merci pour ta bonne humeur, ton soutien, ta gentillesse et tes encouragements.

Jessica, jumelle de galère de thèse, merci de ton aide en imagerie, de tes bonnes blagues et de nous faire rire en toutes circonstances.

Ma petite **Marion** avec qui j'ai beaucoup aimé partager mon bureau, je te remercie pour tout ces bons moments, pour ta sympathie et de m'avoir tenu la main au congrès de la SFH (je t'avais promis un paquet de chocobons !!! je ne l'ai pas oublié !!).

Claire, merci pour tes conseils en immunohistochémie et en imagerie, je te souhaite beaucoup de réussite dans tous les domaines.

Tous les stagiaires passés et présents pour le repeuplage saisonnier du laboratoire et pour la bonne ambiance apportée. Merci **Erika** pour tes délicieux gâteaux, et bon courage pour ta thèse.

Tous ceux et celles avec qui j'ai aimé partager le bureau et la pièce de culture...

Sophie, Dominique, David, Clément, ... et tous les membres de l'unité INSERM 765 pour leur accueil.

Mes amies de l'autre côté de la méditerranée; Saida, Pima, Djidji, Zahoua, Lynda, Saliha, Batia, Nadia, Rabiha, Khadidja et toutes celles et ceux qui m'ont tant encouragé.

Enfin, je tiens à exprimer ici toute ma gratitude envers mes proches de Paris ou d'ailleurs : A ma très chère mère, ma famille et ma belle famille, tous vous m'avez soutenu et encouragé dans cette entreprise. Ce travail est mon remerciement. Merci à mes beaux parents pour vous être si bien occupé d'Ilyan et me permettre de mener à terme cette thèse.

Merci à Khaled, l'homme le plus patient au monde. Supporter mes humeurs et mon sale caractère durant cette période éprouvante est digne de louange. Merci de tout mon cœur.

Merci Ilyan d'avoir été si sage pendant que je rédigeais, pour tes sourires qui me redonnent du courage et pour la joie que tu nous apportes.

Sommaire

LISTE DES ILLUSTRATIONS:	7
ABBRÉVIATIONS:	8
INTRODUCTION GENERALE	9
I/SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	13
CHAPITRE 1: L'OSTEOPROTEGERINE	14
1.1 GENERALITES ET DEFINITIONS:	14
1.1.1 Définition :.....	14
1.1.2 Structure :.....	14
1.1.3 Distribution tissulaire :.....	15
1.1.4 Concentrations sériques de l'OPG :	15
1.1.5 Facteurs régulant l'expression de l'OPG :.....	16
1.2 OPG ET TISSU OSSEUX - LA TRIADE OPG/RANK/RANKL :	16
1.2.1 La triade OPG/RANK/RANKL :.....	17
1.2.2 RANKL ;facteur inducteur de la résorption osseuse :.....	17
1.2.3 RANK ; récepteur membranaire de RANKL :	18
1.2.4 OPG ; récepteur leurre de RANKL et inhibiteur de la résorption osseuse :.....	18
1.2.5 Rôle de l'OPG dans les pathologies osseuses :.....	19
1.3 OPG ; FACTEUR DE SURVIE CELLULAIRE :	19
1.4 OPG ET SYSTEME IMMUNITAIRE :	20
1.4.1 Les monocytes :.....	20
1.4.2 Les cellules B :.....	20
1.4.3 Les cellules dendritiques et les cellules T:.....	21
1.5 OPG ET SYSTEME HEMATOPOÏÏTIQUE :.....	21
1.6 OPG ET PHYSIOPATHOLOGIE VASCULAIRE :	22
1.6.1 Rôle de l'OPG dans la physiopathologie de l'athérosclérose:.....	23
1.6.2 Le rôle prédictif de l'OPG dans les maladies cardiovasculaires.....	23
1.6.3 La relation entre OPG et les facteurs de risque cardiovasculaire :	25
1.7 OPG ET TUMORIGENESE :	26
1.8 OPG ET ANGIOGENESE :	28
CONCLUSION :	29
CHAPITRE 2 : MECANISMES DE FORMATION DE NOUVEAUX VAISSEAUX ; ANGIOGENESE VERSUS VASCULOGENESE	30
INTRODUCTION :	30
2.1 L'ANGIOGENESE:	30
2.1.1 L'angiogenèse par bourgeonnement :.....	31
2.1.2 L'angiogenèse par intussusception:.....	31
2.1.1 Angiogenèse physiologique versus angiogenèse pathologique :	32
a) Angiogenèse physiologique :.....	33
b) Angiogenèse pathologique :.....	33
Néo-angiogenèse post-ischémique :.....	34
Néo-angiogenèse tumorale :.....	34
2.2 LA VASCULOGENESE EMBRYONNAIRE ET ADULTE :.....	35
2.3 LES PRINCIPAUX ACTEURS IMPLIQUES DANS LA FORMATION DE NOUVEAUX VAISSEAUX :.....	36
2.3.1 L'hypoxie et le système HIF :	36
2.3.2 Le système VEGF/ VEGFR :.....	37
2.3.3 Le système Ang/ Tie :.....	38
2.3.4 Le système Eph/ Eprines :.....	38
2.3.5 Le système Notch/ DLL & Jagged:.....	39
2.3.6 Le système FGF/ FGFR :.....	40
2.3.7 Le système TGF- β / TGF- β R :	41
2.3.8 Le système PDGF/ PDGFR :.....	41
2.3.9 Rôle des métalloprotéinases :.....	42

2.3.10 Le système SDF-1/CXCR4:	42
a) SDF-1:	42
b) Les récepteurs au SDF-1:	43
c) Régulation de l'expression du système SDF-1/CXCR4	44
d) Implication du SDF-1 dans l'angiogenèse:	45
e) Implication du SDF-1 dans la vasculogenèse:	45
f) Implication du SDF-1 dans la croissance tumorale:	46
2.3.11 Rôle des intégrines :	46
Cas particulier de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$:	47
2.3.12 Rôle des Héparanes Sulfates Protéoglycannes (HSPGs):	48
Le Syndécanne-1 (SDC-1) :	50
2.3.13 Rôles de certaines voies de signalisation :	51
a) La voie Akt :	51
b) La voie mTOR :	52
c) La voie Erk1/2 :	52
d) La voie p38 :	53
e) La voie FAK :	53
CHAPITRE 3 : LES PROGENITEURS ENDOTHELIAUX CIRCULANTS	55
INTRODUCTION :	55
3.1 CLASSIFICATION :	55
3.1.1 Les PECs tissulaires versus PECs circulants :	55
3.1.2 Les PECs hématopoïétiques versus PECs non hématopoïétiques :	55
3.1.3 Les PECs formant des colonies versus PECs ne formant pas de colonies :	56
3.2 CARACTERISATION :	57
3.3 LES DIFFERENTES ETAPES DE LA PARTICIPATION DES PECs A LA VASCULOGENESE POSTNATALE:	58
3.3.1 Mobilisation :	59
3.3.2 Homing :	59
3.3.3 Invasion :	60
3.3.4 Différenciation :	60
II/RESULTATS	62
CHAPITRE I: ARTICLE 1; OSTEOPROTEGERIN, A NEW ACTOR IN VASCULOGENESIS, STIMULATES ENDOTHELIAL COLONY-FORMING CELLS PROPERTIES	63
1.1 RATIONNEL DE L'ETUDE ET SYNTHESE DES RESULTATS OBTENUS :	64
1.2 MANUSCRIT :	67
CHAPITRE II: ARTICLE 2; MECHANISTIC STUDY OF THE PROANGIOGENIC EFFECT OF OSTEOPROTEGERIN.	68
2.1 RATIONNEL DE L'ETUDE ET SYNTHESE DES RESULTATS OBTENUS :	69
2.2 MANUSCRIT :	76
CHAPITRE III: ARTICLE 3; OSTEOPROTEGERIN PROMOTES TUMOUR DEVELOPMENT IN AN ORTHOTOPIC MURINE MODEL OF OSTEOSARCOMA.	77
3.1 RATIONNEL DE L'ETUDE ET SYNTHESE DES RESULTATS OBTENUS :	78
3.2 MANUSCRIT :	81
CHAPITRE IV : ARTICLE 4 ; OSTEOPROTEGERIN REGULATES PROGENITOR ENDOTHELIAL CELL DIFFERENTIATION.	82
4.1 RATIONNEL DE L'ETUDE ET SYNTHESE DES RESULTATS OBTENUS :	83
3.2 MANUSCRIT:	85
DISCUSSION GENERALE, CONCLUSION & PERSPECTIVES	86
ANNEXES	86
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	86

Liste des illustrations:

Figures :

Figure-1 : Structure simplifiée de l'OPG.

Figure-2 : Rôle de la triade OPG/RANK/RANKL dans la régulation de l'homéostasie osseuse.

Figure-3 : Schéma représentant l'expression, la réglementation et les propriétés fonctionnelles de l'OPG.

Figure-4 : Représentation schématique de l'angiogenèse par bourgeonnement.

Figure-5 : Représentation schématique de l'angiogenèse par intussusception.

Figure-6 : Représentation schématique des mécanismes impliqués dans le recrutement des PECs sur les sites revascularisation.

Figure-7 : Schéma représentant la signalisation induite par la liaison du SDF-1 au CXCR4.

Figure-8 : Représentation schématique des héparanes sulfates protéoglycannes.

Figure-9 : Schéma représentant l'organisation structurelle du syndécanne-1.

Figure-10 : Représentation schématique des différents types de PECs.

Figure-11 : Représentation schématique des mécanismes moléculaires régissant les différentes étapes de la participation des PECs à la vasculogenèse postnatale.

Figure-12 : Profil d'expression d'OPG par les ECFCs en présence et en l'absence du VEGF et du SDF-1.

Figure-13 : Effet d'un préconditionnement des ECFCs par OPG et RANKL sur la prolifération et la tubulogenèse.

Figure-14 : Effets de l'OPG sur la survie des ECFCs.

Figure-15 : le SDF-1 libéré sous l'effet de l'OPG par les ECFCs est en partie responsable de la formation de pseudotubes induite par l'OPG.

Figure-16 : L'abrasion des HSPGs inhibe l'effet de l'OPG sur l'expression des ARNm codant pour SDF-1.

Figure-17 : l'inhibition du SDC-1 induit une réduction importante de l'effet chimioattractant de l'OPG.

Figure-18 : OPG (1-194) induit l'expression des ARNm codant pour le SDF-1 à des niveaux similaires à OPG (1-401).

Figure-19 : Taux de prolifération des ECFCs en présence et en l'absence de l'OPG.

Tableaux :

Tableau-I : Quelques cytokines et facteurs de croissance régulant l'expression de l'OPG.

Tableau-II : Quelques études épidémiologiques évaluant le rôle de l'OPG dans certaines maladies cardiovasculaires.

Tableau-III : Liste des facteurs pro et anti-angiogéniques.

Abbréviations:

ADAM: A Disintegrin And Metallo-proteinase.
ADAMTS: ADAM with thrombospondin motifs.
Ang: Angiopoïétine.
BMP: Bone Morphogenetic Protein.
CD: Cellules Dendritiques.
CE: Cellules Endothéliales.
CFU-ECs: Endothelial Cell Colony-Forming Units.
CML: Cellules Musculaires Lisses.
CRP : C-Reactive Protein.
CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques.
DLL : Delta Like Ligand.
DMO : Densité Minérale Osseuse.
ECFCs: Endothelial Colony Forming Cells.
eNOS : endothelial Nitric Oxide Synthase.
Eph : Erythropoietin-producing hepatoma.
EPO : Erythropoïétine.
Erk1/2 : Extracellular signal-regulated protein Kinases 1 et 2.
FAK: Focal Adhesion Kinase.
FGF: Fibroblast Growth Factor.
FMAD: Flow-Mediated Dilatation of the brachial Artery.
GAGs: glycosaminoglycannes.
G-CSF: Granulocyte Colony-Stimulating Factor.
GM-CSF: Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor.
Grb2: Growth factor Receptor Bound protein 2.
HGF: Hepatocyte Growth Factor.
HIF: hypoxia inductible factor.
HMVECs: Human Microvascular Endothelial Cells.
HPP-ECFCs: High Proliferative Potential-ECFCs.
Hs6st: 6-O-sulfotransferase.
HSPGs: Héparanes Sulfates ProtéoGlycannes.
HUAECs: Human Umbilical Arterial Endothelial Cells.
HUVECs: Human Umbilical Vein Endothelial Cells.
ICAM-1: InterCellular Adhesion Molecule.
IFN: interferon.
IGF-1: Insulin-like Growth Factor-1.
IL: interleukine.
JPD: Juvenil Paget Disease.

LPP ECFCs: Low Proliferative Potential-ECFCs.
MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase.
MAPKAP-K2: MAPK-activated protein kinase-2.
MCP: Monocyte Chemoattractant Protein.
M-CSF: Macrophage Colony-Stimulating Factor.
MK: Mégakaryocytes.
MMP : Métalloprotéinases Matricielles.
mTOR: mammalian Target Of Rapamycin.
Nds: N-deacetylase/N-sulfotransferases.
NF- κ B: Nuclear Factor-kappa B.
NO: monoxyde d'azote.
OB: Ostéoblastes.
OC: Ostéoclastes.
OPG: Ostéoprotégérine.
PAF: Platelet Activating Factor
PDGF: Platelet-Derived Growth Factor.
PECs: Progéniteurs Endothéliaux Circulants.
PECs-h : PECs hématopoïétiques.
PECs-nh : PECs non hématopoïétiques (h).
PI3K: phosphatidylinositol 3 kinase.
PKB: protéine kinase B
PKC: protéines kinase C.
PKD: protéine kinase D.
PLC- γ : phospholipase C – γ .
PIGF: Placental Growth Factor.
RANK: Receptor Activator of NF- κ B.
RANKL: Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand.
SDC-1: Syndécanne-1.
SDF-1: Stromal Cell-Derived factor-1.
TGF- β : Transforming Growth Factor- β .
TNF: Tumor Necrosis Factor.
TNFR: TNF receptor.
TRAIL: Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand.
TRAP: Tartrate-Resistant Acid Phosphatase.
VCAM-1: Vascular Cell Adhesion Molecule-1.
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor.
VWF: Von Willebrand Factor.

Introduction générale

L'Ostéoprotégérine(OPG), une cytokine appartenant à la famille des récepteurs au TNF, est principalement connue pour son action régulatrice dans l'homéostasie osseuse. C'est en effet, l'inhibiteur endogène naturel de RANKL (*Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand*). En neutralisant cette protéine, OPG inhibe la différenciation ostéoclastique, diminue la survie des ostéoclastes matures, freinant ainsi la résorption osseuse [1]. Il est donc largement admis que l'OPG est au cœur du remodelage osseux. Cependant et du fait de sa large distribution tissulaire, cette protéine semble intervenir dans la régulation d'une variété de processus.

Elle intervient dans la réponse immunitaire en modulant la survie des cellules dendritiques, la prolifération des lymphocytes et la migration des monocytes [2, 3]. Elle a été décrite comme un facteur de croissance et de survie hématopoïétique [4] et intervient dans la régulation de la progression tumorale, en particulier dans les cancers du sein, de la prostate et du myélome multiple[5]. De même, l'OPG semble avoir un rôle vasculaire et semble en particulier intervenir dans la progression de l'athérosclérose. Dans des études observationnelles, les taux élevés d'OPG ont été associés à un risque accru d'infarctus du myocarde, d'ischémie cérébrale et de décès liés à une cardiopathie ischémique [6]. Il a été rapporté que les niveaux d'OPG sont associés à des facteurs de risque traditionnels (hypertension, diabète, tabagisme et hypercholestérolémie), à une prévalence élevée de maladies cardio-vasculaires et aux maladies vasculaires cérébrales [7]. Des études prospectives ont démontré que les niveaux d'OPG peuvent prédire le pronostic à long terme chez des patients atteints de l'angine stable de poitrine [8] et des syndromes coronariens aigus [9, 10]. Une corrélation entre les niveaux plasmatiques de l'OPG et de la gravité de maladies coronariennes et celles des artères périphériques a également été rapportée [11, 12].

L'implication de l'OPG dans le processus de revascularisation a été envisagée, après que des études aient démontré son expression par les cellules endothéliales matures isolées de patients atteints de différentes tumeurs malignes [13]. Les cellules endothéliales stockent l'OPG dans les corps de Weibel-Palade, ce qui fait que sa concentration peut être rapidement augmentée en réponse à différents stimuli inflammatoires [14]. Par ailleurs, la faculté qu'a cette molécule à lier l'agent inducteur de l'apoptose TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*) et inhiber son activité a été mise en évidence, ce qui fait qu'elle pourrait protéger différents types cellulaires dont les cellules endothéliales de l'apoptose induite par cet agent [15].

En somme l'OPG qui est un facteur clé du métabolisme osseux impliqué dans la réponse immunitaire et dans l'hématopoïèse, associé à la dysfonction endothéliale, à la morbi-mortalité cardiovasculaire et semble être lié à l'angiogenèse, constituerait un trait d'union entre le tissu osseux et vasculaire.

L'homéostasie vasculaire et osseuse repose sur un réseau complexe de messagers solubles capables d'agir sur les deux systèmes qui collaborent étroitement pour former la matrice osseuse. Durant l'ossification, le cartilage avasculaire se transforme en tissu osseux hautement vascularisé.

Le réseau vasculaire mis en place permet l'approvisionnement en cellules nécessaires au remodelage osseux (ostéoblastes et ostéoclastes) et les cellules endothéliales produisent plusieurs facteurs (RANKL, IL-6, PDGF, TGF- β ...) nécessaires à la différenciation ostéoblastique. Les cellules impliquées dans le remodelage de la matrice osseuse produisent des stimulateurs d'angiogenèse, essentiellement le VEGF et le FGF-2, fournissant ainsi une cible pour l'invasion capillaire [16]. Etant libérée par les deux systèmes osseux et vasculaires, l'OPG se retrouve donc au milieu de ce carrefour métabolique. Son rôle du côté osseux est aujourd'hui bien établi, mais celui du côté de la vascularisation reste à définir.

Le processus de revascularisation se définit par le développement de nouveaux vaisseaux sanguins par bourgeonnement de vaisseaux pré-existants (angiogenèse) ou par la différenciation de précurseurs endothéliaux primitifs appelés angioblastes (vasculogenèse). Cette définition a été réévaluée grâce à la mise en évidence d'une nouvelle source de renouvellement endothélial, qui est une sous-population de cellules mononuclées CD34⁺ circulantes dans le sang périphérique des adultes et provenant de la moelle osseuse. Ces cellules souches dérivées probablement des angioblastes embryonnaires ont la capacité de proliférer et de se différencier en cellules endothéliales matures et de s'incorporer à la paroi des vaisseaux préexistants, elles ont donc été appelées Progéniteurs Endothéliaux Circulants (PECs) [17]. Plusieurs populations de PECs ont été caractérisées mais seule une petite fraction, les ECFCs (*endothelial colony-forming cells*) possèdent les caractéristiques d'un « vrai » progéniteur endothélial ayant toutes les propriétés requises pour former des néovaisseaux *in vivo* [18, 19].

Au cours de ce travail, nous avons dans un premier temps, évalué l'effet d'un préconditionnement à l'OPG, d'ECFCs isolés à partir du sang de cordon ombilical sur les étapes clés du processus angiogénique *in vitro*, et sur la formation de néovaisseaux *in vivo* dans un modèle murin de revascularisation de la matrice extracellulaire. Nous avons par la suite, exploré son mécanisme d'action *in vitro* et évalué son effet sur la croissance et l'angiogenèse tumorale *in vivo*, en utilisant le modèle de xéno greffes tumorales chez la souris Nude. Par ailleurs, nous avons évalué l'effet de l'OPG sur la différenciation endothéliale de cellules CD34+.

Ce manuscrit est ainsi divisé en deux grandes parties :

- I) Une partie bibliographique décrivant l'OPG et ses différents rôles dans la physiopathologie osseuse et vasculaire, passant en revue le processus de revascularisation, tout en mettant l'accent sur la biologie des PECs ; matière première de ce travail.
- II) La seconde partie est consacrée aux différents résultats obtenus et qui sont répartis en quatre publications :

- i) la première, publiée dans *Journal of Thrombosis and Haemostasis* en 2011, décrit l'effet de l'OPG et de son ligand (RANKL) sur les différentes étapes du processus angiogénique *in vitro* et *in vivo* ;
- ii) la seconde, publiée dans *Angiogenesis (sous presse)* décrit le mécanisme d'action de l'OPG sur les ECFCs *in vitro* ;
- iii) la troisième quant à elle, rapporte l'effet de cette protéine sur la vascularisation et la croissance tumorale et sera soumise très prochainement en tant *short communication* à *Cancer Research*
- iv) et la dernière sera soumise très prochainement à *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* en tant que *brief report*, mentionne l'effet de l'OPG sur la maturation biologique des ECFCs.

Cette seconde partie est suivie d'une discussion générale et une conclusion clôt ce manuscrit.

I/Synthèse bibliographique

Chapitre 1: L'Ostéoprotégérine

1.1 Généralités et définitions:

1.1.1 Définition :

L'Ostéoprotégérine est une glycoprotéine soluble membre de la superfamille des récepteurs au facteur de nécrose tumorale (TNFR ; *tumour necrosis factor receptor*). C'est un membre atypique de cette famille puisqu'elle ne possède ni un domaine cytoplasmique ni transmembranaire. Elle a été initialement identifiée par 3 équipes de recherche en 1997 [20-22], mais ce n'est qu'en 1998 que les protéines nouvellement découvertes se sont avérées identiques. Ces 3 équipes ont remarqué que l'OPG jouait un rôle central dans la régulation du remodelage osseux en inhibant l'ostéoclastogénèse, d'où ses noms alternatifs de ; *osteoclast inhibitory factor*, *TNF receptor-related molecule-1* et *follicular dendritic cell-derived receptor-1*[23, 24]. Le terme osteoprotégérine a été également proposé en raison des effets observés dans les modèles animaux de protection de l'os d'une résorption excessive. Le gène humain codant pour OPG est localisé sur le chromosome 8 (8q24) et contient 5 exons sur un domaine de 29 kb. Le codon de terminaison de la traduction est présent dans l'exon5 et un poly(A)-signal d'addition est située 173 nucléotides en aval du codon de terminaison de traduction [25].

1.1.2 Structure :

L'OPG existe à la fois sous une forme monomérique de 60kDa et dimérique de 120kDa. Structuellement elle est constituée de 401 acides aminés, dont 21 forment un peptide signal qui est clivé pour engendrer une forme mature de 380 acides aminés (figure 1, [25]).

**Autorisation de diffusion
non obtenue.**

Figure-1: Structure simplifiée de l'OPG d'après Yamaguchi K et al, 1998.

A l'extrémité N-terminale, les domaines 1-4 correspondent aux domaines riches en cystéine. Pour les protéines de la famille des TNFR, ces régions sont en général extracellulaires et sont impliquées dans l'interaction avec leurs ligands. Même pour les récepteurs de forme solubles, tels que l'OPG, ces régions ont encore la possibilité de s'associer avec leurs ligands. C'est donc via ces domaines que l'OPG lie sa cible principale qui est le RANKL. À l'extrémité C-terminale, on retrouve deux domaines homologues (5 et 6) appelés domaines de mort et impliqués dans la transmission de signaux apoptotiques dans de nombreuses cellules. Ces deux domaines ne sont

pas essentiels pour l'activité inhibitrice de la résorption osseuse mais leur suppression entraîne une diminution marquée de l'activité biologique de l'OPG. Bien que la surexpression de l'OPG ne provoque en aucun cas la mort cellulaire, Yamaguchi *et al* rapportent que la présence de ces deux domaines pourrait induire l'apoptose d'une manière inconnue sous certaines conditions [25]. Les deux domaines 5 et 6 sont suivis d'un domaine D7 qui possède un site de liaison à l'héparine important pour l'interaction de l'OPG avec les protéoglycannes. Sur ce même domaine et à la position 400, on retrouve une cystéine responsable de l'homodimérisation de l'OPG. Même si la dimérisation est extrêmement importante pour d'autres membres de la famille des TNFR, il a été démontré que la substitution ou la suppression de cette cystéine-400 n'a aucune incidence sur l'activité de l'OPG, ce qui explique le fait qu'elle garde la même activité spécifique dans l'inhibition de l'ostéoclastogénèse qu'elle soit sous forme monomérique ou dimérique [22].

1.1.3 Distribution tissulaire :

Même si l'OPG est majoritairement libérée dans l'os, c'est une molécule ubiquitaire et elle est fortement exprimée dans divers tissus dont: les poumons, le cœur, les reins, le foie, la rate, le thymus, la prostate, les ovaires, l'intestin grêle, la thyroïde, les ganglions lymphatiques, la trachée, les glandes surrénales, les testicules et la moelle osseuse. Elle a été également détectée à de très faibles niveaux, dans le cerveau, le placenta et le muscle squelettique [20, 26, 27]. Au niveau cellulaire, il a été démontré que les cellules mésenchymateuses, les cellules stromales médullaires et les ostéoblastes (OB) constituent la principale source de l'OPG endogène. Il a été également démontré que les lymphocytes B et les cellules dendritiques (CD) sont responsables de 64% de la production totale de l'OPG dans la moelle osseuse, dont 45% proviennent de cellules B matures. Les fibroblastes et les monocytes en culture primaires expriment fortement l'OPG. Au niveau vasculaire, elle est produite par les cellules endothéliales (CE) matures et les cellules musculaires lisses (CML), ce qui représente les deux principales sources de l'OPG circulante [5, 26, 28]. L'OPG est également libérée par les mégacaryocytes (MK) matures ainsi que par les plaquettes qui en dérivent [29]. Cette large distribution tissulaire confère à l'OPG plusieurs rôles physiopathologiques et une implication dans la régulation de plusieurs systèmes, essentiellement le système osseux mais aussi les systèmes immunitaire, hématopoïétique et vasculaire.

1.1.4 Concentrations sériques de l'OPG :

Les niveaux d'OPG mesurés dans le sérum tiennent compte non seulement de l'OPG libérée par l'os, mais également de celle libérée par les différents tissus qui l'expriment [30]. Les taux d'OPG ont été d'abord évalués en utilisant des anticorps monoclonaux, des anticorps polyclonaux et même des ligands d'OPG, mais des résultats hétérogènes ont été obtenus en raison de l'existence de différentes formes circulantes (mature, immature, monomérique, dimérique, glycosylée ou non) [31-36]. A titre d'exemple, l'étude menée par Seidel *et al.* rapporte que les concentrations sériques en OPG chez des volontaires sains peuvent varier de 5 à 150 ng/mL [37]. Certaines améliorations des méthodes de détection ont été mises au point, et une

attention particulière a été accordée aux techniques de prélèvement des échantillons et à la forme d'OPG utilisée dans la calibration des tests [38, 39]. Ainsi, des concentrations allant de 0,1 à 3,6 ng/mL ont été détectées dans le sérum adulte [40], 5 à 35 ng/mL dans le liquide synovial [30], 162 ± 58 ng/mL dans le lait maternel [41] et 50 à 700 ng/mL dans le fluide gingival [42].

1.1.5 Facteurs régulant l'expression de l'OPG :

Plusieurs facteurs locaux et systémiques sont connus pour réguler l'expression de l'OPG mais il est difficile de faire une liste exhaustive de facteurs stimulant ou inhibant sa production, puisque celle-ci est très variable en fonction du type cellulaire et des conditions environnantes. Le tableau I résume les facteurs principaux affectant sa production [43].

Tableau-I: Cytokines et facteurs de croissance régulant l'expression de l'OPG.

Cytokines	Expression d'OPG	Type cellulaire	Références
IL-1 α	↑	CE	[44]
IL-1 β	↑/↓	CE (↑), fibroblastes (↑), CML (↑), OB (↑), CD(↑), cellules stromales médullaires(↓)	[45-47]
IL-6	↑/↓	Calvaria (↑), cellules stromales médullaires (↓)	[46, 48]
IL-11	↑/↓	OB(↑), calvaria (↑), cellules stromales médullaires (↓)	[46, 49, 50]
IL-17	↓	cellules stromales médullaires	[46]
IL-18	↑	cellules stromales médullaires, OB	[51]
TNF- α	↑	CE, CML, fibroblastes, CD.	[44, 47, 52, 53]
BMP-2	↑/↓	CML (↓), OB (↑)	[45, 54]
BMP-4	↑	cellules stromales médullaires	[55]
BMP-7	↓	CML	[54]
TGF β	↑/↓	cellules stromales médullaires (↑), OB (↑), CML (↓)	[54, 56, 57]
FGF-2	↑/↓	CML (↑), OB (↓)	[47, 58]
PDGF	↑	CML, MK	[47]
IGF-1	↓	cellules stromales médullaires	[59]

Légende : (↑) augmente l'expression d'OPG; (↓) diminue l'expression d'OPG ; IL-1: interleukine-1; TNF- α : *Tumor Necrosis Factor- α* ; BMP: *Bone Morphogenetic Protein*; TGF- β : *Transforming Growth Factor- β* ; FGF-2: *basic Fibroblast Growth Factor*; PDGF: *Platelet-Derived Growth Factor*; IGF-1: *Insulin-like Growth Factor-1* ; CE: cellules endothéliales ; CML: cellules musculaires lisses ; OB : ostéoblastes; CD: cellules dendritiques ; MK : mégacaryocytes.

1.2 OPG et tissu osseux - la triade OPG/RANK/RANKL :

Le remodelage osseux est un processus physiologique qui permet le renouvellement du tissu osseux grâce à la résorption de l'os ancien et à son remplacement par une matrice osseuse nouvellement synthétisée. Les ostéoclastes (OC) qui sont des cellules d'origine hématopoïétique sont responsables de la résorption osseuse et les OB qui ont une origine mésenchymateuse, sont des cellules responsables de la formation osseuse. La différenciation ainsi que l'activation des OC nécessitent des interactions avec les OB et les cellules stromales, principalement par contacts

cellulaires. Ce processus est régulé par plusieurs facteurs locaux et systémiques dont les plus importants forment la triade moléculaire OPG/RANK/RANKL [60].

1.2.1 La triade OPG/RANK/RANKL :

L'identification des nouveaux membres de la super famille des TNF et des TNFR à savoir RANKL (TNFRSF11), son récepteur RANK (Receptor Activator of NF- κ B ; TNFRSF11A) et son récepteur leurre OPG (TNFRSF11B), a permis une avancée considérable dans la compréhension des mécanismes impliqués dans la résorption osseuse en physiologie et en pathologie, grâce à l'utilisation de modèles animaux transgéniques qui ont permis de mettre en évidence le rôle de chaque protagoniste dans le contrôle de l'homéostasie osseuse. L'interaction de RANKL avec son récepteur RANK induit la différenciation et l'activation des précurseurs ostéoclastiques en OC matures et actifs. L'OPG qui est un récepteur soluble est capable de lier le RANKL et empêcher son interaction avec RANK, inhibant ainsi l'activation des OC et par conséquent la résorption osseuse. L'OPG est donc une molécule qui protège l'os d'une résorption excessive (Figure 2) [60].

**Autorisation de diffusion
non obtenue.**

Figure-2: Rôle de la triade OPG/RANK/RANKL dans la régulation de l'homéostasie osseuse (adapté par Amgen de Boyle et al. 2003).

1.2.2 RANKL ; facteur inducteur de la résorption osseuse :

RANKL auparavant connu sous les noms de ligand de l'OPG, de facteur de différenciation des OC ou de cytokine induite par activation du TNF (TRANCE), appartient à la famille des ligands TNF. C'est une protéine transmembranaire qui peut également exister sous forme libre par clivage ou épissage alternatif. L'association de 3 molécules de RANKL compose la molécule fonctionnelle trimérique [61]. RANKL est essentiellement exprimé dans le tissu osseux (cellules stromales et OB) et les organes lymphoïdes (lymphocytes T). Toutefois, de nombreux autres types cellulaires l'expriment dont les ostéocytes, les cellules épithéliales mammaires, les

kératinocytes, les fibroblastes synoviaux, les chondrocytes hypertrophiques, certaines cellules malignes et les cellules endothéliales [62].

RANKL apparaît comme le facteur essentiel de la coopération entre les cellules stromales/ostéoblastiques et les précurseurs ostéoclastiques [63]. En se liant à son récepteur RANK en présence du M-CSF, RANKL stimule la fusion des précurseurs ostéoclastiques, leur attachement à la matrice osseuse, l'activité de la résorption osseuse et leur survie [31, 64]. *In vivo*, les souris déficientes pour le gène de RANKL développent une ostéopétrose caractérisée par l'absence d'OC, mais les progéniteurs ostéoclastiques sont en nombre normal et peuvent se différencier en OC actifs quand ils sont cocultivés avec des cellules normales stromales/OB [63]. Les souris surexprimant RANKL développent une ostéoporose sévère [65]. Ainsi, RANKL est un puissant inducteur de la résorption osseuse.

1.2.3 RANK ; récepteur membranaire de RANKL :

RANK est une protéine transmembranaire appartenant à la superfamille des récepteurs au TNF. RANK est présent à la surface des précurseurs ostéoclastiques et des OC matures au niveau osseux, et il est également exprimé par les lymphocytes, les cellules dendritiques et les cellules endothéliales [66]. Lors de contacts cellulaires, la liaison RANK/RANKL permet la transduction de signaux intracellulaires indispensables à la différenciation ostéoclastique [34]. Les souris transgéniques déficientes pour le gène RANK développent une ostéopétrose caractérisée par l'absence d'OC, phénotype similaire à celui des souris invalidées pour le gène codant pour RANKL. En outre, les précurseurs ostéoclastiques de ces souris sont incapables de se différencier en OC *in vitro* [67]. Ainsi, RANK est indispensable à l'action de RANKL.

1.2.4 OPG ; récepteur leurre de RANKL et inhibiteur de la résorption osseuse :

Récepteur soluble de RANKL, l'OPG est un puissant inhibiteur de la résorption osseuse en agissant comme un récepteur leurre ; il se lie à RANKL et bloque son interaction avec RANK inhibant ainsi la différenciation et l'activation ostéoclastique (voir la figure 2). L'OPG peut également agir directement sur les OC matures, où elle régule la production de protéases impliquées dans la dégradation de la matrice organique. Elle inhiberait l'expression de la cathepsine K et de la TRAP (*Tartrate-resistant acid phosphatase*), et stimulerait celle de la MMP-9 (*Métalloprotéinases Matricielles-9*). L'OPG aurait également la capacité d'induire l'apoptose des OC [68]. RANKL contrôle la biodisponibilité de l'OPG, son internalisation et sa dégradation, et l'OPG module la demi-vie de RANKL [69]. *In vivo*, les souris transgéniques surexprimant l'OPG développent une ostéopétrose caractérisée par un défaut de la différenciation ostéoclastique. Les souris déficientes en OPG développent quant à elle, une ostéoporose sévère avec une augmentation de la différenciation et de l'activité des OC. L'administration d'OPG chez le rat entraîne une augmentation de la densité minérale osseuse (DMO) et du volume osseux, avec une diminution rapide du nombre d'OC actifs, et prévient la perte osseuse secondaire à l'ovariectomie

[20, 70, 71]. Ainsi, l'OPG est le facteur permettant de maintenir l'équilibre entre la résorption et la formation osseuse.

1.2.5 Rôle de l'OPG dans les pathologies osseuses :

Puisque l'OPG est un acteur central dans la régulation du remodelage osseux, un certain nombre d'études ont évalué son rôle dans les maladies liées à l'os. Son implication a été particulièrement évaluée dans l'ostéoporose, la polyarthrite rhumatoïde, la parodontite et la maladie de Paget juvénile. Dans la majorité des cas, un traitement par l'OPG améliore les effets liés à ces pathologies. L'ostéoporose caractérisée par une faible DMO en raison de l'activité accrue des OC liée à la carence chez les femmes en œstrogènes, peut être contrôlée par l'injection d'œstrogènes ou de bisphosphonates. Ces deux molécules stimulent la production d'OPG par les OB [55, 72, 73]. La polyarthrite rhumatoïde induite par une inflammation chronique de la membrane synoviale des articulations peut être « ralentie » dans les modèles murins de la maladie par l'injection d'OPG qui prévient l'accumulation des OC [74-76]. La parodontite liée à une prolifération bactérienne du tissu conjonctif gingival entraînant une destruction osseuse alvéolaire pourrait être traitée par l'OPG [77-79]. Enfin la maladie de Paget juvénile caractérisée par un remaniement osseux accéléré de l'ensemble du squelette est induite par des mutations du gène OPG sur les domaines 2, 3 et/ou 4 et le domaine de mort. L'injection d'OPG recombinante améliore la DMO et réduit le remodelage osseux [80-82].

1.3 OPG ; facteur de survie cellulaire :

Pendant des années, l'intérêt porté sur l'OPG était axé sur sa capacité à inhiber l'ostéoclastogénèse, jusqu'à ce qu'on découvre que cette protéine était également capable de lier le ligand inducteur d'apoptose relatif au TNF, TRAIL. Ce ligand de la famille des TNF fonctionne sous forme d'homotrimer, son activité biologique est la surveillance immunitaire et l'induction de l'apoptose dans les cellules tumorales [83].

In vivo, TRAIL est exprimé dans plusieurs tumeurs malignes [84]. Il est le principal médiateur de l'activité cytotoxique des cellules tumorales et est produit par les monocytes en réponse à l'interféron- γ ou- α [15]. Les cellules normales sont en principe insensibles à l'action du TRAIL, mais de plus en plus d'expériences montrent son rôle dans la régulation de divers tissus sains. Des études réalisées sur des souris déficientes en TRAIL ont démontré son rôle anti-tumoral. En effet, les souris TRAIL^{-/-} sont plus sensibles à l'initiation tumorale [85]. TRAIL exerce ses effets par sa liaison à deux classes de récepteurs membranaires (DR4 et DR5) portant des domaines dits de mort [86]. L'activation de DR4/DR5 par TRAIL déclenche la cascade de mort cellulaire commune à la famille des TNF. Pour éviter l'apoptose induite par TRAIL, certaines cellules adoptent une stratégie de synthèse de récepteurs membranaires leurres ne possédant pas les domaines de mort ou libèrent des cytokines capables de lier le TRAIL et l'inhiber. Au moins 2 de ces récepteurs de surface cellulaire ont été identifiés: DcR1 et DcR2 [87], et l'OPG représente une de ces cytokines puisqu'elle est capable d'inhiber complètement l'action

de TRAIL. Cette capacité qu'a l'OPG à lier TRAIL et à empêcher son association avec les récepteurs induisant la mort cellulaire, lui confère sa qualification de facteur de survie cellulaire, notamment dans le cas des tumeurs. Enfin, Cross *et al.* suggèrent que l'OPG pourrait intervenir dans la promotion de la survie cellulaire via un mécanisme indépendant du TRAIL [13], mécanisme qui reste à identifier et qui impliquerait probablement l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et la voie de signalisation NF- κ B (*nuclear factor-kappa B*) [88].

