



HAL
open science

Implication de la chaîne $\alpha 1$ de laminine dans l'angiogenèse physiologique et tumorale

Elmina Mammadova Bach

► **To cite this version:**

Elmina Mammadova Bach. Implication de la chaîne $\alpha 1$ de laminine dans l'angiogenèse physiologique et tumorale. Biologie du développement. Université de Strasbourg, 2012. Français. NNT : 2012STRAJ110 . tel-01089542

HAL Id: tel-01089542

<https://theses.hal.science/tel-01089542v1>

Submitted on 2 Dec 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.

UMR_S682
De l'homéostasie tissulaire
au Cancer et à l'Inflammation
Michèle Kédinger
Directeur
3, avenue Molière, 67200 Strasbourg
<http://u682-inserm.u-strasbg.fr>



Inserm



Institut national
de la santé et de la recherche médicale



Thèse présentée pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline: Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

par **Elmina Mammadova-Bach**

Implication de la chaîne $\alpha 1$ de laminine dans l'angiogenèse physiologique et tumorale

Soutenue publiquement le 26 septembre 2012

Membres du jury

Directeur de thèse
Rapporteur externe
Rapporteur externe
Examineur interne

Dr. Olivier Lefebvre, INSERM U682, Strasbourg
Dr. Catherine Monnot, Collège de France, Paris
Dr. Klaus-Peter Janssen, Universitaet Muenchen, Allemagne
Dr. Monique Dontenwill, UMR CNRS 7213, Strasbourg

Remerciements

Mon intérêt pour la recherche m'a incité à réaliser une thèse de doctorat. J'arrive, au bout de ces quatre ans, à la fin de mon travail. J'en retire une grande expérience professionnelle et humaine. Maintenant que l'aventure touche à sa fin, je tiens à adresser mes remerciements à celles et ceux qui m'ont permis de réaliser ce travail et qui m'ont accompagnée tout au long de ce chemin.

Je tiens à remercier tout d'abord les membres de mon jury de me faire l'honneur de juger mon travail. Mme Catherine Monnot, Mme Monique Dontenwill et Monsieur Klaus-Peter Janssen.

Je remercie chaleureusement Mme Michèle Keding, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. Je tiens également à vous exprimer ma reconnaissance pour votre grande disponibilité et vos précieux conseils.

Je remercie Mme Gertraud Orend de m'avoir donné la possibilité de réaliser ma thèse dans son équipe. Je vous remercie également pour vos suggestions, conseils et discussions scientifiques tout au long de ces années de thèse.

Mes remerciements vont bien évidemment à mon directeur de thèse, le Dr Olivier Lefebvre, pour la confiance dont il m'a fait part en me proposant ce sujet de thèse.

Je remercie Patricia Simon-Assmann pour ses conseils, ses suggestions et sa gentillesse et d'avoir partager ses nombreuses connaissances sur les laminines.

Je te remercie Annick pour ton aide avec les souris et aussi pour ta présence et ta bonne humeur de tous les jours.

Merci à tous les membres de l'équipe et du laboratoire.

Мама, папа благодарю вас, за все что вы делаете для меня

A mes parents

A Thierry

Oscar Wilde : « Il faut toujours viser la lune, car même en cas d'échec on atterrit dans les étoiles »

Ce travail a été financé par Atropatena Technological Equipment Company, l'Ambassade de France, et la Ligue Nationale contre le Cancer

Sommaire

LISTE DES ABBREVIATIONS -----	7
OBJECTIFS DU PROJET DE DOCTORAT -----	9
INTRODUCTION -----	10
I. BIOLOGIE DE LA TUMEUR -----	11
<i>I.1 Caractéristiques communes des tumeurs</i> -----	11
<i>I.2 Microenvironnement tumoral</i> -----	13
I.2.1 Matrice extracellulaire -----	14
I.2.2 Fibroblastes-----	15
II. LAMININE 111, CONSTITUANT DE LA LAME BASALE -----	17
<i>II.1 Lame basale</i> -----	17
II.1.1 Collagène de type IV-----	18
II.1.2 Nidogène-----	19
II.1.3 Perlécan-----	19
II.1.4 Laminines-----	19
II.1.5 Laminine-111 -----	22
II.1.5.1 Structure de la laminine-111 -----	22
II.1.5.2 Gène <i>LAMA1</i> -----	24
II.1.5.3 Expression de la chaîne $\alpha 1$ de laminine -----	25
II.1.5.4 Rôle biologique de la LM111 -----	25
III. ANGIOGENESE -----	29
<i>III.1 Angiogenèse physiologique</i> -----	29
III.1.1 Vasculatisation embryonnaire -----	29
III.1.2 Angiogenèse et expansion du réseau primaire -----	29
III.1.2.1 Angiogenèse par bourgeonnement -----	30
III.1.2.2 Angiogenèse par intussusception -----	36
<i>III.2 Angiogenèse tumorale</i> -----	37
III.2.1 Notion du « switch » angiogénique -----	37
III.2.2 Vaisseaux tumoraux-----	39
<i>III.3 Voie VEGF</i> -----	42
III.3.1 VEGF et ses récepteurs-----	42
III.3.2 VEGFA -----	44
III.3.2.1 Gène <i>VEGFA</i> -----	44
III.3.2.2 Structure protéique et isoformes du VEGFA -----	45
III.3.2.3 Régulation transcriptionnelle du VEGFA -----	46
III.3.2.4 Activités et fonctions physio-pathologiques du VEGFA -----	47

III.4 Voie de signalisation Notch-----	49
III.4.1 Structure des récepteurs et des ligands Notch-----	49
III.4.2 Fragment intracellulaire et transduction du signal-----	50
III.4.3 Les récepteurs et ligands Notch dans le système vasculaire -----	52
III.4.4 Axe VEGF/Dll4 -----	53
III.4.5 Dll4 et l'angiogenèse tumorale -----	54
IV. CANCERS COLORECTAUX -----	56
IV.1 Epidémiologie et incidence-----	56
IV.2 Evaluation et traitements des cancers colorectaux-----	57
IV.3 Les différents types des CCR -----	59
IV.3.1 CCR héréditaires -----	59
IV.3.1.1 Le syndrome FAP-----	59
IV.3.1.2 Les cancers HNPCC ou syndrome de Lynch-----	60
IV.3.2 Les CCR sporadiques-----	60
IV.4 Séquence adéno-carcinome -----	61
IV.5 Concept de cellule souche cancéreuse -----	62
IV.6 Les voies de signalisation impliquées dans le cancer colorectal -----	65
IV.6.1 Le complexe APC/ β -caténine et la voie Wnt -----	65
IV.6.2 Voie des MAPkinases – KRAS-----	66
IV.6.3 Voie TGF- β /SMAD -----	67
IV.6.4 Le gène p53-----	68
IV.7 Modèles murins de cancers colorectaux -----	69
IV.7.1 Modèles génétiques-----	69
IV.7.2 Modèles chimiques-----	70
IV.8 Laminine 111 et le cancer colorectal-----	72
RESULTATS-----	74
PARTIE I. ETUDE DU ROLE DE LA LMα1 DANS LE DEVELOPPEMENT RETINIEN ET L'ANGIOGENESE PHYSIOLOGIQUE-----	75
I. RESUME-----	76
II. PUBLICATION 1 : MUTATIONS IN LAMA1 DISRUPT RETINAL VASCULAR DEVELOPMENT AND INNER LIMITING MEMBRANE FORMATION -----	78
III. DISCUSSION ET PERSPECTIVES -----	95
PARTIE II. ETUDE DE L'IMPACT DE LA LMα1 SUR LA PROGRESSION ET L'ANGIOGENESE TUMORALE-----	98
I. CONTEXTE ET RESUME DU TRAVAIL -----	99

II. PUBLICATION 2 : LAMININ ALPHA 1 PROMOTES ANGIOGENESIS IN COLON CANCER INVOLVING VEGFA AND NOTCH SIGNALING-----	101
III. RESULTATS COMPLEMENTAIRES-----	147
<i>III.1 Etude de l'effet du VEGFA sur l'expression du Dll4 dans des fibroblastes associés aux cancers.</i> -----	147
<i>III.2 Corrélation entre croissance tumorale, CD31, α-SMA et Dll4</i> -----	148
<i>III.3 Recherche de gènes différenciellement exprimés par qRT-PCR</i> -----	150
<i>III.4 Recherche de gènes différenciellement exprimés par Affymetrix</i> -----	152
<i>III.5 Recherche de gènes différenciellement exprimés par RNAseq</i> -----	154
IV. DISCUSSION ET PERSPECTIVES-----	164
V. CONCLUSION GENERALE-----	168
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES -----	 169
 ANNEXES -----	 193
LISTE DES PUBLICATIONS-----	194
REVUE : ROLE OF LAMININS IN PHYSIOLOGICAL AND PATHOLOGICAL ANGIOGENESIS-----	195

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AMPc	Adénosine Monophosphate cyclique
Ang	angiopoietin
AOM	azoxyméthane
AP	Adaptor Protein
APAF-1	Apoptotic peptidase activating factor 1
APC	Adenomatous Polyposis Coli
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	messenger de l'Acide RiboNucléique
ATP	Adénosine TriPhosphate
BACTH	Bacterial Adenylate Cyclase-based Two-Hybrid
Bcl2	B-Cell CLL/Lymphoma 2
Bcl-XL	Bcl-2-associated death promoter
CAF	Cancer Associated Fibroblast
CAP	Catabolite Activator Protein
CCL-2	Chemokine (C-C motif) Ligand 2
CCR	Cancer Colorectal
CDK	Cyclin-Dependent Kinase
CE	Cellule Endothéliale
CHO	Chinese Hamster ovary
CIN	Chromosomic Instability
CK1	Caseine Kinase-1
CML	Cellules Musculaires Lisses
Col IV	collagène IV
Ct	threshold cycle – seuil de détection
DII	Delta Like Ligand
DMBA	3,2 -diméthyl-4-aminobiphényle
DSh	dishevelled
DSS	Dextran sulfate sodium
EGF	Epidermal Growth Factor
Egr-1	early gene response protein
EHS	Engelbreth-Holm-Swarm
ENU	Ethyl-nitroso-urée
FAP	Familial Adenomatous Polyposis
FDA	Food and Drug Administration
FGF	Fibroblast Growth Factor
FSP1	Fibroblast-specific protein 1
GSK3	Glycogen Synthase Kinase-3
GTP	Guanosine 5'-Triphosphate
HGF	Hepatocyte Growth Factor.
HIF	Hypoxia Inducible Factor
HNPCC	Hereditary Non Polyposis Colon Cancer
HSPG	Heparan Sulfate Proteoglycan
IGFBP3	Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 3
IL	interleukine
ILM	Inner Limiting Membrane
IQ	2-amino-3-méthylimidazo[4,5-f]quinoline
KLF	Krüppel-like Factor
LB	lame basale
LM	laminine
LRP5/6	Lipoprotein Receptor-related Protein
LRX	Liver Receptor X
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1

MEC	matrice extracellulaire
MEK	mitogen activated protein kinase kinase
MGP	Matrix Gla Protein
MIN	microsatellite instability
MLH	MutL-homolog
MMP	Matrix Metalloproteinase
MMR	MisMatch Repair
MNNG	N-méthyle-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
MNU	N-méthyle-N-nitroso-urée
MSH	MutS-homolog
NFAT	Nuclear Factor of Activated T cells
NG2	Nerve/Glial antigen 2
NO	Nitric Oxide
NRP	neuropilin
PBGD	Porphobilinogen deaminase
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1
PhIP	2-amino-1-méthyle-6-phenylimidazol pyridine
PI3-kinase	Phosphatidyl Inositol Kinase 3
PIGF	Placental Growth Factor
PMS	postmeiotic segregation
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
RGS5	Regulator of G protein Signaling 5
RTK	Receptor Tyrosine Kinase
SDF-1	Stromal cell – Derived Factor 1
SMA	Smooth Muscle Actin
SMAD	Mothers against decapentaplegic homolog
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
svVEGF	snake venom Vascular Endothelial Growth Factor
TGF	Transforming Growth Factor
TNF	Tumor Necrosis Factor
t-PA	tissue Plasminogen Activator
u-PA	urokinase Plasminogen Activator
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VHL	Von Hippel Lindau
VPF	Vascular Permeability Factor
v-src	viral sarcoma
Wnt	Wingless-type MMTV integration site family member
α	alpha
β	bêta
γ	gamma
Δ	delta

Objectifs du projet de doctorat

L'objectif global de mon projet de doctorat consiste en l'étude de l'impact de la chaîne $\alpha 1$ de laminine dans la progression des tumeurs colorectales afin de chercher les mécanismes contrôlés par la chaîne $\alpha 1$ de laminine, notamment dans l'angiogenèse tumorale. En parallèle, j'ai été impliquée dans l'étude de l'analyse du rôle de la chaîne $\alpha 1$ de laminine dans le développement rétinien et l'angiogenèse. Les résultats de ces études sont présentés dans les publications 1 et 2 :

1) **Mutations in Lama1 Disrupt Retinal Vascular Development and Inner Limiting Membrane Formation.** Malia M. Edwards, Elmina Mammadova-Bach, Fabien Alpy, Annick Klein, Wanda L. Hicks, Michel Roux, Patricia Simon-Assmann, Richard S. Smith, Gertraud Orend, Jiang Wu, Neal S. Peachey, Jürgen K. Naggert, Olivier Lefebvre, and Patsy M. Nishina. 2010. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, pp. 7697–7711.

2) **Laminin alpha 1 promotes angiogenesis in colon cancer involving VEGFA and Notch signaling.** Elmina Mammadova-Bach, Ivo Jivkov, Malia Edwards, Annick Klein, Agnès Méchine-Neuville, Laura Pisarsky, Michele Kedingger, Olivier De Wever, Noona Ambartsumian, Sylvie Robine, Patricia Simon-Assmann, Gertraud Orend and Olivier Lefebvre (manuscript soumis).

INTRODUCTION

I. BIOLOGIE DE LA TUMEUR

Depuis des décennies le cancer est décrit comme la transformation d'une cellule normale vers un phénotype aberrant à la suite de mutations successives de son génome (Vogelstein and Kinzler, 2004). Il est intéressant de voir que les concepts actuels de la biologie tumorale, dérivent d'hypothèses déjà évoquées depuis un siècle. Ainsi, en 1914, Théodore Boveri à partir de ses études sur la fécondation chez l'oursin, a théorisé que le chromosome contenait le support de l'information génétique, alors même que la démonstration et le mécanisme n'en seront démontrés que 50 ans plus tard par Watson et Crick. A cette époque, le concept de gène n'avait pas encore été énoncé, ce qui n'empêcha pas Théodore Boveri de suggérer que la croissance tumorale illimitée pourrait dériver d'une ségrégation anormale chromosomique. Ensuite, il prédit l'existence de points de contrôle du cycle cellulaire, des gènes suppresseurs de tumeurs, des oncogènes, la progression vers un phénotype tumoral par accumulation des modifications génétiques et l'héritage d'une prédisposition au développement des cancers par la transmission de chromosomes aberrants (pour revue voir, Balmain, 2001). La découverte des translocations chromosomiques (Nowell and Hungerford, 1960), des premiers oncogènes (Stéhelin, 1976) et des gènes suppresseurs de tumeurs (Knudson, 1971) a permis d'approuver ces hypothèses et d'établir les bases de la susceptibilité génétique des cancers.

I.1 Caractéristiques communes des tumeurs

Les tumeurs sont issues de la division clonale d'une cellule initiatrice cancéreuse ayant acquis certaines caractéristiques au cours de sa transformation et lui permettant de se diviser à l'infini. Malgré l'existence d'une grande variété de cancers humains, toutes les cellules tumorales partagent des caractéristiques communes (Hanahan and Weinberg, 2000, 2011).

- Autosuffisance en facteurs de croissance

La survie et la prolifération de toute cellule, soit-elle normale ou tumorale, dépend des signaux de croissance. En l'absence de ces signaux, dont les supports sont les facteurs de croissance et les protéines de l'environnement, la cellule meurt. Ces signaux sont transmis à la cellule par l'intermédiaire des récepteurs membranaires. Les cellules tumorales sont capables de produire elles-mêmes leurs signaux de croissance pour ne pas dépendre totalement de leur environnement.

- Perte d'inhibition de croissance

Les cellules tumorales, au cours de leur développement, peuvent continuer à proliférer alors même que des signaux sont émis pour arrêter ce processus. C'est ce qu'on appelle la perte d'inhibition de croissance, qui se produit même si les contacts avec les cellules voisines sont maintenus. Ces contacts font intervenir des molécules d'adhésion cellulaire, comme l'E-cadhérine, par exemple.

- Echappement à l'apoptose

Toutes les cellules normales possèdent des mécanismes de contrôle de la croissance cellulaire par stimulation de l'apoptose. Les cellules tumorales vont échapper à ces mécanismes de contrôle, notamment en sur-exprimant des facteurs anti-apoptotiques (Bcl2, Bcl-XL...).

- Potentiel répliatif illimité

Les cellules normales ont un mécanisme de contrôle, limitant le nombre maximal de division basé sur l'érosion des télomères qui se raccourcissent au fur et à mesure des cycles de divisions, jusqu'à une certaine limite au-delà de laquelle la cellule entre en sénescence ou apoptose. Les cellules tumorales compensent l'érosion des télomères par sur-expression de la télomérase.

- Modification du métabolisme cellulaire

Une cellule normale en condition d'aérobie utilise le glucose comme source de production d'énergie sous forme d'ATP via la phosphorylation oxydative mitochondriale, alors qu'une cellule tumorale même en condition aérobie va utiliser uniquement la glycolyse anaérobique pour produire de l'ATP, dont le rendement énergétique est 20 fois inférieur à la phosphorylation oxydative mitochondriale. En fait, la production d'intermédiaires métaboliques du glucose permettrait la stimulation des voies anaboliques afin de produire des macromolécules et des organelles nécessaires à la division cellulaire.

- Echappement immunitaire

Normalement le système immunitaire surveille l'organisme pour éliminer les cellules anormales dont font parti les cellules tumorales. Les cellules tumorales sont capables de restreindre cette surveillance en exprimant des facteurs immunosuppresseurs comme le TGF- β .

- Induction de l'angiogenèse

Les cellules tumorales ont un métabolisme très actif et nécessitent un apport en oxygène et en nutriments pour pouvoir croître. Cet apport se fait par le processus de formation de nouveaux vaisseaux.

- Invasion des tissus et métastases

Durant le développement de la plupart des cancers, les cellules tumorales vont se détacher de la tumeur afin d'envahir le tissu sain adjacent pour ensuite, via la circulation sanguine ou lymphatique, être à l'origine de la formation de tumeurs secondaires, encore appelées métastases dans d'autres organes.

Ces caractéristiques des cellules tumorales ne représentent qu'une partie du tableau global qui permet de comprendre le processus de croissance des cancers. En effet, la tumeur ne croît pas « toute seule » mais au sein d'un tissu/organe/organisme avec lesquels elle est en relation étroite. La tumeur est en fait elle-même un organe, dans lequel la cellule tumorale est interconnectée avec son microenvironnement.

I.2 Microenvironnement tumoral

Le rôle de l'environnement de la tumeur a été pour la première fois pressenti par Paget en 1889, lorsqu'il émet l'hypothèse du "seed-soil" c'est-à-dire de la graine et du sol. Cette hypothèse, formulée initialement pour expliquer la dissémination sélective du cancer du sein dans différents organes, est actuellement transposable aux tumeurs primaires. Cette hypothèse est restée dormante pendant de longues années, quand la génétique des tumeurs était une question primordiale en oncologie. Mais au début des années 70, la contribution du microenvironnement à la progression tumorale commence à être reconnue par un nombre croissant de chercheurs.

Le microenvironnement tumoral, encore appelé le stroma tumoral est composé d'une matrice extracellulaire, comprenant différentes protéines, des glycoprotéines, des protéoglycanes et des carbohydrates ancrant les différents types cellulaires tels que les fibroblastes, les cellules immunitaires, les cellules endothéliales et les péricytes s'adossant à ces dernières, et ainsi que les cellules cancéreuses. Tous ces éléments cellulaires vont dialoguer entre eux via des différents facteurs de croissance et des cytokines. Ces interactions dynamiques entre les cellules cancéreuses et stromales sont un point clé dans la progression tumorale (**Figure 1**).

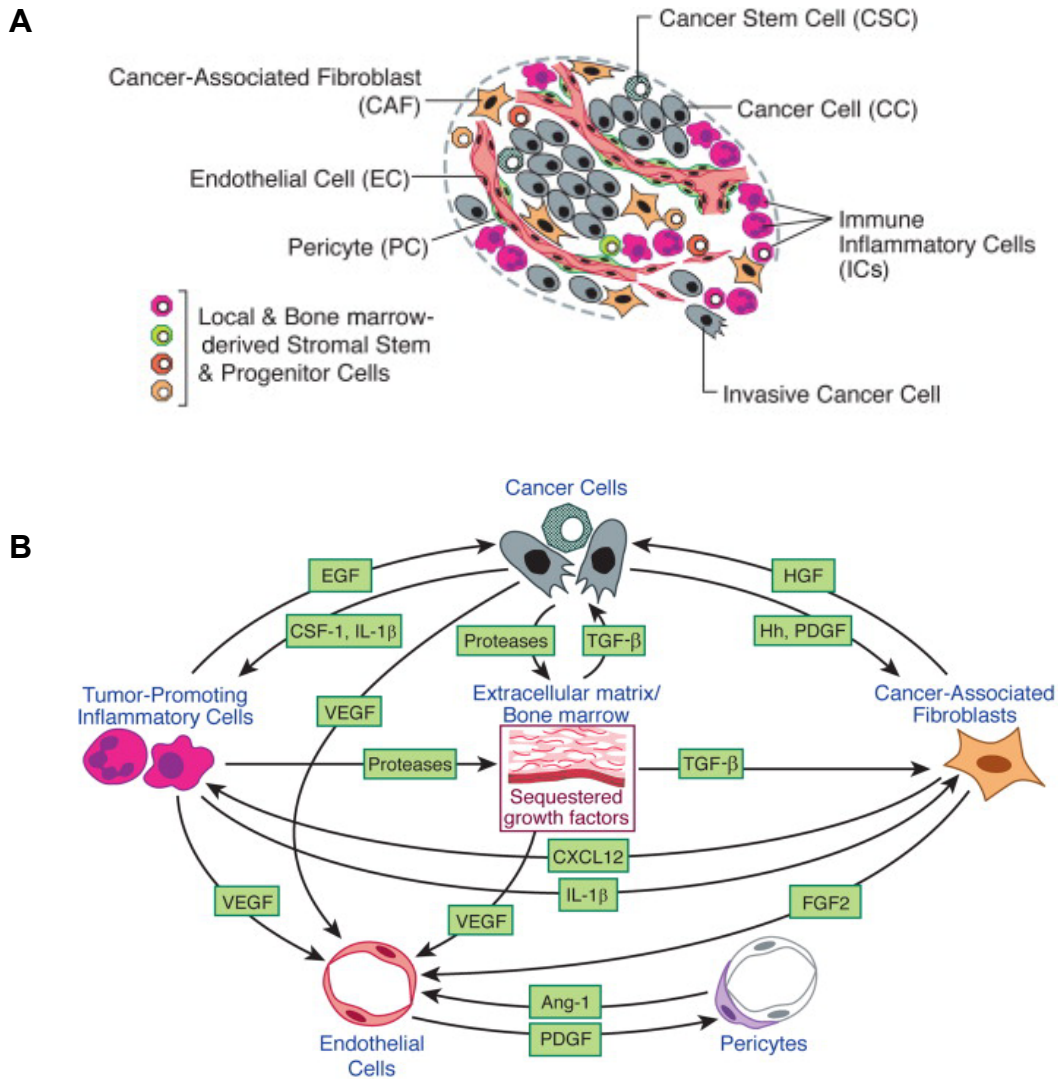


Figure 1 : Présence de types cellulaires distincts **(A)** dans le microenvironnement tumoral et **(B)** les différentes interactions permettant la croissance et la progression tumorale (Hanahan and Weinberg, 2011).

I.2.1 Matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) est une structure, essentielle à la création, au maintien de l'intégrité d'un organe ou d'un tissu. Longtemps, la MEC a été considérée comme une structure passive mais l'identification de récepteurs cellulaires se liant à la MEC, a permis de démontrer son rôle crucial sur la structuration cellulaire, sur différents processus biologiques importants tels que le développement, la prolifération, la différenciation et la migration. La MEC comprend un mélange de protéines dont majoritairement les collagènes, les laminines, les ténascines et la fibronectine ainsi que des protéoglycanes comme le perlécan, le chondroïtine sulfate et l'héparane sulfate, en fournissant un support biomécanique et biophysique aux cellules mais également en étant un réservoir de facteurs

de croissance et de molécules de guidage piégés dans cette structure. Parmi les composants de la MEC, le collagène, la ténascine-c et la fibronectine jouent un rôle majeur dans la progression tumorale (Lu et al., 2012).

I.2.2 Fibroblastes

Les fibroblastes sont des cellules d'origine mésenchymateuse jouant un rôle capital dans le remodelage de la MEC, puisqu'ils sont responsables de la sécrétion des composants de la MEC en parallèle avec les cellules cancéreuses. Dans des conditions physiologiques normales, la prolifération des fibroblastes est peu élevée et liée à une faible capacité métabolique. Cependant lors des processus tels que la cicatrisation et la tumorigenèse, ces fibroblastes appelés « myofibroblastes » ou « activés » vont exprimer un certain nombre de molécules comme des cytokines, des facteurs de croissance, mais également de nouvelles molécules matricielles ainsi que les molécules de remodelage de la MEC. Comme leur nom l'indique, ces fibroblastes expriment un type particulier d'actine que l'on trouve dans les cellules musculaires lisses, l' α -SMA (α -Smooth Muscle Actin) et aussi la vimentine. Il a été montré que les fibroblastes exposés au milieu conditionné des cellules cancéreuses sont capables de se différencier aux myofibroblastes. Il est probable que les cellules tumorales lancent non seulement la conversion des fibroblastes en myofibroblastes du stroma, mais aussi aident à conserver leur phénotype (Shimoda et al., 2010).

La première démonstration de l'impact des fibroblastes sur le développement tumoral a consisté à co-injecter les fibroblastes avec un nombre restreint de cellules cancéreuses chez la souris nude, aboutissant dans tous les cas à l'apparition de tumeurs, alors que la même quantité de cellules tumorales sans les fibroblastes n'aboutit pas à la formation de tumeurs (Picard et al., 1986).

Une deuxième population des fibroblastes tumoraux est les fibroblastes associés au cancer, les CAF (Cancer Associated Fibroblasts) suivant l'acronyme anglais (Tripathi et al., 2012). Les CAF sont très abondants dans le stroma de certaines tumeurs du pancréas, du sein, du côlon et de la prostate (Shimoda et al., 2010). Ils expriment fortement l' α -SMA (α -Smooth Muscle Actin), mais aussi FSP1 (Fibroblast specific protein 1), encore appelé S100A4+. Les CAF sécrètent des taux élevés de chimiokine CXCL-12 (aussi appelée SDF-1) qui recrute des progéniteurs endothéliaux au sein de la tumeur afin de favoriser l'angiogenèse (Orimo et al., 2005). Puis, il a été montré que les CAF contribueraient à la croissance tumorale et à la formation des métastases, grâce à la sécrétion de

nombreuses chimiokines et facteurs de croissance, tels que l'EGF, l'HGF, le TGF- β et le VEGFA (Kalluri and Zeisberg, 2006; O'Connell et al., 2011).

II. LAMININE 111, CONSTITUANT DE LA LAME BASALE

II.1 Lame basale

La lame basale (LB) est définie comme une structure très organisée de la MEC, qui est composée essentiellement par l'assemblage de deux réseaux indépendants : celui des collagènes de type IV et celui des laminines, interconnectés entre eux par l'intermédiaire des nidogènes et du perlécane (**Figure 2**). Elle se présente sous forme d'un feuillet, qui souligne tous les épithéliums, les endothéliums et la plupart des cellules musculaires, adipeuses et nerveuses. Elle joue un rôle de soutien, ainsi qu'un rôle plus actif dans de processus importants pour la vie cellulaire, tels que la morphogenèse, la prolifération, la migration, la différenciation, l'adhésion.

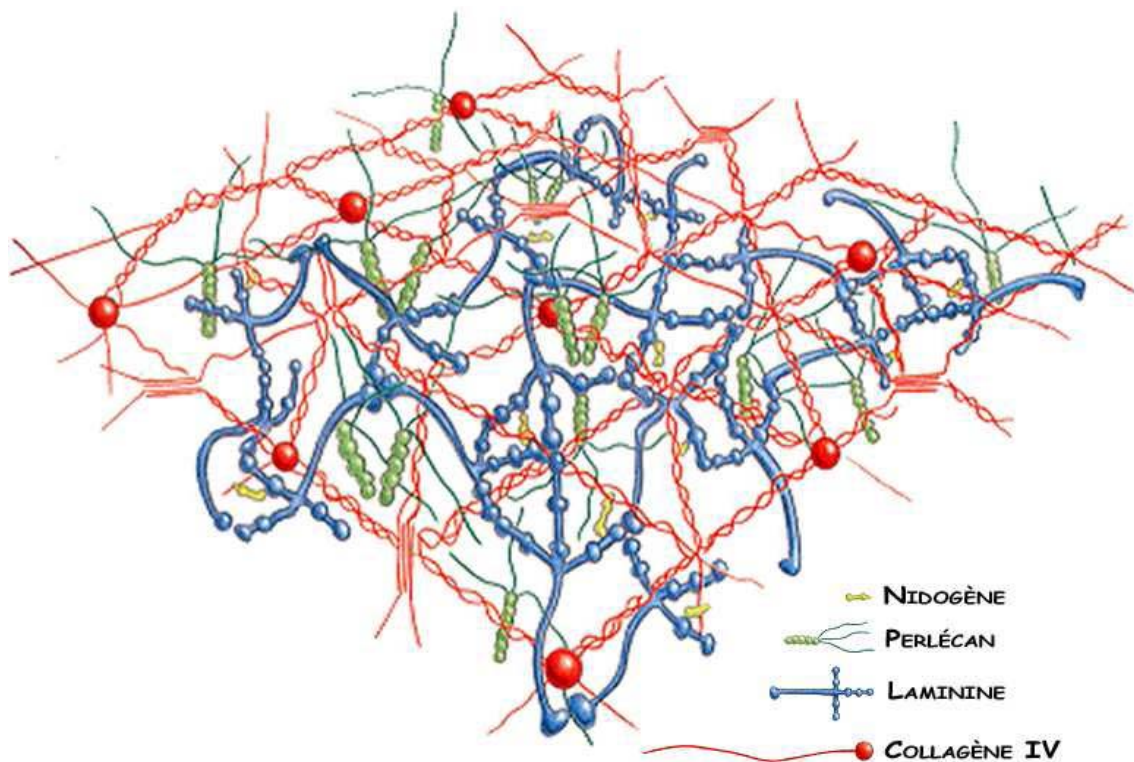


Figure 2 : Structure tridimensionnelle de la LB avec ses composants majeurs.

Les laminines et les collagènes de type IV sont capables de s'auto-assembler en réseaux indépendants. Les nidogènes et le perlécane associent ces deux réseaux (Adapté de Molecular Biology of the Cell, 4th Edition).

Les molécules composant la LB sont sécrétées par les cellules environnantes. En microscopie électronique à transmission, il est possible de distinguer deux couches : la couche plus sombre, la *lamina densa*, qui confère à la LB une stabilité mécanique, et la couche plus claire, la *lamina lucida*, située à proximité du pôle basal des cellules.

II.1.1 Collagène de type IV

Les collagènes sont classés en deux groupes, les collagènes fibrillaires et les collagènes non-fibrillaires. Dans la MEC, les collagènes fibrillaires (de type I et III) sont retrouvés dans des tissus interstitiels sous la LB, tandis que le collagène de type IV, non-fibrillaire est retrouvé dans la LB sous forme d'un réseau qui la stabilise.

Le collagène de type IV se forme par l'enroulement en hélice de 3 chaînes α polypeptidiques. Chez l'homme, il existe 6 chaînes α différentes de collagène IV. L'isoforme la plus majoritaire des lames basales est l'isoforme $\alpha1(IV)_2\text{-}\alpha2(IV)$.

L'assemblage entre les chaînes α , commencé par une interaction dans leur domaine NC1 (la partie COOH-terminale) se poursuit par la mise en place de l'hélice centrale. Le réseau final est tissé entre les trimères à la fois via leur domaine NC1 et leur domaine riche en cystéine au niveau de la partie NH₂-terminale.

Chez la souris le collagène $\alpha1(IV)_2\text{-}\alpha2(IV)$ est le plus répandu lors du développement embryonnaire et son absence conduit à une létalité à 11,5 jours de la vie embryonnaire suite aux défauts d'organisation de la LB. Ces données chez la souris ont permis de mettre fin à une polémique partageant les "collagénistes" et les "laministes" pour déterminer lequel des deux réseaux étaient nécessaires pour initier l'assemblage d'une LB, démontrant que le réseau de collagène n'était pas nécessaire à ce processus (Pöschl et al., 2004). Le collagène IV peut subir des clivages protéolytiques par des métalloprotéases (Egeblad and Werb, 2002) pouvant libérer un fragment NC1 de la partie COOH-terminale, décrit comme ayant un fort effet anti-angiogénique (Tran et al., 2005). Cette activité anti-angiogénique est retrouvée dans des domaines NC1 des collagènes IV, XVIII et XIX (O'Reilly et al., 1997; Petitclerc et al., 2000; Ramont et al., 2007).

II.1.2 Nidogène

Les nidogènes sont des glycoprotéines sulfatées contenant 3 domaines globulaires qui permettent la liaison aux laminines et au collagène IV et apportent ainsi une certaine stabilité à la LB. Il existe 2 membres de la famille du nidogène, le nidogène-1 et le nidogène-2, qui semblent pouvoir se compenser l'un, l'autre. Cependant, si l'ablation conjointe des deux types de nidogène n'empêche pas d'établir l'architecture correcte des tissus durant l'organogenèse, elle engendre une létalité post-natale chez la souris, due à des défauts de la LB dans le poumon et le tissu cardiaque (Bader et al., 2005).

II.1.3 Perlécan

Le perlécan est le protéoglycane le plus abondant de la LB. Il est constitué d'un corps protéique de 450 kDa sur lequel 3 chaînes d'héparane sulfate viennent s'attacher. Parmi les 5 domaines composant le core protéique, le domaine I est celui qui porte les bras d'héparane sulfate.

Le perlécan est exprimé très tôt lors du développement, 40% des souris invalidées pour le gène *Hspg2* codant pour le perlécan meurent à 10,5 jours de la vie embryonnaire d'un défaut de développement cérébral, cardiaque et squelettique; tandis que 60% des souris restantes meurent juste après la naissance avec des défauts cranio-faciaux et/ou des dysplasies du squelette (Arikawa-Hirasawa et al., 1999; Costell et al., 1999). Un fragment issu de la partie COOH-terminale du perlécan, appelé endorépeline a été décrit pour avoir des actions anti-angiogéniques que n'ont pas les molécules natives. A l'inverse, la MMP-3 peut cliver le perlécan et libérer le facteur FGF2 pro-angiogénique que le perlécan natif est capable de séquestrer (Whitelock et al., 1996; Olsen, 1999).

II.1.4 Laminines

Les laminines constituent une famille de protéines composée pour le moment de 15 membres (Durbeej, 2010). Ce sont des hétérotrimères glycosylés résultant d'un assemblage d'une chaîne α , d'une chaîne β , et d'une chaîne γ . Les 5 chaînes α , 4 chaînes β (uniquement 3 chez la souris) et 3 chaînes γ ont été caractérisées: elles sont codées respectivement par des gènes Lama1 à 5, Lamb1 à 4 et Lamc1 à 3. Les laminines sont présentes dans toutes les LB avec une distribution variable en trimère. Cela suggère une grande complexité d'interactions et d'assemblages des différentes chaînes.

Les chaînes $\beta 1$ et $\gamma 1$ sont les plus exprimées et présentent une distribution quasi ubiquitaire, tandis que les chaînes α ont un profil d'expression plus tissu spécifique, apportant généralement la spécificité au trimère. La nomenclature des laminines est liée à la composition en chaînes, par exemple LM111, anciennement appelée LM1, se forme de l'association des chaînes $\alpha 1$, $\beta 1$ et $\gamma 1$ (**Figure 3**).

Il n'y a donc pas une LB mais des lames basales qui diffèrent d'un épithélium à l'autre et d'un organe à l'autre suivant leur variation de composition en différentes isoformes de laminines mais également de collagène IV, que ce soit au cours du développement, à l'âge adulte ou dans des conditions pathologiques. Enfin il faut noter que l'importance des laminines au cours du développement est illustrée par les divers phénotypes des souris invalidées pour ces différents gènes souvent létaux ainsi que l'association de mutations de certaines chaînes de laminine avec des pathologies humaines. Ces données sont résumées dans le **tableau 1**.

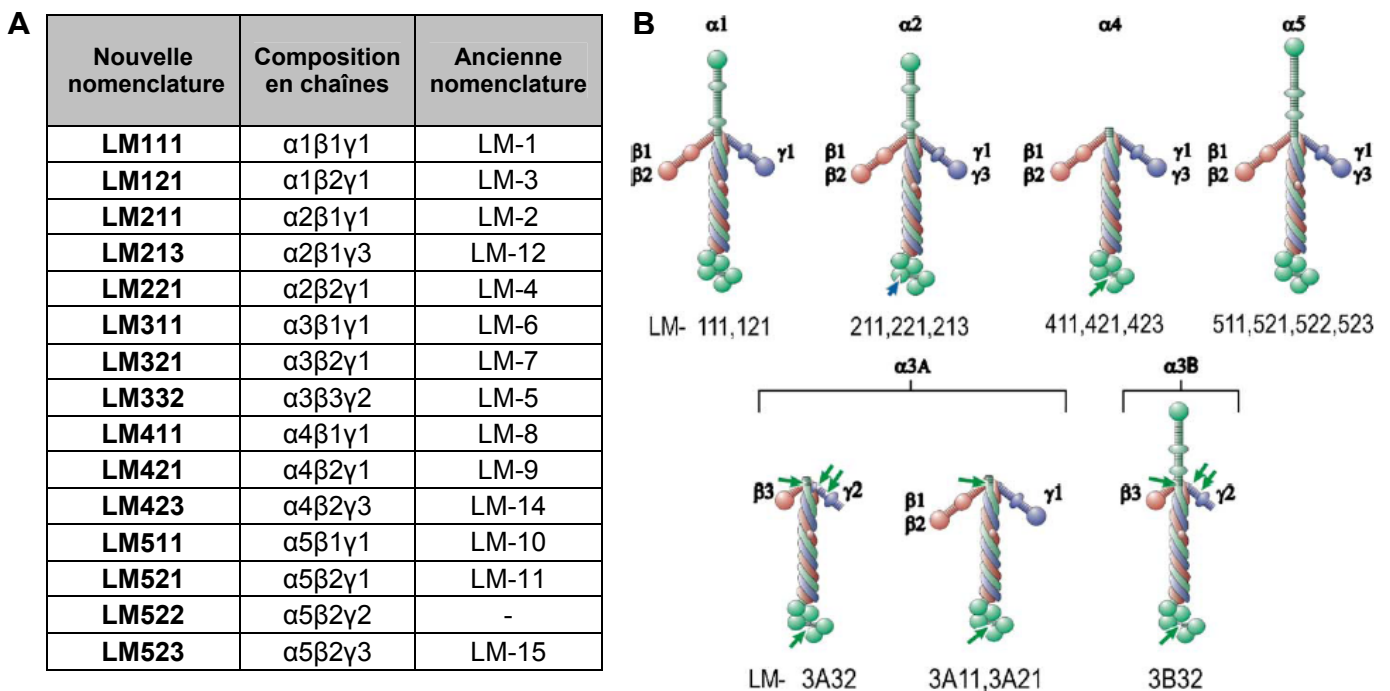


Figure 3 : Présentation de 15 isoformes de laminines (**A**) et ainsi que des différentes configurations (**B**) que peuvent adopter les laminines. Les flèches indiquent les sites de clivages connus par des enzymes donnant des fragments libres (flèche verte) ou restant associés à l'isoforme (Aumailley et al., 2005).

Sous-unité de laminine	Distribution tissulaire	Phénotype souris KO	Pathologie humaine associée
$\alpha 1$	embryon, membrane de Reichert, placenta, rein, glandes mammaires, ovaires, utérus, testicules, rétine, intestin, foie, poumons	létalité embryonnaire précoce	désordres cognitifs
$\alpha 2$	trophoblaste, muscles squelettique et cardiaque, nerfs périphériques, intestin, cerveau	létalité à 5 semaines de vie post-natale, dystrophies musculaires	dystrophie musculaire congénitale
$\alpha 3$	peau et la plupart des LB sous-épithéliales	létalité post-natale. Décollement de l'épiderme	épidermolyse bulleuse jonctionnelle
$\alpha 4$	muscles squelettiques, muscles lisses, endothéliums, moelle osseuse	altérations des jonctions neuromusculaires : mouvements non coordonnés	cardiomyopathie
$\alpha 5$	reins, poumons, vaisseaux sanguins, moelle osseuse, muscles et nerfs, la plupart des LB sous-épithéliales (intestin, poumon...)	létalité embryonnaire vers E16,5. Défauts de placentation, défauts développementaux des poumons, des reins et de l'intestin. Syndactylie et excécéphalie.	non décrite
$\beta 1$	Ubiquitaire	létalité embryonnaire précoce	non décrite
$\beta 2$	glomérules rénaux, vaisseaux sanguins	létalité post-natale. Défauts d'ultrafiltration rénale et anomalie au niveau des jonctions neuromusculaires, dysplasie rétinienne	syndrome de Pierson
$\beta 3$	peau et la plupart des LB sous-épithéliales	/	épidermolyse bulleuse jonctionnelle
$\gamma 1$	Ubiquitaire	létalité embryonnaire précoce	insuffisance ovarienne précoce
$\gamma 2$	peau et la plupart des LB sous-épithéliales	létalité à 5 jours de vie post-natale. Décollement de l'épiderme.	épidermolyse bulleuse jonctionnelle
$\gamma 3$	reins, poumons, appareil génital, nerfs, cerveau, rétine	dysplasie rétinienne	non décrite

Tableau 1 : Récapitulatif de la distribution tissulaire des chaînes de laminine, ainsi que du phénotype des souris invalidées pour la chaîne d'intérêt et l'implication éventuelle de cette chaîne dans une pathologie humaine (Adapté de Rozario and De Simone, 2010; Yurchenco and Patton, 2009). KO: souris "knock-out" (invalidée).

II.1.5 Laminine-111

II.1.5.1 Structure de la laminine-111

La laminine 111 (LM111), la première laminine étudiée a été isolée à partir de la matrice issue d'une tumeur murine EHS (Engelbreth-Holm-Swarm) (Timpl et al., 1979). Elle est composée de trois chaînes $\alpha 1$, $\beta 1$ et $\gamma 1$ et elle présente une structure en croix, formée de quatre bras: un bras long et trois bras courts. Le bras long est formé par une hélice « coiled-coil » qui permet l'assemblage de trois chaînes (**Figure 4**). Les trois bras courts de la croix sont représentés par les parties NH_2 -terminale des chaînes.

Les différents domaines retrouvés sur les chaînes de laminines sont:

- Le domaine LN, situé dans la partie NH_2 -terminale des chaînes α , β et γ , permet l'interaction avec les molécules de laminines voisines afin de former le réseau de polymères. Le domaine LN de la chaîne $\alpha 1$ présente ainsi deux sites de liaison aux intégrines: $\alpha 1\beta 1$ et $\alpha 2\beta 1$.
- Le domaine LEa est riche en résidus cystéine et glycine. Il contient des répétitions du domaine EGF-like (Epidermal Growth Factor like motifs) que l'on retrouve comme son nom l'indique dans l'EGF, également dans la plupart molécules de l'ECM, et dans les récepteurs Notch1 à 4, au niveau des ligands de Notch : Dll1 à 4 et Jagged 1 et 2 (Fleming et al., 1997).
- Le domaine LEb comme le domaine LEa est aussi riche en résidus cystéine et glycine. Ces résidus s'organisent en multiples répétitions rappelant les motifs EGF (EGF-like repeats). Il a été démontré que certains de ces résidus cystéine peuvent former une structure ternaire en se liant au Zn. Pour conséquence le Zn permettrait une meilleure liaison au nidogène-1 et au perlécan lors de l'assemblage de la LB (Ancsin and Kisilevsky, 1996).
- Le domaine L4 comprenant L4a et L4b diffère entre les chaînes de laminine. Le domaine L4b est commun aux chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de laminines et porte une séquence, dont la délétion sur la chaîne $\alpha 2$ entraîne des dystrophies musculaires congénitales (Allamand et al., 1997).
- Les 5 domaines globulaires, appelés les domaines LG sont situés dans la partie COOH -terminale des chaînes α . Leur rôle est d'interagir avec les récepteurs membranaires comme les intégrines $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 7\beta 1$ et encore l' α -dystroglycan.

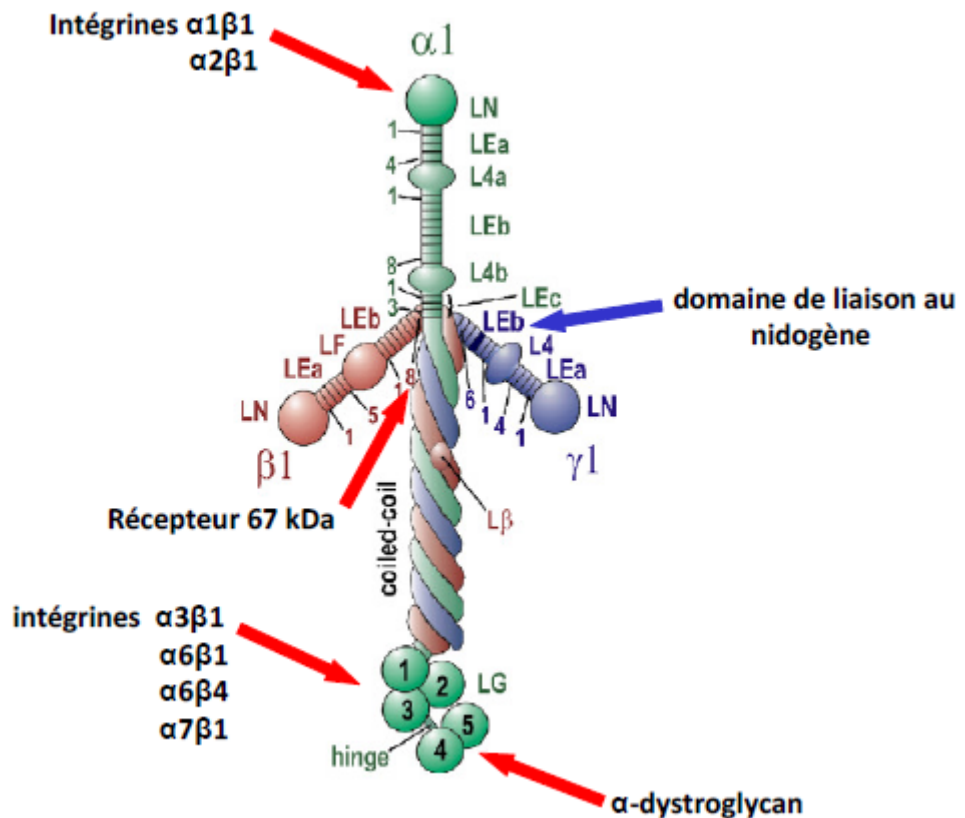


Figure 4 : Structure de la LM111. Les différents domaines sont représentés. Le domaine LEB, spécifique aux chaînes β (ici $\beta 1$) très riche en cystéine et glycine, présente une boucle en dehors de l'hélice. Le domaine LEB sur la chaîne $\gamma 1$, riche en cystéine est le domaine de liaison au nidogène-1 (indiqué par la flèche bleue). Les interactions avec les principaux récepteurs de la chaîne $\alpha 1$ sont représentées avec les flèches rouges (Adapté d'Aumailley et al., 2005).

L'expression de la chaîne $\alpha 1$ est nécessaire pour permettre la sécrétion du trimère LM111 dans le milieu extracellulaire. Ainsi sécrétées, les molécules de laminines s'associent en polymères en interagissant avec les récepteurs présents à la surface de la cellule et avec les autres composants de la MEC (Yurchenco et al., 1997).

Deux différentes études ont permis de modéliser le processus de polymérisation des laminines. La première étude, réalisée à partir de protéines natives purifiées, a montré que la polymérisation des laminines permet la formation d'un réseau et que l'interaction s'effectue entre domaines LN d'une chaîne à l'autre selon plusieurs possibilités, telles que $\alpha \leftrightarrow \beta$, $\alpha \leftrightarrow \gamma$ et $\gamma \leftrightarrow \beta$ (Cheng et al., 1997), **Figure 5.**

La deuxième étude, réalisée par l'approche Biacore à partir de domaines LN purifiés, a confirmé la possibilité de ces interactions, mais a rajouté également une possibilité d'interaction entre les

domaines LN de deux chaînes identiques $\alpha \leftrightarrow \alpha$ mais également entre chaînes α différentes, ce qui augmente la complexité structurale de la LB (Odenthal et al., 2004), (**Figure 5**).

Interaction des laminines via domaines LN

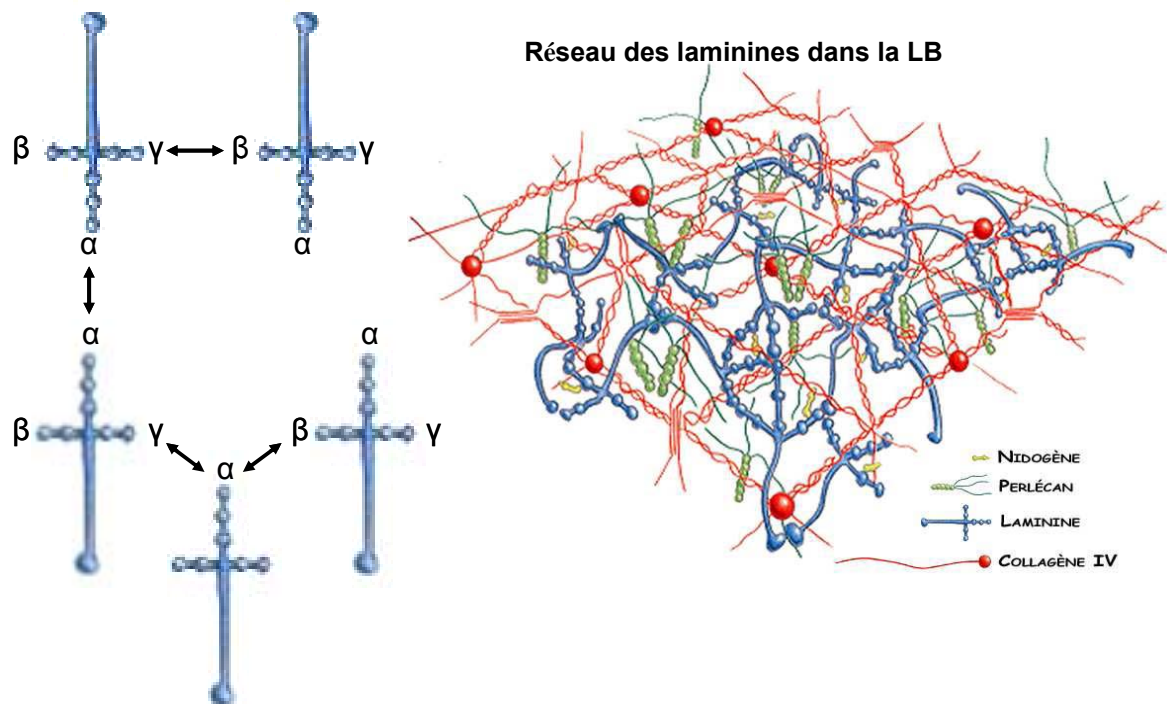


Figure 5 : Polymérisation des laminines. Le processus de polymérisation des laminines s'effectue par les interactions des domaines LN (partie NH_2) de type α - α , α - β , α - γ , γ - β des laminines. Ces interactions aboutissent à la formation du réseau des laminines dans la LB (Adapté de Cheng et al., 1997; Odenthal et al., 2004 et de Molecular Biology of the Cell, 4th Edition).

II.1.5.2 Gène *Lama1*

Le gène *Lama1* humain est localisé sur le chromosome 18p11.3.1. Chez la souris, ce gène se trouve sur le chromosome 17. Les études réalisées au laboratoire sur sa régulation ont montré que les régions proximales du promoteur possèdent des séquences conservées entre l'homme et la souris et ne contiennent pas de boîtes TATA et CCAAT. Le promoteur du gène *Lama1* murin possède un motif très riche en résidus GC, permettant la liaison de facteurs de transcription, tels que Sp1 et SP3 (Niimi et al., 2003). Ce motif est crucial pour l'activité transcriptionnelle du promoteur. Cette région inclut également un élément de fixation pour les facteurs Krüppel-like, notamment KLF4 et KLF5 : KLF5 le régule d'une façon positive, tandis que KLF4 d'une façon négative (Piccinni et al., 2004). Ces facteurs sont retrouvés également comme régulant le gène *Lama1* humain (Niimi et al., 2006). D'autres régions régulatrices ont été déterminées dans le gène *Lama1* murin, notamment une région enhancer

situé à environ -3300 bp du site d'initiation de la transcription et conférant une spécificité d'expression au niveau endodermique pariétal via la liaison des facteurs Sox7 et Sox17 (Niimi et al., 2004).

II.1.5.3 Expression de la chaîne $\alpha 1$ de laminine

La chaîne de $\alpha 1$ de laminine (LM $\alpha 1$) est la première exprimée des chaînes α , apparaissant lors du développement chez la souris, dès le stade 16 cellules (Cooper and MacQueen, 1983).

La LM $\alpha 1$ est très abondante au cours du développement embryonnaire. Pratiquement tous les organes lors de leur développement vont exprimer à un moment donné cette chaîne de laminine (Sasaki et al., 2002). Chez l'adulte, la LM $\alpha 1$ est exprimée dans quelques organes (le rein, le testicule, l'ovaire, la pie-mère, la prostate, la vessie, la glande mammaire et l'œil), (Falk et al., 1999). Dans certains organes, elle est très peu exprimée, comme par exemple, la base des cryptes de l'intestin grêle et du côlon proximal (Simo et al., 1991). Dans les lames basales vasculaires, on trouve abondamment les chaînes $\alpha 4$ et $\alpha 5$ de laminine, la LM $\alpha 1$ n'est pas du tout exprimée, excepté au niveau de la LB du parenchyme cérébral entourant les vaisseaux sanguins cérébraux. Cette LB participe à la barrière hémato-encéphalique du cerveau au même titre que la LB sous-endothéliale (Agrawal et al., 2006; Wu et al., 2009).

II.1.5.4 Rôle biologique de la LM111

- LM111 dans le développement embryonnaire

Des travaux réalisés au laboratoire ont montré que l'inactivation de la LM $\alpha 1$ empêche la formation d'une LB extra-embryonnaire, appelée la membrane de Reichert, ce qui entraîne une létalité au stade 7,5 jours du développement (Alpy et al., 2005). L'analyse de ces souris LM $\alpha 1^{-/-}$ a révélé une absence de différenciation au niveau des endodermes pariétal et viscéral et une augmentation de l'apoptose aussi bien dans l'embryon que dans les annexes embryonnaires, ceci est en accord avec les résultats décrits par une autre équipe (Miner et al., 2004). Une délétion des domaines globulaires LG4 et LG5 de LM $\alpha 1$ aboutit également à une létalité à 6,5 jours de développement s'accompagnant d'une non polarisation des cellules épiblastiques (Schéele et al., 2005).

Les souris invalidées pour les LM β 1 et LM γ 1 présentent également des défauts de formation de la membrane de Reichert et de la LB embryonnaire ce qui entraîne une mort encore plus précoce que l'invalidation de la chaîne α 1, à 5,5 jours de développement (Smyth et al., 1999; Miner et al., 2004).

- LM111 et sa fonction rétinienne

Dans l'œil la LM α 1 est retrouvée au niveau de trois LB : la membrane limitante interne de la rétine (ILM, inner limiting membrane) séparant celle-ci de l'humeur vitrée, la membrane rétinienne de Bruch (**Figure 6A**) et une LB entourant le cristallin.

Les premiers travaux démontrant son rôle dans le fonctionnement de la rétine, ont été réalisés chez le poisson-zèbre. L'inhibition du gène *Lama1* par injection des morpholinos oligonucléotides chez le poisson zèbre entraîne de graves défauts au niveau de l'humeur vitrée avec une réduction apparente de la taille des yeux (Zinkevich et al., 2006). Une autre étude a montré que la mutation du gène *Lama1* chez le poisson-zèbre aboutit à l'altération du développement rétinien, s'accompagnant d'une dysplasie de la cornée et d'une désorganisation du réseau hyaloïde rétinien (réseau vasculaire précoce, fournissant des éléments nutritifs pour la rétino-genèse dans des phases précoces du développement, **Figure 6B**), (Semina et al., 2006). Dès le 10^{ème} jour de la post-fécondation chez le poisson-zèbre, la mutation au niveau du gène *Lama1* entraîne une dégénérescence de l'humeur vitrée, des défauts de cellules ganglionnaires et cellules des vaisseaux hyaloïdes, ainsi que la réduction de l'axe corporel. Ces mutants présentent également des perturbations de l'ILM avec le raccourcissement de l'extrémité des cellules de Müller (cellules gliales de la rétine possédant des projections qui sont normalement aux contacts de l'ILM, **Figure 6A**). Bien que ces études indiquent l'importance de la LM α 1 dans le développement rétinien chez le poisson-zèbre, le rôle de la LM α 1 dans la rétine chez l'adulte n'a pas pu être déterminé suite à la létalité embryonnaire.

Une étude réalisée au laboratoire a pu clairement démontrer que la présence de la LM α 1 était indispensable à la formation de l'ILM de la rétine chez la souris (ce travail figure dans la partie publication 1).

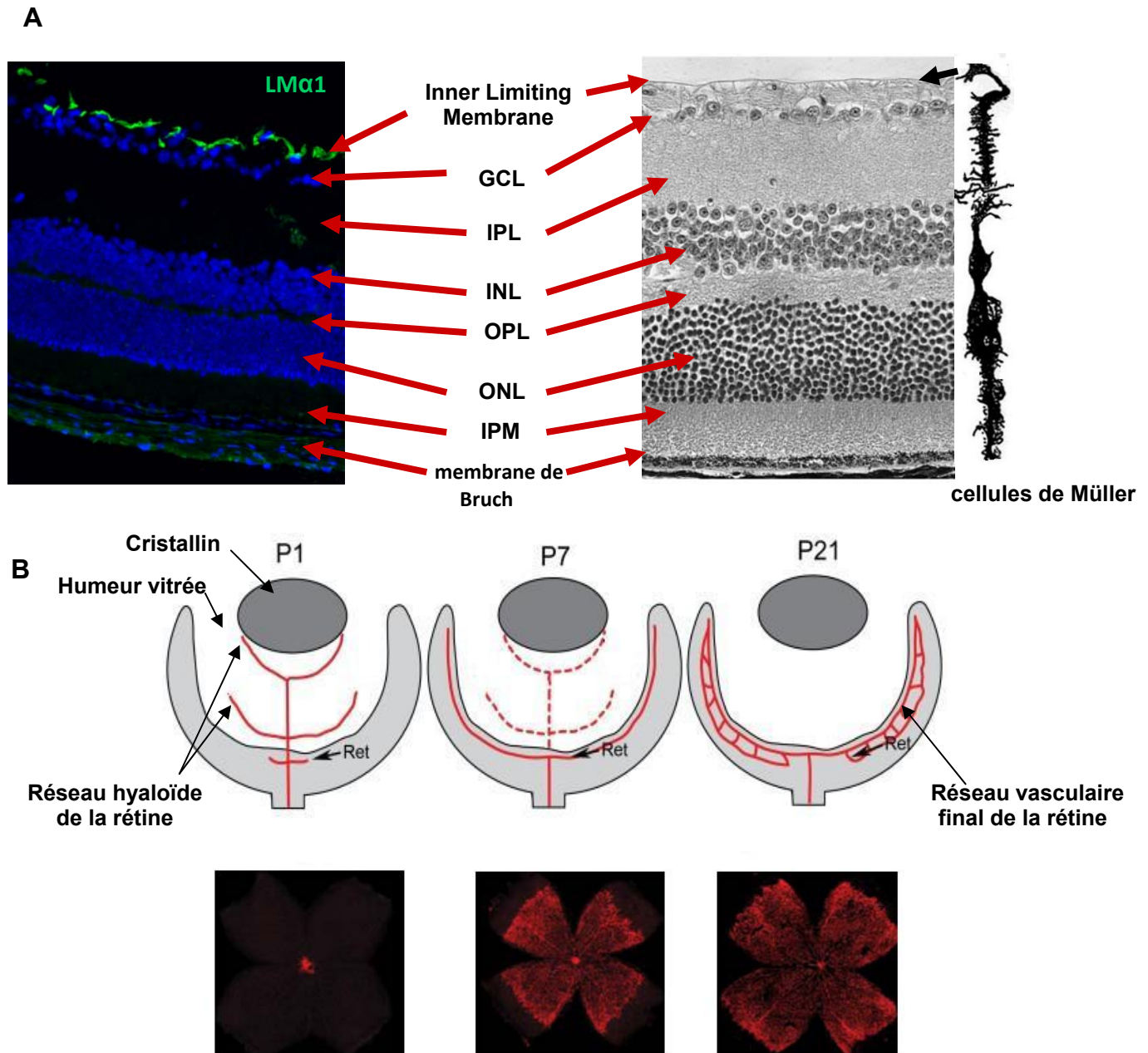


Figure 6 : Structure de la rétine et l'expression de la LM α 1 (A). La rétine est organisée en une structure alternée de différentes couches cellulaires. **GCL** : ganglion cell layer - la couche contient des cellules ganglionnaires, **INL** : inner nuclear layer, la couche nucléaire interne comporte les corps des cellules horizontales, des cellules bipolaires, des cellules amacriques et des cellules de Müller. **IPL** : inner plexiform layer, cette couche contient les synapses qui relient les cellules bipolaires, amacriques et ganglionnaires. **OPL** : outer plexiform layer, la couche plexiforme externe comporte les synapses qui relient les photorécepteurs aux dendrites des cellules bipolaires et horizontales. **ONL** : outer nuclear layer, la couche nucléaire externe contient les corps cellulaires des photorécepteurs. **IPM** : interphotoreceptor matrix. Les cellules Müller sont les cellules gliales de la rétine, traversant celle-ci de part en part, avec des projections qui sont aux contacts de l'ILM. La chaîne α 1 de laminine est présente dans l'ILM et la membrane de Bruch, la dernière se trouve au contact de la choroïde.

Développement du réseau vasculaire rétinien (B). La rétine à la naissance, possède deux réseaux vasculaires, un réseau précoce hyaloïde embryonnaire se formant autour du cristallin et occupant tout l'espace oculaire, réseau qui régresse au fur et à mesure que le réseau mature progresse (entre P1 et P21, jours postnataux). Le réseau mature forme un plexus vasculaire superficiel qui s'étend afin d'atteindre les périphéries de la rétine (Adapté de Stahl et al., 2010 et Edwards et al., 2012).

- LM111 et la différenciation

Différentes expériences de cultures cellulaires ont pu montrer que la LM111 est impliquée dans la différenciation de différents types de cellules. Le blocage de la LM111 avec un anticorps contre la LM111 en co-culture d'endoderme intestinal sur des fibroblastes entraîne une inhibition de la lactase, qui est un marqueur précoce de la différenciation intestinale (Simo et al., 1992). Dans la lignée cellulaire intestinale Caco-2, la LM111 est capable de moduler l'expression du facteur de transcription Cdx-2 et d'induire une différenciation fonctionnelle de ces cellules se traduisant par un taux élevé de saccharase-isomaltase, considérée comme un marqueur final de différenciation entérocytaire (Turck et al., 2004). Ce phénomène s'accompagne de la délocalisation d'une protéine nucléaire, la nucléoline, d'une manière dépendante de l'intégrine $\beta 1$ (Turck et al., 2006). Les cellules épithéliales mammaires cultivées sur la LM111 subissent également une accélération de la différenciation, attestée par l'induction de l'expression de la protéine du lait, la β -caséine. De même, les cellules neuro-épithéliales de la rétine de poulet lorsqu'elles sont cultivées sur la LM111 se différencient en neurones, tandis que sur la LM211, elles sont conduites à la mort cellulaire (Frade et al., 1996). En culture, la LM111 stimule également la différenciation des cellules précurseurs pancréatiques aux cellules β (Jiang et al., 1999). Un phénomène intéressant a été observé, lors d'une expérience de culture de cellules Y79 de rétinoblastome déposées sur la LM111, où ces cellules s'attachent très fortement à la LM111, ce qui crée un environnement favorable à la morphogenèse cellulaire, conduisant à une différenciation avec projection d'axones (Campbell and Chader, 1988).

III. ANGIOGENESE

L'angiogenèse est le terme qui définit la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir d'un réseau vasculaire préexistant. Ce phénomène est indispensable au cours de nombreux processus physiologiques tels que le développement embryonnaire, l'implantation du placenta, mais aussi pathologiques tels que la croissance tumorale ou le développement des métastases.

III.1 Angiogenèse physiologique

III.1.1 Vascularisation embryonnaire

Au cours des premières étapes du développement embryonnaire, en absence de réseaux vasculaires, les nutriments et l'oxygène indispensables à la croissance cellulaire parviennent aux tissus par diffusion simple (Noden, 1989). Puis, très rapidement, un réseau de vaisseaux sanguins se met en place par deux processus : la vasculogenèse et l'angiogenèse.

La vasculogenèse est la formation du réseau vasculaire primitif durant le développement embryonnaire, à partir de cellules précurseurs, appelées hémangioblastes et angioblastes dérivant du mésoderme postérieur et latéral et qui sont à l'origine des cellules endothéliales (Risau, 1997). Les facteurs de croissance tels que FGF-2, VEGFA (Cf. partie III.3) et TGF- β sont impliqués dans l'émergence de ces précurseurs endothéliaux. La vasculogenèse est principalement limitée aux étapes précoces du développement embryonnaire. Cependant chez l'adulte, la vasculogenèse peut être réactivée par le recrutement de progéniteurs endothéliaux des cellules de la moelle osseuse (Carmeliet, 2000a, Luttun et al., 2002; Rafii et al., 2002).

III.1.2 Angiogenèse et expansion du réseau primaire

L'angiogenèse, qui fait suite à la vasculogenèse, permet l'extension et le remodelage du plexus primitif afin d'établir un système vasculaire fonctionnel et mature. Deux types d'angiogenèse peuvent se produire lors de ce processus: l'angiogenèse par bourgeonnement et l'angiogenèse par intussusception (Risau, 1997; Carmeliet, 2000b, Carmeliet and Jain, 2000, 2011).

Chez l'adulte, l'angiogenèse intervient régulièrement. C'est par exemple le cas au niveau de l'appareil reproducteur féminin lors des cycles menstruels ou de la gestation, mais également au cours de la réparation et la cicatrisation tissulaire ainsi que dans certaines pathologies, notamment des maladies inflammatoires telles que les arthrites rhumatoïdes, le psoriasis, les rétinopathies et également le cancer (Carmeliet and Jain, 2000, 2011).

III.1.2.1 Angiogenèse par bourgeonnement

L'angiogenèse par bourgeonnement est le mécanisme d'angiogenèse le mieux décrit. Elle se caractérise par plusieurs étapes (**Figure 7**) qui sont sous la dépendance de facteurs pro-angiogéniques et anti-angiogéniques (Papetti and Herman, 2002).

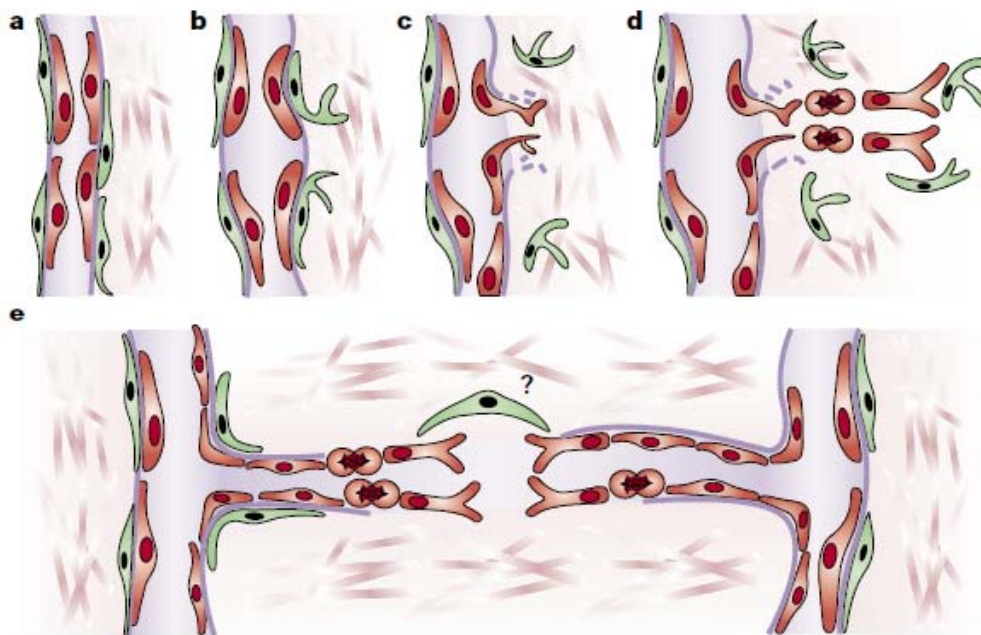


Figure 7 : L'angiogenèse par bourgeonnement. Elle est caractérisée par quatre phases: la phase d'initiation (**b**), définie par une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité vasculaire. Suit la phase de migration (**c**) des cellules endothéliales (CE) induite par différents facteurs chimiotactiques. Pour que cette migration cellulaire soit possible, la LB doit avoir été dégradée. La phase de différenciation (**d**) comprend l'organisation des CE en un vaisseau. La dernière étape est une étape de maturation (**e**). Elle correspond au recrutement des cellules murales qui stabilisent les vaisseaux naissants, et au dépôt de la LB et la MEC. Les cellules murales peuvent probablement être impliquées dans la fusion de deux vaisseaux. (Bergers and Benjamin, 2003).

- Vasodilatation, perméabilité vasculaire et dégradation de la MEC

La vasodilatation est prérequis à la migration des cellules endothéliales (CE) et au bourgeonnement des vaisseaux. Elle est dépendante du monoxyde d'azote (NO), qui induit fortement la transcription du gène VEGFA. Celui-ci, stimulé par l'hypoxie, augmente ensuite la perméabilité vasculaire en relocalisant les molécules d'adhésion intercellulaires PECAM-1 et VE-cadhérine et en altérant la structure des membranes cellulaires (Eliceiri and Cheresh, 2001). Ceci permet une extravasation de protéines plasmatiques favorisant la survie des CE, et leur migration à travers la paroi vasculaire. La perméabilité des vaisseaux sanguins est régulée par l'action des angiopoïétines 1 et 2 (Ang-1 et Ang-2), qui se lient au même récepteur Tie2, mais ces deux facteurs possèdent des fonctions antagonistes. L'Ang-1 est impliquée dans l'inhibition de la perméabilité vasculaire en resserrant les jonctions intercellulaires (Thurston et al., 2000; Thomas and Augustin, 2009). Au contraire, l'Ang-2 induit le détachement des cellules musculaires lisses et des péricytes (Cf. pages 33, 34). Lors du détachement des péricytes de la paroi des vaisseaux, les récepteurs présents à la surface des CE deviennent accessibles au VEGF, lequel induit la synthèse de protéases, notamment les métalloprotéases (MMPs), capables de dégrader la MEC et la LB. Plus d'une vingtaine de sous-types de MMPs ont été identifiées et jouent un rôle important dans la phase précoce de l'angiogenèse (Nelson et al., 2000; Fink and Boratyński, 2012).

- Prolifération et migration des cellules endothéliales

L'action des protéases permet la création d'un espace libre pour la migration des cellules endothéliales qui prolifèrent vers les stimuli angiogéniques. Les CE commencent à former de fins prolongements cytoplasmiques et les CE migrantes s'allongent et s'alignent les unes avec les autres afin de former un bourgeon capillaire.

Les VEGF et leurs récepteurs sont largement impliqués au cours de ce phénomène (Ferrara, 1999; Lohela et al., 2009). L'Ang-1 paraît impliquée dans le chimiotactisme des CE potentialisant le VEGF. Les membres de la famille des FGF et PDGF stimulent aussi la croissance endothéliale et recrutent des cellules mésenchymateuses et/ou des cellules inflammatoires qui, à leur tour, secrètent des facteurs angiogéniques (Hirschi et al., 1999; Carmeliet, 2000a). Les molécules impliquées dans les interactions cellule-cellule ou cellule-matrice, comme les intégrines $\alpha\beta3$ ou $\alpha\beta5$, ou cellule-cellule comme PECAM-1 et VE-cadhérine (Brooks et al., 1994; Couffinhal et al., 2001; Avraamides et al.,

2008) et les éphrines jouent un rôle majeur dans la prolifération et la migration des CE (Wilkinson, 2000). Des membres de la superfamille du TGF- β comme l'activine A ou le TNF α sont des cytokines qui, dans différents modèles, inhibent ou activent la croissance endothéliale (Pepper, 1997). Enfin, des chémokines comme la MCP-1 stimulent la prolifération des CE (Belperio et al., 2000).

-Structuration des vaisseaux et formation du lumen

Le réseau vasculaire doit être structuré et ordonné pour pouvoir s'étendre et se propager dans les tissus non vascularisés. L'angiogenèse par bourgeonnement permet cette propagation en créant des nouveaux vaisseaux en réponse à différents facteurs pro-angiogéniques. Dans l'angiogenèse par bourgeonnement, les néovaisseaux vont créer des ramifications, appelées « branching ». Au niveau du bourgeonnement, on trouve deux types de cellules : la cellule de tête ou « tip cell » et la/les cellules qui la suivent ou « stalk cell » (**Figure 8**). La « tip cell », correspond à la cellule qui migre, prolifère et peut s'étendre et se rétracter en créant des filopodes dans différentes directions, de manière à sonder son microenvironnement. La « stalk cell » se positionne derrière la « tip cell », allonge la ramification, prolifère, se fixe à la MEC et forme un lumen permettant un maintien de la connexion au réseau vasculaire.

La sélection du devenir cellulaire en « tip » ou « stalk » est un mécanisme finement régulé par la voie de signalisation NOTCH (Cf. partie III.4).

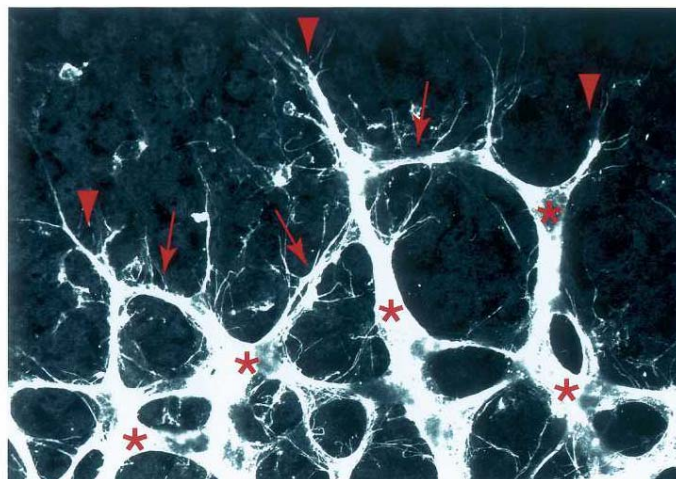


Figure 8 : L'image des vaisseaux sanguins de la rétine post-natale marquée avec l'Isolectine. Les cellules « tip », qui sont en tête, forment des filopodes (indiquées par des flèches) et les cellules « stalk », c'est-à-dire les cellules qui suivent les cellules « tip » (indiquées par des astérisques) se positionnent derrière les cellules « tip » (Roca and Adams, 2007).

Après la phase de prolifération et migration, les CE commencent à s'allonger pour former des cordes de cellules afin de s'assembler en tube au sein duquel se forme la lumière des vaisseaux. Le VEGFA, en association avec l'Ang-1 participe à la formation et à l'augmentation du diamètre luminal. Les intégrines, molécules impliquées dans l'interaction cellule/matrice ($\alpha\beta3$ ou $\alpha5\beta1$) participent à la formation de la lumière (Ribatti et al., 2011). En revanche, certains facteurs endogènes inhibent la formation de la lumière comme la thrombospondine-1, l'angiostatine et l'endostatine (Tolsma et al., 1997; Bloch et al., 2000; Patan, 2000).

-Stabilisation de nouveaux vaisseaux

Une fois la lumière vasculaire est créée, les nouveaux vaisseaux entreront en phase de maturation au cours de laquelle ils vont compléter l'organisation du réseau et la stabilisation de la structure (Jain, 2003). Les nouveaux vaisseaux sont stabilisés par le recrutement des cellules murales et l'élaboration de la LB et de la MEC (communes aux cellules CE et aux cellules murales). Il existe deux grandes classes de cellules murales : les péricytes et les cellules musculaires lisses (CML). Les péricytes entourent les vaisseaux de petit calibre (capillaires), tandis que les CML sont recrutées aux vaisseaux de moyen (artérioles, veinules) et gros calibre (artères, veines), (**Figure 9**).

Le développement et le recrutement des cellules murales impliquent des nombreuses molécules. Le TGF- β 1 permet la différenciation des cellules mésenchymateuses soit en péricytes, soit en CML (Hirschi et al., 1999). Chez la souris, l'inactivation du gène TGF- β 1 entraîne des dilatations et une irrégularité au niveau des micro-vaisseaux (Lebrin et al., 2005). L'endogline, un corécepteur du TGF- β 1 est également impliqué dans la maturation des vaisseaux, car les souris déficientes pour ce corécepteur présentent une diminution du nombre des CML (Li et al., 1999, Bernabeu et al., 2007).

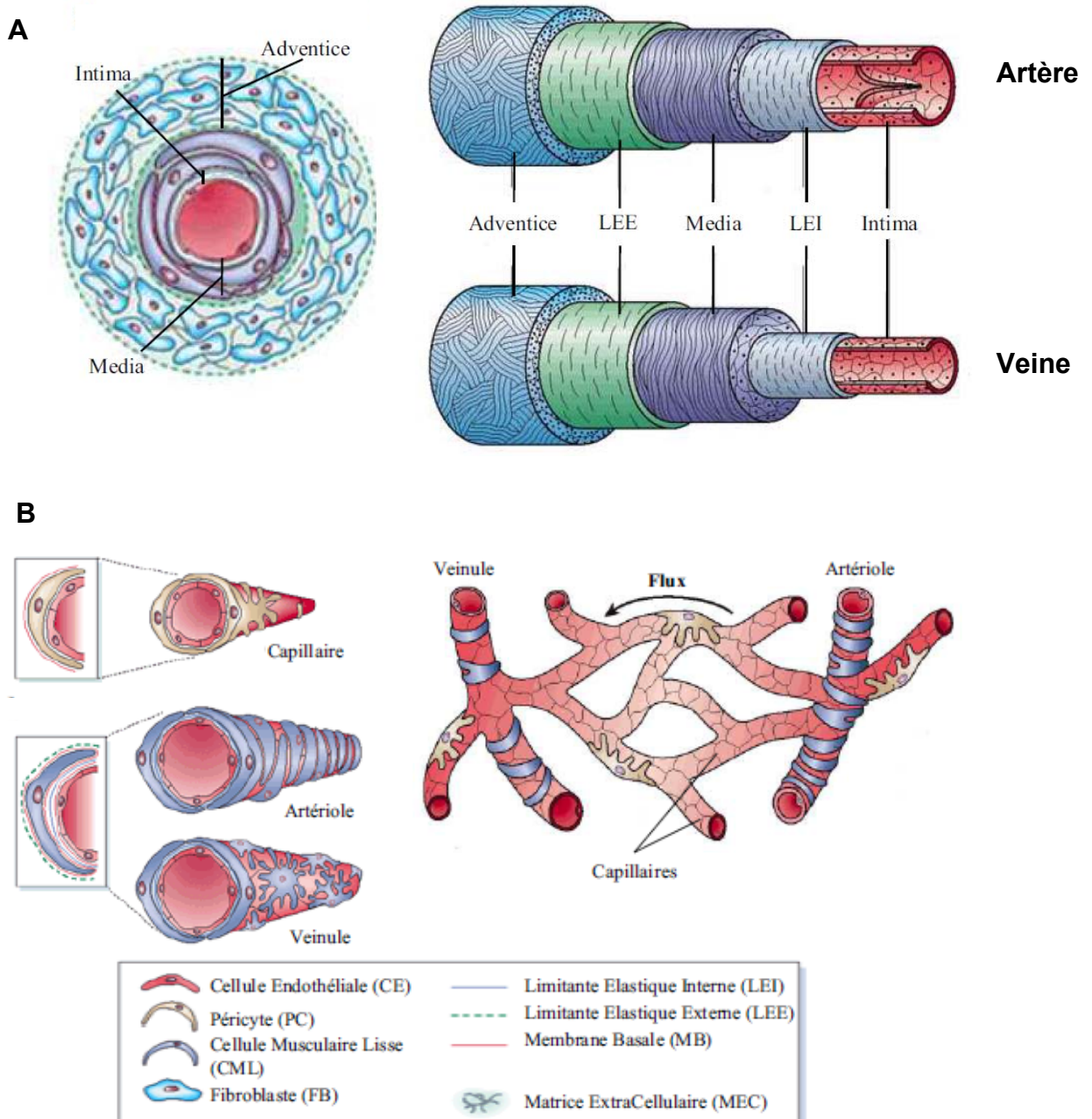
Les CE sécrètent le PDGFB et les péricytes expriment le PDGFR- β (Betsholtz, 2004; Betsholtz et al., 2005), ce qui suggère un mode paracrine de l'interaction entre ces deux types de cellules. Le PDGFB en réponse à une stimulation par le VEGFA, induit le recrutement, la prolifération et la migration des cellules murales (Hellström et al., 2001).

Les péricytes expriment un protéoglycane appelé le NG2. Le NG2 secrété peut promouvoir la motilité des CE au cours des étapes précoces de l'angiogenèse en formant le complexe avec la galectine-3 et l'intégrine $\alpha3\beta1$ à la surface des CE (Fukushi et al., 2004).

Les angiopoïétines jouent également un rôle essentiel dans l'expansion, le remodelage du réseau vasculaire et le recrutement des péricytes (Thurston, 2003). L'Ang-1 est produite par les péricytes et les CML active le récepteur Tie2 dans des CE et maximise les interactions entre les CE et les péricytes (Maisonpierre et al., 1997; Sundberg et al., 2002). Les souris déficientes pour l'Ang-1 ou son récepteur Tie-2 meurent au cours du développement embryonnaire avec les défauts vasculaires similaires chez les souris déficientes pour le PDGFB, c'est à dire des dilatations des vaisseaux et la présence de micro anévrysmes (Jones et al., 2001). Chez les souris déficientes pour le PDGFB, l'administration d'Ang-1 recombinant est capable de rétablir la structure du réseau vasculaire rétinien (Uemura et al., 2002). L'analyse ultra structurale des vaisseaux chez les souris invalidées pour le gène *Tie-2* a montré que leurs vaisseaux sont dépourvus de cellules murales (Patan, 1998).

Les membres de la famille des éphrines jouent aussi un rôle important dans le remodelage vasculaire. Les mutations de l'EphrineB2 et EphB4 conduisent à une létalité embryonnaire précoce chez la souris (Wang et al, 1998;. Adams et al, 1999; Gerety et al, 1999;. 2002). Le processus du remodelage du plexus primaire vasculaire s'arrête chez ces deux mutants. De plus, l'Éphrine-B2 est connu comme un régulateur essentiel de la migration et de la propagation des cellules murales et de leur adhérence dans la paroi vasculaire (Foo et al., 2006). Plus récemment, l'EphB4 a été décrit comme un médiateur critique de l'assemblage des péricytes postnatales au sein des tubes endothéliaux (Salvucci et al., 2009).

Les collagènes, la fibronectine, les proteoglycanes et les intégrines sont décrites comme étant nécessaires pour la maturation, la différenciation et la stabilisation vasculaire (Stringer 2006; Rhodes and Simon, 2007). Plus récemment, Stratman et ses collaborateurs (2009) ont montré que la coculture des CE avec les péricytes stimulait l'expression de la LM411 (Stratman et al., 2009; Stratman and Davis, 2012).



III.1.2.2 Angiogenèse par intussusception

C'est en 1986 que l'angiogenèse par intussusception a été évoquée pour la première fois, dans des travaux de Caduff et de ses collaborateurs sur la restructuration du lit capillaire au sein des poumons chez le rat (Caduff et al., 1986). Plus tard, les travaux de microscopie électronique de Burri et Tarek ont permis de définir le mécanisme d'angiogenèse par intussusception en tant que processus d'élargissement et de séparation des vaisseaux déjà formés (Burri and Tarek, 1990).

L'angiogenèse par intussusception (**Figure 10**) est différente de l'angiogenèse bourgeonnante, car ce type d'angiogenèse ne nécessite pas une prolifération importante des cellules endothéliales, mais plutôt un réarrangement des structures qui sont déjà formées. Au cours de l'intussusception, un vaisseau existant peut se scinder en deux vaisseaux par compartimentation (Burri and Tarek, 1990; Patan et al., 1996a, 1996b).

Le processus d'intussusception est initié par une invagination de la paroi capillaire à l'intérieur de la lumière et aboutit à la création d'une zone de contact entre les deux parois du tube capillaire. Ce contact permet une réorganisation des jonctions entre les cellules endothéliales et une séparation interstitielle, zone où les péricytes et myofibroblastes vont migrer. Par la suite, ces cellules péri-vasculaires synthétisent une MEC riche en fibres de collagène, qui augmente la séparation entre les deux nouveaux vaisseaux et sert de support à la croissance vasculaire (Djonov et al., 2003).

Le processus d'intussusception peut également influencer la diversification du diamètre des vaisseaux et de leur angle de branchement (Djonov et al., 2003). Les mécanismes moléculaires régulant l'angiogenèse par intussusception restent encore largement à élucider. Certains facteurs, tels que les facteurs PDGFB (Burri and Djonov, 2002) le VEGFA et Ang-1 (Thurston et al., 1999), semblent jouer un rôle important dans ce type d'angiogenèse.

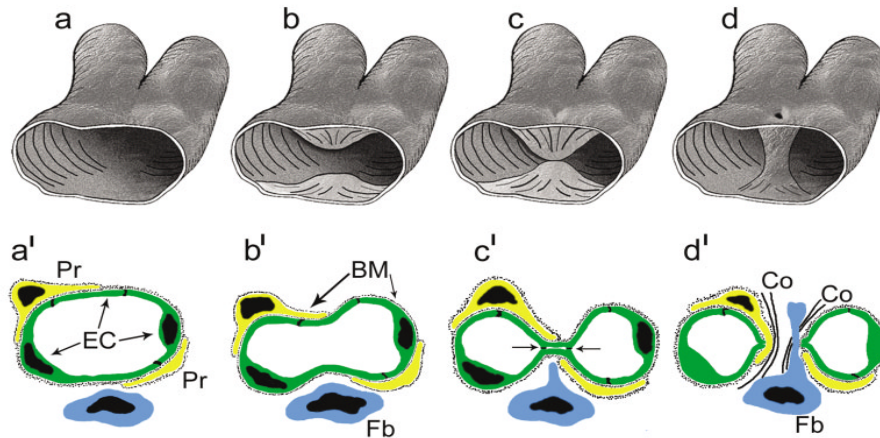


Figure 10 : Représentation tridimensionnelle du processus d'angiogénèse par intussusception. Le processus d'angiogénèse par intussusception commence par l'invagination des parois opposées d'un vaisseau préexistant à l'intérieur de la lumière du tube vasculaire. Lorsque les parois entrent en contact, elles commencent à former un pont endothélial. Ce processus se termine par la perforation du pont endothélial et l'invasion par les fibroblastes et les péricytes afin de former deux vaisseaux distincts; EC - cellules endothéliales, Pr - péricytes, Fb - fibroblastes, BM - lame basale, Co - fibres de collagène (Burri et al., 2004).

III.2 Angiogénèse tumorale

III.2.1 Notion du « switch » angiogénique

En 1971, Judah Folkman énonce l'idée qu'au-delà d'une certaine taille, la tumeur doit initier la formation de nouveaux vaisseaux sanguins via la production de différentes substances pro-angiogéniques, afin de pouvoir croître (Folkman, 1971). De plus, il propose l'hypothèse qu'en bloquant l'action de ces substances pro-angiogéniques, il serait possible d'arrêter la croissance tumorale (Folkman and Klagsbrun, 1987).

La croissance tumorale est contrôlée par des mécanismes intra-tumoraux et par des interactions entre les cellules tumorales et leur microenvironnement. Donc l'une des étapes clés de la progression tumorale serait le déclenchement d'un programme de formation de nouveaux vaisseaux (« switch » angiogénique, **Figure 11**). Les travaux du groupe de Hanahan en 1985 ont permis de confirmer la réalité de ce concept en montrant dans un modèle animal d'insulinome, que des structures pré-tumorales n'induisaient pas d'angiogénèse alors que des tumeurs même non invasives comme les carcinomes *in situ* conduisaient à une forte stimulation angiogénique (Hanahan, 1985; Hanahan and Folkman, 1996).

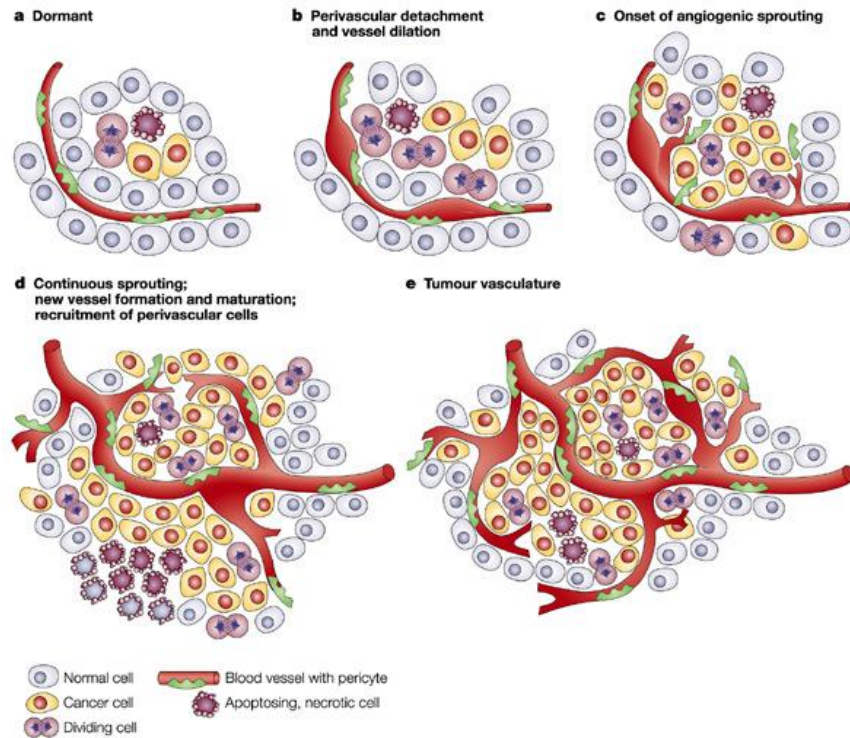


Figure 11 : Le switch angiogénique. L'induction de l'angiogenèse dans un nodule tumoral avasculaire aboutit à la croissance tumorale (Bergers and Benjamin, 2003).

Le mécanisme de régulation de l'angiogenèse tumorale est à l'image d'une balance qui comporte sur chaque plateau, soit des activateurs, soit des inhibiteurs de l'angiogenèse (**Figure 12**). Le « switch » angiogénique se met en position « off » quand l'action des facteurs pro-angiogéniques est contre balancée par celle des facteurs anti-angiogéniques. D'une façon inverse, l'équilibre se rompt en faveur des facteurs pro-angiogéniques et donc la formation de nouveaux vaisseaux est engagée. Un déséquilibre en faveur des facteurs pro-angiogéniques est corrélé avec une augmentation de la densité vasculaire tumorale (Bergers and Benjamin, 2003). Mais dans certaines tumeurs (les tumeurs du sein), l'expression des facteurs pro et anti-angiogéniques peuvent être augmentés en même temps (Fontana et al., 2005), il faut donc prendre en considération le rapport entre les quantités relatives de ces facteurs.

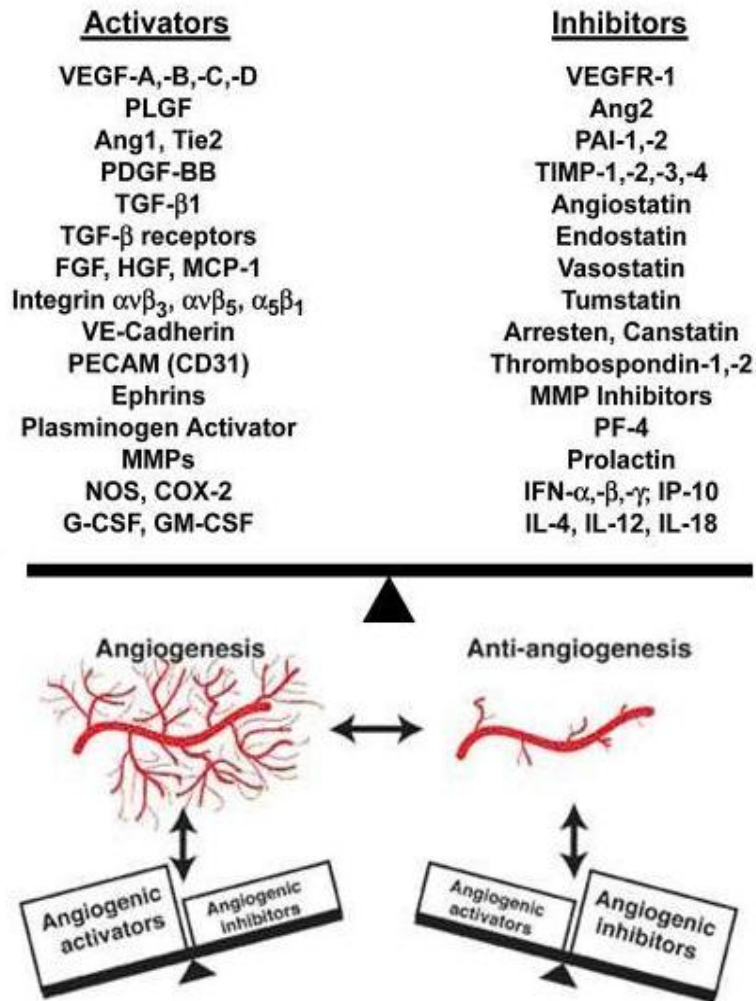


Figure 12 : La balance angiogénique, (Adapté de Sudhakar et al., 2009).

III.2.2 Vaisseaux tumoraux

Contrairement aux vaisseaux normaux qui ont une architecture bien organisée et régulière, les vaisseaux tumoraux sont décrits d'une façon générale étant courts, tortueux, dilatés et faiblement couverts ou dépourvus de péricytes (Carmeliet and Jain, 2011), (**Figure 13**).

Cependant, de plus en plus d'études sur les modèles pré-cliniques et les biopsies de patients atteints de différents types de cancer montrent que ces propriétés ne constituent pas un dogme absolu et varient en fonction du type et du stade du cancer. Cela suggère que les mécanismes de l'angiogenèse ne sont pas les mêmes (Cf. page 40) dans les différents types de cancer et différent d'un type à l'autre, à travers d'une grande diversité de régulateurs moléculaires. Une étude réalisée

par Chao et ses collaborateurs, montre que la couverture péricytaire des vaisseaux sanguins chez les patients atteints d'un cancer du rein est corrélée à un mauvais pronostic (Cao et al., 2012). Les auteurs de cette étude proposent que les thérapies anticancéreuses prennent en compte la diminution du nombre des péricytes (Cao et al., 2012). Dans les mélanomes humains et murins, les microvaisseaux sont aussi décrits étant richement couverts par des péricytes et avec une LB vasculaire continu (Döme et al., 2002).

Puis, récemment, une étude sur un grand nombre de tumeurs coliques, a montré que les vaisseaux tumoraux possédaient une couverture péricytaire très importante (attestée par le marquage de la desmine, l'un des marqueurs des péricytes), laquelle est corrélée à la progression tumorale (Arentz et al., 2011).

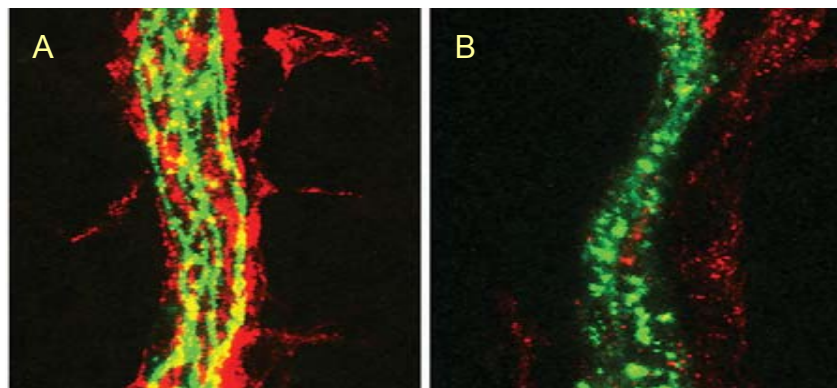


Figure 13 : Les images des vaisseaux tumoraux richement couverts (**A**), et quasiment dépourvus de péricytes (**B**) comarqués avec le marqueur endothélial CD31/PECAM (en vert), l'un des marqueur des péricytes, PDGFR β (en rouge),(Extrait de Falcón et al., 2009).

La formation de vaisseaux tumoraux peut se produire par bourgeonnement et intussusception (**Figure 14A, C**). Cependant, ces mécanismes ne sont pas les seuls, car différentes études au cours de la dernière décennie ont décrit plusieurs nouveaux concepts de la formation des vaisseaux tumoraux.

Parmi ces études, il y a celles qui décrivent une réactivation de la vasculogénèse dans le cancer, processus qui implique le recrutement de progéniteurs endothéliaux de la paroi vasculaire ou des cellules de la moelle osseuse (Rafii et al., 2002; Reyes et al., 2002), (**Figure 14B**).

La tumeur se développant dans des tissus hautement vascularisés n'induit pas toujours l'angiogénèse pour proliférer. Pour subvenir à ses besoins en oxygène et nutriments, elle entoure les vaisseaux sanguins préexistants (**Figure 14D**). Ce phénomène appelé, «vaisseaux co-optés», a été décrit dans la progression des astrocytomes (Vajkoczy et al., 2002).

Le mimétisme vasculaire est un nouveau mécanisme d'angiogénèse où la plasticité de certaines cellules cancéreuses leur permet d'imiter les propriétés des CE et de participer à la formation de

néovaisseaux en réseaux dont on suppose qu'ils peuvent aboucher sur des capillaires sanguins (**Figure 14E**). Ce mode d'angiogenèse tumorale pourrait être observé dans des carcinomes de la cornée (Seftor et al., 2002), des astrocytomes (Yue and Chen, 2005) et dans de nombreux autres types de cancer (Hendrix et al., 2003). Récemment, il a été décrit que dans les glioblastomes, la vascularisation tumorale pourrait être le fait de la trans-différenciation de cellules souches cancéreuses en CE (**Figure 14F**), qui participeraient ainsi à la formation de nouveaux capillaires (Ricci-Vitiani et al., 2010; Wang et al., 2010).

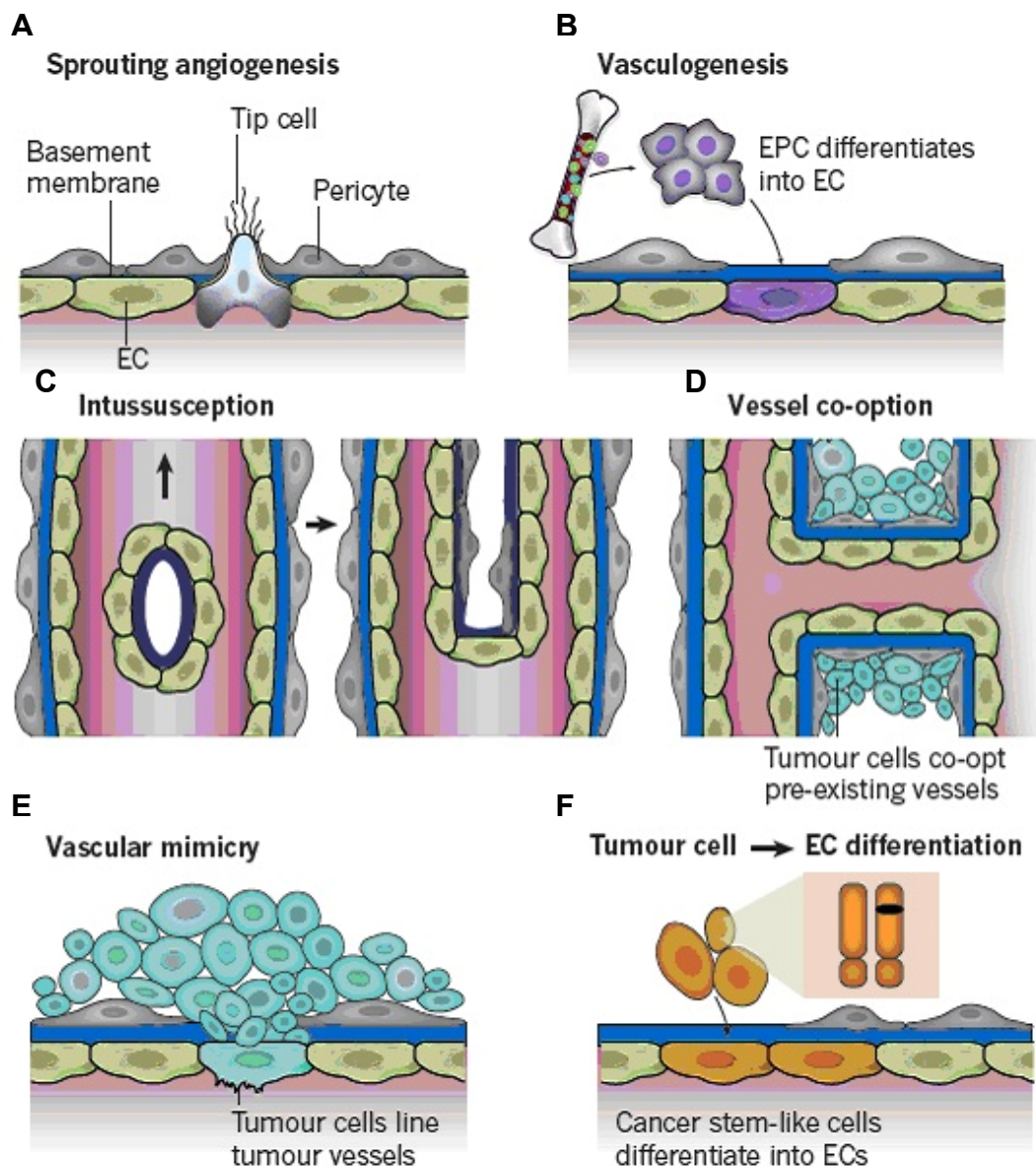


Figure 14 : Les différents mécanismes de formation des vaisseaux spécifiques de l'angiogenèse tumorale (Carmeliet and Jain, 2011).

III.3 Voie VEGF

III.3.1 VEGF et ses récepteurs

Les VEGF (vascular endothelium growth factors) constituent une famille de glycoprotéines homodimériques d'environ 40 kDa. Cinq membres ont été caractérisés chez les mammifères: VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD et PIGF (placental growth factor) et codés par des gènes différents (respectivement sur les chromosomes 6, 11, 4, X et 14 chez l'homme). Il existe d'autres facteurs apparentés au VEGF, le VEGFE, codé par des parapoxvirus (appartenant à la famille des poxvirus, responsables de zoonoses) et les svVEGF (snake venom VEGF), identifiés à partir du venin de vipère des montagnes. Ils sont capables de se lier aux mêmes récepteurs que les VEGF.

Les VEGFA, B et PIGF sont essentiels à la formation des vaisseaux sanguins, tandis que les VEGFC et VEGFD sont essentiels pour la lymphoangiogenèse (Jussila and Alitalo, 2002; Takahashi and Shibuya, 2005). Les VEGF présentent des profils d'expressions différents ainsi que des spécificités de liaison aux récepteurs. D'une manière générale, les VEGF lient trois récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK: receptor tyrosine kinase): les VEGFR1 (appelé flt-1), VEGFR2 (KDR ou flk-1) et VEGFR3 (Figure 15). Ils peuvent former soit des homodimères, soit des hétérodimères. De plus, ils peuvent s'associer à des corécepteurs comme les neuropilines (NRP) 1 et 2 ainsi que certaines intégrines comme $\alpha\beta3$ ou $\alpha9\beta1$ (De et al., 2005; Oommen et al., 2011).

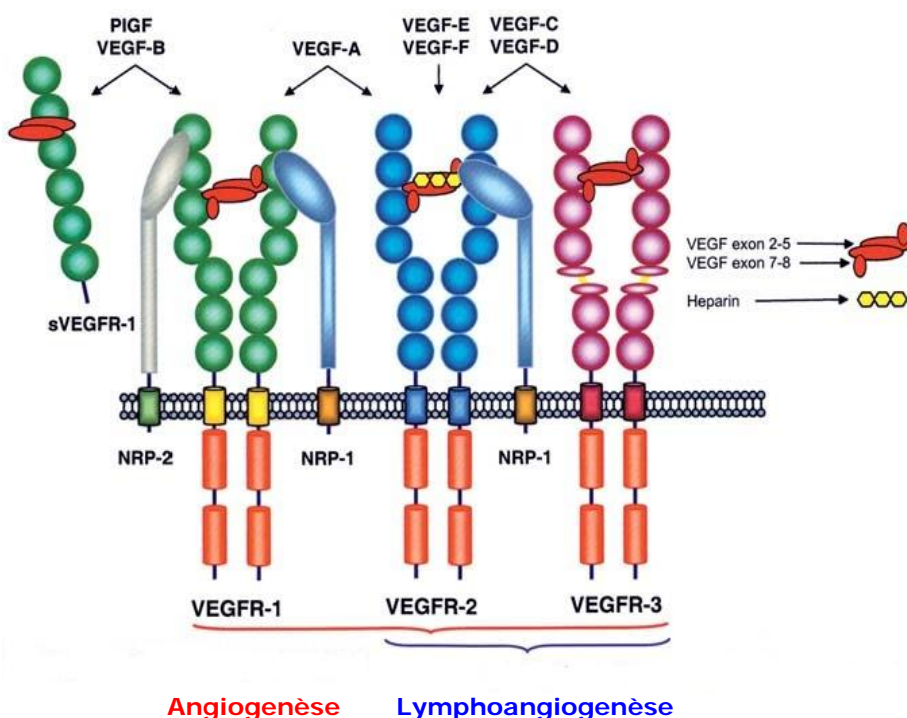


Figure 15 : Récepteurs des VEGF et leurs fonctions biologiques

Les neuropilines (NRP1 et NRP2) symbolisent les corécepteurs aux VEGF. sVEGFR1 correspond à une forme soluble du VEGFR1 (Adapté de Cébe-Suarez et al., 2006).

Les VEGFR sont constitués d'un domaine extracellulaire composé de sept domaines de type immunoglobuline, d'une région transmembranaire et d'un domaine intracellulaire comportant deux domaines à activité enzymatique tyrosine kinase (Shibuya et al., 1990; Matthews et al., 1991; Terman et al., 1991). La fixation des VEGF aboutit à la dimérisation des VEGFR, ce qui induit leur activité tyrosine kinase intracellulaire. Ces récepteurs activés phosphorylent les différentes protéines possédant des domaines SH2, aboutissant à l'activation en cascade des différentes voies de signalisation intracellulaire.

Parmi ces 3 récepteurs, le VEGFR2 est considéré comme étant un acteur majeur des fonctions physiologiques et pathologiques du VEGFA sur les cellules endothéliales (**Figure 16**). L'invalidation du gène VEGFR2 chez la souris conduit à une létalité à 8,5 jours de la vie embryonnaire par défaut de développement des cellules hématopoïétiques et CE (Shalaby et al., 1995). Le VEGFR2 contrôle, en effet, la prolifération, la migration et la survie des CE ainsi que la perméabilité des vaisseaux sanguins (Cross et al., 2003)

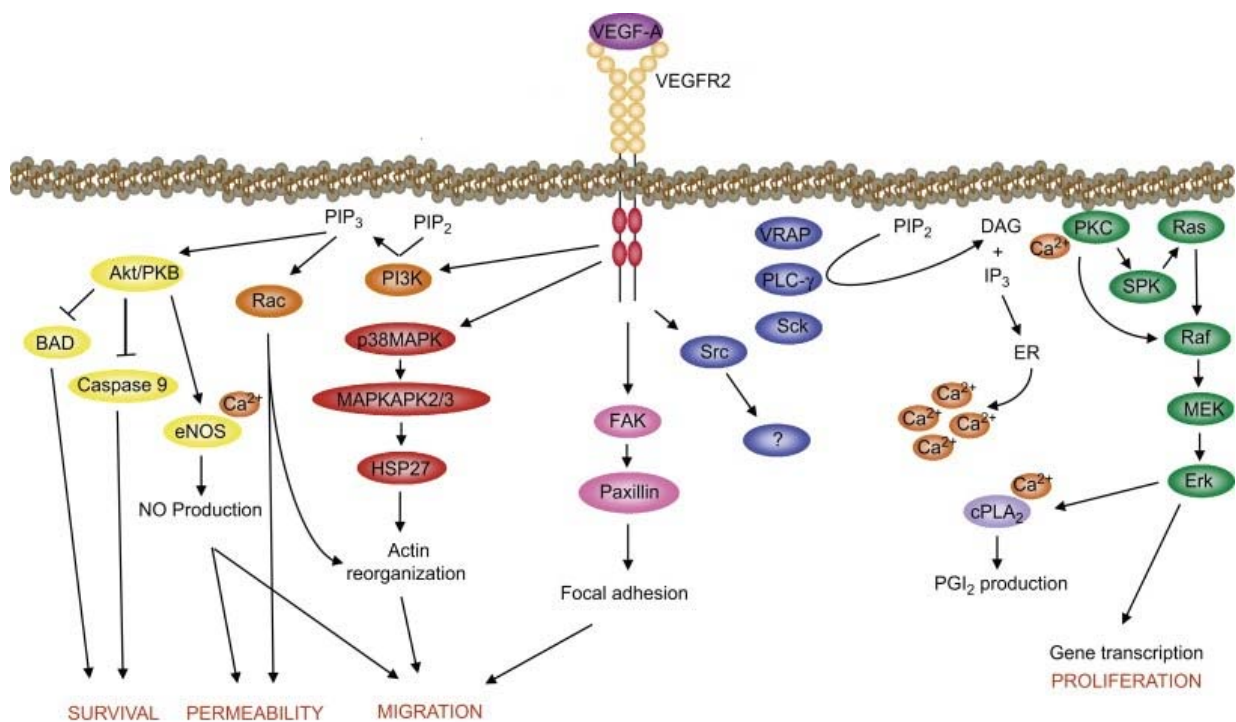


Figure 16 : Voie de signalisation et fonctions biologiques associées au VEGFR2

Le VEGFR2 régule différents processus comme la prolifération, la migration et la survie des CE ainsi que la perméabilité des vaisseaux sanguins (Penn et al., 2008).

La voie de signalisation du VEGFR1 est moins étudiée que celle des autres VEGFR. Le VEGFR1 interviendrait au cours du processus de la vasculogénèse, bien que son activité tyrosine kinase ne soit pas nécessaire à son action sur les CE. En effet, les souris invalidées pour le gène VEGFR1 meurent *in utero* à 9 jours de développement, probablement à cause d'un excès de progéniteurs endothéliaux; on note la présence de vaisseaux anormaux (Fong et al., 1995). Par contre, des souris qui expriment le VEGFR1 sans le domaine à activité tyrosine kinase, ne présentent pas de phénotype vasculaire (Hiratsuka et al., 1998). Enfin il existe une version soluble de ce récepteur qui lie également le VEGFA avec une forte affinité, comme la version transmembranaire. Il empêcherait ainsi le VEGFA de se lier au VEGFR2 et serait donc un acteur anti-angiogénique (Claesson-Welsh, 2003). Le VEGFR3, qui se lie aux VEGFC et VEGFD est important dans le développement cardiovasculaire et lymphatique de l'embryon ainsi que dans la régulation de la formation des vaisseaux lymphatiques chez l'adulte (Jussila and Alitalo, 2002). L'invalidation du gène VEGFR3 conduit à une létalité embryonnaire à 10 jours de développement par défaut cardio-vasculaire (Dumont et al., 1998). Chez l'homme, des mutations sont retrouvées au niveau du domaine tyrosine kinase de VEGFR3 conduisant à la formation d'œdème lymphatique (Irrthum et al., 2000). Les VEGFR2 et 3 sont retrouvés activement exprimés dans tous les processus d'angiogénèse notamment, au niveau tumoral.

III.3.2 VEGFA

Initialement le VEGFA a été connu sous le nom de VPF (vascular permeability factor), le facteur de perméabilité vasculaire. Plus tard, il a été identifié sous le nom de VEGFA, en tant que mitogène et facteur pro-angiogénique (Ferrara and Henzel, 1989; Plouët et al., 1997). Depuis, le VEGFA a fait l'objet de très nombreuses études, qui lui ont attribuées un grand nombre d'activités biologiques. Il est considéré comme un facteur majeur des processus de vasculogénèse et d'angiogénèse et donc intervient dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques (Ferrara et al., 2003b).

III.3.2.1 Gène VEGFA

Le gène humain codant pour le VEGFA (14kb) est localisé au niveau du chromosome 6p21.3 (Vincenti et al., 1996) et possède 8 exons, séparés par 7 introns (Houck et al., 1991; Tischer et al., 1991). Il est transcrit en un pré-ARNm, qui génère par épissage alternatif de nombreux transcrits, pas loin de 25

chez l'homme dont 16 codent effectivement pour une protéine.

III.3.2.2 Structure protéique et isoformes du VEGFA

Les monomères de VEGFA sont associés par des liaisons disulfures entre le résidu Cys51 d'une chaîne et le résidu Cys61 de l'autre (Pötgens et al., 1994). Le site de glycosylation au niveau du résidu Asn74 est décrit comme étant nécessaire à la sécrétion des dimères de VEGFA, pourtant il n'intervient pas dans les processus biologiques (Peretz et al., 1992; Claffey et al., 1995). Les études de mutagenèse dirigée ont révélé que les acides aminés Asp63, Gln64 et Gln67 (codés par l'exon 3) et les trois résidus basiques Arg82, Lys84 et His86 (codés par l'exon4) sont essentiels à l'interaction avec les récepteurs VEGFR1 et VEGFR2 (Keyt et al., 1996).

Parmi les 16 isoformes chez l'homme, 6 isoformes du VEGFA ont été plus caractérisés : VEGFA₁₂₁, VEGFA₁₄₅, VEGFA₁₆₅, VEGFA₁₈₃, VEGFA₁₈₉ et VEGFA₂₀₆ (les indices correspondent au nombre des résidus d'acides aminés), (**Figure 17**). Les isoformes les plus étudiées sont VEGFA₁₂₁, VEGFA₁₆₅, et le VEGFA₁₈₉, leurs homologues chez la souris correspondent aux VEGFA₁₂₀, VEGFA₁₆₄ et VEGFA₁₈₈ respectivement.

Chez l'homme, le VEGFA est produit par une grande variété de cellules, telles que les CE, les cellules tumorales, les fibroblastes, les macrophages et les lymphocytes T (Freeman et al., 1995; Ferrara and Davis-Smyth, 1997; Melter et al., 2000). La majorité de ces cellules expriment les isoformes VEGFA₁₂₁, VEGFA₁₆₅ et VEGFA₁₈₉. L'isoforme VEGFA₁₈₃ possède également une large distribution tissulaire. Les isoformes VEGFA₁₄₅ et VEGFA₂₀₆ sont spécifiquement exprimées dans les cellules d'origine placentaire, mais en proportion très faible par rapport aux autres isoformes (Anthony et al., 1994; Neufeld et al., 1999; Robinson and Stringer, 2001).

Les isoformes du VEGFA diffèrent entre elles par la présence ou l'absence des séquences codées par les exons 6 (a et b) et 7. Ces exons codent pour des régions d'affinités pour les HSPG (heparane sulfate proteoglycanes), qui sont des protéines présentes à la surface cellulaire et dans la MEC (Tischer et al., 1991). L'isoforme VEGFA₁₆₅ sécrétée sous forme d'un homodimère de 45 kDa possède une affinité pour l'héparine, par la présence de 15 acides aminés basiques codés par l'exon 7 (Ferrara and Henzel, 1989; Keck et al., 1989; Leung et al., 1989). En revanche, le VEGFA₁₂₁, dépourvu d'exons 6 et 7 n'a aucune affinité pour l'héparine et est donc une isoforme entièrement diffusible alors qu'une grande fraction du VEGFA₁₆₅ reste elle, associée à la cellule ou à la MEC (Houck et al. 1992;

Park, J. E. et al. 1993). Les isoformes VEGFA₁₄₅, VEGF₁₈₉ et VEGF₂₀₆ de par la présence de ces domaines de liaison à l'héparine restent complètement liées aux HSPG (Houck et al., 1992; Ferrara and Davis-Smyth, 1997). L'affinité différente des isoformes du VEGFA pour les HSPG présente deux avantages : premièrement, elle permet la formation d'un réservoir en facteurs de croissance (Houck et al., 1992; Plouët et al., 1997); deuxièmement elle aboutit à la maturation fonctionnelle des isoformes VEGF₁₈₉ et VEGF₂₀₆. Ces deux isoformes non clivées ne sont pas capables de stimuler la prolifération des cellules endothéliales pour cause de repliements protéiques, masquant les régions de fixation au récepteur VEGFR2. La maturation enzymatique par la plasmine ou l'uPA permet à ces isoformes de fixer le VEGFR2 et par la suite d'activer les voies de signalisation intracellulaire (Cross et al., 2003). De plus, la plasmine est la seule enzyme capable de cliver tous les VEGFs. Son site d'action se trouve sur l'exon 5 commun à tous ces facteurs (Cross et al., 2003).

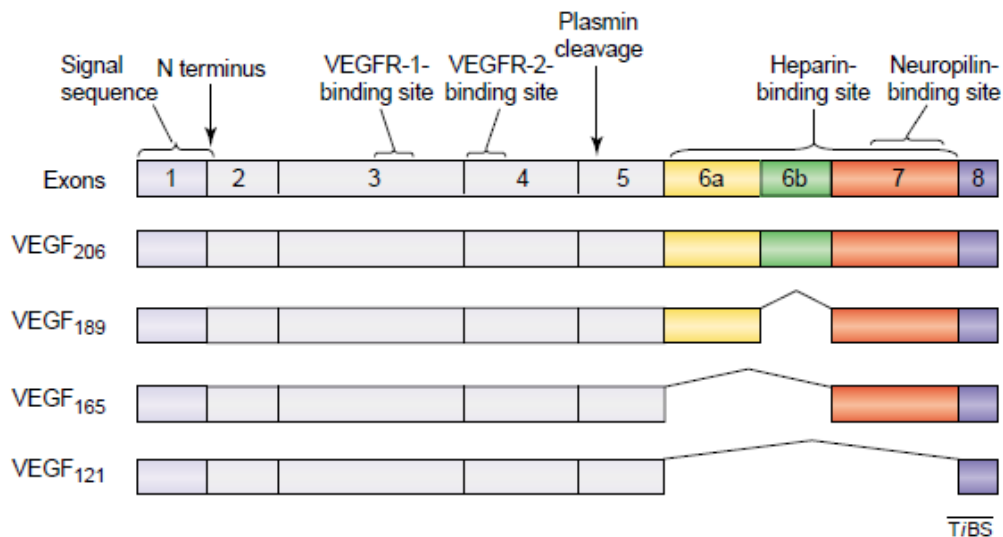


Figure 17 : Structure des principales isoformes du VEGFA chez l'homme (Cross et al., 2003).

III.3.2.3 Régulation transcriptionnelle du VEGFA

De nombreuses études montrent que la régulation du VEGFA se fait principalement au niveau transcriptionnel et aussi par une stabilisation de ses ARNm (Dibbens et al., 1999).

Le promoteur du VEGFA est très conservé entre les espèces et contient de nombreux sites consensus de fixation pour des facteurs de transcription comme Sp1/Sp3, Ap-1, Ap-2, Egr-1, STAT3 et HIF ainsi que des sites de fixation des récepteurs d'hormones comme les oestrogènes, la progestérone ou le récepteur X du foie (LRX) (Joško and Mazurek, 2004; Pagès and Pouysségur,

2005) et NFAT (Chang et al., 2004). Donc de nombreuses voies de signalisation vont stimuler son expression. Parmi différents récepteurs à activité tyrosine kinase, ceux de l'EGF et du FGF (Pagès and Pouyssegur, 2005) peuvent ainsi activer le promoteur du VEGFA. L'hypoxie, qui est courante au sein des tumeurs, est capable d'induire la transcription du VEGFA via les facteurs de transcriptions HIF (Stein et al., 1995). De plus, de nombreux oncogènes et gènes suppresseurs de tumeur, tels que VHL, p53, Bcl2, v-src, RAS, c-myc, PTEN, modulent également la transcription du VEGFA (Joško and Mazurek, 2004; Steelman et al., 2004; Pagès and Pouyssegur, 2005).

III.3.2.4 Activités et fonctions physio-pathologiques du VEGFA

Le VEGFA joue un rôle crucial dans les processus de vasculogenèse et d'angiogenèse embryonnaires. Les souris hétérozygotes pour le VEGFA (VEGFA^{+/-}) présentent une aorte dorsale anormale et l'accumulation de défauts vasculaires conduit à une létalité entre le 11^{ème} et 12^{ème} jour de la vie embryonnaire (Carmeliet et al., 1996; Ferrara et al., 1996). Les souris invalidées pour les deux allèles du VEGFA présente un phénotype vasculaire encore plus sévère, entraînant une létalité précoce à 9,5-10,5 jours de l'embryogenèse (Carmeliet et al., 1996). Il est aussi important dans la vie post-natale précoce et le développement d'organes, comme le cœur, la rétine, la croissance osseuse et le foie (Ferrara, 2004). Chez l'adulte, le VEGFA intervient dans les cycles menstruels, l'angiogenèse ovarienne et la cicatrisation (Carmeliet, 2003; Ferrara et al., 2003a).

Le VEGFA peut stimuler la perméabilité des micro-vaisseaux et induire la vasodilatation des vaisseaux capillaires sanguins en induisant la synthèse de la NO-synthase dans des CE (Ku et al., 1993). Le VEGFA est capable d'activer *in vitro* la prolifération et la migration de CE provenant des artères, veines et vaisseaux lymphatiques. En effet, le VEGFA peut stimuler l'expression de protéases, telles que la collagénase interstitielle (MMP-1), l'u-PA et le t-PA (activateur du plasminogène tissulaire et de type urokinase) (Pepper et al., 1991; Unemori et al., 1992) qui libèrent les cellules de leur ancrage en permettant leur migration.

Le VEGFA peut agir comme une cytokine sur les cellules dérivées de la moelle osseuse et induire la formation de granulocytes, de macrophages et la chémo-attraction des monocytes (Clauss et al., 1990; Broxmeyer et al., 1995). Par la suite, les monocytes, les macrophages et lymphocytes T induisent des facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGFA ou le PDGF ainsi que la MMP-9 et

contribuent ainsi à l'angiogenèse et à la maturation des vaisseaux néoformés lors des processus inflammatoires (Freeman et al., 1995; Melter et al., 2000; Rafii et al., 2002).

Le VEGFA protège les CE de l'apoptose au cours de la formation de nouveaux-vaisseaux au sein des tumeurs. Il a été proposé que la couverture péricytaire des vaisseaux soit un événement critique, qui en exprimant le VEGFA permettrait la survie des CE (Darland et al., 2003). Les études *in vitro* ont montré que le VEGFA empêche l'apoptose après privation de sérum, en induisant l'expression de protéines anti-apoptotiques, telles que Bcl-2 et A1, une protéine appartenant à la famille Bcl2 (Gerber et al., 1998). Le VEGFA est capable d'agir en tant que facteur de survie cellulaire en stimulant la voie de signalisation PI3-k/Akt (Gerber et al., 1998). Son effet protecteur de l'apoptose est très étroitement régulé au cours du développement embryonnaire, car l'inhibition du VEGFA chez la souris nouveau-née provoque l'apoptose, alors que chez la souris adulte son inhibition n'a aucun effet (Gerber et al., 1999).

Le VEGFA est impliqué dans les maladies cardio-vasculaires, oculaires et inflammatoires (Aiello et al., 1994; Malecaze et al., 1994; Detmar et al., 1995; Dvorak et al., 1995; Kovács et al., 1996; Carmeliet, 2003). Le VEGFA est surexprimé dans de nombreux cancers humains, incluant les leucémies myéloïdes, le cancer du côlon, du poumon, du foie, de la thyroïde, le cancer du sein, les cancers gastro-intestinaux, les angiosarcomes et les tumeurs cérébrales (Loureiro and D'Amore, 2005).

Le VEGFA n'est pas un oncogène, sa présence ne suffit pas à transformer une cellule en cellule tumorale. Cependant, une des premières données montrant son caractère pro-tumoral a consisté à injecter des cellules non tumorales CHO (Chinese Hamster ovary) transfectées par des vecteurs d'expression de différentes isoformes du VEGFA à des souris Nude, entraînant la formation de tumeurs alors que les cellules contrôles n'en développent pas (Ferrara et al., 1993). A l'inverse, l'utilisation d'un anticorps bloquant a permis de montrer son efficacité dans différents modèles de cancer comme les rhabdomyosarcomes et les glioblastomes chez la souris (Kim et al., 1993).

Cette approche thérapeutique utilisant un anticorps humanisé contre le VEGFA dont le plus connu est le Bevacizumab vendu commercialement sous le nom d'Avastin, est maintenant utilisé dans le traitement de nombreuses pathologies humaines comme la dégénérescence maculaire lié à l'âge et le cancer colorectal (Los et al., 2007). Par contre ces effets bénéfiques sont controversés dans le cancer du sein, où des effets secondaires, comme l'hypertension et les risques hémorragiques ont été décrits, entraînant le retrait de son utilisation par le FDA en 2011.

III.4 Voie de signalisation Notch

Au cours de la dernière décennie, de nombreuses études ont montré que la voie Notch était impliquée dans le développement vasculaire et dans différentes pathologies humaines (pour revue voir, Kume, 2009). La voie de signalisation Notch est une voie hautement régulée et conservée au cours de l'évolution et qui joue un rôle important dans la détermination de l'identité, la différenciation cellulaire et d'autres processus biologiques (Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Bray, 2006).

La voie de signalisation Notch, encore appelée voie d'inhibition latérale, permet à deux cellules voisines de suivre un destin différent. Cette voie est basée sur les récepteurs transmembranaires de la famille Notch et leurs ligands portés sur la membrane de la cellule voisine. Initialement découvert chez la drosophile, chez les mammifères, la voie Notch comprend quatre récepteurs Notch (Notch1 – Notch4) et cinq ligands (Dll1, Dll3, Dll4, Jagged1 et Jagged2).

III.4.1 Structure des récepteurs et des ligands Notch

Les récepteurs Notch sont composés d'un fragment extracellulaire (ECN) et d'un fragment transmembranaire (NTM). L'ECN est constitué de motifs de type EGF (Epidermal Growth Factor-Like ; EGFL) et de motifs LN (LIN12/NOTCH repeats). Les motifs LNR restreignent l'activation non spécifique du récepteur, ne résultant pas d'une liaison avec l'un de ses ligands. Le fragment NTM est constitué d'un court domaine extracellulaire, d'un domaine transmembranaire unique et d'un domaine intracellulaire (ICN). L'ICN est composé d'un domaine RAM, de deux domaines de localisation nucléaire (NLS), de domaines ankyrine répétés (ANK) (Blaumueller and Artavanis-Tsakonas, 1997) et d'une séquence PEST (Pro-Glu-Ser-Thr). La séquence PEST est capable de recruter des ubiquitines, ce qui aboutit à la dégradation du récepteur (Lyman and Young, 1993; Artavanis-Tsakonas et al., 1999). Chez les mammifères, les récepteurs Notch 1-2 et Notch3 possèdent également un domaine de réponse aux cytokines (NCR) et un domaine TAD (transcriptional activation domain) (**Figure 18**).

La partie extracellulaire des ligands Notch est composée d'un domaine DSL et de 14 motifs de type EGF pour Dll1, 3 et 4 et 16 pour les Jagged1 et Jagged2 respectivement (Bettenhausen et al., 1995; Dunwoodie et al., 1997; Shutter et al., 2000), (**Figure 18**) ainsi que d'un troisième domaine (domaine de von Willebrand de type C), impliqué probablement dans les processus de dimérisation

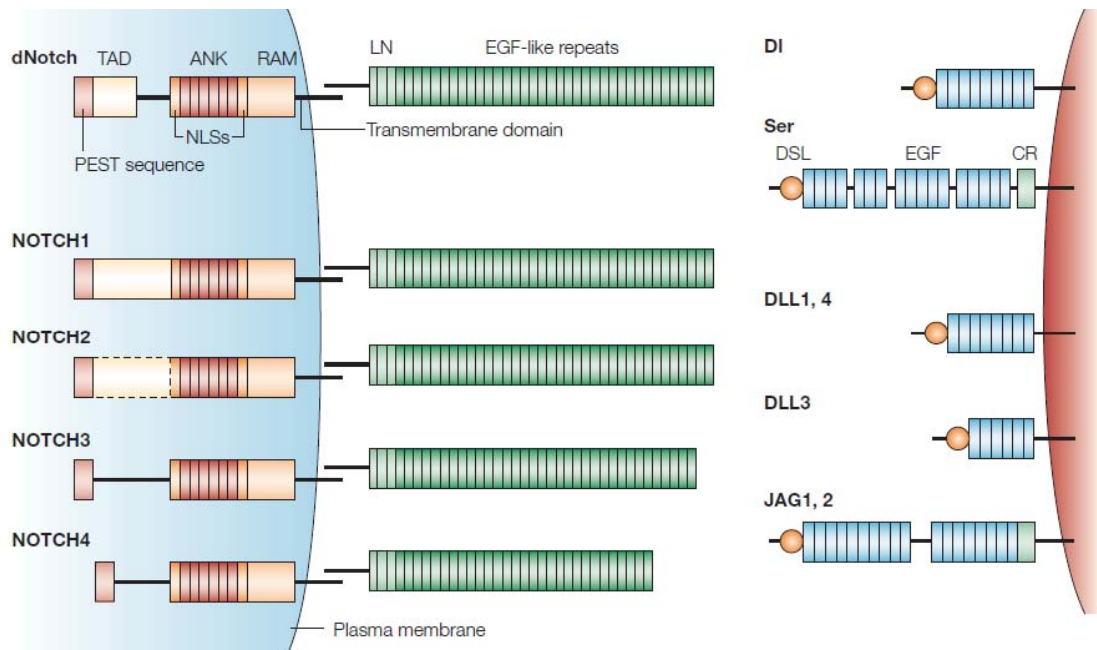


Figure 18 : Les récepteurs Notch et leur ligands chez la drosophile et chez l'homme.

La drosophile possède un récepteur Notch (dNotch) et les mammifères possèdent quatre récepteurs (Notch1-4). Deux ligands ont été décrits chez la drosophile, codés par des gènes *Delta* et *Serrate*. Chez les mammifères, il existe 3 variantes du gène *Delta*, les DELTA LIKE 1, -3 et 4 (Dll1, Dll3 et Dll4). La deuxième famille de ligands Notch est appelée SERRATE chez la Drosophile et Jagged (1 et 2) chez les mammifères.

EGF : motif de type EGF, Epidermal growth factor, **TAD** : domaine d'activation transcriptionnelle, **PEST** : séquence Pro-Glu-Ser-Thr, **RAM** : domaine RAM23, **ANK** : domaines ankyrine répétés, **LN** : domaines LIN12/NOTCH répétés, **NLS** : domaine de localisation nucléaire, **CR** : domaine riche en cystéine (Radtke and Raj, 2003).

III.4.2 Fragment intracellulaire et transduction du signal

Le récepteur Notch est synthétisé sous forme d'un précurseur de 300 kDa. Ce précurseur est constitutivement clivé dans le Golgi par une furine (S1) (**Figure 19**), (Guidos, 2002). Ce clivage aboutit à la formation de deux sous-unités ECN et NTM qui s'associent d'une façon non-covalente et calcium-dépendante sous forme d'hétérodimères (Annaert and De Strooper, 1999). L'hétérodimère est ensuite adressé à la surface cellulaire où il reste inactif jusqu'à ce qu'il lie un de ses ligands présents à la surface d'une cellule voisine.

L'interaction du récepteur Notch avec son ligand conduit à une cascade de clivages protéolytiques (**Figure 19**). Le second clivage de Notch est médié par TACE (TNF- α converting enzyme), qui est une métalloprotéinase appartenant à la famille ADAM (a desintegrin and metalloproteinase) (Brou, 2009). Cette enzyme clive le récepteur au niveau de l'ECN (site S2). Le troisième clivage est effectué grâce à

l'activité enzymatique γ -sécrétase de présénilines (PS) (site S3) (Baron, 2003; Wolfe, 2006). Le domaine intracellulaire actif de Notch (NIC) est libéré dans le cytoplasme, puis transporté dans le noyau où il s'associe au facteur de transcription CSL (encore appelé CBF1 ou RBP-jk). Il déplace les co-répresseurs au profit des co-activateurs (Baron, 2003; Friedmann et al., 2008) ce qui transforme CSL de l'état d'inhibiteur à un activateur transcriptionnel. L'activation de CSL par NIC va modifier le programme génétique de la cellule dans laquelle la voie Notch sera activée suite à l'interaction avec le ligand porté par la cellule voisine. Cela aboutit à la stimulation de la transcription des gènes dits «cibles» codant pour les facteurs de transcription de la famille Hes/Hey (*hairy/enhancer of split*) (Hansson et al., 2004). La cellule dans laquelle la voie Notch est activée va avoir une faible expression du ligand à sa surface, et la cellule voisine au contraire, une forte expression du ligand et donc une faible activité de la voie Notch, ce qui fait que les deux cellules contiguës suivent des destins différents.

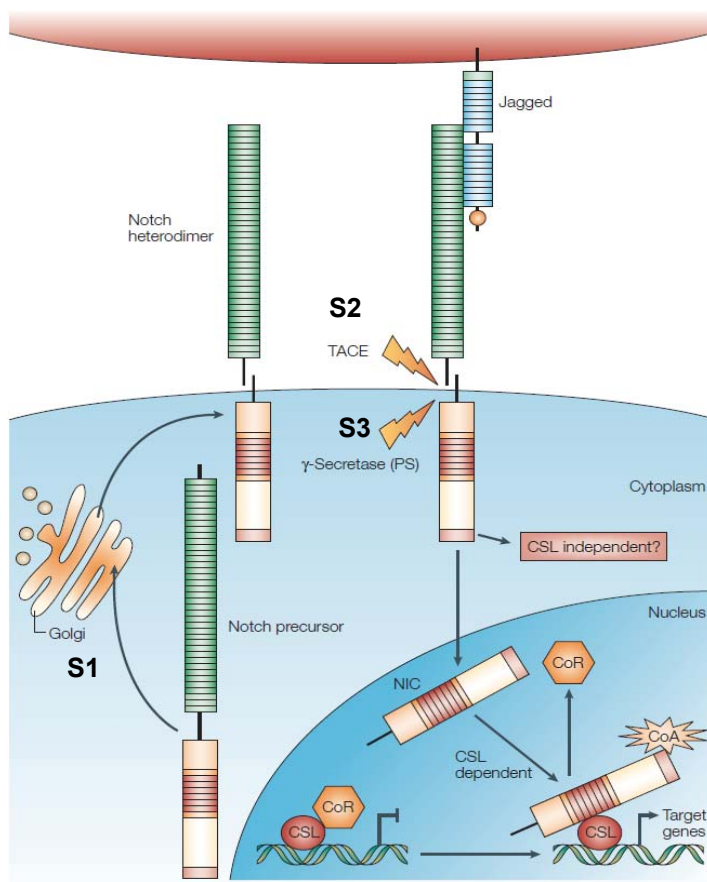


Figure 19 : Mécanisme de l'activation de la voie Notch

Le récepteur Notch subit un premier clivage par la furine (S1). Après l'interaction avec son ligand, ici Jagged, Notch subit un second clivage (S2) par la protéase TACE et troisième clivage (S3) par le complexe γ -sécrétase. Ceci permet la libération de l'ICN, qui migre dans le noyau grâce à la présence de signaux NLS où il forme un complexe activateur de la transcription avec CSL, qui active les gènes cible de la famille Hes/Hey (*hairy enhancer of split*). La liaison de l'ICN aux CSL dans le noyau s'effectue au niveau de la séquence RAM et lève l'effet répresseur des CSL. Cela permet l'activation de la transcription des gènes cibles comme les facteurs de transcription de la famille Hes (Adapté de Radtke and Raj, 2003).

III.4.3 Les récepteurs et ligands Notch dans le système vasculaire

Le rôle crucial de la voie de signalisation Notch au cours du développement embryonnaire vasculaire et de l'angiogenèse a été démontré à l'aide de nombreux modèles murins invalidés pour les gènes codant les différents composants de cette voie. La délétion du gène du récepteur *Notch1* dans l'endothélium chez la souris n'affecte pas la vasculogenèse mais entraîne de graves anomalies du remodelage du plexus primitif vasculaire en provoquant une létalité à 10,5 jours de la vie embryonnaire (Krebs et al., 2000; Limbourg et al., 2005).

Les embryons des souris doublement invalidés pour les gènes *Notch1* et *Notch4* présentent des défauts vasculaires du plexus primitif vasculaire encore plus sévères que les embryons uniquement invalidés pour *Notch1*. Ces défauts de remodelage vasculaire comprennent également la perte des marqueurs artériels (Krebs et al., 2000). Mais l'invalidation du gène *Notch4* ne provoque pas de phénotype particulier (Krebs et al., 2000).

L'invalidation d'un seul allèle du gène *Dll4* chez la souris résulte d'une haploinsuffisance avec la létalité à 9,5 jours de la vie embryonnaire (Duarte et al., 2004; Gale et al., 2004; Krebs et al., 2004). Le degré de l'haploinsuffisance est dépendant du fond génétique des souris, indiquant la contribution de gènes modificateurs. Les défauts vasculaires des embryons *Dll4*^{+/-} sont similaires à ceux des embryons *Notch1*^{-/-}*Notch4*^{-/-} (Duarte et al., 2004; Gale et al., 2004; Krebs et al., 2004). Cela suggère que le processus d'angiogenèse implique *Notch1/4* activé(s) par *Dll4*. En accord avec cette hypothèse, le patron d'expression de *Dll4* correspond à celui de *Notch1* et 4 aux stades précoces du développement embryonnaire (Krebs et al., 2000). En fonction du fond génétique, certaines souris *Dll4*^{+/-} survivent, ceci a permis à Suchting et ses collaborateurs d'analyser le rôle de *Dll4* dans le réseau vasculaire rétinien (Suchting et al., 2007). Leurs travaux montrent que l'absence d'un seul allèle du gène *Dll4* ou le blocage de la voie Notch avec les inhibiteurs de γ -sécrétase entraînent un nombre excessif de cellules « tip » au niveau de la rétine (Suchting et al., 2007), (**Figure 20**).

Des défauts dans l'angiogenèse ont également été observés chez les embryons *Jagged1*^{-/-} ou *Dll1*^{-/-} (Hrabě de Angelis et al., 1997; Xue et al., 1999), mais ces derniers meurent plus tard que les embryons *Notch1*^{-/-}*Notch4*^{-/-}. La délétion spécifique de *Jagged-1* dans l'endothélium chez la souris provoque la perte de l'expression des marqueurs de différenciation des CML (α -actine et SM-22 α) au niveau de l'aorte dorsale (High et al., 2008).

Les souris *Notch3*^{-/-} développent de graves défauts artériels, tels que l'élargissement des artères mais avec un amincissement de la couche des CML pauvrement différenciées (Domenga et al., 2004).

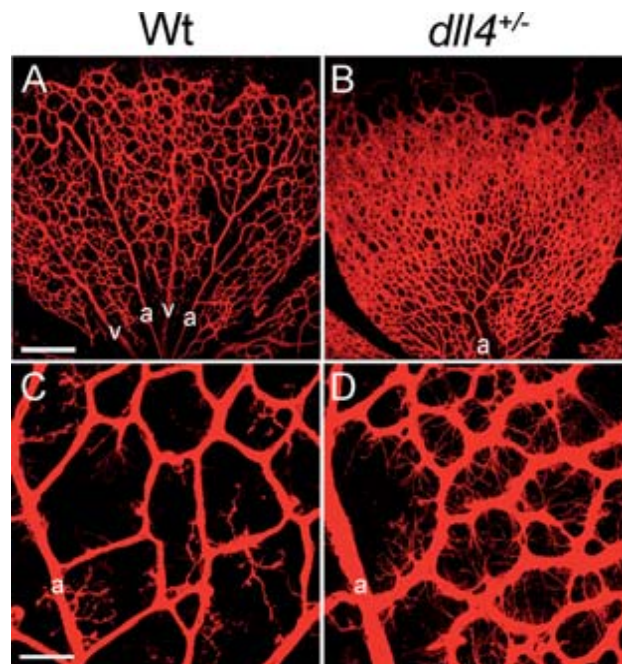


Figure 20 : Réseau vasculaire normal avec alternance d'artères et de veines connectées par des capillaires (A). Les vaisseaux des rétines des souris *Dll4*^{+/-} montrent un branchement excessif du réseau vasculaire. À plus fort grossissement (C, D), les vaisseaux rétiniens *Dll4*^{+/-} (D) présentent plus de cellules « tip », chacune étant à l'origine d'un nouveau point de branchement. a: artères; v: veines, (Suchting et al., 2007).

III.4.4 Axe VEGF/Dll4

La voie VEGF interagit avec la voie Notch, notamment lors de sélection d'identité tip/stalk. Le VEGF induit l'expression du *Dll4* dans les cellules « tips » et le *Dll4* à son tour active la voie de signalisation Notch dans les cellules « stalk », ce qui réduit la sensibilité des cellules stalk au gradient du VEGF et diminue l'expression des récepteurs VEGFR2/VEGFR3. À l'inverse, le ligand Jagged-1 fortement exprimé dans les cellules stalk antagonise l'activation de la voie Notch médiée par *Dll4* afin d'augmenter le nombre des cellules tip et de stimuler le bourgeonnement des vaisseaux. Cet effet antagoniste de Jagged1 est médié par la modification post-traductionnelle des récepteurs Notch, comme les glycosylations par les membres de la famille Fringe (Benedito et al., 2009), (Figure 21). Il est important de noter que pendant plusieurs années, on croyait que le VEGFA induisait le *Dll4* via le VEGFR2. Cependant, les travaux récents de l'équipe de Ralf Adams montrent que la voie de signalisation de VEGFR2 activée par le VEGFA stimule fortement l'expression du VEGFR3, tandis

que le VEGFR2 a un très faible effet sur l'expression du Dll4 (Benedito et al., 2012). Il reste encore à élucider par quel récepteur le VEGFA induit le Dll4.

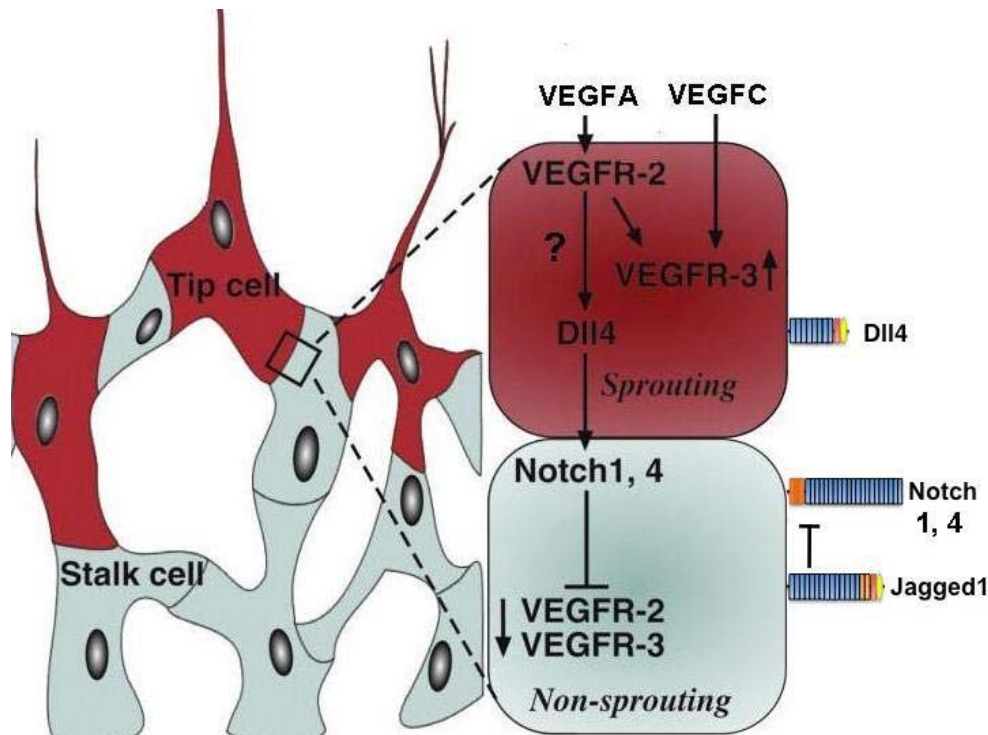


Figure 21 : Schéma récapitulatif de la sélection tip/stalk (Adapté de Lohela et al., 2009).