1.4 OPG et système immunitaire :

Les systèmes squelettique et immunitaire ont une relation complexe. Ils sont intimement liés à l'ostéoclastogenèse et l'hématopoïèse qui se produisent dans la moelle osseuse. Les cellules osseuses et immunitaires partagent également des précurseurs hématopoïétiques. En outre, les systèmes squelettique et immunitaire partagent diverses cytokines qui régulent les voies de transduction impliquées dans l'ostéoclastogenèse et l'activation du système immunitaire. C'est le cas de la triade OPG/RANK/RANKL. Ainsi, malgré le fait que l'OPG soit principalement impliquée dans le remodelage osseux, un faisceau d'arguments plaide pour une interaction de cette protéine avec la réponse immunitaire [89], où son rôle est souvent associé à RANKL et TRAIL. Il a été démontré que l'OPG interagit en particulier avec plusieurs cellules du système immunitaire dont les monocytes, les cellules dendritiques et les cellules T et B.

1.4.1 Les monocytes :

Seshasayee *et al.* ont montré qu'une stimulation de monocytes pendant 24 heures avec des doses croissantes de RANKL induit une production accrue de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α et l'IL-1, ainsi qu'une activation de la synthèse de cytokines T comme l'IL-12 et l'IL-6. Cette stimulation induit également une expression du CD80, du CD86 et du CMHII par les monocytes humains. RANKL peut donc induire la présentation de l'antigène par les monocytes aux cellules T, activant ainsi l'immunité adaptative. Il a été également démontré que l'ajout de l'OPG dans ce milieu est capable d'inhiber totalement les effets induits par RANKL. Ceci suggère un rôle régulateur de l'OPG analogue à celui qu'elle joue dans le remodelage osseux [90]. L'OPG module également la migration des monocytes via sa liaison au syndécanne-1 (SDC-1) et une signalisation impliquant les voies phosphatidylinositol 3-kinase/Akt [3].

1.4.2 Les cellules B :

Yun *et al.* ont évalué le rôle d'OPG dans le développement des cellules B chez des souris OPG^{-/-}. Ils ont cultivé des cellules pro-B de souris OPG^{-/-}, OPG^{+/-} et OPG^{+/+} en présence d'IL-7, une cytokine nécessaire à la survie et la prolifération des cellules pro-B. Les cellules pro-B des souris OPG^{-/-} prolifèrent plus que celles issues des souris OPG^{+/-} et OPG^{+/+}, suggérant que l'OPG régule négativement la prolifération des cellules pro-B [2]. RANKL est connu pour réguler le développement de cellules B aux stades précoces. Des preuves récentes d'une nouvelle souche de souris mutante OPG^{-/-} confirment l'idée que l'interaction entre OPG, RANK et RANKL

règle le développement des cellules B et, éventuellement, les fonctions de cellules B matures [63].

1.4.3 Les cellules dendritiques et les cellules T:

Les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigènes spécialisées dans l'initiation de la réponse T. Elles ont la capacité de migrer *in vivo* à partir des tissus où elles rencontrent les antigènes, vers les tissus lymphoïdes contenant les cellules T et où la réponse immune est initiée. L'expression de RANK a été détectée sur les cellules dendritiques, et son activation par RANKL exprimé à la surface des lymphocytes T prévient l'apoptose des cellules dendritiques tout en entraînant la prolifération des lymphocytes T. Ces effets sont supprimés en présence d'OPG. En effet, l'OPG diminue la production de cytokines engendrées par la stimulation des cellules dendritiques par RANKL, c'est-à-dire des cytokines pro-inflammatoires comme IL-6, IL-11 et des cytokines produites par la prolifération des lymphocytes T : IL-12 et IL-15 [91, 92]. Ainsi, il a été démontré qu'un traitement des lymphocytes T à l'OPG empêche leur réponse immunitaire à médiation cellulaire dans un modèle de souris, ce qui est dû à une forte réduction de la survie des cellules dendritiques [93]. D'autre part, TRAIL produit par les cellules T activées et les cellules dendritiques induit l'apoptose de ces dernières. Etant capable de se lier au TRAIL, OPG peut donc également jouer un rôle contraire qui est celui de maintien de survie des cellules dendritiques. Ainsi l'équilibre entre les niveaux de RANKL, du TRAIL et de l'OPG à des stades précoces ou tardifs de la réponse immunitaire est déterminant pour le sort des cellules dendritiques et de la réponse immunitaire.

1.5 OPG et système hématopoïétique :

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont responsables de la production des cellules sanguines tout au long de la durée de vie d'un individu [94]. Elles sont localisées le long de l'endoste¹ et dans des sites périvasculaires adjacents à l'endothélium où plusieurs facteurs régulent leur différenciation [95]. Plusieurs types cellulaires de l'endoste dont les OB, les cellules souches mésenchymateuses et les cellules stromales ont été décrites pour réguler la maintenance des CSH dans la niche ostéoblastique [96]. Afin d'identifier les facteurs impliqués dans ce processus complexe, Weisel *et al* ont isolé plus de 100 lignées de cellules stromales de l'aorte-gonado-Mésonephros d'embryons de souris et ont vérifié leur capacité à maintenir les CSH dans leur niche. Ils ont démontré que de multiples clones ont une grande efficacité dans le soutien, le maintien et l'expansion de ces CSH et observé que l'OPG jouait un rôle essentiel dans l'expansion des CSH, suggérant ainsi, un rôle potentiel de l'OPG dans la croissance et la maintenance des CSH [97]. Il semble que l'OPG soit fortement exprimée par diverses lignées de cellules stromales et favorise l'expansion des CSH. Un traitement de cellules CD34⁺ avec l'OPG induit une prolifération cellulaire accrue, accompagnée d'une augmentation de la fonction des

¹ Fine couche de cellules ostéoprogénitrices/ostéoclastes/cellules bordantes recouvrant la face interne de l'os.

cellules progénitrices. L'ensemble de ces effets est partiellement neutralisé par l'ajout de RANKL [98]. D'autre part, la déficience en OPG chez la souris provoque une diminution de la masse osseuse accompagnée d'une baisse de l'activité hématopoïétique [99]. Ainsi, l'OPG a été décrite par Moldenhauer *et al* comme un facteur de croissance hématopoïétique [4].

Un autre mécanisme via lequel l'OPG pourrait intervenir dans le système hématopoïétique est son interaction avec TRAIL. Suivant Zauli *et al*, l'OPG libérée dans le microenvironnement de la moelle osseuse par les cellules stromales médullaires et les OB est capable de moduler l'activité biologique de TRAIL. L'OPG est donc aussi un puissant facteur de survie pour les progéniteurs érythroïdes et mégacaryocytaires [100].

Chagraouia *et al* ont montré une forte expression de l'OPG dans le cytoplasme des MK et les proplaquettes murins. Sa libération dans le milieu conditionné de ces cellules en culture est également détectée *in vitro* [29]. Par ailleurs, l'étude menée par Chollet *et al* atteste que l'OPG est colocalisée avec le facteur de Von Willebrand (VWF) au sein des granules alpha des MK humains et des plaquettes qui en dérivent [101]. Suivant ces 2 équipes, l'OPG est exprimée à tous les stades de maturation mégakaryocytaire, et qu'elle soit située à l'intérieure des granules alpha ou à la périphérie de la cellule, sa localisation apicale est compatible avec sa fonction en tant que molécule de sécrétion.

La thrombopoïétine, une hormone qui stimule la prolifération et la maturation des MK, augmente fortement les taux d'expression d'ARNm codants pour l'OPG par ces cellules [29]. Les niveaux d'expression de l'OPG sont augmentés avec la maturation des MK [102]. Ces résultats pourraient expliquer pourquoi les MK matures deviennent insensibles à la cytotoxicité induite par TRAIL et suggèrent un rôle de l'OPG dans leur maturation.

1.6 OPG et physiopathologie vasculaire :

L'OPG est exprimée à la fois par les CML et les CE des parois artérielles et veineuses. Ainsi, son implication dans la physiopathologie vasculaire a été décrite par plusieurs auteurs. Des études menées chez l'homme ont montré que la prévalence de l'ostéoporose est souvent associée à une prévalence élevée de facteurs de risque cardiovasculaires voire de maladies cardiovasculaires avérées. Une association entre la fragilité osseuse et les manifestations cliniques de l'athérosclérose a été mise en évidence. Ce qui est aussi le cas pour la baisse de la DMO qui elle, est associée à une prévalence élevée de survenue d'accidents vasculaires cérébraux [26]. Des études menées sur des modèles animaux ont montré qu'un traitement à l'OPG empêche les dépôts calciques artériels liés aux traitements antithrombotiques par la warfarine ou à des doses élevées de vitamine D. En revanche, des niveaux sériques élevés en OPG ont été retrouvés chez des patients atteints de maladies coronariennes [11, 103], et ont été corrélés à un risque de décès d'origine cardiovasculaire 3 à 4 fois plus élevé [104, 105].

En plus de la forme soluble de l'OPG, une autre forme associée au VWF a été détectée dans les corps de Weibel Palade. Sa concentration sérique peut donc être rapidement augmentée

sous l'effet de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α et l'IL-1 β [106]. L'OPG est alors rapidement relarguée dans l'espace extracellulaire où elle joue un rôle dans le recrutement des leucocytes et des plaquettes sur les sites d'inflammation ou d'ischémie [14]. Nous décrivons dans la suite de ce chapitre l'implication de l'OPG dans la pathogenèse de l'athérosclérose et des maladies cardio-vasculaires.

1.6.1 Rôle de l'OPG dans la physiopathologie de l'athérosclérose:

La calcification des parois artérielles, phénomène actif similaire à celui de la formation osseuse, est fréquemment associée à l'athérosclérose. La participation de l'OPG dans ce processus est apparemment liée à l'inflammation puisqu'une forte expression de l'OPG par les cellules inflammatoires présentes dans les plaques d'athérosclérose a été observée [107]. De plus, l'expression de l'OPG par les CML et les CE est fortement augmentée sous l'effet de cytokines pro-inflammatoires contribuant ainsi à la dysfonction endothéliale [44]. En outre, l'OPG induit l'expression d' ICAM-1, de VCAM-1 et de la E-sélectine par les CE favorisant ainsi l'adhésion des monocytes à l'endothélium ; une première étape de la dysfonction endothéliale [108].

Les niveaux d'expression de l'OPG dans les plaques d'athérosclérose peuvent varier en fonction du type de la plaque: élevés dans les plaques les plus instables (symptomatiques), ils peuvent être très faibles dans les plaques stables (asymptomatiques) [109]. Les concentrations physiologiques en OPG protégeraient la paroi vasculaire contre la calcification. En effet les modèles animaux OPG^{-/-} montrent des artères calcifiées [110]. Toutefois, le traitement de ces souris OPG^{-/-} avec une OPG recombinante induit l'apparition de fibroses et une augmentation de l'expression du TGF- β 1 favorisant ainsi un rôle pathogène de l'OPG dans le développement, l'évolution et l'instabilité des lésions athérosclérotiques [111]. Enfin, une étude réalisée chez des femmes ménopausées a démontré que des niveaux sériques élevés en OPG sont associés à une augmentation de l'épaisseur de l'intima-média, un marqueur de l'athérosclérose précoce [112].

1.6.2 Le rôle prédictif de l'OPG dans les maladies cardiovasculaires

Au cours de ces dernières années, de nombreuses études cliniques rapportent une corrélation entre les niveaux sériques d'OPG et la morbi-mortalité cardiovasculaire liée aux maladies coronariennes, à la calcification vasculaire, aux complications diabétiques, à l'insuffisance cardiaque et à l'anévrisme de l'aorte abdominale. Un petit résumé de quelques-unes de ces études, est présenté dans le tableau II.

Tableau-II : Etudes épidémiologiques évaluant le rôle de l'OPG dans certaines maladies cardiovasculaires.

Etude	Objectif-cible	principales conclusions	Référence
Prospective	La mortalité due aux maladies cardiovasculaires cérébrales.	Corrélation significative entre les niveaux sériques d'OPG, la mortalité globale et la mortalité due aux maladies cardiovasculaires.	[104]
Transversale	La présence et/ou la sévérité de maladies coronariennes.	Corrélation significative entre la présence de l'OPG et de la gravité des maladies coronariennes.	[11]
Prospective	Progression de l'athérosclérose, des maladies cardiovasculaires et mortalité globale.	Forte corrélation entre les concentrations sériques basales de l'OPG, la progression de l'athérosclérose et l'apparition de maladies cardiovasculaires.	[105]
Prospective	La mortalité d'origine cardiovasculaire et mortalité globale.	Les concentrations plasmatiques élevées en OPG au début de maladies cardiovasculaires sont un signe de mauvais pronostic.	[9]
Transversale	Sévérité de maladies artérielles périphériques et l'apparition de l'ischémie.	Corrélation significative des niveaux de l'OPG chez les patients présentant des ulcérations ischémiques et corrélation positive avec la sévérité de la maladie.	[12]
Transversale	Calcifications de l'aorte, hypertrophie du ventricule gauche et maladies coronariennes.	Corrélation significative entre les niveaux d'OPG et la sévérité de maladies coronariennes mais pas avec la calcification aortique.	[113]
Prospective	Epaisseur de l'aorte abdominale.	Corrélation entre les niveaux sériques d'OPG et l'épaisseur de l'intima-média.	[40]
Transversale	Insuffisance cardiaque	Corrélation significative entre l'OPG et la sévérité de la maladie.	[114]
Transversale	L'ischémie myocardique silencieuse.	Augmentation des niveaux d'OPG chez les patients asymptomatiques.	[115]
Transversale	Infarctus aigu du myocarde et maladies coronariennes stables.	Corrélation significative des niveaux d'OPG chez les patients atteints d'infarctus du myocarde aigu et de maladies coronariennes stables.	[116]
Prospective	Mortalité due aux maladies cardiovasculaires.	Corrélation significative entre les niveaux de base d'OPG et la mortalité.	[117]
Transversale	Stabilité de la plaque carotidienne.	Corrélation inverse entre les niveaux sériques d'OPG et la stabilité de la plaque	[107]
Prospective	La mortalité à long terme.	Les niveaux sériques d'OPG sont prédictifs de la mortalité à long terme et du développement d'une insuffisance cardiaque chez les patients atteints de syndromes coronariens aigus.	[10]
Prospective	Risque relatif de futurs événements coronariens.	L'OPG est associée au risque d'apparition des événements coronariens.	[118]
Prospective	Mortalité cardiovasculaire.	L'OPG semble être un facteur de risque indépendant pour la mortalité globale et les décès d'origine cardiovasculaire.	[119]

Prospective	Calcification des artères coronaires, incidence de maladies et mortalité.	L'OPG est associée à un risque accru d'incidents cardiovasculaires et de mortalité. Log-OPG est positivement lié à de multiples facteurs de risque des maladies cardiovasculaires.	[120]
Prospective	Décès dus aux maladies cardiovasculaires, à l'infarctus du myocarde et mortalité globale.	L'OPG est associée à un risque accru de mortalité globale, de mortalité par maladies cardio-vasculaires et d'infarctus du myocarde.	[8]
Prospective	Décès d'origine cardiovasculaire.	les taux sériques d'OPG sont un facteur prédictif de la mortalité chez les patients atteints de maladies coronariennes stables.	[121]
Prospective	Risque d'infarctus du myocarde, d'accidents vasculaires cérébraux et de mortalité.	Les concentrations sériques d'OPG sont associées à un risque d'infarctus du myocarde, d'accidents vasculaires cérébraux, de la mortalité globale, de la mortalité due à l'ischémie cardiaque et aux accidents vasculaires cérébraux.	[6]
Prospective	Infarctus du myocarde non fatal, décès d'origine cardiovasculaire.	les niveaux élevés d'OPG sont un facteur prédictif indépendant du pronostic des patients atteints de lésions coronaires intermédiaires.	[122]

1.6.3 La relation entre OPG et les facteurs de risque cardiovasculaire :

Plusieurs associations entre les concentrations sériques en OPG et les facteurs de risque cardiovasculaire ont été rapportées. D'une manière générale, les taux plasmatiques d'OPG sont associés à des états inflammatoires [123, 124] et comme nous l'avons vu plus haut, corrélés à la sécrétion de différentes cytokines inflammatoires [125, 126] et de certaines hormones (insuline) [127]. Des corrélations positives avec les niveaux d'homocystéine, du tabagisme, de la glycémie à jeun et de l'hémoglobine glycosylée ont été également décrites. Par ailleurs, une augmentation importante de l'OPG avec l'âge et chez les patients atteints de diabète, d'hypothyroïdie ou d'insuffisance rénale sévère a été rapportée, et une association entre l'OPG et le vieillissement a été ainsi suggérée [103, 105, 128, 129].

Dans l'étude de Terekeci *et al.*, les taux plasmatiques d'OPG étaient sensiblement associés au cholestérol total, au cholestérol HDL, à la lipoprotéine A, et à l'apolipoprotéine B [130]. De plus, OPG a été proposée comme un marqueur de la dysfonction endothéliale. La dysfonction endothéliale est évaluée par la mesure de la dilatation de l'artère branchiale induite par le flux (FMAD ; *flow-mediated dilatation of the brachial artery*). Plusieurs études ont démontré une association entre les concentrations d'OPG et la réduction de la FMAD chez les patients diabétiques [131, 132]. La FMAD est également en corrélation négative avec les concentrations sériques d'OPG chez patients atteints de maladies artérielles périphériques [133]. Akinçi *et al.* ont observé une association significative entre l'OPG et l'épaisseur de l'intima-media de la carotide chez les femmes atteintes de diabète gestationnel, ce qui suggère que l'OPG pourrait jouer un rôle dans la pathogenèse de la dysfonction endothéliale [134].

Au sujet du diabète, les concentrations périphériques d'OPG ont été retrouvées plus élevées dans les deux types 1 et 2 de patients diabétiques. D'ailleurs, les femmes diabétiques présentent des concentrations sériques d'OPG 30% plus élevées que les sujets contrôles. Les niveaux d'OPG semblent être ainsi, étroitement liés à l'apparition ainsi qu'à la progression de cette maladie [135]. D'autre part, les niveaux d'OPG sont fortement liés à la fois à la pression artérielle systolique et diastolique [136], ce qui suggère que les concentrations sériques d'OPG pourraient être un marqueur aussi de l'hypertension [137, 138]. Et enfin, OPG semble avoir un rôle dans l'insuffisance cardiaque ce qui est, en partie, attribuable à l'induction de des MMP-2 et -9 qui entraînent la dégradation de la matrice, le remodelage ventriculaire défavorable et la détérioration de la fonction du myocarde [139].

1.7 OPG et tumorigénèse :

La découverte que l'OPG est un inhibiteur potentiel de l'activation et de la maturation des OC, a initié la recherche sur la possibilité d'utiliser cette molécule comme agent thérapeutique dans le traitement des maladies associées à une augmentation de la résorption osseuse ou au développement des métastases osseuses. La dérégulation du système RANKL/OPG est en effet, la cause principale des pathologies osseuses consécutives d'une tumeur primaire comme le cancer du sein, de la prostate et les myélomes multiples. Cependant, la découverte de l'habileté qu'a cette molécule à lier TRAIL et inhiber son activité a controversé son éventuelle utilisation comme agent thérapeutique.

L'OPG et ses deux ligands, TRAIL et RANKL, sont exprimés à différents niveaux dans les tissus normaux et tumoraux, et leur rôle dans le microenvironnement tumoral est loin d'être établi. OPG pourrait exercer un effet anti-ou pro-tumorale selon qu'elle soit associée à RANKL ou à TRAIL, ce qui dépend des concentrations relatives des deux cytokines dans l'environnement tumorale [5, 13, 140]. En se liant à TRAIL, elle inhibe l'apoptose de certaines cellules tumorales, et en se liant à RANKL elle inhibe l'ostéoclastogénèse et diminue la capacité de migration des cellules tumorales en raison de l'inhibition de l'interaction entre RANKL et RANK [141]. De plus, l'activité de l'OPG peut être régulée par les protéoglycanes sulfatés. La capture de l'OPG par les protéoglycanes de la matrice extracellulaire de l'os, favorise l'ostéolyse, contribuant ainsi à des troubles osseux conduisant à l'apparition de métastases. L'interaction de l'OPG avec les protéoglycanes empêche sa liaison avec le TRAIL et le RANKL, et diminue son temps de demi-vie [142, 143]. D'ailleurs, certaines cellules tumorales comme les cellules de myélomes humains, sécrètent d'avantage de syndécanne-1 pour inhiber l'action de l'OPG et augmenter la maturation des OC [144]. Par conséquent, les concentrations relatives des protéoglycanes sont également déterminantes de l'activité anti- ou pro-tumorale de l'OPG.

L'OPG est sécrétée par un grand nombre de cellules tumorales, du cancer du sein, de la prostate [145-147], du colon [148, 149], de la vessie [150] et d'ostéosarcomes [151]. Ses niveaux d'expression sont en général corrélés à l'agressivité des cancers et à leur degré métastatique [152-

155]. D'ailleurs, elle a été proposée comme un marqueur des stades d'avancement de certains cancers dont celui du colon et du pancréas [148, 150, 156, 157]. Il semblerait que l'OPG favorise le développement des métastases osseuses conséquentes à certaines tumeurs (le cancer du sein notamment), où elle joue un rôle multifactoriel. Non seulement elle inhibe d'une façon dose-dépendante l'action de TRAIL mais elle est également en mesure d'attirer les métastases sur le site osseux [154, 158, 159].

Les métastases osseuses dans le cancer de la prostate sont très souvent ostéocondensantes. Chez les patients ayant ce type de métastases on retrouve des taux sériques élevés en OPG, ce qui résulte probablement de la sécrétion d'OPG par les cellules tumorales et/ou au fait que ces dernières libèrent des facteurs qui stimulent la production d'OPG par les OB [145]. L'implantation de cellules du cancer de la prostate (OPG-C4-2) qui surexpriment l'OPG, en sous-cutané chez la souris, n'exerce aucun effet sur le volume et la croissance tumorale. Par contre, l'implantation de ces mêmes cellules dans l'os réduit significativement le volume de la tumeur. Donc, l'OPG n'a pas d'effet direct sur la croissance des cellules tumorales mais, en diminuant l'ostéolyse associée aux tumeurs celle-ci minimise l'approvisionnement en facteurs de croissance et donc limite l'espace de la tumeur qui, pour se développer a besoin des facteurs libérés à partir des cavités de l'ostéolyse [160].

Les cellules de myélomes humains ne produisent pas l'OPG, par contre elles ont la capacité de diminuer sa sécrétion par les d'autres types cellulaires et diminuer ainsi ses concentrations locales. [144]. Cette diminution de la production d'OPG est susceptible de contribuer aux maladies osseuses observées dans le cas des myélomes multiples, où l'activité des ostéoclastes est accrue. Cependant, l'observation selon laquelle OPG peut inhiber l'apoptose, suggère qu'il existe un équilibre délicat entre les effets bénéfiques de l'OPG et les effets potentiellement néfastes. Tenant compte de cela, un peptidomimétique d'OPG ; OP3-4 a été développé. Le traitement des cellules murines mononuclées du sang périphérique avec l'OP3-4 inhibe la formation des ostéoclastes, et contrairement à l'OPG, ce peptide n'inhibe pas l'apoptose induite par TRAIL chez les cellules du myélome. Des expériences utilisant ce peptide sur des souris porteuses de myélome, ont montré des résultats prometteurs en effet, il est capable de réduire l'ostéolyse et la masse tumorale [161].

Les tumeurs locales osseuses sont souvent agressives et les ostéolyses associées sont sévères [162]. Les ostéosarcomes sont des tumeurs primitives osseuses caractérisées par leur capacité à former un tissu ostéoïde et se métastasent prioritairement dans l'os, les poumons et le foie [163]. Il a été démontré que l'OPG produite par les cellules d'ostéosarcome favorisait la croissance tumorale [140]. De plus, une surexpression de RANKL dans les ostéosarcomes humains a été rapportée, ce qui vient probablement perturber le remodelage osseux et favoriser le développement des ostéolyses [164]. Des études menées chez des animaux présentant un

ostéosarcome, ont montré qu'un traitement à l'OPG-Fc², bloque la destruction osseuse induite par la tumeur [163]. Enfin, une étude plus récente montre qu'un traitement des cellules d'ostéosarcome humain au 2-méthoxyestradiol³ stimule l'expression d'OPG ce qui expliquerait probablement les effets bénéfiques de cet agent [165].

1.8 OPG et angiogenèse :

L'implication de l'OPG dans la vascularisation a été suggérée pour la première fois en 2000 par l'équipe de Malyankar, qui ont observé son expression par les CE extraites de l'aorte de rats [166]. Ensuite d'autres auteurs ont documenté son expression sur des CE de macro- et micro-vaisseaux [44, 47, 106]. En conditions physiologiques, l'OPG libérée dans la paroi vasculaire provient essentiellement des CML et non pas des CE [167]. En effet, Les CE sécrètent de faibles quantités d'OPG (environ 2ng/ml/10⁶ cellules/24h) mais celles-ci peuvent être multipliées par un facteur de 15 dans des conditions inflammatoires sous l'effet du TNF- α (32ng/ml/10⁶ cellules/24h) [168]. Au sein des CE, l'OPG est localisée dans les corps de Weibel-Palade, associée au VWF. Lors de la stimulation des CE avec le TNF- α et IL-1 β *in vitro*, ce complexe est rapidement libéré dans le milieu de culture. *In vivo*, il est également retrouvé dans le sérum humain [106]. L'équipe de Malyankar a démontré un rôle protecteur de l'OPG sur les CE microvasculaires humaines (HMVECs ; *human microvascular endothelial cells*) de l'apoptose induite par une carence en facteurs de croissance. Au départ, ils ont suggéré un mécanisme qui impliquerait l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et l'activation de la voie de signalisation NF- κ B [166]. Cependant, une étude complémentaire publiée par la même équipe en 2004, a révélé la présence d'un complexe OPG-TRAIL dans le surnageant des HMVECs cultivées sur l'ostéopontine, ligand de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, en condition sans sérum. L'OPG protégerait donc les CE de l'apoptose via son interaction avec TRAIL [169]. Cet effet anti-apoptotique de l'OPG sur les CE a également été démontré chez les patients atteints de parodontite. Kobayashi-Sakamoto *et al.* ont ainsi montré que *Porphyromonas gingivalis*; un pathogène majeur de la parodontite de l'adulte qui affecte profondément la vascularisation du parodonte, stimule la sécrétion de l'OPG par les HMVECs. L'OPG ainsi synthétisée est aussitôt dégradée par la bactérie [78]. L'OPG semble jouer un rôle protecteur sur les HMVECs du détachement et de l'apoptose induite par les cystéines protéinases libérées par le *Porphyromonas gingivalis*. Par ailleurs, l'OPG induirait une surexpression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ par les CE, améliorant ainsi leur adhésion à la matrice extracellulaire, ce qui les protégerait de l'apoptose subséquente au détachement cellulaire [170].

Les effets de l'OPG sur l'angiogenèse n'ont pas été vraiment étudiés mais quelques études ont cependant montré son rôle dans la vascularisation des tumeurs. Ainsi en 2006, l'équipe de Cross a confirmé une fois de plus l'effet pro-apoptotique de l'OPG sur les CE ; un effet qui

² Protéine chimérique dont la partie Fc de l'immunoglobuline humaine IgG1 est fixée par liaison covalente à l'extrémité C-terminale riche en cystéine de l'OPG

³ 2ME2 (nom commercial Panzem) Métabolite naturel de l'estradiol anti-angiogène et induit l'apoptose des cellules cancéreuses

n'impliquerait pas cette fois-ci, TRAIL. Elle a également rapporté une plus grande capacité des CE de type HUVECs (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) à former des pseudo-tubes sur Matrigel. Un marquage immunohistochimique de coupes provenant de plusieurs tumeurs malignes et bénignes a révélé une forte expression d'OPG par les CE des tissus malins dans certains cancers (cancer du sein, cancer colorectal). Aucune coloration similaire n'a été observée dans les CE des tissus sains environnants. Cette surexpression d'OPG est donc propre aux zones de malignité. L'expression de l'OPG par les CE semble être liée à une interaction directe des cellules cancéreuses avec les CE. Cette stimulation de la sécrétion d'OPG impliquerait l'activation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et de la voie NF- κ B [171]. Secchiero *et al.* a observé un lien entre le gène suppresseur des tumeurs p53 et la sécrétion de l'OPG. En effet les CE n'exprimant pas ce gène libèrent des taux beaucoup plus élevés d'OPG que les cellules contrôles [172]. Il semble que l'OPG soit capable d'induire l'expression de certains facteurs pro-angiogènes comme l'angiopoïétine-2 (Ang-2), et de certaines molécules d'adhérence : ICAM-1, VCAM-1 et la E-sélectine par les HUVECs stimulées au TNF- α [173]. Par ailleurs l'OPG recombinante favorise la prolifération des CE microvasculaires en induisant l'activation de la voie Erk1/2. Ces effets sont régulés par les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$ [174].

Cependant, les travaux menés par Cackowski *et al.* montrent que l'OPG inhibe d'une façon dose-dépendante l'angiogénèse induite par des peptides qui activent les récepteurs de l'hormone thyroïdienne dans un modèle d'explants métatarsiens chez la souris, via son action sur la formation des ostéoclastes [175]. Ainsi, on peut remarquer que les études menées sur l'implication de l'OPG dans le processus angiogénique se limitent à son implication dans le maintien de la survie des CE matures et sur leur prolifération.

Conclusion :

Le meilleur moyen de conclure sur les diverses fonctions physiopathologiques de l'OPG est d'étudier ce schéma résumant les connaissances actuelles sur son expression, sa régulation et ses fonctions putatives, souvent associées à RANKL et à TRAIL (figure 3 Kiechl *et al.*).

**Autorisation de diffusion
non obtenue.**

Figure-3 : Schéma représentant l'expression, la réglementation et les propriétés fonctionnelles de l'OPG (Kiechl *et al.*, 2006).

Légende : DC: cellules dendritiques ; EC: cellules endothéliales ; FC: Foam cell; IL: interleukine; MC: monocytes et macrophages ; OB : ostéoblastes; OC: ostéoclastes; PPAR: Peroxisome proliferator-activated receptor ; SMC: cellules musculaires lisses.

Chapitre 2 : mécanismes de formation de nouveaux vaisseaux ; angiogenèse versus vasculogenèse

Introduction :

L'importance du système vasculaire est révélée par son émergence dès le début du développement embryonnaire. Du fait de son rôle essentiel de fournir l'oxygène et les nutriments aux tissus en développement, il constitue le premier système fonctionnel chez les vertébrés. Ce système est également essentiel à la réparation des tissus endommagés chez l'adulte [176]. Le système vasculaire découle de l'action de trois processus : la vasculogenèse, l'angiogenèse et l'artériogenèse [177]. La vasculogenèse donne naissance au premier vaisseau sanguin permettant ainsi l'établissement d'un plexus vasculaire primaire. L'angiogenèse quant à elle, est le bourgeonnement de nouvelles branches capillaires à partir de vaisseaux sanguins préexistants permettant un développement spectaculaire du plexus vasculaire. L'artériogenèse intervient dans l'augmentation du diamètre des vaisseaux par le recrutement de CML en réponse à un flux sanguin important et aux forces de cisaillement [178].

Grâce à ces trois mécanismes, un système circulatoire complexe est formé pour assurer la médiation d'un large éventail de processus physiologiques vitaux dont l'oxygénation des tissus, la livraison des éléments nutritifs, l'élimination des déchets, la réponse immunitaire, la régulation de la température et le maintien de la pression artérielle. Ce système est constitué de capillaires, d'artères et de veines constitués de plusieurs couches : l'intima formée de CE et de péricytes, la media composée principalement de CML et de leur matrice extracellulaire et dans les plus gros vaisseaux, de l'adventice composée principalement de fibroblastes et de leur matrice extracellulaire. La coordination précise des différentes composantes de ce système permet le maintien et le remodelage du système vasculaire régi par un réseau complexe de médiateurs et d'interactions cellulaires. Dans ce chapitre, nous résumons les voies principales impliquées dans la régulation de la vasculogenèse et de l'angiogenèse.

2.1 L'angiogenèse:

L'angiogenèse est un processus complexe, finement équilibré qui consiste en la formation de nouveaux vaisseaux à partir de ceux déjà existants. Elle joue un rôle essentiel au cours du développement embryonnaire et, plus tard à l'âge adulte, dans plusieurs conditions physiologiques et pathologiques comme l'ovulation, l'exercice musculaire prolongé, les tumeurs, la cicatrisation des plaies et les maladies ischémiques. La formation de nouveaux vaisseaux sanguins commence par un « switch » angiogénique induit par le facteur de transcription induit par l'hypoxie (HIF-1 α ; *hypoxia inducible factor-1 α*), l'acidose, l'activation des oncogènes ou l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs [179]. L'angiogenèse peut être induite par la germination de CE matures, résidentes à proximité d'une plaie vasculaire, qui prolifèrent, migrent et se remodelent en néovaisseaux ou par intussusception.

2.1.1 L'angiogenèse par bourgeonnement :

Au cours de ce processus, le bourgeonnement vasculaire est dirigé par une cellule endothéliale spécialisée appelée *tip cell*: c'est une cellule qui reçoit les premiers stimuli angiogéniques [180]. Cette cellule est connectée aux autres CE qui vont former le nouveau vaisseau. Le processus angiogénique est initié par la destruction locale de la membrane basale du vaisseau et la dissociation des péricytes qui augmente ainsi la perméabilité vasculaire. Cette étape est régulée par le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), le monoxyde d'azote (NO), les MMP et le système Ang/Tie, et favorise la migration de la *tip cell* vers le stimulus angiogénique. La dégradation de la matrice extracellulaire par les MMP permet aux CE de se détacher de la membrane basale, de migrer derrière la *tip cell* et d'envahir l'espace extravasculaire. Cette dégradation permet également la libération de facteurs de croissance pro-angiogènes emprisonnés dans la matrice, grâce à quoi, les CE prolifèrent et migrent en tandem tout en s'organisant en structures tubulaires tridimensionnelles dotés d'une lumière, par l'intermédiaire de molécule d'adhésion. La stabilisation de la paroi vasculaire, par la synthèse d'une membrane basale et par le recrutement de péricytes et de CML, est l'étape finale de l'angiogenèse qui conduit à la formation d'un nouveau réseau vasculaire fonctionnel [180, 181] (figure 4).

Autorisation de diffusion
non obtenue.

Figure-4: Représentation schématique de l'angiogenèse par bourgeonnement (Papetti et Herman, 2002).

2.1.2 L'angiogenèse par intussusception:

L'angiogenèse intussusceptive est l'expansion du réseau capillaire à travers un processus de remodelage complexe qui implique l'insertion de « colonnes » dans les vaisseaux existants. Ce processus comprend trois étapes au cours desquelles un vaisseau préexistant va se scinder en deux ; la croissance microvasculaire intussusceptive, l'arborisation intussusceptive et le

remodelage des branches intussusceptives [182] (figure 5). La croissance microvasculaire intussusceptive est déclenchée par le contact entre les CE des deux parois opposées d'un vaisseau qui s'invagine pour établir une zone de contact et former une structure appelée noyau à l'intérieur du vaisseau. Les facteurs de croissance, les péricytes et les myofibroblastes, envahissent le noyau sur lequel des fibrilles de collagène sont formées afin de le stabiliser. La formation d'une membrane basale termine cette étape. L'arborisation intussusceptive contribue à l'expansion de l'arbre vasculaire par la formation de petits vaisseaux. Enfin le remodelage des branches intussusceptives permet de moduler la structure et le nombre des vaisseaux en réponse à différents signaux locaux et systémiques [183].

**Autorisation de diffusion
non obtenue.**

Figure-5: Représentation schématique de l'angiogenèse par intussusception (Makanya et al, 2009).

Légende : EC : cellule endothéliale ; Pr : péricyte ; BM : membrane basale ; Fb : fibroblaste ; Co : collagène.

2.1.1 Angiogenèse physiologique versus angiogenèse pathologique :

Dans des conditions physiologiques, l'angiogenèse dépend de l'équilibre entre les régulateurs positifs et négatifs de l'angiogenèse (facteurs pro et anti-angiogéniques, tableau III) dans l'environnement périvasculaire et microvasculaire, et nécessite une activité fonctionnelle d'un certain nombre de molécules, notamment les facteurs de croissance et leurs récepteurs, les protéines de la matrice extracellulaire, les molécules d'adhésion et les enzymes protéolytiques. Au cours de l'angiogenèse, les CE ont un profil d'expression génique distinct caractérisé par un switch dans la balance cellulaire protéolytique vers un phénotype invasif accompagné par une différence dans l'expression des molécules d'adhésion et des récepteurs aux facteurs de croissance. Au sein des tissus normaux, la quiescence vasculaire est maintenue par une dominance de facteurs endogènes inhibiteurs d'angiogenèse au profit des facteurs pro-angiogènes. En revanche, l'angiogenèse pathologique est principalement liée à un déséquilibre entre les facteurs pro- et anti-angiogènes [180].

Tableau-III : Liste des facteurs pro et anti-angiogéniques.

Type	Nom
Pro-angiogènes	VEGF, FGF-2, PlGF, SDF-1, PDGF, TGF- α et - β , HGF, PAF, TNF- α , IGF, Ang-1, G-CSF, GM-CSF, Erythropoïétine, MCP-1, kallistéine tissulaire, Fractalkine/CX3CL1, IL-6, IL-8
Anti-angiogènes	Angiostatine, Endostatine, Thrombospondine-1, IFN- α et - γ , PTX3 IL-12, Ang-2, les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases.