III.4.5 Dll4 et l'angiogenèse tumorale

Des études chez l'homme et la souris ont montré que Dll4 est fortement exprimé dans l'endothélium tumoral (Mailhos et al., 2001; Patel et al., 2005, 2006; Noguera-Troise et al., 2006; Jubb et al., 2010).

En accord avec les études sur l'angiogenèse physiologique, l'expression de Dll4 dans les vaisseaux tumoraux semble être directement régulée par le VEGFA. Par exemple, le blocage du VEGFA chez les souris portant des tumeurs entraîne une diminution rapide et profonde de l'expression de Dll4 au sein des vaisseaux tumoraux (Noguera-Troise et al., 2007). Dans les tumeurs humaines de la vessie le niveau d'expression du Dll4 est corrélée avec celui du VEGFA (Patel et al., 2006).

Le traitement local ou systémique des souris portant des tumeurs avec les inhibiteurs de Dll4 et Notch cause une inhibition de la croissance tumorale dans une variété de modèles murins de différents cancers. Cette réduction de la croissance tumorale a été associée avec une augmentation de la densité anormale des vaisseaux tumoraux et à une angiogenèse non fonctionnelle (Noguera-Troise et al., 2006; Ridgway et al., 2006; Li et al., 2007; Scehnet et al., 2007).

Récemment, Li et ses collaborateurs ont montré que dans les glioblastomes, le Dll4 serait responsable de la résistance au traitement anti-VEGFA. Ces travaux décrivent que la voie Dll4/Notch participe à la résistance anti-VEGFA en stimulant la formation de vaisseaux qui ne répondent plus au VEGF. Les auteurs proposent de combiner des inhibiteurs de la voie Dll4/Notch au traitement anti-VEGF (Li et al., 2011).

Le Dll4 est souvent décrit comme étant spécifique des CE. Cependant, une étude récente a montré que dans un modèle murin de sarcome d'Ewing, les cellules de la moelle osseuse peuvent se différencier en péricytes, qui vont exprimer le Dll4. Cela a été confirmé dans des biopsies d'enfants atteints de sarcome d'Ewing, où l'expression de Dll4 est confinée aux cellules périvasculaires (Schadler et al., 2010). L'inhibition de Dll4 par shRNA ou par un anticorps neutralisant réduit significativement le nombre des péricytes au sein des tumeurs, avec pour conséquence une baisse de la fonctionnalité des vaisseaux conjointement à la croissance tumorale réduite (Stewart et al., 2011).

IV. CANCERS COLORECTAUX

IV.1 Epidémiologie et incidence

Le cancer colorectal (CCR) constitue un problème majeur de la Santé Publique de par son incidence et sa gravité. C'est le troisième cancer dans le monde avec une estimation de plus de 1 million de nouveaux cas diagnostiqués en 2002 (Parkin et al., 2005) et il est en progression constante depuis 1975. Il représente 20% des cancers dans les pays industrialisés. En terme de fréquence, le cancer colorectal se situe après le cancer du poumon et de la prostate chez l'homme et après le cancer du sein chez la femme. Le CCR affecte un peu plus les hommes que les femmes avec un ratio moyen H/F de 1,2. Sa répartition dans le monde présente une réelle disparité (**Figure 22**).

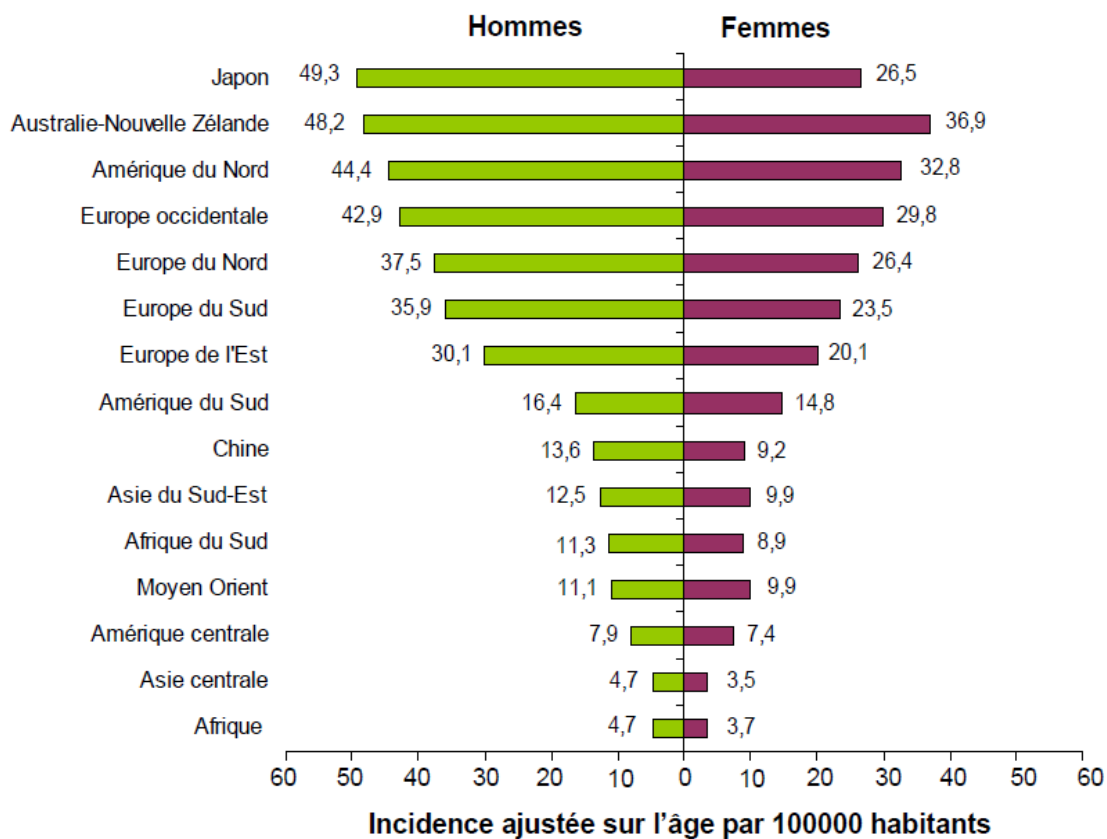


Figure 22 : Incidence des cancers colorectaux dans le monde. Taux pour 100000 habitants ajustés sur l'âge. Adapté de Parkin et al., 2005.

Rappelons qu'en France le cancer est la première cause de mortalité avant les maladies cardiovasculaires et que le CCR est responsable de 3 % des décès annuels selon les données de l'INSEE de 2009. Ainsi plus de 36000 nouveaux cas sont recensés chaque année, avec plus de 16000 décès par an. La région Alsace est plus touchée avec un ratio région sur la moyenne nationale de 1,2 (d'après CépiDc INSERM/ département Observatoire des cancers).

Différents facteurs de risques à la fois familiaux (prédisposition génétique) et environnementaux peuvent favoriser l'apparition des tumeurs. Plusieurs études mettent en cause le régime alimentaire, le mode de vie et la surcharge pondérale (Key et al., 2004; Michels, 2005). De nombreuses études épidémiologiques soulignent qu'une forte consommation de viandes rouges augmente les risques de développer un cancer du côlon (Giovannucci et al., 1994; Norat et al., 2002; Chao et al., 2005; Willett, 2005). La sédentarité et l'obésité sont aussi des facteurs favorisant le CCR (Giovannucci, 2002), alors que l'activité physique régulière est associée à une réduction du risque de ce cancer (Hardman, 2001; Thune and Furberg, 2001; Giovannucci, 2002).

IV.2 Evaluation et traitements des cancers colorectaux

La majorité de cancers colorectaux (CCR) correspondent à des adénocarcinomes, qui sont des tumeurs d'origine épithéliale. Les tumeurs non épithéliales sont rares et de deux types, les lymphomes, se développant à partir des tissus lymphoïdes associés à la muqueuse intestinale et les sarcomes qui sont des tumeurs des tissus musculaires et conjonctifs du côlon.

Les procédures déterminant le stade et le grade des tumeurs correspondent à des critères définis par des accords internationaux. Le stade tumoral, TNM décrit le niveau de propagation de la tumeur primaire localement ainsi qu'à distance. Le « T » caractérise la tumeur (**Figure 23**), les « N » et « M » correspondent au nombre de ganglions et la présence des métastases respectivement.

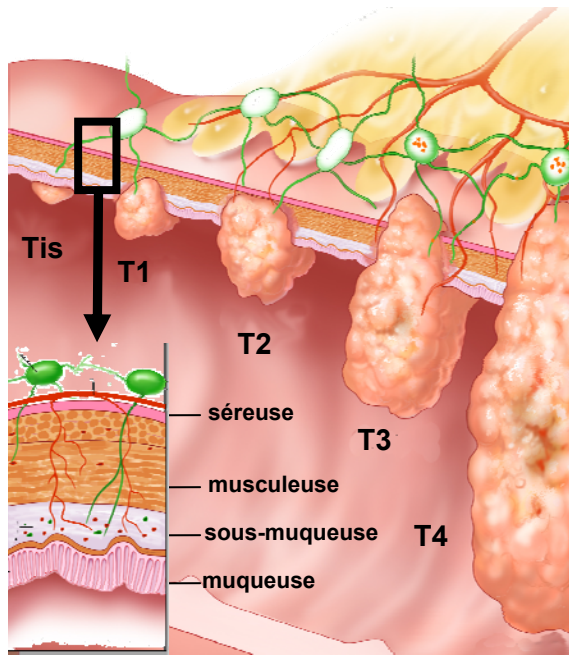


Figure 23 : Schéma de classification de la tumeur primaire

Tis - tumeur intra-épithéliale (carcinome *in situ* ou intra-muqueuse (une tumeur ayant franchie la LB sous-épithéliale).

T1 - tumeur infiltrant la sous-muqueuse

T2 - tumeur infiltrant la musculaire

T3 - tumeur infiltrant la séreuse

T4 - tumeur envahissant un organe ou une structure de voisinage

Adapté du site <http://www.curecancerproject.org>

Le grade tumoral est l'évaluation de l'agressivité de la tumeur en fonction de sa morphologie et de sa capacité proliférative. Le grade 1 ou bas grade définit un cancer à croissance lente. On le dénote également bien différencié, c'est-à-dire qu'on peut y retrouver une morphologie tissulaire colique. Le grade 2 ou modéré correspond à une différenciation intermédiaire. Enfin, le grade 3 ou haut grade indique une croissance du cancer plus rapide, qui est peu différencié, c'est-à-dire qu'on ne reconnaît plus la morphologie tissulaire colique.

Lorsque les CCR sont détectés à un stade précoce, une simple chirurgie pourra être mise en place afin de les éliminer. La chirurgie est curative dans plus de 90% des cas pour les cancers du stade T1N0M0 et dans 75% des cas pour le stade T2N0M0. La probabilité de récurrence est associée au degré de pénétrance de la tumeur et à l'atteinte des nodules lymphatiques. Des métastases peuvent se développer dans les 5 années qui suivent la résection tumorale chez 30% des patients ne présentant initialement qu'une tumeur localisée. Les organes les plus fréquemment atteints par des métastases issus de cancers colorectaux sont le foie et les poumons. Un très faible pourcentage des métastases peut être réséqué par la chirurgie. Chez 60% des patients, l'invasion des nodules lymphatiques entraîne une récurrence. En cas de métastases chez les patients, la chirurgie est accompagnée d'une chimiothérapie de première ligne utilisant le protocole FOLFOX, associant le 5-Fluoro-uracile (un analogue de base bloquant le cycle cellulaire), l'acide folinique (qui potentialise l'action du 5-Fluoro-

uracile) et l'oxyplatine (provoquant un pont entre deux guanines empêchant ainsi la réplication). Une chimiothérapie de seconde ligne utilisant le protocole FOLFIRI associant le 5-Fluo-uracile, acide folinique et irinotécan (un inhibiteur covalent des topoisomérases) peut être également proposée. D'autres stratégies récentes ont permis de mettre au point des traitements ciblés, notamment contre le microenvironnement tumoral comme ceux dirigés contre certains facteurs angiogéniques comme le bevacizumab (un inhibiteur du VEGFA).

IV.3 Les différents types des CCR

Les CCR se divisent en deux groupes : les cancers héréditaires (15%) et les cancers sporadiques (85%).

IV.3.1 CCR héréditaires

IV.3.1.1 Le syndrome FAP

Les patients atteints de FAP (Familial Adenomatous Polyposis) présentent de nombreux polypes adénomateux (**Figure 24**), se développant le plus souvent dans la partie distale du côlon et pouvant apparaître dès l'âge de 20 ans. Chez les patients non traités, ces polypes peuvent progresser en un CCR vers l'âge de 40 ans. La FAP est causée par des mutations germinales au niveau du gène suppresseur de tumeur *APC* (Adenomatous Polyposis Coli) (Leppert et al., 1987; Groden et al., 1991). Le nombre de mutations différentes sur ce gène peut atteindre 300, toutes aboutissant à l'expression d'une forme tronquée inactive de la protéine (Syngal et al., 2000). Les tumeurs surviennent en cas de perte ou mutation du second allèle. Ces tumeurs sont caractérisées par une instabilité chromosomique ou CIN (Chromosomal Instability).

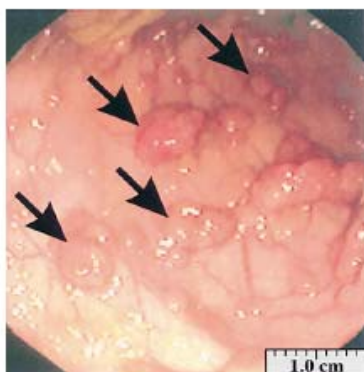


Figure 24 : Polypes adénomateux de type FAP
Adapté de Kinzler and Vogelstein, 1996.

IV.3.1.2 Les cancers HNPCC ou syndrome de Lynch

Le deuxième groupe de cancers héréditaires regroupe les cancers sans adénomes multiples encore appelés HNPCC (hereditary non polyposis colon cancer) ou syndrome de Lynch (**Figure 25**). Ce cancer est caractérisé par l'instabilité des séquences microsatellites, encore appelé MIN (microsatellite instability) selon l'acronyme anglais, et causé par des mutations mono-alléliques germinales au niveau des gènes *hMSH2* (Leach et al., 1993), *hMLH1* (Bronner et al., 1994), *hPMS1*, *hPMS2* (Nicolaidis et al., 1994) et *hMSH6* (Miyaki et al., 1997) gènes appartenant au système de réparation de l'ADN. Cette instabilité entraîne très souvent des mutations au niveau des gènes *APC*, la β -caténine et *KRAS*.



Figure 25 : Tumeur de type HNPCC
Adapté de Kinzler and Vogelstein, 1996.

IV.3.2 Les CCR sporadiques

La majorité des CCR sont des cancers sporadiques (Potter et al., 1993). Les patients atteints de CCR sporadiques ont acquis de nombreuses mutations tout au long de leur vie par exposition à différents agents cancérigènes chimiques, bactériens ou alimentaires, aboutissant finalement au développement tumoral. Comme les CCR héréditaires, les CCR sporadiques peuvent suivre deux types de pathogénèse (Frattini et al., 2004). Environ 85% des cas sont dus à une mutation somatique du gène *APC* et aboutissent à des tumeurs CIN. Les 15 % restant sont dus à des mutations somatiques ou à une méthylation des promoteurs des gènes du système de réparation de l'ADN. Ces tumeurs ont un phénotype MIN (Liu et al., 1995; Jass, 2004).

IV.4 Séquence adéno-carcinome

En 1990 Fearon et Vogelstein proposent pour la première fois un modèle décrivant les différentes étapes de développement aboutissant à un CCR, à partir d'un épithélium normal jusqu'au développement d'un carcinome (Fearon and Vogelstein, 1990). Cette progression est connue sous le terme de séquence adénome-carcinome. Les adénomes se développent à partir des foyers de cryptes aberrantes, structures qui proviennent d'une hyperprolifération des cellules des cryptes aboutissant à une dilatation, élongation ou fission de ces cryptes coliques. Chaque étape de cette séquence s'accompagne d'accumulation d'altérations génétiques, faisant intervenir des mutations au niveau des gènes *APC*, *KRAS*, *DCC*, *SMAD4* et *p53* (**Figure 26**). Pourtant les mutations dans certaines tumeurs, n'apparaissent pas dans le même ordre. En plus, toutes ces mutations ne sont pas forcément retrouvées dans une même tumeur (Smith et al., 2002). Aujourd'hui, le modèle proposé par Fearon et Vogelstein n'illustre pas cette complexité des voies de signalisation intervenant dans la tumorigenèse colorectale.

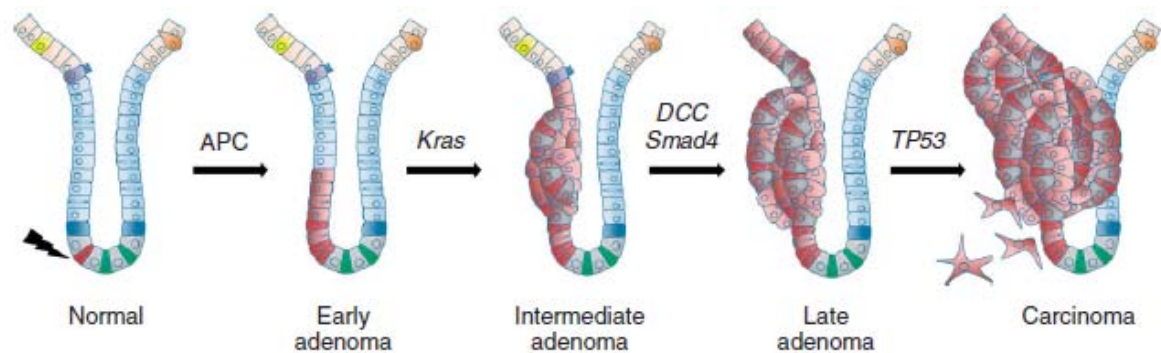


Figure 26 : La séquence adéno-carcinome proposé par Fearon et Vogelstein, 1990. Les adénomes se forment à partir d'un épithélium normal et peuvent progresser aux carcinomes, Rizk and Barker, 2012.

IV.5 Concept de cellule souche cancéreuse

Le côlon, comme tous les autres organes du tractus gastro-intestinal, est composée de 4 couches concentriques. En partant de l'extérieur vers l'intérieur, se trouvent une couche externe (sérouse), une couche composée de muscles lisses (musculeuse), une couche intermédiaire (sous-muqueuse) où on trouve le tissu conjonctif et enfin la couche interne (muqueuse) (Cf. **Figure 23**).

La muqueuse est composée d'un épithélium simple, qui se repose sur une LB qui le sépare du tissu conjonctif. Dans le côlon, la surface de la muqueuse est plate et ne forme pas de villosités comme dans l'intestin grêle (**Figure 27**). Les invaginations encore appelées, cryptes de Lieberkühn, plongent dans toute l'épaisseur de l'épithélium de la muqueuse. La densité des cryptes peut varier en fonction du segment, avec une densité plus faible dans le côlon distal que dans le côlon proximal (Gutschmidt et al. 1983).

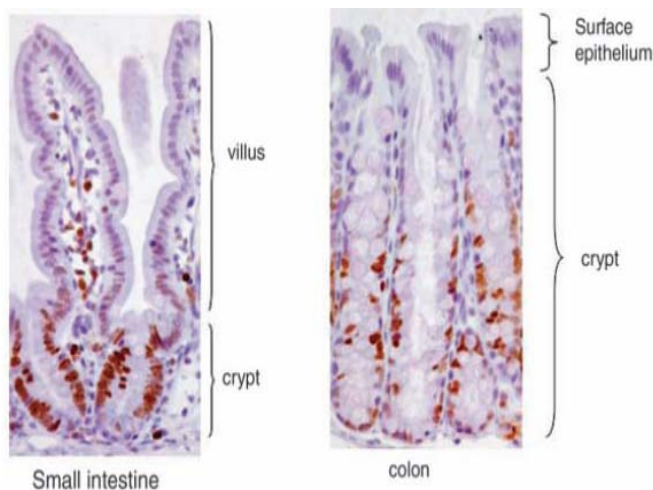


Figure 27 : (A) Représentation comparative de l'épithélium de l'intestin (comprenant les cryptes et les villosités) et du côlon (formé de cryptés et d'un épithélium plate de surface) (B) Les noyaux marqués en brun par l'immunomarquage du Ki67 révèlent les cellules en prolifération qui sont restreintes à la région des cryptes dans l'intestin grêle et le fond des cryptes dans le côlon (Radtke and Clevers, 2005).

L'épithélium du côlon, comme celui de l'intestin grêle, présente un renouvellement dynamique, rapide et constant. L'épithélium colique est ainsi renouvelé en 4 à 6 jours, processus qui fait intervenir un compartiment prolifératif à la base des cryptes, où des cellules progénitrices ayant une grande capacité de prolifération sont issues de la division de cellules souches, situées à la base des cryptes. Des expériences de "lineage tracing" c'est-à-dire la possibilité de suivre le devenir cellulaire d'une seule cellule, ont permis d'identifier en position +4 (le +1 étant la cellule la plus au fond des cryptes) cette cellule souche à raison d'une cellule/crypte. Des marqueurs de cette cellule souche ont été identifiés comme LRG5 ("leucine-rich G protein-coupled receptor 5") ou Bmi1 ("B lymphoma Mo-MLV

insertion region 1 homolog") ou CD133. Cette cellule souche, contrairement aux cellules progénitrices, possède une capacité d'auto-renouvellement. Après l'étape de prolifération les cellules vont migrer et se différencier en différents types cellulaires (cellules à mucus, colonocytes, cellules entéroendocrines) que l'on trouve dans le côlon) pour arriver au niveau de l'épithélium de surface où ces cellules se détacheront et seront relarguées dans la lumière intestinale (pour revue Simons and Clevers, 2011).

Le concept de cellules souches repose sur l'observation que toutes les cellules dans les tumeurs ne sont pas égales. Ce concept suppose que la croissance des tumeurs est alimentée par un nombre limité de cellules souches qui sont capables d'auto-renouvellement. La majeure partie d'une tumeur se compose de cellules en prolifération rapide ainsi que de cellules post-mitotiques, qui sont plus ou moins différenciées. Comme aucune de ces deux classes de cellules ne sont capables de s'auto-renouveler, la contribution de ces cellules tumorales sur la maintenance de la tumeur à long terme est négligeable. Une cellule souche normale, notamment celle des cryptes coliques, est construite pour durer toute une vie, pour résister aux agressions du milieu extérieur : bactériologique, virale, chimique etc. Cependant si le génome de cette cellule souche est altérée par perte de gènes suppresseurs de tumeurs ou par activation d'oncogènes, cette cellule souche, que l'on peut maintenant appelée cellule souche cancéreuse, ne va plus répondre aux signaux de régulations et va pouvoir donner naissance à une tumeur (**Figure 28**). Comme ces cellules souches cancéreuses dérivent des cellules souches normales, elles ont les mêmes propriétés. Elles vont être plus résistantes aux radiothérapies et chimiothérapies, vont pouvoir sommeiller pendant une longue durée, mais également vont acquérir de nouvelles propriétés du fait de leurs altérations génétiques, pouvant aboutir aux métastases. Des cellules souches cancéreuses ont été caractérisées dans pratiquement tous les types de cancers dont le cancer du côlon (O'Brien et al., 2007; Ricci-Vitiani et al., 2007; Todaro et al., 2007), mais les marqueurs qui ont été utilisés pour les caractériser sont multiples et ne sont pas toujours co-exprimés par un même type de cellule souche cancéreuse. Cela complique l'élaboration de stratégies thérapeutiques pour cibler uniquement cette population de cellules souches cancéreuses, d'autant plus qu'elles ont gardé une plasticité importante comme par exemple, de pouvoir se trans-différencier en cellules endothéliales (Dong et al., 2011).

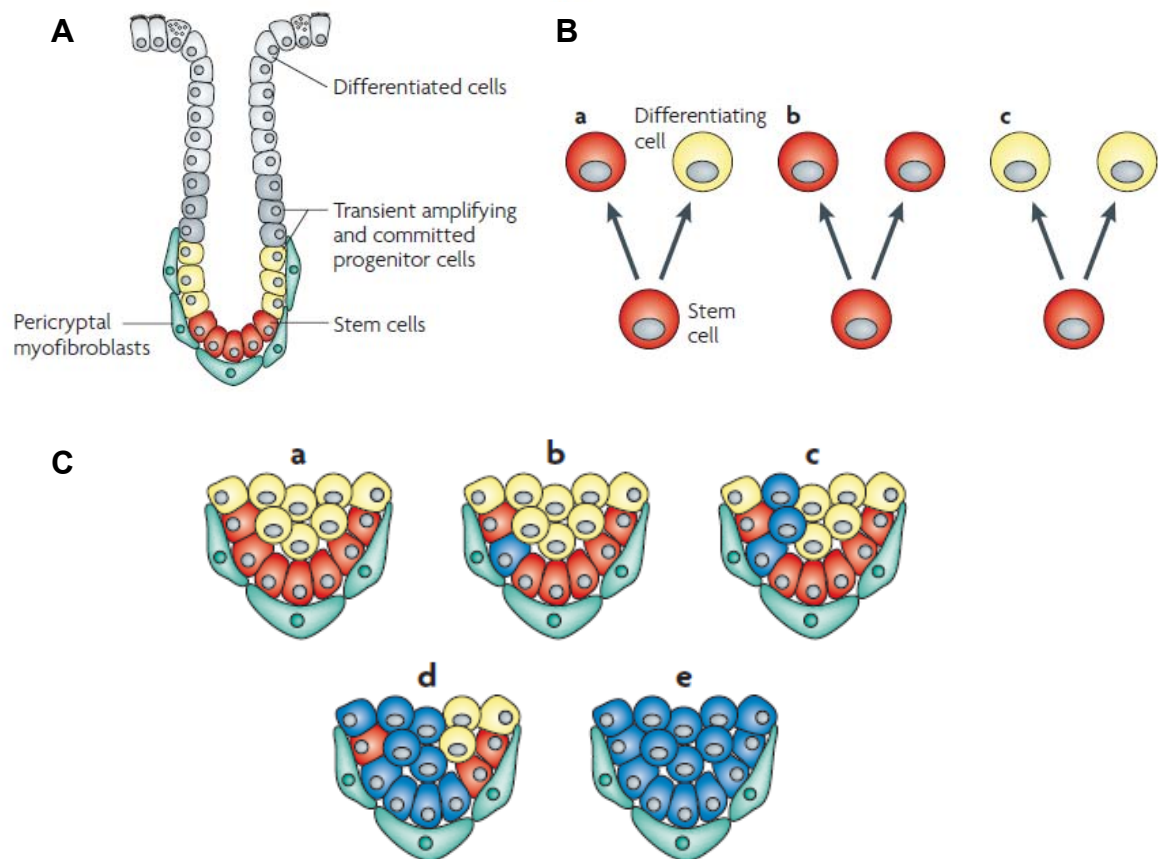


Figure 28 : Les cellules souches sont logées à la base des cryptes (**A**). Les cellules souches selon les modifications de l'environnement tissulaire, subissent des divisions asymétriques (**a**.une cellule souche donnant une cellule souche et une cellule différenciée), divisions symétriques (**b**.une cellule souche donnant deux cellules souches ou **c**. deux cellules différenciées). La souche souche transformée suite aux différents types de mutations va donner la naissance à la tumeur (**C, a-e**), (Humphries and Wright 2008).

IV.6 Les voies de signalisation impliquées dans le cancer colorectal

IV.6.1 Le complexe APC/ β -caténine et la voie Wnt

Dans le côlon normal, l'APC se concentre au niveau des cellules matures, c'est-à-dire les cellules ayant déjà proliférées et migrées. La fonction principale d'APC est de réguler le taux cytosolique de la β -caténine. En absence de signal extracellulaire Wnt, le niveau de β -caténine est réduit au minimum grâce au complexe formé par des protéines d'assemblage Axine, APC, Div, et les kinases CK1 et GSK3 β . La phosphorylation de l'extrémité NH₂ de la β -caténine entraîne son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome (Rubinfeld et al., 1996; Amit et al., 2002; Liu et al., 2002). Mais, si la cellule est exposée aux molécules Wnt, celles-ci interagissent avec les récepteurs de la famille Frizzled associés au corécepteur LRP (LRP5/6), ce qui active le DSh (Dvl chez les mammifères), l'inhibiteur de GSK3 β . En conséquence, la β -caténine cytoplasmique n'est plus dégradée par le protéasome, donc elle s'accumule dans le cytoplasme et peut alors se transloquer dans le noyau où elle interagit avec les facteurs de transcription de la famille TCF/LEF. Cela aboutit à l'activation de l'expression des gènes cibles de la voie Wnt, comme c-myc (He et al., 1998) la cycline D1 (Tetsu and McCormick, 1999), c-jun (facteur de transcription du complexe A1, (Mann et al., 1999) ou encore la survivine (un inhibiteur de l'apoptose, (**Figure 29**). Dans le cancer colorectal, une perte de fonction du gène APC aboutira à une activation constitutive de la voie Wnt/ β -caténine.

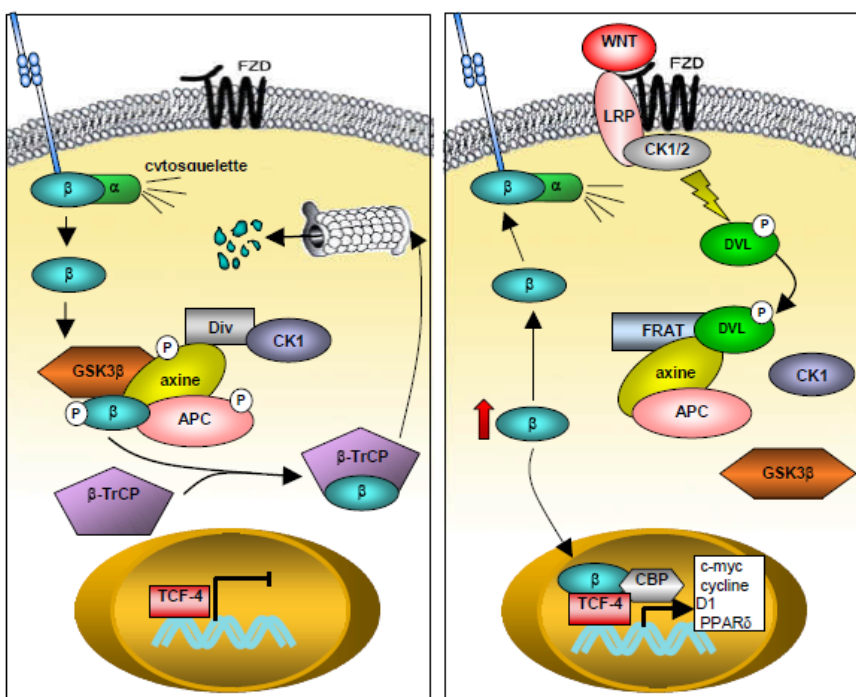


Figure 29 : Complexe APC/ β -caténine.

La protéine APC non mutée, après sa phosphorylation par GSK-3 β , lie la β -caténine. Ce complexe est ensuite dégradé par ubiquitination. En cas de mutation d'APC ou l'activation de Wnt, la β -caténine agit comme un facteur de transcription en activant de nombreux gènes qui régulent le cycle cellulaire, en stimulant la prolifération et en diminuant l'apoptose. α : α -caténine, β : β -caténine (Thorstensen et al., 2005).

IV.6.2 Voie des MAPkinases – RAS

Les protéines Ras (HRAS, KRAS et NRAS) appartiennent à la superfamille des petites protéines G et interviennent dans la régulation de la croissance cellulaire. Lorsque, la protéine Ras est activée sous la forme Ras-GTP, elle entraîne une cascade de phosphorylations/activations de Raf1, des MEK1 et MEK2, puis des ERK1 et ERK2. Les ERK1 et 2 sont finalement transloqués dans le noyau où ils activent des facteurs, tels que Elk, c-myc, qui régulent eux même la transcription de gènes anti-apoptotiques, comme bcl-2 (Bos, 1989).

Le complexe ERK1/2 phosphoryle également c-Jun qui en s'associant à c-Fos forment le complexe de transcription AP1. Ce dernier à son tour stimule l'expression de gènes contrôlant le cycle cellulaire, comme la cycline D1, qui promeut la division cellulaire. La protéine Ras peut également interagir directement avec la PI3K et active ainsi la voie anti-apoptotique AKT favorisant la survie cellulaire **(Figure 30)**.

Dans le modèle de séquence adénome - carcinome proposé par Fearon et Vogelstein (1990) l'activation du gène *KRAS* est considérée comme le second événement rencontré dans les CCR, après l'altération du gène *APC*. L'expression constitutive d'une forme oncogénique de *KRAS* dans l'épithélium intestinal des souris transgéniques aboutit à l'apparition des tumeurs (Janssen et al., 2002). L'effet oncogénique de *KRAS* passe par l'activation de la voie ERK1/2, démontrant l'importance de la régulation des MAPK dans l'intestin. Mais cet effet oncogénique est indépendant d'*APC*. Autrement, l'accumulation de l'hétérozygotie d'*APC* de l'expression de la forme oncogénique *KRAS* est synergique, ce qui a pour conséquence d'amplifier le nombre et l'agressivité des tumeurs (Janssen et al., 2006).

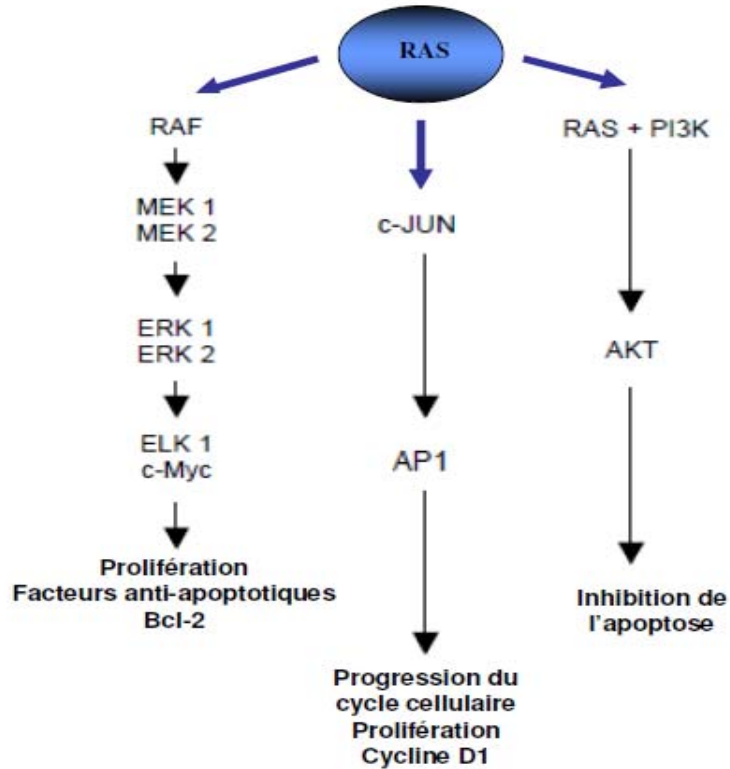


Figure 30 : le RAS est constitutivement actif dans les cellules tumorales présentant une mutation dans ce gène.

IV.6.3 Voie TGF- β /SMAD

L'Le TGF- β est impliqué dans un grand nombre de processus cellulaires, notamment la croissance cellulaire, la différenciation et l'apoptose. Il est capable d'induire le complexe hétérotétramérique des récepteurs de type I et II du TGF- β , qui va s'autophosphoryler et recruter les facteurs SMAD2 et SMAD3 (**Figure 31**). Les SMAD2 et SMAD3 forment un complexe avec le SMAD4, qui sera transloqué dans le noyau où il joue le rôle de facteur de transcription pour un certain nombre de gènes cibles ayant une action anti-tumorale (Moustakas et al., 2001). Les altérations du gène *SMAD4* (Mothers against decapentaplegic homolog 4), sont parmi les 4 altérations génétiques majeures dans la séquence adéno-carcinome (Fearon and Vogelstein, 1990). L'invalidation du gène *SMAD4* chez la souris entraîne des polypes dans l'intestin (He et al., 2004; Takaku et al., 1999; Taketo and Takaku, 2000). Cependant la délétion du SMAD4 spécifiquement dans les cellules épithéliales intestinales ne provoque pas l'apparition de tumeurs, en revanche la délétion du Smad4 spécifiquement dans les cellules du système immunitaire entraîne des tumeurs épithéliales (Kim B.G et al., 2006). La présence

des adénocarcinomes invasifs a été décrite dans le côlon des souris déficientes pour le gène *SMAD3* (Zhu et al, 1998).

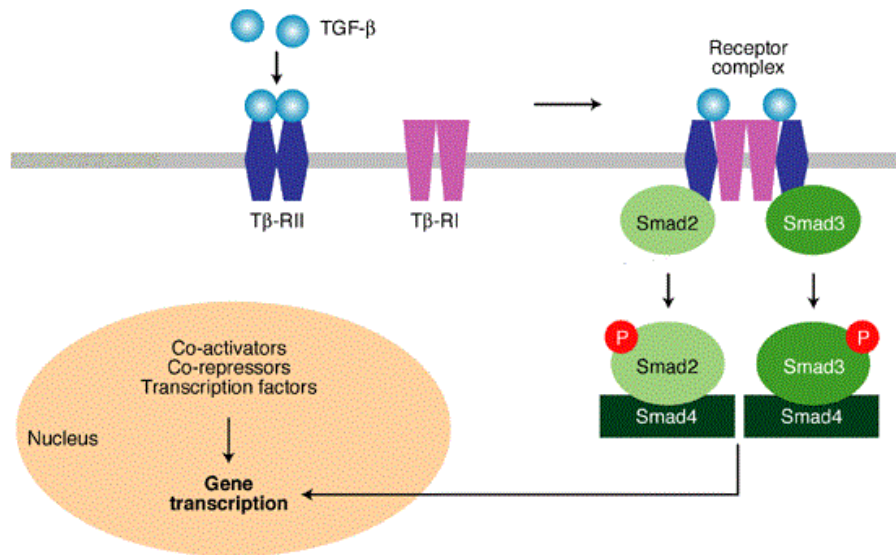


Figure 31 : Le TGFβ se fixe sur ses récepteurs : TβRII et TβRI. La formation du complexe hétérotétramérique induit la phosphorylation des SMAD2 et SMAD3. Le SMAD2 et SMAD3 interagissent avec le SMAD4. Le complexe formé de SMAD2/3 et 4 est transloqué dans le noyau où il active ou réprime l'expression des gènes cibles en combinaison avec d'autres facteurs de transcription et cofacteurs.

IV.6.4 Le gène *p53*

Le gène *p53* est un gène suppresseur de tumeurs, situé sur le chromosome 17, siège fréquent de délétions chromosomiques dans les CCR (Baker et al., 1989; Delattre et al., 1989). De nombreuses études ont décrit ce gène étant muté dans le cancer colorectal (Kinzler and Vogelstein, 1996; Sakai et al., 2003; Conlin et al., 2005; Hoff, 2005). Le *p53* est un facteur de transcription, qui régule l'expression de nombreux gènes importants dans l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation des mésappariements et l'apoptose. Lorsqu'il est activé suite aux stress cellulaires, il provoque l'arrêt du cycle cellulaire en activant l'expression de *p21*. Le gène *p53* peut aussi induire l'apoptose en stimulant l'expression des gènes pro-apoptotiques (*c-myc*, *puma*, *noxa*, *bax*...), en réprimant celle des gènes anti-apoptiques (*bcl-2* et *bcl-xL*), en stimulant l'expression d'effecteurs de l'apoptose APAF-1 et des caspases. Il est également capable d'inhiber la voie de survie cellulaire PI3 kinase/AKT(Phosphatidylinositol-3-Kinase) et l'expression de PTEN l'inhibiteur de la PI3 kinase

(Stambolic et al., 2001) . De par son rôle clé dans le maintien de l'intégrité de l'information génétique, on l'a souvent décrit comme étant le gardien du génome.

IV.7 Modèles murins de cancers colorectaux

IV.7.1 Modèles génétiques

Une grande majorité de modèles murins génétiques mimant les CCR humains sont basés sur des mutations du gène *APC*, modèles qui ont permis de démontrer le rôle de la voie Wnt dans la tumorigenèse intestinale.

Le premier modèle murin basé sur une mutation du gène *APC* est la souris *APC*^{Min/+} qui possède à l'état hétérozygote un allèle du gène *APC* présentant une mutation non-sens sur le codon 850. Ces souris développent en moyenne une trentaine d'adénomes dans l'intestin grêle et plus rarement dans le côlon dès l'âge de quatre mois (Moser et al., 1990; Su et al., 1992).

Les autres modèles liés à des mutations/délétions du gène *APC* ont été générés par recombinaison homologue.

Le modèle *APC*^{+ / Δ 716} est lié à la mutation, aboutissant à une protéine tronquée de 716 acides aminés où les domaines d'interactions avec la β -caténine, l'axine et les microtubules sont délétés. Les souris hétérozygotes pour cette mutation développent de nombreux adénomes (~ 300) au niveau desquels l'allèle sauvage du gène *APC* est perdu suite à des réarrangements chromosomiques (Oshima et al., 1995). Même si ces adénomes apparaissent dans l'intestin grêle plutôt que dans le côlon ces souris sont utilisées comme un modèle de FAP.

Les souris avec un allèle muté *APC*^{+ /1638N} expriment une protéine composée des 1638 premiers acides aminés, donc sans le domaine d'interaction avec la β -caténine, l'axine et les microtubules. Ces souris développent progressivement des cryptes aberrantes, des polypes, des adénomes et carcinomes dans l'intestin grêle et le côlon (Fodde et al., 1994). Ces animaux survivent plus longtemps que les souris *APC*^{Min/+} et peuvent également présenter des kystes, des tumeurs desmoïdes et des anomalies au niveau de l'épithélium pigmentaire de la rétine (Marcus et al., 1997; Smits et al., 1998).

Dans le modèle de souris *APC*^{+ / Δ 14}, l'exon 14 du gène *APC* a été délété (Colnot et al., 2004) aboutissant à une protéine tronquée de 580 acides aminés. Ces souris développent des tumeurs dans

l'ensemble de l'intestin et le côlon, ce qui se rapproche de la pathologie humaine. De plus les tumeurs apparaissent plus tôt et sont de tailles plus importantes que les souris APC^{Min/+} (Colnot et al., 2004).

Récemment, un modèle de souris conditionnelle où l'exon 15 du gène APC est encadré de séquences loxP a été créé permettant une invalidation conditionnelle. La délétion complète de l'exon 15, qui est le plus grand exon du gène APC et qui contient la majeure partie des domaines d'interactions avec différentes protéines (β -caténine, axine, microtubules), aboutit à une protéine de 74kDa. La délétion de l'exon 15 via la souris Fabp1-Cre permet la formation d'un grand nombre de tumeurs dans tout l'ensemble du gros intestin: caecum, côlon, rectum (Robanus-Maandag et al., 2010).

De nombreux modèles murins basés sur les mutations des gènes du système MMR (Mismatch Repair) ont été créés afin de mimer le syndrome HNPCC.

Les souris déficientes pour les gènes Msh2, Mlh1, ou Pms2 présentent d'une façon attendue une instabilité de microsatellites, mais développent plutôt des lymphomes et des sarcomes. Les souris Msh2^{-/-} et Mlh2^{-/-} développent également des tumeurs dans l'intestin grêle, mais pas dans le côlon (Baker et al., 1989). Les souris Pms2^{-/-}, quant à elles, ne développent de tumeurs ni dans l'intestin ni dans le côlon. En revanche, les souris double transgéniques Pms2^{-/-} APC^{Min/+} développent 3 fois plus d'adénomes intestinaux et quatre fois plus d'adénomes coliques comparé aux souris APC^{Min/+} (Baker et al., 1989).

IV.7.2 Modèles chimiques

Il existe également des modèles chimiques de CCR. Les carcinogènes chimiques couramment utilisés dans les études de CCR sont les amines aromatiques, hétérocycliques, les composés comme l'alkyl-nitrosamide et l'azoxyméthane. Tous ces agents fonctionnent d'une manière identique en formant des adduits sur l'ADN, qui conduisent après la réparation par le système MMR à l'incorporation de mutations.

L'amine aromatique DMBA (3,2 -diméthyl-4-aminobiphényle) est capable d'induire des tumeurs épithéliales bénignes et malignes au niveau du côlon chez la souris. Elle nécessite de multiples injections chez la souris et peut induire également des tumeurs dans d'autres organes.

Les amines hétérocycliques comme l'IQ (2-amino-3,3-méthylimidazo [4,5-f] quinoline) et le PhIP (2-amino-1-méthyl-6-phenylimidazol pyridine) sont également capables d'induire des tumeurs coliques, pourtant elles présentent une forte toxicité et induisent également des tumeurs dans d'autres organes,

comme la glande mammaire et la prostate. Les tumeurs coliques induites par le PhIP ont été décrites pour l'instabilité de microsatellites, des mutations au niveau du gène APC. Aucune mutation au niveau des gènes *KRAS* et *p53* n'a été décrite dans ces tumeurs coliques.

Les composés d'alkylnitrosamides tels que le MNU (N-Methyl-N-nitroso-urée) ou le MNNG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) induisent également les tumeurs coliques. Pourtant l'incidence tumorale causée par ces agents est très faible et le temps nécessaire au développement tumoral est très long. Le MNU induit également des tumeurs au niveau de l'intestin grêle (Qin et al., 2000).

L'AOM (azoxyméthane) est aujourd'hui le carcinogène le plus couramment utilisé dans les études sur les CCR. Il présente l'avantage de cibler préférentiellement les tumeurs dans le côlon et d'y induire un grand nombre des tumeurs. Son principe actif est de former des adduits (Papanikolaou et al., 1998) sur l'ADN, se traduisant après la réplication par l'apparition de mutations ponctuelles entraînant le remplacement de la paire de base G :: C en A :: T (Takahashi and Wakabayashi, 2004). L'AOM a ainsi été montré comme créant des mutations au niveau des gènes comme la *β-caténine*, *KRAS*, des gènes du système MMR. Certaines études montrent que les gènes *APC*, *p53* ne sont pas souvent mutés dans des tumeurs coliques induites par l'AOM (Kobaek-Larsen et al., 2000). Dans de rares cas ont été observées des tumeurs dans la partie proximale de l'intestin ainsi que des lymphomes ou des cancers de la peau (Ochiai et al., 2001). L'action de l'AOM dépend énormément du fond génétique des souris. Ainsi les souris AKR/J ne présentent aucune tumeur induite par l'AOM au bout de six mois, tandis qu'on observe plus d'une trentaine de tumeurs chez les souris A/J pour la même période (Papanikolaou et al., 1998). Il est intéressant de noter que les souris AKR/J sont toutefois susceptibles de développer des cryptes aberrantes considérées comme étant des lésions précurseur des tumeurs coliques. Il semble que ce sont les mécanismes, faisant passer la crypte aberrante en tumeur, qui soient à l'origine de la résistance à l'induction tumorale à l'AOM chez ces souris AKR/J (Papanikolaou et al., 1998). Les tumeurs observées sont en très large majorité des adénocarcinomes.

Aujourd'hui, un traitement combinant l'AOM avec le dextran sulfate de sodium (DSS) est aussi couramment utilisé. Le DSS est un détergent qui induit une abrasion de la muqueuse conduisant à une ulcération du tissu intestinal avec inflammation, puis à une réparation. Il est utilisé à ce titre pour reproduire les pathologies humaines d'inflammations intestinales. L'administration de DSS dans l'eau de boisson aux souris traitées préalablement avec l'AOM, aboutit rapidement à des adénocarcinomes coliques, permettant de diminuer considérablement le temps de latence comparé à un traitement

classique avec l'AOM (Neufert et al., 2007; De Robertis et al., 2011). Même si le modèle AOM/DSS est souvent décrit et utilisé comme un modèle de tumeurs colorectales associées à l'inflammation, il est en fait bien plus proche d'un modèle de cancer colorectal sporadique. Ainsi des études chez les rongeurs ont révélé que les tumeurs coliques induites par le traitement l'AOM/DSS présentent des caractéristiques très semblables au CCR humain, aussi bien au niveau histologique qu'au niveau moléculaire. On n'y retrouve pas de mutations du gène *p53* comme c'est le cas en pathologie humaine dans les tumeurs colorectales associées à l'inflammation (De Robertis et al., 2011). Il a été montré que les tumeurs coliques induites par ce traitement présentaient des mutations au niveau du gène *APC*, de la *β -caténine*, *KRAS* (Vivona et al., 1993; Tanaka, 2012). Le traitement AOM/DSS initie la tumorigenèse à partir de cryptes aberrantes, pouvant progresser en adénome puis adénocarcinomes, ce qui rend possible l'étude du CCR à plusieurs stades du développement tumoral (De Robertis et al., 2011). La distribution du DSS dans l'eau de boisson chez la souris *APC^{Min/+}* augmente fortement l'incidence des cryptes dysplasiques et des tumeurs coliques (Tanaka, 2012).

IV.8 Laminine 111 et le cancer colorectal

Une analyse comparative de différentes isoformes de laminines dans des tumeurs épithéliales humaines a mis en évidence une expression différentielle de la LM111 présente dans un certain nombre de carcinomes (poumon, sein, ovaire, thyroïde, rein, prostate) et absente totalement dans d'autres (gastrique, langue) (Patarroyo et al., 2002; Määttä et al., 2001). Dans des carcinomes coliques, 1 carcinome sur 6 s'est révélé positif pour la détection de la chaîne $\alpha 1$ de laminine (LM $\alpha 1$) en immunohistochimie (Määttä et al., 2001). L'action stimulatrice de la LM $\alpha 1$ sur la tumorigenèse colique a été démontrée au laboratoire. En effet, des cellules HT29, qui sont des cellules issues de cellules cancéreuses coliques et qui n'expriment pas la chaîne $\alpha 1$, ont été transfectées avec un vecteur d'expression de la chaîne $\alpha 1$. Ces cellules transfectées injectées à des souris nude produisent des tumeurs de tailles plus importantes comparées aux tumeurs dérivant de cellules non transfectées. Par ailleurs, les tumeurs provenant des cellules surexprimant la LM $\alpha 1$ sont plus richement vascularisées (De Arcangelis et al., 2001).

Une étude japonaise de 2005 a montré que les patients atteints d'un cancer colorectal, présente un très fort taux de laminine circulante dans leur sérum et que ce fort taux est associé à un plus mauvais

pronostique (Saito and Kameoka, 2005). Les résultats de cette étude, obtenus par un test ELISA détectant toutes les chaînes de laminines, ne permettent pas de déduire quelle chaîne de laminine présente ce fort taux.

Résultats

**Partie I. Etude du rôle de la LM α 1 dans le
développement rétinien et l'angiogenèse
physiologique**

Cette étude consiste à analyser le rôle de la LM α 1 dans le développement rétinien en utilisant un modèle de perte de fonction pour la LM α 1 et un modèle de mutation ponctuelle dans le domaine LN de la LM α 1.

I. RESUME

Ce travail a été réalisé en collaboration étroite entre l'équipe américaine dirigée par le Dr Patsy Nishina (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine) et la nôtre. Cette équipe cherchait à identifier des gènes impliqués dans l'angiogenèse rétinienne. Pour cela, elle a utilisé une approche de mutagenèse en traitant des souris mâles par un agent mutagène, l'ENU (Ethyl-nitroso-urée). La descendance issue du croisement de ces souris mâles avec les souris femelles a été analysée dans le but de rechercher un phénotype oculaire. L'une de ces souris transmet à sa descendance, selon un mode récessif, une pathologie caractérisée par une fibroplasie rétinienne et une désorganisation du réseau vasculaire, visible par examen du fond de l'œil. La cartographie de la mutation, appelée nmf223, a permis de montrer qu'elle se situait dans le gène *Lama1* codant pour la LM α 1, changeant la tyrosine 265 (conservée chez l'homme et la souris et également entre plusieurs chaînes de laminines) au niveau du domaine LN, en une cystéine. Ce domaine LN est le domaine NH₂ terminal qui permet la polymérisation des laminines entre elles ainsi que la liaison à des récepteurs membranaires de type intégrines. En parallèle, nous avons développé au laboratoire une stratégie pour contourner le problème de létalité embryonnaire précoce des souris invalidées pour le gène *Lama1*, létalité due à l'absence de la membrane extra-embryonnaire, appelée la membrane de Reichert (Alpy et al., 2005). Les souris *Lama1*^{flox/flox} ont été croisées avec des souris transgéniques exprimant la recombinase Cre sous le contrôle du promoteur Sox2 (Hayashi et al., 2002). Le Sox2 est un marqueur des cellules souches, qui est de façon précoce spécifiquement exprimé dans l'épiblaste (structure embryonnaire donnant le futur embryon), mais pas dans les annexes extra-embryonnaires, donc sans répercussion sur la membrane de Reichert. L'analyse génomique par PCR de différents organes nous a permis de démontrer la présence unique de l'allèle délété chez les souris *Lama1*^{-/-} Sox2-Cre. Ces souris peuvent donc être considérées comme des souris totalement invalidées pour le gène *Lama1*. Etonnamment, malgré tous les sites d'expression de la LM α 1 décrits dans la littérature

au niveau embryonnaire et chez l'adulte, nous avons obtenu des souris *Lama1*^{-/-} *Sox2-Cre* viables, fertiles.

L'analyse des rétines des souris *Lama1*^{-/-} *Sox2-Cre* nous a permis de montrer que ces souris présentaient une profonde altération de leur rétine tant par l'absence de la lame basale au niveau de la membrane limitante interne (ILM), ce qui entraîne un déficit en cellules ganglionnaires et une désorganisation des cellules de Müller, dont les prolongements, au lieu de s'arrêter normalement au niveau de l'ILM, se retrouvent à différents niveaux de la rétine et dans l'humeur vitrée. Enfin ces animaux présentent une profonde perturbation du réseau vasculaire qui apparaît tortueux avec une persistance du réseau hyaloïde. Des tests optomoteurs et des électro-rétinogrammes ont confirmé le défaut rétinien et permis de conclure que les souris *Lama1*^{-/-}*Sox2-Cre* sont aveugles. Les souris *Lama1*^{n^{mf}223/n^{mf}223} de l'équipe collaboratrice présentent les mêmes défauts rétiens, qui s'accroissent avec le vieillissement des animaux mais qui restent moins sévères que ceux des souris totalement invalidées pour le gène *Lama1*.

Il a été démontré que les interactions des domaines LN de type α 1- α 1, α 1- β 1, α 1- γ 1, β 1- γ 1 des laminines aboutissent à la formation du réseau des laminines dans la lame basale (Cheng et al., 1997; Odenthal et al., 2004). Ma contribution à ce travail a consisté à étudier l'impact de la mutation Y265C sur les interactions entre domaines LN des chaînes α 1, β 1 et γ 1 de laminines (LM α 1, LM β 1 et LM γ 1). Pour cela j'ai développé au laboratoire une technique de double hybride chez *Escherichia coli* (E.Coli) appelée BACTH pour "Bacterial Adenylate Cyclase-based Two-Hybrid" (Karimova et al., 1998). Le principe de cette technique est le suivant : les gènes de protéines d'intérêt sont fusionnés à deux domaines complémentaires (T18 et T25) constituant le domaine catalytique de l'adénylate cyclase de *Bordetella pertussis*. Les gènes pour des protéines sont exprimés dans une lignée *Escherichia coli* déficiente en adénylate cyclase. Si les deux protéines interagissent, il y a complémentation fonctionnelle entre T18 et T25, ce qui aboutit à la synthèse d'AMPc, qui est quantifiable par l'activité de la β -galactosidase (enzyme régulée par le complexe AMPc/CAP). J'ai pu montrer que la mutation Y265C diminue effectivement l'interaction des domaines LN entre eux mais également avec les domaines LN des LM β 1 et LM γ 1 (**Figure 7, page 7705 de la publication 1**), ce qui conduit probablement à une fragilisation locale de la lame basale rétinienne.

**II. PUBLICATION 1 : MUTATIONS IN LAMA1 DISRUPT
RETINAL VASCULAR DEVELOPMENT AND INNER
LIMITING MEMBRANE FORMATION**

Mutations in *Lama1* Disrupt Retinal Vascular Development and Inner Limiting Membrane Formation^{*S}

Received for publication, September 23, 2009, and in revised form, December 16, 2009. Published, JBC Papers in Press, January 4, 2010, DOI 10.1074/jbc.M109.069575

Malia M. Edwards^{†1}, Elmina Mammadova-Bach[§], Fabien Alpy^{§2}, Annick Klein[§], Wanda L. Hicks[‡], Michel Roux[¶], Patricia Simon-Assmann[§], Richard S. Smith[‡], Gertraud Orend[§], Jiang Wu^{||}, Neal S. Peachey^{||**‡‡}, Jürgen K. Naggert[‡], Olivier Lefebvre^{§3}, and Patsy M. Nishina^{†4}

From the [†]The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine 04609, [§]INSERM, U682, 3 Avenue Molière, Strasbourg F-67200, France and Université de Strasbourg, Strasbourg F-67081, France, [¶]Institut Clinique de la Souris, Illkirch 67404, France, the ^{||}Cole Eye Institute, Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, Ohio 44195, the ^{**}Research Service, Cleveland Veterans Affairs Medical Center, Cleveland, Ohio 44106, and ^{‡‡}Ophthalmology, Cleveland Clinic Lerner College of Medicine of Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio 44195

The Neuromutagenesis Facility at the Jackson Laboratory generated a mouse model of retinal vasculopathy, *nmf223*, which is characterized clinically by vitreal fibroplasia and vessel tortuosity. *nmf223* homozygotes also have reduced electroretinogram responses, which are coupled histologically with a thinning of the inner nuclear layer. The *nmf223* locus was mapped to chromosome 17, and a missense mutation was identified in *Lama1* that leads to the substitution of cysteine for a tyrosine at amino acid 265 of laminin $\alpha 1$, a basement membrane protein. Despite normal localization of laminin $\alpha 1$ and other components of the inner limiting membrane, a reduced integrity of this structure was suggested by ectopic cells and blood vessels within the vitreous. Immunohistochemical characterization of *nmf223* homozygous retinas demonstrated the abnormal migration of retinal astrocytes into the vitreous along with the persistence of hyaloid vasculature. The Y265C mutation significantly reduced laminin N-terminal domain (LN) interactions in a bacterial two-hybrid system. Therefore, this mutation could affect interactions between laminin $\alpha 1$ and other laminin chains. To expand upon these findings, a *Lama1* null mutant, *Lama1^{tm1.1Olf}*, was generated that exhibits a similar but more severe retinal phenotype than that seen in *nmf223* homozygotes. The increased severity of the *Lama1* null mutant phenotype is probably due to the complete loss of the inner limiting membrane in these mice. This first report of viable *Lama1* mouse mutants emphasizes the importance of this gene in retinal development. The data presented herein suggest that hypomorphic mutations in human *LAMA1* could lead to retinal disease.

* This work was supported, in whole or in part, by National Institutes of Health Grants EY011996, EY016501, and R24EY16538 and Grant CA34196 (to The Jackson Laboratory). This work was also supported by the Department of Veterans Affairs, Foundation Fighting Blindness, Research to Prevent Blindness, Association pour la Recherche sur le Cancer Grant 3666, Institut National du Cancer and Cancéropôle Grand-Est.

^S The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Fig. 1.

¹ Present address: Wilmer Ophthalmological Institute, Department of Ophthalmology, The Johns Hopkins Hospital, Baltimore, MD 21287.

² Present address: IGBMC, 1 Rue Laurent Fries BP 163, Illkirch Graffenstaden F-67404, France.

³ To whom correspondence may be addressed. Tel.: 33-3-88-27-77-27; Fax: 33-3-88-26-35-38; E-mail: olivier.lefebvre@inserm.fr.

⁴ To whom correspondence may be addressed: The Jackson Laboratory, 600 Main St., Bar Harbor, ME 04609. Tel.: 207-288-6383; Fax: 207-288-6079; E-mail: patsy.nishina@jax.org.

Laminins are a family of heterotrimeric glycoproteins required for basal lamina formation (1, 2). The 15 known laminin isoforms each contain one of the five α , three β , and three γ chains and have distinct functions and tissue expression patterns. Although $\alpha 1$ is the first α chain to appear during embryonic development and is widely expressed during organogenesis (3, 4), its expression in adults is highly restricted, being observed primarily in the central nervous system, eye, kidney, digestive system, and reproductive organs (5). Within the eye, laminin $\alpha 1$ is expressed in the inner limiting membrane as well as the ciliary body and lens (5–7). Furthermore, the gene encoding laminin $\alpha 1$, *LAMA1*, and several peptides derived from laminin $\alpha 1$ have been shown to induce angiogenic sprouting in cell culture and angiogenesis in chicken chorioallantoic membrane assays (8, 9). It has been difficult to study the functional role of this gene beyond embryogenesis, because all *Lama1* mouse mutants generated to date die by embryonic day 7 (10, 11). Mutant zebrafish, however, have provided some insights into the function of *lama1* (12–16). Zebrafish produced with *lama1* knockdown morpholinos were shown to develop severe lens degeneration by 48 h postfertilization with apparent reduction in eye size by 72 h (16). In separate studies, zebrafish with mutations in *lama1* were shown to have defects in axonal guidance (13, 14). Another study identified a zebrafish *lama1* mutant, *lama1^{ac69}*, in a forward genetic screen that carries a cysteine to serine substitution at amino acid 56 (15). At 10 days postfertilization, *lama1^{ac69}* zebrafish have a reduced body axis and early lens degeneration as well as defects of retinal ganglion cells and of hyaloid vessels, which provide nutrients to the retina prior to its vascularization. *Lama1* zebrafish mutants also exhibit inner limiting membrane disruptions and shortened Müller cell end-feet (12). Although these studies indicate the importance of *lama1* in retinal development, the effects of these mutations in the adult retina could not be determined because they are larval lethal. In particular, the potential involvement of *lama1* in retinal vascular development could not be discerned because zebrafish models die prior to the initiation of this process.

The present study reports a mouse mutant in which a missense mutation generated by chemical mutagenesis in the *Lama1* gene disrupts retinal development. In order to better understand the functional consequences of this mutation, a

Mutations in Lama1 Disrupt Retinal Development

Lama1 null mouse was generated using Cre-lox technology. The normal life span of the *Lama1* mouse mutants discussed herein allowed the investigation of the role(s) that laminin $\alpha 1$ plays in retinal vessel and inner limiting membrane development.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Generation of Mutants by The Jackson Laboratory Neuroscience Mutagenesis Facility—C57BL/6J (B6) male mice (G0) were administered *N*-ethyl-*N*-nitrosourea in three intraperitoneal injections at 80 mg/kg over a period of 3–4 weeks. After returning to fertility, the G0 mice were mated to B6 females to produce G1 male mice, which were subsequently mated to B6 females to generate G2 progeny. G3 mice, generated by backcrossing G2 females to G1 sires, were screened for retinal abnormalities by indirect ophthalmoscopy at 12 weeks of age. Mice with the mutant phenotype, named *nmf223*, were outcrossed to B6 animals, and the resultant F1 mice were intercrossed to determine the mode of heritability.

Generation of *Lama1* ^{Δ} , Tg(*Sox2-cre*)1Amc Mice—Generation of the *Lama1*^{*tm1.1Olf*} (herein referred to as *Lama1* ^{Δ}) heterozygous and *Lama1*^{*tm1Olf*} (herein referred to as *Lama1*^{*flxed*}) homozygous mice has been described previously (10). Heterozygous *Lama1* ^{Δ} mice carrying the Tg(*Sox2-cre*)1Amc transgene were generated by crossing *Lama1* ^{Δ} heterozygotes to mice carrying the Tg(*Sox2-cre*)1Amc transgene (17). F1 progeny heterozygous for *Lama1* ^{Δ} and hemizygous for Tg(*Sox2-cre*)1Amc were crossed to *Lama1*^{*flxed*} homozygotes to generate mice homozygous for *Lama1* ^{Δ} and hemizygous for Tg(*Sox2-cre*)1Amc. The Tg(*Sox2-cre*)1Amc mice were on a mixed B6, CBA, and Swiss Webster background, and the *Lama1*^{*flxed*} mice were on a CD1 background. Genomic DNA was extracted from various organs, and genotypes were analyzed by PCR. *Lama1* wild type (WT)⁵ and *Lama1*^{*flxed*} alleles were detected using primers Ln127 (5'-GGCTGCACTAGGTAGAGTTTGAACGTACAG) and Ln135 (5'-GATGCTGCCCTGGTTGGTCTTGAATTTATG) generating a 345-bp and a 515-bp fragment, respectively. The *Lama1*^{*flxed*} allele was detected using primers Ln126 (5'-CCTCGGGGATTGCTTTACAACAAACAATGT-3') and Ln137LPN (5'-CTCAGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTCGA-3'). The *Lama1* inactivated allele (*Lama1* ^{Δ}) was detected using primers Ln123 (5'-GAACAGCAAGTGTTTAAGCCCCCTAAACCC-3') and Ln127. The Tg(*Sox2-cre*)1Amc transgene was amplified using primer AFX2 (5'-GCAT-TACCGTTCGATGCAACGAGTGATGAG-3') and AFX3 (5'-GAGTGAACGAACCTGGTTCGAAATCAGTGCG-3').

Mouse Husbandry—The *nmf223* mice were bred and housed at The Jackson Laboratory, and all experimental procedures were performed according to Animal Care and Use Committee-approved protocols. Mice were fed a National Institutes of Health 6% fat diet and acidified water with a 12-h light/12-h dark cycle. The colony was maintained by homozygous and heterozygous matings, and affected animals were identified by

indirect ophthalmoscopy. *Lama1* ^{Δ} and *Lama1*^{*flxed*} animals at INSERM were maintained under similar conditions with the exception that they were fed a 3.1% fat diet. For all experiments, a minimum of three control and three mutant mice were investigated.

Genetic Mapping and Analysis—B6-*nmf223* homozygotes were mated to DBA/2J mice to generate F1 progeny, which were subsequently intercrossed. F2 progeny were phenotyped at 4 weeks of age by indirect ophthalmoscopy. DNA was isolated from tail snips using a modified version of previously described methods (18). A genome-wide scan using simple sequence length polymorphic markers to determine the map position of *nmf223* was performed by The Jackson Laboratory Fine Mapping Facility. Additional simple sequence length polymorphic markers and single nucleotide polymorphisms were used to narrow the critical region encompassing the *nmf223* mutation. All unaffected recombinant mice were progeny-tested by mating them to B6-*nmf223* homozygotes to determine if they carried the *nmf223* mutation. A minimum of 20 offspring from each progeny test were genotyped and phenotyped. PCR amplification was carried out as follows: 94 °C for 2 min, 94 °C for 30 s, annealing temperature of 55 °C for 45 s, and 72 °C for 1 min. Steps 2–4 were repeated for 35 cycles, followed by one cycle at 72 °C for 2 min. PCR products were separated by electrophoresis on a 4% MetaPhor-agarose (Lonza) gel, stained with ethidium bromide, and visualized under UV light.

For sequencing of candidate genes, total RNA was prepared from three mutant mice and three control, B6 mice. RNA was isolated from snap-frozen eyes using TRIzol (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. The Retroscript kit (Ambion) was used to generate cDNA. All genes within the critical region were amplified from cDNA using PCR assays, and purified products were sequenced by The Jackson Laboratory Allele Typing and Sequencing Service.

Complementation Testing—In order to verify that the mutation identified in *Lama1* was the *nmf223* disease-causing mutation, a complementation test was performed with the previously described *Lama1* ^{Δ} heterozygotes. *In vitro* fertilization technology was used to generate offspring from female *nmf223* homozygotes and male *Lama1* ^{Δ} heterozygotes. Progeny from the *in vitro* fertilization procedure were genotyped for the *Lama1* ^{Δ} allele and examined clinically by indirect ophthalmoscopy. A minimum of three mice with each genotype were examined.

Clinical Assessment—Mice were phenotyped by indirect ophthalmoscopy and by fluorescein angiography according to previously described methods (19).

Electroretinogram (ERG) Testing—Two systems were used to examine ERGs in *nmf223* and *Lama1* ^{Δ} mice. In both cases, responses of mutant mice were compared with those obtained from WT littermates, and a minimum of five mice per genotype were tested. The ERG system used to test *nmf223* mutants has been described previously (19). For *Lama1* ^{Δ} mice, the following procedure was used. Mice were dark-adapted for at least 12 h and subsequently handled under dim red light. Anesthesia was achieved through intramuscular injection of a mixture of ketamine (120 mg/kg) and xylazine (14 mg/kg) diluted in saline solution. The left pupil was dilated with a drop of 1% atropine

⁵ The abbreviations used are: WT, wild type; BACTH, bacterial two-hybrid; ERG, electroretinogram; GFAP, glial fibrillary acidic protein; cd, candela(s); H/E, hematoxylin and eosin; LN, laminin N-terminal domain; Pn, postnatal day *n*.

on the cornea and vibrissae were trimmed. Animals were placed on a heating plate to prevent anesthesia-induced hypothermia. The reference and ground electrodes were placed in the cheek and in the tail, respectively. The measuring gold electrode was positioned onto the cornea with a drop of methylcellulose. ERGs were recorded using VisioSystem and a Ganzfeld stimulator (SIEM Bio-Médicale, Nîmes, France). Signals were low pass-filtered at 300 Hz prior to digitization. For dark-adapted ERGs, 5–12 responses were averaged, depending on the stimulus intensity (12 for 0.001, 0.0032, 0.01, and 0.032 cd s/m² and 5 for 0.1, 0.32, 1, and 1.5 cd s/m²). Flashes were separated by 10 s for lower intensities and by 1 min for the higher stimulus intensities. All flashes were 3 ms in duration, except for 1.5 cd s/m², for which flash duration was increased to 5 ms. To extract the a- and b-waves, dark-adapted ERG data were band pass-filtered at 1–70 Hz. The a-wave amplitude was measured from the base line to the first negative peak, whereas the b-wave amplitude was measured from the a-wave to the next positive peak. After a 5-min adaptation to a background light of 24 cd/m², light-adapted ERGs were recorded with flash durations of 10 ms (1 and 3.2 cd s/m²) or 30 ms (10 cd s/m²), and five responses were averaged.

Optomotor Testing—Optomotor responses were obtained and analyzed as described previously (20).

Histological and Immunodetection Assessment—For immunofluorescence staining of cryosections, tissues were embedded in Tissue-Tek (Sakura) and frozen on dry ice. Seven- μ m cryosections were incubated for 2 h at room temperature with primary antibodies in a moist chamber. Tissues were then washed three times in phosphate-buffered saline and incubated for 1 h with secondary antibodies Alexa 488 anti-rat IgG (Jackson ImmunoResearch) and cyanine 3-conjugated anti-rabbit IgG (Molecular Probes). Primary antibodies used on cryosections included anti-laminin α 1 (1:100; antibody no. 200) (21), anti-laminin α 1 (1:300; antibody no. 1057+) (22), anti-collagen IV (1:200) (23), anti-perlecan (1:500; Roche Applied Science catalog number BMS 4057), anti-dystroglycan (1:100; Millipore catalog number VIA4-1), and anti-integrin β 1 (1:50; BD Pharmingen catalog number 9EG7) prior to a 10-min acetone fixation. After washing, nuclei were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole dye (Vector Laboratories). Slides were mounted in Aqua Polymount (PolySciences). Control sections were processed as above with the omission of the primary antibody. Observations of kidney and testes were made with a DMIRE2 fluorescence microscope (Leica) equipped with a Cool Snap HQ digital camera (Roper Scientific). Images of the retina inner limiting membrane were obtained using a Provis AX60 Olympus fluorescence microscope equipped with an Olympus F-view digital camera (Olympus Corp.) or with a Zeiss Axio Imager Z2 fluorescence microscope equipped with a Zeiss AxioCam MRm digital camera (Zeiss).

To better understand the vascular abnormalities observed, retinal vessel development in WT and *Lama1*^{nmf223} homozygotes was examined longitudinally using marker analysis of retinal whole mounts. The development of retinal astrocytes was also investigated because these glial cells are known to guide endothelial cell migration and retinal vascular development (24). Astrocytes were labeled using anti-GFAP, whereas endo-

thelial cells and developing blood vessels were visualized with *Griffonia simplicifolia* isolectin conjugated with Alexa Fluor[®] 594, which also binds to endothelial cells as well as macrophages. Hyaloid vessels were distinguished from retinal vasculature by the plane of focus, a more intense *G. simplicifolia* isolectin staining, and staining with anti-endostatin (25, 26).