Légende: VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor, FGF : Fibroblast Growth Factor, PlGF : Placental Growth Factor, SDF-1 : Stromal Cell-Derived factor-1, PDGF : Platelet-Derived Growth Factor, TGF : Transforming Growth Factor, HGF: Hepatocyte Growth Factor, PAF : Platelet Activating Factor, TNF : Tumor Necrosis Factor, IGF : Insulin-like Growth Factor, G-CSF : Granulocyte Colony-Stimulating Factor, GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, MCP : Monocyte Chemoattractant Protein, IL : interleukine, IFN : interferon.

a) *Angiogenèse physiologique :*

Chez l'adulte sain le réseau vasculaire est quiescent, mais la croissance de nouveaux vaisseaux s'observe physiologiquement dans certaines conditions. Au cours du cycle ovarien et de la grossesse chez la femme, le développement du processus angiogénique est fortement augmenté dans la muqueuse utérine et au niveau de l'endomètre en prévision de l'implantation de l'embryon [184]. L'angiogenèse intervient également dans le développement d'une circulation collatérale lors d'une activité physique soutenue où, un remodelage vasculaire est observé suite à une diminution du taux d'oxygène [185]. Le développement de nouveaux vaisseaux sanguins est aussi impliqué dans le processus de réparation tissulaire. En cas de lésion d'un tissu, l'inflammation locale amplifie la réponse angiogénique et la formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux environnants permettant ainsi, un apport nutritif au niveau des parties lésées. Ce phénomène est observé au cours de la cicatrisation normale post chirurgicale [186]. La majorité des os du squelette se développent à travers le processus d'ossification endochondrale selon lequel la matrice osseuse remplace le cartilage avasculaire. Durant ce processus, les cellules du centre du cartilage (diaphyse) ou de la plaque de croissance épiphysaire des os longs transitent de chondrocytes au repos en chondrocytes en prolifération et deviennent une cible d'invasion par des vaisseaux sanguins. Les OC et les OB infiltrant coordonnent la dégradation du cartilage hypertrophique et la minéralisation de la matrice extracellulaire donnant naissance à une nouvelle matrice osseuse vascularisée [187].

b) *Angiogenèse pathologique :*

L'angiogenèse pathologique prend part à de nombreux processus de l'angiogenèse physiologique. Dans les deux cas, une cascade hautement coordonnée de fonctions cellulaires conduit à la création de nouveaux vaisseaux sanguins en réponse à la demande croissante en oxygène et en nutriments. En conditions pathologiques, l'angiogenèse est impliquée dans les phénomènes de croissance tumorale, des affections oculaires comme la dégénérescence maculaire

liée à l'âge, des maladies inflammatoires dont la toxémie gravidique, l'endométriase, la polyarthrite rhumatoïde, le psoriasis, l'ulcère et la maladie de Crohn [179]. Ici nous allons aborder les deux cas les plus cités dans la littérature, à savoir les tumeurs et les ischémies.

→ Néo-angiogenèse post-ischémique :

En cas d'occlusion d'une artère, le tissu en aval se trouve en situation d'hypoxie. Cette hypoxie entraîne une série de réponses systémiques et locales comme l'accélération du débit cardiaque, la vasodilatation et l'hyperventilation. Ces réponses cellulaires sont coordonnées par HIF-1 α qui, activé par une diminution de la pression partielle en oxygène, déclenche le processus de néo-vascularisation [188]. La capacité de l'organisme à développer spontanément de nouveaux vaisseaux sanguins collatéraux constitue une réponse adaptative importante à l'occlusion vasculaire. Les principaux mécanismes à l'origine de la néoangiogenèse post-ischémique sont l'hypoxie, l'inflammation et le recrutement des CE. La régulation de ce processus implique également le recrutement des PECs qui sont mobilisés depuis la moelle osseuse vers la circulation périphérique, et qui migrent vers les tissus ischémisés pour s'incorporer aux sites de néo-vascularisation où leur différenciation en CE s'achève [189]. Le processus de néo-vascularisation dépend largement de la réaction inflammatoire puisque des macrophages et des monocytes activés ont été retrouvés dans les zones où le processus angiogénique est important [190].

→ Néo-angiogenèse tumorale :

Les tumeurs sont des populations de cellules dérivées de l'hôte qui ont perdu la capacité de réguler leur croissance et subissent donc une prolifération non contrôlée. Si plusieurs caractéristiques les distinguent de leurs homologues non transformées, de nombreux aspects de cellules tumorales sont semblables à ceux de cellules normales. Une similitude importante est le besoin d'un approvisionnement en oxygène et en nutriments ainsi qu'un moyen efficace d'éliminer les déchets pour maintenir les processus métaboliques. Ainsi, quand une tumeur atteint un volume de 2-3 mm³, sa demande en oxygène et en nutriments dépasse l'offre locale. Un microenvironnement hypoxique se forme pour promouvoir l'angiogenèse. Ce processus hypoxique entraîne l'activation transcriptionnelle du HIF-1 α qui induit l'expression de facteurs pro-angiogènes capables de déclencher le processus angiogénique [191]. L'activation coordonnée de nombreux facteurs pro et anti-angiogéniques est une exigence principale pour l'angiogenèse physiologique. Le développement des vaisseaux tumoraux résulte principalement d'une surexpression du VEGF-A. Les vaisseaux ainsi formés présentent de nombreuses anomalies, comme la sinuosité, la fragilité, l'absence fréquente de péricytes ainsi qu'une tendance aux saignements. En outre, les parois des vaisseaux tumoraux peuvent être constituées de CE et de cellules tumorales. Ces anomalies fonctionnelles sont considérées comme un facteur limitant dans l'administration d'agents anti-tumoraux anti-angiogéniques, car ceux-ci peuvent transitoirement normaliser la vascularisation de la tumeur et augmenter l'apport en oxygène et en nutriments pour

le microenvironnement tumoral, ce qui favorise la dissémination des cellules tumorales vers des foyers métastatiques [192].

Une autre facette de la complexité de l'angiogenèse tumorale est la capacité qu'ont les cellules tumorales au moins dans certains mélanomes, à subir une dédifférenciation appelée mimétisme vasculogène et à former des canaux tumoraux permettant le passage du flux sanguin [193]. Il convient également de signaler, qu'en plus des CE recrutées sur place pour participer à la vascularisation de la tumeur, la présence des PECs, a été également rapportée sur les sites tumoraux [194].

2.2 La vasculogénèse embryonnaire et adulte :

Le développement du système circulatoire commence peu de temps après la gastrulation concomitante avec la formation des somites. Le processus de formation des vaisseaux à ce stade précoce du développement est appelé vasculogénèse, terme proposé par Risau et ses collègues en 1988 [195]. La vasculogénèse est alors décrite comme étant le processus par lequel de nouveaux vaisseaux sanguins se forment par une différenciation à partir du mésoderme, de cellules souches (hémangioblaste et angioblaste) en CE matures qui conduit à la formation d'un réseau vasculaire primitif.

Des études antérieures sur la vasculogénèse ont conclu que la formation de vaisseaux sanguins se produit à la fois en intra- et extra-embryonnaire. Le mésoderme embryonnaire, les sites extra-embryonnaires du sac vitellin, l'allantoïde et le placenta ont été identifiés comme les principales sources de cellules progénitrices qui participent à la vasculogénèse [196]. Dans le sac vitellin murin, les cellules progénitrices migrent, se différencient et s'associent en groupes appelés îlots sanguins entre les 6^{ème} et 7^{ème} jours du stade embryonnaire. Au sein de ces îlots, un sous-ensemble de cellules situées en périphérie, appelé angioblaste subissent une différenciation en CE vers le 8^{ème} jour, tandis que les cellules situées à l'intérieur deviennent des précurseurs hématopoïétiques qui donneront naissance aux cellules sanguines. Le terme hémangioblaste a été donné à l'ensemble des cellules qui forment les îlots sanguins qui donnent finalement naissance à la fois aux CE et aux cellules hématopoïétiques.

La découverte des cellules progénitrices circulantes, les PECs, dans la moelle osseuse et le sang périphérique adulte a remis en question la théorie selon laquelle la vasculogénèse se limitait au stade embryonnaire [17]. L'équipe d'Asahara a en effet, démontré que de nouveaux vaisseaux sanguins pouvaient se former chez l'adulte, non seulement grâce à la germination des CE matures (angiogenèse) mais aussi par la différenciation des PECs, indépendamment du système vasculaire préexistant (vasculogénèse adulte). En effet, ces chercheurs ont constaté que des cellules CD34+ dérivées de la moelle osseuse pouvaient acquérir les caractéristiques de CE matures et intégrer les nouveaux vaisseaux en formation sur des sites d'ischémie [17]. Des études ultérieures ont montré que la vasculogénèse postnatale contribuait à la réparation des lésions vasculaires en participant au processus de ré-endothélialisation rapide des vaisseaux dénudés ainsi qu'à la formation de

vaisseaux collatéraux dans les tissus ischémiques. Dans ce processus, les PECs sont mobilisés à partir de la moelle osseuse dans la circulation générale en réponse à des stimuli inflammatoires, migrent via la circulation sanguine aux sites de lésions vasculaires, où elles s'extravasent à travers l'endothélium et contribuent à la formation de néo-vaisseaux et à la réparation des vaisseaux endommagés en travaillant en collaboration avec les CE matures préexistantes (figure 6) [197].

Un nombre croissant d'études rapporte également la participation du processus de vasculogénèse à la vascularisation des tumeurs. Le recrutement de PECs dérivés de la moelle osseuse et leur intégration fonctionnelle dans les vaisseaux tumoraux ont été rapportés. La mobilisation des PECs est déclenchée par l'augmentation des niveaux circulatoires de plusieurs facteurs tels que le VEGF et le SDF-1 qui sont libérés par les tumeurs. Ces facteurs activent les PECs qui passent d'un état quiescent à un état pro-angiogénique afin de participer à la formation des vaisseaux tumoraux [198].

**Autorisation de diffusion
non obtenue.**

Figure-6: Représentation schématique des mécanismes impliqués dans le recrutement des PECs sur les sites revascularisation (Foubert, 2007) [199].

2.3 Les principaux acteurs impliqués dans la formation de nouveaux vaisseaux :

2.3.1 L'hypoxie et le système HIF :

HIF est un facteur de transcription composé de deux sous-unités : une forme constitutivement active appelée HIF-1 β et une sous-unité sensible à l'oxygène appelée HIF-1 α . Sous condition de normoxie, HIF-1 α est aussitôt dégradé après sa synthèse. L'hypoxie par contre induit son accumulation et sa dimérisation avec la sous-unité HIF-1 β pour lier l'ADN et activer la transcription de nombreux facteurs impliqués dans la régulation de l'angiogénèse. Il a été démontré que le système HIF pouvait réguler l'expression de plus de 60 gènes impliqués dans la

réponse tissulaire à l'hypoxie [200]. Des embryons HIF-1 α ^{-/-} meurent au cours de la gestation et affichent une vascularisation anormale. La surexpression de HIF-1 α quant à elle, induit la formation d'un réseau vasculaire dense normal. Ceci suggère que HIF-1 α régule aussi bien les gènes impliqués dans l'initiation et la formation des vaisseaux que ceux impliqués dans leur stabilité. La surexpression d'HIF-1 α induit la synthèse de plusieurs facteurs pro-angiogènes, le VEGF, PLGF, l'Ang-1 et -2 et le PDGF [200]. HIF-1 α induit également l'expression du SDF-1 qui mobilise les PECs dans la circulation depuis de la moelle osseuse [201].

2.3.2 Le système VEGF/VEGFR :

Le système VEGF activé par le système HIF, joue un rôle central dans l'angiogenèse et la vasculogenèse. Il intervient généralement par une action paracrine ce qui signifie que ce facteur agit sur les CE voisines des cellules qui le sécrètent. La famille des VEGF comprend un grand nombre de glycoprotéines solubles: les VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, *endocrine gland VEGF* (EG-VEGF), VEGF-E, VEGF-F, VEGF-b et PlGF. Le VEGF-A initialement appelé facteur de perméabilité vasculaire, est le plus impliqué dans les deux processus angiogénique et vasculogénique. Les VEGF-C et -D interviennent dans le développement des vaisseaux lymphatiques mais peuvent également participer à l'angiogenèse. EG-VEGF est plus spécifique, puisqu'il intervient seulement dans l'activité de CE des glandes endocrines. Le VEGF-b aurait plutôt une activité anti-angiogénique. Enfin le PlGF est connu pour stimuler l'angiogenèse en coordination avec le VEGF-A [202].

Les membres de la famille des VEGF interagissent avec trois récepteurs principaux : VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR) et VEGFR-3 (Flt-4). Ils sont tous membres de la famille des récepteurs au PDGF et possèdent un domaine extracellulaire constitué de répétitions d'immunoglobuline impliqués dans la liaison au VEGF et un domaine intracellulaire à activité tyrosine kinase [203]. Les VEGF peuvent également se fixer à d'autres molécules qui agissent comme des corécepteurs aux VEGFR et qui modulent la transduction du signal en aval, tel est le cas des neuropilines. Les neuropilines sont des glycoprotéines transmembranaires avec de courts domaines cytoplasmiques ne possédant pas d'activité catalytique intrinsèque. Les VEGF-A, -B, -E et le PlGF se lient à la neuropiline-1 qui ensuite s'associe soit au VEGFR-1 ou au VEGFR-2. La neuropiline-2 se lie aux VEGF-A, -C, -D et PlGF, puis forment des complexes avec le VEGFR-1, VEGFR-2 ou VEGFR-3. Plusieurs études ont associé les neuropilines à la vasculogenèse, chez des souris dépourvues de ces deux corécepteurs ne parviennent pas à induire la vasculogenèse du sac vitellin et n'ont pas de plexus vasculaire primaire [204]. Les glycosaminoglycannes (GAGs) peuvent également lier le VEGF et le présenter à ses récepteurs tout en augmentant l'intensité et la durée du signal, probablement en empêchant l'internalisation des récepteurs [205].

Le VEGF-A et ses récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2 sont exprimés dès le début du développement embryonnaire. Le VEGF-A est exprimé dans les îlots sanguins et le VEGFR-2 est un marqueur des cellules progénitrices endothéliales et hématopoïétiques des îlots sanguins.

La liaison des VEGF à leurs récepteurs respectifs induit une homo- ou hétéro-dimérisation des récepteurs qui déclenche leur activité kinase. L'interaction du VEGF avec le VEGFR-2 est plus largement étudiée et semble jouer un rôle central dans la stimulation de la migration, la prolifération, la survie et la différenciation des CE matures et immatures [206].

2.3.3 Le système Ang/Tie :

Bien que le VEGF soit nécessaire à la formation des vaisseaux, il peut ne pas être suffisant. En plus de promouvoir l'angiogenèse, le VEGF augmente la perméabilité vasculaire. Une surexpression du VEGF dans la peau des souris donne lieu à un nombre accru de vaisseaux sanguins qui présentent une perméabilité excessive alors que l'expression à la fois du VEGF et de l'Ang-1 se traduit par des vaisseaux normaux [207]. Quatre glycoprotéines sécrétées forment la famille des angiopoïétines, ligands des récepteurs Tie-1 et Tie-2. La signalisation via Tie-1 et Tie-2 intervient dans la stabilité des vaisseaux. Ce sont des récepteurs à activité tyrosine kinase très exprimés dans les vaisseaux. Ang-1 et Ang-4 se lient à Tie-2 et induisent la phosphorylation du récepteur, alors que Ang-2 et -3 fonctionnent comme des antagonistes de Tie-2 [207].

La cascade de signalisation induite par le couple Ang/Tie-2 joue un rôle crucial dans le recrutement de cellules stabilisatrices des vaisseaux en formation. L'Ang-1 est sécrétée par les péricytes et les CML et interagit avec Tie-2 présent à la surface des CE, ce qui facilite l'interaction entre les deux types cellulaires. Cependant la production de l'Ang-2 par l'endothélium déstabilise l'interaction entre les péricytes et les CE, et rend l'endothélium vasculaire plus susceptible de répondre aux facteurs angiogéniques. La signalisation Ang/Tie-2 dépend du VEGF. En effet, en présence du VEGF, l'Ang-2 déstabilisent les vaisseaux ce qui induit la dissociation des péricytes et permet aux CE sous-jacentes de répondre aux signaux envoyés par le VEGF, ce qui stimule l'angiogenèse [208]. Les embryons invalidés pour le gène Tie-2 meurent au stade embryonnaire entre E9.5 et E10.5. Bien que le plexus vasculaire primaire de ces embryons apparaisse indemne, le remodelage vasculaire ainsi que les parois vasculaires sont défectueux, ce qui se traduit par des œdèmes et des hémorragies. Ce phénotype est similaire à celui observé chez des embryons déficients en Ang-1 et ceux surexprimant l'Ang-2. Une surexpression de l'Ang-1 quant à elle induit une hyper vascularisation avec de nombreux petits vaisseaux stables [209].

2.3.4 Le système Eph/Ephrines :

Initialement caractérisés dans les tissus neuronaux, les récepteurs Eph (*Erythropoietin-producing hepatoma*) et leurs ligands éphrines, représentent la plus grande famille des récepteurs à activité tyrosine kinase répartie en de deux classes A et B. Ils interviennent largement dans la formation de nouveaux vaisseaux. Trois caractéristiques fondamentales distinguent cette famille de protéines : (a) les récepteurs et les ligands sont tous liés à la membrane ; (b) contrairement à d'autres récepteurs où le ligand est libéré par une cellule pour cibler une autre, Eph et éphrines établissent une interaction directe cellule-cellule ; (c) les couples Eph et éphrines sont capables de transduire un signal à leurs cellules hôtes; cette transduction du signal bidirectionnel rend le

concept de "récepteur" et "ligand" arbitraire, car les récepteurs Eph peuvent agir comme des ligand et vice-versa [210]. Les interactions cellule-cellule induites par le couple Eph/éphrines déclenchent en général des signaux répulsifs induisant la migration cellulaire, mais ils peuvent également induire l'adhésion cellulaire. Ce sont des molécules d'orientation qui dirigent le mouvement des cellules en fonction de leur microenvironnement immédiat [211].

Au cours du développement embryonnaire, ce système est en particulier impliqué dans le remodelage des vaisseaux sanguins en contrôlant la séparation des cellules dans les deux systèmes artériel et veineux. La spécificité des artères et des veines est supposée se produire avant même que les vaisseaux sanguins soient complètement formés et a été attribuée à l'expression différentielle du système Eph/éphrines. L'endothélium des artères en développement exprime en effet, l'éphrine B2 alors que l'expression de son récepteur EphB4 est limitée à l'endothélium des veines en développement [212].

L'éphrine B2 et son récepteur Eph B4 semblent être nécessaires au développement vasculaire puisque les souris dépourvues de l'une de ces protéines meurent au stade embryonnaire (E10.5) et présentent des défauts de vascularisation du sac vitellin et de l'embryon lui-même. Les éphrines semblent également influencer les anastomoses artério-veineuses en inhibant la stimulation des CE induite par le VEGF et l'Ang-1 [212]. Les cellules de soutien et de stabilisation des vaisseaux comme les péricytes, nécessitent l'éphrine B2 pour assurer leur association aux micro-vaisseaux. D'ailleurs des souris invalidées pour le gène éphrine B2 (au niveau des cellules de soutien) affichent des défauts vasculaires dans de nombreux organes : la peau, les poumons, les intestins et les reins caractérisés par une hémorragie importante. Ces défauts confirment donc le rôle de l'éphrine B2 dans le maintien de l'architecture vasculaire, en veillant à l'organisation spatiale adéquate des cellules de maintien qui bordent les vaisseaux sanguins. *In vitro*, les CE déficientes en éphrine B2 montrent un mauvais étalement, des lamellipodes défectueux et une augmentation de la motilité cellulaire non directionnelle [213].

2.3.5 Le système Notch/DLL & Jagged:

La famille des récepteurs Notch et leurs ligands contrôlent la germination des CE au cours du développement vasculaire embryonnaire. Quatre récepteurs Notch (1, 2, 3 et 4) sont exprimés chez les mammifères. Cinq ligands de Notch ont été identifiés : Jagged1, Jagged2, DLL (Delta like ligand) 1, 3 et 4. Au sein du système vasculaire, Notch1 et 4 sont exprimés par l'endothélium, tandis que Notch3 est exprimé par les CML. L'activation des récepteurs Notch induit leur clivage protéolytique sur deux sites distincts. Les métalloprotéinases clivent le récepteur à son domaine extracellulaire ce qui entraîne sa libération avec son ligand lié [214]. Ce complexe est en mesure d'agir sur les cellules voisines après son endocytose. Le clivage du récepteur induit également la libération du domaine intracellulaire de Notch qui est ensuite acheminé vers le noyau où il active plusieurs voies de transcription dont les voies HES/HEY [215].

Les souris Notch1^{-/-} meurent au stade embryonnaire à E11. Bien que ces dernières possèdent un plexus vasculaire primaire normal, elles présentent une dégénérescence des

vaisseaux et/ou un remodelage vasculaire anormal. Les souris déficientes pour les deux gènes Notch1 et 4 montrent des perturbations vasculaires plus sévères. La délétion du gène de Jagged1 entraîne la mort embryonnaire à E10 suite à des défauts de vascularisation du sac vitellin et à des hémorragies vasculaires [216, 217]. Il a été démontré que le VEGF induit l'expression de DLL4 et la signalisation Notch. Des niveaux d'expression élevés de DLL4 et du VEGFR-2 ont été détectés dans les *tip-cell* par rapport aux cellules voisines. En effet, Notch semble agir via un mécanisme de rétroaction négative pour réguler la signalisation du VEGF [218]. Schématiquement la *tip-cell* exprime de très forts taux de VEGFR-2. Elle va par conséquent présenter la plus forte réponse au VEGF ce qui induit sa capacité à étendre de très nombreux filopodes conduisant à sa germination. L'activation de la *tip-cell* par le couple VEGF/VEGFR2 conduit à une surexpression du DLL4 par ces dernières et à l'induction de la signalisation Notch chez les cellules avoisinantes. L'activation du signal Notch induit à son tour une diminution de l'expression du VEGFR2 par les CE voisines de la *tip-cell* qui vont ainsi former la lumière du capillaire. Comme le bourgeonnement d'un nouveau vaisseau sanguin n'a besoin que d'une seule *tip-cell*, le couple DLL4/Notch empêche les cellules avoisinantes d'évoluer toutes en *tip-cell* [218].

2.3.6 Le système FGF/FGFR :

Acide ou basique, les facteurs de croissance fibroblastiques sont une famille de polypeptides de 18 à 25kDa exprimés de manière ubiquitaire. A ce jour, 23 membres de cette famille ont été mis en évidence. Ils sont impliqués dans de nombreuses réponses cellulaires physiologiques au cours du développement embryonnaire ainsi qu'à l'âge adulte. Ils sont impliqués dans la prolifération et la différenciation de plusieurs types cellulaires et interviennent au cours de l'angiogenèse. Les FGF1-FGF10 et FGF16-FGF23 se lient à une famille de cinq récepteurs (FGFR1-5) à activité tyrosine kinases. Les FGFR sont constitués d'un domaine extracellulaire composé de domaines Immunoglobuline-like, d'un domaine acide, d'un domaine de liaison aux molécules d'adhérence, d'un domaine de liaison à l'héparine, suivi d'un domaine transmembranaire et d'un domaine cytoplasmique à activité tyrosine kinase [219]. Les FGF-1 et -2 stimulent la prolifération et la migration des CE. Le FGF-2 favorise également la tubulogenèse des CE cultivées sur une matrice de collagène, la production de protéases, l'expression du VEGF, du SDF-1 et de plusieurs intégrines dont $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_6\beta_4$, $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$ [220-222].

Les FGF-1 et -2 ne possèdent pas de séquence signal et par conséquent n'existent pas sous forme libre dans la circulation. Ils sont présents dans le cytoplasme, ou stockés à la surface des cellules ou dans la matrice extracellulaire liés aux HSPGs. Ils peuvent ainsi être rapidement libérés lors d'une lésion vasculaire pour participer à l'angiogenèse locale et à la réparation des tissus endommagés. Les FGF ne semblent pas jouer un rôle dans toutes les réponses angiogéniques, ils sont plutôt nécessaires aux remodelages des vaisseaux sanguins associés à la réparation tissulaire [223].

2.3.7 Le système TGF- β / TGF- β R :

La famille des TGF- β comprend plusieurs membres incluant le TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, BMP, *activins* et *inhibins*, qui se lient à deux types de récepteurs I et II. L'activation des récepteurs de la famille I qui compte sept membres, induit leur phosphorylation et translocation vers le noyau pour activer la transcription de gènes cible. Les cinq récepteurs de type II dont le TGF- β R2, subissent des changements conformationnels lors de la liaison à leur ligand et activent les récepteurs de type I. Les CE expriment le TGF- β R2, récepteur à activité sérine thréonine kinase, et les récepteurs de type I; ALK1 et ALK5. Les CE expriment également l'endogline, un co-récepteur qui peut modifier la signalisation induite par le TGF- β [224].

Des données contradictoires ont été rapportées dans la littérature quant à l'effet du TGF- β sur les CE, ce qui souligne la complexité de la signalisation TGF- β /TGF- β R. Des études menées *in vitro* ont montré que le TGF- β inhibe la prolifération et la migration des CE [225]. Cependant d'autres études ont suggéré un rôle mitogène pour le TGF- β sur ces mêmes cellules [226]. A faible concentration, le TGF- β régule positivement l'angiogenèse tandis que des concentrations élevées semblent inhiber la croissance des CE [227].

La suppression ciblée de TGF- β 1 induit la mort de la moitié des embryons à E9.5-E10.5 en raison d'un défaut de vascularisation de sac vitellin, tandis que l'autre moitié survie plusieurs semaines avant de succomber. La suppression du TGF- β R2 se traduit également par une létalité embryonnaire à E10.5 en raison d'un défaut de vascularisation du sac vitellin et de l'embryon [224, 228]. Une étude plus récente montre que le TGF- β 1 présente une fonction pro-angiogénique, puisqu'il induit la formation de nouveaux vaisseaux sanguins dans le modèle du *Matrigel plug* chez la souris et améliore la viabilité et la migration des PECs. Les auteurs suggèrent donc un rôle important du TGF- β 1 dans l'angiogenèse excessive et/ou le remodelage vasculaire pathologique dans les maladies fibrotiques via le recrutement et l'expansion des PECs [229].

2.3.8 Le système PDGF/PDGF-R :

Le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) est un effecteur majeur dans la maturation des parois vasculaires. Comme son nom l'indique le PDGF a été initialement purifié à partir des plaquettes, mais il a été détecté dans de nombreux autres types cellulaires dont les CE. La famille des PDGF se compose de quatre isoformes (PDGF-A, B, C et D) qui forment des homodimères ou des hétérodimères. Les récepteurs au PDGF aussi forment des dimères constitués de sous unités α et/ou β [186]. Les CE des capillaires expriment le récepteur PDGF- β et sont stimulées par le PDGF-B qui, *in vitro*, induit leur bourgeonnement. Le PDGF stimule également la prolifération des CML et des péricytes qui expriment le récepteur PDGF- β . De plus, il peut contribuer indirectement à l'angiogenèse cardiaque, puisqu'il induit *in vitro* l'expression du VEGF et du VEGF-R2 par les CE microvasculaires cardiaques [186]. Les souris déficientes en PDGF-B ou PDGF- β développent des vaisseaux sanguins en apparence normaux, mais meurent en périnatale pour cause d'hémorragies et d'œdèmes. Il a été ensuite démontré qu'une défaillance

dans le système microvasculaire de ces souris mutantes était à l'origine de la dilatation et de la perméabilité capillaire [230]. Il a été démontré que la prolifération et la migration des péricytes au long des bourgeons angiogéniques se font sous le contrôle du PDGF [231]. En fin, il a été rapporté que l'expression du PDGF est très importante dans les *tip-cell*, où sa sécrétion établirait un gradient permettant un recrutement efficace des péricytes [181].

2.3.9 Rôle des métalloprotéinases :

Les métalloprotéinases appartiennent à la famille multigénique des endopeptidases à zinc dont vingt trois membres ont été identifiés chez l'homme. Cette famille se compose de métalloprotéinases sécrétées (MMP), de métalloprotéinases membranaires (MT-MMP), de métalloprotéinases ADAM (*a disintegrin and metalloproteinase domain*) et ADAMTS (*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*). Les CE sont connues pour exprimer la plupart des membres de cette famille, cependant les MMP-2, MMP-9 et MT1-MMP sont les trois membres les plus impliqués dans le processus angiogénique. Les CE quiescentes produisent peu ou pas de métalloprotéinases actives, ces dernières sont fortement induites et activées au cours de la formation des bourgeonnements capillaires [232].

L'angiogenèse est un processus invasif qui fait appel à des activités protéolytiques, nécessaires à la dégradation de la membrane basale endothéliale afin de faciliter la migration cellulaire et la génération de l'espace pour que les cellules puissent former la lumière du futur vaisseau [233]. En plus des propriétés de dégradation de la matrice, ces protéases exercent des fonctions supplémentaires qui jouent un rôle clé dans l'angiogenèse. Elles modulent l'équilibre entre les facteurs pro- et anti-angiogéniques par l'activation et la modification des facteurs de croissance et des chimiokines. A titre d'exemple, la MMP-9 libère le VEGF par clivage protéolytique, le rendant ainsi disponible pour se lier à ses récepteurs. La MT1-MMP et la MMP-14 quant à elles, induisent la libération et l'activation du TGF- β [234]. Les MMP assurent également le « *shedding* » (coupure puis libération) des ectodomains des récepteurs membranaires tout en induisant leur activation, et génèrent des fragments de protéines matricielles qui inhibent ou activent l'angiogenèse. De plus, les MMP facilitent la mobilisation des cellules progénitrices à partir de la moelle osseuse ainsi que l'entrée de ces cellules et celles des leucocytes dans la zone angiogénique. Enfin, l'interaction des péricytes et des vaisseaux nouvellement formés est en général accompagnée d'une inhibition de l'activité des MMP [233].

2.3.10 Le système SDF-1/CXCR4:

a) SDF-1:

La plupart des chimiokines (chemotactic cytokines) sont des protéines sécrétées de petite taille allant de 8 à 14 kDa. À ce jour plus de 50 chimiokines ont été identifiées. En raison de l'évolution rapide de leur découverte et de l'absence d'un système de classification uniforme, les chimiokines ont été annotés par plusieurs noms. Par exemple, le SDF-1 a été également nommé; le facteur de croissance stimulant les cellules Pré-B. En 2000, un système de classification des

chimiokines, basé sur l'agencement structurel des cystéines N-terminales, a été introduit. Le SDF-1 a été donc renommé CXCL12 [235]. Le SDF-1 possède plusieurs particularités par rapports aux autres membres de la famille des chimiokines. Alors que la plupart des chimiokines CXC sont regroupées sur le chromosome humain 4q12-q21, le SDF-1 est situé sur le chromosome 10q11.1 [236]. Il est exprimé sous 2 isoformes principales : le SDF-1 α (89 acides aminés) qui est la forme prédominante et le SDF-1 β qui contient 4 acides aminés de plus à l'extrémité C-terminale [236]. Plusieurs isoformes supplémentaires issues de l'épissage alternatif ont été récemment identifiées [237]. En particulier le SDF-1 γ qui contient un « core » protéique identique aux autres isoformes, et une partie C-terminale basique possédant une très forte affinité aux héparanes sulfates. Par conséquent, cette isoforme reste attaché à la membrane cellulaire en raison de sa forte interaction avec les glycosaminoglycannes de surface cellulaire. *In vivo*, cette isoforme a montré un effet beaucoup plus important que celui exercé par le SDF-1 α , dans la revascularisation du Matrigel plug chez la souris [238].

b) Les récepteurs au SDF-1:

Le CXCR4 a longtemps été considéré comme l'unique récepteur au SDF-1, et le SDF-1 a été aussi considéré comme étant le seul ligand du CXCR4. Les souris déficientes pour l'un ou l'autre présentent exactement le même phénotype à savoir des anomalies dans le développement de l'arbre vasculaire et des défauts d'hématopoïèse entraînant la mort [239, 240]. Cependant en 2005, un nouveau récepteur a été mis en évidence, le récepteur RDC-1 rebaptisé CXCR7 [241].

Dans le processus angiogénique, l'interaction du SDF-1 avec le CXCR4 est la voie la plus impliquée et la plus étudiée. Le CXCR4 est constitutivement exprimé par l'endothélium vasculaire, les CE matures et les PECs. C'est un récepteur à sept domaines transmembranaires couplés à une protéine Gi. Sa partie extracellulaire est constituée de 3 boucles extracellulaires et du domaine N-terminal sur lequel on retrouve les 17 résidus nécessaires à sa liaison au SDF-1. La partie transmembranaire est constituée de sept domaines et la partie intracellulaire de trois boucles présentant différents rôles associée à la partie C-terminale qui contient 18 acides aminés phosphorylables de type sérine/thréonine, participant à la signalisation intracellulaire [242]. La liaison du SDF-1 au CXCR4 entraîne l'activation de la protéine Gi hétérotrimérique qui assure la médiation de l'étape initiale de la signalisation en séparant la protéine Gi en sous-unités G α et G $\beta\gamma$. Les deux sous-unités régulent en aval plusieurs voies conduisant à des modifications du cytosquelette et à la transcription de gènes impliqués notamment, dans la migration et la survie cellulaire [243]. L'activité du SDF-1 peut être déterminée par la mesure de l'augmentation transitoire du calcium cytoplasmique résultant de l'activation de la phospholipase C. Les voies de signalisation phosphoinositide-3-kinase (PI-3K), protéine kinase C (PKC), Rho, FAK (*Focal Adhesion Kinase*) et MAP kinases (*mitogen-activated protein (MAP) kinase*) peuvent toutes être activées par le SDF-1 (Figure 7). Le signal peut être éteint par la phosphorylation de la partie cytoplasmique et l'internalisation ultérieure du complexe ligand-récepteur. Après internalisation,

le récepteur CXCR4, peut être recyclé vers la membrane plasmique ou dégradé dans les lysosomes [243].

**Autorisation de diffusion
non obtenue.**

Figure-7: Schéma représentant la signalisation induite la liaison du SDF-1 au CXCR4 (Liekens et al, 2010).

c) Régulation de l'expression du système SDF-1/CXCR4

SDF-1 et CXCR4 sont tout les deux surexprimés dans des conditions nécessitant un déclenchement d'une néovascularisation tel que l'ischémie ou le développement tumoral. L'expression du SDF-1 est induite par le système HIF. Le promoteur du SDF-1 contient 2 sites de liaison à HIF-1 α par conséquent son expression dans les tissus ischémiés est corrélée avec la réduction des taux d'oxygène. L'expression du SDF-1 induite par le HIF-1 α se traduit par un plus fort potentiel d'adhésion, de migration et de homing des cellules CXCR4+ [244]. L'hypoxie augmente également l'expression du CXCR4 à la surface de différents types de cellulaires dont les CE, les monocytes, les macrophages et les cellules cancéreuses [245]. L'expression du SDF-1 et de son récepteur peut également être régulée positivement par des facteurs angiogéniques dont le VEGF et le FGF-2. De plus, l'inhibition de l'interaction SDF-1/CXCR4 réduit voire inhibe les effets pro-angiogènes du VEGF et du FGF-2, ce qui indique que leurs effets pro-angiogènes passent en partie, par une interaction SDF-1/CXCR4. Par ailleurs, il a été rapporté que le VEGF, en induisant la surexpression du CXCR4 par les CE, agit synergiquement avec le SDF-1 pour booster l'angiogenèse dans le cancer ovarien [246]. L'expression du SDF-1 et du CXCR4 est également modulée par des médiateurs inflammatoires tels que l'IL-18. L'expression du CXCR4

est aussi augmentée par le TGF- β [247]. En revanche, le TNF- α réduit l'expression du SDF-1 par les CE tout en augmentant celle du CXCR4 [248]. Enfin, l'irradiation et la chimiothérapie induisent une augmentation du SDF-1 dans la moelle osseuse et la rate des souris NOD/SCID, induisant une augmentation du homing des cellules souches/progénitrices [249].

d) Implication du SDF-1 dans l'angiogenèse:

Les CE expriment constitutivement le SDF-1 et forment spontanément des structures tubulaires sur Matrigel. Cette morphogenèse de ramification est associée à l'expression du CXCR4 et peut être perturbée par des anticorps dirigés contre le SDF-1 ou le CXCR4, ce qui suggère un rôle important pour la voie SDF-1/CXCR4 dans l'angiogenèse [250]. Il a été démontré qu'un apport exogène en SDF-1 était capable d'induire l'angiogenèse dans plusieurs modèles *in vitro* et *in vivo*. Le SDF-1 induit la migration et le chimiotactisme des CE, la formation de pseudotubes sur Matrigel et la germination des anneaux aortiques *in vitro*. *In vivo*, le SDF-1 induit l'angiogenèse dans un modèle de revascularisation de la cornée chez le lapin et dans les modèles du Matrigel plug, d'ischémie rétinienne et de *wound healing* chez la souris [251, 252]. En outre, les taux plasmatiques du SDF-1 sont associés aux niveaux de progression de l'angiogenèse tumorale chez les patients atteints de myélomes multiples [253]. La tubulogenèse induite par le SDF-1 sur les CE microvasculaires cultivées en 3D sur un gel de fibrine est accompagnée d'une augmentation des taux du VEGF [251]. Le SDF-1 induit également l'expression des ARNm codant pour le VEGF par les CE isolées de l'artère du cordon ombilical humain (HUAEC ; *human umbilical arterial endothelial cells*) et potentialise la transcription de l'ADN induite par le VEGF [254]. L'activation du CXCR4 entraîne également la synthèse du VEGF par les cellules de gliome malin ce qui suggère que le VEGF peut être un médiateur important de l'angiogenèse induite par le SDF-1 [255]. De plus, le SDF-1 est en mesure de stimuler la synthèse de l'IL-8 qui, à son tour induit la sécrétion de plusieurs facteurs angiogéniques, dont les MMP [256].

e) Implication du SDF-1 dans la vasculogenèse:

Comme précisé au début de ce chapitre, le processus de vasculogenèse nécessite la mobilisation des PECs à partir de la moelle osseuse et leur homing sur les sites de néovascularisation. Ce processus est essentiellement médié par le SDF-1. *In vitro*, l'exposition des PECs au SDF-1 induit leur migration et la formation de pseudotube dans le Matrigel. Il améliore aussi leur capacité d'adhésion à l'endothélium activé tout en stimulant l'expression des deux sous-unités d'intégrine α_4 et α_M qui sont impliquées dans le homing des cellules immatures aux vaisseaux sanguins. Le SDF-1 est également en mesure d'augmenter le potentiel thérapeutique des PECs dans un modèle murin d'ischémie des membres inférieurs. Il augmente considérablement la sécrétion du FGF-2 et de la MMP-2 par les PECs, ce qui peut faciliter leur migration à travers la membrane basale [257]. Il a été également démontré que l'administration rétroviral du SDF-1 dans les muscles de souris ischémiques C57BL/6J est capable de potentialiser l'effet pro-angiogène du G-CSF. La combinaison du G-CSF et du SDF-1 donne lieu

à une mobilisation massive de cellules CD34⁺ sur les sites ischémiés, et une augmentation de la densité capillaire ce qui suggère que l'activité angiogénique du SDF-1 est liée à une stimulation directe des PECs [258]. Enfin, l'induction de l'expression du SDF-1 par des cellules tumorales non vasculogènes déclenche le processus de vasculogénèse, ce qui indique que le SDF-1 est à la fois nécessaire mais surtout suffisant pour le recrutement des PECs en cas de vascularisation tumorale [259].

f) Implication du SDF-1 dans la croissance tumorale:

En plus de promouvoir la vascularisation des tumeurs, le SDF-1 sécrété par plusieurs cellules tumorales est en mesure via son récepteur CXCR4, de transmettre plusieurs signaux autocrines et paracrines conduisant à la croissance et à la formation de métastases tumorales. Le SDF-1 est capable d'induire la prolifération de plusieurs lignées tumorales en activant les voies de signalisation Erk1/2 et Akt [260]. Il stimule également la motilité des cellules tumorales ainsi que leur adhésion aux différents composants de la matrice extracellulaire (fibronectine, laminine et collagène) et à l'endothélium activé, via la surexpression de plusieurs sous-unités d'intégrines impliquées dans l'adhésion cellulaire. L'hypoxie et le traitement au VEGF induit une surexpression du CXCR4 par les cellules du glioblastome ou des cellules de carcinome mammaire, ce qui augmente leur pouvoir invasif [260]. Dans le cancer du pancréas, l'IL-8 et le SDF-1 coopèrent pour promouvoir la vascularisation de la tumeur et son invasivité via la sécrétion de facteurs pro-angiogènes [261]. Enfin, il stimule la sécrétion de protéases en particulier les MMPs, facilitant ainsi l'invasion des cellules tumorales à travers la membrane basale [260].