For whole mount experiments, all eyes were fixed in 4% paraformaldehyde for 30 min prior to the dissection of retinas in phosphate-buffered saline. For staining of retinal vessels, *G. simplicifolia* isolectin (1:200; Molecular Probes) was applied simultaneously with the secondary antibody onto retinal whole mounts. Previously described methods were used for all other histological and immunohistochemical assessments, including electron microscopy (19). Labeling was visualized by fluorescence microscopy using a Leica DMLB microscope equipped with a SPOT[™] CCD camera (Diagnostic Instruments). A Polaroid[™] digital microscope camera model PDMC1 (Polaroid Corp.) was used to photograph hematoxylin and eosin (H/E)-stained sections. Primary antibodies used for paraffin section and whole mount retina staining included the following: glial fibrillary acidic protein (GFAP; 1:200; Dako Z0334), glutamine synthetase (1:1000; Chemicon, Millipore catalog number MAB302), endostatin (1:200; Chemicon, Millipore catalog number AB1880); calbindin (1:100; Abcam catalog number AB11426), TH1 (tyrosine hydroxylase 1) (1:100; Chemicon catalog number AB152), and VSX2 (visual system homeobox 2) (1:100; Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA) catalog number sc-21690).

ADPase histochemistry, which labels endothelial cells as well as angioblasts and vascular buds, was also used to visualize developing vessels. This was performed using a modification of the method described by Luty and McLeod (27). Images were taken under dark field using a Leica DFC 300 FX cooled-CCD color camera attached to a Leica Upright DMRXE.

Plasmid Constructions—The mouse laminin α 1 LN (from amino acid 25 to 274, accession number ENSMUSP00000043957 in the Ensembl data base) was amplified in 30 cycles by PCR using the Platinum Taq polymerase High Fidelity, according to the manufacturer's instruction (Invitrogen), with the primers Lama1 Nt up HindIII (5'-AAGCTTGCAGAGAGAGGCTTGTTCCCTGCC-3') and Lama1 Nt down BamHI (5'-GGATCCCCGCCTCCAACG-GAAATGTCTTT-3') using 0.1 ng of plasmid pCIS mouse laminin α 1 (a kind gift from Dr. Peter Yurchenco, Piscataway, NJ). The mouse laminin β 1 LN (from amino acid 69 to 316, accession number ENSMUSG00000002900; primers Lamb1 LN up HindIII (5'-AAGCTTGCAGGAACCGGAGTTTCAGCTAT-3') and Lamb1 LN down BamHI (5'-GGATCCCCCCTCGAACCACCATAT-CATA-3') and the γ 1 LN (from amino acid 42 to 280, accession number ENSMUSG00000026478; primers Lamc1 LN up HindIII (5'-AAGCTTGGGGCGGCCGCGAGCGCTGCATG-3') and Lamc1 LN down BamHI (5'-GGATCCCCGCCACAGCAA-GTCTGAGAT03') were amplified by PCR using the same procedure from mouse colon cDNA. The different PCR fragments were cloned in the pCRII-TOPO vector, according to the manufacturer's instruction (Invitrogen), to generate the plasmids pCRII-TOPO Lama1, Lamb1, or Lamc1 LN. The GeneEditor *in vitro* site-directed mutagenesis system (Promega) with the primer Lama1NT LNmf223 (5'-AGACCTTGACCCCATTTGTCAG-

Mutations in *Lama1* Disrupt Retinal Development

CGTCGTTATTGCTATTCGATAAAAAGACATTTCC-3') was used to introduce a point mutation changing the tyrosine at position 265 to a cysteine (in order to generate the *nmf223* mutation), according to the manufacturer's instructions to generate the plasmid containing the pCRII-TOPO *Lama1* LN $nmf223$ domain. The different plasmids were then digested with HindIII + BamHI restriction enzymes. Inserts were gel-purified using the Ultra agarose spin kit according to the manufacturer's instructions (ABgene, Courtaboeuf, France) and subcloned in gel-purified vector pUT18 or pKNT25 from the bacterial double hybrid (BACTH) system kit (Euromedex) that were restriction-digested with HindIII + BamHI to generate constructs pUT18 *Lama1* LN, *Lama1* LN $nmf223$, *Lamb1* LN, or *Lamc1* LN and pKNT25 *Lama1* LN, *Lama1* LN $nmf223$, *Lamb1* LN, or *Lamc1* LN fragments. All constructs were verified by sequencing at the IGBMC (Illkirch, France) sequencing facility.

BACTH and β -Galactosidase Activity Measurements—The BACTH system kit (28) was chosen because it permits an evaluation of the strength between two interacting proteins. The system is based on the interaction-mediated reconstitution of the adenylate cyclase activity in *Escherichia coli*, which allows cyclic AMP to bind with the catabolite activator protein. Given that the cAMP-catabolite activator protein complex is a pleiotropic regulator of gene transcription in *E. coli*, its formation turns on the expression of several resident genes, including genes of the *lac* operon involved in lactose catabolism. The efficiency of complementation between the two-hybrid proteins can then be quantified by assaying the β -galactosidase enzymatic activities in bacterial extracts, which is correlated with cAMP levels produced in the bacteria.

0.5 ng of different combinations of pUT18 plus pKNT25-derived constructs were electroporated into the bacterial strain BTH101 (F⁻, *cya*-99, *araD*139, *galE*15, *galK*16, *rpsL*1, *hsdR*2, *mcrA*1, *mcrB*1) and selected on a Luria-Bertani (LB) medium agar plate containing ampicillin (100 μ g/ml), kanamycin (50 μ g/ml), in the presence of 50 μ l of 2% 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-gal) and 10 μ l of 100 mM isopropyl β -D-thiogalactopyranoside, at 30 °C for 48–72 h.

Blue colonies (white for the empty vectors and the combination of β 1 LN plus β 1 LN or γ 1 LN plus γ 1 LN) were cultured in 3 ml of LB medium containing ampicillin (100 μ g/ml), kanamycin (50 μ g/ml), and 0.5 mM isopropyl β -D-thiogalactopyranoside overnight at 30 °C. The different samples were then diluted to obtain an absorbance at 600 nm of 0.6. After centrifugation at 4000 \times *g* for 15 min at 4 °C, the pellets were resuspended in 50 μ l of lysis buffer from the β -galactosidase assay kit (Invitrogen), frozen on dry ice, and thawed at 37 °C three times in order to rupture bacterial membranes. After removing insoluble materials by centrifugation at 4000 \times *g* for 10 min at 4 °C, the amount of protein present in the supernatant was measured using the protein assay kit (Bio-Rad). β -Galactosidase activity was then measured using the β -galactosidase assay kit according to the manufacturer's instructions (Invitrogen) and calculated as the nmol of orthonitrophenyl- β -D-galactopyranoside hydrolyzed/mg of protein. Four independent electroporation experiments with at least three clones per condition were analyzed. The results are presented as the mean -fold change of the

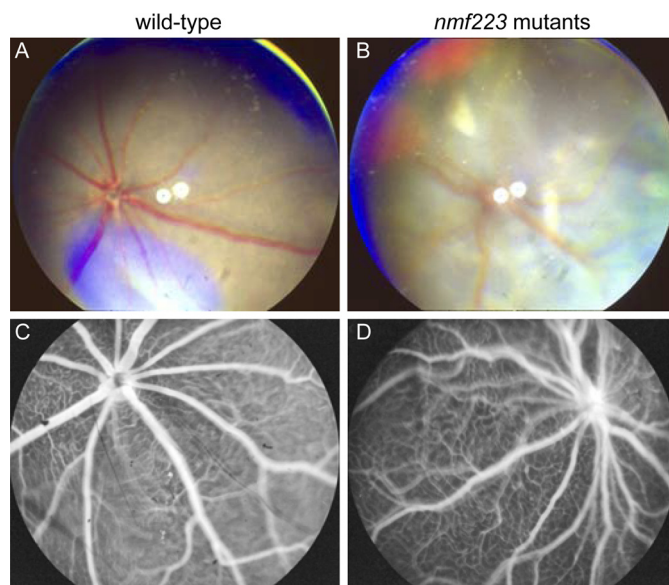


FIGURE 1. Clinical assessment of *nmf223* mutants reveals vitreal and retinal abnormalities. Fundus photographs and fluorescein angiography of littermate control (A and C) and *nmf223* homozygotes (B and D) at 8 weeks of age are shown. Mutants exhibit vitreal fibroplasia, white spots, and vessel tortuosity.

Lama1 LN $nmf223$ domain compared with the wild type *Lama1* LN.

The results were analyzed using GraphPad Prism version 5.0. The Shapiro-Wilk normality test was used to confirm the normality of the data, the difference in variance was analyzed using the F-test, and the statistical difference of the mean was analyzed using Student's unpaired two-tailed *t* test with Welch's correction in case of unequal variances. The one-way analysis of variance Kruskal-Wallis test following by Dunn's multiple comparison post-test was used for multiple data comparison.

RESULTS

***nmf223* Mutants Exhibit Vitreal Fibroplasia and Vascular Abnormalities**—Indirect ophthalmoscopy of *nmf223* homozygotes revealed abnormalities, including small white retinal spots, vitreal fibroplasia (which presents as cobweb-like material covering the retina), and vessel tortuosity, that were not seen in WT littermates (Fig. 1, A and B). Fluorescein angiography further demonstrated the vascular tortuosity and also revealed hypervascularization of the retina in *nmf223* mutants (Fig. 1, C and D). These features were observed as early as 3 weeks of age, the earliest time point investigated, and remained unchanged in mice as old as 2 years, indicating that the clinical phenotype of *nmf223* homozygotes is stable.

The *nmf223* Phenotype Is Caused by a Recessive Mutation in *Lama1*—When mice bearing the *nmf223* phenotype were outcrossed to B6 animals, the resulting F1 mice were phenotypically normal. When F1 progeny were intercrossed ~25% of F2 progeny were affected, consistent with a single recessive mutation.

The *nmf223* locus was mapped to mouse chromosome 17, between microsatellite markers *D17Mit89* and *D17Mit160*. Identification of critical genetic recombinants and progeny testing of potentially informative, unaffected animals refined

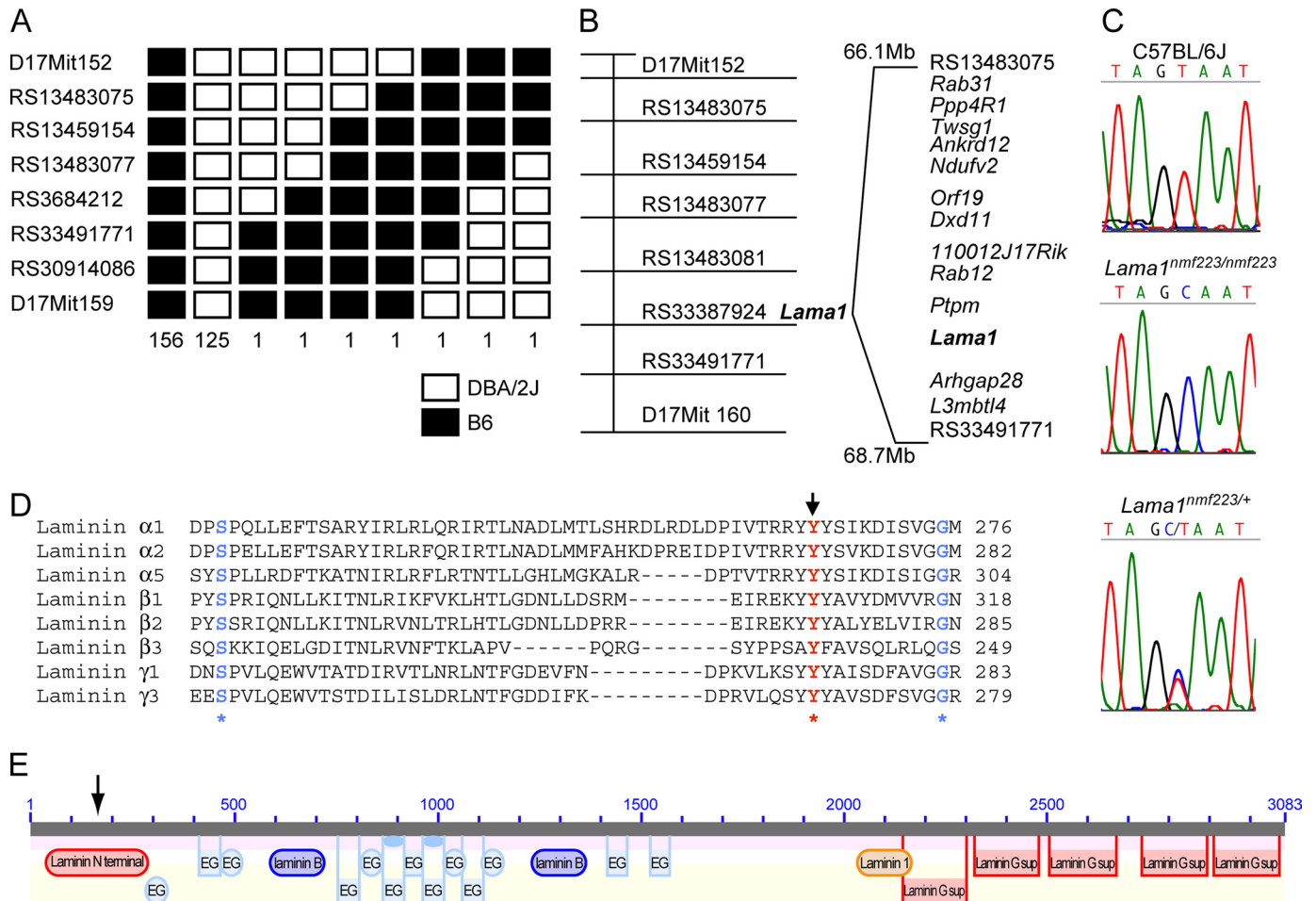


FIGURE 2. **Positional cloning and direct sequencing reveals that *nmf223* mice carry a mutation in *Lama1* in a highly conserved amino acid.** *A*, haplotype figure of progeny-tested unaffected and affected informative mice carrying recombinations that define the critical interval. The numbers at the bottom represent the number of chromosomes of each haplotype. *B*, genetic map showing genes and markers within the critical region. *C*, chromatographs depicting the A to G missense mutation observed in *nmf223* mice (antisense strand). *D*, conservation of amino acid 265 among laminin chains with an LN. The arrows indicate the mutation site in *D* and *E*.

the minimal genomic region to 2.6 Mb between single nucleotide polymorphisms RS13483075 and RS33491771 (Fig. 2, *A* and *B*). Sequence analysis of *Lama1*, contained in the critical region, revealed an A to G missense mutation at nucleotide 794 that is predicted to change amino acid 265 from a hydrophilic tyrosine to a hydrophobic cysteine residue (Y265C). This mutation was confirmed by comparing sequence from genomic DNA in affected, control, and F1 animals (Fig. 2*C*). Both the original nucleotide and the amino acid it encodes are highly conserved across all vertebrate species for which *Lama1* sequence is available. The affected amino acid lies in the end of the N-terminal domain (LN) of *Lama1* (Fig. 2*E*). Interestingly, this central Tyr in the YYY motif is among few amino acids conserved in all laminin subunits containing an LN (Fig. 2*D*).

In order to verify that *Lama1* carries the mutation responsible for the *nmf223* phenotype, homozygous *nmf223* mice were crossed to heterozygous *Lama1*^Δ mice (10). Retinas from *nmf223* heterozygotes not carrying the *Lama1*^Δ allele were identical to those of WT mice when viewed by indirect ophthalmoscopy (Fig. 3*A*). The phenotype of *Lama1*^{nmf223/Δ} compound heterozygotes, however, was comparable with *nmf223* mutants with white spots, vitreal fibroplasia, and vessel tortuosity (Fig. 3*B*), confirming that

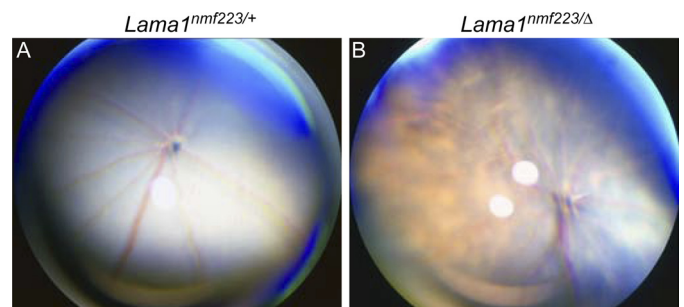


FIGURE 3. **Complementation test confirms that the *nmf223* phenotype is due to a mutation in *Lama1*.** Fundus photographs demonstrate a normal fundus in *Lama1*^{+/nmf223} mice (*A*), whereas *Lama1*^{Δ/nmf223} mice experience vitreal fibroplasia and vessel tortuosity (*B*).

nmf223 is a mutant allele of *Lama1*. The *nmf223* allele will now be designated as *Lama1*^{nmf223}.

The Localization of Laminin α1 and Other Inner Limiting Membrane Components Is Unaltered in the Retinas of Lama1nmf223 Homozygotes—In order to determine whether the Y265C mutation disrupted the localization of laminin α1 in the retina, immunohistochemical studies were performed using both a monoclonal antibody 200 (21, 29) and a polyclonal anti-

Mutations in Lama1 Disrupt Retinal Development

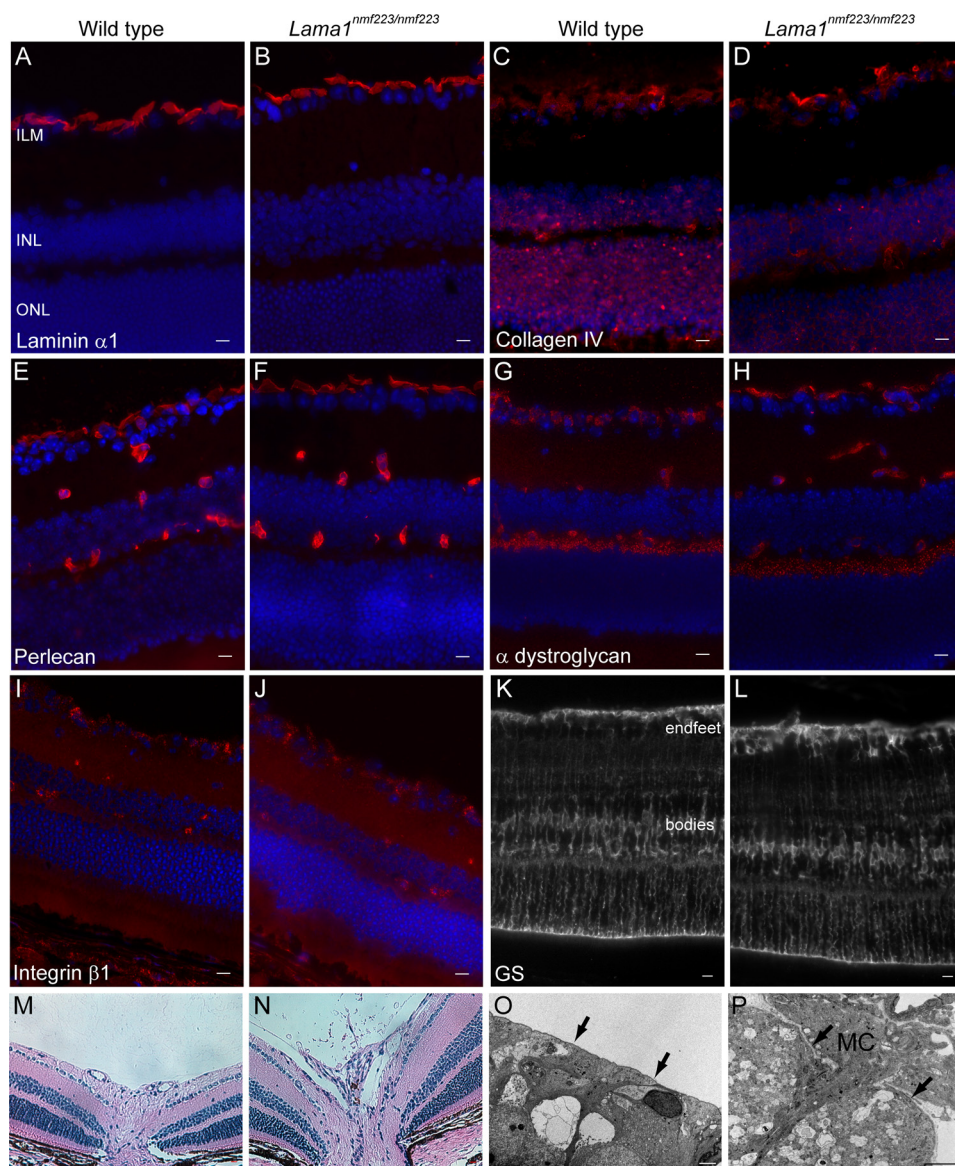


FIGURE 4. Primary inner limiting membrane components are present in *Lama1*^{nmf223} homozygotes, but abnormalities in this structure are evident by light and electron microscopy. Immunohistochemical labeling of littermate controls (A, C, E, G, and I) and mutant (B, D, F, H, and J) retinas with anti-laminin $\alpha 1$, anti-collagen IV, anti-perlecan, anti-dystroglycan, and anti-integrin $\beta 1$ is shown with retinal layers defined as inner limiting membrane (ILM), inner nuclear layer (INL), and outer nuclear layer (ONL). Immunohistochemical staining for anti-glutamine synthetase (GS) demonstrates that Müller cell end-feet reach the inner limiting membrane in both littermate controls (K) and *Lama1*^{nmf223} homozygotes (L). H/E staining of control (M) and mutant (N) retinas shows ectopic vessels and cells within the vitreous of mutants. Electron microscopy confirms the inner limiting membrane of control mice (O) is continuous above the ganglion cell (GC) layer, whereas the mutants exhibit frequent breaks through which Müller cells (MC) protruded (P). The arrows indicate the inner limiting membrane. Scale bars, 10 μm (A–N) and 1 μm (O and P).

body 1057+ (directed against the LN). Both anti-laminin $\alpha 1$ antibodies primarily stained the inner limiting membrane of the retina (Fig. 4A) with some labeling surrounding the optic nerve in control mice. Staining of retinal sections from homozygous *Lama1*^{nmf223} mutants revealed the mutant laminin $\alpha 1$ localized correctly to the inner limiting membrane (Fig. 4B).

Because *Lama1* is an integral part of the inner limiting membrane, we sought to determine the effects of the Y265C mutation in laminin $\alpha 1$ on this structure. The localization of other inner limiting membrane components, including collagen IV, perlecan, and dystroglycan, were similar in control and

Lama1^{nmf223} homozygotes (Fig. 4, C–H). In addition, the localization of the laminin $\alpha 1$ receptor, integrin $\beta 1$, was unaltered in *Lama1*^{nmf223} homozygotes (Fig. 4, I and J) as was the localization of integrin subunit $\alpha 1$ (data not shown). To determine if the Müller cell end-feet, which normally attach to the inner limiting membrane, were affected in *Lama1*^{nmf223} homozygotes, retinal sections were stained with an antibody against glutamine synthetase. Both at 4 weeks (Fig. 4, K and L) and at 6 months (data not shown), Müller cell processes in *Lama1*^{nmf223} homozygous retinas resembled those of age-matched WT retinas, extending through the entire length of the retina. Together, these data suggest that the Y265C point mutation does not affect the inner limiting membrane assembly.

Staining of retinal sections with H/E, however, demonstrated the presence of ectopic cells and vessels within the vitreous of the mutant retina, indicating the possibility of a disruption of the inner limiting membrane (Fig. 4, M and N). Indeed, ultrastructural examination of the inner limiting membrane with electron microscopy revealed structural abnormalities. At postnatal day 2 (P2), the inner limiting membrane was normal in some areas but absent or severely attenuated in others. In addition, although Müller cell end-feet terminated at the inner limiting membrane in some cases, in others they protruded into the vitreous (Fig. 4, O and P). In addition to aberrant blood vessels (Fig. 4N), ectopic cells that appeared morphologically to be astrocytes and retinal ganglion cells

were also found in the vitreous (data not shown). Similar inner limiting membrane abnormalities were noted at 4 weeks of age (data not shown).

*Peripheral Inner Nuclear Layer Thinning and an Associated Reduction in ERG Response Are Observed in *Lama1*^{nmf223} Homozygotes*—The central retinas of *Lama1*^{nmf223} homozygotes remained comparable with those of WT mice as late as 18 months with the exception of sporadic areas of dysplasia, which are likely to correspond to the small white spots observed by indirect ophthalmoscopy. In contrast, between 8 and 12 weeks of age, a reduction in the number of cells in the peripheral inner nuclear layer of *Lama1*^{nmf223} homozygous retinas was observed

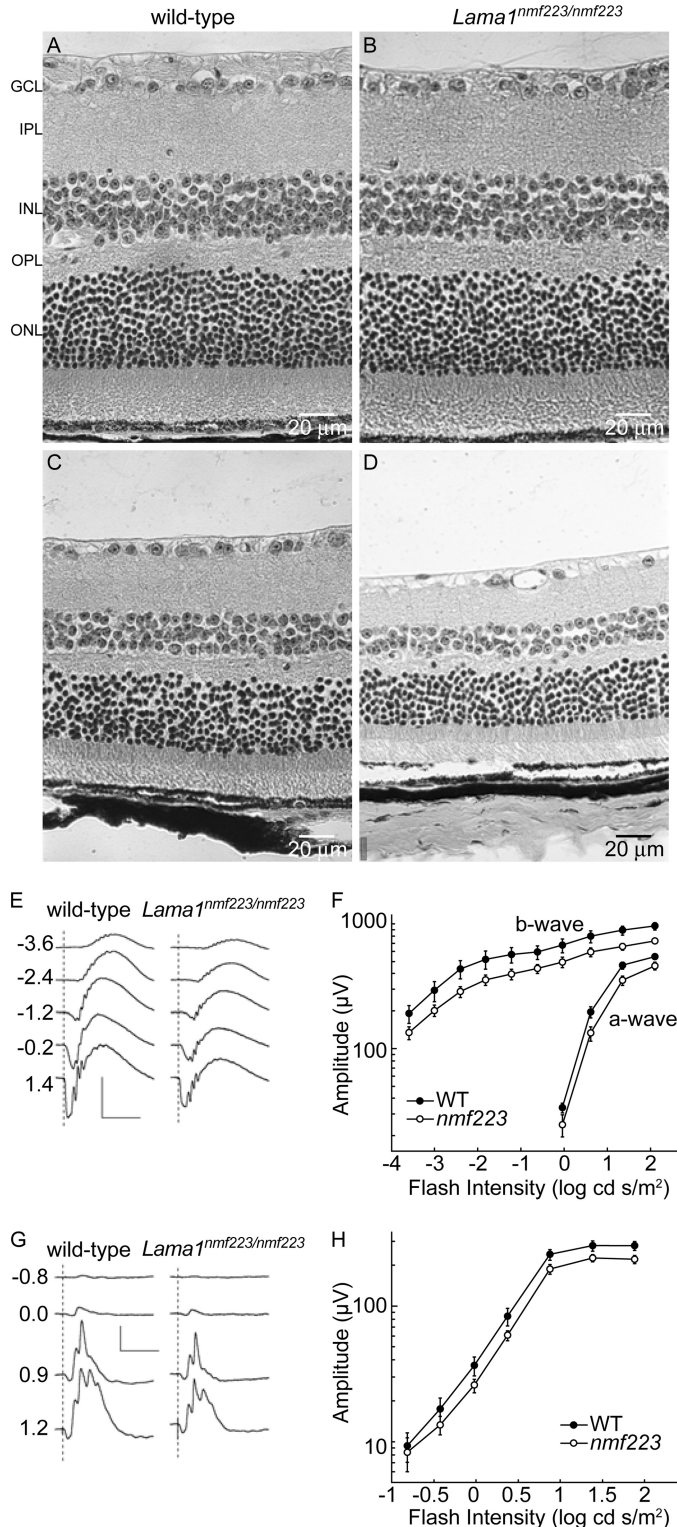


FIGURE 5. The peripheral inner nuclear layer cell loss peaks at 9 months in *Lama1^{nmf223}* homozygotes and is associated with reduced ERG responses as shown by a summary of strobe flash ERG results obtained at 1 year of age. Resembling littermate controls (A), H/E staining reveals a normal central retina in 9-month-old *Lama1^{nmf223}* homozygotes (B). However, compared with littermate controls (C), the peripheral inner nuclear layer is thinner in *Lama1^{nmf223}* homozygotes (D). The following abbreviations represent the retinal layers: ganglion cell layer (GCL), inner plexiform layer (IPL), inner nuclear layer (INL), outer plexiform layer (OPL), and outer nuclear layer (ONL). E, dark-adapted responses obtained from a representative WT (left) and *Lama1^{nmf223}* homozygous (right) mouse. Scale bar, 100 ms and 500 μ V. F, intensity-response functions for the dark-adapted a- and b-wave of WT (●)

(Fig. 5). This loss progressed slowly and stopped after 1 year of age.

Immunohistochemical studies of retinal sections were used to compare the relative number of amacrine, horizontal, and bipolar cells in the inner nuclear layer of 9-month-old *Lama1^{nmf223}* homozygous and WT controls. Labeling with antibodies against calbindin (horizontal cells), VSX2 (formerly CHX10; bipolar cells), paired box 6 (amacrine and horizontal cells), and TH1 (dopaminergic amacrine cells) did not reveal a marked reduction of any one particular cell type (data not shown). At 12 weeks of age, there was also a variable loss of cells in the retinal ganglion cell layer in \sim 20% of *Lama1^{nmf223}* homozygotes. The number of mutants experiencing this loss increased to 80% at 9 months of age (Fig. 5). As with inner nuclear layer thinning, this cell loss affected only the peripheral retina. The peripheral cell loss was not associated with a reduction in vascularization.

ERG results obtained from 1-year-old mice are also summarized in Fig. 5. Fig. 5E depicts representative responses obtained from WT littermates (left) and *Lama1^{nmf223}* homozygotes (right) to strobe stimuli presented to the dark-adapted eye. *Lama1^{nmf223}* homozygotes had ERG waveforms that were comparable with those of WT animals but of reduced amplitude. Fig. 5F plots intensity-response functions for the major ERG components obtained under dark-adapted conditions. The a- and b-wave components of *Lama1^{nmf223}* homozygotes were reduced below those of WT animals by a fraction that was consistent across flash intensities. Fig. 5G depicts representative responses obtained from WT (left) and *Lama1^{nmf223}* homozygotes to strobe stimuli superimposed upon a steady adapting field. Although light-adapted ERGs of *Lama1^{nmf223}* homozygotes had waveforms that were comparable with those of WT animals, the overall *Lama1^{nmf223}* mutant response was reduced. Fig. 5H shows that the reduction in cone ERG amplitude of *Lama1^{nmf223}* homozygotes was consistent across flash intensity. Similar ERG results were obtained for 6.5- and 8.5-month old *Lama1^{nmf223}* homozygotes (data not shown).

Persistent Hyaloid Remnants Are the Predominant Vessel Type in *Lama1^{nmf223}* Homozygotes—In WT mice, a honeycomb pattern of GFAP-positive astrocytes was formed between P0 and P1 and extended across the developing retina. *G. simplicifolia* isolectin highlighted the emergence of vessels from the optic disc, which followed the GFAP-labeled astrocytic template (Fig. 6A). During sample processing, the hyaloid vasculature readily detached from the retina of WT mice and was observed to contain many macrophages. At P7, when the primary plexus was near completion, retinal blood vessels were found in close association with the fully formed retinal astrocyte template (Fig. 6C). Retinal capillaries were observable with both *G. simplicifolia* isolectin and ADPase staining (Fig. 6, C

and *Lama1^{nmf223}* homozygotes (○). G, cone ERGs obtained from a representative WT (left) and *Lama1^{nmf223}* homozygous (right) mouse. Scale bar, 100 ms and 100 μ V. H, intensity response functions for the cone ERG b-wave of WT (●) and *Lama1^{nmf223}* homozygotes (○). In E and G, the numbers to the left of each pair of waveforms indicate flash intensity (in log cd s/m²), and the dashed lines indicate the time of flash presentation. In F and H, data points indicate the average for four WT and six *Lama1^{nmf223}* homozygotes. Error bars, \pm S.E.

Mutations in *Lama1* Disrupt Retinal Development

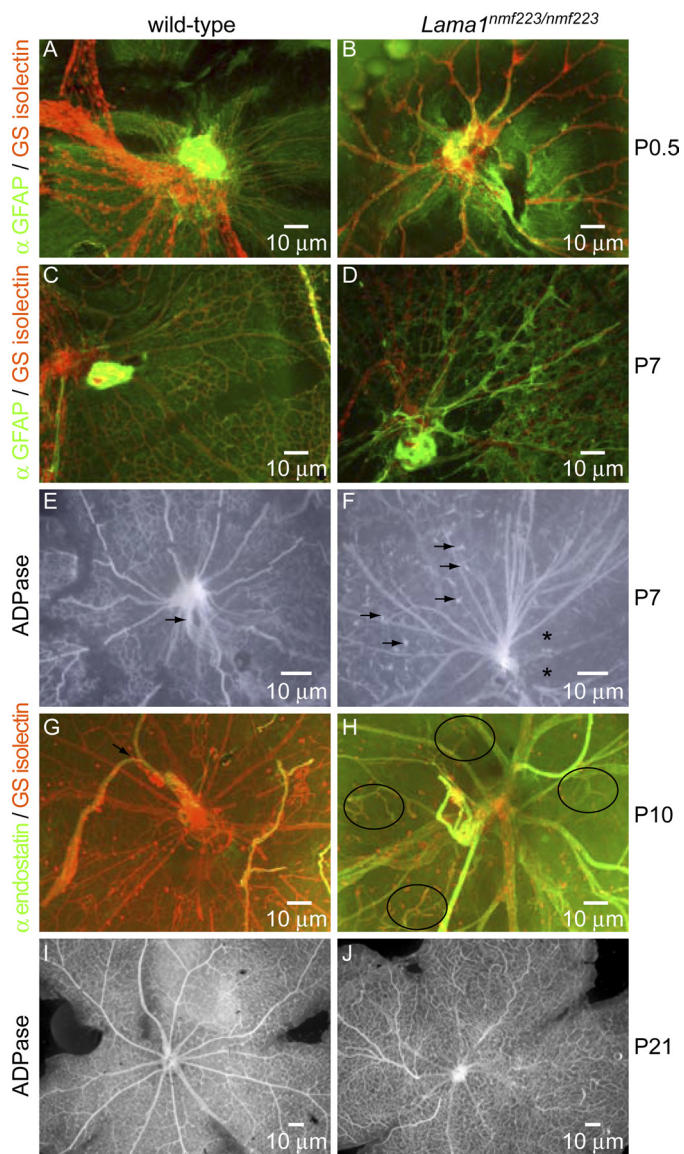


FIGURE 6. Astrocyte and blood vessel development are altered in *Lama1*^{nmf223} homozygotes. Immunohistochemical staining with anti-GFAP and *G. simplicifolia* isolectin (*GS isolectin*) in P0.5–P1 central retina of wild type (A) and *Lama1*^{nmf223} homozygotes (B) demonstrates the apparent lack of retinal vessels in *Lama1*^{nmf223} homozygotes. P7 central retina of control (C) and *Lama1*^{nmf223} homozygotes (D) stained with anti-GFAP and *G. simplicifolia* isolectin. ADPase staining of P7 retinas shows a complete primary plexus as well as the formation of capillaries in WT retinas (E), whereas in the *Lama1*^{nmf223} homozygous retina, budding of the vitreal vessels is observed, but no capillaries are present (F). The arrows indicate the hyaloid remnants in WT mice and budding of hyaloid vessels in *Lama1*^{nmf223} homozygotes, whereas the asterisks indicate areas devoid of retinal vessels in *Lama1*^{nmf223} homozygotes. Labeling with anti-endostatin and *G. simplicifolia* isolectin at P10 demonstrates the failure of hyaloid vessels to regress in *Lama1*^{nmf223} homozygotes (H) compared with controls (G). Only endostatin-positive primary-like vessels are observed in *nmf223* retinas. The arrow in G indicates the hyaloid artery in controls, whereas circles in H highlight anastomoses of hyaloid vessels entering the retina. Rather than within the retina, as seen in controls (I), in adult retinas, ADPase staining confirms that primary-like vessels lie in the vitreous of *Lama1*^{nmf223} homozygotes (J).

and E). Concomitantly, staining with anti-endostatin and *G. simplicifolia* isolectin demonstrated that the hyaloid vasculature had begun to regress (data not shown). This regression continued so that by P10 only the primary hyaloid artery remained in the vitreous, as shown by anti-endostatin and

G. simplicifolia isolectin labeling (Fig. 6G). At P21, the intermediate plexus was fully developed, completing retinal vascularization (Fig. 6I).

The *Lama1*^{nmf223} mutation significantly altered the development of astrocytes and retinal vessels. Between P0 and P1, GFAP-positive astrocytes were condensed around the optic disc, with only a few processes extending to the periphery in mutant retinas. Many of the astrocytes appeared to lie within the vitreous rather than the retina itself and were associated with hyaloid vessels (Fig. 6B). Retinal blood vessels, when present, were observed only immediately adjacent to the optic disc and were reduced in number compared with those seen in controls. In addition, fewer *G. simplicifolia* isolectin-positive cells were observed throughout the retina. At P7, the majority of blood vessels were observed in the vitreous rather than the retina. As with younger retinas, double staining with anti-GFAP and *G. simplicifolia* isolectin demonstrated that mutant astrocytes associated with vitreal vessels, wrapping around them as they would mature retinal vessels (Fig. 6D). In addition, GFAP staining was more intense than that seen in WT retinas, with astrocytes appearing hyperstellated. Removal of the vitreous and hyaloid vessels revealed *G. simplicifolia* isolectin-positive cells in the underlying retina, particularly in the periphery (data not shown). These cells were associated with retinal astrocytes that formed a less dense version of the WT astrocyte template. A majority of the vessels observed in *Lama1*^{nmf223} homozygous retinas were endostatin-positive, indicating their hyaloid vessel origins (data not shown). ADPase staining of mutant retinas demonstrated that some hyaloid vessels, rather than regressing, were beginning to bud at this stage (Fig. 6F).

At P10, immunohistochemical labeling demonstrated that most of the larger vessels in *Lama1*^{nmf223} homozygous retinas were endostatin-positive and, therefore, of hyaloid origin. At this stage, endostatin-positive blood vessels could be seen branching into the deeper retina, where endostatin expression was absent (Fig. 6H). The larger, vitreal vessels remained endostatin-positive throughout adulthood (data not shown). ADPase staining at P21 confirmed that the larger, primary plexus-like vessels were found within the vitreous rather than the retina (Fig. 6J). This stain also demonstrated that the secondary and intermediate plexi do form in mutant retinas despite the lack of a normal retinal primary plexus. The blood vessels within these deeper layers, however, were disorganized and more abundant with a higher density of capillary branch points than in control retinas. GFAP staining of P21 retinas was identical to that observed at earlier time points with the exception that focal areas completely void of astrocytes and blood vessels were observed (data not shown).

The Y265C Mutation Significantly Affects Laminin $\alpha 1$ LN Domain Interactions in Vitro—The BACTH system (28) was used to test the hypothesis that the Y265C mutation leads to a perturbation of laminin chain interactions. The plasmids coding for T18 and T25 fused to the *Lama1* LN or LN^{nmf223}, Lamb1 LN, and Lamc1 LN were introduced into *E. coli* BTH101, an adenylate cyclase-deficient bacterial strain. β -Galactosidase activity was used to evaluate the strength of interaction between two interacting proteins. The BACTH system was first validated by testing interactions between the different combi-

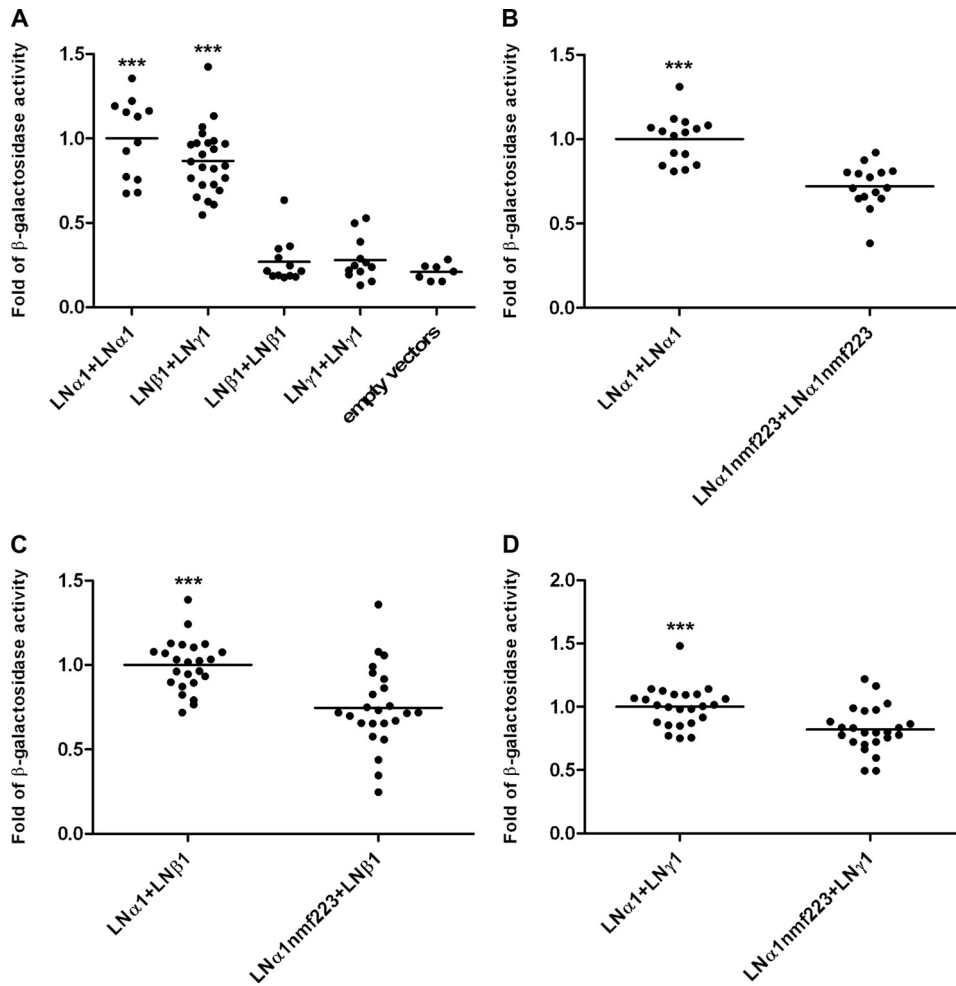


FIGURE 7. BACTH analysis of interactions of wild type and of mutated LNs. *A*, validation of the BACTH system with binding partners already described in the literature. *B–D*, the effect of the Y265C mutation on the efficiencies of functional complementation between the indicated hybrid proteins were quantified by measuring β -galactosidase activities present in *E. coli* BTH101 cells harboring the corresponding LN, as described under “Experimental Procedures.” The bar represents the mean value resulting from four independent experiments. Results are presented as the mean -fold change of β -galactosidase activity of the $\alpha 1$ LN^{nmf223} domain compared with the $\alpha 1$ WT LN. All means are statistically different using a one-way analysis of variance test or Student’s *t* test (***, $p < 0.001$).

nations of wild type LNs. Interactions were observed between $\alpha 1$ LN and $\alpha 1$ LN and between $\beta 1$ LN and $\gamma 1$ LN, as well as between $\alpha 1$ LN and $\beta 1$ LN and between $\alpha 1$ LN and $\gamma 1$ LN but not between $\beta 1$ LN and $\beta 1$ LN or between $\gamma 1$ LN and $\gamma 1$ LN, which had levels of β -galactosidase activity similar to that observed with transfectants harboring the empty vector (Fig. 7A). The one-way analysis of variance test indicated that both the $\alpha 1$ LN plus $\alpha 1$ LN and $\beta 1$ LN plus $\gamma 1$ LN combinations were statistically different ($p < 0.001$) compared with the $\beta 1$ LN plus $\beta 1$ LN, $\gamma 1$ LN plus $\gamma 1$ LN, or empty vectors. These data are in agreement with that described in the literature (30, 31). The effect of the laminin $\alpha 1$ LN^{nmf223} mutation on interactions between $\alpha 1$, $\beta 1$, and $\gamma 1$ LN was then investigated. In comparison with wild type, the presence of the $\alpha 1$ LN^{nmf223} mutation significantly decreased the affinity of *Lama1* LN with all binding partners ($p < 0.001$) (Fig. 7, *B–D*). Taking into account the basal β -galactosidase activity observed in *E. coli* BTH101 transfected with empty vectors, the $\alpha 1$ LN^{nmf223} mutation leads to a

reduction of $\sim 50\%$ with the wild type $\alpha 1$ LN and $\beta 1$ LN and 40% with the $\gamma 1$ LN.

Deletion of Lama1 in the Epiblast by Activation of the Lama1 Floxed Allele Using Tg(Sox2-cre)1Amc Allows for the Generation of Viable Lama1 Null Mice—In order to bypass the early embryonic lethality observed previously in null *Lama1* mice (10, 11), *Lama1* Δ heterozygotes were crossed to Tg(Sox2-cre)1Amc mice, which express *cre* under the control of a 12-kb *Sox2* promoter region. This transgenic line has been reported to induce recombination in all epiblast cells by embryonic day 6.5 with no activity in extraembryonic cell types (17). Progeny from this cross, which carried both the deleted *Lama1* allele and the Tg(Sox2-cre)1Amc transgene, were mated to homozygous *Lama1*^{flxed} mice. This cross generated viable *Lama1* null, *Lama1* Δ/Δ , Tg(Sox2-cre)1Amc mice. Here, we use the term *Lama1* Δ homozygote to refer to mice that were also, by necessity, hemizygous for the Tg(Sox2-cre)1Amc transgene. The absence of the WT or *Lama1* floxed allele in these mice was verified by performing an analysis of various tissues by PCR, indicating that these mice are not mosaic and should be considered as a true *Lama1* knockout mouse strain (Fig. 8A). A number of tissues were examined by immunofluorescence using a specific antibody against laminin $\alpha 1$

(21). Laminin $\alpha 1$ staining was found in the basal lamina of both the cortical tubules of the kidney and the testis seminiferous epithelium of control mice, whereas no laminin $\alpha 1$ staining was observed in *Lama1* Δ homozygotes (Fig. 8B). The absence of laminin $\alpha 1$ staining was also confirmed in the retina (Fig. 9), bladder, mammary gland, intestine, and ovary of *Lama1* Δ homozygotes (data not shown). The only physical abnormality observed in *Lama1* Δ homozygotes was a 13% reduction in birth weight when compared with control mice ($p < 0.05$, Student’s *t* test, $n = 14$). By 8 weeks of age, however, this weight difference was no longer observed. Both male and female *Lama1* Δ homozygotes had normal life spans and fertility.

The Inner Limiting Membrane Is Absent in Lama1 Δ Homozygotes—Immunohistochemical staining for inner limiting membrane components confirmed a lack of laminin $\alpha 1$ in *Lama1* Δ homozygote retinas (Fig. 9, *A* and *B*). The linear inner limiting membrane staining for collagen IV and perlecan observed in heterozygous mice (Fig. 9, *C* and *E*) and

Mutations in *Lama1* Disrupt Retinal Development

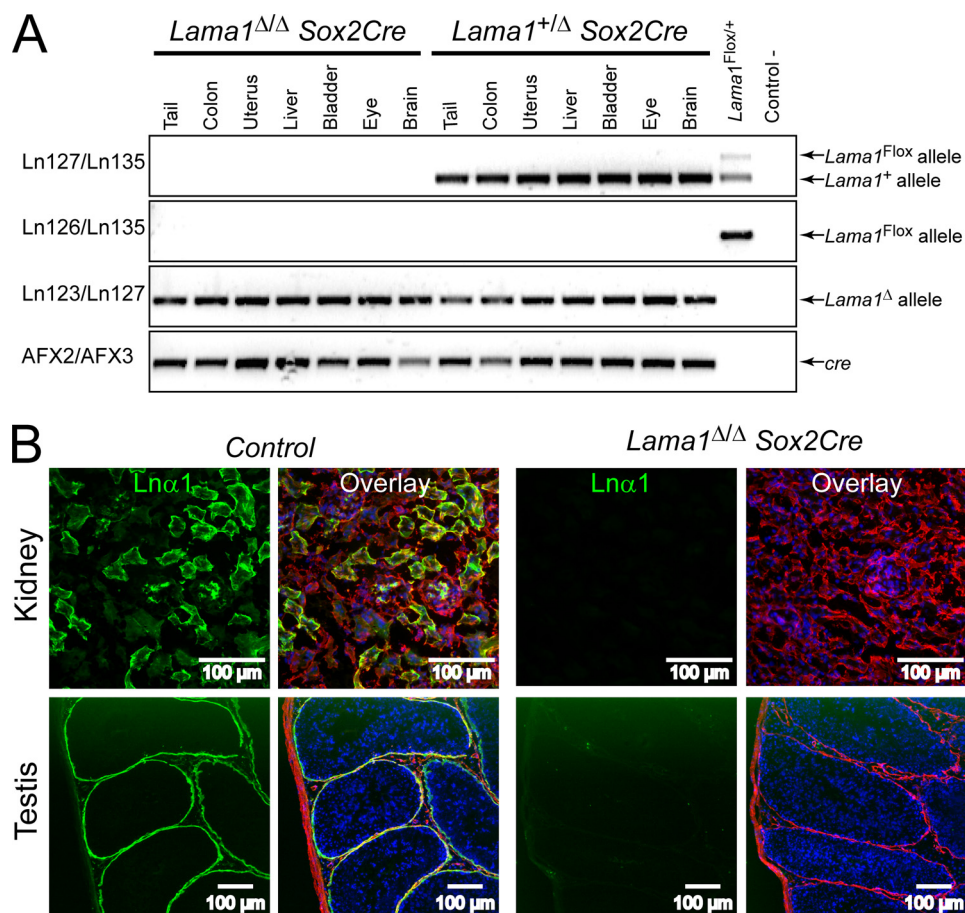


FIGURE 8. Activation of the *Lama1*^{floxed} allele with Tg(*Sox2-cre*)1Amc-transgene generates a *Lama1* null mouse. A, genotype analysis of various organs of heterozygous and homozygous *Lama1*^Δ mice. *Lama1* alleles were detected by PCR using primer pairs Ln127/Ln135, Ln126/Ln137LPN, and Ln123/Ln127. Tg(*Sox2-cre*)1Amc-transgene was detected using primers AFX2/AFX3. Genomic DNA from a *Lama1*^{floxed/+} mouse was used as a control for the floxed allele amplification. Only the deleted allele can be detected in homozygous *Lama1*^Δ mouse tissues. B, immunofluorescence analysis of kidney and testis from a *Lama1*^Δ mutant (right) and a control mouse (left) using anti-laminin $\alpha 1$ (green) and anti-collagen IV (red) antibodies. Merged images of laminin $\alpha 1$ and anti-collagen IV images together with nuclear 4',6-diamidino-2-phenylindole staining (blue) are shown on the right. Laminin $\alpha 1$ staining is found in the basal lamina of both the cortical kidney tubules and the testis seminiferous epithelium of control mice. No laminin $\alpha 1$ staining is observed in *Lama1*^Δ mutants.

Lama1^{nmf223} mutants (Fig. 4) was punctate in *Lama1*^Δ homozygotes (Fig. 9, D and F). In addition to being punctated, dystroglycan staining was reduced in *Lama1*^Δ homozygotes (Fig. 9H) compared with littermate controls (Fig. 9G). Together, these observations suggest that the inner limiting membrane does not form properly in *Lama1*^Δ homozygotes. Histological assessment of *Lama1*^Δ homozygotes supported this observation, with ectopic cells and blood vessels in the vitreous (Fig. 9, I and J). Labeling with glutamine synthetase revealed many Müller cells lacking end-feet with misguided and shortened processes (Fig. 9, K and L).

***Lama1*^Δ Homozygotes Have a Similar but More Severe Retinal Phenotype than That Observed in *Lama1*^{nmf223} Homozygotes**—Fundus examination by indirect ophthalmoscopy revealed that *Lama1*^Δ homozygotes also exhibit vitreal fibroplasia, vessel tortuosity, and white retinal spots (Fig. 10, A and B). Compared with *Lama1*^{nmf223} homozygotes, the retinal spots were larger and more prominent, resembling patches of retinal degeneration that progressed with age. At 1 year of age, eye diameters of *Lama1*^Δ homozygotes were 11% larger than

those of control mice ($n = 10$ control and 13 mutant mice, $p < 0.001$, Student's t test), a phenotype not seen in *Lama1*^{nmf223} mutants (data not shown). ADPase staining of retinal whole mounts demonstrated larger vessels lying within the vitreous with an apparent lack of primary plexus veins and arteries within the retina (Fig. 10, C and D). The aberrant vitreal vessels covered the entire retinal surface and were similar in number to those seen in *Lama1*^{nmf223} homozygotes. As with *Lama1*^{nmf223} homozygotes, the vitreal vessels remained endostatin-positive throughout adulthood, suggesting hyaloid origin. These vessels could be seen branching into the retina as well (data not shown). Although present, the intermediate and deep vascular plexi of the retina did not appear to be as dense as those in *Lama1*^{nmf223} homozygous retinas. Furthermore, the deeper retinal vasculature of *Lama1*^Δ homozygotes penetrated the periphery in some but not all quadrants. Co-staining of *Lama1*^Δ homozygous whole mount retinas with anti-GFAP and *G. simplicifolia* isolectin revealed astrocytes associating with vitreal vessels, a phenotype similar to that seen in *Lama1*^{nmf223} homozygotes (Fig. 10, E and F).

Histologically, the central retina of *Lama1*^Δ homozygotes was similar to that of controls at both 4 weeks and 6 months of age with the exception of the observed inner limiting membrane defects (Fig. 11, A–C). As early as 4 weeks of age, however, *Lama1*^Δ homozygotes showed peripheral loss of cells similar to but more severe than that seen in *Lama1*^{nmf223} homozygotes, affecting both nuclear layers of the retina and the inner plexiform layer (Fig. 11, D and E). In addition to an earlier onset, this cell loss extended further into the central retina, unlike *Lama1*^{nmf223} mutants, which primarily affected cells of the peripheral inner nuclear layer. Examination of 6-month-old retinal sections showed that this cell loss was progressive, particularly in the outer nuclear layer (Fig. 11F). Cell loss from the retinal ganglion cell layer of *Lama1*^Δ homozygotes was also more severe than that observed in *Lama1*^{nmf223} homozygotes and was readily apparent by 4 weeks of age, the earliest time point examined. Moreover, the cells in this layer were disorganized, with some areas having extra cells whereas others were thinned with many ectopic cells on the vitreal surface of the retina. Consistent with a more severe histological phenotype, reductions in ERG amplitude were

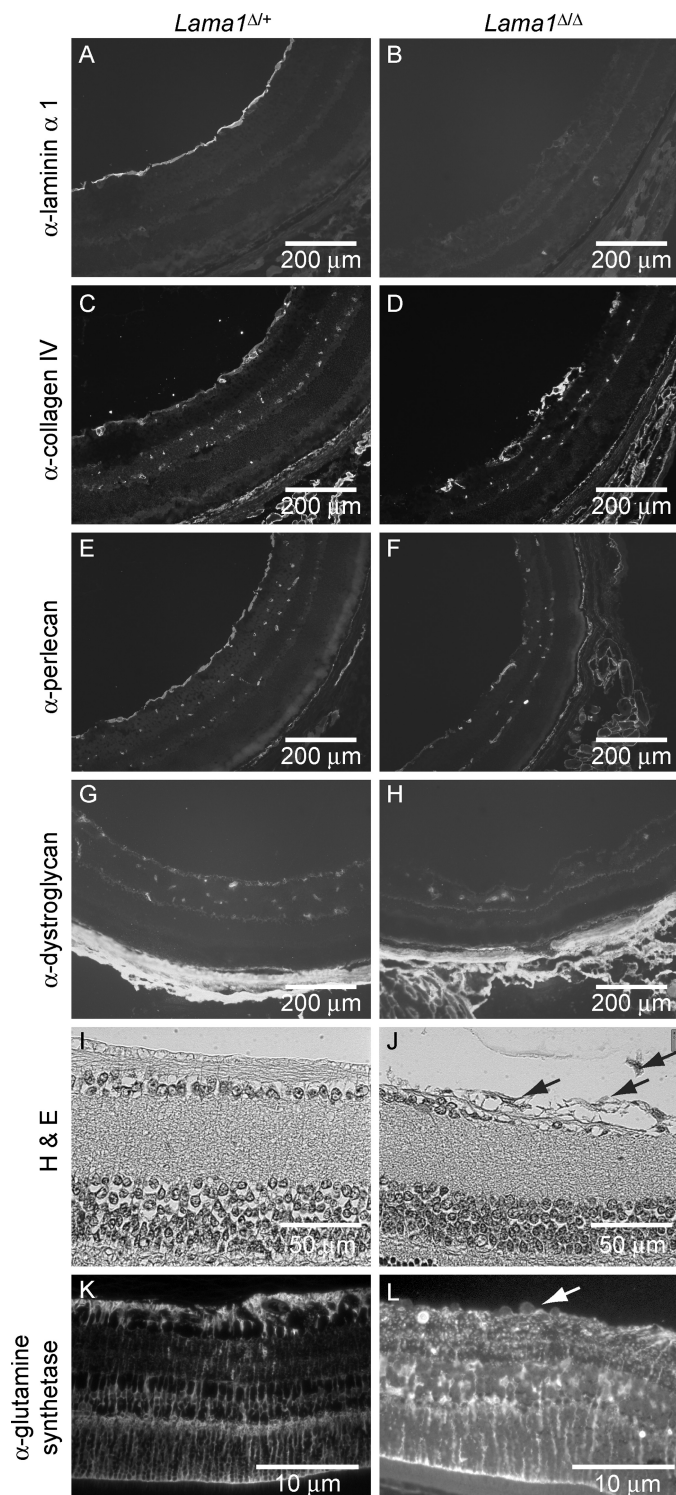


FIGURE 9. The inner limiting membrane does not form in homozygous *Lama1* $\Delta\Delta$ mutants. Shown is immunofluorescence analysis of 4-week-old eyes from littermate controls (A, C, E, and G) and *Lama1* $\Delta\Delta$ homozygotes (B, D, F, and H) with anti-laminin $\alpha 1$, anti-collagen IV, anti-perlecan, and anti-dystroglycan antibodies. Histological examination with H/E staining demonstrates that the well organized ganglion cell layer and intact inner limiting membrane seen in controls (I) are replaced by a disorderly ganglion cell layer with ectopic cells and vessels within the vitreous in *Lama1* $\Delta\Delta$ homozygotes (J). Glutamine synthetase staining shows that, in the control retinas, Müller cell end-feet lie at the inner limiting membrane (K). In the *Lama1* $\Delta\Delta$ homozygous retinas, however, many Müller cell processes fall short, terminating in the inner plexiform layer, and are lacking end-feet (L). Ectopic cells (arrows) are also visible on the vitreal side of the retina in *Lama1* $\Delta\Delta$ homozygous retinas.

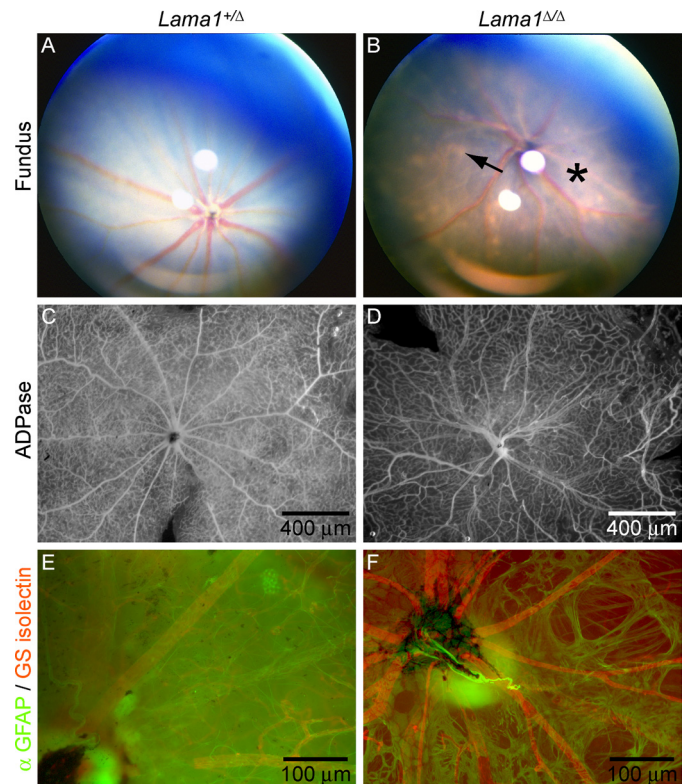


FIGURE 10. *Lama1* null mice demonstrate a similar but more severe retinal phenotype than that observed in *Lama1*^{nmf223} homozygotes. Fundus photographs of 8-week-old littermate controls (A) and homozygous *Lama1* $\Delta\Delta$ mutants (B) reveal white retinal spots (arrow) as well as vitreal fibroplasia (asterisk) in the mutant retina. ADPase staining of 6-month-old mice highlights normal retinal vasculature in heterozygous *Lama1* Δ mice (C), whereas vessels in homozygous *Lama1* $\Delta\Delta$ mice are tortuous, with larger vessels lying in the vitreous (D). GFAP and *G. simplicifolia* isolectin (*GS isolectin*) staining demonstrates the normal retinal vasculature and astrocyte template in littermate controls (E) compared with the association of astrocytes with vitreal vessels in *Lama1* Δ homozygotes (F).

more pronounced in *Lama1* Δ homozygotes (Fig. 11, G and H) than in *Lama1*^{nmf223} homozygotes (Fig. 5, E–H). Optomotor testing showed that *Lama1* Δ homozygotes were behaviorally blind at 1 year (supplemental Fig. 1).

DISCUSSION

The present study describes the first mammalian hypomorphic and null alleles of *Lama1* that survive into adulthood. The current work supports the role of *Lama1* in ocular development previously suggested by zebrafish studies (12, 15, 16) because both *Lama1*^{nmf223} and *Lama1* Δ homozygotes develop ocular defects.

Lama1 mutations in zebrafish have been reported to disrupt inner limiting membrane formation in zebrafish (12). Although inner limiting membrane disruptions were observed in *Lama1* mutant mice, the severity and consequences of these differ from the zebrafish models and from one another. In *Lama1*^{nmf223} homozygotes, the presence of the primary inner limiting membrane proteins and electron microscopic analysis demonstrates that this structure is formed. However, electron microscopy revealed focal disruptions with cells and vessels protruding into the vitreous. Thus, in *Lama1*^{nmf223} homozygotes, the inner limiting membrane forms, but its integrity is reduced by the Y265C mutation. By contrast, histological assessment of *Lama1* Δ

Mutations in *Lama1* Disrupt Retinal Development

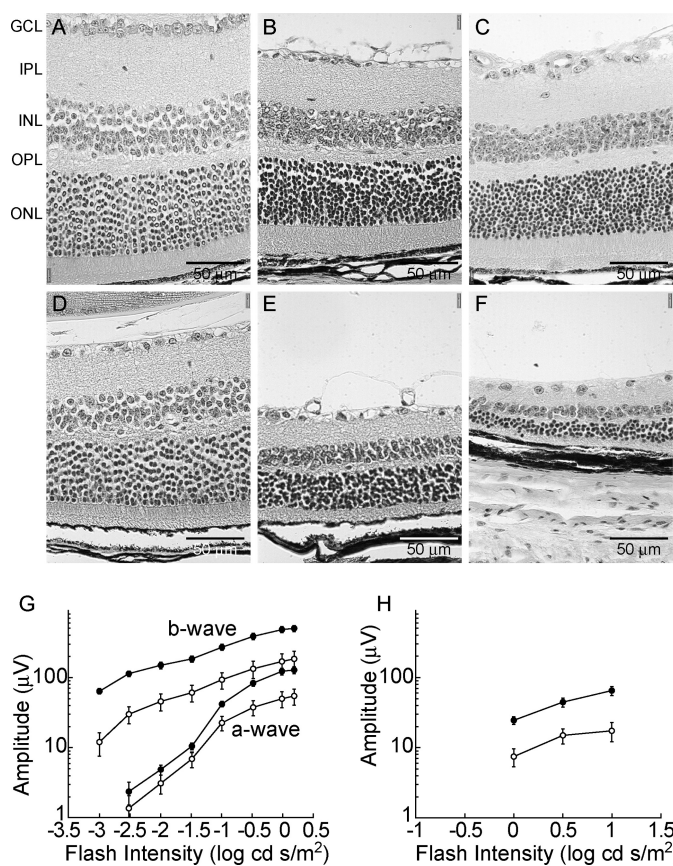


FIGURE 11. Peripheral retinal degeneration is observed in *Lama1*^Δ mice as early as 4 weeks of age. H/E staining demonstrates that the central retina of *Lama1*^Δ homozygotes is similar to that of littermate controls (A) at both 4 weeks (B) and 6 months (C) with the exception of the inner limiting membrane defects. The peripheral retina, however, shows thinning of the outer and inner nuclear layers as well as a loss of ganglion cell layer cells in 4-week-old *Lama1*^Δ homozygotes (E) compared with controls (D). This thinning progresses slightly and affects the outer nuclear and inner plexiform layers as well in retinas of 6-month-old *Lama1*^Δ homozygotes (F). GCL, ganglion cell layer; IPL, inner plexiform layer; INL, inner nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; ONL, outer nuclear layer. G, intensity response functions for the dark-adapted a- and b-waves of *Lama1*^Δ mice (○) compared with control mice at 1 year of age (●). H, intensity-related functions for the cone ERG b-wave of 1-year-old *Lama1*^Δ homozygotes (○) compared with control littermates (●). In G and H, error bars indicate S.E.

homozygotes revealed an apparent panretinal loss of the inner limiting membrane with numerous ectopic cells and blood vessels within the vitreous. Indeed, three primary inner limiting membrane components, collagen IV, perlecan, and laminin $\alpha 5$ (data not shown), were expressed in the *Lama1*^Δ homozygous retina but in a punctate manner unlike the continuous linear distribution seen in controls or *Lama1*^{nmf223} homozygotes. In addition, the intensity of dystroglycan was reduced in the retina of *Lama1*^Δ mutants. Together, these observations suggest that the inner limiting membrane does not form in *Lama1*^Δ mutants.

Although the absence of the inner limiting membrane in the *Lama1*^Δ mutants is not surprising because laminin-111 is a prerequisite for basal membrane formation (10, 32, 33), the abnormalities in the *Lama1*^{nmf223} mutants are more difficult to explain. Given that cysteines are important for disulfide bridge formation (34, 35), the addition of this residue may perturb the three-dimensional structure of laminin $\alpha 1$ and subsequent

interactions with other laminin chains and receptors. In order to investigate the effects of the Y265C mutation on laminin $\alpha 1$ function, bacterial two-hybrid studies were undertaken. The use of this novel method for studying laminin chain interactions was verified by the presence of interactions between $\alpha 1$ LN and $\alpha 1$ LN and between $\beta 1$ LN- $\gamma 1$ LN as well as between $\alpha 1$ LN and $\beta 1$ LN and between $\alpha 1$ LN $\gamma 1$ LN but not between $\beta 1$ LN and $\beta 1$ LN or $\gamma 1$ LN and $\gamma 1$ LN, which is consistent with findings reported in the literature (30, 31). All interactions with the $\alpha 1$ chain were markedly reduced in strength by introduction of the nmf223 mutation Y265C.

The *Lama1* LN has been shown previously to self-interact *in vitro* with high affinity in the presence of Ca²⁺ (30) and in the absence of Ca²⁺ (31, 36) to form dimers. Recently Yurchenco and co-workers (37) demonstrated that laminin $\alpha 1$ as well as the $\beta 1$ and $\gamma 1$ LNs are essential for basement membrane formation. The LN self-interaction may facilitate the polymerization of the different laminin chains. Our BACTH results demonstrate that the tyrosine 265 is important for such interactions. We hypothesize that the nmf223 mutation in *Lama1*, Y265C, could lead to an abnormal mesh formation in the basement membrane by decreasing the number of $\alpha 1$ LN binding partners *in vivo*, despite the presence of interactions between $\beta 1$ LN and $\gamma 1$ LN. In addition, the ability of laminin 111 to act as a chemoattractant for Müller cells (38) may be hindered by the Y265C mutation.

The Y265C mutation may also disrupt other important laminin $\alpha 1$ interactions. For example, the binding of laminin $\alpha 1$ to receptors on Müller cells may be weakened. Indeed, the LN contains receptor binding sites for integrins $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ as well as perlecan (2, 39). These changes may also contribute to the decreased integrity of the inner limiting membrane and the abnormal presence of cells and vessels within the vitreous. Support for the hypothesis that binding to the Müller cell receptors is disrupted comes from observations that a similar although more severe phenotype is observed in mice with mutations in *Large*, which encodes a glycosyltransferase required for the proper glycosylation of α -dystroglycan (19). Interactions of other proteins, known to contain an LN, such as netrins (40) may also be disrupted by the Y265C mutation. Although the specific protein interactions disrupted are yet to be elucidated, the current study demonstrates that the tyrosine 265 is crucial for normal LN function. The conservation of this central Tyr in the YYY motif in all laminins containing an LN further supports the importance of the mutated residue.

It is interesting to note that other animal models with point mutations in the LN of laminin α chains exist. This is the case of the zebrafish mutant bal^{a69} that has a mutation C56S in the *lama1* gene, leading to several ocular defects (15). The *Lama2*^{nmf417} carries a C79R mutation in the LN of the mouse *Lama2* gene (encoding the laminin $\alpha 2$ chain) that causes congenital muscular dystrophy (41). Although basement membranes appear generally normal at the electron microscopy level in *Lama2*^{nmf417} mice, immature Schwann cells fail to assemble this structure and underscore the importance of the LN in this process.

The inner limiting membrane abnormalities noted in *lama1*-deficient zebrafish were associated with retinal ganglion cell

layer defects (12, 15) and axonal abnormalities (13, 14). Similarly, cells in this layer were affected in both *Lama1* mouse mutants but not in the same manner. Although retinal ganglion cell development was normal in *Lama1^{nmf223}* homozygotes, a progressive cell loss was observed within this layer in some mice beginning at 12 weeks of age. In *Lama1^Δ* homozygotes, the retinal ganglion cell layer was thickened in some areas and attenuated in others as early as 4 weeks of age, the earliest time point investigated, suggesting possible developmental defects. In neither case was the ganglion cell loss associated with a change in intraocular pressure (data not shown). The ganglion cell layer alterations in *lama1*-deficient zebrafish were attributed to abnormal inner limiting membrane formation and subsequent aberrant development of Müller cells (12). At the light microscopic level, Müller cell processes of *Lama1^{nmf223}* homozygotes were similar to those of WT mice, terminating with end-feet just below the inner limiting membrane. However, in the *Lama1^Δ* homozygous retina, many Müller cell processes were truncated and lacked end-feet. These abnormalities suggest that laminin $\alpha 1$ is important in path searching of Müller glial cells *in vivo* as has already been demonstrated for laminin-111 *in vitro* (38). The differences observed between these mouse models in regard to retinal Müller cells and ganglion cells are likely to reflect allelic differences and their effects on laminin $\alpha 1$ protein structure and function as well as subsequent protein interactions.

The ERG phenotype observed in *Lama1^{nmf223}* homozygotes is consistent with the modest loss of retinal neurons in these mice. Taking the amplitude reduction into account, the overall waveform was comparable in *Lama1^{nmf223}* homozygotes and WT mice, indicating that the cells lost in the inner nuclear layer were not preferentially bipolar cells, which would present as a b-wave reduction (42). Indeed, staining for VSX2, a bipolar cell marker, showed no marked reductions in *Lama1^{nmf223}* homozygotes. A recent report showed that mice lacking *Lamb2* experience disruption in the development of retinal dopaminergic neurons, which are identified by TH1 (43). No difference was observed in TH1 expression in *Lama1^{nmf223}* homozygotes compared with WT mice. Similarly, no other cell type was markedly reduced in mutants, suggesting subtle losses of all inner nuclear layer cell types.

Lama1^Δ homozygotes experienced a more pronounced reduction in ERG responses compared with *Lama1^{nmf223}* homozygotes. This was associated with an increase in the severity of retinal degeneration as well as an earlier onset. Cell loss from the inner nuclear layer and ganglion cell layer was observed as early as 4 weeks of age, the earliest time point examined, compared with 12 weeks in *Lama1^{nmf223}* homozygotes. By 6 months of age, the outer nuclear layer and inner plexiform layers were also thinner in *Lama1^Δ* homozygotes. The increased severity of the retinal phenotype observed in *Lama1^Δ* homozygotes suggests that laminin $\alpha 1$ and perhaps the inner limiting membrane itself are required for the survival of retinal neurons. This supports previous work in chick retinas implicating the retinal ganglion cell dependence on the inner limiting membrane (44).