2.3.11 Rôle des intégrines :

Le processus de revascularisation dépend non seulement des facteurs de croissance et de leurs récepteurs, mais il est également influencé par les récepteurs aux protéines de la matrice extracellulaire principalement les intégrines. Ces dernières sont composées de deux sous-unités α et β liées de manière non covalente, 18 sous-unités α et 8 sous-unités β ont été identifiées chez l'homme dont au moins 8 α et 4 β sont exprimées par l'endothélium. Parmi les couples d'intégrine décrits, neuf jouent un rôle dans la vascularisation : $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_6\beta_4$, $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$. On retrouve des récepteurs au collagène ($\alpha_1\beta_1$ et $\alpha_2\beta_1$), à la laminine ($\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_6\beta_4$), à la fibronectine ($\alpha_4\beta_1$ et $\alpha_5\beta_1$) et à la vitronectine ($\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$) [262]. Les intégrines sont cruciales à la vasculogénèse, à l'angiogénèse et à l'intégrité vasculaire en tant que médiateurs majeurs de l'adhésion et de la migration des CE et des PECs à travers la matrice extracellulaire, via leur rôle de co-récepteurs aux récepteurs à activité tyrosine kinase. Elles sont caractérisées par un domaine extracellulaire qui se lie aux composants de la matrice extracellulaire, et un domaine cytoplasmique qui interagit avec le cytosquelette d'actine, les protéines associées aux microfilaments et plusieurs médiateurs de signalisation [263].

L'activation des intégrines est provoquée par des signaux intracellulaires induits par exemple par l'activation des récepteurs aux facteurs de croissance ou de chimiokines, ou par un stress mécanique, qui permet ainsi la phosphorylation du domaine cytoplasmique de la sous unité β ou sa liaison avec la taline. Cela induit la dissociation des domaines cytoplasmiques des sous unités α et β , permettant à l'intégrine de se déplier et d'acquérir une conformation active pour s'associer à son ligand. L'association de l'intégrine avec son ligand provoque un écartement des domaines transmembranaires des deux sous-unités ce qui permet au domaine cytoplasmique de la sous unité β de recruter et d'activer différents effecteurs cellulaires [262].

L'activation des voies de signalisation par les intégrines impliquent la phosphorylation de protéines kinases, de FAK, le recrutement d'adaptateurs comme Grb2 (*Growth factor Receptor Bound protein 2*), l'activation de petites protéines G comme Rho, l'activation des voies de signalisation PI3K/Akt et MAP kinases et le recrutement de protéines liant le cytosquelette d'actine (α -actinine, taline, vimentine, vinculine...). L'activation des différentes voies induit la formation de points d'adhésion focaux et de podosomes qui permettent l'ancrage de la cellule à la matrice extracellulaire. Ainsi, une communication se crée entre la matrice et la cellule dont la nature et l'intensité détermineront le phénotype qu'adoptera la cellule (adhésion, migration, survie, prolifération,...) [262].

➔ Cas particulier de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$:

L'implication de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans l'angiogenèse et la vasculogenèse a d'abord été mise en évidence en 1994 par l'équipe de Brooks *et al.*, qui ont remarqué sa surexpression dans les capillaires en formation comparativement aux vaisseaux en quiescence [264] [265]. Son expression peut être induite par plusieurs facteurs de croissance et cytokines angiogéniques [266], et son inhibition favorise la régression tumorale. Des CE sur lesquelles on a bloqué l'expression de cette intégrine, rentrent en apoptose ce qui conduit à la régression des capillaires en formation ; $\alpha_v\beta_3$ est donc impliquée dans le maintien de la survie cellulaire.

Scatena *et al* rapportent un effet anti-apoptique de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ sur les CE qui serait dépendant de l'activation de la voie de signalisation NF- κ B [88]. Cependant, cette intégrine n'est clairement pas indispensable à l'angiogenèse ni à la vasculogenèse, puisque les souris et les humains présentant une déficience en l'intégrine β_3 présentent des défauts plaquettaires, mais semblent développer une vasculature normale [267]. En outre, les souris déficientes en α_v , même si elles présentent des anomalies dans la vascularisation du cerveau et des intestins, possèdent un arbre vasculaire quasi-normal [268]. Ainsi, même si l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ joue un rôle dans l'angiogenèse, il existe clairement d'autres mécanismes qui sont en mesure de compenser son absence [269]. C'est une intégrine qui lie la majorité des protéines contenant une séquence RGD (arginine-glycine-aspartate) incluant les protéines d'adhérence en particulier la vitronectine, la fibronectine, le fibrinogène, la thrombospondine, le collagène, le VWF, l'ostéopontine et plusieurs autres protéines dépourvues de cette séquence telle que la tumstatin [266]. Les

signalisations induites en aval suite à l'engagement des différents ligands ne sont pas nécessairement les mêmes et les effets peuvent donc être aussi divers et variables que les ligands engagés. Cette intégrine est également capable d'interagir avec les récepteurs des facteurs de croissance tels que le VEGF-R2, les récepteurs du PDGF, Tie-2 et l'intégrine $\alpha_5\beta_1$. Elle a été également décrite pour lier la MMP-2 et la rendre disponible sous sa forme active à la surface des vaisseaux angiogéniques, facilitant ainsi la dégradation des composants de la matrice extracellulaire et la migration cellulaire [266]. Ainsi $\alpha_v\beta_3$ est impliquée de par ses multiples fonctions, dans les différentes phases du processus angiogénique.

2.3.12 Rôle des Héparanes Sulfates Protéoglycannes (HSPGs):

Les HSPGs sont des composés glycoconjugués constitués d'un core protéique sur lequel sont liées de façon covalente, une à plusieurs chaînes de GAGs. Ils sont abondamment présents dans la matrice extracellulaire et à la surface des cellules et interagissent avec les facteurs de croissance, les chimiokines, les récepteurs aux facteurs de croissance, les protéases, les inhibiteurs de protéases et les protéines d'adhésion. La partie saccharidique est en grande partie responsable de ces interactions qui régulent l'activité et la stabilité de nombreux couples ligand-récepteur [270]. Les GAGs sont de longues chaînes linaires composées d'un motif disaccharidique répétitif, généralement composé d'un ose aminé et d'un acide uronique. Il existe plusieurs motifs disaccharidiques essentiellement : les héparanes sulfates (HS), les chondroïtines sulfates (CS) et les dermatanes sulfates (DS) (figure 8). Ces motifs sont plus ou moins sulfatés et carboxylés ce qui leur confère leur caractère polyanionique. Dans le système cardiovasculaire, les HSPGs sont constitutivement synthétisés par les CE et le sous endothélium, et sont fortement impliqués dans l'angiogenèse, la vasculogenèse et l'artériogenèse [270].

**Autorisation de diffusion
non obtenue.**

Figure-8: Représentation schématique des héparanes sulfates protéoglycannes (Souza-Fernandes et al, 2006).

Les HS sont des modulateurs importants du processus de vascularisation et plusieurs études menées *in vivo* montrent leur implication dans le maintien et la stabilisation des vaisseaux. L'inactivation du gène codant pour la 6-O-sulfotransférase (Hs6st), une enzyme impliquée dans la synthèse des HS chez la drosophile, induit plusieurs anomalies dont des défauts de ramification de l'arbre vasculaire. La même observation a été faite par *Chen et coll.* sur le poisson-zèbre, chez qui ont été observés également des défauts d'expression de Tie-1 et Tie-2, suggérant un rôle essentiel des HS dans le remodelage vasculaire [271]. Chez la souris, la déficience en une des trois isoformes de la *Hs6st* induit la mort des embryons (E15.5). Des anomalies du développement ainsi qu'une réduction de 50% du nombre de microvaisseaux dans la zone labyrinthique du placenta en développement ont été également rapportés [272]. Les *N*-déacetylase/*N*-sulfotransférases (ndst) effectuent la première étape de la modification des HS par le remplacement du groupe *N*-acétyle de la *N*-acétylglucosamine par un groupe sulfate. Les souris *ndst-1^{-/-}* présentent un phénotype sévère et meurent au stade embryonnaire (E14.5) ou peu de temps après la naissance. Un examen détaillé de la vascularisation chez ces embryons révèle l'absence de péricytes dans les vaisseaux [273]. La suppression du gène codant pour la glycosyltransférase *Ext-1*, une enzyme essentielle pour l'élongation des chaînes HS, conduit à une perte complète des HS et la mort des embryons de souris à E19 en raison d'hémorragies et d'œdèmes dus à une augmentation de la perméabilité vasculaire [274].

Les variants du VEGF-A diffèrent par leur affinité pour les HS. Le VEGF120 qui ne possède pas de domaine de liaison aux HS, diffuse librement dans la matrice extracellulaire, alors que les VEGF164 et 188 peuvent être retenus partiellement ou totalement dans les compartiments riches en HS, ce qui augmente leur biodisponibilité. Les souris qui expriment uniquement le VEGF120 présentent une cardiomyopathie ischémique et finissent par mourir d'une défaillance cardiaque, avec des anomalies dans l'arbre vasculaire constitué de vaisseaux de très gros diamètre. Cette anomalie serait liée semble-t-il, à son défaut de liaison aux HS qui jouent un rôle essentiel dans la régulation des ramifications vasculaires [275]. Des études plus approfondies suggèrent un rôle des HS dans le maintien d'un gradient de concentration du VEGF-A, nécessaire pour guider les CE en bourgeonnement et former de nouveaux vaisseaux [274]. Le PDGF-B est un autre facteur de croissance dont la signalisation est régulée par les HS. Sa présence à la surface des CE, lié aux HS, facilite la migration des péricytes tout au long des vaisseaux en formation [276]. Les HS jouent également un rôle important dans le maintien de liaison du TGF- β à la fibronectine et permet de le stocker au sein de la matrice extracellulaire afin qu'il soit rapidement disponible [277]. Ils peuvent également moduler plusieurs voies angiogéniques dont celle du FGF-2, des éphrines, la voie Wnt ainsi que certains composants de la matrice extracellulaire tels que la fibronectine et la laminine.

Les HSPGs comptent quatre grandes familles ; les glycanes, le bétaglycanes, le CD44 et les syndécannes. Ces derniers sont exprimés à près d'un million de copies par cellule dans presque toutes les cellules du corps. Les mammifères expriment 4 syndécannes différents (1, 2, 3 et 4).

Structurellement, les syndécannes sont composés d'un domaine extracellulaire, d'une région transmembranaire caractéristique et d'un court domaine cytoplasmique conservé. Le domaine extracellulaire est constitué de chaînes d'HS dont les caractéristiques structurelles sont responsables de l'interaction des syndécannes avec un grand nombre de facteurs solubles, de molécules associées aux cellules et des composants de la matrice extracellulaire. Dans certains cas, l'engagement de la partie HS peut favoriser la conformation active du ligand. En règle générale, les syndécannes ne fonctionnent pas comme des récepteurs primaires mais comme des corécepteurs, bien que certaines expériences *in vitro* indiquent clairement que des structures spécifiques des HS peuvent médier des liaisons de haute affinité. Les syndécannes peuvent également intervenir via leur core protéique transmembranaire ou leur domaine cytoplasmique. Ces interactions sont régulées par la phosphorylation qui induit le *clustering* et le *shedding* du domaine extracellulaire [278]. Dans ce travail, notre intérêt porte essentiellement sur le syndécane-1 (SDC-1).

→Le Syndécane-1 (SDC-1) :

Le SDC-1 également appelé CD138, est un protéoglycane sulfaté de 32 477 Da, avec un point isoélectrique de 4,26 et dont le core protéique est constitué de 310 acides aminés. Comme tous les autres syndécannes, le core protéique du SDC-1 est constitué de trois domaines : le domaine cytoplasmique contient deux régions constantes C1 et C2, séparées par une région variable spécifique à chaque syndécane (figure 9). Les régions C interagissent avec une variété de molécules de signalisation et des composants du cytosquelette. Les chaînes de glycosaminoglycannes liées au domaine extracellulaire sont des HS mais une chaîne de CS peut être présente. La sulfatation complexe des chaînes des HS est nécessaire pour les interactions du SDC-1 avec des ligands spécifiques et peut être remodelée par différents phénomènes tels que la progression tumorale et l'ischémie. L'ectodomaine intacte peut être clivé au niveau d'un site à proximité de la membrane plasmique afin de générer une molécule effectrice soluble. SDC-1 est présent à la surface de plusieurs types cellulaires dont les CE. Il est impliqué dans le contrôle de plusieurs voies de prolifération, de migration, de différenciation, de survie et de signalisation cellulaire. Il est également impliqué dans l'organisation du cytosquelette et les interactions cellules/cellules et cellules/matrice extracellulaire [279].

Le SDC-1 se lie aux facteurs pro-angiogéniques, FGF-2 et VEGF essentiellement, et les présente à leurs récepteurs respectifs à la surface des CE, participant ainsi à l'invasion et au bourgeonnement des vaisseaux. L'ectodomaine du SDC-1 à lui seul est un élément phare dans le processus de vascularisation. En effet sous sa forme soluble, il lie les facteurs de croissance, les stabilise et les transporte jusqu'aux sites de néovascularisation. Les niveaux d'expression des héparanases impliquées dans le *shedding* du SDC-1 sont augmentés sous l'effet du VEGF et du HGF [280]. L'implication de cet ectodomaine dans le processus de revascularisation a été confirmée par Purushothaman *et al.* qui ont observé une augmentation de la formation des

artérioles d'anneaux d'aorte de rat cultivés en présence de l'ectodomaine du SDC-1 et du VEGF par rapport au VEGF seul [281]. Dans un modèle de xénogreffe de cellules de carcinome mammaire chez la souris, l'expression du SDC-1 est associée à une augmentation de la densité des capillaires. L'expression du SDC-1 par les fibroblastes du stroma du cancer mammaire chez la femme est également en corrélation significative avec la densité des microvaisseaux formés [282]. Cette expression est induite par le FGF-2 et le VEGF durant le processus angiogénique *in vitro* et *in vivo* [283]. La formation d'un complexe de l'ectodomaine du SDC-1 avec les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$ est nécessaire à son action pro-angiogénique. L'interaction des intégrines $\alpha_v\beta_3$ et/ou $\alpha_v\beta_5$ avec le SDC-1 favorise leur *clustering*. Ainsi, il est possible que cette liaison active des kinases associées soit à l'intégrine et/ou au SDC-1 qui initie leur trans-phosphorylation et l'activation de voies de signalisation qui activent les intégrines [283].

**Autorisation de diffusion
non obtenue.**

Figure-9: Schéma représentant l'organisation structurelle du syndécanne-1 (Edwards et al, 2012).

2.3.13 Rôles de certaines voies de signalisation :

Les résultats obtenus au cours de ce travail nous ont amenés à nous intéresser plus particulièrement à certaines voies de signalisation impliquées dans le processus de revascularisation à savoir les voies Akt, mTOR, Erk1/2, FAK, et p38.

a) La voie Akt :

La voie Akt, également connu sous le nom de la protéine kinase B (PKB) transmet des signaux de survie provenant de facteurs de croissance. Elle existe sous trois isoformes et est impliquée dans la régulation de la survie, la migration et la prolifération cellulaire, ainsi que le métabolisme, la croissance tumorale et l'angiogénèse. Cette voie est activée par des cytokines et des facteurs de croissance incluant le VEGF, le FGF, le EGF, le HGF, l'IGF et l'Angiopoïétine, par des oncogènes tels que Ras et Src, par l'activation de la voie des PI3K, et par des mutations ou des délétions des suppresseurs de tumeurs [284]. Les intégrines et les facteurs de croissance coactivent synergiquement la voie Akt. L'activation par une signalisation outside-in provenant des

intégrines, favorise l'adhésion des CE à la matrice et la survie cellulaire. La voie Akt contrôle également la réorganisation du cytosquelette d'actine et la migration des CE et joue un rôle clé dans le recrutement des PECs au niveau des sites ischémiés dans un modèle murin de l'ischémie des membres inférieurs. Elle contrôle aussi la synthèse du VEGF, par l'induction de l'expression du HIF-1. Cette voie est également, en mesure de contrôler la production du monoxyde d'azote (NO) par les CE pour réguler le diamètre des vaisseaux et le flux sanguin [285].

b) La voie mTOR :

L'enzyme mTOR (*mammalian target of rapamycin*) appartient à la famille des sérine/thréonine kinase qui régule la prolifération, la croissance, la mobilité, la survie cellulaire et la synthèse protéique. Son activité catalytique est liée au fonctionnement de deux sous-unités distinctes mTORC1 et mTORC2. La première, mTORC1, est composée de mTOR, d'une protéine de régulation associée à mTOR (Raptor) et d'une protéine apparentée à la sous-unité β du complexe protéine G/LST8 (mLST8/G β L). Ce complexe fonctionne comme l'intégrateur des signaux de disponibilité des nutriments, d'énergie et contrôle la synthèse protéique. Le complexe mTOR 2 (mTORC2) est composé de mTOR, de la protéine associée à mTOR dite insensible à la rapamycine (Rictor), de G β L, et de la protéine kinase activée par le stress (mSIN1). mTORC2 est un régulateur essentiel du cytosquelette par la stimulation des fibres de F-actine, paxilline, RhoA, Rac1, Cdc42, et la PKC α . mTORC2 stimule la phosphorylation et donc l'activation de Akt [286]. Ce dernier complexe est décrit comme étant essentiel à la croissance endothéliale. En effet, l'activation de mTOR régule les voies apoptotiques et autophagiques en cas d'un stress oxydatif, protégeant les CE de l'apoptose et participe à l'angiogenèse et à la régénération tissulaire. L'effet anti-apoptotique de la protéine mTOR repose sur l'activation de la voie Akt qui intervient par l'inactivation des facteurs de transcription tels que FOXO3a qui conduit à la croissance cellulaire et à une protection des CE du stress oxydant [287]. L'inhibition de la signalisation mTOR, conduit à une séquence d'événements qui perturbe l'équilibre entre les facteurs pro et anti-angiogéniques, comme une augmentation de l'activité de la MMP-1 et l'inhibition de la MMP-3 [288]. La perte de l'activité de mTOR bloque également la prolifération des CE et des PECs [289]. La protéine mTOR peut jouer un rôle important dans le développement des PECs car l'inhibition de cette voie avec la rapamycine conduit à leur mort, ce qui peut résulter de l'inhibition de la signalisation induite par les facteurs de croissance. Un autre facteur de croissance dont l'activation repose sur la voie mTOR est l'érythropoïétine, dont le rôle dans l'angiogenèse et la survie endothéliale est bien connu [286].

c) La voie Erk1/2 :

Les kinases « *extracellular signal-regulated protein kinases 1 et 2* » plus couramment appelées Erk1/2, ajoutent des groupements phosphates à d'autres protéines afin de les activer. Erk1 et 2 appartiennent à la famille des MAP kinases qui phosphoryle une variété de protéines intracellulaires, y compris d'autres kinases et des facteurs de transcription. La signalisation par la

voie Erk peut réguler la différenciation, la prolifération ou la transformation oncogénique selon le contexte cellulaire [290]. En réponse aux facteurs de croissance, les CE activent la voie Erk qui transmet les signaux nécessaires à la régulation de plusieurs fonctions. L'activation de la voie Erk au sein des CE est induite par l'activation des récepteurs aux facteurs de croissance notamment le VEGFR2, le FGFR2 et le Tie-2, ainsi que par l'activation de l'endogline ou des intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$. Son activation confère aux CE un phénotype pro-angiogène et son inhibition induit la quiescence de ces dernières [291].

d) La voie p38 :

La MAP-kinase p38 a été identifiée pour la première fois dans les cellules de mammifères comme un polypeptide de 38kDa phosphorylé en réponse à l'endotoxine et au choc hyperosmotique. Elle a donc été décrite comme une kinase répondant au stress et capable d'activer à son tour une autre kinase, la MAPKAP-K2 (*MAP kinase-activated protein kinase-2*). p38 est une protéine ubiquitaire pouvant être à l'origine de différentes réponses cellulaires en fonction du type, du contexte cellulaire et du stimulus [292]. Son rôle dans le processus angiogénique a été décrit par plusieurs auteurs. En effet, les souris invalidées pour p38 meurent au stade embryonnaire entre les jours E10.5 et E11.5 en raison de défauts de vascularisation placentaire [293]. Les effets biologiques résultant de l'activation de la voie p38 dépendent de la durée et de la magnitude du signal. Elle induit la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , le TNF- α ou l'IL6 et la synthèse de molécules d'adhérence telles que VCAM-1. De plus, elle participe à la régulation de la prolifération et de la différenciation des CE. Par ailleurs, p38 joue un rôle crucial dans la régulation de l'apoptose, de la survie, du cycle cellulaire, de la différenciation, de la sénescence et de la croissance cellulaire [294].

Quatre isoformes de p38, α , β , γ et δ ont été identifiées. Ces différentes isoformes contrôlent différemment l'apoptose et la survie des CE. Les CE en culture expriment les trois isoformes α , β et γ . Le VEGF active p38 β alors que le TGF- β 1 active p38 α . L'inhibition de la signalisation induite par p38 α bloque l'apoptose des CE, alors que l'inhibition de la signalisation induite par l'isoformes β ou γ induit une apoptose accrue. Ceci suggère un effet proapoptotique de l'isoforme p38 α et une signalisation antiapoptotique des deux isoformes β et γ [295].

e) La voie FAK :

FAK est une protéine cytoplasmique ubiquitaire détectée au sein des complexes d'adhésion. Son activation par les intégrines, les facteurs de croissance, les cytokines ou les hormones induit l'autophosphorylation d'un résidu tyrosine libérant un site de liaison pour la protéine Src. Cette liaison permet l'activation des protéines du complexe d'adhérence et transmet des signaux régulateurs pour l'adhésion, la migration, la survie et la prolifération cellulaires [296]. FAK est un médiateur clé de l'angiogenèse au cours du développement. Les souris invalidées pour le gène de FAK au niveau endothélial meurent au stade embryonnaire en raison principalement d'une augmentation de l'apoptose et de la perméabilité endothéliale [297]. Même si son rôle a

essentiellement été décrit dans l'adhérence cellulaire, des études récentes ont montré son implication dans le contrôle de la migration et la prolifération des CE en réponse à une stimulation mécanique (forces de cisaillement). Une coopération étroite entre les intégrines et le VEGFR-2 passant par l'intermédiaire de FAK a été décrite dans les CE. Cette coopération est nécessaire pour une migration correcte des cellules. De même, l'activation de FAK des CML vasculaires potentialise l'activation de Erk par le PDGF et favorise leur prolifération et leur migration. Une mutation du gène FAK des CE induit une perturbation des microtubules, des défauts mitotiques et des modifications dans l'organisation du fuseau mitotique et du centrosome [298].

Chapitre 3 : Les Progéniteurs Endothéliaux Circulants

Introduction :

Depuis les travaux de Stump *et al.* en 1963 qui avaient démontré qu'un patch de Dacron suspendu dans la circulation et n'ayant aucun contact avec l'endothélium, était recouvert d'îlots de CE matures en 7 jours [299], il était admis que la source de remplacement de l'endothélium endommagé était les CE matures circulantes qui se détachent de la paroi vasculaire et adhèrent aux vaisseaux lésés, et que la formation de CE à partir d'angioblastes provenant du mésoderme était limitée au stade embryonnaire. Cependant, les travaux de Asahara en 1997 [17] ont mis fin à ce dogme. Cette équipe a identifié une nouvelle source de renouvellement endothélial qui est une sous-population de cellules mononuclées CD34+ capables de proliférer et de se différencier en CE matures. Ces Progéniteurs Endothéliaux Circulants présentent trois caractéristiques principales: (i) leur capacité à se différencier en lignée endothéliale, (ii) leur immaturité attestée par la présence de marqueurs de cellules souches primitives et l'absence (partielle) des marqueurs de CE matures, et (iii) leurs propriétés pro-vasculogènes ajoutées à une forte activité biologique permettant la récupération fonctionnelle et la régénération d'une lésion vasculaire [300]. Les PECs peuvent être classés en plusieurs catégories en fonction de leur origine ou sur leur capacité à former des colonies.

3.1 Classification :

3.1.1 Les PECs tissulaires versus PECs circulants :

En fonction de l'environnement dans lequel ils se retrouvent après leur mobilisation depuis la moelle osseuse, les PECs peuvent être classés en deux catégories : les PECs circulants et les PECs tissulaires. Les PECs circulants sont les cellules qui se retrouvent dans le sang et qui sont bioactives en suspension. Elles peuvent proliférer, se différencier et présentent une grande capacité de homing sur les sites de lésions leur permettant de contribuer à la régénération tissulaire, où elles se transforment en PECs tissulaires. Ainsi, les PECs tissulaires sont les cellules ayant déjà adhéré, qui expriment fortement la VE-cadhérine, ce qui est à l'origine de leur bioactivité. Elles ont également la capacité de proliférer, de se différencier, et de migrer plus loin au sein du même tissu et présentent un grand potentiel sécrétoire (figure 10) [300].

3.1.2 Les PECs hématopoïétiques versus PECs non hématopoïétiques :

Les PECs circulants peuvent être subdivisés en deux catégories principales : les PECs hématopoïétiques (PECs-h) et les PECs non hématopoïétiques (PECs-nh). Les PECs-h proviennent de la moelle osseuse et représentent une sous-population pro-vasculogène des CSH exprimant à la fois des marqueurs hématopoïétiques et endothéliaux (CD34, CD45, CD31, VEGFR2). Elles sont composées de trois populations : (i) des PECs descendant directs des CSH, (ii) des cellules myéloïdes dérivées de progéniteurs myéloïdes mais pouvant encore se différencier en CE et (iii) une troisième population est appelée *circulating angiogenic cells*. Les PECs-h

contribuent à la vascularisation principalement par leurs propriétés paracrines, la sécrétion de facteurs de croissance pro-angiogéniques, et ont été décrites sous plusieurs noms dont les PECs myéloïdes, les PECs précoces, ou CFU-ECs (*endothelial cell colony-forming units*). Elles apparaissent après 4 à 7 jours de culture. Les PECs-nh, également appelés les PECs tardifs, *late outgrowth EPCs* ou encore ECFCs, sont des cellules CD34+ et CD45-, qui proviennent également de la moelle osseuse mais leur origine exacte reste inconnue. Au sein de cette population et en fonction de leur potentiel prolifératif deux types cellulaires ont été décrits HPP-ECFCs (*high proliferative potential-ECFCs*) et LPP ECFCs (*low proliferative potential-ECFCs*). *In vitro*, ces cellules apparaissent après 10 à 20 jours de culture (figure 10) [300, 301].

3.1.3 Les PECs formant des colonies versus PECs ne formant pas de colonies :

La culture des cellules CD34+/CD133+ isolées du sang périphérique sur méthylcellulose a permis de mettre en évidence deux types de cellules bien distincts ; des PECs qui forment des colonies et d'autres qui apparaissent en culture sous forme de cellules isolées.

Au sein du premier groupe, deux types de colonies ont été mis en évidence, des colonies formées par des cellules de petite taille correspondant au PECs primitifs, et des colonies formées par des cellules larges correspondant au PECs définitifs. Les PECs primitifs ont un taux de prolifération plus élevés et donnent lieu à des colonies secondaires, cependant, les PECs définitifs donnent lieu à des CE isolées et montrent un plus grand potentiel vasculogène *in vitro* et *in vivo*. Les PECs ne formant pas de colonies sont souvent appelés *CE-like*, en raison de la présence de certaines caractéristiques endothéliales tels que (i) l'expression de marqueurs endothéliaux : CD31, VEGF-R2, CD144, Tie-2 et VWF, (ii) leur bioactivité de type CE caractérisée par leur capacité à migrer vers un gradient de facteurs de croissance angiogéniques et pour former des structures tubulaires et (iii) leur contribution directe et/ou indirecte à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins *in vivo* (figure 10) [300].

**Autorisation de diffusion
non obtenue.**

Figure-10: Représentation schématique des différents types de PECs (Masaaki et Asahara, 2011)

3.2 Caractérisation :

A la suite de leur découverte par Asahara, plusieurs équipes se sont lancées dans leur isolement et leur caractérisation cependant, à ce jour, aucune description nette n'a pu être apportée. Le groupe d'Ingram est à présent, le seul à avoir apporté la caractérisation phénotypique la moins ambiguë. Pour ces cellules isolées à partir du sang du cordon ombilical ou du sang périphérique, les auteurs ont décrit les deux sous populations CFU-ECs et ECFCs. Les CFU-ECs ont été décrites comme exprimant le CD31, CD34, CD105, CD144, CD146, VWF, VEGF-R2, CD14, CD45 et CD115. La seconde sous-population ECFCs a été décrite pour exprimer le CD31, CD34, CD105, CD144, CD146, VEGF-R2 et VWF. Ces dernières n'expriment donc pas les marqueurs monocytaires tels que le CD45 et le CD14 [18]. La principale difficulté est qu'il n'existe pas de marqueurs spécifiques à ces cellules puisque les marqueurs endothéliaux tels que ceux décrits ci-dessus sont également présents sur les CE matures, y compris le CD34+ qui a été pourtant longtemps décrit comme un marqueur d'immatunité. Certaines études rapportent que l'expression du CD133 dont la fonction est inconnue, diminue rapidement au cours de la maturation des PECs [302]. Par conséquent, il semble que la perte de ce marqueur définit le moment de l'acquisition du phénotype endothélial par les PECs. Il a été suggéré que cet antigène est maintenu en culture pendant 30 jours, ainsi l'association des trois marqueurs de surface CD34, VEGF-R2 et CD133 semble être la meilleure combinaison pour distinguer les CE matures des cellules immatures [303].

→ A la lumière de ces articles, nous pouvons constater que les PECs représentent une population cellulaire très hétérogène, et à ce jour il n'existe pas de classification précise ni de consensus établi sur les marqueurs qui les définissent. Les auteurs utilisent donc différentes combinaisons de marqueurs de surface et de tests fonctionnels pour les isoler et les caractériser. Dans le cadre de ce travail, les PECs utilisés seront définis comme étant de type ECFCs, exprimant des marqueurs d'immaturité (CD133, CD34 et c-kit), capable d'acquérir des marqueurs endothéliaux (CD146, CD31, CD105, VWF, CD144 et VEGF-R2) et négatives pour les marqueurs monocytaires (CD14 et CD45). Elles apparaissent en culture sous forme de colonies qui, à partir du 1^{er} passage, se développent en monocouche de cellules pavimenteuses typique des CE. Elles possèdent une forte capacité à former des pseudo-tubes sur Matrigel *in vitro*, et sont capables de se différencier pour former des vaisseaux fonctionnels *in vivo* [302].

3.3 Les différentes étapes de la participation des PECs à la vasculogénèse postnatale:

Les différentes étapes du recrutement et de la participation des PECs à la vasculogénèse post-natale ainsi que les mécanismes impliqués sont résumés en figure 11.

Autorisation de diffusion
non obtenue.

Figure-11: Représentation schématique des mécanismes moléculaires régissant les différentes étapes de la participation des PECs à la vasculogénèse postnatale (Caiado et al, 2012).

3.3.1 Mobilisation :

La majorité des PECs reste à l'état quiescent au sein d'une niche entourée de cellules de soutien (fibroblastes, OB, CE, cellules stromales), de facteurs solubles et de composants de la matrice extracellulaire. Ces cellules sont complexées aux intégrines ou aux GAGs des cellules stromales notamment qui régulent leur auto-renouvellement et leur différenciation. En réponse à une lésion vasculaire ou à un stress physiologique, les PECs sortent de leur état quiescent et sont rapidement mobilisés et recrutés sur la zone endommagée par l'action des MMPs. Leur libération de la niche est régulée par une interaction complexe entre les cytokines/chimiokines, les protéinases et les molécules d'adhésion cellulaire.

Le couple SDF-1/CXCR4 semble être l'acteur principal de ce processus. Les CE matures et les péricytes des tissus hypoxiques, endommagés ou néoplasiques, les plaques d'athérosclérose et les plaquettes libèrent constitutivement le SDF-1, qui attire fortement les PECs puisqu'ils expriment le CXCR4. Les PECs eux même sécrètent du SDF-1 qui peut agir d'une façon paracrine. En entrant dans le microenvironnement de la moelle, le SDF1 active la MMP-9 qui induit la libération du ligand soluble Kit (sKitL) à partir du ligand membranaire (mKitL). sKitL est un ligand du c-kit exprimé par les PECs, en s'associant donc à ce dernier empêche la liaison des PECs au mKitL exprimé par les cellules stromales facilitant ainsi leur évacuation en dehors de la moelle osseuse. Le VEGF est également un agent mobilisateur efficace qui agit en activant les MMP de la moelle osseuse. Le G-CSF et le GM-CSF peuvent stimuler la mobilisation des PECs par la libération de protéinases (élastase, cathepsineG, MMP9 et lactoferrin) à partir de granules azurophiles et de granules spécifiques à l'intérieur des neutrophiles. En outre l'érythropoïétine (EPO), l'IL8, le Groβ, le NO et la protéine C-reactive (CRP) qui semblent, en partie, coopérer avec les MMPs sont également en mesure d'influencer la mobilisation des PECs. Le rôle du stress oxydatif caractérisé par la production accrue d'espèces réactives de l'oxygène a été rapporté. Quel que soit le facteur engagé, il semble y avoir des voies de signalisation communes impliquées dans la libération des PECs. La liaison du SDF-1 au CXCR4 par exemple induit l'activation de voies clés dans ce processus Akt-PI3K et la cascade MAPK-Erk. L'activation d'Akt semble favoriser la phosphorylation de la eNOS, l'augmentation de la production de NO et donc la migration des PECs. Akt intervient également dans la mobilisation induite par le VEGF. Erk1 et 2 sont impliquées dans la mobilisation induite par le SDF-1. Enfin, les intégrines qui représentent un régulateur clé de la mobilisation des PECs à partir de la moelle osseuse interviennent dans cette étape via les couples $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_4\beta_7$ et $\alpha_v\beta_3$ [197, 304-306].

3.3.2 Homing :

Une fois dans la circulation, les PECs migrent vers la zone ischémisée où ils vont rouler sur l'endothélium activé, puis s'arrêter et adhérer fermement avant d'entamer la migration transendothéliale. A leur sortie de la moelle osseuse, les PECs sont attirés vers les tissus endommagés par le gradient de chimiokines formé dans les zones de tissus nécessitant un

remodelage actif. Ce mécanisme est régulé par une hypoxie tissulaire et le VEGF-A et fait intervenir plusieurs couples de chimiokines/récepteurs : SDF-1/CXCR4, IL-8/CXCR2, growth regulated oncogene-a/CXCR1 et les chimiokines C-C et leurs récepteurs 2 et 5. Le *rolling* des PECs sur l'endothélium fait intervenir les sélectines E et P, les intégrines $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ et β_2 , l'Eph-B4, ICAM-1 ainsi que HMGB1 (*high-mobility group box 1*). Cette étape est suivie par l'extravasation des cellules vers les tissus sous-jacents. Peu de chose sont connues sur ce processus mais il semble être médié par les intégrines β_2 et dépend du VEGF, de l'activation de la voie Akt, du CD99 et du CD9 [304, 305, 307].

3.3.3 Invasion :

Après avoir traversé la monocouche endothéliale, les PECs migrent à travers la membrane basale des vaisseaux sanguins et à travers la matrice extracellulaire interstitielle vers le site de revascularisation. Ce processus dépend de la capacité invasive des PECs et du rôle essentiel de la matrice extracellulaire en tant que fournisseur de signaux biochimiques et biophysiques qui régissent le comportement cellulaire. Les PECs peuvent détecter la rigidité de la matrice extracellulaire à travers une cascade de signalisation intégrine-dépendante ($\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_6\beta_1$) conduisant à l'activation de la Rho guanosine triphosphate hydrolase et du CDC42 (*cell division control protein 42 homolog*). Par conséquent, si la rigidité de la matrice est élevée, les PECs augmentent la production et l'activité de protéases extracellulaires qui dégradent les composants de la matrice extracellulaire, de la membrane basale des vaisseaux et dans l'espace interstitiel. Les protéases majeures impliquées dans ce processus sont des membres de la famille des MMP (notamment la MMP-9 et MMP-2), les membres de la famille cathepsine (cathepsine L), les serines protéases et l'activateur tissulaire du plasminogène [304, 305].

3.3.4 Différenciation :

A leur arrivée sur les sites du remodelage vasculaire, les PECs se différencient en CE matures et s'incorporent dans les néovaisseaux par la production de signaux paracrines ou juxtacrines qui favorisent les interactions des PECs avec les cellules environnantes.