Although the zebrafish models die prior to retinal vascular development, they have provided valuable insights into *lama1*

function in vessel formation and maintenance. In *lama1* zebrafish morphants, endothelial cell differentiation is delayed, and capillary formation and blood flow in the hyaloid vasculature are reduced (12, 15). Similarly, endothelial cell development was attenuated or at least delayed in *Lama1^{nmf223}* homozygous retinas. Most large vessels in *Lama1^{nmf223}* homozygotes remained endostatin-positive into adulthood, suggesting hyaloid origins (26). Anastomoses from these vessels appeared to enter the retina and form the intermediate and deep retinal vascular plexi, which were comparable with those of WT mice, although less organized with potentially more capillaries. It is possible that the increased number of capillaries in *Lama1^{nmf223}* homozygotes is caused by errors in remodeling of these structures. In adult *Lama1^Δ* homozygous retinas, endostatin-positive hyaloid vessels also appeared to penetrate into the retina, suggesting that a similar compensatory development of retinal vessels occurs in these mice. Interestingly, although the hyaloid vessels of the homozygous *Lama1^Δ* extended over the entire vitreal-retinal surface, the deeper retinal vasculature was unevenly distributed, with some areas containing fewer peripheral blood vessels compared with both littermate controls and *Lama1^{nmf223}* homozygotes. Additional studies are under way to investigate the vascular differences between the *Lama1^Δ* and *Lama1^{nmf223}* mutant retinas. Interestingly, the formation of retinal vessels from branching hyaloid vessels has also been reported in *Collagen type XVIII $\alpha 1$* -targeted mutant mice (25, 45). The similarities between the vascular development of *Lama1^{nmf223}* homozygotes and *Collagen XVIII* mutants suggest that *Lama1*, like *Collagen XVIII*, is required for the regression of the hyaloid vessels (25, 45). It has been demonstrated *in vitro* that the C-terminal endostatin domain of collagen XVIII inhibits endothelial cell proliferation (46) and migration (47). Perhaps more importantly with regard to hyaloid regression, endostatin has been shown to induce endothelial cell apoptosis (48). Moreover, endostatin has been shown to bind to the LN of all laminin-111 chains, and the interaction is crucial for endostatin function (46, 49, 50). Given that the Y265C mutation significantly reduced LN-LN interactions in BACTH studies, it is worth considering that this point mutation may disrupt the binding of laminin-111 to the endostatin domain of collagen XVIII. In doing so, the Y265C mutation would inhibit the apoptotic function of endostatin on hyaloid vessels. Further studies are required to investigate this proposed mechanism.

The *Lama1* mutants described herein also share a phenotype described in mice lacking both *Collagen XVIII* and *Collagen XV* (45), an abnormal migration of astrocytes into the vitreous. The ectopic astrocytes associate with hyaloid vessels in the vitreous, potentially stabilizing them and preventing their normal regression. These observations suggest that an intact, fully functional inner limiting membrane is required to retain astrocytes within the retina. Alternatively, laminin $\alpha 1$ may provide signals that guide astrocyte migration. Interestingly, some astrocytes from *Lama1^{nmf223}* homozygous mutants do enter the retina, producing a honeycomb-like pattern similar to but far less dense than that seen in control retinas. Why this subset of astrocytes is able to migrate normally whereas most astrocytes enter into the vitreous has yet to be determined. What is

Mutations in Lama1 Disrupt Retinal Development

clear is that these changes in astrocytes, which are required to guide normal endothelial cell differentiation and migration, hinder formation of the retinal primary plexus in *Lama1* mutants.

It is interesting to note that some disease features observed in zebrafish morphants with reduced *lama1* expression were not encountered in either *Lama1* mouse model described here. These include microphthalmia, cataracts, and lens degeneration (15). The anterior segment differences between zebrafish and mice may be due to allelic or species variation. In addition, mammals may form laminin heterotrimers not found in zebrafish that compensate for the loss of functional $\alpha 1$.

The present study demonstrates the importance of laminin $\alpha 1$ in the development of the mouse retina, particularly with regard to angiogenesis. The following model may explain the phenotypes observed. In *Lama1^{nmf223}* homozygotes, the Y265C point mutation disrupts the binding of laminin $\alpha 1$ to one of its interacting partners on retinal Müller cells, whereas in the conditional null mouse described, the loss of *Lama1* disrupts the entire assembly of the inner limiting membrane. In both cases, astrocytes migrate into the vitreous, where they associate with hyaloid vessels, preventing their regression. The lack of an astrocyte template affects endothelial cell differentiation and migration, disrupting the retinal primary vascular plexus formation and leaving the retina dependent on the hyaloid vasculature. Around P10, hypoxia stimulates the branching of hyaloid vessels into the retina, allowing the deep and intermediate vascular plexi to form. Although the cause of inner nuclear layer thinning in *Lama1^{nmf223}* homozygotes is unknown, the uneven peripheral retinal vasculature in the *Lama1^Δ* homozygotes probably results in hypoxia and the observed cell loss.

The mouse models described herein suggest that point mutations in human *LAMA1* could impact retinal development and function without altering survival. Based on the vitreal fibroplasia and abnormal vascular development observed in *Lama1* mouse mutants, it is possible that mutations in *LAMA1* could predispose individuals to retinal detachment. Indeed, retinal detachment was observed in six of eight (75%) *Lama1^Δ* homozygotes examined (data not shown). Given the similarities between the *Lama1* and the *Collagen XVIII* mutants as well as the known interactions between laminins and endostatin, it is possible that *LAMA1* could also contribute to Knobloch syndrome, in which patients experience persistent fetal vasculature. Mutations in *Collagen XVIII* have been identified in Knobloch syndrome but do not account for all cases of this condition (51, 52). Furthermore, some mutations in *Collagen XVIII* leading to Knobloch syndrome also reduce affinity toward laminin (51, 52). The increased eye diameter observed in *Lama1^Δ* homozygotes also suggests a possible link to myopia, which is associated with increased eye size (53). Interestingly, a locus for high grade myopia-2 maps to a region on human chromosome 18 that contains *LAMA1* (54, 55). Finally, mutations in *LAMB2* have recently been shown to cause Pierson disease, in which patients experience microcoria (narrowing of the pupils) as well as kidney and central nervous system abnormalities clinically characterized by microcoria (fixed narrowing of the pupils) (56). Therefore, this is the second member of the lami-

nin gene family to cause eye disease when mutated. Although additional studies will be required to completely define the function of *Lama1* in retinal development, the availability of the two models described here will facilitate the discovery process.

In conclusion, this study emphasizes the importance of the inner limiting membrane in retinal development and maintenance and suggests that mutations in genes encoding other components of this structure or binding partners could have similar effects on the retina. These should, therefore, be considered candidate genes for human retinal diseases.

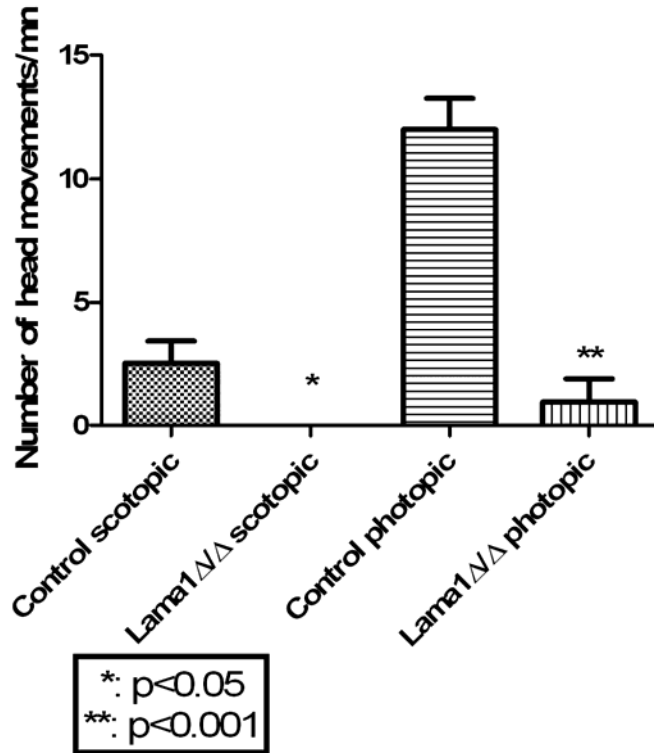
Acknowledgments—We thank Dr. Lydia Sorokin and Dr. Takako Sasaki for kindly providing laminin $\alpha 1$ antibodies and Peter Yurchenco for the pCIS laminin $\alpha 1$ construct. We also appreciate the careful review of the manuscript by Dr. Mary Ann Handel, Dr. Robert Burgess, and Melissa Berry. We especially thank Gérard Cremel, Pierre Hubert, and Michèle Kedingler for great help, advice, and support. We also thank Jeanie Hansen for excellent animal care, Jesse Hammer for figure preparation, and the Scientific Services of The Jackson Laboratory for assistance with this project.

REFERENCES

1. Aumailley, M., Bruckner-Tuderman, L., Carter, W. G., Deutzmann, R., Edgar, D., Ekblom, P., Engel, J., Engvall, E., Hohenester, E., Jones, J. C., Kleinman, H. K., Marinkovich, M. P., Martin, G. R., Mayer, U., Meneguzzi, G., Miner, J. H., Miyazaki, K., Patarroyo, M., Paulsson, M., Quaranta, V., Sanes, J. R., Sasaki, T., Sekiguchi, K., Sorokin, L. M., Talts, J. F., Tryggvason, K., Uitto, J., Virtanen, I., von der Mark, K., Wewer, U. M., Yamada, Y., and Yurchenco, P. D. (2005) *Matrix Biol.* **24**, 326–332
2. Colognato, H., and Yurchenco, P. D. (2000) *Dev. Dyn.* **218**, 213–234
3. Dziadek, M., and Timpl, R. (1985) *Dev. Biol.* **111**, 372–382
4. Ekblom, M., Falk, M., Salmivirta, K., Durbeek, M., and Ekblom, P. (1998) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **857**, 194–211
5. Falk, M., Ferletta, M., Forsberg, E., and Ekblom, P. (1999) *Matrix Biol.* **18**, 557–568
6. Kohno, T., Sorgente, N., Ishibashi, T., Goodnight, R., and Ryan, S. J. (1987) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **28**, 506–514
7. Libby, R. T., Champlaud, M. F., Claudepierre, T., Xu, Y., Gibbons, E. P., Koch, M., Burgeson, R. E., Hunter, D. D., and Brunken, W. J. (2000) *J. Neurosci.* **20**, 6517–6528
8. Dixelius, J., Jakobsson, L., Genersch, E., Bohman, S., Ekblom, P., and Claesson-Welsh, L. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 23766–23772
9. Malinda, K. M., Nomizu, M., Chung, M., Delgado, M., Kuratomi, Y., Yamada, Y., Kleinman, H. K., and Ponce, M. L. (1999) *FASEB J.* **13**, 53–62
10. Alpy, F., Jivkov, I., Sorokin, L., Klein, A., Arnold, C., Huss, Y., Kedingler, M., Simon-Assmann, P., and Lefebvre, O. (2005) *Genesis* **43**, 59–70
11. Miner, J. H., Li, C., Mudd, J. L., Go, G., and Sutherland, A. E. (2004) *Development* **131**, 2247–2256
12. Biehlmaier, O., Makhankov, Y., and Neuhauss, S. C. (2007) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **48**, 2887–2894
13. Karlstrom, R. O., Trowe, T., Klostermann, S., Baier, H., Brand, M., Crawford, A. D., Grunewald, B., Haffter, P., Hoffmann, H., Meyer, S. U., Müller, B. K., Richter, S., van Eeden, F. J., Nüsslein-Volhard, C., and Bonhoeffer, F. (1996) *Development* **123**, 427–438
14. Paulus, J. D., and Halloran, M. C. (2006) *Dev. Dyn.* **235**, 213–224
15. Semina, E. V., Bosenko, D. V., Zinkevich, N. C., Soules, K. A., Hyde, D. R., Vihtelic, T. S., Willer, G. B., Gregg, R. G., and Link, B. A. (2006) *Dev. Biol.* **299**, 63–77
16. Zinkevich, N. S., Bosenko, D. V., Link, B. A., and Semina, E. V. (2006) *BMC Dev. Biol.* **6**, 13
17. Hayashi, S., Lewis, P., Pevny, L., and McMahon, A. P. (2002) *Mech. Dev.* **119**, Suppl. 1, S97–S101
18. Buffone, G. J., and Darlington, G. J. (1985) *Clin. Chem.* **31**, 164–165
19. Lee, Y., Kameya, S., Cox, G. A., Hsu, J., Hicks, W., Maddatu, T. P., Smith,

- R. S., Naggert, J. K., Peachey, N. S., and Nishina, P. M. (2005) *Mol. Cell Neurosci.* **30**, 160–172
20. Abdeljalil, J., Hamid, M., Abdel-Mouttalib, O., Stéphane, R., Raymond, R., Johan, A., José, S., Pierre, C., and Serge, P. (2005) *Vision Res.* **45**, 1439–1446
 21. Sorokin, L. M., Conzelmann, S., Ekblom, P., Battaglia, C., Aumailley, M., and Timpl, R. (1992) *Exp. Cell Res.* **201**, 137–144
 22. Ettner, N., Göhring, W., Sasaki, T., Mann, K., and Timpl, R. (1998) *FEBS Lett.* **430**, 217–221
 23. De Arcangelis, A., Neuville, P., Boukamel, R., Lefebvre, O., Kedinger, M., and Simon-Assmann, P. (1996) *J. Cell Biol.* **133**, 417–430
 24. Dorrell, M. I., Aguilar, E., and Friedlander, M. (2002) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **43**, 3500–3510
 25. Fukai, N., Eklund, L., Marneros, A. G., Oh, S. P., Keene, D. R., Tamarkin, L., Niemelä, M., Ilves, M., Li, E., Pihlajaniemi, T., and Olsen, B. R. (2002) *EMBO J.* **21**, 1535–1544
 26. Ohlmann, A. V., Adamek, E., Ohlmann, A., and Lütjen-Drecoll, E. (2004) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **45**, 2384–2390
 27. Luty, G. A., and McLeod, D. S. (1992) *Arch. Ophthalmol.* **110**, 267–276
 28. Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A., and Ladant, D. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 5752–5756
 29. Sorokin, L. M., Pausch, F., Durbeek, M., and Ekblom, P. (1997) *Dev. Dyn.* **210**, 446–462
 30. Odenthal, U., Haehn, S., Tunggal, P., Merkl, B., Schomburg, D., Frie, C., Paulsson, M., and Smyth, N. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 44504–44512
 31. Yurchenco, P. D., and Cheng, Y. S. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 17286–17299
 32. Miner, J. H., and Yurchenco, P. D. (2004) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**, 255–284
 33. Pöschl, E., Schlötzer-Schrehardt, U., Brachvogel, B., Saito, K., Ninomiya, Y., and Mayer, U. (2004) *Development* **131**, 1619–1628
 34. Kumagai, C., Kadowaki, T., and Kitagawa, Y. (1997) *FEBS Lett.* **412**, 211–216
 35. Mascarenhas, J. B., Rüegg, M. A., Sasaki, T., Eble, J. A., Engel, J., and Stetefeld, J. (2005) *Matrix Biol.* **23**, 507–513
 36. Schittny, J. C., and Yurchenco, P. D. (1989) *Curr. Opin. Cell Biol.* **1**, 983–988
 37. McKee, K. K., Harrison, D., Capizzi, S., and Yurchenco, P. D. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 21437–21447
 38. Méhes, E., Czirók, A., Hegedüs, B., Vicsek, T., and Jancsik, V. (2002) *Cell Motil. Cytoskeleton* **53**, 203–213
 39. Colognato-Pyke, H., O'Rear, J. J., Yamada, Y., Carbonetto, S., Cheng, Y. S., and Yurchenco, P. D. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 9398–9406
 40. Schneiders, F. I., Maertens, B., Böse, K., Li, Y., Brunken, W. J., Paulsson, M., Smyth, N., and Koch, M. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 23750–23758
 41. Patton, B. L., Wang, B., Tarumi, Y. S., Seburn, K. L., and Burgess, R. W. (2008) *J. Cell Sci.* **121**, 1593–1604
 42. Peachey, N. S., Quiambao, A. B., Xu, X., Pardue, M. T., Roveri, L., McCall, M. A., and Al-Ubaidi, M. R. (2003) *Exp. Eye Res.* **77**, 477–483
 43. Dénes, V., Witkovsky, P., Koch, M., Hunter, D. D., Pinzón-Duarte, G., and Brunken, W. J. (2007) *Vis. Neurosci.* **24**, 549–562
 44. Halfter, W., Willem, M., and Mayer, U. (2005) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **46**, 1000–1009
 45. Hurskainen, M., Eklund, L., Hägg, P. O., Fruttiger, M., Sormunen, R., Ilves, M., and Pihlajaniemi, T. (2005) *FASEB J.* **19**, 1564–1566
 46. Sasaki, T., Fukai, N., Mann, K., Göhring, W., Olsen, B. R., and Timpl, R. (1998) *EMBO J.* **17**, 4249–4256
 47. Shichiri, M., and Hirata, Y. (2001) *FASEB J.* **15**, 1044–1053
 48. Dhanabal, M., Ramchandran, R., Waterman, M. J., Lu, H., Knebelmann, B., Segal, M., and Sukhatme, V. P. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 11721–11726
 49. Javaherian, K., Park, S. Y., Pickl, W. F., LaMontagne, K. R., Sjin, R. T., Gillies, S., and Lo, K. M. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 45211–45218
 50. Kuo, C. J., LaMontagne, K. R., Jr., Garcia-Cardeña, G., Ackley, B. D., Kalmann, D., Park, S., Christofferson, R., Kamihara, J., Ding, Y. H., Lo, K. M., Gillies, S., Folkman, J., Mulligan, R. C., and Javaherian, K. (2001) *J. Cell Biol.* **152**, 1233–1246
 51. Duh, E. J., Yao, Y. G., Dagli, M., and Goldberg, M. F. (2004) *Ophthalmology* **111**, 1885–1888
 52. Menzel, O., Bekkeheien, R. C., Reymond, A., Fukai, N., Boye, E., Kosztolanyi, G., Aftimos, S., Deutsch, S., Scott, H. S., Olsen, B. R., Antonarakis, S. E., and Guipponi, M. (2004) *Hum. Mutat.* **23**, 77–84
 53. Feldkämper, M., and Schaeffel, F. (2003) *Dev. Ophthalmol.* **37**, 34–49
 54. Scavello, G. S., Jr., Paluru, P. C., Zhou, J., White, P. S., Rappaport, E. F., and Young, T. L. (2005) *Mol. Vis.* **11**, 97–110
 55. Young, T. L., Ronan, S. M., Drahozal, L. A., Wildenberg, S. C., Alvear, A. B., Oetting, W. S., Atwood, L. D., Wilkin, D. J., and King, R. A. (1998) *Am. J. Hum. Genet.* **63**, 109–119
 56. Zenker, M., Aigner, T., Wendler, O., Tralau, T., Müntefering, H., Fenski, R., Pitz, S., Schumacher, V., Royer-Pokora, B., Wühl, E., Cochat, P., Bouvier, R., Kraus, C., Mark, K., Madlon, H., Dötsch, J., Rascher, W., Maruniak-Chudek, I., Lennert, T., Neumann, L. M., and Reis, A. (2004) *Hum. Mol. Genet.* **13**, 2625–2632

Supplement 1



Supplement 1: Behavioral testing using the optomotor test showed that *Lama1*^{ΔΔ} homozygotes are functionally blind. Bars indicate the number of head movements recorded per minute in control (bars 1 and 3) and *Lama1*^{ΔΔ} homozygotes (bars 2 and 4). Asterisks indicate significant differences. *Lama1*^{ΔΔ} homozygotes scored significantly lower on both scotopic (bars 1 and 2) and photopic tests (bars 3 and 4).

III. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Cette étude présente le premier modèle murin de perte de fonction conditionnelle de la LM α 1 (Lama1^{-/-} Sox2-Cre) permettant d'étudier le rôle de la LM α 1 à des stades ultérieurs du développement embryonnaire. Il a permis ainsi d'étudier le rôle de la LM α 1 dans le développement vasculaire rétinien et de comparer nos données avec celles obtenues chez la souris portant une mutation ponctuelle dans le domaine LN.

L'absence de l'ILM chez les souris Lama1^{-/-} Sox2-Cre n'est pas surprenant étant donné que la LM111 fait partie intégrante de l'ILM. Mais il est toutefois intéressant de voir que la mutation au niveau d'un seul acide aminé du domaine LN de la LM α 1 impacte également d'une façon négative l'ILM, qui présente des ruptures fréquentes chez les souris mutantes Lama1^{nmf223/nmf223}. Notre étude montre que la tyrosine 265 est importante dans la polymérisation des laminines et que la mutation Y265C doit certainement modifier la structure 3D du domaine LN.

Les données de la littérature montrent que la LM111 exerce une activité chémo-attractante sur les cellules de Müller (Méhes et al., 2002). Le domaine LN contient des sites de liaison pour les intégrines α 1 β 1 et α 2 β 1, sa version Y265C pourrait perturber ces sites de liaison et avoir des conséquences négatives sur l'attachement des cellules de Müller sur la lame basale de l'ILM. L' α -dystroglycan est décrit comme un récepteur présent sur les cellules de Müller et qui stimule la motilité de ces cellules après liaison à la LM111 (Méhes et al., 2005). L'expression de l' α -dystroglycan est fortement perturbée chez les souris Lama1^{-/-}Sox2-Cre ce qui pourrait expliquer les aberrations de positionnement des cellules de Müller. D'une façon intéressante les souris mutées pour le gène *Large*, codant pour une glycosyl-transférase, dont une des fonctions est de glycosyler l' α -dystroglycan lui permettant ainsi de lier la LM α 1 au niveau des domaines LG (Inamori et al., 2012), présentent des phénotypes similaires aux souris de perte de fonction de la LM α 1 (Lee et al., 2005).

Les nétrines sont des protéines qui possèdent une structure proche de partie NH₂ terminale des laminines, notamment la présence d'un domaine LN suivi d'un certain nombre de répétitions EGF-like (Rajasekharan and Kennedy, 2009). La nétrine-4 peut lier la LM111, notamment par interaction avec le domaine LN de la LM α 1 et ainsi se retrouver dans les lames basales (Schneiders et al., 2007). Elle est décrite en tant qu'un stimulateur de l'angiogenèse rétinienne étant exprimée par les cellules de Müller (Lambert et al., 2012; Lange et al., 2012). Il est tentant de postuler que les perturbations

observées chez les souris $Lama1^{-/-} Sox2-Cre$ sont liées à une mauvaise localisation de la nétrine-4. Cependant une étude récente indique que les souris invalidées pour la nétrine-4 n'ont pas un phénotype oculaire marquant. Toutefois ces souris présentent une perturbation de l'angiogenèse avec une augmentation des ramifications de capillaires (Li et al., 2012). Un autre membre de la famille des nétrines, la nétrine-1 est décrite pour son action attractante sur les axones alors qu'une compétition avec la LM111 inhibe cette action pour la transformer en répulsion (Höpker et al., 1999). Ces données suggèrent que potentiellement la nétrine-1 pourrait lier également la LM111. Bien que son rôle soit encore soumis à controverse, il semblerait que la nétrine-1 soit aussi un facteur pro-angiogénique (Castets and Mehlen, 2010), dont on pourra également déterminer si sa localisation est perturbée dans les rétines des souris mutantes $LM\alpha 1$.

Les travaux récemment réalisés au laboratoire sur ce même modèle murin $Lama1^{-/-} Sox2-Cre$ indiquent que ces souris présentent également un phénotype au niveau du cervelet. Cette structure cérébrale est importante dans le contrôle de l'équilibre et de la motricité, présente des anomalies histologiques dès les premières étapes de son développement postnatal chez les souris $Lama1^{-/-} Sox2-Cre$. Chez ses souris, la lame basale au niveau de la pie-mère est discontinue, avec une prolifération excessive des précurseurs des cellules granulaires contrebalancée par une mort cellulaire massive se produisant entre P7 et P20. La conséquence directe de ces perturbations se traduit par une réduction importante de la taille du cervelet chez ces animaux. De plus l'absence de $LM\alpha 1$ a un impact sur la glie de Bergmann (l'échafaudage cellulaire qui permet aux cellules granulaires de rejoindre correctement leur position laminaire) qui est fortement perturbée, avec des prolongements aberrants, qui rappellent ceux observés pour les cellules de Müller de la rétine. Ce défaut conduit à une désorganisation globale du cervelet dont le signe majeur est la persistance d'îlots de cellules granulaires dans la couche granulaire externe à l'âge adulte (Heng et al., 2011). Ces données ont été récemment confirmées par une autre étude (Ichikawa-Tomikawa et al., 2012). Outre la rétine et le cervelet, les souris $Lama1^{-/-} Sox2-Cre$ présentent une perturbation structurale du néocortex, la structure cérébrale responsable des fonctions cognitives. Les résultats préliminaires obtenus dans l'équipe montrent là encore de nombreuses anomalies histologiques, telles que les ruptures localisées de la lame basale au niveau de la pie-mère corticale, le mauvais positionnement des neurones corticaux, les ondulations de la surface corticale, accompagnées de troubles de la croissance axonale. De plus on y trouve un déficit de glie radiaire, qui a le même rôle que la glie de Bergmann dans le

cervelet (Heng et al., en préparation). Cela suggère un rôle majeur de la LM α 1 dans le système nerveux central. Le réseau vasculaire du cerveau de ces animaux est en cours d'investigation dans l'équipe.

On peut se poser la question de savoir si les défauts de vascularisation observés dans la rétine des animaux mutants et invalidés pour la LM α 1 sont une cause directe ou indirecte de l'absence de LM α 1. Les différentes études ont montré que la LM111 et différents peptides issus de la LM α 1 sont pro-angiogéniques (pour la revue voir Simon-Assmann et al., 2011). Il est connu que les interactions entre les astrocytes et les cellules endothéliales sont importantes pour la différenciation et la migration des cellules endothéliales, interactions qui vont aboutir à la formation du plexus vasculaire rétinien mais également dans tout le système nerveux central (Abbott, 2002). Les défauts d'organisation des cellules de Müller au niveau de la rétine dans les deux modèles murins Lama1^{hmf223/nmf223} et Lama1^{-/-} Sox2-Cre, pourraient ainsi avoir des conséquences secondaires sur le réseau vasculaire. Enfin, il est possible que la LM α 1 puisse agir sur l'angiogenèse à travers différentes voies de signalisation angiogéniques. Ceci sera discuté dans la partie publication 2.

**PARTIE II. ETUDE DE L'IMPACT DE LA LM α 1 SUR LA
PROGRESSION ET L'ANGIOGENESE TUMORALE**

I. CONTEXTE ET RESUME DU TRAVAIL

Nous venons de voir que la LM α 1 a un rôle dans l'angiogenèse physiologique. Les travaux antérieurs du laboratoire montrent que la présence de la LM α 1 dans un modèle de xénogreffe sous-cutanée chez la souris Nude, réalisée à partir de cellules HT29 (cellules d'adénocarcinomes humains) entraîne une augmentation de la croissance tumorale, associée à une vascularisation accrue (De Arcangelis et al., 2001). A part le travail de Määttä et ses collaborateurs (2001) montrant l'expression de la LM α 1 dans 1 cas sur 6 de carcinome humain, aucune donnée de la littérature à ma connaissance, n'a décrit la LM α 1 dans un contexte de tumorigenèse colorectale. L'étude chez les patients atteints de cancer colorectal a révélé une forte présence de laminine sérique, corrélée à une diminution de leur survie (Saito and Kameoka, 2005). Cependant, ce travail n'a pas identifié quelle isoforme de laminine pourrait être impliquée.

En tenant compte de l'ensemble de ces données, mon objectif a été dans un premier temps de confirmer l'impact positif de la LM α 1 sur l'angiogenèse dans le modèle de xénogreffe et de caractériser cette angiogenèse. Dans un deuxième temps, j'ai étudié l'impact de la LM α 1 sur la progression des tumeurs colorectales et l'angiogenèse dans un modèle murin transgénique de surexpression soumis à un carcinogène. Ce modèle a été réalisé au laboratoire : il consiste à utiliser l'ADNc codant pour la LM α 1 sous le contrôle d'un promoteur spécifique de l'intestin, celui de la villine (Pinto et al., 1999) et de l'exprimer par transgénèse dans la région des cryptes de l'intestin grêle et surtout du côlon. Les souris transgéniques V-LM α 1 ne forment pas de façon spontanée des tumeurs colorectales. Afin d'étudier le rôle de la LM α 1 dans un contexte tumorale, ces souris ont été traitées soit avec un carcinogène l'azoxyméthane (AOM) soit avec de l'azoxyméthane couplé à un traitement au sodium sulfate de dextran (AOM-DSS) aboutissant à la formation de tumeurs coliques et récapitulant bien les différentes étapes de la pathologie humaine (Nambiar et al., 2003; Neufert et al., 2007; De Robertis et al., 2011). Les résultats montrent que la LM α 1 stimule l'incidence tumorale et la prolifération des cellules cancéreuses. Cette incidence tumorale a été également confirmée en utilisant un modèle de cancérogenèse intestinale des souris mutées pour le gène suppresseur de tumeur colique *APC* (Fodde et al., 1994). Suite à ces premiers résultats, j'ai étudié dans ce modèle l'impact de la LM α 1 sur l'angiogenèse et l'expansion des fibroblastes. Mes résultats ont montré que

l'incidence tumorale stimulée par la LM α 1 s'accompagne d'un accroissement de l'angiogenèse et la maturation des vaisseaux sanguins et une expansion des fibroblastes. J'ai également confirmé ces résultats dans le modèle de xénogreffe HT29LM α 1.

Après avoir déterminé l'impact de la LM α 1 sur l'angiogenèse, mon objectif était de développer des outils permettant de chercher les mécanismes d'actions de la LM α 1 sur l'angiogenèse (détaillé dans la partie résultats complémentaires), en se basant sur les données de la littérature. Après avoir analysé l'expression de différents gènes candidats, plus particulièrement ceux impliqués dans l'angiogenèse, j'ai pu montrer que la surexpression de la LM α 1 aboutissait à une augmentation de l'expression du VEGFA, de Dll4 et des cibles de ce dernier Hey1 et Hey2 dans le stroma tumoral mais pas au niveau des cellules cancéreuses. J'ai ainsi pu montrer que l'expression de ces trois composants de la voie Notch diminuaient au niveau de la rétine des souris invalidées pour la LM α 1 (LM α 1^{cko} : Lama1^{-/-}Sox2-Cre) et des souris mutantes LM α 1^{Y265C} (Lama1^{nmf223/nmf223}).

Ensuite, pour déterminer dans quel type cellulaire la LM α 1 était capable de moduler l'expression du VEGF, de Dll4 et des composants Notch, j'ai développé un modèle *in vitro*, consistant en la culture de cellules stromales, de différents fibroblastes normaux et associés au cancer (CAF) et de cellules endothéliales sur la protéine purifiée LM111 (le trimère contenant la chaîne α 1). J'ai pu montrer que la LM α 1 stimulait l'expression de Dll4 dans tous les fibroblastes et les cellules endothéliales. Par contre, l'activation de la voie Notch (expression de Hey1 et Hey2) a lieu uniquement dans des cellules endothéliales. En revanche la LM α 1 stimule le VEGFA uniquement dans les CAF et elle a une action chémo-attractrice sur ces fibroblastes.

Ensuite, j'ai tenté de comparer les résultats obtenus par les modèles animaux aux tumeurs coliques humaines. J'ai pu montrer que la LM α 1 est la chaîne la plus fortement exprimée dans ces tumeurs coliques humaines comparé à leurs tissus sains adjacents. Cette forte expression de la LM α 1 s'accompagne d'une augmentation de l'expression du VEGFA et Dll4. De plus l'expression de la LM α 1 est corrélée significativement avec celle de Dll4 dans ces tumeurs coliques. Ces résultats sont présentés dans le manuscrit de la publication 2.

Suite au manuscrit, un chapitre présentera mes travaux complémentaires, réalisés dans le but d'approfondir ce travail.

**II. PUBLICATION 2: LAMININ ALPHA 1 PROMOTES
ANGIOGENESIS IN COLON CANCER INVOLVING VEGFA
AND NOTCH SIGNALING**

Laminin alpha 1 promotes angiogenesis in colon cancer involving VEGFA and Notch signaling

Elmina Mammadova-Bach¹, Ivo Jivkov¹, Malia Edwards², Annick Klein¹, Agnès Méchine-Neuville³, Laura Pisarsky^{1, 4}, Michele Kedinger¹, Olivier De Wever⁵, Noona Ambartsumian⁶, Sylvie Robine⁷, Patricia Simon-Assmann¹, Gertraud Orend¹ and Olivier Lefebvre^{*1}

¹Inserm U682, Strasbourg, F-67200 France; Univ de Strasbourg, F-67000 France.

²Wilmer Ophthalmological Institute, Johns Hopkins Hospital, Baltimore, MD 21287, USA.

³Department of Anatomy and Pathology, CHRU Houtepierre, F-67200 Strasbourg, France.

⁴present address, University of Basel, Basel, Switzerland.

⁵Laboratory of Experimental Cancer Research, Department of Radiotherapy and Nuclear Medicine, Ghent University Hospital, 9000 Ghent, Belgium.

⁶Institut for Cancer Biology, Copenhagen, Denmark.

⁷Institut Curie, 75248 Paris, France.

Key words: Laminin α 1; colorectal cancer, tumor angiogenesis, VEGFA, Notch pathway.

Grant support:

This work has been supported by Inserm, the Ligue contre le Cancer (OL), the Institut National du Cancer (PSA, GO), and the Houtepierre Hospital, Strasbourg (GO). EMB was a recipient of fellowship from the Ligue contre le Cancer.

Abbreviations:

BM: basement membrane; ECM: extracellular matrix; LM: laminin. V-LM α 1: villin-LM α 1 transgenic mice.

***Correspondence:**

Olivier Lefebvre

Inserm U682

Impact du microenvironnement sur l'angiogenèse et l'invasion tumorale

3, Avenue Molière 67200 Strasbourg- France

E-mail: olivier.lefebvre@inserm.fr

Phone: (33) 3 88 27 77 27 - Fax: (33) 3 88 26 35 38

Conflicts of interest:

The authors disclose no conflicts

Author contribution:

EMB : study concept and design, acquisition, analysis and interpretation of data, drafting of the manuscript

IJ : acquisition of data, analysis and interpretation of data

ME : providing materials

AK : expertise in histology and immunohistochemistry

AMN : expertise in anatomo-pathology

LP : acquisition of data

MK : establishment of collaboration, funding, critical revision of the manuscript

ODW : providing material

NA : providing material

SR : providing material

PSA : critical revision of the manuscript

GO : drafting of the manuscript, funding,

OL : establishment of mouse models, study concept and design, acquisition, analysis and interpretation of data, drafting of the manuscript, funding.

Abstract

Matrix remodeling is a key feature of malignant tumors and plays a crucial role in cancer progression. We had identified the laminin alpha1 (LM α 1) chain to promote tumor progression. By using murine gain and loss of function models combined with cancer models (mutated APC, AOM treatment, cancer cell grafting), we now demonstrate that overexpression of LM α 1 enhances tumor incidence, growth and angiogenesis. Tumor blood vessels appeared mature as demonstrated by an increased LM α 4 expression in the endothelial basement membrane and by an increased pericyte number and blood vessel coverage. LM α 1 triggered expression of VEGFA and the Notch pathway through Dll4 and downstream Hey1 and Hey2 which were increased. We also provide a link of LM α 1 to Notch signaling in developmental angiogenesis by showing that aberrant retinal angiogenesis in two LM α 1 mutated mouse models exhibits reduced Dll4, Hey1 and Hey2 expression. Finally, in contrast to all examined LM molecules, LM α 1 is the only one that exhibits consistent overexpression in human colon cancer compared to normal tissue, which also correlated with elevated Dll4 expression. Thus high expression of LM α 1 and Dll4 may represent a useful diagnostic tool and novel therapeutic targets in colon cancer.

Introduction

Cancer progression is considered as a multistep process, where tumor cells acquire properties that enable their survival, proliferation and invasion, finally leading to dissemination and establishment of metastasis in whole body. Some steps are cell autonomous while others need the cooperation with other cell types within the tumor stroma (Hanahan and Weinberg, 2011). The tumor stroma is composed of tumor associated cells such as endothelial cells, immune cells and mesenchymal cells that secrete soluble factors as well as extracellular matrix (ECM) molecules. The ECM of tumors is very different from that of normal tissue and is often characterized by huge amounts of collagen and other ECM molecules such as oncofetal fibronectin and tenascin-C (Midwood et al., 2011; Van Obberghen-Schilling et al., 2011). Cancer associated fibroblasts (CAF) have been identified as important bystanders that drive cancer progression by secretion of soluble factors such as vascular endothelial growth factor A (VEGFA) and ECM molecules such as tenascin-C or periostin (Orimo et al., 2005; O'Connell et al., 2011; Malanchi et al., 2012).

Laminins (LMs) are heterotrimeric glycoproteins that together with other ECM molecules such as collagen type IV, nidogens and perlecan form a highly organized ECM network, so called basement membrane, which serves as barrier between epithelial and mesenchymal tissues (Yurchenco, 2011). LMs represent a large family of at least 15 isoforms. LMs are trimeric molecules composed of an α , β and γ chain (Simon-Assmann et al., 2011). LM111, composed of $\alpha1\beta1\gamma1$, was discovered more than thirty years ago in the mouse tumor EHS (Timpl et al., 1979) and is highly expressed in most basement membranes during embryonic development but found only in some restricted tissues in adult body (Falk et al., 1999). Whereas the LM $\beta1$ and $\gamma1$ chains are found in many isoforms, the LM $\alpha1$ chain is only present in LM111 and LM121. The physiological function and the implication of LM $\alpha1$ containing LMs in diseases are poorly understood. Some information was gathered from LM $\alpha1$ knockout mice. Deletion of the LM $\alpha1$ gene in mice revealed its crucial role in embryonic development. In a complete LM $\alpha1$ knockout we and others have shown that mice die *in utero* due to a severe defect in the extra-embryonic Reichert's membrane (Miner et al., 2004; Alpy et al., 2005). Recently, we have described a Sox2-driven conditional knockout where LM $\alpha1$ is deleted from embryonic tissues but not from the extra-embryonic Reichert's membrane. These mice are viable but blind due to disruption of the retina. We had observed a similar phenotype in mice with a point mutation in the LM $\alpha1$ gene (Edwards et al., 2010, 2011). The retina of LM $\alpha1$ mutated mice is characterized by a defective inner

limiting basement membrane, a decreased number of ganglionic cells, aberrant positioning of Muller glial cells and a profoundly disorganized retinal vasculature. Formation of the primary plexus after birth is retarded and the retinal blood vessels are tortuous in adult (Edwards et al., 2010, 2011). Also the organization of the cerebellum suffers from the absence of LM α 1 with a mis-positioning of Bergman glial cells and neurons. Moreover, the cerebellum is smaller due to an unbalanced and excessive proliferation and apoptosis (Heng et al., 2011; Ichikawa-Tomikawa et al., 2012). In humans, a point mutation in the LM α 1 gene was found in a family affected by recessive cognitive disorders (Najmabadi et al., 2011). So far only indirect data implicate LM α 1 in other human pathologies such as cancer. Several studies have identified serum LM as a potential maker for cancer (Chu et al., 2002; Rosa and Parise, 2008; Aghcheli et al., 2012) and, in colorectal cancer, high serum levels of LM correlated with a worse prognosis (Saito and Kameoka, 2005). We had demonstrated that overexpression of LM α 1 in the human HT29 colorectal cancer cell line causes increased tumor growth and angiogenesis upon xenografting (De Arcangelis et al., 2001). But the underlying mechanisms for this tumorigenesis promoting effect of LM α 1 were unknown.

Therefore, in this study, we have established a new transgenic model with ectopic expression of LM α 1 in the intestinal epithelium. Upon crossing with APC^{1638N/+} mice (Fodde et al., 1994) or upon treatment with the carcinogen AOM or AOM/DSS (De Robertis et al., 2011) which trigger colon tumorigenesis, we determined the impact of ectopically expressed LM α 1 on stochastically arising tumors in the immune competent mice. We observed that high LM α 1 promotes tumor formation and tumor angiogenesis. We also provide an underlying mechanism demonstrating an intimate cross talk of tumor and stromal cells with LM α 1 which triggers VEGFA and Notch signaling. We demonstrate that LM α 1 expressed by tumor cells attracts fibroblasts that secrete VEGFA and express DII4. This activates Notch signaling in endothelial cells but not in fibroblasts or tumor cells. Our data provide evidence that a causal link of LM α 1 to enhanced tumor angiogenesis and increased VEGFA and DII4 expression may also exist in human colon cancer since LM α 1, VEGFA and DII4 were found to be overexpressed in human colon tumors. Our results have strong implications for diagnosis and therapy of colon cancer.

Materials and methods

Cloning of the Villin-LM α 1 vector

The plasmid pBS-Villin-promoter containing 3.5 Kb of the murine villin promoter, the first non coding exon, 5.5 kb of the first intron and 15 nucleotides of the second villin exon, was kindly provided by Sylvie Robine (Institute Curie, Paris, France). The EcoRI site in the multi cloning site was destroyed by fill in ligation with T4 polymerase according to the manufacturer's instructions (NEB, OZYME, Saint Quentin Yvelines, France). Site directed mutagenesis (GeneEditor in vitro Site-Directed Mutagenesis system, Promega, Charbonnières-les-Bains, France) was then used to introduce a BsiWI site before the start codon of the Villin coding sequence using the 5' phosphorylated primer: 5'CCTTCTCCTCTAGGCTCGCGTACGATGACGTCGGACTTGC GG3'. A double strand annealed oligonucleotide, 5'GGCCGGACGCGTGAATTCGTCGACGC3' and 5'GGCCGCGTCGACGAATTCACGCGTCC3' containing restriction sites for MluI, EcoRI and Sall were inserted in the NotI site (present in the multi cloning site), generating the plasmid pBS-Villin-promoter-MES. The SV40 polyA region of the pEGFP plasmid (Clontech, OZYME, Saint Quentin Yvelines, France) was amplified by PCR using primers 5'GGCGCCTCTAGATCATAATCAGCCATA3' and 5'GGCGCCCTTAAGATACATTGATGAGTT3' before subcloning into the pGEMTeasy vector (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). After EcoRI digestion, the SV40 polyA fragment was purified with NucleoSpin Extract II kit (Machery-Nagel, Hoerd, France) and then subcloned into the EcoRI site of the plasmid pBS-Villin-promoter-MES. Site directed mutagenesis was used to introduce a BsiWI site (5' phosphorylated AGCGCAGGGAGCGGCGGCCGTACGATGCGCGGCAGCGGCACG3') before the initiation codon and a MluI site (5' phosphorylated CCCGGGCCTGAGCCCTAAACGCGTGCCAGCCTCTGCCCTTGG3') after the stop codon in the full length cDNA coding for the mouse LM α 1 in the pCIS vector (kindly provided by Peter Yurchenco, Piscataway, USA). The BsiWI-MluI fragment containing the LM α 1 cDNA was gel purified and subcloned into the BsiWI-MluI sites of the pBS-Villin-promoter-MES-SV40-polyA vector giving rise to plasmid pBS-Villin-LM α 1.

Generation of V-LM α 1 transgenic mice

From the pBS V-LM α 1 plasmid a Sall fragment containing the 9 kb Villin promoter region followed by the mouse LM α 1 cDNA and the SV40 polyA was obtained, purified and used for injection into pronuclei of fertilized oocytes (F1 hybrid C57Bl/6 x DBA/2, transgenic facility of the IGBMC, Strasbourg, France). Germline transmission was determined by PCR analysis of tail DNA, using the villin 1 primer present in the villin promoter (5'ATAGGAAGCCAGTTTCCCTTC3') and the LM17 primer present in the 5' region of the LM α 1 cDNA (5'TGACCCAGAGCACCGAGGCCA3') generating a fragment of 152 bp. For confirmation a second PCR was done obtaining a 166 bp product with primer LM116 present in the 3' region of the Lama1 cDNA (5'GCCTCATTCCGGGGCTGTGTG3') and primer SV40 3' (5'AATGTGGTATGGCTGATTATG3') encompassing the SV40 polyA sequence. Two founders out of 68 Villin-LM α 1 (V-LM α 1) showed stable integration and expression and were further used in parallel for all experiments. Heterozygous V-LM α 1 mice were kept using CD1 background (Charles River, L'Arbresle Cedex, France).

Generation of V-LM α 1/APC^{+1638N} mice

V-LM α 1 mice were crossed with APC^{+1638N} mice (kindly provided by Ricardo Fodde, Leiden, Netherlands). Double transgenic mice were kept using CD1 background.

AOM and AOM/DSS treatment

Eight week old wild type (WT) mice and V-LM α 1 littermates were injected intra-peritoneally (i.p.) with AOM (azoxymethane, 10 mg/kg, Sigma Aldrich, Lyon France) once a week for 5 weeks. Animals were sacrificed 9 months after the last AOM injection. For a combined AOM/DSS treatment eight week old WT and V-LM α 1 littermates were injected i.p. with a single dose of AOM. The day after, 3 % DSS (dextran sulfate sodium, molecular weight 36000-50000, MP Biomedicals, Illkirch, France) was provided in the drinking water for 5 days. Afterwards mice obtained regular water for 2 months before sacrifice. Colon tumor tissue was prepared, immediately snap frozen for RNA extraction in liquid nitrogen or was embedded into OCT (Labonord, Templemars, France) for tissue and immunofluorescence analysis. Samples were stored at -80°C.

Tumor xenograft experiments

10 million cells (HT29 control or HT29LM α 1 cells) were injected subcutaneously into eight week old nude MRF1 female mice (Janvier, La plaine Saint Denis, France). Mice were sacrificed 4 weeks after injection. Tumor tissue was fixed overnight in 4% PFA and embedded in paraffin, directly frozen in OCT or frozen on dry ice or liquid nitrogen for RNA or protein extraction. All material was conserved at -80° C.

Preparation of retinas

Homozygous mutant mice, harboring a point mutation Y265C in the LN domain (LM α 1^{Y265C}) or conditional knockout (LM α 1^{cko}) mice, have been described earlier (Edwards et al., 2010). Upon eye dissection retinas were isolated from LM α 1^{Y265C} or LM α 1^{cko} homozygous mice and their corresponding control littermates at the age of 7 days (P7). For RNA extraction, retinas were immediately snap frozen in liquid nitrogen and conserved at -80° C.

Cell lines

HT29 control and HT29LM α 1 cells were cultured as previously described (De Arcangelis et al., 2001). Human cancer associated fibroblasts CAF (kindly provided by Pr. Olivier De Vewer, Gent, Belgium), Mouse Embryonic Fibroblasts (kindly provided by Pr. Ruth Chiquet-Ehrissman, Basel, Switzerland) and IMR90, a human normal lung fibroblasts (CCL-186, ATCC, France) were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum, 1 % penicillin 10.000 U/mL/10.000 μ g/mL (Gibco, USA) and 40 μ g/mL of gentamycin (Gibco, USA). Human immortalized dermal microvascular endothelial cells cdc-HMEC.1 (kindly provided by Dr. Ellen Van Obberghen-Schilling, Nice, France) were maintained in MCDB 131 medium (Invitrogen) supplemented with 12.5% fetal calf serum, glutamin (10 mM; Invitrogen), EGF (10 ng/mL), bFGF (10 ng/mL), heparin (10 ng/mL), and hydrocortisone (1 μ g/mL); all compounds are from Sigma Aldrich, Lyon, France.

Conditioned Media

HT29 control and HT29LM α 1 cells were cultured for 5 days in DMEM/10% FCS. The conditioned media were collected, centrifuged to remove cell debris and stored at -20° C for up to 2 months before use.

Coating

Cell culture dishes were coated with LM111 (L2020, Sigma Aldrich, Lyon, France) or FN (fibronectin, purified from horse serum (Huang et al., 2001) overnight at 4°C. Both ECM molecules were used at a concentration of 10µg/cm². Different fibroblast lines, CAF, MEF, IMR90 and HMEC were plated onto uncoated, LM111 or FN coated dishes for up to 24 hours in their appropriate medium before RNA or protein extraction.

Boyden chamber chemo-attraction assay

Chemo-attraction assays were performed in 24 well Boyden Chambers with a polycarbonate filter of 8 µm pore size (Dutcher, Brumath, France). Conditioned media from HT29 control or HT29LMα1 cells were put in the lower chamber or LM111 (10µg/cm²) was coated on the outer surface of the insert. 3,000 CAF, IMR90 or HMEC cells were administered to the upper chamber and incubated overnight at 37°C in 5% CO₂. The insert was removed from the chamber and cells on the upper side of the filter that did not have transmigrated were removed. Cells on the lower side of the filter were fixed, stained with DAPI and quantified using the ImageJ software and the analyze particule modules (National Institutes of Health, USA). Three independent experiments with triplicates were done.

Colon cancer specimen

Primary human colon tumors and matched adjacent tissue with no signs of tumorigenesis (considered as normal) were obtained from 30 patients with a written consent according to conventional ethics standards. All surgical specimens were evaluated and histologically analyzed by an experienced pathologist. Data are listed in **Supplementary Table S2**. Tumor material and healthy tissue were isolated, immediately snap frozen for RNA extraction or were embedded into OCT (Labonord, Templemars, France) for tissue and immunofluorescence analysis.

Gene expression analysis

RNA was extracted with the TriReagent (Molecular Research Center Inc., Euromedex, France). RNA was treated with DNaseI and reverse transcribed using the High Capacity cDNA RT Kit. qRT-PCR was performed using the Power SYBR Green PCR Master Mix or TaqMan Gene Expression Master

Mix. All compounds are from Life Technologies, Villebon sur Yvette, France. Primer sequences or probes are listed in **Supplementary Table S3**. Two sets of primers/probes were used for determination of expression of LM α 1 in human tumors, one located in the 5' and the other in the 3' region of the gene giving similar results.

All data were normalized to the reference gene GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) for colon tumors. Relative expression in the control and interest group was calculated based on the mean of the control group using the $\Delta\Delta C_t$ method and is presented as $-\Delta\Delta C_t$. A primer design approach was used to obtain species specific real-time qRT-PCR primers. The coding regions of the mouse and human homologous cDNA sequences were aligned. Regions of low homology were chosen for selection of species specific primers that always were spanning an intron. Primer specificity was confirmed by using cDNA from human or mouse tissues. Only primers giving an efficiency value of 93 to 108% were used. When calculating murine or human gene expression in the xenograft tumors, primers for mouse or human PBDG (porphobilinogen deaminase) were used.

Histological and immunofluorescence analysis

For histological analysis, tissues were embedded in paraffin. Seven μm paraffin sections were stained with periodic acid-Schiff reagent and hematoxylin. The list of primary antibodies used is listed in the **Supplementary table S4**. For immunohistochemistry, tissue sections of 6 μm thickness were used. Tissue sections were deparaffinized with toluene, then boiled with the antigen retrieval sodium citrate buffer (pH 6) for 10 minutes. Sections were incubated with primary antibodies overnight at 4°C. Slides were thereafter incubated with biotinylated secondary antibodies (Vector Laboratories, EUROBIO/ABCYS, Les Ulis, France), amplified with the ABC Elite Vectorstain kit and developed with the DAB kit from Vector Laboratories. Slides were examined using Zeiss Axio Imager A1 microscope equipped with an A-Plan x5/0.12, an A-Plan x20/0.45 objective and a Zeiss AxioCam Icc3 color camera (Carl Zeiss, Le Pecq, France). For immunofluorescence staining, 6 μm cryosections were incubated overnight with primary antibodies, washed three times in PBS and incubated for 1 hour with Alexa 488- or cyanine3-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). After washing, nuclei were stained with DAPI (1/30000) and mounted using the FluorSave reagent (Calbiochem-Merck, Lyon France). Slides were examined using an epifluorescence Zeiss axio imager 2 microscope equipped with a Plan Apochromat x20/0.8, a Plan Apochromat

x40/0.95 objectives and an apotome module. Pictures were taken with a Zeiss Axiocam MRm black and white digital camera. Control sections were processed as above with omission of the primary antibodies.

Quantification of immunostaining signals

Surface quantification of immunofluorescent signals was done using the ImageJ software and the analyze particules module (National Institutes of Health, USA). Several images per tumor were taken using a 20x objective to cover most of the tumor surface. Data are presented as average area fraction per tumor in all defined groups. The following calculation was used to quantify pericyte coverage of vessels: $\text{area fraction of NG2} / \text{area fraction of CD31} = \text{area fraction of pericyte positive vessels}$. For proliferation analysis, immunohistochemical staining of Ki67 was quantified in defined fields and is represented as average of Ki67 positive cells per analyzed tumor area.

Protein extraction and immunoblotting

Proteins were extracted from cells and tissue using lysis buffer (50mM Tris pH 7, 150 mM NaCl, 1 % NP-40, and 1% protease inhibitors, Roche, Meylan, France). 50 µg of protein lysate (quantified by Bradford assay) was separated by SDS PAGE and transferred onto nitrocellulose membrane (Millipore, Molsheim, France). Membranes were incubated with different primary antibodies (**Supplementary table S4**). Bound HRP-coupled secondary antibodies were detected with ECL (Amersham).

Quantification of VEGF by ELISA

VEGF in total protein lysates of tumors (25µg) and CAF (50µg) was determined with a murin and human specific VEGFA ELISA kit following the manufacture`s instructions (R&D Systems, Minneapolis, USA) measuring absorbance at 450 nm (Biotek plate reader E800, Biotek, Colmar, France).

Statistical analysis

Statistical significance of results was analyzed by using the GraphPad Prism program version 5.0. The Shapiro-Wilk normality test was used to confirm the normality of the data, the difference in variance

was analyzed using the F-test and the statistical difference of the mean was analyzed using the Student unpaired two-tailed t test with Welch's correction in case of unequal variances. For data that did not follow a Gaussian distribution, the non parametric Mann-Whitney test was used. The one way ANOVA test followed by a Tukey's Multiple Comparison post-test was used for multiple data comparison. Contingency was analysed using the Fisher's exact test or chi-square test. Correlation studies were analyzed using Pearson R tests with Gaussian approximation. p-values smaller than 0.05 were considered as significant.

Results

Generation of transgenic mice overexpressing LM α 1

To investigate the role of LM α 1 in colon cancer, we have generated transgenic tumor mouse models in which the LM α 1 cDNA is expressed under the control of the 9 kb Villin promoter region (**Figure 1A**). The Villin promoter drives specific and efficient expression of transgenes in the gut endoderm along the entire intestinal crypt–villus axis (Pinto et al., 1999). In this study we used two founder lines that overexpressed LM α 1 at identical levels throughout the intestine, including the colon. LM α 1 was strongly overexpressed at RNA (more than 70-fold) and protein level in the colon of transgenic Villin-LM α 1 (V-LM α 1) mice in comparison to colon from wild type littermates as determined by qRT-PCR, Western blot analysis and tissue staining (**Figure 1 B-E**). In contrast to weak expression of LM α 1 in control colon tissue transgenic V-LM α 1 is expressed in the basement membrane of the crypt region (**Figure 1 D, E**). Overexpression of LM α 1 was not observed in any other analyzed organs (data not shown).

LM α 1 overexpression promotes tumor incidence and tumor cell proliferation

Upon analysis of proliferation, migration and differentiation in developing and adult intestinal tissue no obvious differences were noticed between transgenic and wild type control mice. Even in older mice, overexpression of LM α 1 does not lead to any abnormalities. To investigate the consequences of LM α 1 overexpression in colon cancer, we used the carcinogen azoxymethan (AOM) or a combination of AOM and DSS to induce colon carcinomas. The arising colon tumors closely resemble the human pathology in terms of histology and molecular events (Papanikolaou et al., 1998; De Robertis et al., 2011) including the Vogelstein adenoma to carcinoma sequence of events (Vogelstein et al., 1988). Tumors occurred as intra-mucosal carcinoma to PT2 adenocarcinomas. First, we have analyzed the expression of LM α 1 in normal and tumorigenic colon tissue. We found that LM α 1 mRNA levels were 7-fold higher in colon tumors in comparison to non-tumorigenic control tissue (**Figure 2 A**). Moreover, colon tumors from V-LM α 1 transgenic mice exhibited 8-fold higher LM α 1 levels than tumors from wild type mice (**Figure 2 A**). By immunofluorescence analysis we observed overexpression of LM α 1 in V-LM α 1 colon tumors with localization inside the tumor stroma and at the interface between cancer cells and the tumor stroma (**Figure 2 B-C**). To determine whether LM α 1 plays a role in colon

carcinogenesis, we compared the tumor incidence in wild-type and V-LM α 1 transgenic mice upon AOM induction. We observed that 100% of transgenic V-LM α 1 mice developed at least one tumor in the colon which was in contrast to control mice with a tumor incidence rate of 36% (**Figure 2 D**). We confirmed a tumor-promoting effect of LM α 1 in V-LM α 1 expressing mice harboring one allele with a deletion in the tumor suppressor gene APC that spontaneously develop adenocarcinomas (Fodde et al., 1994); 75% of double transgenic V-LM α 1/APC^{+/^{1638N} mice developed tumors in contrast to 17% of APC^{+/^{1638N} control mice (**Supplementary Fig. S1**).}}

Finally we addressed whether overexpressed LM α 1 had an effect on tumor cell proliferation by quantification of Ki-67 positive cells (**Figure 2 E, F**). We observed that the colon tumors from V-LM α 1 mice exhibited 1.4-fold more proliferative cells than tumors from control mice (**Figure 2 G**).

In conclusion LM α 1 levels are increased in colon carcinoma which correlates with an increased tumor incidence and enhanced cell proliferation.

LM α 1 promotes tumor angiogenesis and improves pericyte coverage of blood vessels

Since we previously described that overexpression of LM α 1 in a human colon carcinoma xenograft model leads to increased tumor growth and enhanced tumor vascularization (De Arcangelis et al., 2001) we now determined angiogenesis arising in colon tumors by quantification of the endothelial marker CD31. We found that the number of endothelial cells is 2.2-fold higher in V-LM α 1 colon tumors than in control tumors (**Figure 3 A-C**).

Next we addressed whether LM α 1 has an impact on blood vessel maturation. For this purpose, we quantified the number of pericyte-covered blood vessels using the pericyte marker NG2 (Stallcup, 2002). We observed that the NG2/CD31 ratio was increased by 1.8-fold in V-LM α 1 colon tumors in comparison to control tumors (**Figure 3 D-F**) indicating an improved pericyte coverage.

The pericyte recruitment to endothelial cells during angiogenesis is described to stimulate vascular basement membrane assembly (Stratman et al., 2009). Since LM-411 and LM-511 are major laminin isoforms in vascular basement membranes (Hallmann et al., 2005), we quantified the expression of LM α 4 and LM α 5. We demonstrate a slight but significant increase of LM α 4 in blood vessels of V-LM α 1 colon tumors compared to control tumors (**Figure 3 G-I**). However, we observed no change in LM α 5 expression levels (data not shown). Also in the HT29LM α 1 xenograft model with overexpression of LM α 1 (De Arcangelis et al., 2001), we observed a significant increase of the NG2/CD31 ratio

compared to control tumors by 1.5 fold (**Supplementary Fig.S2 A-F**). These HT29LM α 1 tumors exhibited also a significantly increased expression of LM α 4 by 2.2 fold around the vessels compared to control tumors (**Supplementary Fig. S2 G-I**). These results prompted us to determine expression of LM α 4 in the basement membrane of the retinal vasculature of mice with either a point mutation or a deletion of the LM α 1 gene since these mice exhibit a strong defect in retinal angiogenesis (Edwards et al., 2010, 2011). We found a significant decrease in LM α 4 gene expression in the retina of mice with either point mutation or deletion of the LM α 1 gene compared to control littermates, by 2.9 and 3 fold respectively (**Supplementary Fig. S2 J,K**).

Together these data demonstrate that high LM α 1 levels promote tumor angiogenesis leading to mature blood vessels.

LM α 1 promotes expansion of fibroblasts

It has been shown that myofibroblasts and cancer associated fibroblasts (CAF) play a key role in tumor growth and angiogenesis (Guo et al., 2008; Hanahan and Weinberg, 2011). We analyzed the impact of LM α 1 on myofibroblast abundance by using α smooth muscle actin as a marker and observed that V-LM α 1 colon tumors exhibited 1.7-fold more myofibroblasts than control tumors (**Figure 4 A-C**). We also saw a significant increase of myofibroblasts in the HT29LM α 1 xenograft tumors by 1.6 fold (**Supplementary Fig. S3 A-C**). Next we analyzed the impact of LM α 1 on CAF by using S100A4/Mts1 as a marker (Grum-Schwensen et al., 2005). We found that V-LM α 1 tumors exhibited 1.9-fold more CAF than control tumors (**Figure 4 D-F**).

LM α 1 stimulates stromal expression of VEGFA

Since VEGFA is a key factor driving tumor angiogenesis (Winder and Lenz, 2010) we determined VEGFA expression by qRT-PCR and ELISA in LM α 1 overexpressing tumors. We observed that the abundance of VEGFA mRNA and protein are significantly increased in V-LM α 1 colon tumors compared to control tumors by 1.6 and 1.4 fold respectively (**Figure 5 A, B**). To identify the cellular source we determined VEGFA expression in HT29 xenograft tumors by using species specific murine and human primers. We found that in contrast to unaltered in epithelial tumor cells (data not shown), stromal VEGFA mRNA levels are increased in HT29LM α 1 tumors compared to control tumors lacking

LM α 1 by 2.4 fold (**Figure 5C**). We confirmed increased expression of stromal VEGFA in HT29LM α 1 tumors by ELISA by 1.5 fold (**Figure 5D**).

High LM α 1 activates Notch signaling *in vivo*

In search for a mechanism that could explain how LM α 1 stimulates tumor growth and angiogenesis, we studied a potential link of LM α 1 to Notch signaling by measuring expression of different Notch receptors and ligands in HT29LM α 1 xenograft tumors by qRT-PCR, again using species specific murine and human primers. We found increased Dll4 mRNA levels in the stromal compartment of HT29LM α 1 tumors in comparison to control tumors by 1.6 fold (**Figure 6 A**). This was in contrast to the tumor epithelial compartment that exhibited similar Dll4 expression levels (data not shown). Whether increased Dll4 levels potentially had an impact on Notch signaling was addressed by expression analysis of Notch targets genes. We found a significantly increased expression of Hey1 and Hey2 in the stromal compartment of HT29LM α 1 tumors compared to control tumors by 1.5 fold (**Figure 6 B, C**). Again no differences were apparent in the human tumor cell compartment (data not shown). Together these results indicate that high LM α 1 leads to activation of Notch signaling in stromal cells.

We also quantified Dll4 expression upon tissue staining. First we noticed that Dll4 is expressed close to endothelial cells. Moreover, the Dll4 signal was 2-fold and 2.2-fold higher in HT29LM α 1 xenograft tumors and V-LM α 1 colon tumors compared to control tumors, respectively (**Figure 6 D-I**).

Also in the non-tumorigenic context of retinal angiogenesis we determined Notch signaling in dependence of LM α 1. We found a concomitant significant decrease in Dll4, Hey1 and Hey2 expression in retinas from mice with either a point mutation (by 3.4, 3.3 and 3.3 fold respectively) or a deletion of the LM α 1 gene (by 1.9, 1.6 and 1.8 fold respectively) in comparison to control littermates (**Supplementary Fig. S4 A-F**).

LM111 increases VEGFA expression and Notch signaling and attracts stromal cells

To address whether LM111 had a direct impact on VEGFA expression and Notch signaling in stromal cells, we investigated the expression of VEGFA, Dll4 and Hey1 and Hey2 in CAF and human dermal microvascular endothelial cells (HMEC), upon growth on LM111 or fibronectin (FN) containing substrata. We observed a significant increase of VEGFA expression only in CAF cultured on LM111

but not in HMEC (**Figure 7 A, B**) or in normal fibroblasts (**Supplementary Table S1**). Whereas Dll4 expression was significantly stimulated in both stromal cell lines grown on LM111, even in normal fibroblasts (**Supplementary Table S1**), Hey1 and Hey2 gene expression was only induced in HMEC on the LM111 substratum in comparison to FN or an uncoated surface (**Figure 7 A**). These data suggest that in tumors, LM α 1 has a differential effect on stromal cells, increasing VEGFA expression in CAF and Dll4 in both endothelial cells and fibroblasts but only activating Notch signaling in endothelial cells, noticed with an increased Hey1 and Hey2 level.

Since LM α 1 overexpressing tumors exhibited more fibroblasts and endothelial cells we investigated the possibility that a LM α 1 containing substratum potentially had attracted these stromal cells. This was addressed by a Boyden chamber chemo-attraction assay. Cell migration towards purified LM111 or conditioned medium from HT29 and HT29LM α 1 were determined. We observed that LM111 and conditioned medium from HT29LM α 1 cells had attracted significantly 2.5 and 1.7 fold respectively more CAF than the control conditions (**Figure 7 C, D**). This was in contrast to HMEC where LM111 and conditioned medium from HT29LM α 1 cells which not impact cell attraction (**Figure 7 E, F**). We conclude that in contrast to endothelial cells, CAF are attracted by LM111.

LM α 1, VEGFA and Dll4 are overexpressed in human colorectal tumors

Our results suggest an important role of LM α 1 in murine colorectal cancer progression. To address a potential role of laminins and in particular of LM α 1 in the human pathology, we determined expression of all LM chains in thirty primary colorectal cancer specimens (**Supplementary Table S2**). We compared expression to that of matched adjacent normal colonic tissue derived from the same patient. Amongst all LM chains analysed, LM α 1 is exhibiting the highest overexpression (16 fold) in cancer tissue compared to normal tissue (**Figure 8 A, Supplementary Fig. S5 A**). Two other LM chains were also significantly overexpressed in the tumors, the LM β 1 (3 fold) and LM α 5 (1.9 fold), while three other LM chains, showed a decreased expression in the tumors, LM α 3 (-3.6 fold), LM β 3 (-2.7 fold) and LM γ 3 (-6 fold), (**Supplementary Fig. S5 A**). By immunostaining we observed that LM α 1 is expressed in the tumor stroma and at the interface between cancer cells and tumor stroma (**Figure 8 E**) similar to what we had observed in the murine tumors (**Figure 2 C**). We did not see any link of LM α 1 expression to tumor stage or microsatellite unstable (RER) and loss of heterozygosity (LOH) phenotype. These data suggest that high LM α 1 expression may represent an early event in tumorigenesis.

Next we addressed a potential correlated expression of LM α 1, VEGFA and Dll4 in the human cancers by qRT-PCR analysis and observed that indeed VEGFA and Dll4 were significantly overexpressed in cancer tissue compared to normal tissue. Moreover expression of LM α 1 and Dll4 are found to be statistically correlated (**Supplementary Fig. S5 B**). We confirmed overexpression of VEGFA and Dll4 by immunostaining (**Figure 8 C,D, F,G**).

Discussion

Tumor angiogenesis is a key step in tumor progression. Many soluble factors are promoting tumor angiogenesis. Previously, we had shown that upon forced overexpression, the basement membrane component LM α 1 promotes tumor angiogenesis and increases tumor growth in a xenograft model (De Arcangelis et al., 2001). Now we extended our study by showing that this observation has relevance for human cancers since we observed LM α 1 consistently overexpressed in malignant human colon tumors. To mimic the human cancer disease, we had developed two novel immune competent models with ectopic expression of LM α 1, where stochastically occurring intestinal tumorigenesis is driven by AOM or AOM-DSS (De Robertis et al., 2011) or APC^{1638N/+} (Fodde et al., 1994). We observed that high LM α 1 promotes tumor formation and tumor angiogenesis. We also provide an underlying mechanism demonstrating an intimate cross talk of tumor and stromal cells with LM α 1 which triggers VEGFA and Notch signaling.

Tumor vessels are generally described aberrant and leaky, which is frequently linked to a poor pericyte coverage and an abnormal and disrupted endothelial basement membrane (De Bock et al., 2011). In contrast, several studies remained a high pericyte coverage and endothelial basement lining in many type of cancer, such as renal carcinoma, melanoma and colon cancer (Cao et al., 2012; Döme et al., 2002, Arentz et al., 2011).

We have shown that LM α 1 overexpressed by tumor cells promotes angiogenesis, expression of LM α 4 in the endothelial basement membrane and lining of the new vessels by pericytes. On the contrary blood vessels in the retina of mice lacking LM α 1 or exhibiting a point mutation (Y265C) in the LN domain of LM α 1 develop an aberrant vasculature (Edwards et al., 2010). Our data suggest that LM α 1 is essential for physiological angiogenesis. Upon ectopic overexpression in cancer tissue context, LM α 1 promotes tumor angiogenesis with signs of a proficient vasculature.

Our data demonstrate for the first time that LM111 selectively induces the expression of VEGFA in CAF. An important role of stromal VEGFA has been described as an independent risk factor for recurrence in colorectal cancer patients (Tayama et al., 2011) and for gastric cancer progression in mice (Guo et al., 2008). VEGFA is crucial for developmental vasculogenesis and physiological angiogenesis, acting as a survival factor, mitogen and as a chemotactic factor for endothelial cells. VEGFA is also largely implicated in tumor angiogenesis in cancer. Several strategies for VEGFA ablation have been established with mixed outcomes (Potente et al., 2011). The pro-tumorigenic effect

of VEGFA is probably not only confined to its tumor angiogenesis promoting activity but also extends on supporting tumor cell proliferation and survival in combination with other signaling (Lichtenberger et al., 2010). Thus induction of VEGFA by LM α 1 may promote tumor growth by two mechanisms, promoting productive tumor angiogenesis that would allow oxygen and nutrient supply of the tumor tissue and supporting signaling that increases tumor cell proliferation.

Our results suggest that in addition to VEGFA induction, ectopically expressed LM α 1 promotes tumor angiogenesis by a mechanism that involves Notch signaling. We observed an increased expression of Dll4 in stroma, an important ligand triggering Notch signaling, in tumor tissue overexpressing LM α 1. Expression analysis of the Notch downstream targets Hey1 and Hey2 demonstrate that LM α 1 did not induce Notch signaling in the tumor cell compartment but in the stromal cell compartment. To further characterize which stromal cells activate Notch signaling in response to LM α 1 we determined Hey1 and Hey2 expression in endothelial cells and CAF grown on a LM111 substratum. We observed that in contrast to CAF where expression of these transcription factors was unchanged, expression of Hey1 and Hey2 was increased in endothelial cells by LM111. Further support for a link of LM α 1 to Dll4 and Notch signaling, stems from the aberrant retinal angiogenesis in mice with mutated LM α 1. In both models, with complete absence of LM α 1 or with the point mutation Y265C, we saw a strong decrease in retinal Dll4, Hey1 and Hey2 in comparison to wild type mice. Together our results suggest that LM α 1 triggers Notch signaling in endothelial cells via Dll4 expression by CAF and endothelial cells.

Since Dll4 and VEGFA play an important role in physiological sprouting angiogenesis (Lobov et al., 2007; Suchting et al., 2007) it is possible that high VEGFA and Dll4 induction are instrumental in LM α 1 associated sprouting angiogenesis. This possibility is supported by an increased expression of Dll4 in different tumor types (Kuhnert et al., 2011) including colorectal cancer (Jubb et al., 2009; Fischer et al., 2011). Dll4 inhibition leads to immature vessels and poor tissue perfusion (Scehnet et al., 2007) while overexpression leads to improved vessel maturation and an increased tumor growth (Li et al., 2007). Our results confirm published data of an increased expression of Dll4 in colon cancer (Jubb et al., 2009). In addition, here we provide a link of LM α 1 to tumor angiogenesis through Dll4.

We observed an increased expression of Dll4 by a LM111 substratum in CAF and an increased abundance of NG2 positive perivascular cells in the LM α 1 overexpressing tumors which suggests a potential impact of LM α 1 on pericytes through Dll4. Indeed a role of Dll4 on pericytes has been reported in a mouse model of Ewing's sarcoma, where Dll4 was found to be expressed in the

perivascular microenvironment. Moreover, Dll4 was shown to promote the differentiation of bone marrow derived mesenchymal cells into pericytes (Schadler et al., 2010) and, Dll4 inhibition reduced the number of pericytes and tumor size (Stewart et al., 2011). Together our results suggest a role of LM α 1 in increasing pericyte abundance in a Dll4 dependent manner. It remains to be seen whether this involves differentiation of mesenchymal stem cells into pericytes.

Resistance to VEGF inhibitors is a major clinical problem in cancer therapy. Since Notch signaling appears to overcome VEGF dependence, it has been proposed that targeting Dll4 therapy could be a solution for tumors that are resistant to an anti-VEGFA therapy (Kuhnert et al., 2011; Li et al., 2011). Not only VEGFA is an inducer of Dll4 (Lobov et al., 2007). Also LM provide a VEGFA independent route of Dll4 induction (Estrach et al., 2011; Stenzel et al., 2011). In particular in primary human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) Dll4 was found to be induced by a LM111 substratum which occurred in an integrin α 2 β 1 and α 6 β 1 dependent manner (Estrach et al., 2011). Now, we showed increased Dll4 expression by LM111 in HMEC, another endothelial cell type and extend the observation to CAF and normal fibroblasts that also induce Dll4 on a LM111 substratum. Whether LM111 induces Dll4 in other stromal cell types remains to be addressed. Our results extend on published data by showing induction of Notch signaling in endothelial cells through Dll4, that is induced in CAF and endothelial cells by LM111.

So far we had discussed that direct contact of CAF and endothelial cells with LM111 induces Dll4. But LM111 may also induce Dll4 through a mechanism that involves LM411. This LM represents one of the two major laminins expressed in endothelial basement membranes and was shown to induce Dll4 in HUVEC (Stenzel et al., 2011). In support of induction of Dll4 by LM α 1 in a LM α 4 associated manner, we found that LM α 4 and Dll4 expression levels concomitantly correlated with LM α 1 expression in the different tumor models as well as in the retinal vasculature. Whereas LM α 4 and Dll4 were elevated in the LM α 1 overexpressing tumors, we observed that the aberrant retinal vasculature of mice with a LM α 1 knockout or point mutation (Y265C) exhibits a significantly reduced LM α 4 and Dll4 expression.

A LM111 substratum was shown to attract glial cells (Mehes et al., 2002) and neuronal axons (Masuda et al., 2009). Here we reported that LM111 exerts chemoattraction on CAF (and to a lesser extend on normal human and mouse fibroblasts too, data not shown) but not on endothelial cells. The underlying molecular mechanism remains elusive except that the LM α 1 chain appears to be

instrumental (Randlett et al., 2011). One may speculate that the heparin binding site in the LN (Ettner et al., 1998) and LG5 domain of LM α 1 (Harrison et al., 2007) could be involved in binding endothelial cell proliferation factors such as VEGFA (Park et al., 1993). Heparin binding was shown to be essential for the activity of VEGFA (Miralem et al., 2001). The extracellular matrix is proposed to serve as reservoir for growth factors. Matrix degradation or other poorly understood mechanisms would release the bound factors (Schultz and Wysocki, 2009). We observed that LM111 directly binds VEGFA (Cremel et al., in preparation) supporting the possibility that LM111-bound VEGFA could serve as chemoattractant for CAF. Whether VEGFA binding to LM111 involves LM α 1 and in particular the LN and LG5 domains remains to be determined.

We report that LM α 1 is overexpressed in human colorectal cancer where its expression is correlated with elevated Dll4, indicating that our results may have clinical relevance in colon cancer patients. Our data are in contradiction to published results that show overexpression of LM α 1 in the minority of colon cancer specimens examined (one of six) (Maatta et al., 2001). In the present study we described that the 30 analyzed colon tumors exhibit an overexpression of LM α 1 in comparison to normal mucosa. Differences in antibodies (Tiger et al., 1997) and primers (Velling et al., 1999) may explain the discrepancy of our data with the published results.

We observed that LM111 is upregulated in colon cancer independent of the cancer stage. Thus it is likely that induction of LM α 1 occurs early in tumor progression. Increased LM serum levels may serve as diagnostic marker for cancer (Chu et al., 2002; Rosa and Parise, 2008; Aghcheli et al., 2012) and are considered as a sign of bad prognosis in colorectal cancer (Saito and Kameoka, 2005). We propose that screening for LM α 1 in serum could be used to improve early diagnosis of colon cancer. LM α 1 expression promotes vessel maturation and high deposit of endothelial basement membrane, which could have an impact on anti-angiogenic treatment. A well perfusable vasculature is considered highly relevant for good anti-cancer drug delivery. In contrast, some data suggest on a inefficiency of anti-angiogenic treatments, leading to an increased tumor invasion caused by induction of hypoxia (Semenza, 2010) and in addition to stopping of anti-angiogenic treatment, vascular network can quickly reform because endothelial cells are able to use the vascular basement membrane, which always present, to migrate and colonize the tumor (Mancuso et al., 2006; Kucera and Lammert, 2009, Ribatti et al., 2011). In accordance with it, in some cancers pericyte coverage is correlated to tumor advance and poor survival (Arentz et al., 2012; Cao et al., 2012).

A profound knowledge about how LM α 1 impacts on LM α 4 expression and organization of the endothelial basement membrane and recruitment of pericytes may provide novel therapeutic tools in anti-cancer therapies. Based on our results it is questionable whether colon cancer with high LM α 1 expression and a well organized endothelial basement membrane is suited for an anti-VEGFA drug treatment. A combined targeting of Dll4 and VEGFA together with β 1 integrins may be a useful strategy for counteracting LM α 1 in colon cancer.

Acknowledgments

We thanks Dr Ruth Chiquet-Ehrissman and Dr. Ellen Van Obberghen-Schilling for the gift of cell line, Dr Peter Yurchenco for the mouse LM α 1 cDNA, Dr Sorokin, Dr Kleinman, Dr Sasaki and Dr Gullberg for the gift of antibodies, Ricardo Fodde for APC^{+/^{1638N} mice and the Mouse Clinical Institute for transgenic mice generation.}

REFERENCES

- Aghcheli, K., Parsian, H., Qujeq, D., Talebi, M., Mosapour, A., Khalilipour, E., Islami, F., Semnani, S., and Malekzadeh, R. (2012). Serum hyaluronic acid and laminin as potential tumor markers for upper gastrointestinal cancers. *European Journal of Internal Medicine* 23, 58–64.
- Alpy, F., Jivkov, I., Sorokin, L., Klein, A., Arnold, C., Huss, Y., Kedinger, M., Simon-Assmann, P., and Lefebvre, O. (2005). Generation of a conditionally null allele of the laminin alpha1 gene. *Genesis* 43, 59–70.
- Arentz, G., Chataway, T., Price, T.J., Izwan, Z., Hardi, G., Cummins, A.G., and Hardingham, J.E. (2011). Desmin expression in colorectal cancer stroma correlates with advanced stage disease and marks angiogenic microvessels. *Clin Proteomics* 8, 16.
- Cao, Y., Zhang, Z.-L., Zhou, M., Elson, P., Rini, B., Aydin, H., Feenstra, K., Tan, M.-H., Berghuis, B., Tabbey, R., et al. (2012). Pericyte coverage of differentiated vessels inside tumor vasculature is an independent unfavorable prognostic factor for patients with clear cell renal cell carcinoma. *Cancer*.
- Chu, Y., Yang, Y., Lin, M., and Wang, Z. (2002). Detection of laminin in serum and ascites from patients with epithelial ovarian tumor. *J.Huazhong.Univ.Sci.Technolog.Med.Sci.* 22, 58–59, 68.
- De Arcangelis, A., Lefebvre, O., Mechine-Neuville, A., Arnold, C., Klein, A., Remy, L., Kedinger, M., and Simon-Assmann, P. (2001). Overexpression of laminin alpha1 chain in colonic cancer cells induces an increase in tumor growth. *Int.J.Cancer* 94, 44–53.
- De Bock, K., Cauwenberghs, S., and Carmeliet, P. (2011). Vessel abnormalization: another hallmark of cancer?: Molecular mechanisms and therapeutic implications. *Current Opinion in Genetics & Development* 21, 73–79.
- De Robertis, M., Massi, E., Poeta, M.L., Carotti, S., Morini, S., Cecchetelli, L., Signori, E., and Fazio, V.M. (2011). The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies. *J Carcinog* 10, 9.
- Döme, B., Paku, S., Somlai, B., and Tímár, J. (2002). Vascularization of cutaneous melanoma involves vessel co-option and has clinical significance. *J. Pathol.* 197, 355–362.
- Edwards, M.M., Mammadova-Bach, E., Alpy, F., Klein, A., Hicks, W.L., Roux, M., Simon-Assmann, P., Smith, R.S., Orend, G., Wu, J., et al. (2010). Mutations in Lama1 disrupt retinal vascular development and inner limiting membrane formation. *J. Biol. Chem.* 285, 7697–7711.
- Edwards, M.M., McLeod, D.S., Grebe, R., Heng, C., Lefebvre, O., and Lutty, G.A. (2011). Lama1 mutations lead to vitreoretinal blood vessel formation, persistence of fetal vasculature, and epiretinal membrane formation in mice. *BMC Dev Biol* 11, 60.
- Estrach, S., Cailleteau, L., Franco, C.A., Gerhardt, H., Stefani, C., Lemichez, E., Gagnoux-Palacios, L., Meneguzzi, G., and Mettouchi, A. (2011). Laminin-Binding Integrins Induce Dll4 Expression and Notch Signaling in Endothelial Cells. *Circulation Research*.
- Falk, M., Ferletta, M., Forsberg, E., and Ekblom, P. (1999). Restricted distribution of laminin alpha1 chain in normal adult mouse tissues. *Matrix Biol.* 18, 557–568.
- Fischer, M., Yen, W.-C., Kapoun, A.M., Wang, M., O'Young, G., Lewicki, J., Gurney, A., and Hoey, T. (2011). Anti-DLL4 Inhibits Growth and Reduces Tumor-Initiating Cell Frequency in Colorectal Tumors with Oncogenic KRAS Mutations. *Cancer Res* 71, 1520–1525.

- Fodde, R., Edelmann, W., Yang, K., van Leeuwen, C., Carlson, C., Renault, B., Breukel, C., Alt, E., Lipkin, M., Khan, P.M., et al. (1994). A targeted chain-termination mutation in the mouse *Apc* gene results in multiple intestinal tumors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* *91*, 8969–8973.
- Grum-Schwensen, B., Klingelhofer, J., Berg, C.H., El-Naaman, C., Grigorian, M., Lukanidin, E., and Ambartsumian, N. (2005). Suppression of Tumor Development and Metastasis Formation in Mice Lacking the *S100A4*(*mts1*) Gene. *Cancer Res* *65*, 3772–3780.
- Guo, X., Oshima, H., Kitmura, T., Taketo, M.M., and Oshima, M. (2008). Stromal Fibroblasts Activated by Tumor Cells Promote Angiogenesis in Mouse Gastric Cancer. *Journal of Biological Chemistry* *283*, 19864–19871.
- Hallmann, R., Horn, N., Selg, M., Wendler, O., Pausch, F., and Sorokin, L.M. (2005). Expression and Function of Laminins in the Embryonic and Mature Vasculature. *Physiol Rev* *85*, 979–1000.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* *144*, 646–674.
- Harrison, D., Hussain, S.A., Combs, A.C., Ervasti, J.M., Yurchenco, P.D., and Hohenester, E. (2007). Crystal Structure and Cell Surface Anchorage Sites of Laminin {alpha}1LG4-5. *J.Biol.Chem.* *282*, 11573–11581.
- Huang, W., Chiquet-Ehrismann, R., Moyano, J.V., Garcia-Pardo, A., and Orend, G. (2001). Interference of Tenascin-C with Syndecan-4 Binding to Fibronectin Blocks Cell Adhesion and Stimulates Tumor Cell Proliferation. *Cancer Res* *61*, 8586–8594.
- Jubb, A.M., Turley, H., Moeller, H.C., Steers, G., Han, C., Li, J.-L., Leek, R., Tan, E.Y., Singh, B., Mortensen, N.J., et al. (2009). Expression of delta-like ligand 4 (*Dll4*) and markers of hypoxia in colon cancer. *British Journal of Cancer* *101*, 1749–1757.
- Kuhnert, F., Kirshner, J.R., and Thurston, G. (2011). *Dll4*-Notch signaling as a therapeutic target in tumor angiogenesis. *Vascular Cell* *3*, 20.
- Li, J.-L., Sainson, R.C.A., Oon, C.E., Turley, H., Leek, R., Sheldon, H., Bridges, E., Shi, W., Snell, C., Bowden, E.T., et al. (2011). *DLL4*-Notch Signaling Mediates Tumor Resistance to Anti-VEGF Therapy In Vivo. *Cancer Res* *71*, 6073–6083.
- Li, J.-L., Sainson, R.C.A., Shi, W., Leek, R., Harrington, L.S., Preusser, M., Biswas, S., Turley, H., Heikamp, E., Hainfellner, J.A., et al. (2007). Delta-like 4 Notch Ligand Regulates Tumor Angiogenesis, Improves Tumor Vascular Function, and Promotes Tumor Growth In vivo. *Cancer Res* *67*, 11244–11253.
- Lichtenberger, B.M., Tan, P.K., Niederleithner, H., Ferrara, N., Petzelbauer, P., and Sibilio, M. (2010). Autocrine VEGF signaling synergizes with EGFR in tumor cells to promote epithelial cancer development. *Cell* *140*, 268–279.
- Lobov, I.B., Renard, R.A., Papadopoulos, N., Gale, N.W., Thurston, G., Yancopoulos, G.D., and Wiegand, S.J. (2007). Delta-like ligand 4 (*Dll4*) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *104*, 3219–3224.
- Maatta, M., Virtanen, I., Burgeson, R., and Autio-Harminen, H. (2001). Comparative analysis of the distribution of laminin chains in the basement membranes in some malignant epithelial tumors: the alpha1 chain of laminin shows a selected expression pattern in human carcinomas. *J.Histochem.Cytochem.* *49*, 711–726.
- Malanchi, I., Santamaria-Martínez, A., Susanto, E., Peng, H., Lehr, H.-A., Delaloye, J.-F., and Huelsken, J. (2012). Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization. *Nature* *481*, 85–89.

- Masuda, T., Sakuma, C., Kobayashi, K., Kikuchi, K., Soda, E., Shiga, T., Kobayashi, K., and Yaginuma, H. (2009). Laminin peptide YIGSR and its receptor regulate sensory axonal response to the chemoattractive guidance cue in the chick embryo. *Journal of Neuroscience Research* 87, 353–359.
- Mehes, E., Czirok, A., Hegedus, B., Vicsek, T., and Jancsik, V. (2002). Laminin-1 increases motility, path-searching, and process dynamism of rat and mouse Muller glial cells in vitro: implication of relationship between cell behavior and formation of retinal morphology. *Cell Motil.Cytoskeleton* 53, 203–213.
- Midwood, K.S., Hussenet, T., Langlois, B., and Orend, G. (2011). Advances in tenascin-C biology. *Cellular and Molecular Life Sciences* 68, 3175–3199.
- Miner, J.H., Li, C., Mudd, J.L., Go, G., and Sutherland, A.E. (2004). Compositional and structural requirements for laminin and basement membranes during mouse embryo implantation and gastrulation. *Development* 131, 2247–2256.
- Miralem, T., Steinberg, R., Price, D., and Avraham, H. (2001). VEGF(165) requires extracellular matrix components to induce mitogenic effects and migratory response in breast cancer cells. *Oncogene* 20, 5511–5524.
- Najmabadi, H., Hu, H., Garshasbi, M., Zemojtel, T., Abedini, S.S., Chen, W., Hosseini, M., Behjati, F., Haas, S., Jamali, P., et al. (2011). Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders. *Nature advance online publication*.
- O'Connell, J.T., Sugimoto, H., Cooke, V.G., MacDonald, B.A., Mehta, A.I., LeBleu, V.S., Dewar, R., Rocha, R.M., Brentani, R.R., Resnick, M.B., et al. (2011). VEGF-A and Tenascin-C Produced by S100A4+ Stromal Cells Are Important for Metastatic Colonization. *PNAS* 108, 16002–16007.
- Van Obberghen-Schilling, E., Tucker, R.P., Saupe, F., Gasser, I., Cseh, B., and Orend, G. (2011). Fibronectin and tenascin-C: accomplices in vascular morphogenesis during development and tumor growth. *The International Journal of Developmental Biology* 55, 511–525.
- Orimo, A., Gupta, P.B., Sgroi, D.C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., Carey, V.J., Richardson, A.L., and Weinberg, R.A. (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 121, 335–348.
- Papanikolaou, A., Wang, Q.S., Delker, D.A., and Rosenberg, D.W. (1998). Azoxymethane-induced colon tumors and aberrant crypt foci in mice of different genetic susceptibility. *Cancer Lett.* 130, 29–34.
- Park, J.E., Keller, G.A., and Ferrara, N. (1993). The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol. Biol. Cell* 4, 1317–1326.
- Pinto, D., Robine, S., Jaisser, F., El Marjou, F.E., and Louvard, D. (1999). Regulatory sequences of the mouse villin gene that efficiently drive transgenic expression in immature and differentiated epithelial cells of small and large intestines. *J.Biol.Chem.* 274, 6476–6482.
- Potente, M., Gerhardt, H., and Carmeliet, P. (2011). Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis. *Cell* 146, 873–887.
- Randlett, O., Poggi, L., Zolessi, F.R., and Harris, W.A. (2011). The oriented emergence of axons from retinal ganglion cells is directed by laminin contact in vivo. *Neuron* 70, 266–280.
- Ribatti, D. (2011). Vascular normalization: a real benefit? *Cancer Chemother. Pharmacol.* 68, 275–278.

- Rosa, H., and Parise, E.R. (2008). Is there a place for serum laminin determination in patients with liver disease and cancer? *World J.Gastroenterol.* *14*, 3628–3632.
- Saito, N., and Kameoka, S. (2005). Serum laminin is an independent prognostic factor in colorectal cancer. *Int.J.Colorectal Dis.* *20*, 238–244.
- Scehnet, J.S., Jiang, W., Kumar, S.R., Krasnoperov, V., Trindade, A., Benedito, R., Djokovic, D., Borges, C., Ley, E.J., Duarte, A., et al. (2007). Inhibition of Dll4-mediated signaling induces proliferation of immature vessels and results in poor tissue perfusion. *Blood* *109*, 4753–4760.
- Schadler, K.L., Zweidler-McKay, P.A., Guan, H., and Kleinerman, E.S. (2010). Delta-Like Ligand 4 Plays a Critical Role in Pericyte/Vascular Smooth Muscle Cell Formation during Vasculogenesis and Tumor Vessel Expansion in Ewing's Sarcoma. *Clin Cancer Res* *16*, 848–856.
- Schultz, G.S., and Wysocki, A. (2009). Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound Repair and Regeneration* *17*, 153–162.
- Semenza, G.L. (2010). HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *20*, 51–56.
- Simon-Assmann, P., Orend, G., Mammadova-Bach, E., Spenle, C., and Lefebvre, O. (2011). Role of laminins in physiological and pathological angiogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* *55*, 455–465.
- Stallcup, W.B. (2002). The NG2 proteoglycan: past insights and future prospects. *J. Neurocytol* *31*, 423–435.
- Stenzel, D., Franco, C.A., Estrach, S., Mettouchi, A., Sauvaget, D., Rosewell, I., Schertel, A., Armer, H., Domogatskaya, A., Rodin, S., et al. (2011). Endothelial basement membrane limits tip cell formation by inducing Dll4/Notch signalling in vivo. *EMBO Reports* *12*, 1135–1143.
- Stewart, K.S., Zhou, Z., Zweidler-McKay, P., and Kleinerman, E.S. (2011). Delta-like ligand 4–Notch signaling regulates bone marrow–derived pericyte/vascular smooth muscle cell formation. *Blood* *117*, 719–726.
- Suchting, S., Freitas, C., Noble, F. le, Benedito, R., Bréant, C., Duarte, A., and Eichmann, A. (2007). The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. *PNAS* *104*, 3225–3230.
- Tayama, M., Furuhashi, T., Inafuku, Y., Okita, K., Nishidate, T., Mizuguchi, T., Kimura, Y., and Hirata, K. (2011). Vascular endothelial growth factor 165b expression in stromal cells and colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* *17*, 4867–4874.
- Tiger, C.-F., Champlaud, M.-F., Pedrosa-Domellof, F., Thornell, L.-E., Ekblom, P., and Gullberg, D. (1997). Presence of Laminin $\alpha 5$ Chain and Lack of Laminin $\alpha 1$ Chain during Human Muscle Development and in Muscular Dystrophies. *J. Biol. Chem.* *272*, 28590–28595.
- Timpl, R., Rohde, H., Robey, P.G., Rennard, S.I., Foidart, J.M., and Martin, G.R. (1979). Laminin—a glycoprotein from basement membranes. *J. Biol. Chem* *254*, 9933–9937.
- Velling, T., Tiger, C.F., Ekblom, P., and Gullberg, D. (1999). Laminin alpha chains in colon carcinoma cell lines: detection of a truncated laminin alpha1 mRNA in Caco-2 cells. *Exp.Cell Res.* *248*, 627–633.
- Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Kern, S.E., Preisinger, A.C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A.M., and Bos, J.L. (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N. Engl. J. Med.* *319*, 525–532.
- Winder, T., and Lenz, H. (2010). Vascular Endothelial Growth Factor and Epidermal Growth Factor Signaling Pathways as Therapeutic Targets for Colorectal Cancer. *Gastroenterology* *138*, 2163–2176.
- Yurchenco, P.D. (2011). Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *3*,

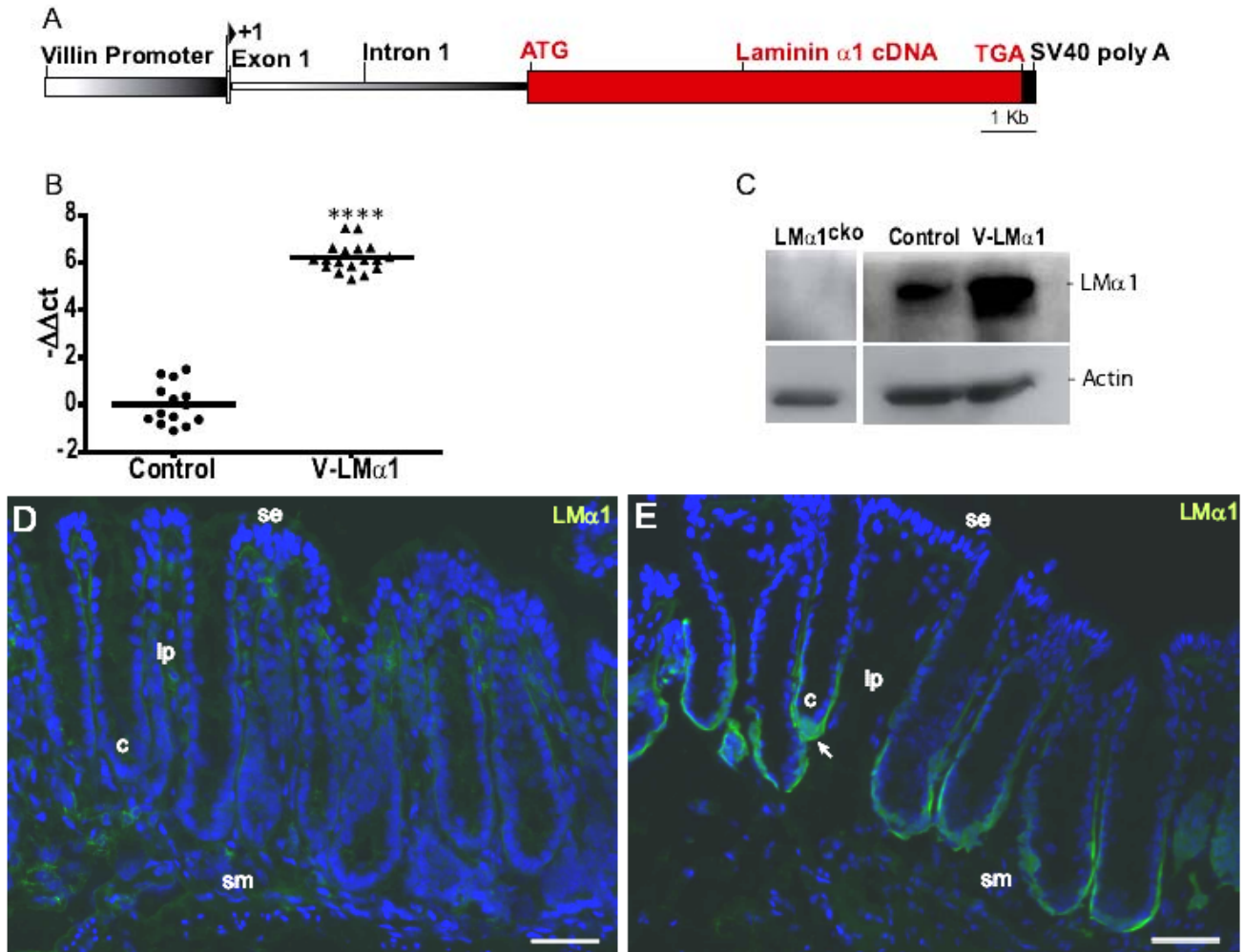


Figure 1: Generation of transgenic mice overexpressing LM α 1

(A) Schematic representation of the LM α 1 transgene. The murine 3.5 kb villin promoter sequence is followed by the 5.5 kb first intron and the 9 kb murine LM α 1 cDNA. (B) qRT-PCR analysis of LM α 1 expression in the colon of control and transgenic mice. The LM α 1 mRNA is overexpressed more than 70 fold in transgenic colon compared to normal control, ****; $p < 0.0001$, Student's t-test. C, expression analysis of LM α 1 in colon tissue from LM α 1^{cko}, wild type control and V-LM α 1 mice by western blot with actin as reference. Note the absence of LM α 1 in LM α 1^{cko} tissue and overexpression of LM α 1 in V-LM α 1 tissue. (D, E) Tissue distribution of LM α 1 in normal distal colon of wild type (D) and a V-LM α 1 transgenic mouse (E) as determined by immunofluorescence analysis. Note LM α 1 expression in the basement membrane of the crypt region (arrow). se: surface epithelium; c: crypt region; lp: lamina propria; sm: sub-mucosa. Scale bars: 50 μ m.

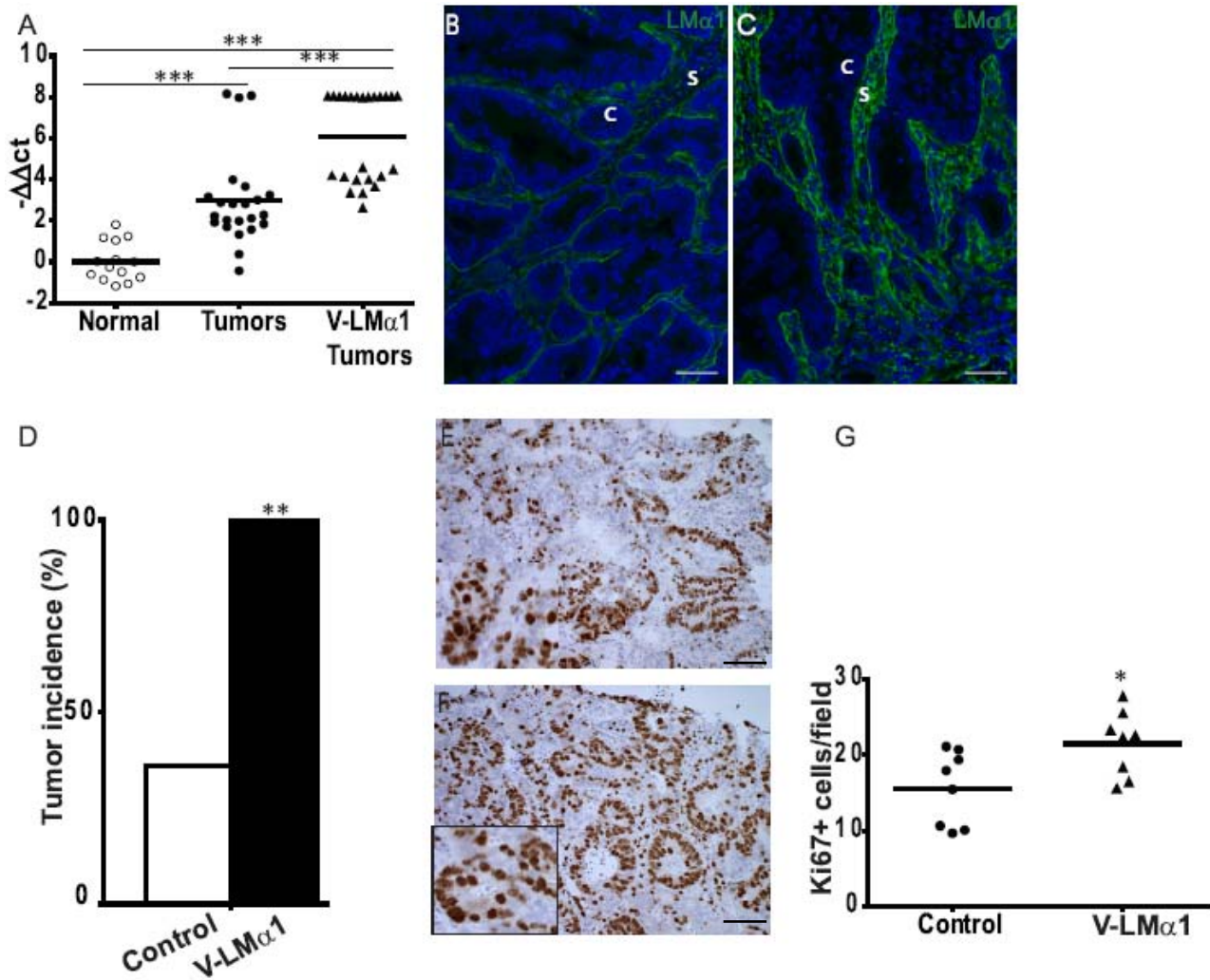


Figure 2: LM α 1 overexpression promotes tumor incidence and tumor cell proliferation

(A) LM α 1 expression in normal and tumorigenic colon tissue of wild type (N, T) and V-LM α 1 mice. In the AOM-DSS model, LM α 1 is overexpressed in control colon tumors compared to normal murine colon tissue. V-LM α 1 colon carcinoma tissue exhibits elevated LM α 1 expression in comparison to wild type control tumors, ***, $p < 0.001$, Anova analysis follow by a Tukey post test.

Tissue expression of LM α 1 in control AOM/DSS induced control colon tumors **(B)** and V-LM α 1 colon tumors **(C)** determined by immunostaining. Note, LM α 1 localization at the interface between cancer cells and in the stromal compartment. Highest expression of LM α 1 was found in V-LM α 1 colon tumors. c: cancer cells; s: stromal compartment; scale bar, 50 μ m. **(D)** Analysis of tumor incidence in AOM treated control and V-LM α 1 mice, indicating that all V-LM α 1 mice develop at least one tumor compared to control, $n = 10$ mice, **, $p < 0.01$, Fisher's exact test. **E-J**, Proliferation analysis in colon tumors from AOM-DSS treated wild type **(E)** and V-LM α 1 mice **(F)**. Ki67 positive cells **(E, F)** were quantified per field. *, $p < 0.05$, Student's t-test. Scale bars: 50 μ m.

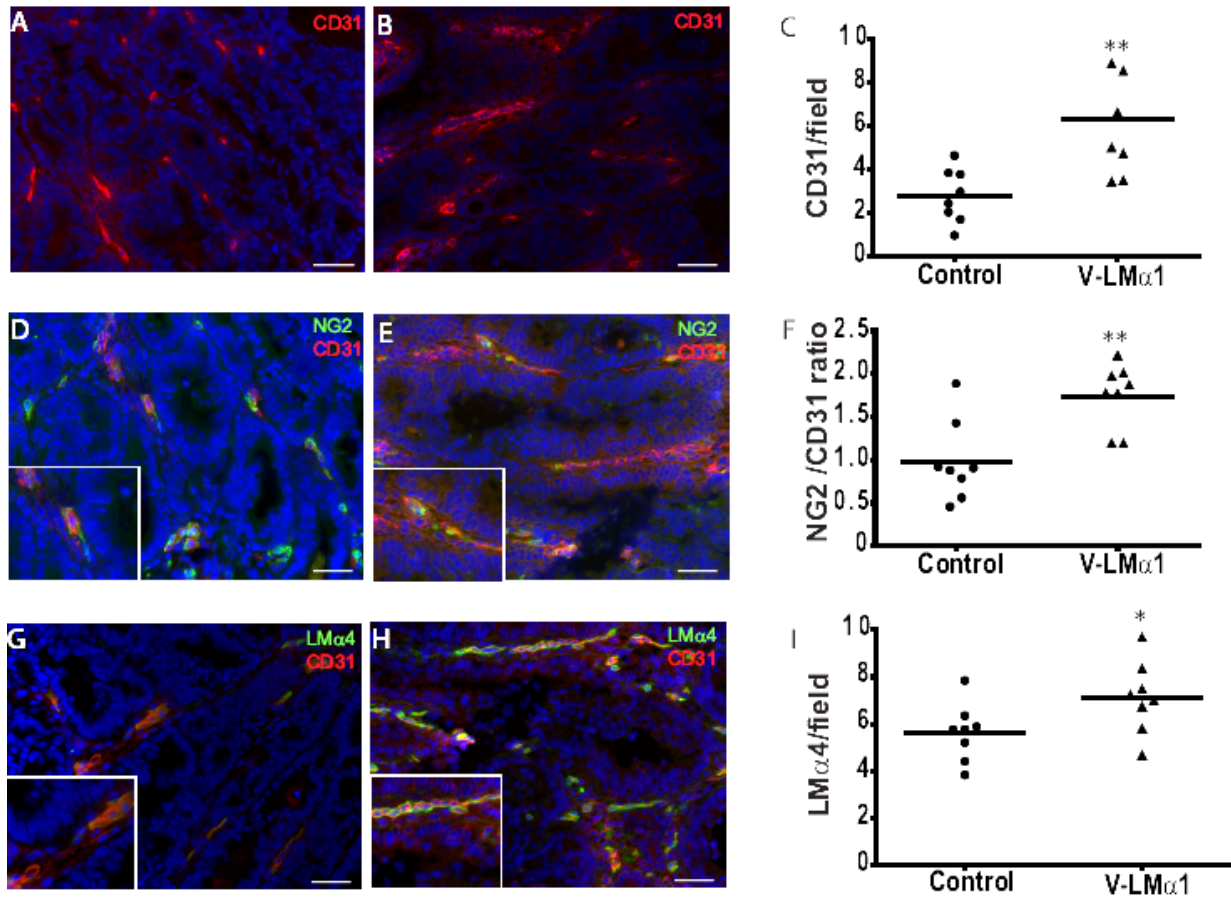


Figure 3: LM α 1 promotes tumor angiogenesis and improves blood vessel maturation in AOM/DSS induced tumors

Representative examples of immunostaining results of AOM-DSS induced colon tumors from wild type (A, D, G) and V-LM α 1 mice (B, E, H) for the indicated molecules, CD31 (A, B), NG2 together with CD31 (D, E) and LM α 4 together with CD31 (G, H). Inserts are magnifications demonstrating close localization of CD31 with NG2 and LM α 4, respectively. (C, F, I) Quantification of the expression of the indicated molecules upon tissue staining of AOM-DSS induced colon tumors from wild type (control) and V-LM α 1 mice. One data point represents one tumor. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, Student's t-test. Scale bars: 50 μ m.

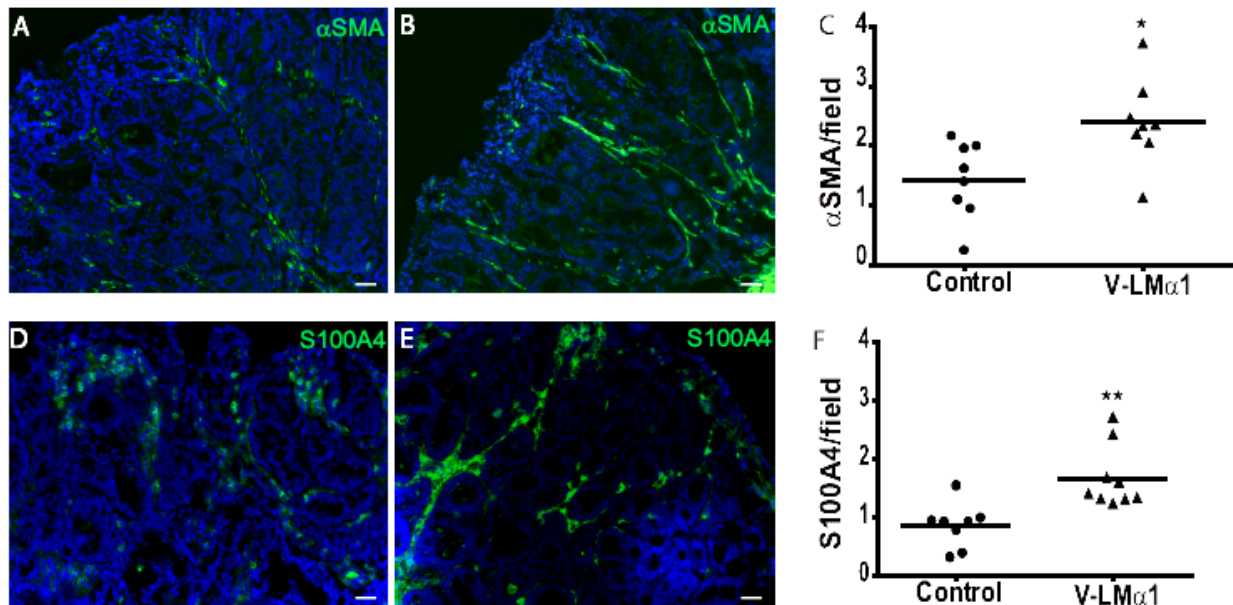


Figure 4: LM α 1 promotes expansion of fibroblasts in AOM-DSS induced tumors

Representative examples of immunostaining results of AOM-DSS induced colon tumors from wild type (**A, D**) and V-LM α 1 mice (**B, E**) for α SMA (**A, B**) and S100A4 (**D, E**). **C, F** Quantification of the expression of α SMA (**C**) and S100A4 (**F**). One data point represents one tumor. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, Student's t-test. Scale bars: 50 μ m

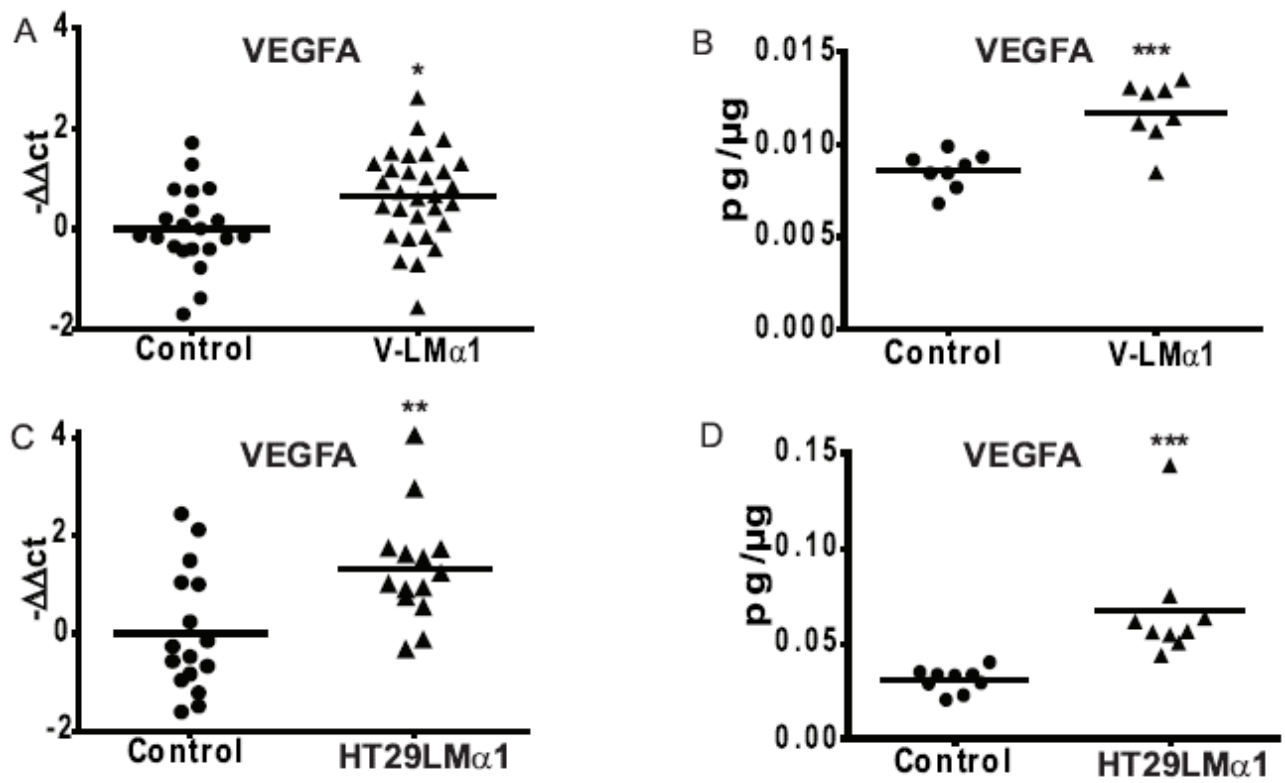


Figure 5: $\text{LM}\alpha 1$ stimulates stromal expression of VEGFA

VEGFA expression in AOM-DSS induced colon tumors of wild type and V- $\text{LM}\alpha 1$ mice (A, B), and in HT29 $\text{LM}\alpha 1$ and control HT29 xenograft tumors (C, D) was determined by qRT-PCR (A, C) and by ELISA (B, D). *, $p < 0.05$, ***, $p < 0.001$, Student's t-test.

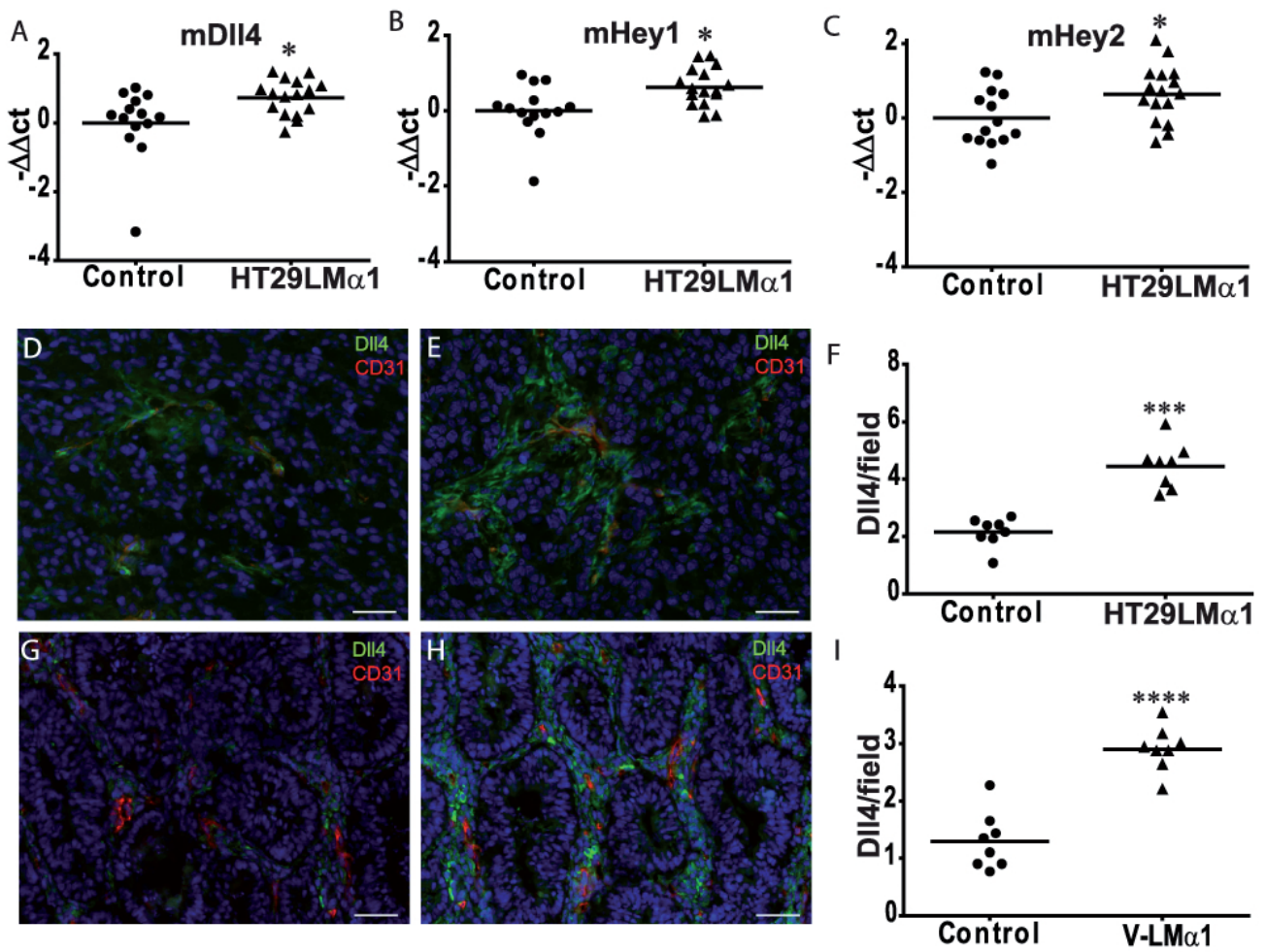


Figure 6: High LM $\alpha 1$ activates Notch signaling *in vivo*

Expression of DII4 (A), murine Hey1 (B) and murine Hey2 (C) was quantified in HT29LM $\alpha 1$ and control HT29 xenograft tumors by qRT-PCR. Tissue distribution (D, E, G, H) and subsequent quantification of CD31 together with DII4 (F, I) in control (D) and HT29LM $\alpha 1$ (E) xenograft tumors and in AOM-DSS induced colon tumors in control (G) and V-LM $\alpha 1$ (H) mice is displayed. ***, $p < 0.001$, ****, $p < 0.0001$, Student's t-test. Scale bars, 50 μm .

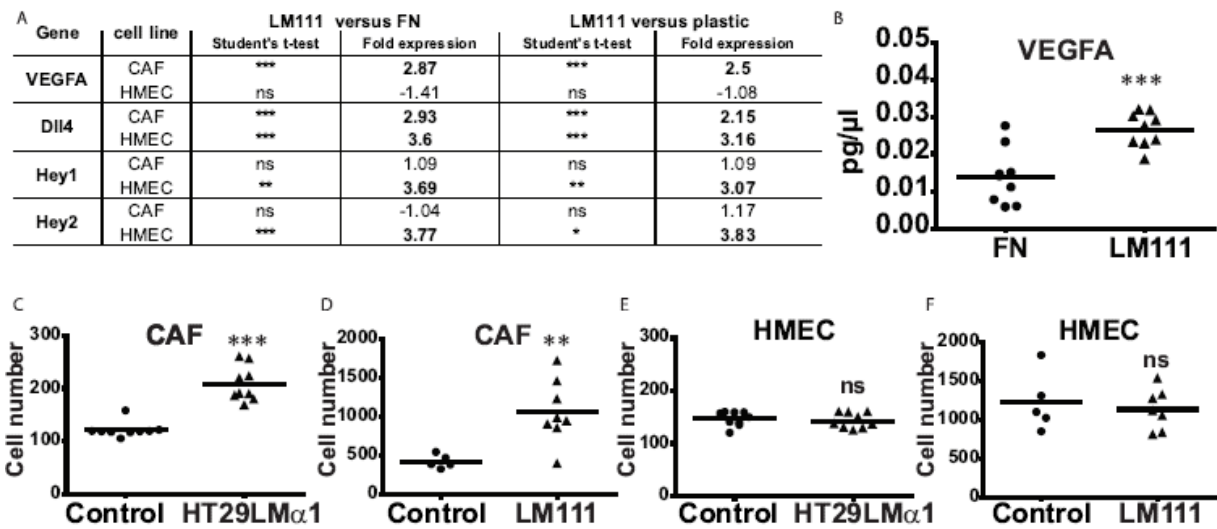


Figure 7: Impact of a LM111 substratum on VEGFA and DII4 expression and on stromal cell attraction

(A) Expression of VEGFA, DII4, Hey1 and Hey2 was determined in CAF and HMEC upon growth on a LM111 substratum in comparison to an uncoated or FN coated surface by qRT-PCR. B, VEGFA expression in CAF was determined by ELISA. 3 independent experiments in triplicate, *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$. Student's t-test. Chemoattraction of CAF (C, D) and HMEC (E, F) in a Boyden chamber assay towards conditioned medium from HT29LM α 1 and control HT29 cells (C, E) and towards a LM111 or uncoated surface (D, F).

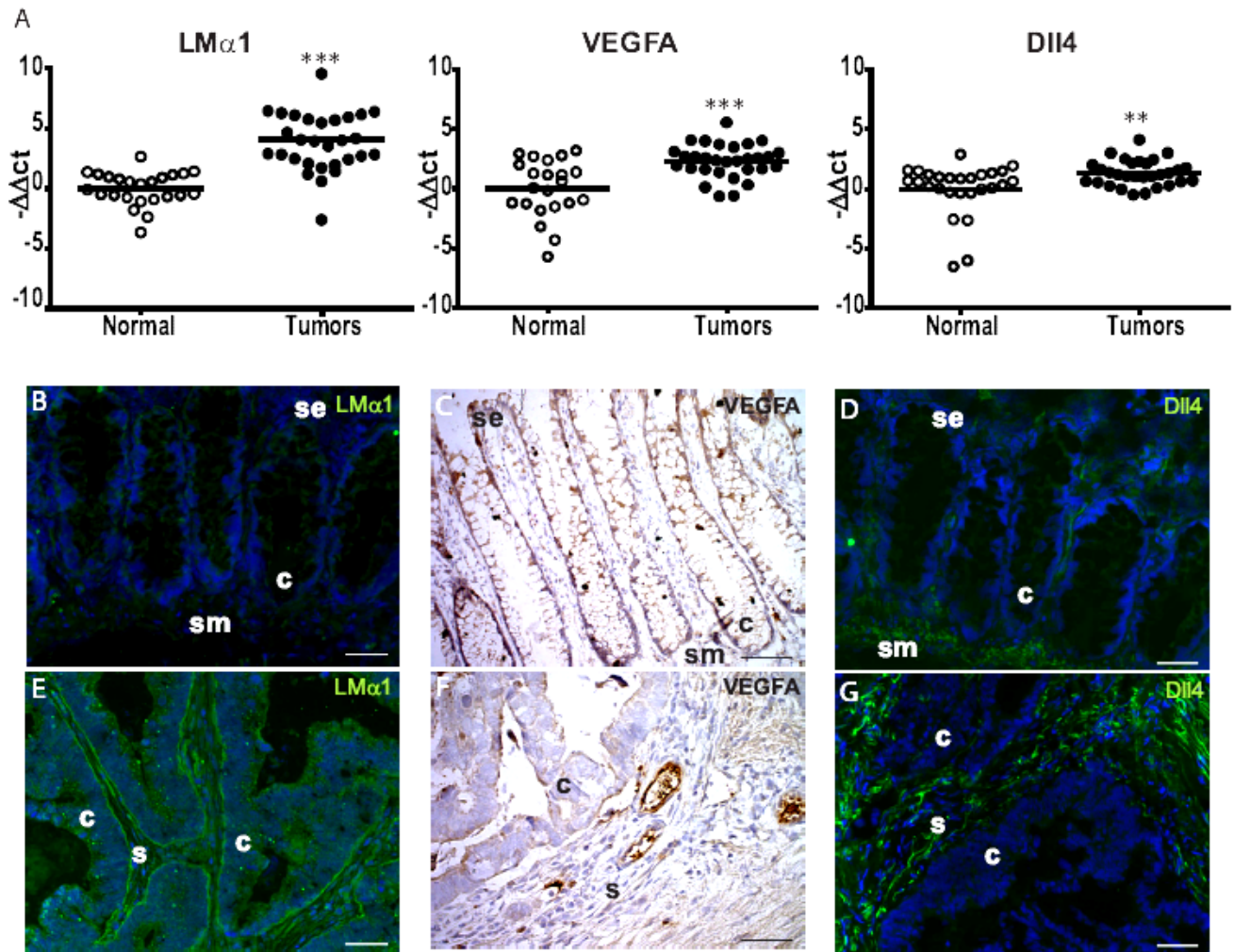


Figure 8: LM α 1, VEGFA and DII4 are overexpressed in human colorectal tumors

Quantification of LM α 1, VEGFA and DII4 in human colorectal tumors in comparison to matched adjacent normal colonic tissue by qRT-PCR. **, $p < 0.01$, Mann Whitney test; ***, $p < 0.001$, Student's t-test (A). Tissue expression of LM α 1, VEGFA and DII4 in normal human colon (B-D) and in human colorectal tumors (E-G). Arrows indicate LM α 1 expression at the tumor stroma interface, asterisks indicate stromal expression. c: crypt; se: surface epithelium; sm: sub-mucosa; c: cancer cells; s: stroma. Scale bars: 50 μ m. n=30.

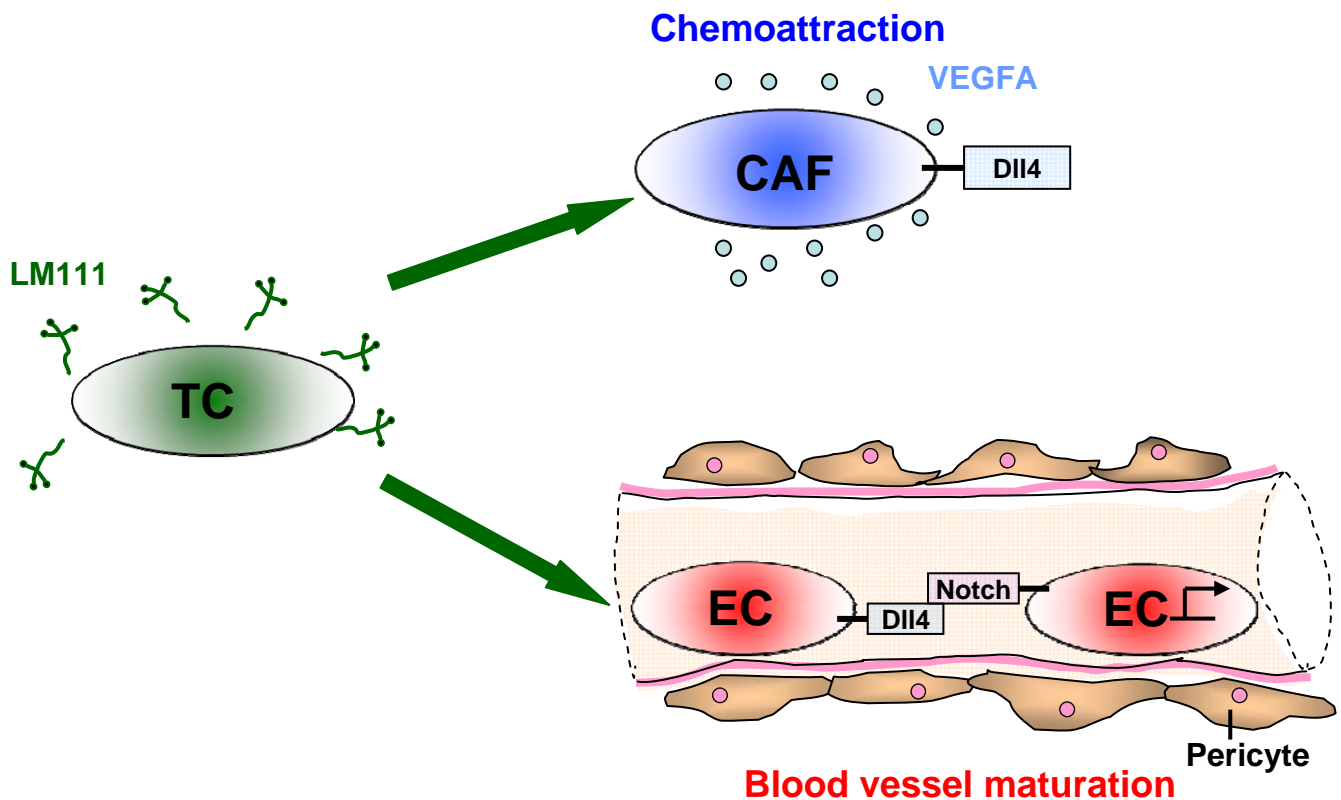


Figure 9: Differential impact of LM111 on stromal cells

In tumor cells of colon cancer LM α 1 expression is induced by an unknown mechanism. LM α 1 can assemble into LM111 which attract CAF. Interaction with LM α 1 containing laminin triggers CAF to express VEGFA and DII4. Although DII4 can be induced by VEGFA this appears not to apply to CAF since stimulation of CAF with VEGFA did not increase DII4 expression (data not shown). In contrast to tumor cells where DII4 did not induce Notch signaling, DII4 induces Notch signaling in endothelial cells as demonstrated by an increased expression of Hey1 and Hey2. A direct contact of endothelial cells with LM111 also induces DII4 in endothelial cells suggesting that both cell types CAF and endothelial cells are a source of DII4 in a LM α 1-rich microenvironment. The arising blood vessels display stronger pericyte coverage in LM α 1 overexpressing tumors, together with increased expression of LM α 4 which is an important component of LM411 in the endothelial basement membrane vasculature. Induction of tumor angiogenesis by ectopically expressed LM α 1 involving a cross talk between tumor and stromal cells through VEGFA and DII4 may apply to human colon cancer where we noticed an increased expression of LM α 1, VEGFA and DII4.

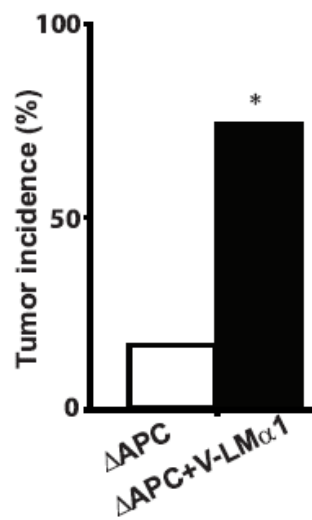


Figure S1: The tumor-promoting effect of LM α 1 is confirmed in V-LM α 1 crossed with APC¹⁶³⁸ mice

Analysis of tumor incidence in APC^{+/1638N} (Δ APC) and V-LM α 1/ APC^{+/1638N} (V-LM α 1/ Δ APC) mice indicating that 75% double transgenic mice develop at least one tumor compare to control, n=8 mice. *, p < 0.05, Chi-square test.

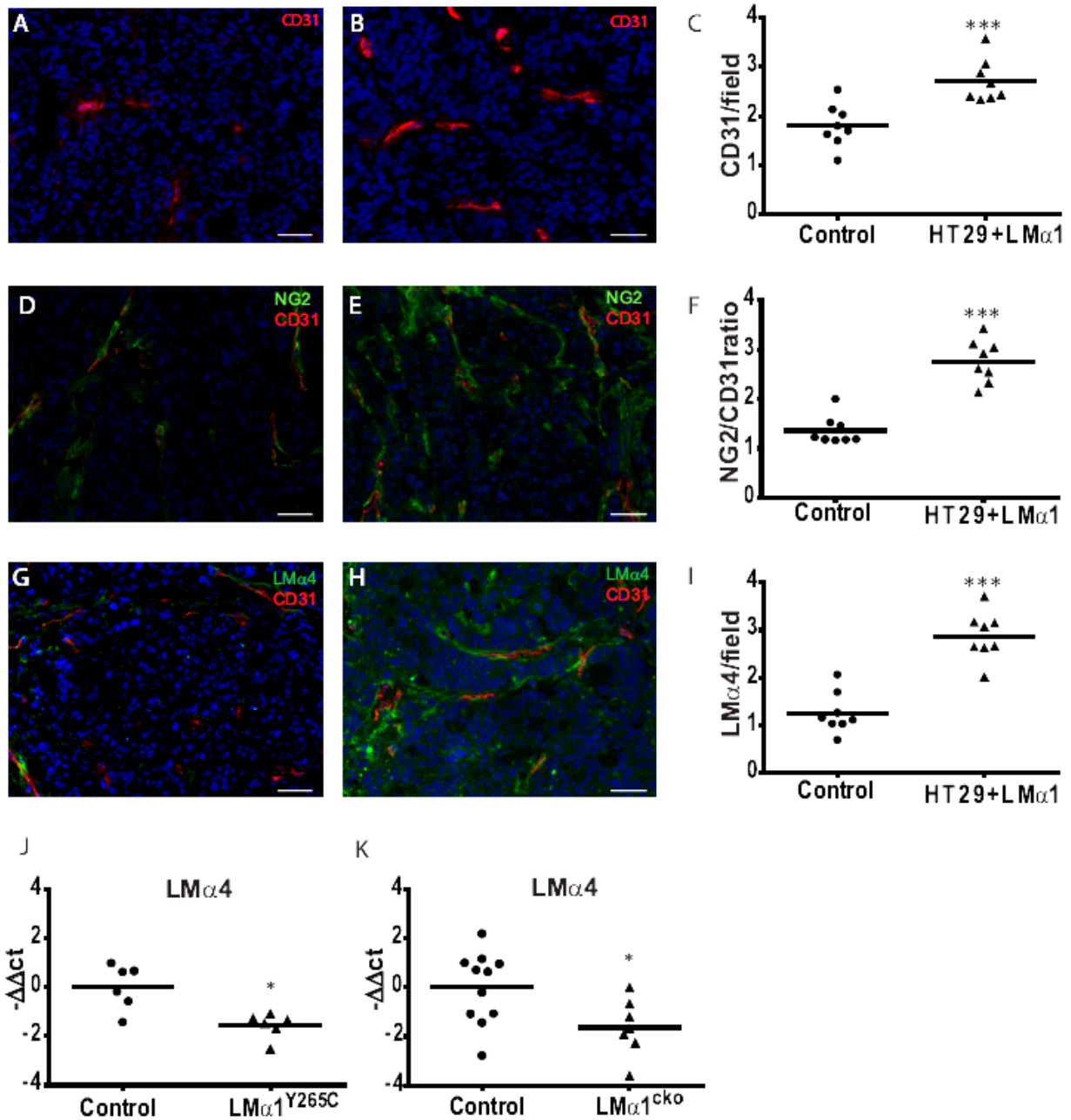


Figure S2: LM α 1 promotes improves blood vessel maturation in HT29 tumors and reduced LM α 4 expression in the retinal vasculature of LM α 1 mutated mice

Representative examples of immunostaining results of HT29 (A, D, G) and HT29LM α 1 xenograft tumors (B, E, H) for CD31 (A), combined NG2 and CD31 (D, E) and LM α 4 and CD31 (G, H). Quantification of the immunostaining signals for CD31 (C), NG2 and CD31 (F) and LM α 4 (I) in the HT29 tumors. One data point represents one tumor. ***, $p < 0.001$, Student's t-test. Scale bar: 50 μ m. Quantification of the expression of LM α 4 mRNA in the retina of mice harboring a point mutation (LM α 1^{Y265C}, J) and knockout (LM α 1^{cko}, K) for the LM α 1 gene by qRT-PCR. One data point represents one retina from one mice. (J) *, $p < 0.05$, Mann-Whitney test. (K) *, $p < 0.05$, Student's t-test.

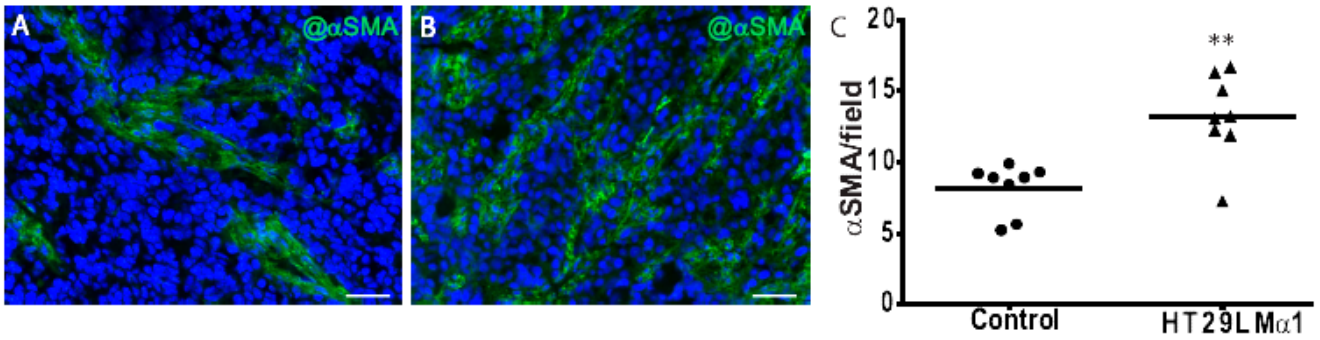


Figure S3: LM α 1 promotes fibroblast expansion in HT29LM α 1 tumors

Representative images of α SMA positive fibroblasts in HT29 control (A) and HT29LM α 1 xenograft tumors (B). (C) Quantification of α SMA positive fibroblasts in both tumor types. One data point represents one tumor. ***, $p < 0.01$, Student's t-test. Scale bars: 50 μ m.

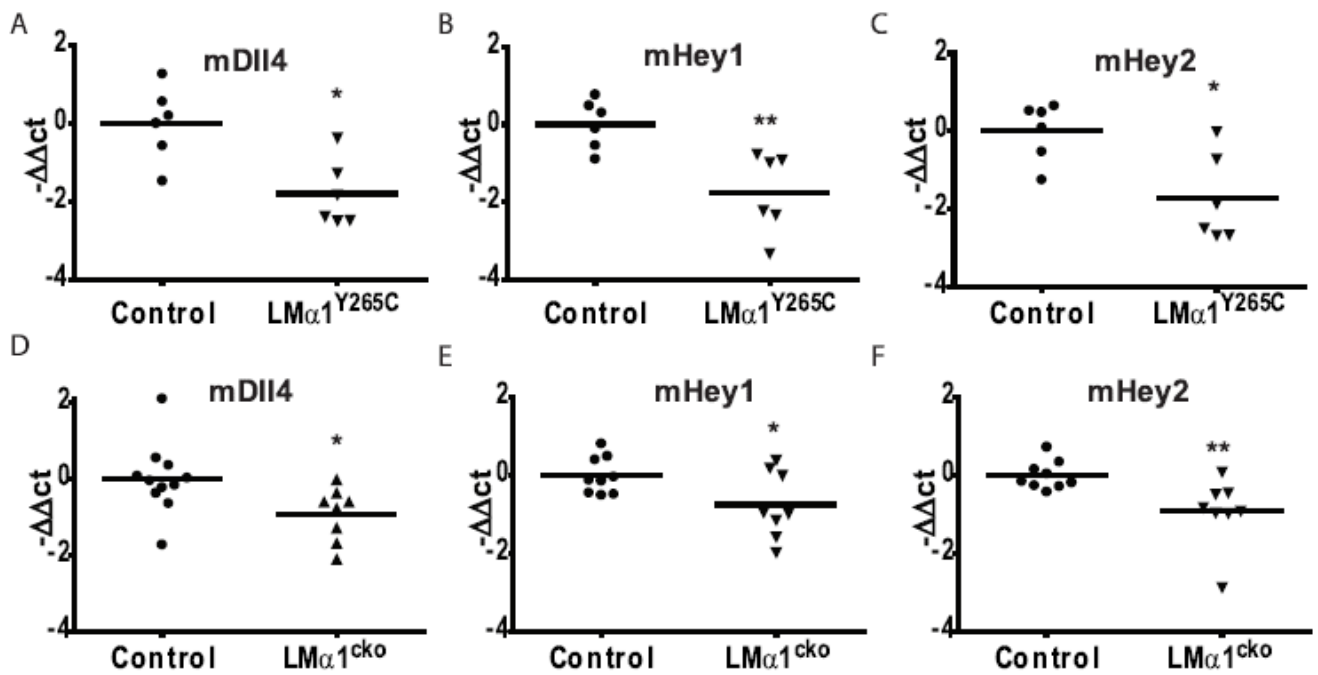


Figure S4: Negative impact of $LM\alpha 1$ gene mutations on Notch signaling in the retinal vasculature

Quantification of DII4, Hey1 and Hey2 expression in retinas of mice harboring a point mutation ($LM\alpha 1^{Y265C}$, **A-C**) and conditional knockout ($LM\alpha 1^{cko}$, **D-F**) for the $LM\alpha 1$ gene by qRT-PCR. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, Mann Whitney test.

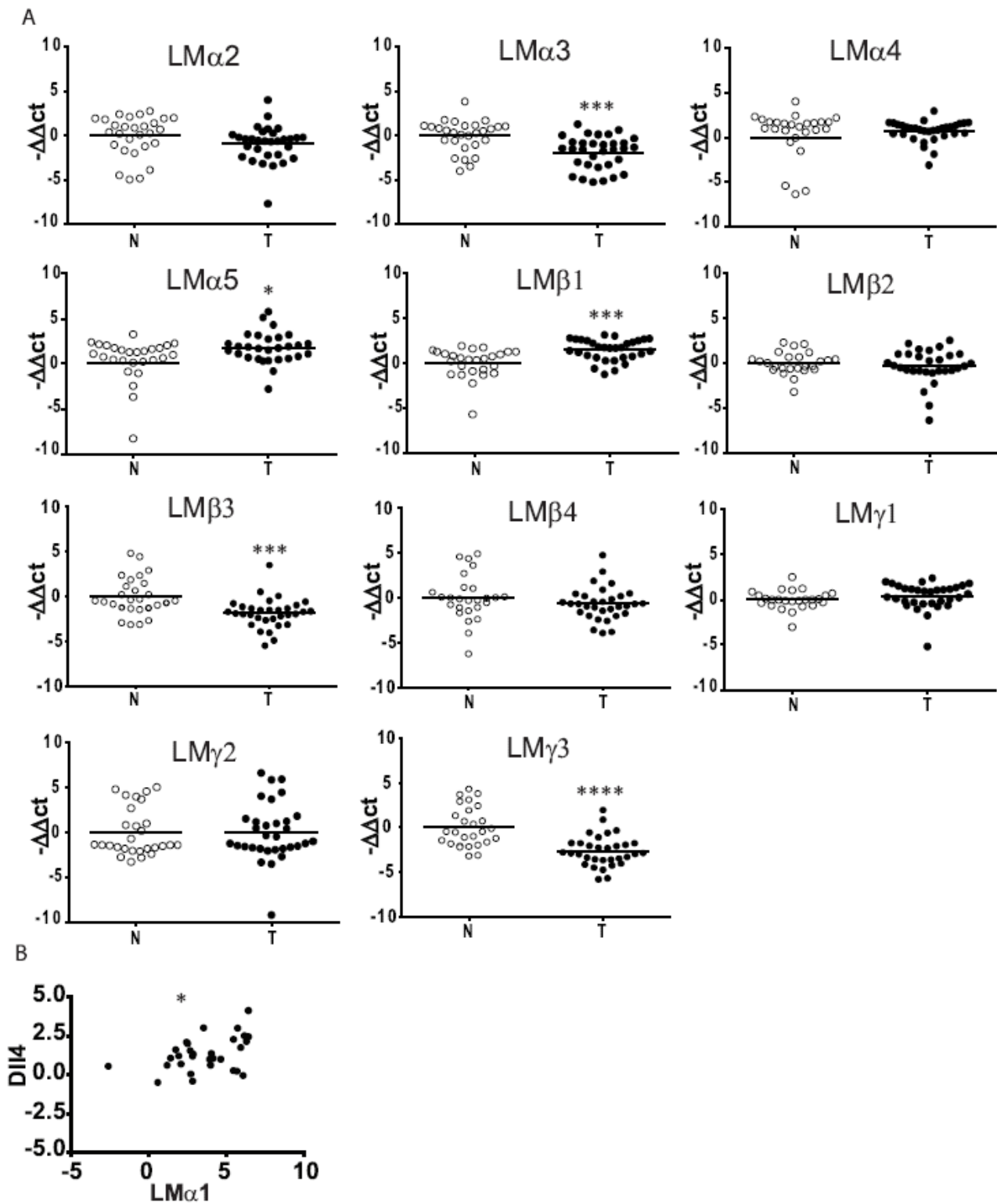


Figure S5: Expression of different LM and correlation with DII4 in human colorectal tumors

(A) Expression of the indicated laminin chains was determined by qRT-PCR in normal colon tissue (N) and in matched tumor tissue (T). *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$ ****, $p < 0.0001$, Student's t-test. $n=30$. (B) Correlation between mRNA expression of LM α 1 and DII4 in human colon tumors. *, $p < 0.05$, Pearson r test.

<i>Gene</i>	<i>cell line</i>	<i>LM111 versus FN</i>		<i>LM111 versus plastic</i>	
		Student's t-test	Fold expression	Student's t-test	Fold expression
VEGFA	MEF	ns	-1.26	ns	-1.14
	IMR90	ns	-1.07	ns	-1.05
DII4	MEF	***	1.81	**	1.97
	IMR90	**	1.79	**	2.3
Hey1	MEF	ns	-1.03	ns	-1.04
	IMR90	ns	1.19	ns	1.01
Hey2	MEF	ns	1.23	ns	1.02
	IMR90	ns	-1.03	ns	-1.38

Supplementary Table S1: Impact of LM111 substratum on the expression of VEGFA and notch signaling in normal fibroblasts.

MEF and IMR90 were plated on LM111, FN substratum or uncoated surface (plastic) for 24h, before extraction of RNA and subsequent qRT-PCR analysis. Gene expression on LM111 is displayed in comparison to FN or plastic. 3 independent experiments in triplicate, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$. Student's t-test.