La maturation des PECs en CE fonctionnelles qui est une étape importante pour leur intégration dans les vaisseaux, est un processus très complexe qui peut être divisé en trois étapes : (i) la première étape consiste en l'interaction des intégrines ($\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_v\beta_5$) avec les composants de la matrice extracellulaire ; l'interaction direct de l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ avec la fibronectine a été décrite comme une étape cruciale de ce processus, (ii) l'intervention de facteurs de croissance dont le VEGF, les Ang, le PDGF, l'IGF, le HGF et le SDF-1, permet le maintien de survie des PECs recrutés et leur prolifération afin d'augmenter la population de cellules disponible, et (iii) la maturation et l'acquisition d'un phénotype endothélial, étape essentielle dans la biologie des PECs qui dépend principalement de la régulation du facteur de transcription HoxA, dont la transcription est régulée par les histones désacétylases induisant la transcription des facteurs p53 et p21, et l'expression de gènes codant pour la eNOS, le VEGFR-2, la VE-cadhérine et plein

d'autres facteurs. Ce processus de différenciation peut s'effectuer sur leur chemin vers les sites de revascularisation ou sur les sites de revascularisation eux même, ainsi le rôle des forces de cisaillement dans l'initiation du processus de maturation a été rapporté par plusieurs auteurs. En plus de se différencier en CE matures, les PECs produisent de multiples facteurs paracrines tels que le VEGF, le SDF-1, l' IGF-1, le MCP-1, le PDGF... pouvant agir sur différents types cellulaires et conduisant à une réponse globale qui favorise l'angiogenèse et la régénération des tissus [197, 304, 308].

II/Résultats

Chapitre I: Article 1; Osteoprotegerin, a new actor in vasculogenesis, stimulates endothelial colony-forming cells properties.

CHAPITRE I

Article 1: J Thromb Haemost. 2011 Apr;9(4):834-43.

Titre: Osteoprotegerin, a new actor in vasculogenesis, stimulates endothelial colony-forming cells properties.

Auteurs: Z. BENSLIMANE-AHMIM, D. HEYMANN, B. DIZIER, A. LOKAJCZYK, R. BRION, I. LAURENDEAU, I. BIECHE, D.M. SMADJA, I. GALY-FAUROUX, S. COLLIEC-JOUAULT, A. M. FISCHER, C. BOISSON-VIDAL.

1.1 Rationnel de l'étude et synthèse des résultats obtenus :

La néovascularisation est une étape fondamentale pour de nombreux mécanismes physiologiques et pathologiques tels que l'ischémie et le développement tumoral. Les conditions hypoxiques et inflammatoires provoquent la sécrétion de facteurs de croissance proangiogènes comme le VEGF qui vont favoriser l'extension de l'arbre vasculaire [177]. Plusieurs études ont rapporté que ces conditions inflammatoires étaient également en mesure de provoquer la libération d'un nouvel acteur angiogénique par l'endothélium, l'OPG, glycoprotéine soluble membre de la famille des récepteurs au TNF, impliquée principalement dans la régulation de l'homéostasie osseuse où elle intervient en freinant la résorption [1]. Ainsi, cette cytokine se retrouve au milieu d'une forte interaction entre les deux systèmes, osseux et vasculaire, qui collaborent étroitement pour assurer le renouvellement permanent d'une matrice osseuse hautement vascularisée. Le rôle de l'OPG dans la formation de la matrice osseuse est aujourd'hui bien élucidé mais son implication dans la vascularisation reste entièrement à établir.

Les études portant sur l'implication de l'OPG dans la biologie vasculaire, sont axées principalement sur un éventuel lien entre cette protéine et différentes maladies cardiovasculaires. Depuis l'étude de Malyankar *et al* en 2000, plusieurs auteurs ont rapporté son expression par les CE micro et macro vasculaires [44, 47, 106, 166]. Cependant, son rôle dans la formation de nouveaux vaisseaux n'a été suggéré qu'en 2006 par l'équipe de Cross *et al.* qui a observé un effet de l'OPG sur la survie des HUVECs et sur la formation d'ébauches vasculaires à partir de CE matures sur Matrigel [13].

Parce que c'est le récepteur leurre de RANKL, le rôle de l'OPG est souvent associé à son interaction avec ce dernier. RANKL est aujourd'hui considéré comme un important régulateur de la physiologie vasculaire. En plus des ostéoblastes et de leurs précurseurs, RANKL est exprimé par de nombreux types cellulaires dont les CE [66]. De nombreuses études ont mis en évidence son rôle proangiogène [309, 310]. RANKL stimule la motilité des CE ainsi que leur différenciation en pseudo-tubes sur Matrigel via son interaction avec RANK [309]. Min JK. *et al.* rapportent que RANKL induit une augmentation de la perméabilité vasculaire qui définit le mouvement et le passage de molécules et de cellules des vaisseaux sanguins vers les tissus avoisinants où se déroule l'angiogenèse active [310].

Les données de la littérature suggèrent un rôle compensateur de ces deux molécules (OPG et RANKL) sur le processus angiogénique, mais soulignent le fait que les mécanismes pharmacologiques les impliquant directement ou indirectement dans le système vasculaire, restent encore mal élucidés. **Le but de cette étude** était de décrire le rôle joué par ces protéines sur la néovascularisation induite *in vitro* par une sous population de PECs, les ECFCs, qui sont des cellules qui expriment des marqueurs endothéliaux CD31 / Tie-2 / VEGFR2 / CD144 et qui sont négatives pour les marqueurs monocytaires, CD14 et CD45. Au cours de cette étude :

- I. Nous avons mis en évidence l'expression des ARNm codant pour l'OPG mais pas pour RANKL, par les ECFCs. Les taux d'expression des ARNm codant pour l'OPG sont multipliés par un facteur de 6 et 9 respectivement en présence du SDF-1 et du VEGF (**figure 1, article 1**). Ces résultats ont été par ailleurs confirmés au niveau protéique par cytométrie de flux (**figure 12**).

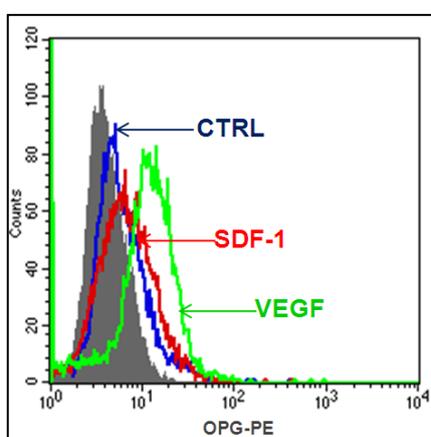


Figure-12 : Profil d'expression, en cytométrie de flux, de l'OPG par les ECFCs en culture dans un milieu de base supplémenté à 5% de sérum de veau fœtal (SVF) en présence et en l'absence du VEGF (courbe verte) et du SDF-1 (courbe rouge).

- II. Nous avons montré qu'un préconditionnement des ECFCs par l'OPG potentialise leurs propriétés proangiogènes *in vitro*, en induisant leur motilité et la formation d'ébauches vasculaires sur Matrigel (**figures 3 & 4, article 1**). L'OPG exerce par ailleurs, un fort effet chimio-attractant sur ces cellules. L'ensemble de ces effets est corrélé à une surexpression des ARNm codant pour le SDF-1 et à une activation des voies de signalisation ERK1/2, Akt et mTOR (**figure 6, article 1**).
- III. Nous avons décrit l'expression des ARNm codant pour RANK sur les ECFCs, ce qui les rend réactives à l'action de RANKL. L'interaction de RANKL avec son récepteur présent sur les ECFCs induit un profil proangiogène avec une augmentation significative de leur taux de prolifération, de migration et de leur tubulogénèse sur Matrigel (**figure 2, 3 & 4, article 1**). Cependant, cet effet est beaucoup moins marqué *in vivo* dans le modèle murin de matrice vascularisée ou Matrigel Plug (**figure 5, article 1**).

IV. Enfin, nous avons montré que l'association de ces deux molécules (OPG et RANKL) inhibe respectivement l'activité angiogénique des 2 protéines. Les propriétés proangiogènes de RANKL sont bloquées par l'ajout de l'OPG et vice versa (**figure 13**). Ces résultats sont probablement la conséquence de la formation du complexe OPG/RANKL qui les empêche d'atteindre leurs cibles respectives. Ce résultat élimine l'hypothèse selon laquelle l'OPG et RANKL joueraient un rôle compensateur sur la formation de néovaisseaux.

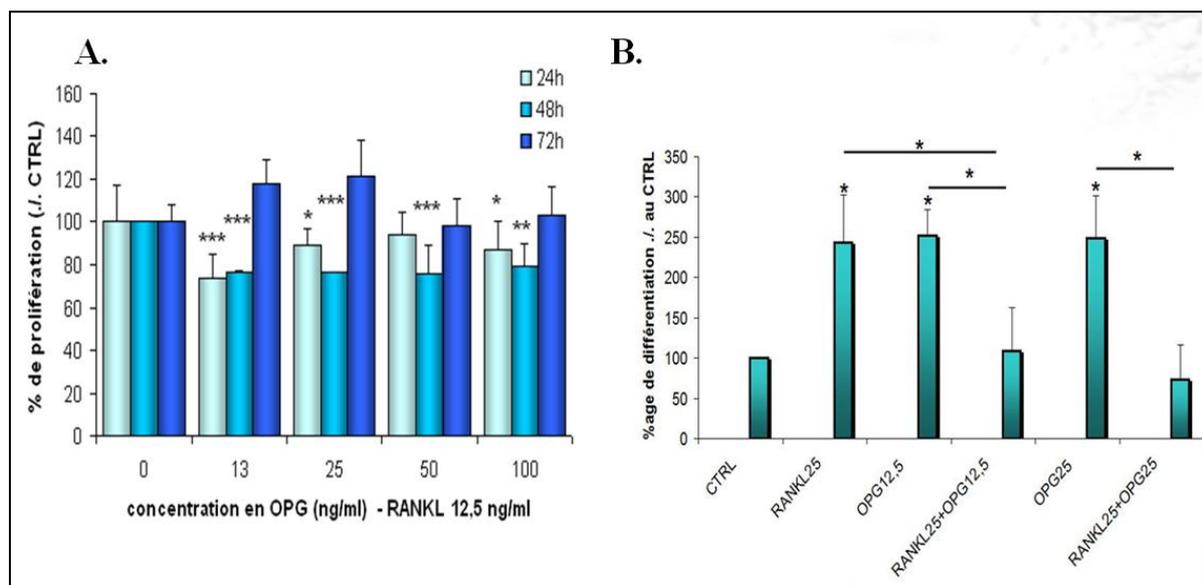


Figure-13: Effet d'un préconditionnement des ECFCs par les deux cytokines OPG et RANKL sur la prolifération et la tubulogénèse. A : diminution de l'effet pro-prolifératif de RANKL sur les ECFCs en présence de doses croissantes en OPG. B : neutralisation des effets de RANKL sur la formation de pseudo-tubes sur Matrigel en présence l'OPG et neutralisation des effets de l'OPG en présence d'OPG.

Il est donc évident que la triade OPG/RANK/RANKL est impliquée dans la vascularisation induite par les progéniteurs endothéliaux circulants, et que le rôle joué par OPG est complètement indépendant de RANKL puisque ce dernier n'est pas exprimé par les ECFCs. OPG intervient probablement via son interaction avec les HSPGs présents à la surface des ECFCs mais cela reste à confirmer par une étude plus approfondie de son mécanisme d'action. Nos résultats suggèrent donc un rôle de l'OPG dans les processus de revascularisation en conditions physiopathologiques. Je cite entre autres, le cas de l'angiogenèse tumorale puisqu'une libération abondante de l'OPG par une variété de cellules cancéreuses a été rapportée par plusieurs auteurs [145, 151, 159], mais également le cas de la vascularisation d'une matrice osseuse nouvellement formée. Par ailleurs, les résultats obtenus *in vivo*, dans le modèle murin du Matrigel plug montrant un effet synergique entre l'OPG et le FGF-2 dans la revascularisation (**figure 5, article 1**) renforcent l'idée d'une éventuelle collaboration entre ces deux cytokines (OPG et FGF-2) dans la formation de la matrice osseuse.

Le remodelage osseux est un processus physiologique complexe orchestré par de subtiles interactions entre plusieurs types cellulaires (essentiellement les ostéoclastes qui résorbent l'os

ancien et les ostéoblastes qui synthétisent la nouvelle matrice) et une multitude de facteurs de croissance. L'expression de cytokines ostéogéniques (OPG...) et/ou angiogéniques (FGF-2...) par les cellules impliquées dans les mécanismes du remodelage osseux induit des interactions cellulaires complexes qui optimisent le processus de consolidation osseuse [311, 312]. Le FGF-2 puissant stimulateur de la revascularisation *in vivo* et régulateur pléiotropique de la prolifération, la migration et la tubulogenèse des CE *in vitro*, est produit par les ostéoblastes et agit comme un régulateur local du remodelage osseux. Il intervient notamment sur la maturation, la différenciation et l'apoptose des cellules ostéoblastiques [311, 312]. L'OPG, produite également par les ostéoblastes, joue un rôle clé dans la régulation de l'homéostasie osseuse puisqu'elle protège l'os d'une résorption excessive. Elle est également capable d'agir sur la revascularisation de l'os. Elle pourrait donc intervenir en étroite collaboration avec le FGF-2 pour contrôler les mécanismes moléculaires gouvernant la formation et la vascularisation de la matrice osseuse.

La complémentarité des cytokines endothéliales et ostéogéniques a été confirmée par plusieurs études montrant la synthèse par les cellules du remodelage osseux de facteurs angiogéniques, et par les CE, de cytokines ostéogéniques [313]. Les PECs sont recrutés et participent à l'amélioration de la vascularisation d'os endommagés[313]. Ce mécanisme est renforcé par la présence d'OPG qui, en intervenant sur la matrice osseuse favorise sa formation et via son rôle vasculaire potentialise les propriétés proangiogènes des PECs et participe ainsi à la vascularisation de la matrice en formation.

1.2 Manuscrit :

**Autorisation de diffusion
non obtenue.**

**Chapitre II: Article 2; Mechanistic study
of the proangiogenic effect of
Osteoprotegerin.**

CHAPITRE II

Article 2: Angiogenesis, 2013. *Epub ahead of print.*

Titre: Mechanistic study of the proangiogenic effect of Osteoprotegerin.

Auteurs: **Z. BENSLIMANE-AHMIM**, F. POIRIER, C. DELOMENIE, A. LOKAJCZYK, F. GRELAC, I. GALY-FAUROUX, A. MOHAMEDI, A-M. FISCHER, D. HEYMANN, D. LUTOMSKI, C. BOISSON-VIDAL.

2.1 Rationnel de l'étude et synthèse des résultats obtenus :

Dans cet article, nous approfondissons le mécanisme d'action de l'OPG sur la néovascularisation induite par les ECFCs. Les résultats précédemment obtenus (**Article 1**), qui démontrent la libération de l'OPG par les ECFCs et confirment son implication dans le processus de revascularisation, suggèrent un rôle important de l'OPG dans la néoangiogenèse physiologique et pathologique (vascularisation de la matrice osseuse, tumeurs, ischémie...). En effet, en raison d'une production abondante de cytokines inflammatoires par les tissus ischémiés et tumoraux, l'OPG peut être rapidement et constitutivement libérée par l'endothélium (CE et CML). Cette OPG est capable de participer au recrutement des ECFCs sur les sites de revascularisation et de favoriser la tubulogenèse. Les effets proangiogènes observés sont corrélés à une surexpression des ARNm codant pour le SDF-1, et l'OPG semble intervenir via un récepteur autre que RANKL, probablement les HSPGs.

Ainsi, pour examiner de plus près le mécanisme d'action de l'OPG, nous avons réalisé une analyse protéomique des ECFCs prétraitées à l'OPG afin de mettre en évidence les différentes voies métaboliques affectées par cette protéine. Le rôle du SDF-1 dans ses effets proangiogènes a été également exploré, tout comme l'implication des HSPGs, en mettant l'accent sur le rôle des syndécannes 1 et 4. L'importance du domaine de liaison à l'héparine de l'OPG a été également étudiée.

- I. **Résultats de l'analyse protéomique :** l'analyse protéomique nous a permis de déterminer le profil d'expression protéique des ECFCs après un traitement à l'OPG. Comme le montre le **tableau 2 (Article 2)**, l'expression de 24 polypeptides est touchée par l'OPG ; 17 sont sous-exprimés tandis que 7 sont surexprimés. Ces protéines sont impliquées entre autres, dans la régulation du métabolisme énergétique, la transduction du signal, l'apoptose, la motilité et l'adhésion cellulaire.
 - (i) L'expression de plusieurs protéines décrites pour jouer un rôle dans l'adhésion cellulaire (*catenin alpha-1*, *spectrin alpha chain*, *copin-1*, *vinculin*, *β-actin*) diminue sous l'effet de l'OPG, ce qui suggère un effet inhibiteur sur l'adhésion cellulaire. Après avoir confirmé certains de ces résultats par RT-qPCR et/ou western blot, nous avons exploré l'implication de l'OPG dans l'adhésion des ECFCs aux protéines de la matrice extracellulaire (fibronectine et collagène de type I) en conditions statiques, et à l'endothélium activé en conditions dynamiques de flux.

En conditions statiques, 20 minutes suffisent pour une adhésion optimale des ECFCs prétraitées à l'OPG. Cependant, cet effet est complètement aboli au bout de 2h d'incubation (**figure 3A-B, article 2**), ce qui suggère que l'OPG favorise l'adhésion intermédiaire des ECFCs mais inhibe leur adhésion focale. Par ailleurs, une réduction de l'activation de la voie FAK est observée en présence d'OPG (**figure 3C, article 2**). Le modèle d'adhésion à l'endothélium activé en conditions dynamiques de flux repose sur l'utilisation d'un système de perfusion au travers d'une chambre tapissée d'une monocouche d'HUVECs en subconfluence, qui permet de mimer l'endothélium et les forces de cisaillement ($50s^{-1}$) subies par les cellules dans les veines ou les artères. Un prétraitement des ECFCs à l'OPG 24h avant leur perfusion sur l'endothélium activé, induit une amélioration significative de leur *rolling*, *tethering* et adhérence (**figure 3D-E, article2**) et une résistance au détachement à des forces de cisaillement plus importantes (jusqu'à $3000 s^{-1}$) (**figure 3F, article 2**). L'OPG induit donc l'expression de molécules favorisant l'adhésion des ECFCs à l'endothélium et non à la matrice.

- (ii) Tandis que des protéines impliquées dans l'adhésion sont sous-exprimées sous l'effet de l'OPG, celles participant à la migration cellulaire sont cependant augmentées, c'est le cas notamment de la *Polymerase I and transcript release factor* et de *Dihydropyrimidinase-related protein-2*. L'effet de l'OPG sur la migration des ECFCs n'est plus à démontrer (**Article 1**), cependant, nous avons voulu regarder si cet effet était visible au niveau du cytosquelette. En effet, en réponse à des signaux chimiotactiques les CE subissent des modifications importantes dans l'organisation et la morphologie de leur cytosquelette. Les fibres d'actine se réorganisent pour induire l'allongement des cellules et leur orientation dans la direction imposée [314, 315]. Ces réponses sont fortement tributaires de la polymérisation et de la dépolymérisation des fibres d'actine. La motilité cellulaire est en effet, inversement proportionnelle aux dimensions et au nombre de points d'adhésion focaux [316]. Un marquage d'ECFCs à la phalloïdine, montre que l'OPG induit une réorganisation du cytosquelette d'actine avec l'émergence de protrusions cellulaires caractéristiques du phénotype migratoire (**figure 3G, article 2**).
- (iii) La *Protein-disulfide isomerase* (Pdi) joue un rôle dans le repliement correcte des protéines. L'analyse protéomique a montré que l'OPG induit des taux d'expression très bas de la Pdia3, un membre de la famille des Pdi. Cependant, la RT-qPCR montre une surexpression des ARNm codant pour cette protéine. Ceci est probablement lié au fait que la Pdia3 est rapidement sécrétée par les CE activées [317] pour former un complexe avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ induisant ainsi l'activation de cette dernière [318]. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est directement impliquée dans les processus angiogéniques et intervient notamment dans la migration et l'adhésion cellulaire [266] [319]. Nous avons donc vérifié si l'effet exercé sur la régulation de la Pdia3 était accompagné d'une activation de cette intégrine. L'expression de $\alpha_v\beta_3$ a été évaluée par cytométrie de flux de 0 à 24h après stimulation à l'OPG. L'expression de cette intégrine

augmente d'environ 10% 1h après le traitement, et passe du simple au double 3heures plus tard (**figure 2C-D, article 2**). Les propriétés proangiogènes de l'OPG sont passés donc en partie, par la modulation de l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

- (iv) L'expression des protéines impliquées dans la survie cellulaire est également modulée sous l'effet de l'OPG. C'est le cas notamment de la *transaldolase*, l'*Hypoxia up-regulated protein-1* et l'*Endophilin-B1*. En inhibant l'activité de la glucose-6-phosphate déshydrogénase, la transaldolase rend les cellules plus sensibles à l'apoptose induite par une carence en facteurs de croissance, le peroxyde d'hydrogène et le NO. A l'inverse, lorsque les taux de cette protéine sont au plus bas, tel est le cas d'ECFCs prétraitées à l'OPG, les cellules sont protégées de l'apoptose [320]. *Hypoxia up-regulated protein-1* dont l'expression est augmentée sous l'effet de l'OPG, inhibe la libération du calcium par le réticulum endoplasmique, et protège ainsi la cellule de l'apoptose induite par un dérèglement du calcium cytosolique [321]. *Endophilin-B1* qui se trouve également surexprimée sous l'effet de l'OPG est une protéine anti-apoptotique impliquée dans l'autophagie, processus essentiel au maintien de l'homéostasie et la survie cellulaire en recyclant les nutriments dans des conditions de carence en facteurs de croissance [322]. Ces résultats qui suggèrent un rôle anti-apoptotique de l'OPG sur les ECFCs, sont étayés par ceux obtenus avec les tests de CellTiter-Glo et Caspase-Glo 3/7 qui montrent une réduction de l'activité des caspase-3/7 (**figure 2E, article 2**) chez les ECFCs stimulées à l'OPG et une amélioration de leur survie (**figure 14**). Nous avons également relevé une diminution significative dans la phosphorylation de la voie p38 (**figure 2F, article 2**).

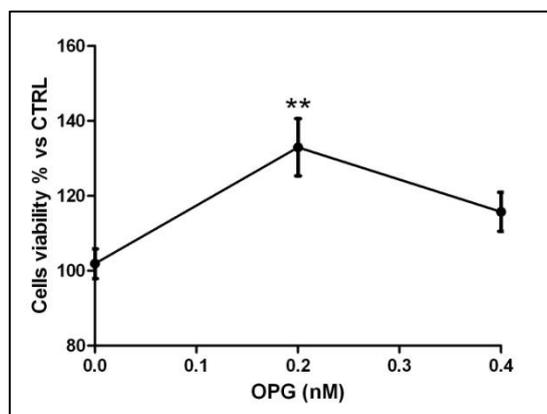


Figure-14: Effets de l'OPG sur la survie des ECFCs. La viabilité cellulaire a été évaluée par le test de CellTiter-Glo après 48h d'incubation des ECFCs en présence d'OPG (0-0.4nM). Les résultats sont normalisés à ceux obtenus avec les ECFCs non traités et exprimés en moyenne \pm SEM de trois expériences indépendantes (** $p < 0,01$).

- (v) Une modulation des protéines impliquées dans la transcription (*Polymerase I and transcript release factor*), la synthèse de facteurs de croissance (*Hypoxia up-regulated protein-1*, *Matrin-3*, *ERO1-like protein alpha*), la dégradation de protéines mal repliées (*Alanyl-tRNA editing protein Aarsd1*, *26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13*, *26S protease regulatory subunit 7*, *Calpain small subunit 1*), le traffick membranaire (*ERO1-like protein alpha copine-1*, *Early endosome antigen-*

1) et le métabolisme des pre-mRNA (*Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K Actin cytoplasmic-1*) sont également observés en présence d'OPG, ce qui témoigne d'une activité métabolique importante. Par ailleurs, les taux d'expression de la *Phosphoribosylformylglycinamide synthase* et de *Polymerase I and transcript release factor*, deux protéines impliquées dans la différenciation et la tubulogénèse, sont multipliés par 3 et 7 respectivement en présence d'OPG.

II. Rôle du SDF-1 dans les effets proangiogènes de l'OPG :

Nous avons précédemment observé une augmentation des ARNm codant pour SDF-1 en présence d'OPG (**Figure 1, article 1**). Nous confirmons dans cet article ce résultat au niveau protéique dans les surnageants de culture (**Figure 4A, article 2**). L'analyse protéomique montre une surexpression de la *Dihydropyridinase-related protein-2*, polypeptide fortement impliqué dans la migration directionnelle induite par le SDF-1 [323]. Nous avons donc recherché l'implication de la voie SDF-1/CXCR4 dans les propriétés proangiogènes de l'OPG.

- (i) En utilisant l'AMD3100, un antagoniste spécifique du CXCR-4, nous avons pu bloquer l'interaction du SDF-1 avec son récepteur sur les ECFCs prétraitées à l'OPG, puis nous avons testé leur capacité à migrer et à former des pseudo-tubes sur Matrigel. L'inhibition de l'interaction SDF-1/CXCR4 induit une réduction de 50% de la migration induite par l'OPG (**Figure 4B, article 2**) et la tubulogénèse d'environ 30% (**Figure 15**). L'effet proangiogène de l'OPG est donc en partie dépendant de la voie SDF-1/CXCR4.
- (ii) Afin de déterminer si le SDF-1 libéré par les ECFCs sous l'effet de l'OPG est fonctionnel, nous avons évalué l'effet des milieux conditionnés des cellules prétraitées par l'OPG sur la cicatrisation d'une monocouche d'HUVECs, traitées ou non à l'AMD3100. Le SDF-1 libéré est capable d'induire la cicatrisation de la monocouche d'HUVECs (**Figure 4C, article 2**). Il est également capable d'induire la prolifération de ces cellules. Ainsi, en plus du rôle autocrine joué par le SDF-1 libéré par les ECFCs sous l'effet de l'OPG, ces résultats lui suggèrent un effet paracrine puisqu'il est capable d'interagir avec d'autres cellules.

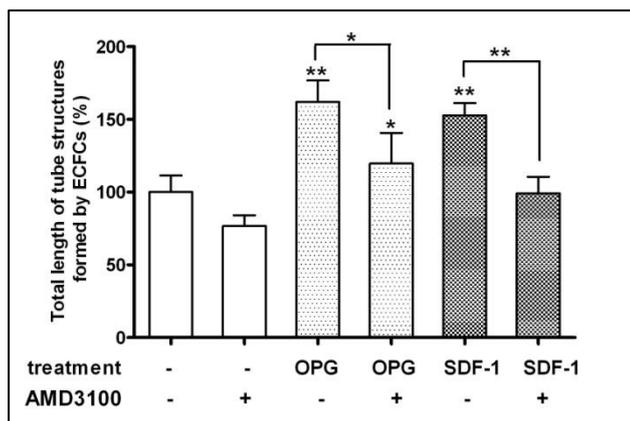


Figure-15: le SDF-1 libéré sous l'effet de l'OPG par les ECFCs est en partie responsable de la formation de pseudotubes induite par l'OPG. Les ECFCs sont traitées à l'AMD3100 pendant 30min avant d'être stimulées à l'OPG pendant 24heures puis ensemencés sur Matrigel pendant 18heures. Les résultats présentent la longueur des pseudo-tubes formés et sont normalisés par rapport aux ECFCs non traitées et exprimés en moyenne \pm SEM de trois expériences indépendantes (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

III. Implication des HSPGs, des syndécannes 1 et 4 et du domaine de liaison à l'héparine dans le processus angiogénique induit par OPG:

- (i) Par ce que l'OPG n'intervient très probablement pas via son interaction avec RANKL pour exercer ses effets sur les ECFCs, nous avons vérifié si elle intervenait via son domaine de liaison à l'héparine avec les HSPGs présents à la surface cellulaire. Les HSPGs jouent un rôle important dans les fonctions biologiques de l'OPG, notamment dans son interaction avec les ostéoclastes. Ainsi avant d'être stimulé à l'OPG, les ECFCs ont été prétraitées avec un mélange enzymatique contenant de l'héparinase I et III et les chondroïtinases A, B et C, permettant de dégrader les héparanes sulfates et les chondroïtines sulfates. L'efficacité des enzymes utilisées a été préalablement testée (**Article 5 en annexe 1**). L'abrasion des HSPGs a complètement inhibé les effets proangiogènes de l'OPG. En effet, les ECFCs prétraités aux enzymes ne migrent plus en réponse à l'OPG (**Figure 5A, article 2**), ne forment plus ou très peu de pseudotubes sur Matrigel (**Figure 5B, article 2**). Dans ce cas-là, l'expression des ARNm codant pour SDF-1 reste à son niveau le plus bas (**Figure 16**). les HSPGs sont donc indispensables à l'action de l'OPG.

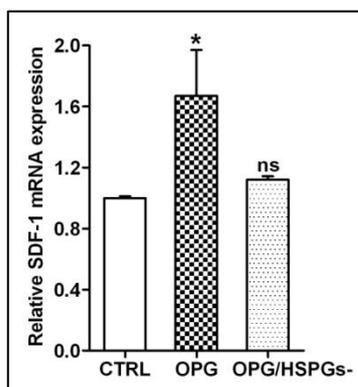


Figure-16: L'abrasion des HSPGs inhibe l'effet de l'OPG sur l'expression des ARNm codant pour SDF-1. La RT-qPCR a été réalisée 4h après un traitement à l'OPG (0,4 nM). GAPDH et Rplp0 ont été utilisés comme des contrôles internes. Les résultats sont exprimés en niveaux de transcription par rapport aux ECFCs CTRL (* $p < 0,05$, ns : non spécifique).

- (ii) Les syndécannes sont des récepteurs cellulaires impliqués dans plusieurs voies régulant l'adhésion, la migration, la prolifération et la différenciation cellulaire. Du fait de leur interaction avec une multitude de facteurs de croissance et leur lien avec les effets de l'OPG sur les monocytes, les syndécannes 1 et 4 sont tous deux des récepteurs potentiels de l'OPG sur les CE. Après nous être assuré de leur expression à la surface des ECFCs (**Figure 6A-B, article 2**), nous avons déterminé leur implication dans l'angiogenèse induite par l'OPG. L'utilisation d'anticorps dirigé contre l'ectodomaines du SDC-1, nous a permis d'observer une réduction importante de la migration induite par OPG (**Figure 17**), une diminution des taux d'ARNm codant pour le SDF-1 (**Figure 6C, article 2**) et une diminution de l'activation des voies de signalisation ERK1/2 et Akt (**Figure 6D-G, article 2**). Le SDC-1 joue donc un rôle important dans l'activité proangiogène de l'OPG, qui agit indépendamment du SDC-4.

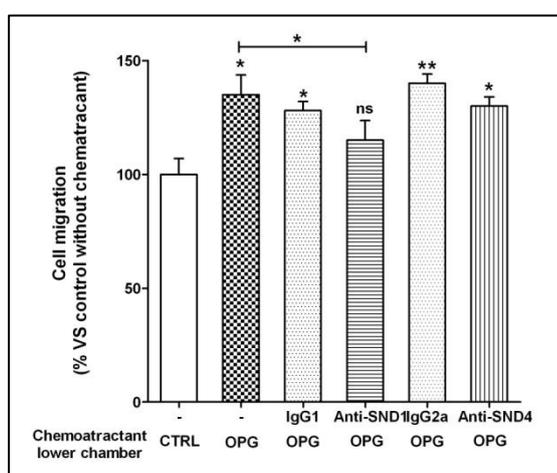


Figure-17: L'inhibition du SDC-1, mais pas celle du SDC-4, induit une réduction importante de la migration induite par OPG. Les cellules ont été prétraitées avec des anticorps dirigés contre les ectodomaines du SDC-1 ou du SDC-4 ou avec l'isotype correspondant à chaque syndécanne, avant d'être traitées à l'OPG (0,4 nM), ensemencées dans des inserts de Boyden et de les laisser migrer vers un milieu de base (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$) ns : non spécifique.

- (iii) Comme la plupart des facteurs de croissance angiogéniques, l'OPG possède un domaine de liaison à l'héparine à son extrémité C-terminale. Nous avons vérifié son importance dans les propriétés proangiogènes de l'OPG en testant les effets d'une OPG tronquée (OPG 1-194) et en les comparant à ceux de l'OPG recombinante intacte (OPG 1-401). D'une façon inattendue, l'OPG (1-194) stimule la migration, la chimiotaxie, la tubulogenèse, la phosphorylation des voies ERK1/2 et Akt (**Figure 7B-E, article 2**), ainsi que l'expression des ARNm codant pour le SDF-1 (**Figure 18**), à des niveaux similaires à ceux observés pour l'OPG (1-401). L'effet le plus marquant est obtenu *in vivo* avec le modèle du Matrigel plug, où l'OPG tronquée (1-194) présente un effet plus important que l'OPG (1-401) sur la potentialisation de la néoangiogenèse induite par le FGF-2 (**Figure 7F-G, article 2**). Ces résultats qui montrent donc l'implication d'un domaine autre que celui de liaison à l'héparine dans les propriétés proangiogènes de l'OPG, suggèrent que les effets de cette dernière ne se limitent pas à son interaction avec les HSPGs/SDC-1. Ce dernier interviendrait donc soit

comme un récepteur de basse affinité soit en tant corécepteur qui lie et présente de façon optimale l'OPG à un récepteur X qui reste encore à identifier.

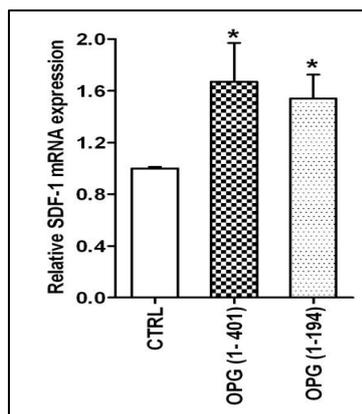


Figure-18: OPG (1-194) induit l'expression des ARNm codant pour le SDF-1 à des niveaux similaires à OPG (1-401). La RT-qPCR a été réalisée après 4h de traitement à l'OPG (1-194) ou à l'OPG (1-401) (0,4 nM). (* $p < 0,05$).

En conclusion, cette étude confirme une fois de plus l'importante contribution de l'OPG dans le processus de revascularisation et fournit plusieurs éléments nouveaux sur son mécanisme d'action. Nous avons schématisé dans la **figure 8 (article2)** les différentes étapes d'intervention de l'OPG sur les propriétés angiogéniques des ECFCs tel que nos résultats le suggèrent. En conditions inflammatoires, des cytokines telles que TNF α ou d'IL-1 β et des facteurs de croissance proangiogènes comme le VEGF stimulent la production de l'OPG endogène par les CE et les CML. L'OPG ainsi libérée dans la matrice extracellulaire via son effet chimioattractant, facilite le recrutement des ECFCs sur les sites de revascularisation. Dans la circulation, elle active les PECs et induit leur adhérence et extravasation vers les sites de revascularisation active où elle permet leur tubulogénèse. Les HSPGs de la matrice extracellulaire peuvent lier l'OPG circulante, la piéger dans la matrice et augmenter sa biodisponibilité.

2.2 Manuscrit :

Autorisation de diffusion
non obtenue.

**Chapitre III: Article 3; Osteoprotegerin
promotes tumour development in an
orthotopic murine model of osteosarcoma.**

CHAPITRE III

Article3: Pour une soumission à Cancer Research (*short communication*).

Titre: Osteoprotegerin promotes tumor development in an orthotopic murine model of osteosarcoma.

Auteurs: Z. BENSLIMANE-AHMIM, J. PEREIRA, A. LOKAJCZYK, I. GALY-FAUROUX, AM. FISCHER, D. HEYMANN, C. BOISSON-VIDAL.

3.1 Rationnel de l'étude et synthèse des résultats obtenus :

Du fait de son expression par une variété de tissus, l'OPG peut interagir avec un grand nombre de types cellulaires de tissus sains ou cancéreux. Elle est ainsi décrite pour intervenir dans le développement de plusieurs cancers dont les ostéosarcomes.

Les ostéosarcomes sont les tumeurs malignes primitives les plus répandues. Ils peuvent toucher tous les os du squelette mais se développent, le plus souvent, sur les os longs situés à proximité du genou, de la hanche et de l'épaule. Leur développement est lié à l'existence d'un cercle vicieux entre la résorption osseuse et la prolifération tumorale [324]. L'ostéosarcome est en effet accompagné d'un dérèglement dans l'expression de l'OPG. Les ostéoclastes activés dégradent le tissu osseux conduisant ainsi à la libération de facteurs favorables à la prolifération des cellules tumorales. À leur tour, les cellules tumorales sécrètent des facteurs permettant la différenciation et l'activation des ostéoclastes[324]. Le blocage de ce cercle vicieux par des molécules inhibant la résorption osseuse représente donc une approche thérapeutique prometteuse.

L'OPG a été ainsi proposée comme un candidat potentiel. Cependant la découverte de son habilité à inhiber l'activité de TRAIL a remis en question son éventuelle utilisation comme agent thérapeutique. En effet, cette protéine peut exercer un effet anti- ou pro-tumorale selon qu'elle soit associée à RANKL ou à TRAIL, ce qui est en fonction des concentrations relatives des deux cytokines dans l'environnement tumorale [5, 13, 140]. Elle inhibe l'apoptose de certaines cellules tumorales via sa liaison à TRAIL, et via sa liaison à RANKL, en plus de l'inhibition de l'ostéoclastogénèse, elle diminue la capacité de migration de certaines cellules cancéreuses [141].

L'angiogénèse est un processus important qui contribue à la croissance et à la progression tumorale. Diverses cytokines angiogéniques sont des mitogènes puissants [325]. Par conséquent, l'angiogénèse tumorale a été beaucoup étudiée et des liens entre l'angiogénèse, les métastases et la survie globale ont été établis [326]. L'OPG peut maintenant être ajoutée à la liste des facteurs pouvant participer à l'angiogénèse pathologique. Son implication dans les deux processus d'angiogénèse et de vasculogénèse vient d'être décrite, et son expression par des néovaisseaux associés aux tumeurs malignes a été mise en évidence [13].