Sample	Sexe	Age	Localisation	Tumoral Stage	CIN or MIN
1	F	81	colon	ADK pT3N1	CIN
2	M	74	rectum	ADK T3N0	CIN
3	M	73	colon	ADK T3N2M1	CIN
4	M	57	colon	ADK T2N0	CIN
5	M	85	colon	ADK pT3N1	CIN
6	M	88	colon	ADK PT3N1	CIN
7	M	74	rectum	ADK pT2N0	CIN
8	M	57	colon	ADK pT2N0	CIN
9	M	67	rectum	ADK pT3N0	CIN
10	M	56	rectum	ADK pTisN0	CIN
11	M	66	colon	ADK pT2N0	MIN
12	M	69	colon	ADK pT4N2M1	CIN
13	F	59	rectum	ADK pT1N0	CIN
14	M	67	colon	ADK pT3N0	CIN
15	F	81	caecum	ADK pT3N1	MIN
16	M	60	colon	polype pTis	CIN
17	M	79	colon	ADK pT3N1	CIN
18	M	71	colon	ADK pT3N2	CIN
19	F	57	colon	ADK pT2N1	CIN
20	F	71	colon	ADK pT3N0	CIN
21	F	71	colon	polype pTis	CIN
22	M	77	colon	ADK pT4N2M1	MIN
23	F	83	colon	ADK pT3N1	CIN
24	M	71	colon	ADK pT2N0	CIN
25	F	55	colon	ADK pT1N0	CIN
26	M	67	colon	ADK pT3N0	CIN
27	F	83	colon	ADK pT3N0	MIN
28	M	58	colon	ADK pT3N2	CIN
29	M	82	colon	ADK pT3N1	RER
30	M	54	colon	ADK pT4N2M1	CIN
31	M	72	colon	ADK pT3N1	MIN
32	M	54	colon	ADK pT3N0	MIN
33	M	65	colon	ADK pT4N0	CIN

CIN: chromosome instability

MIN: microsatellite instability

Supplementary Table S2: List of colon cancer specimens

Name	Sequence 5'-3' Forward	Sequence 5'-3' Reverse
h VEGFA	AAGGAGGAGGGCAGAATCAT	CCAGGCCCTCGTCATTG
h Dll4	CCCTGGCAATGCAGTAGTTGAG	TGGTGGGTGCAGTAGTTGAG
h Hey1	GGAACCTAGAGCCGAACTCA	GTACCATCCAGCAGTGCATC
h LM α 1	Hs00300550_m1 (TaqMan probe, Applied)	
h LM α 1	GACAGCCCGGTGTCTGCCTTCACG	GTGGCGGTTTTGGGCTCATATGCA
h LM α 2	ATGCAATGCGTTTGTGGT	CACGTACAGCATCAGCCTC
h LM α 3	TGCCCATGTCCTCACACTAA	CACGTCTCCCCATTAC
h,m LM α 4	ACCTCCTCAATCAAGCCAGA	TCAGCCACTGCTTCATCACT
h LM α 5	TCCCCTACTGCGAAGCTG	CCTCAGGAAGGGCAGGAT
h LM β 1	CCACTGAAAAACATTGGGAATC	TGAGCCATCATCATTCTGTAACATC
h LM β 2	GAGGCTGAGAAACAACACTACGGGAA	CCCATCCAGCTGGGCCGCTTTGCC
h LM β 3	GAAGATGTCAGACGCACACG	GCATCAGTGTCCGGGTCT
h LM β 4	GATCAGCCCTCAATCAGACC	GGACACTCCATGGGACTCAC
h LMy1	GACATCACTTACGTGCGCCTC	ACTGTAGTACTGATAAGGAAT
h LMy2	ACTGTAGTACTGATAAGGAAT	GACATCACTTACGTGCGCTC
h LMy3	AGACGAGGAGGAGCTCACAG	TATGAGGGGCTGCCCATAG
h GAPDH	Hs99999905_m1 (TaqMan probe, Applied)	
h Pbdg	QT00014462 (Quiagen)	
m VEGFA	GTACCTCCACCATGCCAAGT	TGGGACTTCTGCTCTCCTTC
m Dll4	AGGTGCCACTTCGGTACAC	GGGAGAGCAAATGGCTGAGA
m Hey1	CATGAAGAGAGAGCTCACCCAGA	CGCCGAACTCAAGTTTCC
m Hey2	GAGGAAACGACCTCCGAAA	GACCTCATCACTGAGCTTGTAGC
m LM α 1	CCGACAACCTCCTCTTCTACC	TCTCCACTGCGAGAAAGTCA
m GAPDH	Mm99999915_g1 (TaqMan probe, Applied)	
m Pbdg	QT00494130 (Quiagen)	

h: human specific

m: mouse specific

h,m: recognize human and mouse

Supplementary Table S3: List of primers sequences and probes

Antigen recognized	Antibody	Species recognized	Type	Dilution	Use	Source/reference
α SMA	1A4	mouse	mouse mAB	1/200	IF	Sigma Aldrich
α SMA	E184	mouse	rabbit mAB	1/500	IF	Chemicon Millipore
CD31	73117	mouse	rat mAB	1/500	IF	Pharminogen
DLL4	ab7280	mouse, human	rabbit pAB	1/200	IF	abcam
Ki67	RM-9106	mouse	rabbit pAB	1/200	IHC	Thermo Scientific
LM α 1 VIV domain	1057	mouse	rabbit pAB	1/500	IF	Sasaki et al., 2002
LM α 1	Tiger II	human	rabbit pAB	1/200	IF	Tiger et al., 1997
LM α 1	200	mouse	rat mAB	1/200	IF	Sorokin et al., 1992
LM α 1	YY4	mouse	rabbit pAB	1/500	wb	gift from Linda Kleinman
LM α 4	377	mouse	rabbit pAB	1/750	IF	Sorokin et al., 2000
LM α 5	8948	mouse	rabbit pAB	1/500	IF	Miner et al., 1997
Mts1 Fsp S100A4+	8828	mouse	rabbit pAB	1/500	IF	gift from Nona Ambartsumian
NG2	AB5320	mouse, human	rabbit pAB	1/200	IF	Chemicon Millipore
VEGFA	sc-433	mouse, human	mouse mAB	1/500	IHC	Santa Cruz Biotechnology

mAB: monoclonal antibody

pAB: polyclonal antibody

Supplementary Table S4: List of antibodies

III. RESULTATS COMPLEMENTAIRES

III.1 Etude de l'effet du VEGFA sur l'expression du Dll4 dans des fibroblastes associés au cancer.

Les résultats montrent que la LM111 stimule l'expression du VEGFA dans des fibroblastes associés au cancer (CAF). Les données de la littérature indiquent que le VEGFA stimule l'expression de Dll4 dans des cellules endothéliales (Estrach et al., 2011). Pour tester si le VEGFA était capable directement de moduler l'expression de Dll4 également dans des CAF, j'ai traité les cultures de CAF avec le VEGFA recombinant (20ng/ml, R&D Systems). L'étude par qRT-PCR de l'expression de l'ARNm de Dll4 provenant de CAF après 24 heures de traitement au VEGFA n'a pas révélé de différence significative, comparé aux CAF contrôles. Les résultats sont illustrés sur la **Figure 32**. La confirmation au niveau protéique est en cours.

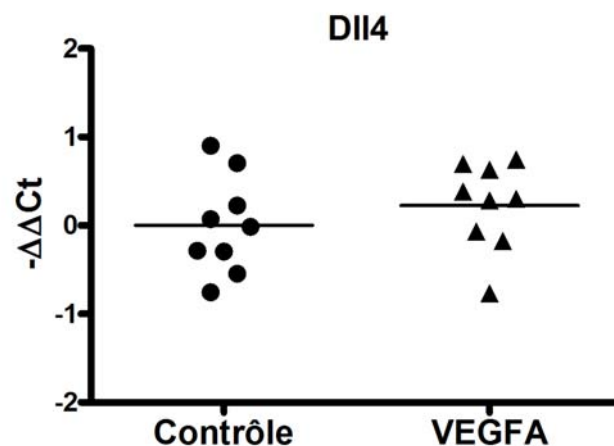


Figure 32 : Expression relative de l'ARNm de Dll4 dans des CAF traités avec le VEGFA comparés aux CAF contrôles n=9, p value = 0.3712, Student's t-test.

III.2 Corrélation entre croissance tumorale, CD31, α -SMA et Dll4

Pour comprendre si l'augmentation du nombre des cellules endothéliales, fibroblastes et de l'expression de Dll4 est bien corrélée avec la pousse tumorale et la présence de la LM α 1, j'ai réalisé une cinétique de croissance des tumeurs sous cutanées développées à partir des cellules HT29 surexprimant ou non la LM α 1 (De Arcangelis et al., 2001) et prélevées à la 2^{ème}, 3^{ème} et 4^{ème} semaine après l'injection. Ceci a permis de montrer que la LM α 1 accélère la croissance tumorale qu'à partir de 4 semaines comparativement aux tumeurs contrôles HT29 (>1.7 fois en moyenne), (**Figure 33**).

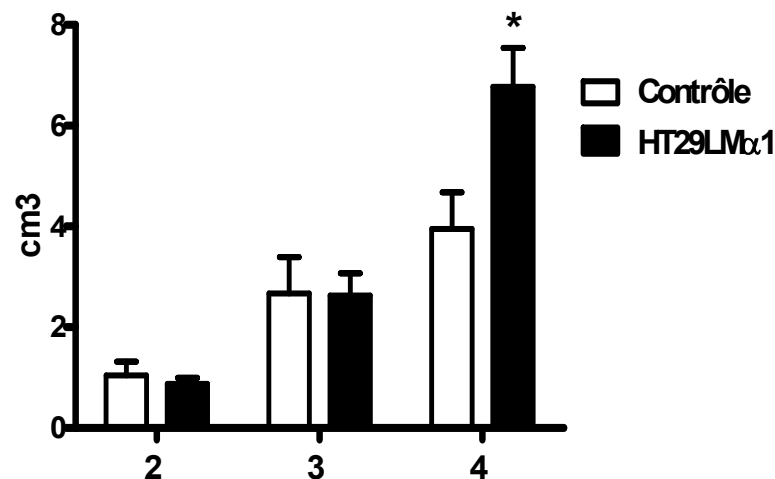


Figure 33 : Quantification du volume tumoral à la 2^{ème}, 3^{ème}, 4^{ème} semaine après l'injection. Les histogrammes correspondent à la moyenne des expériences indépendantes (n=6), représentées avec leur SEM (* moyenne statistiquement significative, p <0.05, Mann Whitney test).

L'étude de la distribution des cellules endothéliales, des fibroblastes et de l'expression de Dll4 par quantification de la surface d'immunomarquage confirme que cet accroissement du volume tumoral est corrélé à l'augmentation du nombre de vaisseaux sanguins (1.8x en moyenne), des fibroblastes (1.7x en moyenne) ainsi qu'à l'expression de Dll4 (1.7x en moyenne) (**Figure 34**).

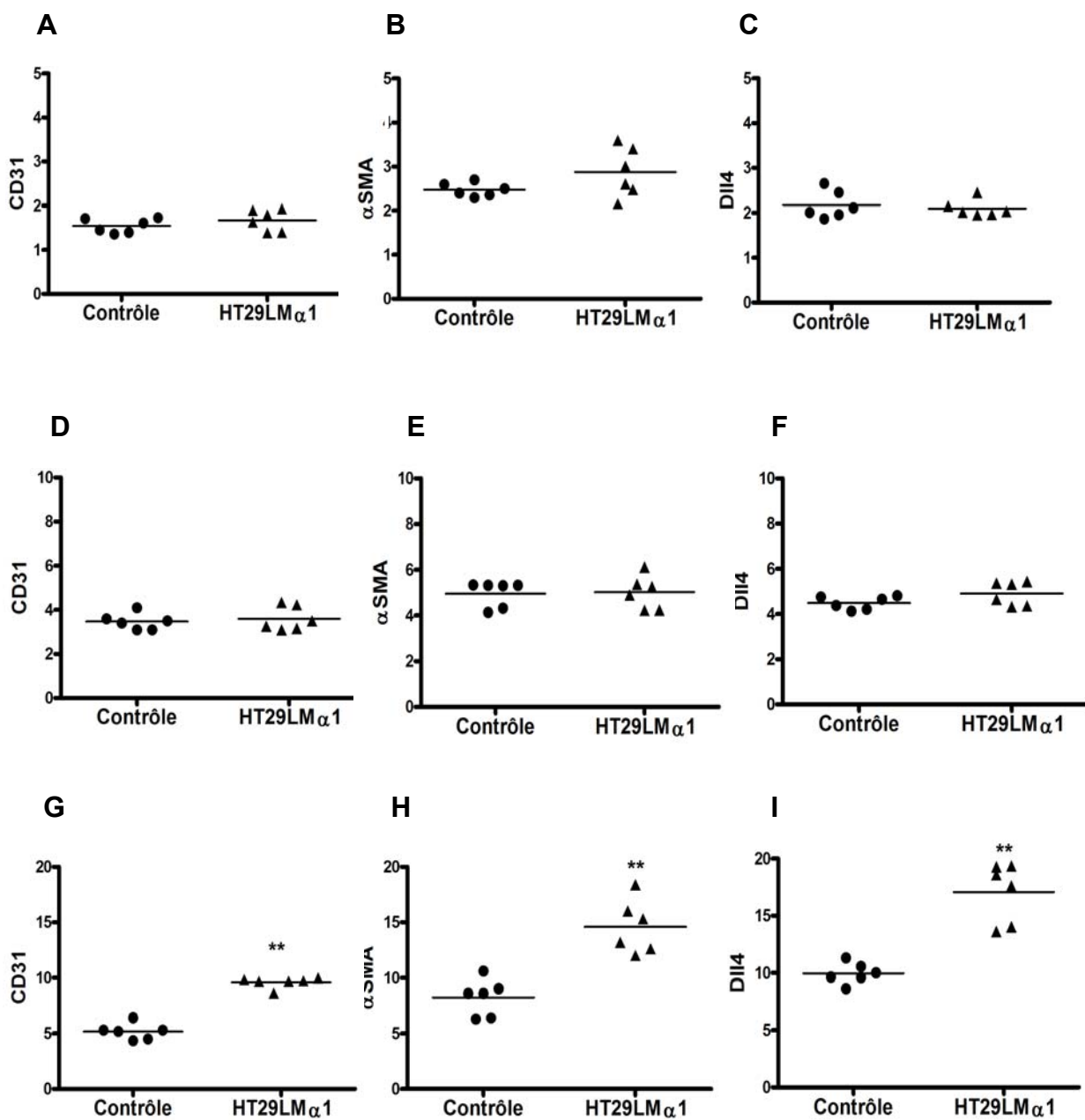


Figure 34 : Quantification de la surface de marquage de CD31, de l' α SMA et de Dll4 dans des tumeurs contrôles HT29 et HT29LM α 1 prélevées à 2 (A-C), 3 (D-F) et 4 (G-I) semaines après l'injection. Chaque point correspond à une expérience indépendante. **, $p < 0.01$, Mann Whitney test

III.3 Recherche de gènes différentiellement exprimés par qRT-PCR

Le modèle de xénogreffes présente l'avantage de pouvoir distinguer par qRT-PCR, le stroma d'origine murine de celui des cellules tumorales (dans notre cas cellules HT29, d'origine humaine) afin d'étudier la différence d'expression de différents gènes sur les deux compartiments. Sur ce modèle, j'ai mis en place au laboratoire une approche de qRT-PCR basée sur le « design » d'amorces spécifiques d'espèces. Pour cela les régions codantes des ARNm humains et murins ont été alignées afin de trouver des régions présentant une faible homologie entre elles, qui ont servi au « design » des amorces de qRT-PCR. La spécificité des amorces a été confirmée en utilisant le module BLAST (NCBI) et par la qRT-PCR. La validation a été réalisée en amplifiant de l'ADNc de tissus humains avec des amorces de gènes murins, et de tissus murins avec des amorces de gènes humains. Chaque gène exprimé dans le stroma ou dans les cellules cancéreuses a été normalisé à un gène de référence lui aussi spécifique d'espèce, dans notre cas celui de PBGD (porphobilinogen deaminase). Le $\Delta\Delta Ct$ de chaque échantillon a été calculé par rapport à la moyenne du ΔCt du groupe contrôle (Ct gène d'intérêt – Ct gène de référence), et représenté sur les différents graphes comme $-\Delta\Delta Ct$.

Tout d'abord, il m'a paru intéressant d'étudier l'expression de gènes impliqués dans le remodelage matriciel et l'invasion (les métalloprotéases matricielles, MMP). De plus une attention particulière a été portée aux gènes impliqués dans l'angiogenèse et la voie Notch. C'est par cette approche que j'ai pu observer une augmentation de l'expression du VEGFA et des composants de la voie Notch (DII4, Hey1, Hey2) dans le stroma tumoral des tumeurs HT29LM α 1, alors que ces gènes ne sont pas modifiés au niveau des cellules tumorales. Cette analyse montre également une augmentation de l'expression de la MMP9, RGS5 (une protéine régulatrice des protéines G, également considéré comme un marqueur des péricytes) et de l'IGFBP3 (Insulin-like growth factor-binding protein 3). Les résultats de cette étude sont présentés dans le **tableau 2** et seront discutés plus loin.

Gène	Expression relative	Student's t-test
h VEGFA	1.69	0.0611
h Dll1	-1.04	0.9093
h Dll4	1.32	0.1545
h Jagged1	2.50	0.3055
h Notch1	1.25	0.2602
h Hey1	1.15	0.5461
m CD44	1.06	0.8707
m FGF1	-1.04	0.1412
m MMP3	-1.62	0.0612
m MMP7	1.51	0.1896
m MMP9	2.12	**
m MMP14	1.05	0.7363
m Syndecan-1	1.41	0.3047
m LYVE-1	1.03	0.8872
m podoplanine	1.19	0.6517
m VEGFA	2.46	**
m VEGFB	-1.05	0.7942
m VEGFC	-1.30	0.3977
m VEGFD	-1.18	0.4654
m VEGFR1	1.56	0.0674
m VEGFR2	1.44	0.1968
m VEGFR3	1.02	0.9276
m Nrp1	1.27	0.1381
m Ang1	1.90	0.0643
m Ang2	1.19	0.5090
m Tie2	1.29	0.2375
m PIGF	1.21	0.5175
m PDGFa	1.28	0.3320
m PDGFb	1.04	0.7818
m RGS5	1.87	*
m EphrineB2	1.51	0.078
m IGFB3	1.84	*
m Dll1	1.29	0.4245
m Dll4	1.65	*
m Jagged-1	1.19	0.3648
m Notch1	1.09	0.7056
m Notch4	-1.01	0.9222
m Hey1	1.52	*
m Hey2	1.54	*

Tableau 2 : Expression relative par qRT-PCR de différents gènes dans les tumeurs HT29LM α 1 comparées aux tumeurs contrôles avec des amorces spécifiques humaines (h) et murines (m), n=16.

*, p<0.05 ; **, p<0.001, Student's t-test

III.4 Recherche de gènes différentiellement exprimés par Affymetrix

Les tumeurs surexprimant la LMa1 présentent un stroma plus important comparé aux tumeurs contrôles, avec un plus grand nombre de vaisseaux sanguins, de péricytes et de fibroblastes. Pour comprendre cette expansion stromale, il était intéressant de rechercher si l'expression de la LMa1 au niveau des cellules HT29 pouvait modifier l'expression de gènes parmi lesquels des facteurs de croissance ou des cytokines, pouvant expliquer cette expansion tumorale.

Pour cela, nous avons réalisé une analyse transcriptomique en utilisant le système Affymetrix (plateforme de biopuces, IGBMC, Illkirch, France). Cette analyse a été réalisée en triplicat biologique provenant de 3 cultures indépendantes de 5 jours de cellules HT29 et de HT29LMa1. Nous avons utilisé les puces GeneChip Human Gene 1.0ST Arrays. Les données de cette analyse fournies sous forme de valeurs de log₂ ont été normalisées en utilisant la méthode RMA (robust multi-array average) (Irizarry et al., 2003), permettant de retrancher les valeurs du bruit de fond des valeurs de PM (Perfect Match). Pour cette étude, j'ai comparé le profil d'expression génique des cellules HT29 et HT29LMa1. La moyenne des valeurs du groupe contrôle HT29 soustraite à la moyenne du groupe HT29LMa1 présente une valeur d'augmentation moyenne (fold increase). Inversement, la moyenne des valeurs du groupe HT29LMa1 soustraite à la moyenne du groupe contrôle HT29 présente la valeur d'inhibition (fold inhibition). Ces données ont été filtrées afin de garder uniquement les différences d'expression > ou < de 1.5 fois en moyenne avec une p value <0.01 (Student's test). Cette liste contient 332 gènes sur ou sous exprimés (**Tableau 3** en fin de section). Dans un premier temps, j'ai validé l'expression de certains gènes sur les ADNc issus de ces mêmes cultures cellulaires par qRT-PCR, qui est une approche plus sensible que l'Affymetrix.

Ensuite j'ai étudié l'expression de certains gènes candidats, qui me semblaient plus pertinents, au niveau des modèles tumoraux: xénogreffe HT29LMa1 et les tumeurs coliques V-LMa1. Pour l'étude de l'expression génique, dans le modèle de xénogreffe, j'ai utilisé à nouveau l'approche de design d'amorce espèce spécifique afin d'évaluer leur expression au niveau du compartiment des cellules tumorales humaines. Ces résultats sont présentés **Figure 35**.

Le choix de ces gènes candidats (dermokine, Cox2, IGF2, LGR5 et MGP) a été basé principalement sur les données de la littérature. La dermokine a été récemment décrite comme un nouveau bio-marqueur, exprimé dans des phases précoces du cancer colorectal (Tagi et al., 2010).

L'expression de la cyclo-oxygénase Cox2 a été décrite comme étant corrélée à l'expression des laminines dans le cadre de la tumorigenèse et de l'inflammation (Niki et al., 2002; Ji and Tsirka, 2012)

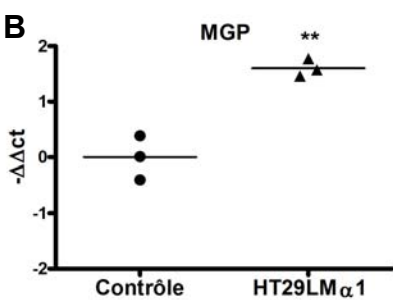
L'IGF2 (Insulin Growth Factor 2) m'a paru très intéressant, car il a été décrit comme étant impliqué dans le recrutement des cellules endothéliales progénitrices et leur incorporation dans les zones néo-vasculaires, ce qui stimulerait l'angiogenèse (Maeng et al., 2009). Il a surtout été décrit dans le cancer colorectal comme étant un bio-marqueur (Baba et al., 2010). LGR5 est connu comme étant un marqueur des cellules souches cancéreuses dans le côlon (Takahashi et al., 2011). La MGP (matrix Gla protein) est un membre de la famille des protéines vitamine K-dépendante qui comprend également la prothrombine. La MGP est une protéine sécrétée. Le gène codant pour cette protéine est potentiellement intéressant dans le contexte de ce travail car MGP a été montrée impliquée aussi bien dans l'angiogenèse physiologique (Yao et al., 2011) que dans l'angiogenèse tumorale (Kuzontkoski et al., 2010).

L'analyse de l'expression génique par qRT-PCR a montré que, parmi les candidats analysés, seule la MGP présentait une augmentation dans les tumeurs HT29LM α 1 (>3x) ainsi que dans les tumeurs coliques V-LM α 1 (2x) comparées à leurs contrôles respectifs (**Figure 35**).

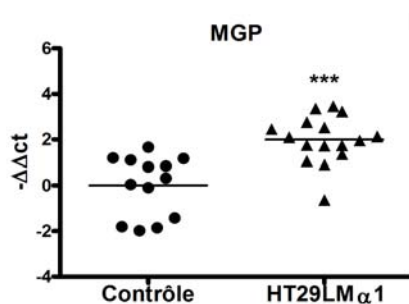
A

Gène	Cellules HT29LM α 1		Tumeurs HT29LM α 1		Gène	Tumeurs AOM-DSS	
	Expression relative	Mann Whitney test	Expression relative	Student's t-test		Expression relative	Student's t-test
h dermokine	4.62	**	6.96	***	m dermokine	1.4	0.5272
h IGF2	3.74	**	3.91	***	m IGF2	1.1	0.6793
h cox2	1.32	0.5065	1.25	0.3615	m cox2	2.32	0.2268
h LGR5	2.78	**	3.65	***	m LGR5	1.27	0.4283
h MGP	3.03	**	3.97	***	m MGP	2.04	*

B



C



D

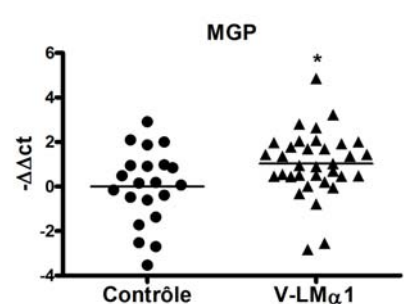


Figure 35 : Validation des résultats obtenus de l'Affymetrix par qRT-PCR (A). Expression relative de l'ARNm de la MGP dans des cellules (n=3) et tumeurs HT29LM α 1 (n=13-16); (**B**, **C**) et des tumeurs V-LM α 1 (n=21-34); (**D**) comparée à leurs contrôles. *, p<0.05. **, p<0.01. ***, p<0.001, Mann Whitney test, Student's t-test. h-humain, m-souris

III.5 Recherche de gènes différentiellement exprimés par RNAseq

Pour aller plus loin dans cette recherche nous avons débuté une approche par RNAseq. Le principe général est un séquençage parallèle à haut débit d'une banque d'ADNc, chaque ADNc étant séquençé individuellement sur une longueur d'environ 72 pb. Après comparaison avec les bases de données issue du séquençage des génomes, on obtient de ce séquençage une information qualitative, c'est-à-dire l'identité de l'ARNm séquençé et d'autre part quantitative, c'est-à-dire le nombre de fois que cet ARNm a été séquençé à partir de la banque d'ADNc construite. Pour cette étude, j'ai comparé le profil d'expression génique de 3 tumeurs xénogreffes HT29 ou HT29LM α 1. Là encore nous avons mis à profit la double origine de ces tumeurs à la fois humaine et murine. Le séquençage permettra de déterminer si le mRNA était d'origine humaine ou murine. Pour augmenter la probabilité de séquencer les zones les plus divergentes possibles entre l'homme et la souris, la construction des banques d'ADNc devait se faire via une synthèse des ADNc à partir des extrémités 3' UTR des mRNA, en utilisant une amorce oligo dT. Malheureusement les banques d'ADNc ont été construites plus classiquement via des amorces aléatoires de 6 pb. Enfin il faut prendre en compte la proportion cellulaire entre cellules tumorales humaines et cellules stromales murines qui est estimée à 90% et 10% respectivement, ce qui diminuera *de facto* le nombre de séquences murines que l'on pourra analyser. Les comparaisons des séquences avec les bases de données humaine ou murine ont été traitées et analysées grâce à une collaboration avec Wolfgang Raffelsberger (IGBMC, Illkirch, France). Les données ont été analysées de la même manière que les puces Affymetrix. Les données ont été filtrées afin de garder uniquement les différences d'expression $>$ ou $<$ de 1,5x avec une p value <0.01 (Student's t test) et sont présentées dans le **tableau 4** (en fin de section). Comme on peut le voir, peu de gènes murins sur- ou sous- exprimés (une quarantaine en tout) ont été trouvé différentiellement exprimés dans les deux types de tumeurs. On peut cependant remarquer que l'expression élevée du gène de la LM α 1* était attendue. Les données sont encore en cours d'analyse par Wolfgang Raffelsberger pour tenter d'avoir plus de séquences murines analysables, notamment en utilisant les données SNP (single nucleotide polymorphism) humaines et murines. Pourtant plusieurs gènes candidats très intéressants sont surexprimés comme Il1 β , Fos, IGFBP3 (dont nous avons déjà validé l'expression différentielle par qRT-PCR) et Wnt5a.

(*) Il est important de noter que les cellules HT29, pour faire exprimer la LM α 1, ont été transfectées avec un vecteur contenant l'ADNc d'origine murine. C'est pour cette raison que l'on trouve l'expression de la LM α 1 dans cette analyse.

Probe Set ID	Gene	Description	Fold change
8175696	GABRA3	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor. alpha 3	6.78
8175747	MAGEA3	melanoma antigen family A. 3	4.41
8170576	CSAG1	chondrosarcoma associated gene 1	4.34
7970448	GJB6	gap junction protein. beta 6. 30kDa	4.10
8073068	APOBEC3C	apolipoprotein B mRNA editing enzyme. catalytic polypeptide-like 3C	4.04
7961514	MGP	matrix Gla protein	3.59
8065412	CST1	cystatin SN	3.51
8140504	MAGI2	membrane associated guanylate kinase. WW and PDZ domain containing 2	3.47
8175710	CSAG2	CSAG family. member 2	3.06
8175492	ATP11C	ATPase. class VI. type 11C	2.99
8170580	CSAG2	CSAG family. member 2	2.97
8101126	CXCL10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	2.60
7957140	LGR5	leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5	2.60
8151369	C8orf84	chromosome 8 open reading frame 84	2.53
7968417	FRY	furry homolog (Drosophila)	2.45
7937335	IFITM1	interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)	2.36
8175724	MAGEA12	melanoma antigen family A. 12	2.34
8170553	MAGEA6	melanoma antigen family A. 6	2.28
8170027	DDX26B	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 26B	2.27
8073081	APOBEC3F	apolipoprotein B mRNA editing enzyme. catalytic polypeptide-like 3F	2.26
8108629	VTRNA1-2	vault RNA 1-2	2.26
8112342	ADAMTS6	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif. 6	2.25
8037750	IGFL4	IGF-like family member 4	2.25
7964759	GRIP1	glutamate receptor interacting protein 1	2.21
8157650	PTGS1	prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (cyclooxygenase 1)	2.20
7919340	GJA5	gap junction protein. alpha 5. 40kDa	2.20
8044353	ACOXL	acyl-CoA oxidase-like	2.16
8036079	DMKN	dermokine	2.16
7947481	ELF5	E74-like factor 5 (ets domain transcription factor)	2.15
8026490	UCA1	urothelial cancer associated 1 (non-protein coding)	2.12
8142524	TSPAN12	tetraspanin 12	2.11
7943998	NNMT	nicotinamide N-methyltransferase	2.11
7968232	SNORD102	small nucleolar RNA. C/D box 102	2.09
7968370	B3GALTL	beta 1.3-galactosyltransferase-like	2.09
7922976	PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (cyclooxygenase 2)	2.05
8073088	APOBEC3G	apolipoprotein B mRNA editing enzyme. catalytic polypeptide-like 3G	2.01
7898413	PADI1	peptidyl arginine deiminase. type I	1.99
8063000	WFDC2	WAP four-disulfide core domain 2	1.99
8095680	IL8	interleukin 8	1.97
8066214	TGM2	transglutaminase 2 (C polypeptide. protein-glutamine-gamma-glutamyltransferase)	1.96
7923406	PTPN7	protein tyrosine phosphatase. non-receptor type 7	1.96
7970831	UBL3	ubiquitin-like 3	1.95
8108631	VTRNA1-3	vault RNA 1-3	1.91
8168470	COX7B	cytochrome c oxidase subunit VIIb	1.91
7968242	GTF3A	general transcription factor IIIA	1.90
7909164	CTSE	cathepsin E	1.89
7937772	IGF2	insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)	1.88

Probe Set ID	Gene	Description	Fold change
7968789	C13orf15	chromosome 13 open reading frame 15	1.88
7977786	SLC7A7	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter. y+ system). member 7	1.87
8122660	UST	uronyl-2-sulfotransferase	1.87
7968658	EXOSC8	exosome component 8	1.87
8046333	CYBRD1	cytochrome b reductase 1	1.85
8146618	CLVS1	clavesin 1	1.85
7968563	RFC3	replication factor C (activator 1) 3. 38kDa	1.84
7917885	CNN3	calponin 3. acidic	1.84
8006531	SLFN5	schlafen family member 5	1.84
7968234	SNORA27	small nucleolar RNA. H/ACA box 27	1.83
7968199	CDK8	cyclin-dependent kinase 8	1.82
7923608	REN	renin	1.80
8129677	SGK1	serum/glucocorticoid regulated kinase 1	1.80
8015323	KRT13	keratin 13	1.80
8178435	IER3	immediate early response 3	1.79
7971027	ALG5	asparagine-linked glycosylation 5. homolog (yeast)	1.79
7909214	RASSF5	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 5	1.78
8016414	SKAP1	src kinase associated phosphoprotein 1	1.78
7945371	IFITM3	interferon induced transmembrane protein 3 (1-8U)	1.77
8176026	FLNA	filamin A. alpha	1.75
7934842	MMRN2	multimerin 2	1.75
8066117	SAMHD1	SAM domain and HD domain 1	1.75
7950534	WNT11	wingless-type MMTV integration site family. member 11	1.74
8111490	PRLR	prolactin receptor	1.74
8124848	IER3	immediate early response 3	1.74
8179704	IER3	immediate early response 3	1.74
7968236	RASL11A	RAS-like. family 11. member A	1.73
8105436	MAP3K1	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1	1.73
7935553	LOXL4	lysyl oxidase-like 4	1.72
8136811	EPHB6	EPH receptor B6	1.72
8156199	DAPK1	death-associated protein kinase 1	1.72
8073743	UPK3A	uroplakin 3A	1.71
8173713	MAGT1	magnesium transporter 1	1.70
7928872	SNCG	synuclein. gamma (breast cancer-specific protein 1)	1.69
7902541	IFI44L	interferon-induced protein 44-like	1.68
7971039	FAM48A	family with sequence similarity 48. member A	1.67
7943715	ZC3H12C	zinc finger CCCH-type containing 12C	1.66
7970810	SLC7A1	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter. y+ system). member 1	1.66
8110803	CLPTM1L	CLPTM1-like	1.64
8162059	SLC28A3	solute carrier family 28 (sodium-coupled nucleoside transporter). member 3	1.64
8174361	TSC22D3	TSC22 domain family. member 3	1.64
7970546	EFHA1	EF-hand domain family. member A1	1.63
7951077	SESN3	sestrin 3	1.63
8064388	C20orf54	chromosome 20 open reading frame 54	1.63
8036710	GMFG	glia maturation factor. gamma	1.62
7970428	ZMYM5	zinc finger. MYM-type 5	1.61
8004184	XAF1	XIAP associated factor 1	1.61
7976443	IFI27	interferon. alpha-inducible protein 27	1.60

Probe Set ID	Gene	Description	Fold change
8169210	CLDN2	claudin 2	1.60
8148548	PSCA	prostate stem cell antigen	1.60
7970716	LN2	ligand of numb-protein X 2	1.59
7929065	IFIT1	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	1.58
7970513	SKA3	spindle and kinetochore associated complex subunit 3	1.57
7977046	TNFAIP2	tumor necrosis factor. alpha-induced protein 2	1.57
8029489	BCAM	basal cell adhesion molecule (Lutheran blood group)	1.57
7968274	PAN3	PAN3 poly(A) specific ribonuclease subunit homolog (yeast)	1.56
7970413	PSPC1	paraspeckle component 1	1.56
8081564	CD96	CD96 molecule	1.56
7970467	N6AMT2	N-6 adenine-specific DNA methyltransferase 2 (putative)	1.55
8174322	MORC4	MORC family CW-type zinc finger 4	1.55
7970793	SLC46A3	solute carrier family 46. member 3	1.55
8072876	LGALS1	lectin. galactoside-binding. soluble. 1	1.55
7969677	MBNL2	muscleblind-like 2 (Drosophila)	1.54
7970704	MTIF3	mitochondrial translational initiation factor 3	1.54
7898916	GRHL3	grainyhead-like 3 (Drosophila)	1.53
8160431	LOC554202	hypothetical LOC554202	1.53
7972297	ABCC4	ATP-binding cassette. sub-family C (CFTR/MRP). member 4	1.52
7972946	RASA3	RAS p21 protein activator 3	1.52
7967987	MRP63	mitochondrial ribosomal protein 63	1.52
8060997	SPTLC3	serine palmitoyltransferase. long chain base subunit 3	1.51
8118571	PSMB9	proteasome (prosome. macropain) subunit. beta type. 9 (large multifunctional peptidase 2)	1.50
7972713	EFNB2	ephrin-B2	1.50
8104201	EXOC3	exocyst complex component 3	1.50
8096335	HERC6	hect domain and RLD 6	1.49
8123678	C6orf145	chromosome 6 open reading frame 145	1.48
8109629	FABP6	fatty acid binding protein 6. ileal	1.48
7942957	PRSS23	protease. serine. 23	1.48
8101429	PLAC8	placenta-specific 8	1.48
8138708	HOXA1	homeobox A1	1.47
8104234	TRIP13	thyroid hormone receptor interactor 13	1.47
8131661	RPL21	ribosomal protein L21	1.46
8103226	TMEM154	transmembrane protein 154	1.46
7902553	IFI44	interferon-induced protein 44	1.46
7955694	IGFBP6	insulin-like growth factor binding protein 6	1.46
8060758	PRNP	prion protein	1.46
8122756	PLEKHG1	pleckstrin homology domain containing. family G (with RhoGef domain) member 1	1.46
8104298	NDUFS6	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 6. 13kDa (NADH-coenzyme Q reductase)	1.45
7967976	SAP18	Sin3A-associated protein. 18kDa	1.45
8165947	WWC3	WWC family member 3	1.45
7924144	RPL21P28	ribosomal protein L21 pseudogene 28	1.45
8149825	STC1	stanniocalcin 1	1.45
7970498	LATS2	LATS. large tumor suppressor. homolog 2 (Drosophila)	1.45
7983734	TMOD2	tropomodulin 2 (neuronal)	1.45
7936727	RPL21	ribosomal protein L21	1.45
8105191	PARP8	poly (ADP-ribose) polymerase family. member 8	1.45
8073062	APOBEC3B	apolipoprotein B mRNA editing enzyme. catalytic polypeptide-like 3B	1.44

Probe Set ID	Gene	Description	Fold change
8167965	MSN	moesin	1.44
7964907	PTPRR	protein tyrosine phosphatase. receptor type. R	1.44
8078619	ITGA9	integrin. alpha 9	1.43
8110755	SLC12A7	solute carrier family 12 (potassium/chloride transporters). member 7	1.43
8148184	FAM83A	family with sequence similarity 83. member A	1.43
8112121	SLC38A9	solute carrier family 38. member 9	1.42
8124707	TRIM31	tripartite motif-containing 31	1.42
8006836	FLJ43826	FLJ43826 protein	1.42
7929511	ENTPD1	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1	1.42
8109333	GPX3	glutathione peroxidase 3 (plasma)	1.42
8014316	CCL5	chemokine (C-C motif) ligand 5	1.42
8009243	C17orf60	chromosome 17 open reading frame 60	1.41
8135363	PIK3CG	phosphoinositide-3-kinase. catalytic. gamma polypeptide	1.41
7968226	RPL21	ribosomal protein L21	1.41
7954330	SLCO1B3	solute carrier organic anion transporter family. member 1B3	-10.9
8140984	HEPACAM2	HEPACAM family member 2	-10.58
7919067	REG4	regenerating islet-derived family. member 4	-5.72
8045736	FMNL2	formin-like 2	-5.48
8096461	ATOH1	atonal homolog 1 (Drosophila)	-5.40
7937560	MUC2	mucin 2. oligomeric mucus/gel-forming	-4.60
8133233	AUTS2	autism susceptibility candidate 2	-3.57
7926545	PLXDC2	plexin domain containing 2	-3.44
7902594	PRKACB	protein kinase. cAMP-dependent. catalytic. beta	-3.36
7937952	OR51E1	olfactory receptor. family 51. subfamily E. member 1	-3.31
8001394	TOX3	TOX high mobility group box family member 3	-3.17
7954344	LST-3TM12	organic anion transporter LST-3b	-3.17
8151795	CDH17	cadherin 17. LI cadherin (liver-intestine)	-3.14
8070567	TFF3	trefoil factor 3 (intestinal)	-3.04
8152719	ANXA13	annexin A13	-2.97
8117054	CAP2	CAP. adenylate cyclase-associated protein. 2 (yeast)	-2.93
8152522	ENPP2	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2	-2.85
8089394	RETNLB	resistin like beta	-2.82
8154779	SPINK4	serine peptidase inhibitor. Kazal type 4	-2.81
8056363	SLC38A11	solute carrier family 38. member 11	-2.79
8151423	JPH1	junctionophilin 1	-2.79
8094134	USP17L6P	ubiquitin specific peptidase 17-like 6 (pseudogene)	-2.79
8029098	CEACAM6	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (non-specific cross reacting antigen)	-2.68
8101862	ADH6	alcohol dehydrogenase 6 (class V)	-2.55
8101893	ADH1C	alcohol dehydrogenase 1C (class I). gamma polypeptide	-2.55
7927631	DKK1	dickkopf homolog 1 (Xenopus laevis)	-2.54
8154381	C9orf150	chromosome 9 open reading frame 150	-2.53
7925062	SIPA1L2	signal-induced proliferation-associated 1 like 2	-2.47
7951217	MMP7	matrix metalloproteinase 7 (matrilysin. uterine)	-2.42
7934083	NEUROG3	neurogenin 3	-2.34
8094130	USP17	ubiquitin specific peptidase 17	-2.27
8056222	DPP4	dipeptidyl-peptidase 4	-2.25
8029086	CEACAM5	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5	-2.24
8094122	USP17	ubiquitin specific peptidase 17	-2.24
8138381	AGR2	anterior gradient homolog 2 (Xenopus laevis)	-2.23
8092134	PLD1	phospholipase D1. phosphatidylcholine-specific	-2.22

Probe Set ID	Gene	Description	Fold change
8133860	GNAI1	guanine nucleotide binding protein (G protein). alpha inhibiting activity polypeptide 1	-2.16
8139640	DDC	dopa decarboxylase (aromatic L-amino acid decarboxylase)	-2.15
8048205	IGFBP2	insulin-like growth factor binding protein 2. 36kDa	-2.15
8047127	MYO1B	myosin IB	-2.14
7973084	ANG	angiogenin. ribonuclease. RNase A family. 5	-2.07
8146500	LYN	v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog	-2.06
8148059	DEPDC6	DEP domain containing 6	-2.06
8121649	RFX6	regulatory factor X. 6	-2.04
8150962	TOX	thymocyte selection-associated high mobility group box	-2.02
8023727	DSEL	dermatan sulfate epimerase-like	-2.02
8122334	CCRL1	chemokine (C-C motif) receptor-like 1	-2.00
7982854	DLL4	delta-like 4 (Drosophila)	-1.98
7980580	GALC	galactosylceramidase	-1.96
8095744	AREG	amphiregulin	-1.95
8059376	SERPINE2	serpin peptidase inhibitor. clade E (nexin. plasminogen activator inhibitor type 1). member 2	-1.94
7903592	KIAA1324	KIAA1324	-1.94
8028963	CYP2B6	cytochrome P450. family 2. subfamily B. polypeptide 6	-1.93
8095736	AREG	amphiregulin	-1.91
8045795	KCNJ3	potassium inwardly-rectifying channel. subfamily J. member 3	-1.91
7945991	OR51E2	olfactory receptor. family 51. subfamily E. member 2	-1.91
8036787	FCGBP	Fc fragment of IgG binding protein	-1.90
7985317	KIAA1199	KIAA1199	-1.89
8113504	C5orf13	chromosome 5 open reading frame 13	-1.88
8134030	STEAP1	six transmembrane epithelial antigen of the prostate 1	-1.86
8084524	EPHB3	EPH receptor B3	-1.83
8101757	GPRIN3	GPRIN family member 3	-1.82
7953252	GALNT8	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine	-1.82
8084717	ST6GAL1	ST6 beta-galactosamide alpha-2.6-sialyltransferase 1	-1.81
8060897	PLCB4	phospholipase C. beta 4	-1.81
8129497	EPB41L2	erythrocyte membrane protein band 4.1-like 2	-1.80
8084100	USP13	ubiquitin specific peptidase 13 (isopeptidase T-3)	-1.80
8099476	PROM1	prominin 1	-1.80
8041447	CRIM1	cysteine rich transmembrane BMP regulator 1 (chordin-like)	-1.78
7950810	SYTL2	synaptotagmin-like 2	-1.77
8018652	RNF157	ring finger protein 157	-1.77
8166925	MAOA	monoamine oxidase A	-1.76
8089011	PROS1	protein S (alpha)	-1.74
8147661	SPAG1	sperm associated antigen 1	-1.74
8139656	GRB10	growth factor receptor-bound protein 10	-1.74
7902023	RAVER2	ribonucleoprotein. PTB-binding 2	-1.73
8018774	ST6GALNAC1	ST6 (alpha-N-acetyl-neuraminyl-2.3-beta-galactosyl-1.3)	-1.72
8091103	TFDP2	transcription factor Dp-2 (E2F dimerization partner 2)	-1.70
8089015	PROS1	protein S (alpha)	-1.70
8071063	psiTPTE22	TPTE pseudogene	-1.69
8092726	CLDN1	claudin 1	-1.68
8041383	LTBP1	latent transforming growth factor beta binding protein 1	-1.66
7993815	ANKS4B	ankyrin repeat and sterile alpha motif domain containing 4B	-1.65
8134036	STEAP2	six transmembrane epithelial antigen of the prostate 2	-1.65
8037444	ZNF235	zinc finger protein 235	-1.64

Probe Set ID	Gene	Description	Fold change
8149241	USP17L2	ubiquitin specific peptidase 17-like 2	-1.64
8171161	ARSE	arylsulfatase E (chondrodysplasia punctata 1)	-1.64
8101260	ANTXR2	anthrax toxin receptor 2	-1.63
8113691	DTWD2	DTW domain containing 2	-1.63
8088919	ROBO1	roundabout. axon guidance receptor. homolog 1 (Drosophila)	-1.62
8140650	SEMA3E	sema domain. immunoglobulin domain (Ig). short basic domain. secreted. (semaphorin) 3E	-1.62
7933821	RHOBTB1	Rho-related BTB domain containing 1	-1.61
8072587	SLC5A1	solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter). member 1	-1.61
8142747	PAX4	paired box 4	-1.60
7927998	HKDC1	hexokinase domain containing 1	-1.60
7951593	C11orf92	chromosome 11 open reading frame 92	-1.60
8108251	NPY6R	neuropeptide Y receptor Y6 (pseudogene)	-1.60
8027748	FXYD3	FXYD domain containing ion transport regulator 3	-1.60
8022356	SPIRE1	spire homolog 1 (Drosophila)	-1.59
8129562	CTGF	connective tissue growth factor	-1.58
8090180	MUC13	mucin 13. cell surface associated	-1.58
8000346	ERN2	endoplasmic reticulum to nucleus signaling 2	-1.58
8150978	CA8	carbonic anhydrase VIII	-1.58
8115368	NMUR2	neuromedin U receptor 2	-1.57
8155673	PIP5K1B	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase. type I. beta	-1.56
8149356	USP17L2 // USP17L2	ubiquitin specific peptidase 17-like 2 // ubiquitin specific peptidase 17-like 2	-1.56
8107532	HSD17B4	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 4	-1.56
7930454	PDCD4	programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor)	-1.55
8103853	MGC45800	hypothetical LOC90768	-1.55
8084219	KLHL24	kelch-like 24 (Drosophila)	-1.55
7922029	GPA33	glycoprotein A33 (transmembrane)	-1.54
8029423	ZNF233	zinc finger protein 233	-1.53
8113790	O3-mars	membrane-associated ring finger (C3HC4) 3	-1.53
7961440	PLBD1	phospholipase B domain containing 1	-1.53
8144395	USP17L2 // USP17L2	ubiquitin specific peptidase 17-like 2 // ubiquitin specific peptidase 17-like 2	-1.52
8152703	FBXO32	F-box protein 32	-1.52
8075956	LGALS2	lectin. galactoside-binding. soluble. 2	-1.52
8103706	AADAT	aminoadipate aminotransferase	-1.52
7984079	TPM1	tropomyosin 1 (alpha)	-1.52
8038735	KLK11	kallikrein-related peptidase 11	-1.51
8145293	ADAM28	ADAM metallopeptidase domain 28	-1.51
8169504	SLC6A14	solute carrier family 6 (amino acid transporter). member 14	-1.50
8134680	ZKSCAN1	zinc finger with KRAB and SCAN domains 1	-1.49
7975136	FUT8	fucosyltransferase 8 (alpha (1.6) fucosyltransferase)	-1.49
8151223	SLCO5A1	solute carrier organic anion transporter family. member 5A1	-1.49
8143564	FAM131B	family with sequence similarity 131. member B	-1.48
8149243	USP17L2 // USP17L2	ubiquitin specific peptidase 17-like 2 // ubiquitin specific peptidase 17-like 2	-1.48
8102587	C4orf31	chromosome 4 open reading frame 31	-1.48
8123695	PECI	peroxisomal D3.D2-enoyl-CoA isomerase	-1.48
8167482	GAGE12C	G antigen 12C	-1.48
8143307	HIPK2	homeodomain interacting protein kinase 2	-1.48
8098441	ODZ3	odz. odd Oz/ten-m homolog 3 (Drosophila)	-1.48

Probe Set ID	Gene	Description	Fold change
7938702	DKFZp686O24166	hypothetical protein DKFZp686O24166	-1.48
8095585	SLC4A4	solute carrier family 4. sodium bicarbonate cotransporter. member 4	-1.47
8145611	FZD3	frizzled homolog 3 (Drosophila)	-1.47
8167584	GAGE12G	G antigen 12G	-1.46
8167508	GAGE12J	G antigen 12J	-1.46
8142585	CADPS2	Ca ⁺⁺ -dependent secretion activator 2	-1.45
8160521	MOBKL2B	MOB1. Mps One Binder kinase activator-like 2B (yeast)	-1.45
8096160	ARHGAP24	Rho GTPase activating protein 24	-1.45
8041727	SLC3A1	solute carrier family 3	-1.44
8167526	GAGE12J	G antigen 12J	-1.44
8103951	ACSL1	acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	-1.44
8095456	ODAM	odontogenic. ameloblast associated	-1.43
8151890	TP53INP1	tumor protein p53 inducible nuclear protein 1	-1.43
8055465	CXCR4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	-1.43
8081710	SIDT1	SID1 transmembrane family. member 1	-1.43
8029399	ZNF226	zinc finger protein 226	-1.43
8106709	ATG10	ATG10 autophagy related 10 homolog (yeast)	-1.42
7903144	SLC44A3	solute carrier family 44. member 3	-1.42
8029392	ZNF234	zinc finger protein 234	-1.42
7984704	NEO1	neogenin homolog 1 (chicken)	-1.42
7907702	SOAT1	sterol O-acyltransferase 1	-1.42
8081488	HHLA2	HERV-H LTR-associating 2	-1.41
7958262	TCP11L2	t-complex 11 (mouse)-like 2	-1.41

Tableau 3 : Liste des gènes modulés dans une marge de $-1.5 < x < 1.5$ fois par puce Affimetrix dans des cellules HT29LM α 1 comparées à des cellules HT29 contrôle. **, $p < 0.01$, Student's t-test)

Ensembl accession number	Gene	Description	Fold change
ENSMUSG00000032796	Lama1	laminin α 1	116.00
ENSMUSG00000078763	Slfn1	schlafen 1 c	33.40
ENSMUSG00000061718	Ppp1r1b	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 1B	16.50
ENSMUSG00000027014	Cwc22	CWC22 spliceosome-associated protein homolog (yeast)	12.50
ENSMUSG00000040901	Kcnk18	Potassium channel subfamily K member 18	9.39
ENSMUSG00000037130	H2-M10.6	histocompatibility 2, M region locus 10.6	3.78
ENSMUSG00000025491	Ifitm1	Interferon-induced transmembrane protein 1	3.37
ENSMUSG00000037246	H2-M10.5	histocompatibility 2, M region locus 10.5	3.15
ENSMUSG00000027398	Il1 β	interleukin 1 β	3.13
ENSMUSG00000026204	Ptprn	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase-like N	2.99
ENSMUSG00000053835	H2-T24	histocompatibility 2, T region locus 24	2.58
ENSMUSG00000021250	Fos	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	2.53
ENSMUSG00000026475	Rgs16	regulator of G-protein signaling 16	2.49
ENSMUSG00000032846	Zswim6	zinc finger, SWIM-type containing 6.	2.47
ENSMUSG00000037411	Serpine1	serine protease inhibitor (serpin) protein	2.36
ENSMUSG00000091705	H2-Q2	histocompatibility 2, Q region locus 2	2.35
ENSMUSG00000021994	Wnt5a	wingless-type MMTV integration site family, member 5A.	2.32
ENSMUSG00000007888	Crlf1	Cytokine receptor-like factor 1	2.02
ENSMUSG00000020427	Igfbp3	Insulin-like growth factor-binding protein 3	2.00
ENSMUSG00000071003	Ccl21a	Ccl21a chemokine (C-C motif) ligand 21A	-37.09
ENSMUSG00000078739	Gm1987	Predicted gene 1987	-36.17
ENSMUSG00000030785	Cox6a2	cytochrome c oxidase subunit VIa polypeptide 2.	-13.61
ENSMUSG00000007877	Tcap	titin-cap (telethonin)	-10.12
ENSMUSG00000024471	Myot	myofibrillar titin-like Ig domains protein	9.01
ENSMUSG00000040694	Apobec2	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 2	-7.36
ENSMUSG00000016349	Eef1a2	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2	-7.05
ENSMUSG00000037974	Muc5ac	mucin 5AC, oligomeric mucus/gel-forming	-6.82
ENSMUSG00000030672	Mylpf	fast skeletal myosin light chain 2; myosin light chain	-6.65
ENSMUSG00000051747	Ttn	connectin	-6.25
ENSMUSG00000027470	Mylk2	myosin light chain kinase 2	-5.89
ENSMUSG00000061816	Myl1	myosin, light polypeptide 1	-5.71
ENSMUSG00000033196	Myh2	myosin, heavy polypeptide 2	-5.44
ENSMUSG00000049134	Nrap	nebulin-related anchoring protein	-4.65
ENSMUSG00000022519	Srl	sarcalumenin	-4.53
ENSMUSG00000036854	Hspb6	heat shock protein, alpha-crystallin-related, B6	-3.96
ENSMUSG00000021798	Ldb3	LIM domain binding 3	-3.47
ENSMUSG00000031461	Myom2	myomesin 2	-3.30
ENSMUSG00000078776	9530053A07Rik	Rikken	-2.48
ENSMUSG00000027533	Fabp5	fatty acid binding protein 5	-2.24
ENSMUSG00000029816	Gpnmb	transmembrane glycoprotein nmb	-1.93

Tableau 4 : Expression relative par RNAseq de différents gènes murins dans les tumeurs HT29LM α 1 comparées aux tumeurs contrôles. **, $p < 0.01$, Student's t-test

IV. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Ce travail montre pour la première fois que la chaîne $\alpha 1$ (LM $\alpha 1$) a un impact positif sur la voie de signalisation Notch *in vivo* dans un contexte tumoral, en modulant différemment l'expression du VEGFA, de Dll4 et des gènes cibles de ce dernier Hey1 et Hey2, spécifiquement dans le stroma tumoral. *In vivo*, la surexpression de la LM $\alpha 1$ stimule l'incidence tumorale et la prolifération des cellules cancéreuses. Il est important de noter que la LM111 n'a pas d'effet *in vitro* sur la prolifération des cellules cancéreuses coliques (De Arcangelis et al., 2001; Turck et al., 2005). Cela suggère que la LM $\alpha 1$, pour agir sur la prolifération des cellules cancéreuses, doit stimuler la production de facteurs de croissance provenant probablement des cellules stromales, comme les fibroblastes ou les cellules endothéliales. La LM111 agit comme une molécule chémo-attractante sur les fibroblastes associés au cancer (CAF) et stimule de façon directe le VEGFA dans ces mêmes cellules. Plusieurs données de la littérature décrivent que la présence de fibroblastes dans des cultures de cellules cancéreuses impacte positivement la prolifération et l'invasion de ces cellules (Sadlonova et al., 2005; Olsen et al., 2010). Une étude récente a montré que le VEGFA produit par les CAF est un facteur de survie pour les cellules cancéreuses métastatiques (O'Connell et al., 2011). De plus, le VEGFA issu des fibroblastes de carcinomes gastriques accélère par la suite le processus d'angiogenèse (Guo et al., 2008). Il est également possible que le VEGFA stimulé par la LM $\alpha 1$ au niveau des CAF, puisse agir sur la prolifération et la survie des cellules cancéreuses.

Il serait intéressant de savoir si la LM $\alpha 1$ peut interagir physiquement avec le VEGFA, via les domaines de liaison à l'héparine présents au niveau des domaines LN (Ettner et al., 1998) et LG5 (Harrison et al., 2007) de la LM $\alpha 1$. Les données préliminaires suggèrent que c'est effectivement le cas en utilisant une approche Biacore (données non publiées, Drs Gérard Crémel, Olivier Lefebvre). La liaison du VEGFA à la LM $\alpha 1$ pourrait ainsi constituer un réservoir pour le gradient de VEGFA, qui est important dans la mise en place de nouveaux vaisseaux sanguins (Gerhardt et al., 2003; Shamloo et al., 2012). Le Dll4 est décrit comme le stimulateur de la croissance tumorale et de la maturation des vaisseaux (Li et al., 2007). La croissance tumorale stimulée par la LM $\alpha 1$ est corrélée à l'expression du Dll4. L'analyse sur les tumeurs primaires coliques montre également une corrélation entre LM $\alpha 1$ et Dll4. L'ensemble de ces résultats renforce l'idée que la LM $\alpha 1$ pourrait accélérer le processus de la tumorigenèse via le Dll4.

Dans l'angiogenèse rétinienne, le gradient du VEGFA est à l'origine de l'induction de Dll4 dans des cellules « tip », aboutissant à l'activation de la voie Notch dans la cellule voisine « stalk » (Benedito et al., 2009). Nos données ainsi que celles de la littérature, montrent que le VEGFA, comme la LM111, est capable de stimuler Dll4 dans des cellules endothéliales. Par contre le traitement des CAF par le VEGFA ne module pas l'expression de Dll4. Donc la stimulation de Dll4 par la LM111 dans des CAF est directe, via un mécanisme qui reste à déterminer mais dont on peut supposer qu'il fasse intervenir des intégrines, comme cela a été montré pour l'induction de Dll4 dans les cellules endothéliales (Estrach et al., 2011). A l'opposé, l'activation de la voie Notch n'a lieu que dans des cellules endothéliales. On peut supposer une possible liaison entre le ligand Dll4 fibroblastique et un récepteur Notch endothélial, suite à un « *cross-talk* » entre fibroblastes et cellules endothéliales.

Si l'action de Dll4 sur l'angiogenèse aussi bien tumorale que physiologique est bien documentée, sa régulation est néanmoins sujette à controverse. Jusqu'à récemment, le modèle suggérait que Dll4 était induit suite à l'interaction de VEGFA avec VEGFR2 (Suchting et al., 2007). Il vient d'être montré que l'axe VEGFA/VEGFR2 ne stimulait que très peu Dll4, et que de ce fait le réel stimulateur de Dll4 était encore à rechercher (Benedito et al., 2012). Nos données, ainsi que celles de la littérature (Estrach et al., 2011), indiquent que dans un contexte physiologique et tumoral, la LM α 1 pourrait être un candidat possible.

L'origine des cellules péricyaires au sein des tumeurs surexprimant la LM α 1 reste encore inconnue. Les péricytes partagent certaines caractéristiques avec les cellules gliales, en particulier d'expression de NG2, un protéoglycane membranaire, qui permet l'interaction des péricytes avec les cellules endothéliales et dont l'absence entraîne un déficit en vaisseaux sanguins tumoraux (Gibby et al., 2012). Il a été montré que la LM111, qui peut lier le NG2 (Burg et al., 1996) est une molécule de guidage pour les axones des neurones et les cellules gliales (cellules de Müller) (Méhes et al., 2002; Randlett et al., 2011). On peut émettre l'hypothèse que la LM111 pourrait être chémo-attractante pour les péricytes comme elle l'est pour les CAF. De plus, la LM111 est capable de stimuler Dll4 dans les CAF. Des données de la littérature montrent que l'expression de Dll4 dans des précurseurs mésenchymateux permet leur différenciation en péricytes (Schadler et al., 2010; Stewart et al., 2011) On peut supposer que certains CAF exprimant Dll4 puissent eux aussi se trans-différencier en péricytes. A noter que de plus en plus, les données montrent une très grande plasticité cellulaire au

sein d'une tumeur, avec des cellules endothéliales pouvant se trans-différencier en CAF (Zeisberg et al., 2007), mais également des cellules tumorales en cellules endothéliales (Wang et al., 2010). Ces travaux suggèrent que l'identité cellulaire au sein d'une tumeur est loin d'être constante, expliquant ainsi pourquoi les innovations thérapeutiques anti-cancéreuses sont parfois décevantes une fois appliquées aux patients.

Il est intéressant de voir que l'expression de RGS5 (une protéine régulatrice des protéines G), également considéré comme un marqueur des péricytes (Mitchell et al., 2008), augmente dans les tumeurs HT29LM α 1. Ceci confirme, une fois encore, le rôle de la LM α 1 sur la stimulation du recrutement des péricytes. Au cours de l'angiogenèse, le recrutement des péricytes permet la maturation des vaisseaux sanguins en régulant la prolifération des cellules endothéliales et la circulation sanguine et les rend potentiellement fonctionnels (Kutcher and Herman, 2009). Le recrutement des péricytes durant l'assemblage des tubes vasculaires est connu pour son action stimulatrice sur la formation de la lame basale vasculaire, notamment l'expression de la LM α 4 composant du trimère LM411 (Stratman et al., 2009). Ceci est consistant avec nos données, issues des modèles perte et gain de fonction, démontrant la corrélation entre la LM α 1 et la stimulation et /ou l'inhibition de la LM α 4. L'ensemble de ces données suggèrent l'impact positif de la LM α 1 sur la maturation des vaisseaux sanguins.

Différents éléments de la littérature suggèrent que les traitements anti-angiogéniques peuvent aboutir à une augmentation de l'invasion tumorale, par l'induction d'une hypoxie et la stimulation de la voie HIF-1 (Hypoxia-inducible factor1) (Semenza, 2010). De plus à l'arrêt des traitements anti-angiogéniques, l'arbre vasculaire peut rapidement se reformer, car les cellules endothéliales vont pouvoir utiliser la lame basale vasculaire, toujours présente, pour migrer et recoloniser la tumeur (Mancuso et al., 2006; Kucera and Lammert, 2009). Une thérapie visant à réduire et/ou à détruire la lame basale endothéliale des tumeurs serait à envisager pour tenter de limiter une repousse tumorale, sans pour autant toucher celle des vaisseaux sanguins des tissus sains. Il faudrait pour cela trouver une cible spécifique de cette lame basale, molécule qui n'est pas connue pour le moment.

Dans notre modèle de perte de fonction de la LM α 1, nous observons une diminution de l'expression de Dll4 au niveau de la rétine. Il est tout à fait remarquable de voir qu'une seule mutation ponctuelle au niveau du domaine LN de la LM α 1, bien que n'altérant pas dramatiquement la lame basale limitante interne de la rétine, entraîne également une diminution de l'expression de Dll4 et de ses

gènes cibles. Le domaine LN peut interagir avec différents récepteurs comme les intégrines $\alpha 1\beta 1$ et $\alpha 2\beta 1$, présents sur les cellules endothéliales. Cela incite à penser que ce domaine LN pourrait être crucial à la stimulation de la voie Notch par la LM α 1.

Dans le cancer d'origine épithéliale, la transition d'un carcinome *in situ* à un carcinome invasif se caractérise avec le franchissement de la lame basale par les cellules cancéreuses, qui vont alors envahir le tissu conjonctif sous-jacent. Ce passage peut se faire via l'action de métalloprotéases (MMP) et d'endoprotéases (Massova et al., 1998), décrites comme surexprimées dans des tumeurs invasives (Seftor et al., 2001) et qui peuvent cliver certains composants clés de cette lame basale que sont les laminines et le collagène IV (Egeblad and Werb, 2002). Dans nos études, l'utilisation de différents anticorps reconnaissant différents domaines de la LM α 1, a montré que les deux parties NH₂ et COOH de la LM α 1 étaient présentes dans des tumeurs coliques suggérant qu'une LM α 1 intacte serait potentiellement toujours là.

D'une façon intéressante, parmi les différentes MMP analysées, seule la MMP9 est stimulée par la présence de la LM α 1 dans les tumeurs HT29. Cela renforce le rôle positif de la LM α 1 sur la voie Notch, car il a été montré que le récepteur Notch est capable d'agir en aval du VEGFA afin de réguler la morphogenèse des cellules endothéliales en activant la MMP9 (Funahashi et al., 2011).

Au niveau des tumeurs HT29LM α 1, l'expression de l'IGFBP3 est également élevée. Les données de la littérature sur l'impact de l'IGFBP3 dans l'angiogenèse sont controversées, car certaines indiquent son rôle pro-angiogénique (Granata et al., 2007), et d'autres son rôle anti-angiogénique (Kim et al., 2011). Comme le Dll4, l'IGFBP3 est décrit comme étant stimulé par l'hypoxie (Diez et al., 2007) et dans la rétine, son expression est souvent confinée à la cellule « tip », qui exprime le Dll4 (Lofqvist et al., 2007).

Lors de l'étude Affymetrix sur les cellules HT29 en culture, la Matrix GLA protein (MGP) s'est révélée étant un gène candidat intéressant au point de vu de son rôle angiogénique. Notre étude montre que la MGP est surexprimée dans le compartiment des cellules cancéreuses des tumeurs HT29LM α 1 et pas dans le stroma tumoral. Ce gène est également surexprimé dans les tumeurs coliques V-LM α 1. La MGP, est une protéine de la matrice extracellulaire, qui est surexprimée dans une grande variété de cancers humains, y compris le cancer cérébral, de l'ovaire, du sein et de l'appareil urogénital (Chen et al., 1990, 2003; Levedakou et al., 1992; Mertsch et al., 2009). Récemment il a été montré dans un modèle de xélogreffe de cellules de glioblastome multiforme, que la MGP stimulait

l'angiogenèse (Kuzontkoski et al., 2010). Une autre étude montre que le traitement des cellules endothéliales avec la protéine purifiée MGP, induit l'expression du VEGFA d'une manière dépendante du TGF β en activant la voie Smad1/5 (Boström et al., 2004). En tenant compte de l'ensemble de ces données démontrant le rôle de la MGP dans l'angiogenèse, il sera très intéressant d'approfondir la possible implication de la MGP dans les mécanismes d'action de la LM α 1 sur l'angiogenèse tumorale. Au vu des interactions connues entre les voies Wnt et Notch, le gène candidat *Wnt5A* apparaît également intéressant. En effet, une étude a montré l'augmentation de son expression dans des fibroblastes, corrélée à l'angiogenèse (Lilly and Kennard, 2009).

V. CONCLUSION GENERALE

Mes travaux présentés ici ont permis de montrer pour la première fois dans le modèle murin de cancer colorectal le rôle clef de la LM α 1 qui possède un effet stimulateur sur la prolifération cellulaire, l'angiogenèse tumorale et la maturation des vaisseaux. Ces données montrent également pour la première fois que le gain de fonction de la LM α 1 impacte d'une façon positive la voie Notch *in vivo*, en modulant l'expression du VEGFA et du ligand Dll4 et les gènes cibles de ce dernier, Hey1 et Hey2 dans le stroma tumoral. Au contraire, sa perte de fonction module négativement la voie Notch dans l'angiogenèse physiologique rétinienne.

De plus, j'ai pu montrer que ces données sont probablement transposables chez l'homme au niveau des cancers colorectaux. La LM α 1 semble pouvoir constituer une cible thérapeutique potentielle pour le blocage de l'angiogenèse tumorale. Dans cette perspective, les modèles de gain et perte de fonction de la LM α 1 utilisés au cours de cette étude pourront représenter des modèles pré-cliniques afin d'évaluer l'efficacité de nouveaux agents thérapeutiques ciblant ou bloquant la LM α 1 et les voies de signalisation sous-jacentes pour inhiber l'angiogenèse.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-A-

Abbott, N.J. (2002). Astrocyte–endothelial interactions and blood–brain barrier permeability*. *Journal of Anatomy* 200, 629–638.

Adams, R.H., Wilkinson, G.A., Weiss, C., Diella, F., Gale, N.W., Deutsch, U., Risau, W., and Klein, R. (1999). Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis. *Genes Dev.* 13, 295–306.

Agrawal, S., Anderson, P., Durbeej, M., van Rooijen, N., Ivars, F., Opdenakker, G., and Sorokin, L.M. (2006). Dystroglycan is selectively cleaved at the parenchymal basement membrane at sites of leukocyte extravasation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 203, 1007–1019.

Aiello, L.P., Avery, R.L., Arrigg, P.G., Keyt, B.A., Jampel, H.D., Shah, S.T., Pasquale, L.R., Thieme, H., Iwamoto, M.A., and Park, J.E. (1994). Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N. Engl. J. Med.* 331, 1480–1487.

Allamand, V., Sunada, Y., Salih, M.A., Straub, V., Ozo, C.O., Al-Turaiki, M.H., Akbar, M., Kolo, T., Colognato, H., Zhang, X., et al. (1997). Mild congenital muscular dystrophy in two patients with an internally deleted laminin alpha2-chain. *Hum. Mol. Genet.* 6, 747–752.

Alpy, F., Jivkov, I., Sorokin, L., Klein, A., Arnold, C., Huss, Y., Keding, M., Simon-Assmann, P., and Lefebvre, O. (2005). Generation of a conditionally null allele of the laminin alpha1 gene. *Genesis* 43, 59–70.

Amit, S., Hatzubai, A., Birman, Y., Andersen, J.S., Ben-Shushan, E., Mann, M., Ben-Neriah, Y., and Alkalay, I. (2002). Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Dev.* 16, 1066–1076.

Ancsin, J.B., and Kisilevsky, R. (1996). Laminin interactions important for basement membrane assembly are promoted by zinc and implicate laminin zinc finger-like sequences. *J. Biol. Chem.* 271, 6845–6851.

Annaert, W., and De Strooper, B. (1999). Presenilins: molecular switches between proteolysis and signal transduction. *Trends Neurosci.* 22, 439–443.

Anthony, F.W., Wheeler, T., Elcock, C.L., Pickett, M., and Thomas, E.J. (1994). Short report: identification of a specific pattern of vascular endothelial growth factor mRNA expression in human placenta and cultured placental fibroblasts. *Placenta* 15, 557–561.

Arentz, G., Chataway, T., Price, T.J., Izwan, Z., Hardi, G., Cummins, A.G., and Hardingham, J.E. (2011). Desmin expression in colorectal cancer stroma correlates with advanced stage disease and marks angiogenic microvessels. *Clin Proteomics* 8, 16.

Arikawa-Hirasawa, E., Watanabe, H., Takami, H., Hassell, J.R., and Yamada, Y. (1999). Perlecan is essential for cartilage and cephalic development. *Nat. Genet.* 23, 354–358.

Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D., and Lake, R.J. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284, 770–776.

Aumailley, M., Bruckner-Tuderman, L., Carter, W.G., Deutzmann, R., Edgar, D., Ekblom, P., Engel, J., Engvall, E., Hohenester, E., Jones, J.C.R., et al. (2005). A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol.*

24, 326–332.

Avraamides, C.J., Garmy-Susini, B., and Varnier, J.A. (2008). Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 8, 604–617.

-B-

Baba, Y., Noshro, K., Shima, K., Huttenhower, C., Tanaka, N., Hazra, A., Giovannucci, E.L., Fuchs, C.S., and Ogino, S. (2010). Hypomethylation of the IGF2 DMR in colorectal tumors, detected by bisulfite pyrosequencing, is associated with poor prognosis. *Gastroenterology* 139, 1855–1864.

Bader, B.L., Smyth, N., Nedbal, S., Miosge, N., Baranowsky, A., Mokkalapati, S., Murshed, M., and Nischt, R. (2005). Compound genetic ablation of nidogen 1 and 2 causes basement membrane defects and perinatal lethality in mice. *Mol. Cell. Biol.* 25, 6846–6856.

Baker, S.J., Fearon, E.R., Nigro, J.M., Hamilton, S.R., Preisinger, A.C., Jessup, J.M., vanTuinen, P., Ledbetter, D.H., Barker, D.F., Nakamura, Y., et al. (1989). Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 244, 217–221.

Balmain, A. (2001). Cancer genetics: from Boveri and Mendel to microarrays. *Nat. Rev. Cancer* 1, 77–82.

Baron, M. (2003). An overview of the Notch signalling pathway. *Semin. Cell Dev. Biol.* 14, 113–119.

Belperio, J.A., Keane, M.P., Arenberg, D.A., Addison, C.L., Ehlert, J.E., Burdick, M.D., and Strieter, R.M. (2000). CXC chemokines in angiogenesis. *J. Leukoc. Biol.* 68, 1–8.

Benedito, R., Roca, C., Sörensen, I., Adams, S., Gossler, A., Fruttiger, M., and Adams, R.H. (2009). The notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis. *Cell* 137, 1124–1135.

Benedito, R., Rocha, S.F., Woeste, M., Zamykal, M., Radtke, F., Casanovas, O., Duarte, A., Pytowski, B., and Adams, R.H. (2012). Notch-dependent VEGFR3 upregulation allows angiogenesis without VEGF-VEGFR2 signalling. *Nature* 484, 110–114.

Bergers, G., and Benjamin, L.E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer* 3, 401–410.