Par ailleurs, un nombre croissant de preuves indique la participation des PECs à la vascularisation tumorale. Leur intégration fonctionnelle dans les néovaisseaux et leurs effets paracrines ont été rapportés [327]. Nous avons déjà montré que l'OPG améliore nettement les propriétés fonctionnelles pro-angiogènes d'une sous-population de PECs, les ECFCs (**Article 1**). Les effets observés sont accompagnés d'une surexpression du SDF-1, un acteur clé dans la migration des cellules tumorale. En effet, le SDF-1 a été décrit pour favoriser le développement et les métastases de tumeurs exprimant le CXCR4 [198]. En plus de l'inhibition de l'apoptose induite par le TRAIL, l'OPG pourrait donc favoriser la croissance tumorale en induisant la sécrétion de chimiokines proangiogènes par les CE. Ces chimiokines sont aussi en mesure de promouvoir la migration de cellules tumorales et par conséquent les métastases.

Nous avons déjà montré que le SDF-1 libéré par les ECFCs sous l'effet de l'OPG était capable d'agir sur d'autres types cellulaires (HUVECs). **Au cours de ce travail, nous avons étudié** la capacité chimioattractante du SDF-1 sécrété par les ECFCs sous l'effet de l'OPG sur une lignée de cellules tumorales issues d'un ostéosarcome humain (HOS) *in vitro*. Nous avons ensuite évalué dans un modèle murin de xénogreffes tumorales, l'effet de l'OPG sur la croissance, la vascularisation et la formation de métastases tumorales *in vivo*.

I. Effet de l'OPG et du SDF-1 libérés dans le milieu de culture d'ECFCs prétraitées à l'OPG, sur la migration des lignées tumorales *in vitro* :

- (i) Parce qu'elles expriment CXCR4, les cellules HOS peuvent répondre à l'action chimioattractante du SDF-1. Nous avons donc évalué l'effet de milieux conditionnés d'ECFCs prétraitées à l'OPG sur la migration directionnelle des HOS (chimiotaxie) *in vitro* en chambre de Boyden. Comme le montre **la figure 1B**, le milieu conditionné d'ECFCs prétraitées à l'OPG contiennent des cytokines qui attirent fortement les HOS. L'ajout d'AMD3100 (un antagoniste du CXCR4) dans le milieu de culture des HOS diminue d'environ 50% cet effet chimioattractant. Cela suggère que le SDF-1 libéré par les ECFCs sous l'effet de l'OPG est en grande partie responsable des effets observés, mais il n'est pas le seul à intervenir. En plus du SDF-1, l'OPG induit la libération d'autres facteurs proangiogènes susceptibles d'attirer les HOS. Par ailleurs, l'OPG elle-même présente un effet chimioattractant sur ces cellules (**figure 1B, article 3**).
- (ii) Le SDF-1 libéré par les ECFCs sous l'effet de l'OPG induit la motilité des HOS. Un prétraitement pendant 24h, des HOS avec les milieux conditionnés d'ECFCs traitées à l'OPG, avant leur ensemencement en chambre de Boyden, augmente le nombre de cellules ayant migré dans la chambre inférieure du dispositif. L'ajout d'AMD3100 dans les milieux de culture réduit cet effet d'environ 20% (**figure 1C, article 3**).
- (iii) Afin de vérifier si les effets observés sont spécifiques aux HOS ou peuvent être observés aussi pour d'autres lignées tumorales, nous avons réalisé ces tests sur des cellules issues d'un

cancer de la prostate, la lignée DU145. Le cancer de la prostate peut se développer rapidement et la voie SDF-1/CXCR4 est fortement impliquée dans ses métastases osseuses qui représentent la complication la plus critique entraînant des douleurs intenses, la morbidité et la mortalité [328]. En outre, les métastases issues de ces tumeurs sécrètent fortement l'OPG [329]. Les niveaux sériques sont positivement corrélés à la progression des métastases osseuses [330]. En accord avec ces données, nos résultats montrent que les milieux conditionnés d'ECFCs prétraitées ou non à l'OPG attirent les DU145. Cependant, l'effet de ces milieux conditionnés est supérieur à l'effet exercé par le SDF-1 seul. Cet effet est réduit de 30% après l'inhibition de l'interaction SDF-1/CXCR4 par l'AMD3100 (**figure 1D, article 3**).

II. Effet de l'OPG sur la croissance, la vascularisation et le développement de métastases tumorales *in vivo* dans un modèle de xénogreffes tumorales chez la souris Nude :

Afin d'évaluer l'implication de l'OPG dans le développement et la vascularisation d'ostéosarcome *in vivo*, nous avons réalisé un modèle de xénogreffe tumorale en injectant des cellules HOS marquées à la GFP (*green fluorescent protein*), à des souris Nude. Dès que les tumeurs ont atteint un volume de 3 à 4 mm³, un protocole de traitement par injection intra-tumorale a été appliqué. Les souris ont été réparties en 4 groupes recevant, deux fois par semaines, soit du PBS (solvant), de l'OPG, du FGF-2 ou un mélange d'OPG et de FGF-2. En effet, nous avons préalablement décrit un effet synergique entre l'OPG et le FGF-2 dans la formation de néovaisseaux *in vivo* (**Article 1**), nous souhaitons vérifier cet effet dans l'angiogenèse tumorale. Les résultats obtenus sont les suivants :

- (i) **La croissance tumorale :** Pendant la première semaine du traitement, aucune différence significative n'a été notée entre les différents groupes, après quoi, les trois groupes OPG, FGF-2 et OPG+FGF-2 se sont démarqués du groupe CTRL, en présentant des tumeurs deux à trois fois plus grosses. Les tumeurs de ces trois groupes poussent ensuite à une vitesse équivalente jusqu'au 17^{ème} jour du traitement, où les tumeurs du groupe OPG/FGF-2 flambent et présentent une croissance tumorale bien plus importante jusqu'à atteindre des tailles critiques au 24^{ème} jour (**figure 2, article 3**).
- (ii) **L'angiogenèse tumorale :** afin d'évaluer le degré de vascularisation de chaque tumeur, les souris ont été sacrifiées à J24, et les tumeurs récupérées pour quantifier les capillaires formés par immunohistochimie et marquage au CD31. Comme attendu, la densité des microvaisseaux du groupe OPG/FGF-2 est supérieure à celles des deux groupes FGF-2 et OPG (**figure 3, article 3**). Nous pouvons remarquer que les niveaux de vascularisation sont corrélés à la croissance tumorale. Ce qui n'est pas surprenant, étant donné que les vaisseaux sanguins sont nécessaires à la croissance tumorale en assurant l'approvisionnement en nutriments et en oxygène.

(iii) **Développement des métastases** : Comme les ostéosarcomes présentent un fort potentiel métastatique, et que après l'os, les poumons sont le siège le plus fréquent de métastases suivis par le foie[331], nous avons prélevés ces deux derniers organes pour une évaluation histologique de l'expression de la GFP. La présence de cellules marquées à la GFP indique la présence des cellules tumorales. Les poumons des souris des 4 groupes ont été atteints à des degrés équivalents. Cependant, l'administration de l'OPG seule (5 fois) ou associée au FGF-2 (14 fois) a induit une augmentation significative du nombre de métastases vers le foie comparativement aux autres groupes de souris FGF2 et CTRL (**figure 4 article 3**). Bien que le groupe FGF-2 ait montré un degré de vascularisation similaire à celui du groupe OPG, le niveau des métastases dans le foie n'est pas significativement différent du groupe CTRL. L'injection d'OPG a donc favorisé la dissémination et le développement de la tumeur sur d'autres sites, les métastases.

Les résultats de cette étude associés à ceux obtenus précédemment (**Articles 1 & 2**) suggèrent qu'en plus de ses effets sur la survie des cellules tumorales et sur l'ostéoclastogénèse, l'OPG libérée par l'ostéosarcome est en mesure de recruter les progéniteurs endothéliaux et de potentialiser leurs propriétés angiogéniques autocrines et paracrines pour participer activement à la vascularisation et au développement de la tumeur et de ses métastases. Cet effet est favorisé par la sécrétion accrue de SDF-1 par les ECFCs recrutées sous l'action de l'OPG. Ils sont probablement observés dans le cas d'autres tumeurs, cas du cancer de la prostate par exemple. Par ailleurs, il n'est pas exclu que l'OPG présente *in situ* dans la moelle puisse favoriser le développement de métastases osseuses, ce développement étant la conséquence d'une balance entre ses propriétés angiogéniques et ses effets sur la résorption osseuse où la voie SDF-1/CXCR4 joue un rôle crucial.

En fin, des expériences supplémentaires visant à confirmer les métastases observées en utilisant un anticorps anti-GFP, et à la recherche d'une infiltration des macrophages sont en cours de réalisation avant de soumettre cet article.

3.2 Manuscrit :

**Autorisation de diffusion
non obtenue.**

**Chapitre IV : Article 4 ; Osteoprotegerin
regulates progenitor endothelial cell
differentiation.**

CHAPITRE IV

Article4: Pour une soumission à *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* (brief report).

Titre: Osteoprotegerin regulates progenitor endothelial cell differentiation.

Auteurs: **Z. BENSLIMANE-AHMIM**, I. GALY-FAUROUX, A. LOKAJCZYK, A. M. FISCHER, D. HEYMANN, C. BOISSON-VIDAL.

4.1 Rationnel de l'étude et synthèse des résultats obtenus :

Il existe une interaction étroite entre les deux systèmes osseux et vasculaire, ceci est le résultat de subtiles interactions entre une multitude de facteurs angiogéniques et ostéogéniques. De nombreuses cytokines ostéogéniques ont été ainsi décrites pour influencer la biologie des CE. C'est le cas par exemple de l'ostéopontine et de la BMP-2, régulateurs de l'angiogenèse *in vivo* et *in vitro* [332]. C'est aussi le cas de l'OPG comme nous l'avons vu précédemment (**Articles 1 et 2**).

La mobilisation et la participation des PECs à la vasculogenèse postnatale est une étape importante dans la réparation tissulaire. Il a été démontré que ces cellules contribuent à 25% des vaisseaux sanguins nouvellement formés [333]. Il est bien établi que les PECs sont recrutés sur les sites nécessitant une réparation vasculaire en réponse à un gradient de facteurs de croissance et de cytokines libérés dans la circulation par l'endothélium lésé et les tissus endommagés[334]. L'OPG fait partie de ces cytokines qui sont capable d'être rapidement et constitutivement libérées par l'endothélium en conditions inflammatoires. Les PECs se retrouvent ainsi doublement exposés à cette protéine : dans la moelle osseuse où l'OPG est libérée par les cellules stromales et les ostéoblastes et dans la circulation générale où elle est libérée par l'endothélium. Nous avons déjà décrit l'effet de cette cytokine sur les propriétés angiogéniques des PECs et **au cours de cette étude, nous avons exploré ses effets sur leur maturation biologique.** L'OPG a en effet été décrite comme un modulateur important de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques puisqu'elle influence leur expansion, leur différenciation et leur prolifération [4]. **Aurait-elle les mêmes effets sur les PECs ?**

Les PECs qui sont une fraction mineure des cellules mononuclées du sang périphérique provenant de la moelle osseuse, représentent une population hétérogène de cellules. Plusieurs auteurs ont tenté de les décrire phénotypiquement mais jusqu'à aujourd'hui, il n'existe aucun consensus sur leur caractérisation définitive. Deux populations de PECs ont été décrites, les CFU-ECs et les ECFCs. Les CFU-ECs expriment le CD31, CD34, CD105, CD144, CD146, vWf, VEGF-R2, CD14, CD45 et CD115, et les ECFCs, le CD31, CD34, CD105, CD144, CD146, KDR et VWF [18]. Nous avons donc étudié les effets de l'OPG sur la maturation biologique des ECFCs.

Pour ce faire, des cellules CD34+ ont été isolées à partir du sang de cordon ombilical humain fraîchement prélevé, cultivées dans le milieu de croissance endothélial classique

(*Endothelial Growth Medium-2*) en présence (appelées ECFCs-OPG) et en l'absence d'OPG (ECFCs-CTRL). A partir du 10^{ème} jour de culture, l'apparition de colonies caractéristiques des ECFCs a été surveillée chaque jour. En utilisant le test d'exclusion au bleu de trypan, les cellules obtenues ont été comptées à chaque passage afin d'évaluer leur potentiel prolifératif. Au bout de 25 jours, les cellules ont été caractérisées pour l'expression membranaire de leur CD34, CD144 (VE-cadherine), CD105 (Endogline), CD133, CD31, CD73, CD61/51($\alpha_v\beta_3$), VEGF-R2 (KDR), CD146 (MCAM), CD54 (ICAM), CD106 (VCAM), CD45 et CD115 (*Macrophage colony-stimulating factor receptor*). Le profil d'expression ainsi obtenu a été comparé à celui obtenu 15 jours plus tard (à J40).

Sur les 8 prélèvements de sangs réalisés, 19 colonies d'ECFCs ont été obtenues en présence d'OPG contre seulement 10 en son absence (**Figure 1A, article 4**). Les colonies obtenues en présence d'OPG sont apparues entre le 10^{ème} et le 13^{ème} jour de culture, alors que celles obtenus en EGM2 seul apparaissent en moyenne 2 à 5 jours plus tard.

Les courbes de croissance représentées en **figures 1C (article 4)** et en **figure 19** montrent que les ECFCs-OPG présentent un potentiel prolifératif plus important que les ECFCs-CTRL. En effet, après une courte période de latence (1-2 jours) le nombre d'ECFCs traitées à l'OPG augmente exponentiellement pour atteindre une moyenne de 9.10^6 cellules à J30, après quoi la croissance se ralentit. Le temps de latence observé pour les ECFCs-CTRL est plus long, ces cellules présentent cependant un taux de prolifération non négligeable et continue de proliférer à la même vitesse même à 50 jours de culture. Ces résultats sont probablement la conséquence d'un effet de l'OPG sur le taux de division des cellules, les ECFCs-OPG se divisent plus rapidement au départ et atteignent leur nombre de divisions maximal avant les ECFCs-CTRL.

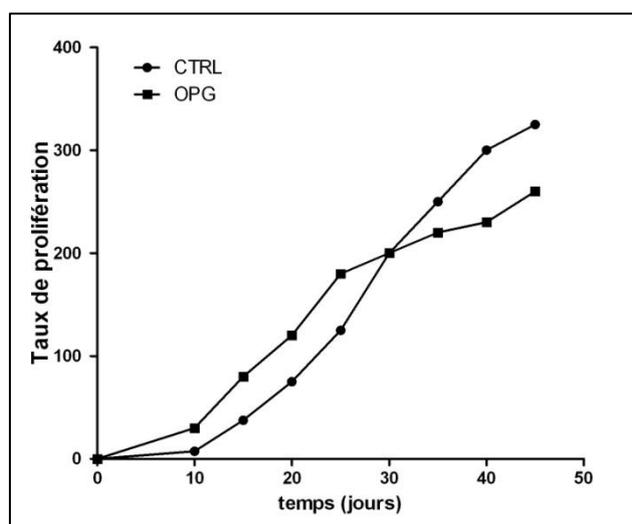


Figure-19: Taux de prolifération des ECFCs en présence et en l'absence de l'OPG. Les résultats sont représentés par le rapport entre le nombre d'ECFCs à JX et leur nombre de départ à J0.

Les ECFCs obtenues à partir des deux conditions de cultures sont fortement positives pour les marqueurs endothéliaux. Elles expriment toutes le CD34, CD31, CD146, KDR, CD105 et CD144, mais à des niveaux différents. Les marqueurs d'immaturation CD34 et CD133 et

l'endogline (CD105) sont plus exprimés en présence d'OPG les 25 premiers jours de culture. Le CD144 est par contre nettement moins exprimé par les ECFCs-OPG que par les cellules contrôles. Ces cellules n'expriment pas le CD115 et CD45 caractéristiques des cellules monocytaires, et le CD106, inductible par des cytokines inflammatoires. Il faut noter que les cellules souches CD34+ mobilisées dans la moelle suite à un stimulus ischémique expriment très peu de CD144, mais cette expression augmente significativement dès qu'elles s'incorporent dans le site ischémié suite à leur activation par les facteurs proangiogènes ce qui facilite leur migration dans le tissu.

Au bout de 40 jours, l'expression du CD34 diminue progressivement dans les deux groupes, mais reste encore légèrement élevée pour les ECFCs-OPG. L'expression du CD133 n'est plus détectable dans les deux groupes. Celle du CD146 et CD54 est à peu près identique dans les deux groupes à J25. Cependant, leur expression diminue fortement au 40^{ème} jour dans le groupe OPG. La diminution de l'expression de deux marqueurs est accompagnée d'une augmentation des niveaux d'expression du CD105, CD73, CD61/51 et du VEGF-R2 (**figure 2, article 4**).

Ces résultats indiquent donc que l'OPG maintient l'état immature des cellules CD34+ plus longtemps tout en accélérant leur division pendant les premiers jours de culture. Le ralentissement de cette division cellulaire, est ensuite accompagné d'une potentialisation de la différenciation endothéliale. Ceci est corrélé à une baisse d'expression de certaines molécules de surface qui jouent un rôle dans l'adhésion cellulaire (CD146, CD144 et CD54), et d'une augmentation de l'expression du VEGF-R2, dont les niveaux d'expression augmentent avec la maturation [335] ; du CD105, connu pour jouer un rôle dans la migration cellulaire [336] ; du CD73, impliqué dans la régulation de la perméabilité vasculaire [337] et du CD61/51; impliqué dans la différenciation cellulaire, la migration et la survie. En plus des différentes voies précédemment décrites (survie, migration et adhésion), l'OPG est donc en mesure d'influencer la « souchitude » des cellules CD34+.

3.2 Manuscrit:

**Autorisation de diffusion
non obtenue.**

Discussion générale,
conclusion & perspectives

Le travail réalisé au cours de cette thèse a été effectué dans le cadre d'un Groupement De Recherche (GDR) « Biothérapie et Polysaccharides Marins – BIOPOLYMAR qui regroupe le « Laboratoire des polysaccharides marins bioactifs et de Biotechnologie » de l'IFREMER (Dr S. Collic-Jouault), le Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives (Inserm U957 Prof D. Heymann) et l'unité Inserm U791 (Dr P. Weiss) de la faculté de médecine de Nantes ainsi que l'unité INSERM 765. Il avait pour but principal d'étudier l'effet d'une protéine régulatrice de l'homéostasie osseuse (OPG) sur l'angiogenèse induite par les progéniteurs endothéliaux circulants, afin de conclure son effet potentiel sur la vascularisation des tissus.

De plus en plus d'études soulignent l'existence d'un lien entre les deux systèmes osseux et vasculaire. L'association entre la formation de la matrice osseuse et les calcifications vasculaires n'est plus à démontrer. Une faible densité minérale osseuse est en effet, souvent associée à une augmentation du risque d'apparition de pathologies cardiovasculaires. Chez des sujets âgés, un remodelage osseux élevé est généralement corrélé à un risque de mortalité cardiovasculaire accru [313]. Ces données et pleins d'autres suggèrent l'existence de mécanismes sous-jacents qui modulent à la fois le remodelage osseux et la biologie vasculaire.

La triade moléculaire RANK, RANKL et OPG se trouve à l'interface os-vasseaux. Les souris invalidées pour le gène de l'OPG développent en plus d'une ostéoporose sévère, des calcifications vasculaires. Par ailleurs, de nombreuses études ont rapporté un lien entre cette cytokine et de nombreuses pathologies vasculaires. L'OPG est exprimée par les cellules endothéliales de micro et macro-vaisseaux ainsi que par les cellules musculaires lisses des artères et des veines [44] [106] [47]. Plusieurs facteurs de croissance et cytokines incluant le $TNF\alpha$, l'IL-1 β , l'IL-1 α , le FGF-2, le PDGF et l'angiotensine II sont capables d'augmenter son expression [47].

Au terme de ces travaux, nous avons montré que l'OPG joue un rôle fondamental dans la vascularisation : 1- en agissant en amont sur le recrutement et la différenciation des cellules souches CD34+ en progéniteurs endothéliaux (Article 4) ; 2- en favorisant la formation des néovaisseaux dans les tissus sains (Articles 1 & 2) ; 3- et pathologiques (Article 3); tout en participant à la dissémination des métastases.

La sous population de cellules progénitrices endothéliales, les ECFCs initialement décrites par Asahara comme étant des cellules dérivées de la moelle osseuse, isolées de la fraction de cellules mononuclées du sang périphérique, expriment des marqueurs d'immaturité (CD34, CD13) et peuvent se différencier en cellules endothéliales matures. Ces cellules sont mobilisées à partir de la moelle osseuse suite à la production de cytokines inflammatoires par le tissu ischémié. Elles passent dans la circulation générale pour migrer et s'incorporer dans les sites de revascularisation active, en situations physiologiques et/ou pathologiques incluant le développement de tumeurs, l'ischémie tissulaire consécutive à une thrombose et la revascularisation de la matrice osseuse.

Après avoir confirmé l'expression de l'OPG par les ECFCs, nous avons montré que sa production par les ECFCs est modulée par le VEGF et à un moindre degré par le SDF-1. Plusieurs cytokines peuvent induire l'expression de l'OPG par les cellules endothéliales mais jusqu'à présent, ni le SDF-1, ni le VEGF n'avaient été décrits pour avoir un tel effet. L'OPG n'est pas la seule molécule ostéogénique à être exprimée par les ECFCs. D'autres protéines telles que l'ostéopontine et la phosphatase alcaline osseuse sont libérées par ces cellules [338]. La présence des marqueurs ostéogéniques a été confirmé par Matsumoto *et al*, sur les cellules CD34+/CD133+ du sang périphérique humain qui expriment en particulier les ARNm codant pour l'ostéopontine. Les progéniteurs endothéliaux du sang périphérique sont du reste, recrutés sur les sites de fractures où ils développent un environnement favorable à la guérison en augmentant la vasculogenèse et l'ostéogenèse, conduisant ainsi à une récupération fonctionnelle plus rapide [339]. Les travaux de Lui *et al* ont par ailleurs montré que les cellules CD34+ et CD133+ sont capables de se différencier en ostéoblastes *in vitro* [340].

L'OPG peut favoriser l'expansion des CSH [4]. Nous avons montré que les propriétés fonctionnelles des cellules CD34+ sont modifiées par un traitement à l'OPG. La culture de ces cellules en présence d'OPG induit dans un premier temps, une augmentation de leur prolifération avec une modification de l'expression des marqueurs d'immatunité CD34 et CD133. A cette 1^{ère} phase succède une deuxième phase où nous avons observé un ralentissement de la prolifération des ECFCs, accompagné d'une surexpression de certains marqueurs endothéliaux incluant le CD105, le CD73 et l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Ceci est corrélé à une diminution de l'expression du CD146 et du CD54. Le CD73 est impliqué dans la régulation de la prolifération cellulaire, de la perméabilité vasculaire et de l'adaptation à l'hypoxie [337]. Le CD105 intervient dans la prolifération, la morphogenèse, la migration et l'adhésion cellulaire à l'endothélium [341]. Le CD146 et CD54 sont des molécules d'adhésion intervenant dans la cohésion cellulaire et/ou dans l'adhésion des cellules à MEC [342]. Du fait de l'importance physiologique de ces différents facteurs, la régulation de leur expression par l'OPG reflète non seulement un effet sur le potentiel prolifératif de ces cellules, mais aussi sur leurs propriétés fonctionnelles. Le traitement des cellules CD34+ à l'OPG induit probablement un changement de leur phénotype en raison de l'activation de différentes, mais interdépendantes, voies moléculaires ciblant la prolifération, la clonogénicité et diverses propriétés fonctionnelles. Cependant, il est frappant de constater que la régulation positive des marqueurs d'immatunité (CD34) associée à une expression de marqueurs de différenciation tels que le CD105, CD73 et CD146. L'OPG agirait à l'échelle du génome générant ainsi des conséquences globales induisant une (re) programmation cellulaire et touchant la détermination du destin cellulaire.

In vivo, au cours d'une vasculogenèse post-natale, les ECFCs se trouvent exposées à l'OPG sécrétée par les cellules activées, tout au long des différentes étapes de leur recrutement sur les sites de réparation vasculaire : dans la moelle osseuse avant leur mobilisation, dans la circulation générale après mobilisation et au cours de leur incorporation dans le site ischémié

durant l'extravasation de l'endothélium, leur invasion et différenciation. Il était donc logique d'évaluer l'implication de l'OPG dans les étapes clés de ce processus. Au cours de ces travaux nous avons ainsi démontré *in vitro* que cette cytokine :

- (1) Est en mesure de jouer le rôle d'une chimiokine puisqu'elle attire fortement les ECFCs à des niveaux comparables à ceux obtenus avec le SDF-1. Ces résultats suggèrent son éventuelle implication dans l'étape de mobilisation *in vivo* ;
- (2) Est capable d'agir directement sur les ECFCs et d'induire leur migration spontanée. Ceci est la conséquence d'une réorganisation du cytosquelette d'actine, imposée par l'OPG qui favorise l'émergence de protusions cellulaires caractéristiques du phénotype migratoire. Cet effet a été également décrit sur les cellules endothéliales microvasculaires, qui présentent un réseau de fibres d'actine plus étendu, avec une fine matrice de microtubules allongés, et qui s'étend jusqu'à la périphérie de la cellule quand elles sont cultivées en présence d'OPG [343]. En agissant sur le cytosquelette d'actine qui confère aux cellules les forces de contraction et de propulsion qui induit leur migration, l'OPG est donc en mesure d'intervenir également sur les deux étapes du homing et d'extravasation ;
- (3) favorise l'adhésion des ECFCs à l'endothélium activé et induit leur adhésion intermédiaire aux composants de la matrice extracellulaire. Cependant, l'OPG empêche leur adhésion focale. Elle exercerait donc un effet anti-adhésion sur les ECFCs lorsqu'elles sont dans la moelle osseuse afin de favoriser leur mobilisation. Une fois sur les sites de revascularisation, celle-ci induirait leur adhésion à l'endothélium et favoriserait leur adhésion intermédiaire à la membrane basale, une des étapes importante à l'extravasation;
- (4) Agit également en stimulant la tubulogénèse en favorisant la formation de pseudotubes sur Matrigel. L'OPG favoriserait donc la différenciation morphologique des ECFCs pour s'incorporer aux structures tubulaires en formation ;
- (5) Enfin, et contrairement à toutes les études rapportant l'effet de l'OPG sur les cellules endothéliales matures sur lesquelles elle exercerait un effet pro-prolifératif, OPG n'affecte aucunement la prolifération des ECFCs en culture. Cependant, un traitement de ces cellules à long terme avec l'OPG (depuis leur isolement) leur confère un taux prolifératif plus important.

Ces résultats ont été confirmés *in vivo* dans le modèle vascularisation d'implants sous-cutanés de substitut de membrane basale (*Matrigel plug*). Ce modèle permet d'étudier l'effet anti- ou proangiogénique de cytokines en évaluant leurs effets sur la vascularisation d'une matrice extracellulaire riche en collagène IV, laminine, nidogène/entacin, et en HSPGs. Dans ce système, les cellules endothéliales, progénitrices ou matures et les cellules musculaires lisses de l'hôte migrent en réponse aux cytokines présentes dans le matrigel et colonisent les implants pour

former un réseau vasculaire. Ce modèle nous a donc permis de confirmer *in vivo*, l'effet proangiogène de l'OPG et de mettre en évidence son effet potentialisateur sur les propriétés angiogènes du FGF-2 sur la formation des vaisseaux.

Le FGF-2 est un des activateurs du processus angiogénique exprimé par les cellules du périoste et les ostéoblastes. Il a été également décrit pour intervenir dans le développement et le remodelage osseux en stimulant la prolifération et la survie des ostéoblastes. Plusieurs études ont montré son potentiel thérapeutique : il induit une augmentation du volume osseux dans un modèle de défauts osseux segmentaires chez le lapin, une accélération de la guérison des fractures et une amélioration de la masse osseuse des implants [344]. Le FGF-2 peut donc potentiellement compenser le rôle de l'OPG dans le développement du squelette. Notre étude suggère que l'OPG à son tour, est en mesure de compenser le rôle du FGF-2 dans le processus de vascularisation. Cette étude n'est pas la première à décrire un éventuel rôle compensateur de ses deux cytokines. En effet, l'équipe de Kyrtsolis a suggéré un effet synergique des deux cytokines dans le développement et la progression du myélome multiples [345]. De plus, il ne faut pas oublier que le FGF-2 a été décrit comme un inducteur de l'expression du gène codant pour l'OPG.

En ce qui concerne les effets possibles de l'OPG sur la survie cellulaire, nous démontrons ici que cette cytokine diminue l'activité des caspases 3 et 7, un effet accompagné de la préservation de la viabilité. Plusieurs études ont démontré que l'OPG est en mesure de préserver les cellules endothéliales matures de l'apoptose [13, 166, 169]. Le mécanisme précis pour cela reste cependant, à déterminer, mais il est peu probable que cela fasse intervenir la protection contre l'apoptose induite par TRAIL. Même si une étude a suggéré l'implication de l'inhibition de TRAIL [169], d'autres ont rapporté que TRAIL est absent dans les cultures de cellules endothéliales, suggérant que des mécanismes alternatifs peuvent exister [13, 108]. En outre, les cellules endothéliales semblent être résistantes à l'apoptose induite par TRAIL, ce qui coïncide avec la notion que les cellules non malignes sont insensibles à ce facteur [13]. Nos résultats suggèrent donc que la protection de l'apoptose induite par l'OPG est liée à une carence en facteurs de croissance, puisque cet effet est exercé surtout lorsque les ECFCs sont cultivées dans un milieu pauvre en sérum. L'analyse protéomique a par ailleurs révélé la régulation d'un certain nombre de protéines dont l'endophiline-B1 et l'Hypoxia up-regulated protéine-1, impliquées dans le processus d'autophagie qui joue un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie et de la survie cellulaire en recyclant les nutriments dans des conditions de carence en facteurs de croissance [322] [321].

L'effet anti-apoptotique de l'OPG ferait également intervenir l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. La croissance et la survie de nombreux types cellulaires nécessitent l'adhésion des cellules à la MEC. Une perturbation de cette interaction arrête les cellules à la phase G1 et induit l'apoptose [346, 347]. D'ailleurs, un nouveau terme, « anoïkis » a été inventé pour désigner l'apoptose induite par la perte d'ancrage à la MEC [348]. Il est clair que pendant le processus d'angiogenèse, l'intégrine

$\alpha_v\beta_3$ joue un rôle fondamental dans le maintien de la viabilité. La signalisation induite par cette intégrine nécessite sa liaison avec les protéines de la matrice telles que la vitronectine, la fibronectine, l'ostéopontine et la ténascine [349]. Certaines données suggèrent que son activation dans les cellules endothéliales supprime l'activité de la voie pro-apoptotique p53 [350]. Par ailleurs, l'équipe de Scatena a identifié une nouvelle voie de survie $\alpha_v\beta_3$ -dépendante. Cette intégrine active spécifiquement la voie NF- κ B, et l'inhibition de la translocation nucléaire de cette dernière abolit complètement l'effet protecteur de $\alpha_v\beta_3$. Ainsi, l'activation de la voie NF- κ B semble nécessaire pour l'effet protecteur de cette intégrine sur les cellules endothéliales de l'apoptose induite par une privation de sérum [88].

Dans la présente étude nous décrivons une régulation positive de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ en présence d'OPG. L'analyse protéomique montre une régulation de la Pdia3, une protéine responsable de l'activation de cette intégrine, un processus qui a été rapporté pour potentialiser la migration, l'adhésion et la survie cellulaire. Par conséquent, il est possible que l'activation des récepteurs à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ compense des mécanismes de signalisation initiés par OPG et que cela conduise à l'activation du processus angiogénique et à la préservation de la survie cellulaire. Les effets de l'activation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ sur le comportement cellulaire sont médiés par la signalisation ERK1/2 [351, 352], une voie qui est également activée par OPG. Cela suggère que la voie ERK1/2 peut au moins, en partie, contribuer au processus angiogénique co-activé par l'OPG et $\alpha_v\beta_3$.

Lors de ce travail, nous avons confirmé l'importance HSPGs/SDC-1 dans l'activité proangiogénique de l'OPG. L'OPG se lie avec une grande affinité à l'héparine sur les ostéoclastes [353]. Elle se lie aussi aux HSPGs de surface cellulaire, ce qui suggère que les effets de l'OPG ne se limitent pas seulement à son interaction avec RANKL ou le TRAIL solubles. Elle peut donc agir directement sur les cellules pour réguler leur fonction. Plusieurs équipes ont suggéré la présence d'autres partenaires capables de lier l'OPG hormis TRAIL et RANKL. L'OPG favorise l'adhérence des leucocytes aux cellules endothéliales, ce mécanisme est médié par des interactions entre le domaine de liaison à l'héparine de l'OPG avec la surface des cellules endothéliales [108]. Toutefois, le ligand d'OPG dans cette interaction reste à identifier, le SDC-1 a été tout de suite proposé puisqu'il est impliqué dans l'interaction de l'OPG avec les monocytes et certaines cellules tumorales [354].

En plus de la voie ERK, l'OPG induit l'activation deux autres voies tout aussi impliquées dans le processus angiogénique ; les voies Akt et mTOR. Les intégrines et les facteurs de croissance coactivent synergiquement la voie Akt. L'activation de cette voie par une signalisation *outside-in* provenant des intégrines, favorise l'adhésion des cellules endothéliales à la matrice et la survie cellulaire. La voie Akt contrôle également la réorganisation du cytosquelette d'actine et la migration des cellules endothéliales [285]. De plus, l'effet anti-apoptotique de la protéine mTOR repose sur l'activation de la voie Akt qui intervient par l'inactivation des facteurs de transcription

tels que FOXO3a, conduisant à la croissance cellulaire et à une protection des cellules endothéliales du stress oxydant [287]. Par ailleurs, l'équipe de Beauvais rapporte que la liaison de l'ectodomaine du SDC-1 à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est nécessaire à une conformation active de cette dernière. Le SDC-1 et $\alpha_v\beta_3$ formeraient un complexe probablement via des interactions latérales de leurs domaines extracellulaires, conduisant au *clustering* des intégrines. Ce regroupement est en mesure d'activer des kinases associées soit à l'intégrine ou au SDC-1 [283]. Il est donc probable que l'OPG via sa liaison au SDC-1 induit l'activation de ce dernier qui, en s'associant à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ induit une signalisation via Akt qui à son tour active la voie mTOR. Enfin, l'angiogenèse initiée par le FGF-2 semble être médiée par $\alpha_v\beta_3$ [355]. FGF-2 a été décrit pour induire l'expression du SDC-1 durant le processus angiogénique [283], ceci pourrait constituer une piste pour expliquer son effet synergique avec l'OPG.

Comme décrit précédemment, l'OPG dans les cellules endothéliales est localisée au sein de granules de sécrétion spécifiques connue sous le nom de Weibel-Palade qui contiennent également le VWF. Dans les corps de Weibel-Palade, l'OPG est physiquement associée au VWF. La stimulation des cellules endothéliales *in vitro*, induit la libération de ce complexe dans le milieu de culture. La présence du complexe OPG/VWF a été également mise en évidence dans le sérum [106], ce qui indique que cette association peut avoir une pertinence physiologique. Les travaux menés par Baud'huin *et al* ont montré que le domaine de l'OPG liant le domaine A1 du VWF est localisé sur son site de liaison à RANKL, et recouvre partiellement ce dernier. Cette interaction annule l'activité inhibitrice de l'OPG sur l'apoptose induite par TRAIL mais son interaction avec RANKL semble in affectée [356].

L'effet de l'OPG sur les ECFCs ne se limite pas à son interaction avec le SDC-1 puisqu'une OPG dépourvue de son domaine de liaison à l'héparine présente une activité proangiogène *in vitro in vivo*. L'hypothèse d'une éventuelle implication de RANKL dans ces effets proangiogènes, a été tout de suite écartée puisque on n'a pas pu le mettre en évidence dans nos cellules. Or, des résultats préliminaires que nous avons réalisés montrent que la liaison du VWF à l'OPG neutralise totalement les effets de cette dernière sur la migration des ECFCs (**Annexe 2**) et leur tubulogénèse (**Annexe 3**). Ceci souligne l'importance du domaine de l'OPG liant le VWF dans ses activités proangiogènes. Existerait-il un autre récepteur potentiel de l'OPG sur les ECFCs ? Est-il possible qu'elle puisse intervenir via son interaction avec le VWF ? Ou interviendrait-elle via une forme membranaire de RANKL qui existerait chez les ECFCs mais que nous n'avons pas pu mettre en évidence par les techniques utilisées ?

Les effets proangiogènes de l'OPG ont été corrélés à une surexpression du SDF-1. L'OPG n'est pas la première cytokine pour laquelle un tel effet est décrit. Ombretta *et al* ont montré que le VEGF et le FGF-2 induisent une augmentation de l'expression du SDF-1 par les cellules endothéliales, et que l'utilisation d'anticorps dirigés contre le SDF-1 inhibe totalement la néovascularisation induite par ces deux facteurs *in vivo* [250]. En plus de retrouver là un nouveau

point commun entre les effets de l'OPG et du FGF-2, ces résultats indiquent que la voie SDF-1/CXCR4 représente un système de signalisation autocrine, un régulateur essentiel de la morphogenèse des cellules endothéliales et de l'angiogenèse.

L'axe SDF-1/CXCR4 joue un rôle important au cours du développement en déclenchant la transduction de signaux multiples conduisant à l'activation de diverses fonctions biologiques comme le chimiotactisme cellulaire, la prolifération, l'apoptose, la survie et la différenciation [357]. L'une des fonctions principales de cette voie est la régulation de l'angiogenèse et de la vasculogenèse. En plus de son rôle dans le maintien des cellules progénitrices dans la niche osseuse et leur mobilisation dans la circulation générale [357], des travaux menés au sein de notre laboratoire ont montré qu'un préconditionnement des ECFCs par le SDF-1 améliore leurs capacités proangiogènes [257]. Ces effets qui sont, en partie, tributaires des HSPGs présents à la surface des cellules sont similaires à ceux que nous avons observés avec l'OPG. L'action proangiogène de l'OPG diminue fortement après l'inhibition de la voie SDF-1/CXCR4. Le SDF-1 libéré par ECFCs sous l'effet de l'OPG serait donc capable d'initier un programme d'activation au sein de ces cellules. De plus, ce SDF-1 est en mesure d'agir sur d'autres types cellulaires, tel est le cas des cellules endothéliales matures de type HUVECs qui, en sa présence, ont montré des taux de prolifération et de cicatrisation beaucoup plus élevés. Ainsi, en plus d'agir sur les propriétés fonctionnelles des ECFCs, l'OPG potentialise également leur effet paracrine. Les ECFCs interviennent dans la revascularisation via leur intégration fonctionnelle aux vaisseaux, mais aussi et surtout via leurs effets paracrines du fait de leur potentiel sécrétoire élevé. Elles agissent sur les cellules endothéliales présentes *in situ* sur les sites de vascularisation pour induire leur activation et participation à la réendothélialisation des vaisseaux lésés.

L'implication de l'OPG dans le développement tumoral a été suggérée il ya de cela quelques années. Cette implication a été cependant, résumée à son interaction avec TRAIL et/ou RANKL. Dans ce travail, nous avons mis en évidence son action sur la croissance et la progression tumorale. En plus de sa capacité à induire la migration des cellules tumorales, l'OPG est en mesure de participer au recrutement des cellules progénitrices endothéliales et au développement d'un réseau vasculaire qui améliore ainsi la croissance de la tumeur primaire et la dissémination des métastases.

L'induction de la sécrétion du SDF-1 est également une nouvelle façon via laquelle l'OPG interviendrait dans le développement des tumeurs. En effet, la voie SDF-1/CXCR4 est impliquée dans la croissance de tumeurs primaires et la formation de métastases. La croissance tumorale est contrôlée non seulement par l'effet du SDF-1 sur la migration directionnelle des cellules cancéreuses, mais aussi via son effet sur la prolifération, l'adhésion et la survie de ces dernières [358].

En conclusion, cette études apporte les preuves nécessaires pour inscrire l'OPG à la liste croissante de cytokines proangiogènes, et décrit plusieurs éléments contribuant à la compréhension de son implication dans le processus angiogénique. L'OPG agit sur la différenciation des cellules progénitrices en ECFCs, sur la prolifération, l'adhésion, la migration, et la survie de ces ECFCs en se liant au SDC-1, en sur-exprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, activant les voies ERK/Akt/mTOR et en faisant intervenir l'axe SDF-1/CXCR4.

Cependant, de nombreuses questions méritent d'être approfondies afin d'établir concrètement son mécanisme d'action :

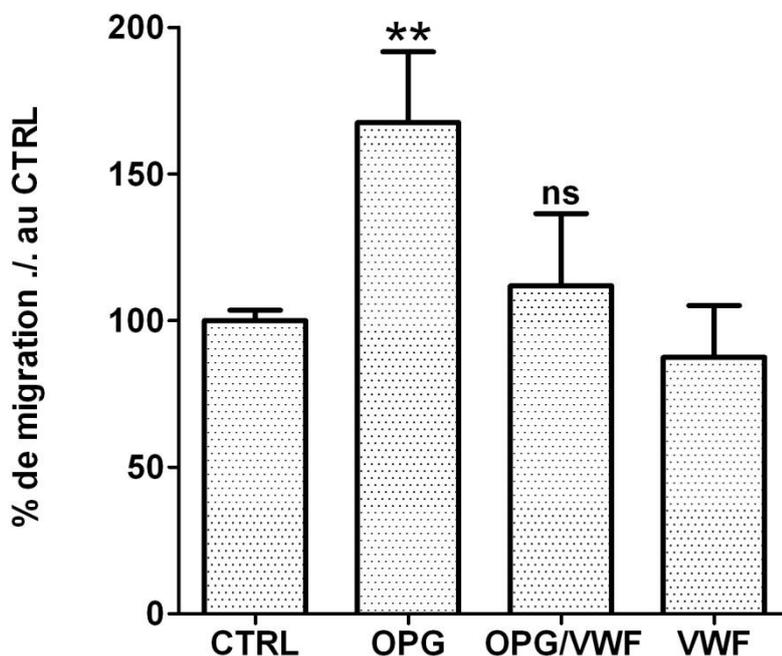
- ⇒ Confirmer l'implication du SDC-1 en testant l'OPG sur des cellules sur lesquelles l'expression du gène codant pour SDC-1 aurait été éteinte (siARN) ;
- ⇒ Outre le SDC-1, OPG semble intervenir via un autre récepteur qui reste à déterminer, pour cela il serait intéressant de rechercher l'expression de RANKL par les ECFCs via d'autres techniques telles que la cytométrie de flux ou l'analyse protéomique.
- ⇒ Au niveau protéomique, il serait intéressant d'étendre l'analyse sur une gamme de pH plus large, autre que la gamme 4-7, pour mettre en évidence l'effet de l'OPG sur les facteurs à pHi basique tel est le cas du RANKL par exemple qui possède un pHi de 7.76.
- ⇒ Comprendre la pertinence physiologique de la liaison de l'OPG avec le VWF, pourrait nous aider à lever le mystère sur son récepteur putatif,
- ⇒ Il serait également intéressant de creuser le lien entre les propriétés observées et la surexpression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. D'autant plus que cette intégrine a été décrite pour interagir avec le SDC-1 pour activer les mêmes voies de signalisation que OPG (Akt et mTOR).
- ⇒ En fin, l'interaction OPG et FGF-2 mérite d'être étudié de plus près, afin de mettre en évidence les mécanismes impliqués dans leur effet synergique. Ceci serait d'autant plus important pour leur intervention dans la réparation osseuse. Comprendre l'implication de ces deux facteurs dans la formation et la vascularisation de l'os, pourrait constituer une façon d'améliorer l'orientation nouvelle de la médecine régénérative qui consiste à l'utilisation de progéniteurs endothéliaux circulants afin de favoriser la néoangiogenèse simultanée à la cicatrisation osseuse pour assurer un approvisionnement adéquat en sang vers les sites des fractures et accélérer la guérison osseuse.

Annexes

ANNEXE1

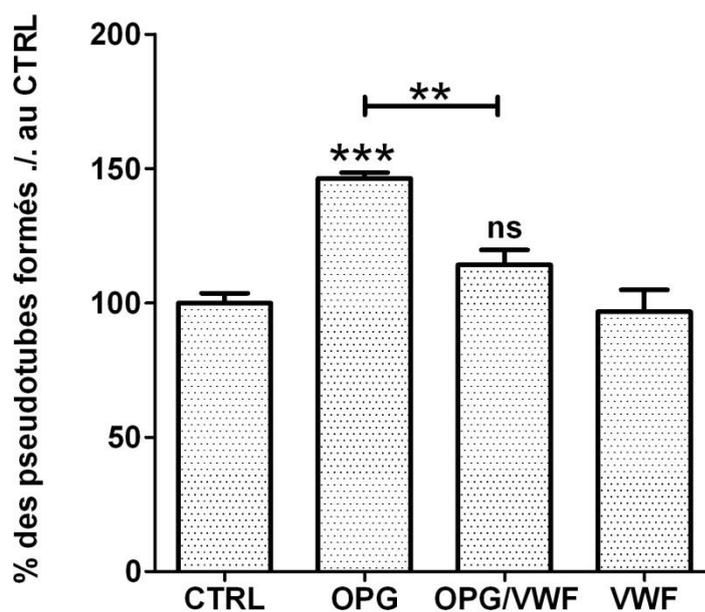
Article5: A motif within the N-terminal domain of TSP-1 specifically promotes the proangiogenic activity of endothelial colony-forming cells. *Biochem Pharmacol.* 2012 Oct 15;84(8):1014-23.

Autorisation de diffusion
non obtenue.

ANNEXE 2

Annexe 2 : l'association de l'OPG au VWF inhibe les effets de l'OPG sur la migration des ECFCs *in vitro*. Les cellules sont traitées ou non à l'OPG seul, au VWF seul ou associé à l'OPG pendant 24 heures avant d'êtreensemencées dans des inserts de Boyden et de les laisser migrer vers un milieu de base (** $p < 0,01$) ns : non spécifique.

ANNEXE 3



Annexe 3 : l'association de l'OPG au VWF inhibe les effets de l'OPG sur la tubulogénèse des ECFCs *in vitro*. Les ECFCs sont traitées ou non à l'OPG seul, au VWF seul ou associé à l'OPG pendant 24 heures puisensemencées sur Matrigel pendant 18 heures. Les résultats présentent la longueur des pseudo-tubes formés et sont normalisés par rapport aux ECFCs non traitées et exprimés en moyenne \pm SEM de trois expériences indépendantes (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). ns : non spécifique.

Références bibliographiques

1. Boyle, W.J., W.S. Simonet, and D.L. Lacey, *Osteoclast differentiation and activation*. *Nature*, 2003. **423**(6937): p. 337-42.
2. Yun, T.J., et al., *Osteoprotegerin, a crucial regulator of bone metabolism, also regulates B cell development and function*. *J Immunol*, 2001. **166**(3): p. 1482-91.
3. Mosheimer, B.A., *Syndecan-1 Is Involved in Osteoprotegerin-Induced Chemotaxis in Human Peripheral Blood Monocytes*. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2005. **90**(5): p. 2964-2971.
4. Moldenhauer, A., et al., *Interleukin 32 promotes hematopoietic progenitor expansion and attenuates bone marrow cytotoxicity*. *European Journal of immunology*, 2011.
5. Zauli, G., et al., *Role of full-length osteoprotegerin in tumor cell biology*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2008. **66**(5): p. 841-851.
6. Vik, A., et al., *Serum osteoprotegerin is a predictor for incident cardiovascular disease and mortality in a general population: the Tromso Study*. *J Thromb Haemost*, 2011. **9**(4): p. 638-44.
7. Mogelvang, R., et al., *Comparison of osteoprotegerin to traditional atherosclerotic risk factors and high-sensitivity C-reactive protein for diagnosis of atherosclerosis*. *Am J Cardiol*, 2012. **109**(4): p. 515-20.
8. Pedersen, E.R., et al., *Serum osteoprotegerin levels and long-term prognosis in patients with stable angina pectoris*. *Atherosclerosis*, 2010. **212**(2): p. 644-9.
9. Ueland, T., et al., *Prognostic value of osteoprotegerin in heart failure after acute myocardial infarction*. *J Am Coll Cardiol*, 2004. **44**(10): p. 1970-6.
10. Omland, T., et al., *Circulating osteoprotegerin levels and long-term prognosis in patients with acute coronary syndromes*. *J Am Coll Cardiol*, 2008. **51**(6): p. 627-33.
11. Jono, S., et al., *Serum osteoprotegerin levels are associated with the presence and severity of coronary artery disease*. *Circulation*, 2002. **106**(10): p. 1192-4.
12. Ziegler, S., et al., *Osteoprotegerin plasma concentrations correlate with severity of peripheral artery disease*. *Atherosclerosis*, 2005. **182**(1): p. 175-80.
13. Cross, S.S., et al., *Osteoprotegerin (OPG)—a potential new role in the regulation of endothelial cell phenotype and tumour angiogenesis?* *International Journal of Cancer*, 2006. **118**(8): p. 1901-1908.
14. Shahbazi, S., et al., *Characterization of the interaction between von Willebrand factor and osteoprotegerin*. *J Thromb Haemost*, 2007. **5**(9): p. 1956-62.
15. Almasan, A. and A. Ashkenazi, *Apo2L/TRAIL: apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2003. **14**(3-4): p. 337-48.
16. Cenni, E., F. Perut, and N. Baldini, *In vitro models for the evaluation of angiogenic potential in bone engineering*. *Acta Pharmacol Sin*, 2011. **32**(1): p. 21-30.
17. Asahara, T., et al., *Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis*. *Science*, 1997. **275**(5302): p. 964-7.
18. Yoder, M.C., et al., *Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals*. *Blood*, 2007. **109**(5): p. 1801-9.
19. Critser, P.J. and M.C. Yoder, *Endothelial colony-forming cell role in neoangiogenesis and tissue repair*. *Curr Opin Organ Transplant*, 2010. **15**(1): p. 68-72.
20. Simonet, W.S., et al., *Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density*. *Cell*, 1997. **89**(2): p. 309-19.
21. Tan, K.B., et al., *Characterization of a novel TNF-like ligand and recently described TNF ligand and TNF receptor superfamily genes and their constitutive and inducible expression in hematopoietic and non-hematopoietic cells*. *Gene*, 1997. **204**(1-2): p. 35-46.
22. Tsuda, E., et al., *Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. **234**(1): p. 137-42.
23. Kwon, B.S., et al., *TR1, a new member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, induces fibroblast proliferation and inhibits osteoclastogenesis and bone resorption*. *FASEB J*, 1998. **12**(10): p. 845-54.
24. Yun, T.J., et al., *OPG/FDCR-1, a TNF receptor family member, is expressed in lymphoid cells and is up-regulated by ligating CD40*. *J Immunol*, 1998. **161**(11): p. 6113-21.
25. Yamaguchi, K., et al., *Characterization of structural domains of human osteoclastogenesis inhibitory factor*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(9): p. 5117-23.
26. Collin-Osdoby, P., *Regulation of Vascular Calcification by Osteoclast Regulatory Factors RANKL and Osteoprotegerin*. *Circulation Research*, 2004. **95**(11): p. 1046-1057.
27. Yasuda, H., et al., *Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(7): p. 3597-602.

28. Hofbauer, L.C., et al., *The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption*. J Bone Miner Res, 2000. **15**(1): p. 2-12.
29. Chagraoui, H., et al., *Expression of osteoprotegerin mRNA and protein in murine megakaryocytes*. Experimental Hematology, 2003. **31**(11): p. 1081-1088.
30. Ziolkowska, M., et al., *High levels of osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor kappa B ligand in serum of rheumatoid arthritis patients and their normalization after anti-tumor necrosis factor alpha treatment*. Arthritis Rheum, 2002. **46**(7): p. 1744-53.
31. Lacey, D.L., et al., *Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation*. Cell, 1998. **93**(2): p. 165-76.
32. Hofbauer, L.C., *Clinical Implications of the Osteoprotegerin/RANKL/RANK System for Bone and Vascular Diseases*. JAMA: The Journal of the American Medical Association, 2004. **292**(4): p. 490-495.
33. Wiley, S.R., et al., *Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis*. Immunity, 1995. **3**(6): p. 673-82.
34. Hsu, H., et al., *Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(7): p. 3540-5.
35. LeBlanc, H.N. and A. Ashkenazi, *Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors*. Cell Death Differ, 2003. **10**(1): p. 66-75.
36. Yano, K., et al., *Immunological characterization of circulating osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor: increased serum concentrations in postmenopausal women with osteoporosis*. J Bone Miner Res, 1999. **14**(4): p. 518-27.
37. Seidel, C., et al., *Serum osteoprotegerin levels are reduced in patients with multiple myeloma with lytic bone disease*. Blood, 2001. **98**(7): p. 2269-71.
38. Chen, D., et al., *ELISA methodology for detection of modified osteoprotegerin in clinical studies*. Clin Chem, 2001. **47**(4): p. 747-9.
39. Chan, B.Y., et al., *Effect of anticoagulants and storage temperature on the stability of receptor activator for nuclear factor-kappa B ligand and osteoprotegerin in plasma and serum*. Clin Chem, 2003. **49**(12): p. 2083-5.
40. Moran, C.S., et al., *Association of osteoprotegerin with human abdominal aortic aneurysm progression*. Circulation, 2005. **111**(23): p. 3119-25.
41. Naylor, K.E., et al., *Serum osteoprotegerin as a determinant of bone metabolism in a longitudinal study of human pregnancy and lactation*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(11): p. 5361-5.
42. Bostanci, N., et al., *Gingival crevicular fluid levels of RANKL and OPG in periodontal diseases: implications of their relative ratio*. J Clin Periodontol, 2007. **34**(5): p. 370-6.
43. Morinaga, T., et al., *Cloning and characterization of the gene encoding human osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor*. Eur J Biochem, 1998. **254**(3): p. 685-91.
44. Collin-Osdoby, P., et al., *Receptor activator of NF-kappa B and osteoprotegerin expression by human microvascular endothelial cells, regulation by inflammatory cytokines, and role in human osteoclastogenesis*. J Biol Chem, 2001. **276**(23): p. 20659-72.
45. Hofbauer, L.C., et al., *Osteoprotegerin production by human osteoblast lineage cells is stimulated by vitamin D, bone morphogenetic protein-2, and cytokines*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **250**(3): p. 776-81.
46. Nakashima, T., et al., *Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **275**(3): p. 768-75.
47. Zhang, J., et al., *PDGF induces osteoprotegerin expression in vascular smooth muscle cells by multiple signal pathways*. FEBS Lett, 2002. **521**(1-3): p. 180-4.
48. Palmqvist, P., et al., *IL-6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of receptor activator of NF-kappa B ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF-kappa B in mouse calvariae*. J Immunol, 2002. **169**(6): p. 3353-62.
49. Ahlen, J., et al., *Characterization of the bone-resorptive effect of interleukin-11 in cultured mouse calvarial bones*. Bone, 2002. **31**(1): p. 242-51.
50. Horwood, N.J., et al., *Osteotropic agents regulate the expression of osteoclast differentiation factor and osteoprotegerin in osteoblastic stromal cells*. Endocrinology, 1998. **139**(11): p. 4743-6.
51. Makiishi-Shimobayashi, C., et al., *Interleukin-18 up-regulates osteoprotegerin expression in stromal/osteoblastic cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **281**(2): p. 361-6.
52. Schoppet, M., et al., *Osteoprotegerin expression in dendritic cells increases with maturation and is NF-kappaB-dependent*. J Cell Biochem, 2007. **100**(6): p. 1430-9.

53. Secchiero, P., et al., *Role of the RANKL/RANK system in the induction of interleukin-8 (IL-8) in B chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells.* J Cell Physiol, 2006. **207**(1): p. 158-64.
54. Nguyen, K.Q., et al., *Bone morphogenetic proteins regulate osteoprotegerin and its ligands in human vascular smooth muscle cells.* Endocrine, 2007. **32**(1): p. 52-8.
55. Tazoe, M., et al., *Involvement of p38MAP kinase in bone morphogenetic protein-4-induced osteoprotegerin in mouse bone-marrow-derived stromal cells.* Arch Oral Biol, 2003. **48**(8): p. 615-9.
56. Takai, H., et al., *Transforming growth factor-beta stimulates the production of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stromal cells.* J Biol Chem, 1998. **273**(42): p. 27091-6.
57. Thirunavukkarasu, K., et al., *Stimulation of osteoprotegerin (OPG) gene expression by transforming growth factor-beta (TGF-beta). Mapping of the OPG promoter region that mediates TGF-beta effects.* J Biol Chem, 2001. **276**(39): p. 36241-50.
58. Nakagawa, N., et al., *Basic fibroblast growth factor induces osteoclast formation by reciprocally regulating the production of osteoclast differentiation factor and osteoclastogenesis inhibitory factor in mouse osteoblastic cells.* Biochem Biophys Res Commun, 1999. **265**(1): p. 158-63.
59. Rubin, J., et al., *IGF-I regulates osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand in vitro and OPG in vivo.* J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(9): p. 4273-9.
60. Shinohara, M. and H. Takayanagi, *Novel osteoclast signaling mechanisms.* Curr Osteoporos Rep, 2007. **5**(2): p. 67-72.
61. Ikeda, T., et al., *Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and their differential expression in bone and thymus.* Endocrinology, 2001. **142**(4): p. 1419-26.
62. O'Brien, C.A., *Control of RANKL gene expression.* Bone, 2010. **46**(4): p. 911-9.
63. Kong, Y.Y., et al., *OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis.* Nature, 1999. **397**(6717): p. 315-23.
64. O'Brien, E.A., J.H. Williams, and M.J. Marshall, *Osteoprotegerin ligand regulates osteoclast adherence to the bone surface in mouse calvaria.* Biochem Biophys Res Commun, 2000. **274**(2): p. 281-90.
65. Mizuno, A., et al., *Transgenic mice overexpressing soluble osteoclast differentiation factor (sODF) exhibit severe osteoporosis.* J Bone Miner Metab, 2002. **20**(6): p. 337-44.
66. Min, J.K., *Vascular Endothelial Growth Factor Up-regulates Expression of Receptor Activator of NF- B (RANK) in Endothelial Cells: CONCOMITANT INCREASE OF ANGIOGENIC RESPONSES TO RANKLIGAND.* Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(41): p. 39548-39557.
67. Dougall, W.C., et al., *RANK is essential for osteoclast and lymph node development.* Genes Dev, 1999. **13**(18): p. 2412-24.
68. Wittrant, Y., et al., *Osteoprotegerin differentially regulates protease expression in osteoclast cultures.* Biochem Biophys Res Commun, 2002. **293**(1): p. 38-44.
69. Tat, S.K., et al., *OPG/membranous-RANKL complex is internalized via the clathrin pathway before a lysosomal and a proteasomal degradation.* Bone, 2006. **39**(4): p. 706-15.
70. Bucay, N., et al., *osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification.* Genes Dev, 1998. **12**(9): p. 1260-8.
71. Lacey, D.L., et al., *Osteoprotegerin ligand modulates murine osteoclast survival in vitro and in vivo.* Am J Pathol, 2000. **157**(2): p. 435-48.
72. Cheung, J., et al., *Interleukin-6 (IL-6), IL-1, receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin production by human osteoblastic cells: comparison of the effects of 17-beta oestradiol and raloxifene.* J Endocrinol, 2003. **177**(3): p. 423-33.
73. Viereck, V., et al., *Bisphosphonates pamidronate and zoledronic acid stimulate osteoprotegerin production by primary human osteoblasts.* Biochem Biophys Res Commun, 2002. **291**(3): p. 680-6.
74. Takayanagi, H., et al., *A new mechanism of bone destruction in rheumatoid arthritis: synovial fibroblasts induce osteoclastogenesis.* Biochem Biophys Res Commun, 1997. **240**(2): p. 279-86.
75. Takayanagi, H., et al., *Involvement of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synoviocytes in rheumatoid arthritis.* Arthritis Rheum, 2000. **43**(2): p. 259-69.
76. Schett, G., et al., *Additive bone-protective effects of anabolic treatment when used in conjunction with RANKL and tumor necrosis factor inhibition in two rat arthritis models.* Arthritis Rheum, 2005. **52**(5): p. 1604-11.
77. Wada, N., et al., *Periodontal ligament cells secrete the factor that inhibits osteoclastic differentiation and function: the factor is osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor.* J Periodontal Res, 2001. **36**(1): p. 56-63.
78. Kobayashi-Sakamoto, M., et al., *NF-kappaB-dependent induction of osteoprotegerin by Porphyromonas gingivalis in endothelial cells.* Biochem Biophys Res Commun, 2004. **315**(1): p. 107-12.

79. Teng, Y.T., et al., *Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection*. J Clin Invest, 2000. **106**(6): p. R59-67.
80. Whyte, M.P., *Paget's disease of bone and genetic disorders of RANKL/OPG/RANK/NF- κ B signaling*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1068**: p. 143-64.
81. Whyte, M.P., et al., *Juvenile Paget's disease: the second reported, oldest patient is homozygous for the TNFRSF11B "Balkan" mutation (966_969delTGACinsCTT), which elevates circulating immunoreactive osteoprotegerin levels*. J Bone Miner Res, 2007. **22**(6): p. 938-46.
82. Cundy, T., et al., *Recombinant osteoprotegerin for juvenile Paget's disease*. N Engl J Med, 2005. **353**(9): p. 918-23.
83. Vitovski, S., et al., *Investigating the interaction between osteoprotegerin and receptor activator of NF- κ B or tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand: evidence for a pivotal role for osteoprotegerin in regulating two distinct pathways*. J Biol Chem, 2007. **282**(43): p. 31601-9.
84. Baetu, T.M. and J. Hiscott, *On the TRAIL to apoptosis*. Cytokine Growth Factor Rev, 2002. **13**(3): p. 199-207.
85. Cretney, E., et al., *Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice*. J Immunol, 2002. **168**(3): p. 1356-61.
86. Ozoren, N. and W.S. El-Deiry, *Cell surface Death Receptor signaling in normal and cancer cells*. Semin Cancer Biol, 2003. **13**(2): p. 135-47.
87. van Noesel, M.M., et al., *Tumor-specific down-regulation of the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand decoy receptors DcR1 and DcR2 is associated with dense promoter hypermethylation*. Cancer Res, 2002. **62**(7): p. 2157-61.
88. Scatena, M. and C. Giachelli, *The $\alpha(v)\beta3$ integrin, NF- κ B, osteoprotegerin endothelial cell survival pathway. Potential role in angiogenesis*. Trends Cardiovasc Med, 2002. **12**(2): p. 83-8.
89. Kong, Y.Y., W.J. Boyle, and J.M. Penninger, *Osteoprotegerin ligand: a regulator of immune responses and bone physiology*. Immunol Today, 2000. **21**(10): p. 495-502.
90. Seshasayee, D., et al., *A novel in vivo role for osteoprotegerin ligand in activation of monocyte effector function and inflammatory response*. J Biol Chem, 2004. **279**(29): p. 30202-9.
91. Wong, B.R., et al., *TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor*. J Exp Med, 1997. **186**(12): p. 2075-80.
92. Wong, B.R., R. Josien, and Y. Choi, *TRANCE is a TNF family member that regulates dendritic cell and osteoclast function*. J Leukoc Biol, 1999. **65**(6): p. 715-24.
93. Ashcroft, A.J., et al., *Colonic dendritic cells, intestinal inflammation, and T cell-mediated bone destruction are modulated by recombinant osteoprotegerin*. Immunity, 2003. **19**(6): p. 849-61.
94. Cheung, A.M., et al., *Stem cell model of hematopoiesis*. Curr Stem Cell Res Ther, 2006. **1**(3): p. 305-15.
95. Morrison, S.J. and A.C. Spradling, *Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life*. Cell, 2008. **132**(4): p. 598-611.
96. Sacchetti, B., et al., *Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment*. Cell, 2007. **131**(2): p. 324-36.
97. Weisel, K.C., et al., *Stromal cell lines from the aorta-gonado-mesonephros region are potent supporters of murine and human hematopoiesis*. Exp Hematol, 2006. **34**(11): p. 1505-16.
98. Schweikle, E., et al., *Osteoprotegerin positively regulates hematopoietic progenitor cells*. Curr Stem Cell Res Ther, 2012. **7**(1): p. 72-7.
99. Miyamoto, K., et al., *Osteoclasts are dispensable for hematopoietic stem cell maintenance and mobilization*. J Exp Med, 2011. **208**(11): p. 2175-81.
100. Zauli, G. and P. Secchiero, *The role of the TRAIL/TRAIL receptors system in hematopoiesis and endothelial cell biology*. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2006. **17**(4): p. 245-257.
101. Chollet, M.E., et al., *Evidence of a colocalisation of osteoprotegerin (OPG) with von Willebrand factor (VWF) in platelets and megakaryocytes alpha granules. Studies from normal and grey platelets*. Br J Haematol, 2010. **148**(5): p. 805-7.
102. Bord, S., et al., *Synthesis of osteoprotegerin and RANKL by megakaryocytes is modulated by oestrogen*. British Journal of Haematology, 2004. **126**(2): p. 244-251.
103. Schoppet, M., et al., *Increased osteoprotegerin serum levels in men with coronary artery disease*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(3): p. 1024-8.

104. Browner, W.S., L.Y. Lui, and S.R. Cummings, *Associations of serum osteoprotegerin levels with diabetes, stroke, bone density, fractures, and mortality in elderly women*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(2): p. 631-7.
105. Kiechl, S., et al., *Osteoprotegerin is a risk factor for progressive atherosclerosis and cardiovascular disease*. Circulation, 2004. **109**(18): p. 2175-80.
106. Zannettino, A.C.W., et al., *Osteoprotegerin (OPG) is localized to the Weibel-Palade bodies of human vascular endothelial cells and is physically associated with von Willebrand factor*. Journal of Cellular Physiology, 2005. **204**(2): p. 714-723.
107. Vik, A., et al., *Serum osteoprotegerin is inversely associated with carotid plaque echogenicity in humans*. Atherosclerosis, 2007. **191**(1): p. 128-34.
108. Zauli, G., et al., *Osteoprotegerin increases leukocyte adhesion to endothelial cells both in vitro and in vivo*. Blood, 2007. **110**(2): p. 536-543.
109. Golledge, J., et al., *Osteoprotegerin and osteopontin are expressed at high concentrations within symptomatic carotid atherosclerosis*. Stroke, 2004. **35**(7): p. 1636-41.
110. Bennett, B.J., et al., *Osteoprotegerin inactivation accelerates advanced atherosclerotic lesion progression and calcification in older ApoE-/- mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(9): p. 2117-24.
111. Montecucco, F., S. Steffens, and F. Mach, *The immune response is involved in atherosclerotic plaque calcification: could the RANKL/RANK/OPG system be a marker of plaque instability?* Clin Dev Immunol, 2007. **2007**: p. 75805.
112. Erdogan, B., et al., *Intima-media thickness of the carotid arteries is related to serum osteoprotegerin levels in healthy postmenopausal women*. Neurol Res, 2004. **26**(6): p. 658-61.
113. Rhee, E.J., et al., *Relationship of serum osteoprotegerin levels with coronary artery disease severity, left ventricular hypertrophy and C-reactive protein*. Clin Sci (Lond), 2005. **108**(3): p. 237-43.
114. Ueland, T., et al., *Dysregulated osteoprotegerin/ RANK ligand/ RANK axis in clinical and experimental heart failure*. Circulation, 2005. **111**(19): p. 2461-8.
115. Avignon, A., et al., *Osteoprotegerin is associated with silent coronary artery disease in high-risk but asymptomatic type 2 diabetic patients*. Diabetes Care, 2005. **28**(9): p. 2176-80.
116. Crisafulli, A., et al., *Serum levels of osteoprotegerin and RANKL in patients with ST elevation acute myocardial infarction*. Clin Sci (Lond), 2005. **109**(4): p. 389-95.
117. Morena, M., et al., *Plasma osteoprotegerin is associated with mortality in hemodialysis patients*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(1): p. 262-70.
118. Semb, A.G., et al., *Osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and risk for coronary events: a nested case-control approach in the prospective EPIC-Norfolk population study 1993-2003*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(6): p. 975-80.
119. Ueland, T., et al., *A cohort study of the effects of serum osteoprotegerin and osteoprotegerin gene polymorphisms on cardiovascular mortality in elderly women*. Clin Endocrinol (Oxf), 2009. **71**(6): p. 828-33.
120. Lieb, W., et al., *Biomarkers of the Osteoprotegerin Pathway: Clinical Correlates, Subclinical Disease, Incident Cardiovascular Disease, and Mortality*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2010. **30**(9): p. 1849-1854.
121. Jono, S., et al., *Serum osteoprotegerin levels and long-term prognosis in subjects with stable coronary artery disease*. J Thromb Haemost, 2010. **8**(6): p. 1170-5.
122. Yang, Q., et al., *Plasma osteoprotegerin levels and long-term prognosis in patients with intermediate coronary artery lesions*. Clin Cardiol, 2011. **34**(7): p. 447-53.
123. Kim, S.M., et al., *Serum osteoprotegerin levels are associated with inflammation and pulse wave velocity*. Clin Endocrinol (Oxf), 2005. **63**(5): p. 594-8.
124. Gannage-Yared, M.H., et al., *Circulating osteoprotegerin is correlated with lipid profile, insulin sensitivity, adiponectin and sex steroids in an ageing male population*. Clin Endocrinol (Oxf), 2006. **64**(6): p. 652-8.
125. O'Sullivan, E.P., et al., *Osteoprotegerin and biomarkers of vascular inflammation in type 2 diabetes*. Diabetes Metab Res Rev, 2010. **26**(6): p. 496-502.
126. Olesen, P., T. Ledet, and L.M. Rasmussen, *Arterial osteoprotegerin: increased amounts in diabetes and modifiable synthesis from vascular smooth muscle cells by insulin and TNF-alpha*. Diabetologia, 2005. **48**(3): p. 561-8.
127. Yaturu, S., J. Rains, and S.K. Jain, *Relationship of elevated osteoprotegerin with insulin resistance, CRP, and TNF-alpha levels in men with type 2 diabetes*. Cytokine, 2008. **44**(1): p. 168-71.

128. Hermann-Arnhof, K.M., et al., *Initially elevated osteoprotegerin serum levels may predict a perioperative myocardial lesion in patients undergoing coronary artery bypass grafting*. Crit Care Med, 2006. **34**(1): p. 76-80.
129. Oh, E.S., et al., *Circulating osteoprotegerin levels are associated with age, waist-to-hip ratio, serum total cholesterol, and low-density lipoprotein cholesterol levels in healthy Korean women*. Metabolism, 2005. **54**(1): p. 49-54.
130. Terekeci, H.M., et al., *Plasma osteoprotegerin concentrations in type 2 diabetic patients and its association with neuropathy*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2009. **117**(3): p. 119-23.
131. Xiang, G.D., et al., *The relationship between plasma osteoprotegerin and endothelium-dependent arterial dilation in type 2 diabetes*. Diabetes, 2006. **55**(7): p. 2126-31.
132. Shin, J.Y., Y.G. Shin, and C.H. Chung, *Elevated serum osteoprotegerin levels are associated with vascular endothelial dysfunction in type 2 diabetes*. Diabetes Care, 2006. **29**(7): p. 1664-6.
133. Golledge, J., et al., *Determinants of endothelial function in a cohort of patients with peripheral artery disease*. Cardiology, 2008. **111**(1): p. 51-6.
134. Akinci, B., et al., *Serum osteoprotegerin is associated with carotid intima media thickness in women with previous gestational diabetes*. Diabetes Res Clin Pract, 2008. **82**(2): p. 172-8.
135. Rasmussen, L.M. and T. Ledet, *Osteoprotegerin and diabetic macroangiopathy*. Horm Metab Res, 2005. **37 Suppl 1**: p. 90-4.
136. Rasmussen, L.M., et al., *Plasma osteoprotegerin levels are associated with glycaemic status, systolic blood pressure, kidney function and cardiovascular morbidity in type 1 diabetic patients*. Eur J Endocrinol, 2006. **154**(1): p. 75-81.
137. Khattar, R.S., et al., *Effect of aging on the prognostic significance of ambulatory systolic, diastolic, and pulse pressure in essential hypertension*. Circulation, 2001. **104**(7): p. 783-9.
138. Yndestad, A., et al., *Increased gene expression of tumor necrosis factor superfamily ligands in peripheral blood mononuclear cells during chronic heart failure*. Cardiovasc Res, 2002. **54**(1): p. 175-82.
139. Yan, A.T., et al., *Relationships between plasma levels of matrix metalloproteinases and neurohormonal profile in patients with heart failure*. Eur J Heart Fail, 2008. **10**(2): p. 125-8.
140. Lamoureux, F., et al., *Glycosaminoglycans as Potential Regulators of Osteoprotegerin Therapeutic Activity in Osteosarcoma*. Cancer Research, 2009. **69**(2): p. 526-536.
141. Jones, D.H., et al., *Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL*. Nature, 2006. **440**(7084): p. 692-6.
142. Lamoureux, F., et al., *Regulation of osteoprotegerin pro- or anti-tumoral activity by bone tumor microenvironment*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1805**(1): p. 17-24.
143. Baud'huin, M., et al., *Glycosaminoglycans inhibit the adherence and the spreading of osteoclasts and their precursors: role in osteoclastogenesis and bone resorption*. Eur J Cell Biol, 2011. **90**(1): p. 49-57.
144. Colucci, S., *T cells support osteoclastogenesis in an in vitro model derived from human multiple myeloma bone disease: the role of the OPG/TRAIL interaction*. Blood, 2004. **104**(12): p. 3722-3730.
145. Clezardin, P. and A. Teti, *Bone metastasis: pathogenesis and therapeutic implications*. Clin Exp Metastasis, 2007. **24**(8): p. 599-608.
146. Brown, J.M., et al., *Osteoprotegerin and rank ligand expression in prostate cancer*. Urology, 2001. **57**(4): p. 611-6.
147. Nyambo, R., et al., *Human Bone Marrow Stromal Cells Protect Prostate Cancer Cells From TRAIL-Induced Apoptosis*. Journal of Bone and Mineral Research, 2004. **19**(10): p. 1712-1721.
148. Ito, R., et al., *Expression of osteoprotegerin correlates with aggressiveness and poor prognosis of gastric carcinoma*. Virchows Archiv, 2003. **443**(2): p. 146-151.
149. De Toni, E.N., et al., *OPG is regulated by beta-catenin and mediates resistance to TRAIL-induced apoptosis in colon cancer*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(15): p. 4713-8.
150. Mizutani, Y., et al., *Prognostic significance of serum osteoprotegerin levels in patients with bladder carcinoma*. Cancer, 2004. **101**(8): p. 1794-1802.
151. Vidal, O.N., et al., *Osteoprotegerin mRNA is increased by interleukin-1 alpha in the human osteosarcoma cell line MG-63 and in human osteoblast-like cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **248**(3): p. 696-700.
152. Andrade, F.R., et al., *Expression of bone resorption regulators (RANK, RANKL, and OPG) in odontogenic tumors*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2008. **106**(4): p. 548-55.
153. Blair, J.M., et al., *Mechanisms of disease: roles of OPG, RANKL and RANK in the pathophysiology of skeletal metastasis*. Nat Clin Pract Oncol, 2006. **3**(1): p. 41-9.

154. Dovoio, A., M.L. Sartori, and A. Angeli, *Correspondence re: A. Lipton et al., Serum osteoprotegerin levels in healthy controls and cancer patients. Clin. Cancer Res., 8: 2306-2310, 2002. Clin Cancer Res, 2003. 9(6): p. 2384-5; author reply 2386.*
155. Valero, C., et al., *Osteoprotegerin and bone mass in squamous cell head and neck cancer patients. Calcif Tissue Int, 2006. 78(6): p. 343-7.*
156. Eaton, C.L., et al., *Serum osteoprotegerin (OPG) levels are associated with disease progression and response to androgen ablation in patients with prostate cancer. Prostate, 2004. 59(3): p. 304-10.*
157. Mountzios, G., et al., *Abnormal bone remodeling process is due to an imbalance in the receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) axis in patients with solid tumors metastatic to the skeleton. Acta Oncol, 2007. 46(2): p. 221-9.*
158. Kapoor, P., et al., *Osteoprotegerin and the bone homing and colonization potential of breast cancer cells. J Cell Biochem, 2008. 103(1): p. 30-41.*
159. Holen, I., et al., *Osteoprotegerin (OPG) expression by breast cancer cells in vitro and breast tumours in vivo--a role in tumour cell survival? Breast Cancer Res Treat, 2005. 92(3): p. 207-15.*
160. Corey, E., et al., *Osteoprotegerin in prostate cancer bone metastasis. Cancer Res, 2005. 65(5): p. 1710-8.*
161. Heath, D.J., et al., *An osteoprotegerin-like peptidomimetic inhibits osteoclastic bone resorption and osteolytic bone disease in myeloma. Cancer Res, 2007. 67(1): p. 202-8.*
162. Fili, S., M. Karalaki, and B. Schaller, *Mechanism of bone metastasis: the role of osteoprotegerin and of the host-tissue microenvironment-related survival factors. Cancer Lett, 2009. 283(1): p. 10-9.*
163. Lamoureux, F., et al., *Proteoglycans: key partners in bone cell biology. BioEssays, 2007. 29(8): p. 758-771.*
164. Molyneux, S.D., et al., *Prkar1a is an osteosarcoma tumor suppressor that defines a molecular subclass in mice. J Clin Invest, 2010. 120(9): p. 3310-25.*
165. Benedikt, M.B., et al., *2-methoxyestradiol-mediated anti-tumor effect increases osteoprotegerin expression in osteosarcoma cells. J Cell Biochem, 2010. 109(5): p. 950-6.*
166. Malyankar, U.M., *Osteoprotegerin Is an alpha v beta 3-induced, NF-kappa B-dependent Survival Factor for Endothelial Cells. Journal of Biological Chemistry, 2000. 275(28): p. 20959-20962.*
167. Nybo, M. and L.M. Rasmussen, *Osteoprotegerin released from the vascular wall by heparin mainly derives from vascular smooth muscle cells. Atherosclerosis, 2008. 201(1): p. 33-35.*
168. Corallini, F., et al., *Trail down-regulates the release of osteoprotegerin (OPG) by primary stromal cells. Journal of Cellular Physiology, 2011. 226(9): p. 2279-2286.*
169. Pritzker, L.B., *The Role of Osteoprotegerin and Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand in Human Microvascular Endothelial Cell Survival. Molecular Biology of the Cell, 2004. 15(6): p. 2834-2841.*
170. Kobayashi-Sakamoto, M., et al., *Osteoprotegerin protects endothelial cells against apoptotic cell death induced by Porphyromonas gingivalis cysteine proteinases. FEMS Microbiology Letters, 2006. 264(2): p. 238-245.*
171. Reid, P.E., N.J. Brown, and I. Holen, *Breast cancer cells stimulate osteoprotegerin (OPG) production by endothelial cells through direct cell contact. Molecular Cancer, 2009. 8(1): p. 49.*
172. Secchiero, P., et al., *Activation of the p53 pathway down-regulates the osteoprotegerin expression and release by vascular endothelial cells. Blood, 2009. 111: p. 1287-1294.*
173. Mangan, S.H., et al., *Osteoprotegerin up regulates endothelial cell adhesion molecule response to tumor necrosis factor- α associated with induction of Angiopoietin-2. Cardiovasc Res, 2007. 76(3): p. 494-505.*
174. Kobayashi-Sakamoto, M., et al., *Role of av integrin in osteoprotegerin-induced endothelial cell migration and proliferation. Microvascular Research, 2008. 76(3): p. 139-144.*
175. Cackowski, F.C., et al., *Osteoclasts are important for bone angiogenesis. Blood, 2009. 115(1): p. 140-149.*
176. Bauer, S.M., R.J. Bauer, and O.C. Velazquez, *Angiogenesis, vasculogenesis, and induction of healing in chronic wounds. Vasc Endovascular Surg, 2005. 39(4): p. 293-306.*
177. Carmeliet, P., *Manipulating angiogenesis in medicine. J Intern Med, 2004. 255(5): p. 538-61.*
178. Heil, M., et al., *Arteriogenesis versus angiogenesis: similarities and differences. J Cell Mol Med, 2006. 10(1): p. 45-55.*
179. Carmeliet, P., *Angiogenesis in life, disease and medicine. Nature, 2005. 438(7070): p. 932-6.*
180. Carmeliet, P., *Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. Nat Med, 2000. 6(4): p. 389-95.*
181. Gerhardt, H., et al., *VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. J Cell Biol, 2003. 161(6): p. 1163-77.*
182. Makanya, A.N., R. Hlushchuk, and V.G. Djonov, *Intussusceptive angiogenesis and its role in vascular morphogenesis, patterning, and remodeling. Angiogenesis, 2009. 12(2): p. 113-23.*

183. Djonov, V.G., H. Kurz, and P.H. Burri, *Optimality in the developing vascular system: branching remodeling by means of intussusception as an efficient adaptation mechanism*. Dev Dyn, 2002. **224**(4): p. 391-402.
184. Heryanto, B., J.E. Girling, and P.A. Rogers, *Intravascular neutrophils partially mediate the endometrial endothelial cell proliferative response to oestrogen in ovariectomised mice*. Reproduction, 2004. **127**(5): p. 613-20.
185. Bloor, C.M., *Angiogenesis during exercise and training*. Angiogenesis, 2005. **8**(3): p. 263-71.
186. Papetti, M. and I.M. Herman, *Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis*. Am J Physiol Cell Physiol, 2002. **282**(5): p. C947-70.
187. Karsenty, G., *The complexities of skeletal biology*. Nature, 2003. **423**(6937): p. 316-8.
188. Ahluwalia, A. and A.S. Tarnawski, *Critical role of hypoxia sensor--HIF-1alpha in VEGF gene activation. Implications for angiogenesis and tissue injury healing*. Curr Med Chem, 2012. **19**(1): p. 90-7.
189. Rosenberger, C., et al., *Cellular responses to hypoxia after renal segmental infarction*. Kidney Int, 2003. **64**(3): p. 874-86.
190. Arras, M., et al., *Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb*. J Clin Invest, 1998. **101**(1): p. 40-50.
191. Dayan, F., et al., *A dialogue between the hypoxia-inducible factor and the tumor microenvironment*. Cancer Microenviron, 2008. **1**(1): p. 53-68.
192. Nagy, J.A., A.M. Dvorak, and H.F. Dvorak, *VEGF-A and the induction of pathological angiogenesis*. Annu Rev Pathol, 2007. **2**: p. 251-75.
193. Hendrix, M.J., et al., *Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(6): p. 411-21.
194. Rafii, S., *Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise*. J Clin Invest, 2000. **105**(1): p. 17-9.
195. Risau, W., et al., *Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies*. Development, 1988. **102**(3): p. 471-8.
196. Caprioli, A., et al., *Hemangioblast commitment in the avian allantois: cellular and molecular aspects*. Dev Biol, 2001. **238**(1): p. 64-78.
197. Urbich, C. and S. Dimmeler, *Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology*. Circ Res, 2004. **95**(4): p. 343-53.
198. Janic, B. and A.S. Arbab, *The role and therapeutic potential of endothelial progenitor cells in tumor neovascularization*. ScientificWorldJournal, 2010. **10**: p. 1088-99.
199. Foubert, *Pro-angiogenic cell therapy in ischaemic diseases*. Sang Thrombose Vaisseaux, 2007. **19**(6): p. 5.
200. Kelly, B.D., et al., *Cell type-specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1*. Circ Res, 2003. **93**(11): p. 1074-81.
201. Ramirez-Bergeron, D.L., et al., *HIF-dependent hematopoietic factors regulate the development of the embryonic vasculature*. Dev Cell, 2006. **11**(1): p. 81-92.
202. Carmeliet, P., et al., *Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions*. Nat Med, 2001. **7**(5): p. 575-83.
203. Patan, S., *Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling*. J Neurooncol, 2000. **50**(1-2): p. 1-15.
204. Takashima, S., et al., *Targeting of both mouse neuropilin-1 and neuropilin-2 genes severely impairs developmental yolk sac and embryonic angiogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(6): p. 3657-62.
205. Jakobsson, L., et al., *Heparan sulfate in trans potentiates VEGFR-mediated angiogenesis*. Dev Cell, 2006. **10**(5): p. 625-34.
206. Eichmann, A., et al., *Ligand-dependent development of the endothelial and hemopoietic lineages from embryonic mesodermal cells expressing vascular endothelial growth factor receptor 2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(10): p. 5141-6.
207. Girling, J.E. and P.A. Rogers, *Regulation of endometrial vascular remodeling: role of the vascular endothelial growth factor family and the angiopoietin-TIE signalling system*. Reproduction, 2009. **138**(6): p. 883-93.
208. Karamysheva, A.F., *Mechanisms of angiogenesis*. Biochemistry (Mosc), 2008. **73**(7): p. 751-62.
209. Davis, S., et al., *Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning*. Cell, 1996. **87**(7): p. 1161-9.
210. Oricchio, E., et al., *The Eph-receptor A7 is a soluble tumor suppressor for follicular lymphoma*. Cell, 2011. **147**(3): p. 554-64.

211. Dahmann, C., A.C. Oates, and M. Brand, *Boundary formation and maintenance in tissue development*. Nat Rev Genet, 2011. **12**(1): p. 43-55.
212. Wang, H.U., Z.F. Chen, and D.J. Anderson, *Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4*. Cell, 1998. **93**(5): p. 741-53.
213. Foo, S.S., et al., *Ephrin-B2 controls cell motility and adhesion during blood-vessel-wall assembly*. Cell, 2006. **124**(1): p. 161-73.
214. Jakobsson, L., K. Bentley, and H. Gerhardt, *VEGFRs and Notch: a dynamic collaboration in vascular patterning*. Biochem Soc Trans, 2009. **37**(Pt 6): p. 1233-6.
215. Shawber, C.J., et al., *Notch signaling in primary endothelial cells*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **995**: p. 162-70.
216. Krebs, L.T., et al., *Haploinsufficient lethality and formation of arteriovenous malformations in Notch pathway mutants*. Genes Dev, 2004. **18**(20): p. 2469-73.
217. Xue, Y., et al., *Embryonic lethality and vascular defects in mice lacking the Notch ligand Jagged1*. Hum Mol Genet, 1999. **8**(5): p. 723-30.
218. Suchting, S., et al., *The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(9): p. 3225-30.
219. Beenken, A. and M. Mohammadi, *The FGF family: biology, pathophysiology and therapy*. Nat Rev Drug Discov, 2009. **8**(3): p. 235-53.
220. Seghezzi, G., et al., *Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis*. J Cell Biol, 1998. **141**(7): p. 1659-73.
221. Moscatelli, D., *High and low affinity binding sites for basic fibroblast growth factor on cultured cells: absence of a role for low affinity binding in the stimulation of plasminogen activator production by bovine capillary endothelial cells*. J Cell Physiol, 1987. **131**(1): p. 123-30.
222. Klein, S., et al., *Basic fibroblast growth factor modulates integrin expression in microvascular endothelial cells*. Mol Biol Cell, 1993. **4**(10): p. 973-82.
223. Miller, D.L., et al., *Compensation by fibroblast growth factor 1 (FGF1) does not account for the mild phenotypic defects observed in FGF2 null mice*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(6): p. 2260-8.
224. Rossant, J. and L. Howard, *Signaling pathways in vascular development*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2002. **18**: p. 541-73.
225. Frater-Schroder, M., et al., *Transforming growth factor-beta inhibits endothelial cell proliferation*. Biochem Biophys Res Commun, 1986. **137**(1): p. 295-302.
226. Iruela-Arispe, M.L. and E.H. Sage, *Endothelial cells exhibiting angiogenesis in vitro proliferate in response to TGF-beta 1*. J Cell Biochem, 1993. **52**(4): p. 414-30.
227. Hofer, E. and B. Schweighofer, *Signal transduction induced in endothelial cells by growth factor receptors involved in angiogenesis*. Thromb Haemost, 2007. **97**(3): p. 355-63.
228. Larsson, J., et al., *Abnormal angiogenesis but intact hematopoietic potential in TGF-beta type I receptor-deficient mice*. EMBO J, 2001. **20**(7): p. 1663-73.
229. Evrard, S.M., et al., *The profibrotic cytokine transforming growth factor-beta1 increases endothelial progenitor cell angiogenic properties*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2012. **10**(4): p. 670-679.
230. Lindahl, P., et al., *Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice*. Science, 1997. **277**(5323): p. 242-5.
231. Hellstrom, M., et al., *Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse*. Development, 1999. **126**(14): p. 3047-55.
232. van Hinsbergh, V.W. and P. Koolwijk, *Endothelial sprouting and angiogenesis: matrix metalloproteinases in the lead*. Cardiovasc Res, 2008. **78**(2): p. 203-12.
233. Siefert, S.A. and R. Sarkar, *Matrix metalloproteinases in vascular physiology and disease*. Vascular, 2012. **20**(4): p. 210-6.
234. Newby, A.C., *Matrix metalloproteinase inhibition therapy for vascular diseases*. Vascul Pharmacol, 2012. **56**(5-6): p. 232-44.
235. Li, M. and R.M. Ransohoff, *The roles of chemokine CXCL12 in embryonic and brain tumor angiogenesis*. Semin Cancer Biol, 2009. **19**(2): p. 111-5.
236. Shirozu, M., et al., *Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene*. Genomics, 1995. **28**(3): p. 495-500.
237. Yu, L., et al., *Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1*. Gene, 2006. **374**: p. 174-9.

238. Rueda, P., et al., *The CXCL12 γ chemokine displays unprecedented structural and functional properties that make it a paradigm of chemoattractant proteins*. PLoS One, 2008. **3**(7): p. e2543.
239. Zou, Y.R., et al., *Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development*. Nature, 1998. **393**(6685): p. 595-9.
240. Ma, Q., et al., *Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(16): p. 9448-53.
241. Balabanian, K., et al., *The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes*. J Biol Chem, 2005. **280**(42): p. 35760-6.
242. Bonocchi, R., et al., *Chemokines and chemokine receptors: an overview*. Front Biosci, 2009. **14**: p. 540-51.
243. Busillo, J.M. and J.L. Benovic, *Regulation of CXCR4 signaling*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1768**(4): p. 952-63.
244. Ceradini, D.J., et al., *Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1*. Nat Med, 2004. **10**(8): p. 858-64.
245. Schioppa, T., et al., *Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia*. J Exp Med, 2003. **198**(9): p. 1391-402.
246. Kryczek, I., et al., *CXCL12 and vascular endothelial growth factor synergistically induce neoangiogenesis in human ovarian cancers*. Cancer Res, 2005. **65**(2): p. 465-72.
247. Buckley, C.D., et al., *Persistent induction of the chemokine receptor CXCR4 by TGF-beta 1 on synovial T cells contributes to their accumulation within the rheumatoid synovium*. J Immunol, 2000. **165**(6): p. 3423-9.
248. Gupta, S.K., et al., *Chemokine receptors in human endothelial cells. Functional expression of CXCR4 and its transcriptional regulation by inflammatory cytokines*. J Biol Chem, 1998. **273**(7): p. 4282-7.
249. Ponomaryov, T., et al., *Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function*. J Clin Invest, 2000. **106**(11): p. 1331-9.
250. Salvucci, O., et al., *Regulation of endothelial cell branching morphogenesis by endogenous chemokine stromal-derived factor-1*. Blood, 2002. **99**(8): p. 2703-11.
251. Mirshahi, F., et al., *SDF-1 activity on microvascular endothelial cells: consequences on angiogenesis in in vitro and in vivo models*. Thromb Res, 2000. **99**(6): p. 587-94.
252. Deshane, J., et al., *Stromal cell-derived factor 1 promotes angiogenesis via a heme oxygenase 1-dependent mechanism*. J Exp Med, 2007. **204**(3): p. 605-18.
253. Martin, S.K., et al., *Tumor angiogenesis is associated with plasma levels of stromal-derived factor-1 α in patients with multiple myeloma*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(23): p. 6973-7.
254. Neuhaus, T., et al., *Stromal cell-derived factor 1 α (SDF-1 α) induces gene-expression of early growth response-1 (Egr-1) and VEGF in human arterial endothelial cells and enhances VEGF induced cell proliferation*. Cell Prolif, 2003. **36**(2): p. 75-86.
255. Yang, S.X., et al., *Activation of chemokine receptor CXCR4 in malignant glioma cells promotes the production of vascular endothelial growth factor*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **335**(2): p. 523-8.
256. Murdoch, C., et al., *The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(8): p. 618-31.
257. Zemani, F., et al., *Ex Vivo Priming of Endothelial Progenitor Cells With SDF-1 Before Transplantation Could Increase Their Proangiogenic Potential*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2008. **28**(4): p. 644-650.
258. Tan, Y., et al., *Stromal cell-derived factor-1 enhances pro-angiogenic effect of granulocyte-colony stimulating factor*. Cardiovasc Res, 2007. **73**(4): p. 823-32.
259. Aghi, M., et al., *Tumor stromal-derived factor-1 recruits vascular progenitors to mitotic neovasculature, where microenvironment influences their differentiated phenotypes*. Cancer Res, 2006. **66**(18): p. 9054-64.
260. Teicher, B.A. and S.P. Fricker, *CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(11): p. 2927-31.
261. Matsuo, Y., et al., *CXCL8/IL-8 and CXCL12/SDF-1 α co-operatively promote invasiveness and angiogenesis in pancreatic cancer*. Int J Cancer, 2009. **124**(4): p. 853-61.
262. Hynes, R.O., *Cell-matrix adhesion in vascular development*. J Thromb Haemost, 2007. **5 Suppl 1**: p. 32-40.
263. Malinin, N.L., E. Pluskota, and T.V. Byzova, *Integrin signaling in vascular function*. Curr Opin Hematol, 2012. **19**(3): p. 206-11.
264. Brooks, P.C., R.A. Clark, and D.A. Cheresh, *Requirement of vascular integrin $\alpha v \beta 3$ for angiogenesis*. Science, 1994. **264**(5158): p. 569-71.

265. Liaw, L., et al., *Osteopontin and beta 3 integrin are coordinately expressed in regenerating endothelium in vivo and stimulate Arg-Gly-Asp-dependent endothelial migration in vitro*. *Circ Res*, 1995. **77**(4): p. 665-72.
266. Eliceiri, B.P. and D.A. Cheresh, *The role of av integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development*. *The Journal of Clinical Investigation*, 1999. **103**: p. 1227-1230.
267. Hodivala-Dilke, K.M., et al., *Beta3-integrin-deficient mice are a model for Glanzmann thrombasthenia showing placental defects and reduced survival*. *J Clin Invest*, 1999. **103**(2): p. 229-38.
268. Bader, B.L., et al., *Extensive vasculogenesis, angiogenesis, and organogenesis precede lethality in mice lacking all alpha v integrins*. *Cell*, 1998. **95**(4): p. 507-19.
269. Senger, D.R., et al., *Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: regulation through alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(25): p. 13612-7.
270. Souza-Fernandes, A.B., P. Pelosi, and P.R. Rocco, *Bench-to bedside review: the role of glycosaminoglycans in respiratory disease*. *Crit Care*, 2006. **10**(6): p. 237.
271. Chen, E., et al., *A unique role for 6-O sulfation modification in zebrafish vascular development*. *Dev Biol*, 2005. **284**(2): p. 364-76.
272. Izvolsky, K.I., et al., *Systemic inactivation of Hs6st1 in mice is associated with late postnatal mortality without major defects in organogenesis*. *Genesis*, 2008. **46**(1): p. 8-18.
273. Abramsson, A., et al., *Defective N-sulfation of heparan sulfate proteoglycans limits PDGF-BB binding and pericyte recruitment in vascular development*. *Genes Dev*, 2007. **21**(3): p. 316-31.
274. Stenzel, D., et al., *Peripheral mural cell recruitment requires cell-autonomous heparan sulfate*. *Blood*, 2009. **114**(4): p. 915-24.
275. Ruhrberg, C., et al., *Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis*. *Genes Dev*, 2002. **16**(20): p. 2684-98.
276. Lindblom, P., et al., *Endothelial PDGF-B retention is required for proper investment of pericytes in the microvessel wall*. *Genes Dev*, 2003. **17**(15): p. 1835-40.
277. Chen, Q., et al., *Potential role for heparan sulfate proteoglycans in regulation of transforming growth factor-beta (TGF-beta) by modulating assembly of latent TGF-beta-binding protein-1*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(36): p. 26418-30.
278. Lambaerts, K., S.A. Wilcox-Adelman, and P. Zimmermann, *The signaling mechanisms of syndecan heparan sulfate proteoglycans*. *Curr Opin Cell Biol*, 2009. **21**(5): p. 662-9.
279. Edwards, I.J., *Proteoglycans in prostate cancer*. *Nat Rev Urol*, 2012. **9**(4): p. 196-206.
280. Teng, Y.H., R.S. Aquino, and P.W. Park, *Molecular functions of syndecan-1 in disease*. *Matrix Biol*, 2012. **31**(1): p. 3-16.
281. Purushothaman, A., et al., *Heparanase-enhanced shedding of syndecan-1 by myeloma cells promotes endothelial invasion and angiogenesis*. *Blood*, 2010. **115**(12): p. 2449-57.
282. Maeda, T., J. Desouky, and A. Friedl, *Syndecan-1 expression by stromal fibroblasts promotes breast carcinoma growth in vivo and stimulates tumor angiogenesis*. *Oncogene*, 2006. **25**(9): p. 1408-12.
283. Beauvais, D.M., et al., *Syndecan-1 regulates v 3 and v 5 integrin activation during angiogenesis and is blocked by synstatin, a novel peptide inhibitor*. *Journal of Experimental Medicine*, 2009. **206**(3): p. 691-705.
284. Jiang, B.H. and L.Z. Liu, *AKT signaling in regulating angiogenesis*. *Curr Cancer Drug Targets*, 2008. **8**(1): p. 19-26.
285. Shiojima, I. and K. Walsh, *Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis*. *Circ Res*, 2002. **90**(12): p. 1243-50.
286. Chong, Z.Z., Y.C. Shang, and K. Maiese, *Cardiovascular disease and mTOR signaling*. *Trends Cardiovasc Med*, 2011. **21**(5): p. 151-5.
287. Thedieck, K., et al., *PRAS40 and PRR5-like protein are new mTOR interactors that regulate apoptosis*. *PLoS One*, 2007. **2**(11): p. e1217.
288. Lemaitre, V., A.J. Dabo, and J. D'Armiento, *Cigarette smoke components induce matrix metalloproteinase-1 in aortic endothelial cells through inhibition of mTOR signaling*. *Toxicol Sci*, 2011. **123**(2): p. 542-9.
289. Humar, R., et al., *Hypoxia enhances vascular cell proliferation and angiogenesis in vitro via rapamycin (mTOR)-dependent signaling*. *FASEB J*, 2002. **16**(8): p. 771-80.
290. Murphy, D.A., et al., *Inhibition of tumor endothelial ERK activation, angiogenesis, and tumor growth by sorafenib (BAY43-9006)*. *Am J Pathol*, 2006. **169**(5): p. 1875-85.
291. Hood, J.D., et al., *Differential alphav integrin-mediated Ras-ERK signaling during two pathways of angiogenesis*. *J Cell Biol*, 2003. **162**(5): p. 933-43.

292. Han, J., et al., *A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells*. Science, 1994. **265**(5173): p. 808-11.
293. Adams, R.H., et al., *Essential role of p38alpha MAP kinase in placental but not embryonic cardiovascular development*. Mol Cell, 2000. **6**(1): p. 109-16.
294. Rose, B.A., T. Force, and Y. Wang, *Mitogen-activated protein kinase signaling in the heart: angels versus demons in a heart-breaking tale*. Physiol Rev, 2010. **90**(4): p. 1507-46.
295. Ferrari, G., et al., *TGF-beta1 induces endothelial cell apoptosis by shifting VEGF activation of p38(MAPK) from the prosurvival p38beta to proapoptotic p38alpha*. Mol Cancer Res, 2012. **10**(5): p. 605-14.
296. Schaller, M.D., *Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 7): p. 1007-13.
297. Zhao, X., et al., *Role of kinase-independent and -dependent functions of FAK in endothelial cell survival and barrier function during embryonic development*. J Cell Biol, 2010. **189**(6): p. 955-65.
298. Belvitch, P. and S.M. Dudek, *Role of FAK in S1P-regulated endothelial permeability*. Microvasc Res, 2012. **83**(1): p. 22-30.
299. Stump, M.M., et al., *Endothelium Grown from Circulating Blood on Isolated Intravascular Dacron Hub*. Am J Pathol, 1963. **43**: p. 361-7.
300. Alev, C., M. Ii, and T. Asahara, *Endothelial progenitor cells: a novel tool for the therapy of ischemic diseases*. Antioxid Redox Signal, 2011. **15**(4): p. 949-65.
301. Ingram, D.A., N.M. Caplice, and M.C. Yoder, *Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells*. Blood, 2005. **106**(5): p. 1525-31.
302. Zemani, F., et al., *Low-molecular-weight fucoidan enhances the proangiogenic phenotype of endothelial progenitor cells*. Biochemical Pharmacology, 2005. **70**(8): p. 1167-1175.
303. Janic, B., et al., *Human cord blood-derived AC133+ progenitor cells preserve endothelial progenitor characteristics after long term in vitro expansion*. PLoS One, 2010. **5**(2): p. e9173.
304. Caiado, F. and S. Dias, *Endothelial progenitor cells and integrins: adhesive needs*. Fibrogenesis Tissue Repair, 2012. **5**: p. 4.
305. Zampetaki, A., J.P. Kirton, and Q. Xu, *Vascular repair by endothelial progenitor cells*. Cardiovascular Research, 2008. **78**(3): p. 413-421.
306. Tilling, L., P. Chowienczyk, and B. Clapp, *Progenitors in motion: mechanisms of mobilization of endothelial progenitor cells*. Br J Clin Pharmacol, 2009. **68**(4): p. 484-92.
307. Velazquez, O.C., *Angiogenesis and vasculogenesis: inducing the growth of new blood vessels and wound healing by stimulation of bone marrow-derived progenitor cell mobilization and homing*. J Vasc Surg, 2007. **45** Suppl A: p. A39-47.
308. Hristov, M., W. Erl, and P.C. Weber, *Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(7): p. 1185-9.
309. Kim, Y.M., *TNF-related Activation-induced Cytokine (TRANCE) Induces Angiogenesis through the Activation of Src and Phospholipase C (PLC) in Human Endothelial Cells*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **277**(9): p. 6799-6805.
310. Min, J.K., et al., *Receptor activator of nuclear factor (NF)- B ligand (RANKL) increases vascular permeability: impaired permeability and angiogenesis in eNOS-deficient mice*. Blood, 2007. **109**(4): p. 1495-1502.
311. Larsen, M., et al., *Augmentation of surgical angiogenesis in vascularized bone allotransplants with host-derived a/v bundle implantation, fibroblast growth factor-2, and vascular endothelial growth factor administration*. J Orthop Res, 2010. **28**(8): p. 1015-21.
312. Willems, W.F., et al., *Induction of angiogenesis and osteogenesis in surgically revascularized frozen bone allografts by sustained delivery of FGF-2 and VEGF*. J Orthop Res, 2012. **30**(10): p. 1556-62.
313. Fadini, G.P., et al., *Emerging role of circulating calcifying cells in the bone-vascular axis*. Circulation, 2012. **125**(22): p. 2772-81.
314. DiMilla, P.A., et al., *Maximal migration of human smooth muscle cells on fibronectin and type IV collagen occurs at an intermediate attachment strength*. J Cell Biol, 1993. **122**(3): p. 729-37.
315. Nix, D.A., et al., *Targeting of zyxin to sites of actin membrane interaction and to the nucleus*. J Biol Chem, 2001. **276**(37): p. 34759-67.
316. Brown, C.M., et al., *Probing the integrin-actin linkage using high-resolution protein velocity mapping*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 24): p. 5204-14.
317. Jasuja, R., B. Furie, and B.C. Furie, *Endothelium-derived but not platelet-derived protein disulfide isomerase is required for thrombus formation in vivo*. Blood, 2010. **116**(22): p. 4665-4674.

318. Swiatkowska, M., et al., *Interaction and functional association of protein disulfide isomerase with $\alpha V\beta 3$ integrin on endothelial cells*. FEBS Journal, 2008. **275**(8): p. 1813-1823.
319. Folkman, J., *Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease*. Nat Med, 1995. **1**(1): p. 27-31.
320. Banki, K., et al., *Molecular ordering in HIV-induced apoptosis. Oxidative stress, activation of caspases, and cell survival are regulated by transaldolase*. J Biol Chem, 1998. **273**(19): p. 11944-53.
321. Sanson, M., et al., *Oxygen-regulated protein-150 prevents calcium homeostasis deregulation and apoptosis induced by oxidized LDL in vascular cells*. Cell Death and Differentiation, 2008. **15**(8): p. 1255-1265.
322. Takahashi, Y., C.L. Meyerkord, and H.G. Wang, *Bif-1/Endophilin B1: a candidate for crescent driving force in autophagy*. Cell Death and Differentiation, 2009. **16**(7): p. 947-955.
323. Vincent, P., et al., *A role for the neuronal protein collapsin response mediator protein 2 in T lymphocyte polarization and migration*. J Immunol, 2005. **175**(11): p. 7650-60.
324. Guise, T.A., *The vicious cycle of bone metastases*. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2002. **2**(6): p. 570-2.
325. Holen, I., et al., *Osteoprotegerin (OPG) is a survival factor for human prostate cancer cells*. Cancer Res, 2002. **62**(6): p. 1619-23.
326. Jung, K., et al., *Comparison of 10 serum bone turnover markers in prostate carcinoma patients with bone metastatic spread: diagnostic and prognostic implications*. Int J Cancer, 2004. **111**(5): p. 783-91.
327. Chavakis, E., C. Urbich, and S. Dimmeler, *Homing and engraftment of progenitor cells: a prerequisite for cell therapy*. J Mol Cell Cardiol, 2008. **45**(4): p. 514-22.
328. Holen, I. and C.M. Shipman, *Role of osteoprotegerin (OPG) in cancer*. Clin Sci (Lond), 2006. **110**(3): p. 279-91.
329. <holen I 2002.pdf>.
330. Ragland, B.D., et al., *Cytogenetics and molecular biology of osteosarcoma*. Lab Invest, 2002. **82**(4): p. 365-73.
331. Uygur, B. and W.S. Wu, *SLUG promotes prostate cancer cell migration and invasion via CXCR4/CXCL12 axis*. Mol Cancer, 2011. **10**: p. 139.
332. Song, X., et al., *BMP2 and VEGF promote angiogenesis but retard terminal differentiation of osteoblasts in bone regeneration by up-regulating Id1*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2011. **43**(10): p. 796-804.
333. Kirton, J.P. and Q. Xu, *Endothelial precursors in vascular repair*. Microvasc Res, 2010. **79**(3): p. 193-9.
334. Schatteman, G.C., M. Dunnwald, and C. Jiao, *Biology of bone marrow-derived endothelial cell precursors*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **292**(1): p. H1-18.
335. Bompais, H., et al., *Human endothelial cells derived from circulating progenitors display specific functional properties compared with mature vessel wall endothelial cells*. Blood, 2004 **103**: p. 2577-2584.
336. Sanz-Rodriguez, F., et al., *Endoglin regulates cytoskeletal organization through binding to ZRP-1, a member of the Lim family of proteins*. J Biol Chem, 2004. **279**(31): p. 32858-68.
337. Choi, K.D., et al., *Identification of the hemogenic endothelial progenitor and its direct precursor in human pluripotent stem cell differentiation cultures*. Cell Rep, 2012. **2**(3): p. 553-67.
338. Gossel, M., et al., *Coronary endothelial dysfunction in humans is associated with coronary retention of osteogenic endothelial progenitor cells*. Eur Heart J, 2010. **31**(23): p. 2909-14.
339. Matsumoto, T., et al., *Circulating endothelial/ skeletal progenitor cells for bone regeneration and healing*. Bone, 2008. **43**(3): p. 434-439.
340. Liu, L., et al., *Oxidized low-density lipoprotein and beta-glycerophosphate synergistically induce endothelial progenitor cell ossification*. Acta Pharmacol Sin, 2011. **32**(12): p. 1491-7.
341. Duff, S.E., et al., *CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications*. FASEB J, 2003. **17**(9): p. 984-92.
342. Kebir, A., et al., *CD146 short isoform increases the proangiogenic potential of endothelial progenitor cells in vitro and in vivo*. Circ Res, 2010. **107**(1): p. 66-75.
343. Kobayashi-Sakamoto, M., E. Isogai, and I. Holen, *Osteoprotegerin induces cytoskeletal reorganization and activates FAK, Src, and ERK signaling in endothelial cells*. European Journal of Haematology, 2010: p. no-no.
344. Haque, T., S. Nakada, and R.C. Hamdy, *A review of FGF18: Its expression, signaling pathways and possible functions during embryogenesis and post-natal development*. Histol Histopathol, 2007. **22**(1): p. 97-105.
345. Kyrtsolis, M.C., et al., *Serum syndecan-1, basic fibroblast growth factor and osteoprotegerin in myeloma patients at diagnosis and during the course of the disease*. Eur J Haematol, 2004. **72**(4): p. 252-8.

346. Fang, M., H.Q. Zhang, and S.B. Xue, [*Apoptosis of HL-60 cells induced by Harringtonine: membrane blebs, nucleus blebs and chromatin condensation*]. Shi Yan Sheng Wu Xue Bao, 1996. **29**(3): p. 221-33.
347. Meikrantz, W. and R. Schlegel, *Suppression of apoptosis by dominant negative mutants of cyclin-dependent protein kinases*. J Biol Chem, 1996. **271**(17): p. 10205-9.
348. Frisch, S.M. and E. Ruoslahti, *Integrins and anoikis*. Curr Opin Cell Biol, 1997. **9**(5): p. 701-6.
349. Ruegg, C. and A. Mariotti, *Vascular integrins: pleiotropic adhesion and signaling molecules in vascular homeostasis and angiogenesis*. Cell Mol Life Sci, 2003. **60**(6): p. 1135-57.
350. Stromblad, S., et al., *Suppression of p53 activity and p21^{WAF1}/CIP1 expression by vascular cell integrin alpha_vbeta₃ during angiogenesis*. J Clin Invest, 1996. **98**(2): p. 426-33.
351. Klemke, R.L., et al., *Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase*. J Cell Biol, 1997. **137**(2): p. 481-92.
352. Renshaw, M.W., X.D. Ren, and M.A. Schwartz, *Growth factor activation of MAP kinase requires cell adhesion*. EMBO J, 1997. **16**(18): p. 5592-9.
353. Théoleyre, S., et al., *Characterization of osteoprotegerin binding to glycosaminoglycans by surface plasmon resonance: Role in the interactions with receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) and RANK*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006. **347**(2): p. 460-467.
354. Borset, M., et al., *Syndecan-1 is targeted to the uropods of polarized myeloma cells where it promotes adhesion and sequesters heparin-binding proteins*. Blood, 2000. **96**(7): p. 2528-36.
355. Friedlander, M., et al., *Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha_v integrins*. Science, 1995. **270**(5241): p. 1500-2.
356. Baud'huin, M., et al., *Factor VIII-von Willebrand factor complex inhibits osteoclastogenesis and controls cell survival*. J Biol Chem, 2009. **284**(46): p. 31704-13.
357. Cencioni, C., M.C. Capogrossi, and M. Napolitano, *The SDF-1/CXCR4 axis in stem cell preconditioning*. Cardiovasc Res, 2012. **94**(3): p. 400-7.
358. Liekens, S., D. Schols, and S. Hatse, *CXCL12-CXCR4 axis in angiogenesis, metastasis and stem cell mobilization*. Curr Pharm Des, 2010. **16**(35): p. 3903-20.

Résumé :

L'Osteoprotégérine est une cytokine soluble qui joue un rôle clé dans le métabolisme osseux et est impliquée dans la réponse immunitaire et l'hématopoïèse. Elle est associée à la dysfonction endothéliale et semble intervenir dans l'angiogenèse. Cette cytokine constituerait en fait, un trait d'union entre le tissu osseux et vasculaire. Son rôle dans la formation de la matrice osseuse est aujourd'hui bien élucidé mais son implication dans la vascularisation reste à établir. L'OPG est rapidement libérée par l'endothélium dans des conditions inflammatoires et est donc en mesure d'intervenir dans le processus de revascularisation initié par les cellules progénitrices endothéliales (PECs). Au cours de cette étude, nous avons tenté de comprendre le rôle joué par cette cytokine dans la néovascularisation induite *in vitro*, par une sous population de PECs appelées ECFCs (*endothelial colony-forming cells*), et sur la formation des néovaisseaux *in vivo*.

Nous avons montré qu'elle agit sur la « souchitude » des cellules CD34+, potentialise les propriétés proangiogènes des ECFCs *in vitro*, et participe au processus angiogénique *in vivo*. L'OPG agit sur les ECFCs via le syndécan-1, inhibe leur adhésion à la matrice extracellulaire, favorise leur migration et leur tubulogénèse via la voie SDF-1/CXCR4, et potentialise leur adhésion à l'endothélium activé. Les effets observés sont corrélés à la libération du SDF-1, une activation des voies de signalisation ERK1/2, Akt et mTOR et à une activation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Par ailleurs, nous avons montré que l'OPG potentialise l'effet proangiogène du FGF-2 *in vivo*. Elle participe également au développement tumoral et à la dissémination des métastases, probablement via l'inhibition de l'apoptose des cellules tumorales, mais aussi par la promotion de l'angiogenèse tumorale.

Abstract :

Osteoprotegerin is a key regulator of bone metabolism involved in the immune response, hematopoiesis, and endothelial dysfunction. It seems to be implicated in angiogenesis and may represent a link between bone and vascular system. Although its role in bone is well recognized, its involvement in vasculature remains to be established.

In inflammatory conditions, OPG is constitutively released by endothelial cells and smooth muscle cells, and therefore is able to participate in blood vessels formation induced by endothelial progenitor cells (EPCs). In this study we attempted to determine, *in vitro* the precise role of OPG in angiogenesis process induced by a subpopulation of EPCs called "endothelial colony-forming cells" (ECFCs), and on neovessel formation *in vivo*.

We found that OPG causes phenotype changes of ECFCs via the activation of different molecular pathways targeting cell clonogenicity, differentiation, proliferation, migration and adhesion. Our results suggest that OPG may interact with ECFCs through its binding to syndecan-1, to induce an anti-adhesive effect and thereby promoting ECFCs migration through a SDF-1/CXCR4 dependant pathway and the ERK1/2, Akt and the mTOR pathways activation. OPG can intervene on the autocrine effect of ECFCs by inducing their adhesion to activated endothelium and their tubulogenesis, and potentiate their paracrine effects by inducing SDF-1 release. Alternatively, it can promote ECFCs survival, probably, in a $\alpha_v\beta_3$ integrin-dependent manner. *In vivo*, OPG potentiates FGF-2 proangiogenic effects and may participate in tumour growth, invasion and metastasis, possibly through inhibition of tumour cell apoptosis but also by promoting tumour angiogenesis.