Bernabeu, C., Conley, B.A., and Vary, C.P.H. (2007). Novel biochemical pathways of endoglin in vascular cell physiology. *J. Cell. Biochem.* 102, 1375–1388.

Betsholtz, C. (2004). Insight into the physiological functions of PDGF through genetic studies in mice. *Cytokine Growth Factor Rev.* 15, 215–228.

Betsholtz, C., Lindblom, P., and Gerhardt, H. (2005). Role of pericytes in vascular morphogenesis. *EXS* 115–125.

Bettenhausen, B., Hrabě de Angelis, M., Simon, D., Guénet, J.L., and Gossler, A. (1995). Transient and restricted expression during mouse embryogenesis of Dll1, a murine gene closely related to *Drosophila* Delta. *Development* 121, 2407–2418.

Blaumueller, C.M., and Artavanis-Tsakonas, S. (1997). Comparative aspects of Notch signaling in lower and higher eukaryotes. *Perspect Dev Neurobiol* 4, 325–343.

Bloch, W., Huggel, K., Sasaki, T., Grose, R., Bugnon, P., Addicks, K., Timpl, R., and Werner, S. (2000). The angiogenesis inhibitor endostatin impairs blood vessel maturation during wound healing. *FASEB J.* 14, 2373–2376.

- Bos, J.L. (1989). *ras* oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 49, 4682–4689.
- Boström, K., Zebboudj, A.F., Yao, Y., Lin, T.S., and Torres, A. (2004). Matrix GLA protein stimulates VEGF expression through increased transforming growth factor-beta1 activity in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 279, 52904–52913.
- Bray, S.J. (2006). Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 678–689.
- Bronner, C.E., Baker, S.M., Morrison, P.T., Warren, G., Smith, L.G., Lescoe, M.K., Kane, M., Earabino, C., Lipford, J., and Lindblom, A. (1994). Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* 368, 258–261.
- Brooks, P.C., Clark, R.A., and Cheresh, D.A. (1994). Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science* 264, 569–571.
- Brou, C. (2009). Intracellular trafficking of Notch receptors and ligands. *Exp. Cell Res.* 315, 1549–1555.
- Broxmeyer, H.E., Cooper, S., Li, Z.H., Lu, L., Song, H.Y., Kwon, B.S., Warren, R.E., and Donner, D.B. (1995). Myeloid progenitor cell regulatory effects of vascular endothelial cell growth factor. *Int. J. Hematol.* 62, 203–215.
- Burg, M.A., Tillet, E., Timpl, R., and Stallcup, W.B. (1996). Binding of the NG2 proteoglycan to type VI collagen and other extracellular matrix molecules. *J. Biol. Chem.* 271, 26110–26116.
- Burri, P.H., and Djonov, V. (2002). Intussusceptive angiogenesis--the alternative to capillary sprouting. *Mol. Aspects Med.* 23, S1–27.
- Burri, P.H., Hlushchuk, R., and Djonov, V. (2004). Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance. *Dev. Dyn.* 231, 474–488.
- Burri, P.H., and Tarek, M.R. (1990). A novel mechanism of capillary growth in the rat pulmonary microcirculation. *Anat. Rec.* 228, 35–45.

-C-

- Caduff, J.H., Fischer, L.C., and Burri, P.H. (1986). Scanning electron microscope study of the developing microvasculature in the postnatal rat lung. *Anat. Rec.* 216, 154–164.
- Campbell, M.A., and Chader, G.J. (1988). Effects of laminin on attachment, growth and differentiation of cultured Y-79 retinoblastoma cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 29, 1517–1522.
- Carmeliet, P. (2000a). Fibroblast growth factor-1 stimulates branching and survival of myocardial arteries: a goal for therapeutic angiogenesis? *Circ. Res.* 87, 176–178.
- Carmeliet, P. (2000b). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Med.* 6, 389–395.
- Carmeliet, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nat. Med.* 9, 653–660.
- Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoek, A., Harpal, K., Eberhardt, C., et al. (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380, 435–439.
- Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249–257.

- Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473, 298–307.
- Castets, M., and Mehlen, P. (2010). Netrin-1 role in angiogenesis: To be or not to be a pro-angiogenic factor? *Cell Cycle* 9,.
- Cao, Y., Zhang, Z.-L., Zhou, M., Elson, P., Rini, B., Aydin, H., Feenstra, K., Tan, M.-H., Berghuis, B., Tabbey, R., et al. (2012). Pericyte coverage of differentiated vessels inside tumor vasculature is an independent unfavorable prognostic factor for patients with clear cell renal cell carcinoma. *Cancer*.
- Cébe-Suarez, S., Zehnder-Fjällman, A., and Ballmer-Hofer, K. (2006). The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 601–615.
- Chang, C.-P., Neilson, J.R., Bayle, J.H., Gestwicki, J.E., Kuo, A., Stankunas, K., Graef, I.A., and Crabtree, G.R. (2004). A field of myocardial-endocardial NFAT signaling underlies heart valve morphogenesis. *Cell* 118, 649–663.
- Chao, A., Thun, M.J., Connell, C.J., McCullough, M.L., Jacobs, E.J., Flanders, W.D., Rodriguez, C., Sinha, R., and Calle, E.E. (2005). Meat consumption and risk of colorectal cancer. *JAMA* 293, 172–182.
- Chen, L., O'Bryan, J.P., Smith, H.S., and Liu, E. (1990). Overexpression of matrix Gla protein mRNA in malignant human breast cells: isolation by differential cDNA hybridization. *Oncogene* 5, 1391–1395.
- Chen, Y., Miller, C., Mosher, R., Zhao, X., Deeds, J., Morrissey, M., Bryant, B., Yang, D., Meyer, R., Cronin, F., et al. (2003). Identification of cervical cancer markers by cDNA and tissue microarrays. *Cancer Res.* 63, 1927–1935.
- Cheng, Y.S., Champlaud, M.F., Burgeson, R.E., Marinkovich, M.P., and Yurchenco, P.D. (1997). Self-assembly of laminin isoforms. *J. Biol. Chem.* 272, 31525–31532.
- Cho, K.R., and Vogelstein, B. (1992). Genetic alterations in the adenoma–carcinoma sequence. *Cancer* 70, 1727–1731.
- Claesson-Welsh, L. (2003). Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 20–24.
- Claffey, K.P., Senger, D.R., and Spiegelman, B.M. (1995). Structural requirements for dimerization, glycosylation, secretion, and biological function of VPF/VEGF. *Biochim. Biophys. Acta* 1246, 1–9.
- Clauss, M., Gerlach, M., Gerlach, H., Brett, J., Wang, F., Familletti, P.C., Pan, Y.C., Olander, J.V., Connolly, D.T., and Stern, D. (1990). Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J. Exp. Med.* 172, 1535–1545.
- Cleaver, O., and Melton, D.A. (2003). Endothelial signaling during development. *Nat. Med.* 9, 661–668.
- Colnot, S., Niwa-Kawakita, M., Hamard, G., Godard, C., Le Plenier, S., Houbron, C., Romagnolo, B., Berrebi, D., Giovannini, M., and Perret, C. (2004). Colorectal cancers in a new mouse model of familial adenomatous polyposis: influence of genetic and environmental modifiers. *Lab. Invest.* 84, 1619–1630.
- Conlin, A., Smith, G., Carey, F.A., Wolf, C.R., and Steele, R.J.C. (2005). The prognostic significance of K-ras, p53, and APC mutations in colorectal carcinoma. *Gut* 54, 1283–1286.
- Cooper, A.R., and MacQueen, H.A. (1983). Subunits of laminin are differentially synthesized in mouse eggs and early embryos. *Dev. Biol.* 96, 467–471.
- Costell, M., Gustafsson, E., Aszódi, A., Mörgelin, M., Bloch, W., Hunziker, E., Addicks, K., Timpl, R.,

and Fässler, R. (1999). Perlecan maintains the integrity of cartilage and some basement membranes. *J. Cell Biol.* 147, 1109–1122.

Couffinhal, T., Dufourcq, P., Daret, D., and Duplaà, C. (2001). [The mechanisms of angiogenesis. Medical and therapeutic applications]. *Rev Med Interne* 22, 1064–1082.

Cross, M.J., Dixelius, J., Matsumoto, T., and Claesson-Welsh, L. (2003). VEGF-receptor signal transduction. *Trends Biochem. Sci.* 28, 488–494.

-D-

Darland, D.C., Massingham, L.J., Smith, S.R., Piek, E., Saint-Geniez, M., and D'Amore, P.A. (2003). Pericyte production of cell-associated VEGF is differentiation-dependent and is associated with endothelial survival. *Dev. Biol.* 264, 275–288.

De, S., Razorenova, O., McCabe, N.P., O'Toole, T., Qin, J., and Byzova, T.V. (2005). VEGF-integrin interplay controls tumor growth and vascularization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 7589–7594.

De Arcangelis, A., Lefebvre, O., Méchine-Neuville, A., Arnold, C., Klein, A., Rémy, L., Kedinger, M., and Simon-Assmann, P. (2001). Overexpression of laminin alpha1 chain in colonic cancer cells induces an increase in tumor growth. *Int. J. Cancer* 94, 44–53.

Delattre, O., Olschwang, S., Law, D.J., Melot, T., Remvikos, Y., Salmon, R.J., Sastre, X., Validire, P., Feinberg, A.P., and Thomas, G. (1989). Multiple genetic alterations in distal and proximal colorectal cancer. *Lancet* 2, 353–356.

De Robertis, M., Massi, E., Poeta, M.L., Carotti, S., Morini, S., Cecchetelli, L., Signori, E., and Fazio, V.M. (2011). The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies. *J. Carcinog* 10, 9.

Detmar, M., Yeo, K.T., Nagy, J.A., Van de Water, L., Brown, L.F., Berse, B., Elicker, B.M., Ledbetter, S., and Dvorak, H.F. (1995). Keratinocyte-derived vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) is a potent mitogen for dermal microvascular endothelial cells. *J. Invest. Dermatol.* 105, 44–50.

Dibbens, J.A., Miller, D.L., Damert, A., Risau, W., Vadas, M.A., and Goodall, G.J. (1999). Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor mRNA stability requires the cooperation of multiple RNA elements. *Mol. Biol. Cell* 10, 907–919.

Diez, H., Fischer, A., Winkler, A., Hu, C.-J., Hatzopoulos, A.K., Breier, G., and Gessler, M. (2007). Hypoxia-mediated activation of Dll4-Notch-Hey2 signaling in endothelial progenitor cells and adoption of arterial cell fate. *Exp. Cell Res.* 313, 1–9.

Djonov, V., Baum, O., and Burri, P.H. (2003). Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis. *Cell Tissue Res.* 314, 107–117.

Domenga, V., Fardoux, P., Lacombe, P., Monet, M., Maciazek, J., Krebs, L.T., Klonjowski, B., Berrou, E., Mericskay, M., Li, Z., et al. (2004). Notch3 is required for arterial identity and maturation of vascular smooth muscle cells. *Genes Dev.* 18, 2730–2735.

Döme, B., Paku, S., Somlai, B., and Tímár, J. (2002). Vascularization of cutaneous melanoma involves vessel co-option and has clinical significance. *J. Pathol.* 197, 355–362.

Dong, J., Zhao, Y., Huang, Q., Fei, X., Diao, Y., Shen, Y., Xiao, H., Zhang, T., Lan, Q., and Gu, X. (2011). Glioma Stem/Progenitor Cells Contribute to Neovascularization via Transdifferentiation. *Stem Cell Reviews and Reports* 7, 141–152.

Duarte, A., Hirashima, M., Benedito, R., Trindade, A., Diniz, P., Bekman, E., Costa, L., Henrique, D., and Rossant, J. (2004). Dosage-sensitive requirement for mouse Dll4 in artery development. *Genes Dev.* *18*, 2474–2478.

Dumont, D.J., Jussila, L., Taipale, J., Lymboussaki, A., Mustonen, T., Pajusola, K., Breitman, M., and Alitalo, K. (1998). Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science* *282*, 946–949.

Dunwoodie, S.L., Henrique, D., Harrison, S.M., and Beddington, R.S. (1997). Mouse Dll3: a novel divergent Delta gene which may complement the function of other Delta homologues during early pattern formation in the mouse embryo. *Development* *124*, 3065–3076.

Durbeej, M. (2010). Laminins. *Cell Tissue Res.* *339*, 259–268.

Dvorak, H.F., Brown, L.F., Detmar, M., and Dvorak, A.M. (1995). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am. J. Pathol.* *146*, 1029–1039.

-E-

Edwards, M.M., McLeod, D.S., Grebe, R., Heng, C., Lefebvre, O., and Lutty, G.A. (2011). Lama1 mutations lead to vitreoretinal blood vessel formation, persistence of fetal vasculature, and epiretinal membrane formation in mice. *BMC Dev Biol* *11*, 60.

Egeblad, M., and Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 161–174.

Eliceiri, B.P., and Chesh, D.A. (2001). Adhesion events in angiogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* *13*, 563–568.

Estrach, S., Cailleteau, L., Franco, C.A., Gerhardt, H., Stefani, C., Lemichez, E., Gagnoux-Palacios, L., Meneguzzi, G., and Mettouchi, A. (2011). Laminin-binding integrins induce Dll4 expression and Notch signaling in endothelial cells. *Circ. Res.* *109*, 172–182.

Ettner, N., Göhring, W., Sasaki, T., Mann, K., and Timpl, R. (1998). The N-terminal globular domain of the laminin alpha1 chain binds to alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins and to the heparan sulfate-containing domains of perlecan. *FEBS Lett.* *430*, 217–221.

-F-

Falcón, B.L., Hashizume, H., Koumoutsakos, P., Chou, J., Bready, J.V., Coxon, A., Oliner, J.D., and McDonald, D.M. (2009). Contrasting actions of selective inhibitors of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 on the normalization of tumor blood vessels. *Am. J. Pathol.* *175*, 2159–2170.

Falk, M., Ferletta, M., Forsberg, E., and Ekblom, P. (1999). Restricted distribution of laminin alpha1 chain in normal adult mouse tissues. *Matrix Biol.* *18*, 557–568.

Fearon, E.R., and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* *61*, 759–767.

Ferrara, N. (1999). Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. *Kidney Int.* *56*, 794–814.

Ferrara, N. (2004). Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr. Rev.* *25*, 581–611.

- Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O'Shea, K.S., Powell-Braxton, L., Hillan, K.J., and Moore, M.W. (1996). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380, 439–442.
- Ferrara, N., and Davis-Smyth, T. (1997). The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.* 18, 4–25.
- Ferrara, N., Frantz, G., LeCouter, J., Dillard-Telm, L., Pham, T., Draksharapu, A., Giordano, T., and Peale, F. (2003a). Differential expression of the angiogenic factor genes vascular endothelial growth factor (VEGF) and endocrine gland-derived VEGF in normal and polycystic human ovaries. *Am. J. Pathol.* 162, 1881–1893.
- Ferrara, N., Gerber, H.-P., and LeCouter, J. (2003b). The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* 9, 669–676.
- Ferrara, N., and Henzel, W.J. (1989). Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161, 851–858.
- Ferrara, N., Winer, J., Burton, T., Rowland, A., Siegel, M., Phillips, H.S., Terrell, T., Keller, G.A., and Levinson, A.D. (1993). Expression of vascular endothelial growth factor does not promote transformation but confers a growth advantage in vivo to Chinese hamster ovary cells. *J. Clin. Invest.* 91, 160–170.
- Fink, K., and Boratyński, J. (2012). [The role of metalloproteinases in modification of extracellular matrix in invasive tumor growth, metastasis and angiogenesis]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 66, 609–628.
- Fleming, R.J., Purcell, K., and Artavanis-Tsakonas, S. (1997). The NOTCH receptor and its ligands. *Trends Cell Biol.* 7, 437–441.
- Fodde, R., Edelmann, W., Yang, K., van Leeuwen, C., Carlson, C., Renault, B., Breukel, C., Alt, E., Lipkin, M., and Khan, P.M. (1994). A targeted chain-termination mutation in the mouse *Apc* gene results in multiple intestinal tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 8969–8973.
- Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* 285, 1182–1186.
- Folkman, J., and Klagsbrun, M. (1987). Angiogenic factors. *Science* 235, 442–447.
- Fong, G.H., Rossant, J., Gertsenstein, M., and Breitman, M.L. (1995). Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 376, 66–70.
- Fontana, A., Filleur, S., Guglielmi, J., Frappart, L., Bruno-Bossio, G., Boissier, S., Cabon, F., and Clézardin, P. (2005). Human breast tumors override the antiangiogenic effect of stromal thrombospondin-1 in vivo. *Int. J. Cancer* 116, 686–691.
- Foo, S.S., Turner, C.J., Adams, S., Compagni, A., Aubyn, D., Kogata, N., Lindblom, P., Shani, M., Zicha, D., and Adams, R.H. (2006). Ephrin-B2 controls cell motility and adhesion during blood-vessel-wall assembly. *Cell* 124, 161–173.
- Frade, J.M., Martínez-Morales, J.R., and Rodríguez-Tébar, A. (1996). Laminin-1 selectively stimulates neuron generation from cultured retinal neuroepithelial cells. *Exp. Cell Res.* 222, 140–149.
- Frattini, M., Balestra, D., Suardi, S., Oggionni, M., Alberici, P., Radice, P., Costa, A., Daidone, M.G., Leo, E., Pilotti, S., et al. (2004). Different genetic features associated with colon and rectal carcinogenesis. *Clin. Cancer Res.* 10, 4015–4021.
- Freeman, M.R., Schneck, F.X., Gagnon, M.L., Corless, C., Soker, S., Niknejad, K., Peoples, G.E., and Klagsbrun, M. (1995). Peripheral blood T lymphocytes and lymphocytes infiltrating human cancers express vascular endothelial growth factor: a potential role for T cells in angiogenesis. *Cancer Res.* 55, 4140–4145.

Friedmann, D.R., Wilson, J.J., and Kovall, R.A. (2008). RAM-induced allostery facilitates assembly of a notch pathway active transcription complex. *J. Biol. Chem.* 283, 14781–14791.

Fukushi, J., Makagiansar, I.T., and Stallcup, W.B. (2004). NG2 proteoglycan promotes endothelial cell motility and angiogenesis via engagement of galectin-3 and alpha3beta1 integrin. *Mol. Biol. Cell* 15, 3580–3590.

Funahashi, Y., Shawber, C.J., Sharma, A., Kanamaru, E., Choi, Y.K., and Kitajewski, J. (2011). Notch modulates VEGF action in endothelial cells by inducing Matrix Metalloprotease activity. *Vascular Cell* 3, 2.

-G-

Gale, N.W., Dominguez, M.G., Noguera, I., Pan, L., Hughes, V., Valenzuela, D.M., Murphy, A.J., Adams, N.C., Lin, H.C., Holash, J., et al. (2004). Haploinsufficiency of delta-like 4 ligand results in embryonic lethality due to major defects in arterial and vascular development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 15949–15954.

Gerber, H.P., Dixit, V., and Ferrara, N. (1998). Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 273, 13313–13316.

Gerber, H.P., Hillan, K.J., Ryan, A.M., Kowalski, J., Keller, G.A., Rangell, L., Wright, B.D., Radtke, F., Aguet, M., and Ferrara, N. (1999). VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development* 126, 1149–1159.

Gerety, S.S., and Anderson, D.J. (2002). Cardiovascular ephrinB2 function is essential for embryonic angiogenesis. *Development* 129, 1397–1410.

Gerety, S.S., Wang, H.U., Chen, Z.F., and Anderson, D.J. (1999). Symmetrical mutant phenotypes of the receptor EphB4 and its specific transmembrane ligand ephrin-B2 in cardiovascular development. *Mol. Cell* 4, 403–414.

Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., Jeltsch, M., Mitchell, C., Alitalo, K., Shima, D., et al. (2003). VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J. Cell Biol.* 161, 1163–1177.

Gibby, K., You, W.-K., Kadoya, K., Helgadottir, H., Young, L.J., Ellies, L.G., Chang, Y., Cardiff, R.D., and Stallcup, W.B. (2012). Early vascular deficits are correlated with delayed mammary tumorigenesis in the MMTV-PyMT transgenic mouse following genetic ablation of the NG2 proteoglycan. *Breast Cancer Research: BCR* 14, R67.

Giovannucci, E. (2002). Modifiable risk factors for colon cancer. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 31, 925–943.

Giovannucci, E., Rimm, E.B., Stampfer, M.J., Colditz, G.A., Ascherio, A., and Willett, W.C. (1994). Intake of fat, meat, and fiber in relation to risk of colon cancer in men. *Cancer Res.* 54, 2390–2397.

Granata, R., Trovato, L., Lupia, E., Sala, G., Settanni, F., Camussi, G., Ghidoni, R., and Ghigo, E. (2007). Insulin-like growth factor binding protein-3 induces angiogenesis through IGF-I- and SphK1-dependent mechanisms. *J. Thromb. Haemost.* 5, 835–845.

Groden, J., Thliveris, A., Samowitz, W., Carlson, M., Gelbert, L., Albertsen, H., Joslyn, G., Stevens, J., Sporio, L., and Robertson, M. (1991). Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 66, 589–600.

Guidos, C.J. (2002). Notch signaling in lymphocyte development. *Semin. Immunol.* 14, 395–404.

Guo, X., Oshima, H., Kitmura, T., Taketo, M.M., and Oshima, M. (2008). Stromal fibroblasts activated by tumor cells promote angiogenesis in mouse gastric cancer. *J. Biol. Chem.* 283, 19864–19871.

Gutschmidt S, Sandforth F, Riecken EO (1983). Segmental variations in the surface architecture of the normal rat colonic mucosa. *Virchows Arch. B Cell Path.* 43,349-354.

-H-

Hanahan, D. (1985). Heritable formation of pancreatic beta-cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes. *Nature* 315, 115–122.

Hanahan, D., and Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86, 353–364.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.

Hansson, E.M., Lendahl, U., and Chapman, G. (2004). Notch signaling in development and disease. *Semin. Cancer Biol.* 14, 320–328.

Hardman, A.E. (2001). Physical activity and cancer risk. *Proc Nutr Soc* 60, 107–113.

Harrison, D., Hussain, S.-A., Combs, A.C., Ervasti, J.M., Yurchenco, P.D., and Hohenester, E. (2007). Crystal structure and cell surface anchorage sites of laminin alpha1LG4-5. *J. Biol. Chem.* 282, 11573–11581.

Hayashi, S., Lewis, P., Pevny, L., and McMahon, A.P. (2002). Efficient gene modulation in mouse epiblast using a Sox2Cre transgenic mouse strain. *Gene Expr. Patterns* 2, 93–97.

He, T.C., Sparks, A.B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L.T., Morin, P.J., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281, 1509–1512.

He, X.C., Zhang, J., Tong, W.-G., Tawfik, O., Ross, J., Scoville, D.H., Tian, Q., Zeng, X., He, X., Wiedemann, L.M., et al. (2004). BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling. *Nat. Genet.* 36, 1117–1121.

Hellström, M., Gerhardt, H., Kalén, M., Li, X., Eriksson, U., Wolburg, H., and Betsholtz, C. (2001). Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J. Cell Biol.* 153, 543–553.

Hendrix, M.J.C., Seftor, E.A., Hess, A.R., and Seftor, R.E.B. (2003). Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nat. Rev. Cancer* 3, 411–421.

Heng, C., Lefebvre, O., Klein, A., Edwards, M., Simon-Assmann, P., Orend, G., and Bagnard, D. (2011). Functional role of laminin α 1 chain during cerebellum development. *Cell Adhesion & Migration* 5, 480–489.

High, F.A., Lu, M.M., Pear, W.S., Loomes, K.M., Kaestner, K.H., and Epstein, J.A. (2008). Endothelial expression of the Notch ligand Jagged1 is required for vascular smooth muscle development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 1955–1959.

Hiratsuka, S., Minowa, O., Kuno, J., Noda, T., and Shibuya, M. (1998). Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 9349–9354.

Hirschi, K.K., Rohovsky, S.A., Beck, L.H., Smith, S.R., and D'Amore, P.A. (1999). Endothelial cells modulate the proliferation of mural cell precursors via platelet-derived growth factor-BB and heterotypic cell contact. *Circ. Res.* 84, 298–305.

Hoff, P.M. (2005). Is there a role for routine p53 testing in colorectal cancer? *J. Clin. Oncol.* 23, 7395–7396.

Höpker, V.H., Shewan, D., Tessier-Lavigne, M., Poo, M., and Holt, C. (1999). Growth-cone attraction to netrin-1 is converted to repulsion by laminin-1. *Nature* 401, 69–73.

Houck, K.A., Leung, D.W., Rowland, A.M., Winer, J., and Ferrara, N. (1992). Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J. Biol. Chem.* 267, 26031–26037.

Hrabě de Angelis, M., McIntyre, J., 2nd, and Gossler, A. (1997). Maintenance of somite borders in mice requires the Delta homologue Dll1. *Nature* 386, 717–721.

Humphries, A., and Wright, N.A. (2008). Colonic crypt organization and tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* 8, 415–424.

-I-

Ichikawa-Tomikawa, N., Ogawa, J., Douet, V., Xu, Z., Kamikubo, Y., Sakurai, T., Kohsaka, S., Chiba, H., Hattori, N., Yamada, Y., et al. (2012). Laminin $\alpha 1$ is essential for mouse cerebellar development. *Matrix Biology* 31, 17–28.

Inamori, K., Yoshida-Moriguchi, T., Hara, Y., Anderson, M.E., Yu, L., and Campbell, K.P. (2012). Dystroglycan function requires xylosyl- and glucuronyltransferase activities of LARGE. *Science* 335, 93–96.

Irizarry, R.A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y.D., Antonellis, K.J., Scherf, U., and Speed, T.P. (2003). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 4, 249–264.

-J-

Janssen, K.-P., Alberici, P., Fsihi, H., Gaspar, C., Breukel, C., Franken, P., Rosty, C., Abal, M., El Marjou, F., Smits, R., et al. (2006). APC and oncogenic KRAS are synergistic in enhancing Wnt signaling in intestinal tumor formation and progression. *Gastroenterology* 131, 1096–1109.

Janssen, K.-P., el-Marjou, F., Pinto, D., Sastre, X., Rouillard, D., Fouquet, C., Soussi, T., Louvard, D., and Robine, S. (2002). Targeted expression of oncogenic K-ras in intestinal epithelium causes spontaneous tumorigenesis in mice. *Gastroenterology* 123, 492–504.

Jass, J.R. (2004). HNPCC and sporadic MSI-H colorectal cancer: a review of the morphological similarities and differences. *Fam. Cancer* 3, 93–100.

Ji, K., and Tzirka, S.E. (2012). Inflammation modulates expression of laminin in the central nervous system following ischemic injury. *J Neuroinflammation* 9, 159.

Jiang, F.X., Cram, D.S., DeAizpurua, H.J., and Harrison, L.C. (1999). Laminin-1 promotes differentiation of fetal mouse pancreatic beta-cells. *Diabetes* 48, 722–730.

Joško, J., and Mazurek, M. (2004). Transcription factors having impact on vascular endothelial growth factor (VEGF) gene expression in angiogenesis. *Med. Sci. Monit.* 10, RA89–98.

Jubb, A.M., Soilleux, E.J., Turley, H., Steers, G., Parker, A., Low, I., Blades, J., Li, J.-L., Allen, P., Leek, R., et al. (2010). Expression of vascular notch ligand delta-like 4 and inflammatory markers in breast cancer. *Am. J. Pathol.* 176, 2019–2028.

Jussila, L., and Alitalo, K. (2002). Vascular growth factors and lymphangiogenesis. *Physiol. Rev.* 82, 673–700.

-K-

Kalluri, R., and Zeisberg, M. (2006). Fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6, 392–401.

Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A., and Ladant, D. (1998). A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 5752–5756.

Keck, P.J., Hauser, S.D., Krivi, G., Sanzo, K., Warren, T., Feder, J., and Connolly, D.T. (1989). Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 246, 1309–1312.

Key, T.J., Schatzkin, A., Willett, W.C., Allen, N.E., Spencer, E.A., and Travis, R.C. (2004). Diet, nutrition and the prevention of cancer. *Public Health Nutr* 7, 187–200.

Keyt, B.A., Nguyen, H.V., Berleau, L.T., Duarte, C.M., Park, J., Chen, H., and Ferrara, N. (1996). Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors. Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 271, 5638–5646.

Kim, B.-G., Li, C., Qiao, W., Mamura, M., Kasprzak, B., Kasperczak, B., Anver, M., Wolfrain, L., Hong, S., Mushinski, E., et al. (2006). Smad4 signalling in T cells is required for suppression of gastrointestinal cancer. *Nature* 441, 1015–1019

Kim, J.-H., Choi, D.S., Lee, O.-H., Oh, S.-H., Lippman, S.M., and Lee, H.-Y. (2011). Antiangiogenic antitumor activities of IGFBP-3 are mediated by IGF-independent suppression of Erk1/2 activation and Egr-1-mediated transcriptional events. *Blood* 118, 2622–2631.

Kim, K.J., Li, B., Winer, J., Armanini, M., Gillett, N., Phillips, H.S., and Ferrara, N. (1993). Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* 362, 841–844.

Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87, 159–170.

Knudson, A.G., Jr (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68, 820–823.

Kobaek-Larsen, M., Thorup, I., Diederichsen, A., Fenger, C., and Hoitinga, M.R. (2000). Review of colorectal cancer and its metastases in rodent models: comparative aspects with those in humans. *Comp. Med.* 50, 16–26.

Kovács, Z., Ikezaki, K., Samoto, K., Inamura, T., and Fukui, M. (1996). VEGF and flt. Expression time kinetics in rat brain infarct. *Stroke* 27, 1865–1872; discussion 1872–1873.

Krebs, L.T., Shutter, J.R., Tanigaki, K., Honjo, T., Stark, K.L., and Gridley, T. (2004). Haploinsufficient lethality and formation of arteriovenous malformations in Notch pathway mutants. *Genes Dev.* 18, 2469–2473.

Krebs, L.T., Xue, Y., Norton, C.R., Shutter, J.R., Maguire, M., Sundberg, J.P., Gallahan, D., Closson, V., Kitajewski, J., Callahan, R., et al. (2000). Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. *Genes Dev.* 14, 1343–1352.

Ku, D.D., Zaleski, J.K., Liu, S., and Brock, T.A. (1993). Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries. *Am. J. Physiol.* 265, H586–592.

Kucera, T., and Lammert, E. (2009). Ancestral vascular tube formation and its adoption by tumors. *Biol. Chem.* 390, 985–994.

Kume, T. (2009). Novel insights into the differential functions of Notch ligands in vascular formation. *J Angiogenes Res* 1, 8.

Kutcher, M.E., and Herman, I.M. (2009). The pericyte: cellular regulator of microvascular blood flow. *Microvasc. Res.* 77, 235–246.

Kuzontkoski, P.M., Mulligan-Kehoe, M.J., Harris, B.T., and Israel, M.A. (2010). Inhibitor of DNA binding-4 promotes angiogenesis and growth of glioblastoma multiforme by elevating matrix GLA levels. *Oncogene* 29, 3793–3802.

-L-

Lambert, E., Coissieux, M.-M., Laudet, V., and Mehlen, P. (2012). Netrin-4 Acts as a Pro-angiogenic Factor during Zebrafish Development. *Journal of Biological Chemistry* 287, 3987–3999.

Lange, J., Yafai, Y., Noack, A., Yang, X.M., Munk, A.-B., Krohn, S., Iandiev, I., Wiedemann, P., Reichenbach, A., and Eichler, W. (2012). The axon guidance molecule Netrin-4 is expressed by Müller cells and contributes to angiogenesis in the retina. *Glia* n/a–n/a.

Leach, F.S., Nicolaides, N.C., Papadopoulos, N., Liu, B., Jen, J., Parsons, R., Peltomäki, P., Sistonen, P., Aaltonen, L.A., and Nyström-Lahti, M. (1993). Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 75, 1215–1225.

Lebrin, F., Deckers, M., Bertolino, P., and Ten Dijke, P. (2005). TGF-beta receptor function in the endothelium. *Cardiovasc. Res.* 65, 599–608.

Lee, Y., Kameya, S., Cox, G.A., Hsu, J., Hicks, W., Maddatu, T.P., Smith, R.S., Naggert, J.K., Peachey, N.S., and Nishina, P.M. (2005). Ocular abnormalities in Large(myd) and Large(vls) mice, spontaneous models for muscle, eye, and brain diseases. *Mol. Cell. Neurosci.* 30, 160–172.

Leppert, M., Dobbs, M., Scambler, P., O'Connell, P., Nakamura, Y., Stauffer, D., Woodward, S., Burt, R., Hughes, J., and Gardner, E. (1987). The gene for familial polyposis coli maps to the long arm of chromosome 5. *Science* 238, 1411–1413.

Leung, D.W., Cachianes, G., Kuang, W.J., Goeddel, D.V., and Ferrara, N. (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246, 1306–1309.

Levedakou, E.N., Strohmeyer, T.G., Effert, P.J., and Liu, E.T. (1992). Expression of the matrix Gla protein in urogenital malignancies. *Int. J. Cancer* 52, 534–537.

Li, D.Y., Sorensen, L.K., Brooke, B.S., Urness, L.D., Davis, E.C., Taylor, D.G., Boak, B.B., and Wendel, D.P. (1999). Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science* 284, 1534–1537.

Li, J.-L., Sainson, R.C.A., Shi, W., Leek, R., Harrington, L.S., Preusser, M., Biswas, S., Turley, H., Heikamp, E., Hainfellner, J.A., et al. (2007). Delta-like 4 Notch ligand regulates tumor angiogenesis, improves tumor vascular function, and promotes tumor growth in vivo. *Cancer Res.* 67, 11244–11253.

Li, J.-L., Sainson, R.C.A., Oon, C.E., Turley, H., Leek, R., Sheldon, H., Bridges, E., Shi, W., Snell, C., Bowden, E.T., et al. (2011). DLL4-Notch signaling mediates tumor resistance to anti-VEGF therapy in vivo. *Cancer Res.* 71, 6073–6083.

- Li, Y.N., Pinzón-Duarte, G., Dattilo, M., Claudepierre, T., Koch, M., and Brunken, W.J. (2012). The expression and function of netrin-4 in murine ocular tissues. *Experimental Eye Research* 96, 24–35.
- Lilly, B., and Kennard, S. (2009). Differential gene expression in a coculture model of angiogenesis reveals modulation of select pathways and a role for Notch signaling. *Physiol. Genomics* 36, 69–78.
- Limbourg, F.P., Takeshita, K., Radtke, F., Bronson, R.T., Chin, M.T., and Liao, J.K. (2005). Essential role of endothelial Notch1 in angiogenesis. *Circulation* 111, 1826–1832.
- Liu, B., Nicolaides, N.C., Markowitz, S., Willson, J.K., Parsons, R.E., Jen, J., Papadopolous, N., Peltomäki, P., de la Chapelle, A., and Hamilton, S.R. (1995). Mismatch repair gene defects in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. *Nat. Genet.* 9, 48–55.
- Liu, C., Li, Y., Semenov, M., Han, C., Baeg, G.H., Tan, Y., Zhang, Z., Lin, X., and He, X. (2002). Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 108, 837–847.
- Lohela, M., Bry, M., Tammela, T., and Alitalo, K. (2009a). VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21, 154–165.
- Lohela, M., Bry, M., Tammela, T., and Alitalo, K. (2009b). VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21, 154–165.
- Lofqvist, C., Chen, J., Connor, K.M., Smith, A.C.H., Aderman, C.M., Liu, N., Pintar, J.E., Ludwig, T., Hellstrom, A., and Smith, L.E.H. (2007). IGFBP3 suppresses retinopathy through suppression of oxygen-induced vessel loss and promotion of vascular regrowth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 10589–10594.
- Los, M., Roodhart, J.M.L., and Voest, E.E. (2007). Target practice: lessons from phase III trials with bevacizumab and vatalanib in the treatment of advanced colorectal cancer. *Oncologist* 12, 443–450.
- Loureiro, R.M.B., and D'Amore, P.A. (2005). Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16, 77–89.
- Lu, P., Weaver, V.M., and Werb, Z. (2012). The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J. Cell Biol.* 196, 395–406.
- Luttun, A., Carmeliet, G., and Carmeliet, P. (2002). Vascular progenitors: from biology to treatment. *Trends Cardiovasc. Med.* 12, 88–96.
- Lyman, D., and Young, M.W. (1993). Further evidence for function of the *Drosophila* Notch protein as a transmembrane receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 10395–10399.

-M-

- Määttä, M., Bützow, R., Luostarinen, J., Petäjäniemi, N., Pihlajaniemi, T., Salo, S., Miyazaki, K., Autio-Harmainen, H., and Virtanen, I. (2005). Differential expression of laminin isoforms in ovarian epithelial carcinomas suggesting different origin and providing tools for differential diagnosis. *J. Histochem. Cytochem.* 53, 1293–1300.
- Maeng, Y.-S., Choi, H.-J., Kwon, J.-Y., Park, Y.-W., Choi, K.-S., Min, J.-K., Kim, Y.-H., Suh, P.-G., Kang, K.-S., Won, M.-H., et al. (2009). Endothelial progenitor cell homing: prominent role of the IGF2-IGF2R-PLCbeta2 axis. *Blood* 113, 233–243.
- Mailhos, C., Modlich, U., Lewis, J., Harris, A., Bicknell, R., and Ish-Horowicz, D. (2001). Delta4, an endothelial specific notch ligand expressed at sites of physiological and tumor angiogenesis. *Differentiation* 69, 135–144.

- Malecaze, F., Clamens, S., Simorre-Pinatel, V., Mathis, A., Chollet, P., Favard, C., Bayard, F., and Plouet, J. (1994). Detection of vascular endothelial growth factor messenger RNA and vascular endothelial growth factor-like activity in proliferative diabetic retinopathy. *Arch. Ophthalmol.* *112*, 1476–1482.
- Mann, B., Gelos, M., Siedow, A., Hanski, M.L., Gratchev, A., Ilyas, M., Bodmer, W.F., Moyer, M.P., Riecken, E.O., Buhr, H.J., et al. (1999). Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *96*, 1603–1608.
- Mancuso, M.R., Davis, R., Norberg, S.M., O'Brien, S., Sennino, B., Nakahara, T., Yao, V.J., Inai, T., Brooks, P., Freimark, B., et al. (2006). Rapid vascular regrowth in tumors after reversal of VEGF inhibition. *J. Clin. Invest.* *116*, 2610–2621.
- Marcus, D.M., Rustgi, A.K., Defoe, D., Brooks, S.E., McCormick, R.S., Thompson, T.P., Edelmann, W., Kucherlapati, R., and Smith, S. (1997). Retinal pigment epithelium abnormalities in mice with adenomatous polyposis coli gene disruption. *Arch. Ophthalmol.* *115*, 645–650.
- Massova, I., Kotra, L.P., Fridman, R., and Mobashery, S. (1998). Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *FASEB J.* *12*, 1075–1095.
- Matthews, W., Jordan, C.T., Gavin, M., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., and Lemischka, I.R. (1991). A receptor tyrosine kinase cDNA isolated from a population of enriched primitive hematopoietic cells and exhibiting close genetic linkage to c-kit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *88*, 9026–9030.
- Méhes, E., Czirók, A., Hegedüs, B., Szabó, B., Vicsek, T., Satz, J., Campbell, K., and Jancsik, V. (2005). Dystroglycan is involved in laminin-1-stimulated motility of Müller glial cells: combined velocity and directionality analysis. *Glia* *49*, 492–500.
- Méhes, E., Czirók, A., Hegedüs, B., Vicsek, T., and Jancsik, V. (2002). Laminin-1 increases motility, path-searching, and process dynamism of rat and mouse Muller glial cells in vitro: implication of relationship between cell behavior and formation of retinal morphology. *Cell Motil. Cytoskeleton* *53*, 203–213.
- Melter, M., Reinders, M.E., Sho, M., Pal, S., Geehan, C., Denton, M.D., Mukhopadhyay, D., and Briscoe, D.M. (2000). Ligation of CD40 induces the expression of vascular endothelial growth factor by endothelial cells and monocytes and promotes angiogenesis in vivo. *Blood* *96*, 3801–3808.
- Mertsch, S., Schurgers, L.J., Weber, K., Paulus, W., and Senner, V. (2009). Matrix gla protein (MGP): an overexpressed and migration-promoting mesenchymal component in glioblastoma. *BMC Cancer* *9*, 302.
- Michels, K.B. (2005). The role of nutrition in cancer development and prevention. *Int. J. Cancer* *114*, 163–165.
- Miner, J.H., Li, C., Mudd, J.L., Go, G., and Sutherland, A.E. (2004). Compositional and structural requirements for laminin and basement membranes during mouse embryo implantation and gastrulation. *Development* *131*, 2247–2256.
- Mitchell, T.S., Bradley, J., Robinson, G.S., Shima, D.T., and Ng, Y.-S. (2008). RGS5 expression is a quantitative measure of pericyte coverage of blood vessels. *Angiogenesis* *11*, 141–151.
- Miyaki, M., Konishi, M., Tanaka, K., Kikuchi-Yanoshita, R., Muraoka, M., Yasuno, M., Igari, T., Koike, M., Chiba, M., and Mori, T. (1997). Germline mutation of MSH6 as the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat. Genet.* *17*, 271–272.
- Moser, A.R., Pitot, H.C., and Dove, W.F. (1990). A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science* *247*, 322–324.
- Moustakas, A., Souchelnytskyi, S., and Heldin, C.H. (2001). Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J. Cell. Sci.* *114*, 4359–4369.

-N-

Nambiar, P.R., Girnun, G., Lillo, N.A., Guda, K., Whiteley, H.E., and Rosenberg, D.W. (2003). Preliminary analysis of azoxymethane induced colon tumors in inbred mice commonly used as transgenic/knockout progenitors. *Int. J. Oncol.* 22, 145–150.

Nagase, H., and Nakamura, Y. (1993). Mutations of the APC (adenomatous polyposis coli) gene. *Hum. Mutat.* 2, 425–434.

Nelson, A.R., Fingleton, B., Rothenberg, M.L., and Matrisian, L.M. (2000). Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J. Clin. Oncol.* 18, 1135–1149.

Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., and Poltorak, Z. (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.* 13, 9–22.

Neufert, C., Becker, C., and Neurath, M.F. (2007). An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression. *Nat Protoc* 2, 1998–2004.

Nicolaides, N.C., Papadopoulos, N., Liu, B., Wei, Y.F., Carter, K.C., Ruben, S.M., Rosen, C.A., Haseltine, W.A., Fleischmann, R.D., and Fraser, C.M. (1994). Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature* 371, 75–80.

Niimi, T., Hayashi, Y., Futaki, S., and Sekiguchi, K. (2004). SOX7 and SOX17 regulate the parietal endoderm-specific enhancer activity of mouse laminin alpha1 gene. *J. Biol. Chem.* 279, 38055–38061.

Niimi, T., Hayashi, Y., and Sekiguchi, K. (2003). Identification of an upstream enhancer in the mouse laminin alpha 1 gene defining its high level of expression in parietal endoderm cells. *J. Biol. Chem.* 278, 9332–9338.

Niimi, T., Hayashi, Y., Sekiguchi, K., and Kitagawa, Y. (2006). The Sp family of transcription factors regulates the human laminin alpha1 gene in JAR choriocarcinoma cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1759, 573–579.

Niki, T., Kohno, T., Iba, S., Moriya, Y., Takahashi, Y., Saito, M., Maeshima, A., Yamada, T., Matsuno, Y., Fukayama, M., et al. (2002). Frequent co-localization of Cox-2 and laminin-5 gamma2 chain at the invasive front of early-stage lung adenocarcinomas. *Am. J. Pathol.* 160, 1129–1141.

Noden, D.M. (1989). Embryonic origins and assembly of blood vessels. *Am. Rev. Respir. Dis.* 140, 1097–1103.

Noguera-Troise, I., Daly, C., Papadopoulos, N.J., Coetzee, S., Boland, P., Gale, N.W., Lin, H.C., Yancopoulos, G.D., and Thurston, G. (2006). Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis. *Nature* 444, 1032–1037.

Noguera-Troise, I., Daly, C., Papadopoulos, N.J., Coetzee, S., Boland, P., Gale, N.W., Lin, H.C., Yancopoulos, G.D., and Thurston, G. (2007). Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis. *Novartis Found. Symp.* 283, 106–120; discussion 121–125, 238–241.

Norat, T., Lukanova, A., Ferrari, P., and Riboli, E. (2002). Meat consumption and colorectal cancer risk: dose-response meta-analysis of epidemiological studies. *Int. J. Cancer* 98, 241–256.

NOWELL, P.C., and HUNGERFORD, D.A. (1960). Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J. Natl. Cancer Inst.* 25, 85–109.

-O-

O'Brien, C.A., Pollett, A., Gallinger, S., and Dick, J.E. (2007). A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 445, 106–110.

O'Connell, J.T., Sugimoto, H., Cooke, V.G., MacDonald, B.A., Mehta, A.I., LeBleu, V.S., Dewar, R., Rocha, R.M., Brentani, R.R., Resnick, M.B., et al. (2011). VEGF-A and Tenascin-C produced by S100A4+ stromal cells are important for metastatic colonization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *108*, 16002–16007.

Odenthal, U., Haehn, S., Tunggal, P., Merkl, B., Schomburg, D., Frie, C., Paulsson, M., and Smyth, N. (2004). Molecular analysis of laminin N-terminal domains mediating self-interactions. *J. Biol. Chem.* *279*, 44504–44512.

O'Reilly, M.S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W.S., Flynn, E., Birkhead, J.R., Olsen, B.R., and Folkman, J. (1997). Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* *88*, 277–285.

Ochiai, M., Ubagai, T., Kawamori, T., Imai, H., Sugimura, T., and Nakagama, H. (2001). High susceptibility of Scid mice to colon carcinogenesis induced by azoxymethane indicates a possible caretaker role for DNA-dependent protein kinase. *Carcinogenesis* *22*, 1551–1555.

Odenthal, U., Haehn, S., Tunggal, P., Merkl, B., Schomburg, D., Frie, C., Paulsson, M., and Smyth, N. (2004). Molecular analysis of laminin N-terminal domains mediating self-interactions. *J. Biol. Chem.* *279*, 44504–44512.

Olsen, B.R. (1999). Life without perlecan has its problems. *J. Cell Biol.* *147*, 909–912.

Olsen, C.J., Moreira, J., Lukanidin, E.M., and Ambartsumian, N.S. (2010). Human mammary fibroblasts stimulate invasion of breast cancer cells in a three-dimensional culture and increase stroma development in mouse xenografts. *BMC Cancer* *10*, 444.

Oommen, S., Gupta, S.K., and Vlahakis, N.E. (2011). Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) induces endothelial and cancer cell migration through direct binding to integrin $\alpha_9\beta_1$: identification of a specific $\alpha_9\beta_1$ binding site. *J. Biol. Chem.* *286*, 1083–1092.

Orimo, A., Gupta, P.B., Sgroi, D.C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., Carey, V.J., Richardson, A.L., and Weinberg, R.A. (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* *121*, 335–348.

Oshima, M., Oshima, H., Kitagawa, K., Kobayashi, M., Itakura, C., and Taketo, M. (1995). Loss of Apc heterozygosity and abnormal tissue building in nascent intestinal polyps in mice carrying a truncated Apc gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *92*, 4482–4486.

-P-

Pagès, G., and Pouyssegur, J. (2005). Transcriptional regulation of the Vascular Endothelial Growth Factor gene—a concert of activating factors. *Cardiovasc. Res.* *65*, 564–573.

Papanikolaou, A., Wang, Q.S., Delker, D.A., and Rosenberg, D.W. (1998). Azoxymethane-induced colon tumors and aberrant crypt foci in mice of different genetic susceptibility. *Cancer Lett.* *130*, 29–34.

Papetti, M., and Herman, I.M. (2002). Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* *282*, C947–970.

Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J., and Pisani, P. (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* *55*, 74–108.

Patan, S. (2000). Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. *J. Neurooncol.* *50*, 1–15.

- Patan, S., Haenni, B., and Burri, P.H. (1996a). Implementation of intussusceptive microvascular growth in the chicken chorioallantoic membrane (CAM): 1. pillar formation by folding of the capillary wall. *Microvasc. Res.* *51*, 80–98.
- Patan, S., Munn, L.L., and Jain, R.K. (1996b). Intussusceptive microvascular growth in a human colon adenocarcinoma xenograft: a novel mechanism of tumor angiogenesis. *Microvasc. Res.* *51*, 260–272.
- Patan, S. (1998). TIE1 and TIE2 receptor tyrosine kinases inversely regulate embryonic angiogenesis by the mechanism of intussusceptive microvascular growth. *Microvasc. Res.* *56*, 1–21.
- Patarroyo, M., Tryggvason, K., and Virtanen, I. (2002). Laminin isoforms in tumor invasion, angiogenesis and metastasis. *Semin. Cancer Biol.* *12*, 197–207.
- Patel, N.S., Dobbie, M.S., Rochester, M., Steers, G., Poulson, R., Le Monnier, K., Cranston, D.W., Li, J.-L., and Harris, A.L. (2006). Up-regulation of endothelial delta-like 4 expression correlates with vessel maturation in bladder cancer. *Clin. Cancer Res.* *12*, 4836–4844.
- Patel, N.S., Li, J.-L., Generali, D., Poulson, R., Cranston, D.W., and Harris, A.L. (2005). Up-regulation of delta-like 4 ligand in human tumor vasculature and the role of basal expression in endothelial cell function. *Cancer Res.* *65*, 8690–8697.
- Penn, J.S., Madan, A., Caldwell, R.B., Bartoli, M., Caldwell, R.W., and Hartnett, M.E. (2008). Vascular endothelial growth factor in eye disease. *Prog Retin Eye Res* *27*, 331–371.
- Pepper, M.S. (1997). Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytokine Growth Factor Rev.* *8*, 21–43.
- Pepper, M.S., Montesano, R., Orci, L., and Vassalli, J.D. (1991). Plasminogen activator inhibitor-1 is induced in microvascular endothelial cells by a chondrocyte-derived transforming growth factor-beta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *176*, 633–638.
- Peretz, D., Gitay-Goren, H., Safran, M., Kimmel, N., Gospodarowicz, D., and Neufeld, G. (1992). Glycosylation of vascular endothelial growth factor is not required for its mitogenic activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *182*, 1340–1347.
- Petitclerc, E., Boutaud, A., Prestayko, A., Xu, J., Sado, Y., Ninomiya, Y., Sarras, M.P., Jr, Hudson, B.G., and Brooks, P.C. (2000). New functions for non-collagenous domains of human collagen type IV. Novel integrin ligands inhibiting angiogenesis and tumor growth in vivo. *J. Biol. Chem.* *275*, 8051–8061.
- Picard, O., Rolland, Y., and Poupon, M.F. (1986). Fibroblast-dependent tumorigenicity of cells in nude mice: implication for implantation of metastases. *Cancer Res.* *46*, 3290–3294.
- Piccinni, S.A., Bolcato-Bellemin, A.-L., Klein, A., Yang, V.W., Keding, M., Simon-Assmann, P., and Lefebvre, O. (2004). Kruppel-like factors regulate the Lama1 gene encoding the laminin alpha1 chain. *J. Biol. Chem.* *279*, 9103–9114.
- Plouët, J., Moro, F., Bertagnolli, S., Coldeboeuf, N., Mazarguil, H., Clamens, S., and Bayard, F. (1997). Extracellular cleavage of the vascular endothelial growth factor 189-amino acid form by urokinase is required for its mitogenic effect. *J. Biol. Chem.* *272*, 13390–13396.
- Pöschl, E., Schlötzer-Schrehardt, U., Brachvogel, B., Saito, K., Ninomiya, Y., and Mayer, U. (2004). Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. *Development* *131*, 1619–1628.
- Pötgens, A.J., Lubsen, N.H., van Altena, M.C., Vermeulen, R., Bakker, A., Schoenmakers, J.G., Ruiters, D.J., and de Waal, R.M. (1994). Covalent dimerization of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor is essential for its biological activity. Evidence from Cys to Ser mutations. *J. Biol. Chem.* *269*, 32879–32885.

Potter, J.D., Slattery, M.L., Bostick, R.M., and Gapstur, S.M. (1993). Colon cancer: a review of the epidemiology. *Epidemiol Rev* 15, 499–545.

-Q-

Qin, X., Shibata, D., and Gerson, S.L. (2000). Heterozygous DNA mismatch repair gene PMS2-knockout mice are susceptible to intestinal tumor induction with N-methyl-N-nitrosourea. *Carcinogenesis* 21, 833–838.

-R-

Radtke, F., and Clevers, H. (2005). Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science* 307, 1904–1909.

Radtke, F., and Raj, K. (2003). The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor? *Nat. Rev. Cancer* 3, 756–767.

Rafii, S., Lyden, D., Benezra, R., Hattori, K., and Heissig, B. (2002). Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? *Nat. Rev. Cancer* 2, 826–835.

Rajasekharan, S., and Kennedy, T.E. (2009). The netrin protein family. *Genome Biology* 10, 239.

Ramont, L., Brassart-Pasco, S., Thevenard, J., Deshorgue, A., Venteo, L., Laronze, J.Y., Pluot, M., Monboisse, J.-C., and Maquart, F.-X. (2007). The NC1 domain of type XIX collagen inhibits in vivo melanoma growth. *Mol. Cancer Ther.* 6, 506–514.

Randlett, O., Poggi, L., Zolessi, F.R., and Harris, W.A. (2011). The oriented emergence of axons from retinal ganglion cells is directed by laminin contact in vivo. *Neuron* 70, 266–280.

Rhodes, J.M., and Simons, M. (2007). The extracellular matrix and blood vessel formation: not just a scaffold. *J. Cell. Mol. Med.* 11, 176–205.

Ribatti, D., Nico, B., and Crivellato, E. (2011). The role of pericytes in angiogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 55, 261–268

Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D.G., Pilozzi, E., Biffoni, M., Todaro, M., Peschle, C., and De Maria, R. (2007). Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 445, 111–115.

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

Ridgway, J., Zhang, G., Wu, Y., Stawicki, S., Liang, W.-C., Chantry, Y., Kowalski, J., Watts, R.J., Callahan, C., Kasman, I., et al. (2006). Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis. *Nature* 444, 1083–1087.

Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386, 671–674.

Rizk, P., and Barker, N. (2012). Gut stem cells in tissue renewal and disease: methods, markers, and myths. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 4, 475–496.

Robanus-Maandag, E.C., Koelink, P.J., Breukel, C., Salvatori, D.C.F., Jagmohan-Changur, S.C., Bosch, C.A.J., Verspaget, H.W., Devilee, P., Fodde, R., and Smits, R. (2010). A new conditional Apc-mutant mouse model for colorectal cancer. *Carcinogenesis* 31, 946–952.

Robinson, C.J., and Stringer, S.E. (2001). The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J. Cell. Sci.* 114, 853–865.

Roca, C., and Adams, R.H. (2007). Regulation of vascular morphogenesis by Notch signaling. *Genes Dev.* 21, 2511–2524.

Rozario, T., and DeSimone, D.W. (2010). The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Dev. Biol.* 341, 126–140.

Rubinfeld, B., Albert, I., Porfiri, E., Fiol, C., Munemitsu, S., and Polakis, P. (1996). Binding of GSK3 β to the APC- β -catenin complex and regulation of complex assembly. *Science* 272, 1023–1026.

-S-

Sadlonova, A., Novak, Z., Johnson, M.R., Bowe, D.B., Gault, S.R., Page, G.P., Thottassery, J.V., Welch, D.R., and Frost, A.R. (2005). Breast fibroblasts modulate epithelial cell proliferation in three-dimensional in vitro co-culture. *Breast Cancer Res.* 7, R46–59.

Saito, N., and Kameoka, S. (2005). Serum laminin is an independent prognostic factor in colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 20, 238–244.

Salvucci, O., Maric, D., Economopoulou, M., Sakakibara, S., Merlin, S., Follenzi, A., and Tosato, G. (2009). EphrinB reverse signaling contributes to endothelial and mural cell assembly into vascular structures. *Blood* 114, 1707–1716.

Sasaki, T., Giltay, R., Talts, U., Timpl, R., and Talts, J.F. (2002). Expression and distribution of laminin alpha1 and alpha2 chains in embryonic and adult mouse tissues: an immunochemical approach. *Exp. Cell Res.* 275, 185–199.

Scehnet, J.S., Jiang, W., Kumar, S.R., Krasnoperov, V., Trindade, A., Benedito, R., Djokovic, D., Borges, C., Ley, E.J., Duarte, A., et al. (2007). Inhibition of Dll4-mediated signaling induces proliferation of immature vessels and results in poor tissue perfusion. *Blood* 109, 4753–4760.

Schadler, K.L., Zweidler-McKay, P.A., Guan, H., and Kleinerman, E.S. (2010). Delta-like ligand 4 plays a critical role in pericyte/vascular smooth muscle cell formation during vasculogenesis and tumor vessel expansion in Ewing's sarcoma. *Clin. Cancer Res.* 16, 848–856.

Schéele, S., Falk, M., Franzén, A., Ellin, F., Ferletta, M., Lonai, P., Andersson, B., Timpl, R., Forsberg, E., and Ekblom, P. (2005). Laminin alpha1 globular domains 4-5 induce fetal development but are not vital for embryonic basement membrane assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 1502–1506.

Schneiders, F.I., Maertens, B., Bose, K., Li, Y., Brunken, W.J., Paulsson, M., Smyth, N., and Koch, M. (2007). Binding of netrin-4 to laminin short arms regulates basement membrane assembly. *J. Biol. Chem.* 282, 23750–23758.

Seftor, E.A., Meltzer, P.S., Kirschmann, D.A., Pe'er, J., Maniotis, A.J., Trent, J.M., Folberg, R., and Hendrix, M.J.C. (2002). Molecular determinants of human uveal melanoma invasion and metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* 19, 233–246.

Seftor, R.E., Seftor, E.A., Koshikawa, N., Meltzer, P.S., Gardner, L.M., Bilban, M., Stetler-Stevenson, W.G., Quaranta, V., and Hendrix, M.J. (2001). Cooperative interactions of laminin 5 gamma2 chain, matrix metalloproteinase-2, and membrane type-1-matrix/metalloproteinase are required for mimicry of embryonic vasculogenesis by aggressive melanoma. *Cancer Res.* 61, 6322–6327.

Semenza, G.L. (2010). HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 20, 51–56.

- Semina, E.V., Bosenko, D.V., Zinkevich, N.C., Soules, K.A., Hyde, D.R., Vihtelic, T.S., Willer, G.B., Gregg, R.G., and Link, B.A. (2006). Mutations in laminin alpha 1 result in complex, lens-independent ocular phenotypes in zebrafish. *Dev. Biol.* 299, 63–77.
- Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T.P., Gertsenstein, M., Wu, X.F., Breitman, M.L., and Schuh, A.C. (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376, 62–66.
- Shamloo, A., Xu, H., and Heilshorn, S. (2012). Mechanisms of vascular endothelial growth factor-induced pathfinding by endothelial sprouts in biomaterials. *Tissue Eng Part A* 18, 320–330.
- Shibuya, M., Yamaguchi, S., Yamane, A., Ikeda, T., Tojo, A., Matsushime, H., and Sato, M. (1990). Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (*flt*) closely related to the *fms* family. *Oncogene* 5, 519–524.
- Shimoda, M., Melody, K.T., and Orimo, A. (2010). Carcinoma-associated fibroblasts are a rate-limiting determinant for tumour progression. *Semin. Cell Dev. Biol.* 21, 19–25.
- Shutter, J.R., Scully, S., Fan, W., Richards, W.G., Kitajewski, J., DeBlandre, G.A., Kintner, C.R., and Stark, K.L. (2000). Dll4, a novel Notch ligand expressed in arterial endothelium. *Genes Dev.* 14, 1313–1318.
- Simo, P., Simon-Assmann, P., Arnold, C., and Kedinger, M. (1992). Mesenchyme-mediated effect of dexamethasone on laminin in cocultures of embryonic gut epithelial cells and mesenchyme-derived cells. *J. Cell. Sci.* 101 (Pt 1), 161–171.
- Simo, P., Simon-Assmann, P., Bouziges, F., Leberquier, C., Kedinger, M., Ekblom, P., and Sorokin, L. (1991). Changes in the expression of laminin during intestinal development. *Development* 112, 477–487.
- Simon-Assmann, P., Orend, G., Mammadova-Bach, E., Spenlé, C., and Lefebvre, O. (2011). Role of laminins in physiological and pathological angiogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 55, 455–465.
- Simons, B.D., and Clevers, H. (2011). Stem cell self-renewal in intestinal crypt. *Experimental Cell Research* 317, 2719–2724.
- Smith, R.A., Von Eschenbach, A.C., Wender, R., Levin, B., Byers, T., Rothenberger, D., Brooks, D., Creasman, W., Cohen, C., Runowicz, C., et al. (2001). American Cancer Society guidelines for the early detection of cancer: update of early detection guidelines for prostate, colorectal, and endometrial cancers. Also: update 2001—testing for early lung cancer detection. *CA Cancer J Clin* 51, 38–75; quiz 77–80.
- Smits, R., van der Houven van Oordt, W., Luz, A., Zurcher, C., Jagmohan-Changur, S., Breukel, C., Khan, P.M., and Fodde, R. (1998). *Apc1638N*: a mouse model for familial adenomatous polyposis-associated desmoid tumors and cutaneous cysts. *Gastroenterology* 114, 275–283.
- Smyth, N., Vatansever, H.S., Murray, P., Meyer, M., Frie, C., Paulsson, M., and Edgar, D. (1999). Absence of basement membranes after targeting the *LAMC1* gene results in embryonic lethality due to failure of endoderm differentiation. *J. Cell Biol.* 144, 151–160.
- Stahl, A., Connor, K.M., Sapieha, P., Chen, J., Dennison, R.J., Krah, N.M., Seaward, M.R., Willett, K.L., Aderman, C.M., Guerin, K.I., et al. (2010). The mouse retina as an angiogenesis model. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 2813–2826.
- Stambolic, V., MacPherson, D., Sas, D., Lin, Y., Snow, B., Jang, Y., Benchimol, S., and Mak, T.W. (2001). Regulation of PTEN transcription by p53. *Mol. Cell* 8, 317–325.
- Steelman, L.S., Pohnert, S.C., Shelton, J.G., Franklin, R.A., Bertrand, F.E., and McCubrey, J.A. (2004). JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia* 18, 189–218.

- Stéhelin, D. (1976). The transforming gene of avian tumor viruses. *Pathol. Biol.* 24, 513–515.
- Stein, I., Neeman, M., Shweiki, D., Itin, A., and Keshet, E. (1995). Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia and hypoglycemia and coregulation with other ischemia-induced genes. *Mol. Cell. Biol.* 15, 5363–5368.
- Stewart, K.S., Zhou, Z., Zweidler-McKay, P., and Kleinerman, E.S. (2011). Delta-like ligand 4-Notch signaling regulates bone marrow-derived pericyte/vascular smooth muscle cell formation. *Blood* 117, 719–726.
- Stratman, A.N., Malotte, K.M., Mahan, R.D., Davis, M.J., and Davis, G.E. (2009). Pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly stimulates endothelial basement membrane matrix formation. *Blood* 114, 5091–5101.
- Stratman, A.N., and Davis, G.E. (2012). Endothelial cell-pericyte interactions stimulate basement membrane matrix assembly: influence on vascular tube remodeling, maturation, and stabilization. *Microsc. Microanal.* 18, 68–80
- Stringer, S.E. (2006). The role of heparan sulphate proteoglycans in angiogenesis. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 451–453.
- Su, L.K., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Preisinger, A.C., Moser, A.R., Luongo, C., Gould, K.A., and Dove, W.F. (1992). Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene. *Science* 256, 668–670.
- Suchting, S., Freitas, C., le Noble, F., Benedito, R., Bréant, C., Duarte, A., and Eichmann, A. (2007). The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 3225–3230.
- Sudhakar A (2009). The matrix reloaded: new insights from type IV collagen derived endogenous angiogenesis inhibitors and their mechanism of action. *J Bioequiv Availab.* 1, 52–62.
- Sundberg, C., Kowanetz, M., Brown, L.F., Detmar, M., and Dvorak, H.F. (2002). Stable expression of angiopoietin-1 and other markers by cultured pericytes: phenotypic similarities to a subpopulation of cells in maturing vessels during later stages of angiogenesis in vivo. *Lab. Invest.* 82, 387–401.
- Syngal, S., Schrag, D., Falchuk, M., Tung, N., Farraye, F.A., Chung, D., Wright, M., Whetsell, A., Miller, G., and Garber, J.E. (2000). Phenotypic characteristics associated with the APC gene I1307K mutation in Ashkenazi Jewish patients with colorectal polyps. *JAMA* 284, 857–860.

-T-

- Tagi, T., Matsui, T., Kikuchi, S., Hoshi, S., Ochiai, T., Kokuba, Y., Kinoshita-Ida, Y., Kisumi-Hayashi, F., Morimoto, K., Imai, T., et al. (2010). Dermokine as a novel biomarker for early-stage colorectal cancer. *J. Gastroenterol.* 45, 1201–1211.
- Takahashi, H., and Shibuya, M. (2005). The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin. Sci.* 109, 227–241.
- Takahashi, M., and Wakabayashi, K. (2004). Gene mutations and altered gene expression in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rodents. *Cancer Sci.* 95, 475–480.
- Takahashi, H., Ishii, H., Nishida, N., Takemasa, I., Mizushima, T., Ikeda, M., Yokobori, T., Mimori, K., Yamamoto, H., Sekimoto, M., et al. (2011). Significance of Lgr5(+ve) cancer stem cells in the colon and rectum. *Ann. Surg. Oncol.* 18, 1166–1174.
- Takaku, K., Miyoshi, H., Matsunaga, A., Oshima, M., Sasaki, N., and Taketo, M.M. (1999). Gastric and

duodenal polyps in Smad4 (Dpc4) knockout mice. *Cancer Res.* 59, 6113–6117.

Taketo, M.M., and Takaku, K. (2000). Gastrointestinal tumorigenesis in Smad4 (Dpc4) mutant mice. *Hum. Cell* 13, 85–95.

Tanaka, T. (2012). Development of an Inflammation-Associated Colorectal Cancer Model and Its Application for Research on Carcinogenesis and Chemoprevention. *International Journal of Inflammation* 2012, 1–16.

Terman, B.I., Carrion, M.E., Kovacs, E., Rasmussen, B.A., Eddy, R.L., and Shows, T.B. (1991). Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 6, 1677–1683.

Tetsu, O., and McCormick, F. (1999). Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398, 422–426.

Thomas, M., and Augustin, H.G. (2009). The role of the Angiopoietins in vascular morphogenesis. *Angiogenesis* 12, 125–137.

Thune, I., and Furberg, A.S. (2001). Physical activity and cancer risk: dose-response and cancer, all sites and site-specific. *Med Sci Sports Exerc* 33, S530–550; discussion S609–610.

Thurston, G., Rudge, J.S., Ioffe, E., Zhou, H., Ross, L., Croll, S.D., Glazer, N., Holash, J., McDonald, D.M., and Yancopoulos, G.D. (2000). Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat. Med.* 6, 460–463.

Thurston, G., Suri, C., Smith, K., McClain, J., Sato, T.N., Yancopoulos, G.D., and McDonald, D.M. (1999). Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science* 286, 2511–2514.

Timpl, R., Rohde, H., Robey, P.G., Rennard, S.I., Foidart, J.M., and Martin, G.R. (1979). Laminin—a glycoprotein from basement membranes. *J. Biol. Chem.* 254, 9933–9937.

Tischer, E., Mitchell, R., Hartman, T., Silva, M., Gospodarowicz, D., Fiddes, J.C., and Abraham, J.A. (1991). The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J. Biol. Chem.* 266, 11947–11954.

Todaro, M., Alea, M.P., Di Stefano, A.B., Cammareri, P., Vermeulen, L., Iovino, F., Tripodo, C., Russo, A., Gulotta, G., Medema, J.P., et al. (2007). Colon Cancer Stem Cells Dictate Tumor Growth and Resist Cell Death by Production of Interleukin-4. *Cell Stem Cell* 1, 389–402.

Tolsma, S.S., Stack, M.S., and Bouck, N. (1997). Lumen formation and other angiogenic activities of cultured capillary endothelial cells are inhibited by thrombospondin-1. *Microvasc. Res.* 54, 13–26.

Tran, K.T., Lamb, P., and Deng, J.-S. (2005). Matrikines and matricryptins: Implications for cutaneous cancers and skin repair. *J. Dermatol. Sci.* 40, 11–20.

Tripathi, M., Billet, S., and Bhowmick, N.A. (2012). Understanding the role of stromal fibroblasts in cancer progression. *Cell Adhesion & Migration* 6,

Turck, N., Gross, I., Gendry, P., Stutzmann, J., Freund, J.-N., Keding, M., Simon-Assmann, P., and Launay, J.-F. (2005). Laminin isoforms: biological roles and effects on the intracellular distribution of nuclear proteins in intestinal epithelial cells. *Exp. Cell Res.* 303, 494–503.

Turck, N., Lefebvre, O., Gross, I., Gendry, P., Keding, M., Simon-Assmann, P., and Launay, J.-F. (2006). Effect of laminin-1 on intestinal cell differentiation involves inhibition of nuclear nucleolin. *J. Cell. Physiol.* 206, 545–555.

Turck, N., Richert, S., Gendry, P., Stutzmann, J., Keding, M., Leize, E., Simon-Assmann, P., Van Dorsselaer, A., and Launay, J.-F. (2004). Proteomic analysis of nuclear proteins from proliferative and

differentiated human colonic intestinal epithelial cells. *Proteomics* 4, 93–105.

-U-

Uemura, A., Ogawa, M., Hirashima, M., Fujiwara, T., Koyama, S., Takagi, H., Honda, Y., Wiegand, S.J., Yancopoulos, G.D., and Nishikawa, S.-I. (2002). Recombinant angiopoietin-1 restores higher-order architecture of growing blood vessels in mice in the absence of mural cells. *J. Clin. Invest.* 110, 1619–1628.

Unemori, E.N., Ferrara, N., Bauer, E.A., and Amento, E.P. (1992). Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* 153, 557–562.

-V-

Vajkoczy, P., Farhadi, M., Gaumann, A., Heidenreich, R., Erber, R., Wunder, A., Tonn, J.C., Menger, M.D., and Breier, G. (2002). Microtumor growth initiates angiogenic sprouting with simultaneous expression of VEGF, VEGF receptor-2, and angiopoietin-2. *J. Clin. Invest.* 109, 777–785.

Vincenti, V., Cassano, C., Rocchi, M., and Persico, G. (1996). Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation* 93, 1493–1495.

Vivona, A.A., Shpitz, B., Medline, A., Bruce, W.R., Hay, K., Ward, M.A., Stern, H.S., and Gallinger, S. (1993). K-ras mutations in aberrant crypt foci, adenomas and adenocarcinomas during azoxymethane-induced colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 14, 1777–1781.

Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nat. Med.* 10, 789–799.

-W-

Wang, R., Chadalavada, K., Wilshire, J., Kowalik, U., Hovinga, K.E., Geber, A., Fligelman, B., Leversha, M., Brennan, C., and Tabar, V. (2010). Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature* 468, 829–833.

Wang, H.U., Chen, Z.F., and Anderson, D.J. (1998). Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell* 93, 741–753.

Whitelock, J.M., Murdoch, A.D., Iozzo, R.V., and Underwood, P.A. (1996). The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases. *J. Biol. Chem.* 271, 10079–10086.

Wilkinson, D.G. (2000). Eph receptors and ephrins: regulators of guidance and assembly. *Int. Rev. Cytol.* 196, 177–244.

Willett, W.C. (2005). Diet and cancer: an evolving picture. *JAMA* 293, 233–234.

Wolfe, M.S. (2006). The gamma-secretase complex: membrane-embedded proteolytic ensemble. *Biochemistry* 45, 7931–7939.

Wu, C., Ivars, F., Anderson, P., Hallmann, R., Vestweber, D., Nilsson, P., Robenek, H., Tryggvason, K., Song, J., Korpos, E., et al. (2009). Endothelial basement membrane laminin alpha5 selectively inhibits T lymphocyte extravasation into the brain. *Nat. Med.* 15, 519–527.

-X-

Xue, Y., Gao, X., Lindsell, C.E., Norton, C.R., Chang, B., Hicks, C., Gendron-Maguire, M., Rand, E.B., Weinmaster, G., and Gridley, T. (1999). Embryonic lethality and vascular defects in mice lacking the Notch ligand Jagged1. *Hum. Mol. Genet.* 8, 723–730.

-Y-

Yue, W.-Y., and Chen, Z.-P. (2005). Does vasculogenic mimicry exist in astrocytoma? *J. Histochem. Cytochem.* 53, 997–1002.

Yurchenco, P.D., Quan, Y., Colognato, H., Mathus, T., Harrison, D., Yamada, Y., and O'Rear, J.J. (1997). The alpha chain of laminin-1 is independently secreted and drives secretion of its beta- and gamma-chain partners. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 10189–10194.

Yurchenco, P.D., and Patton, B.L. (2009). Developmental and pathogenic mechanisms of basement membrane assembly. *Curr. Pharm. Des.* 15, 1277–1294.

-Z-

Zeisberg, E.M., Potenta, S., Xie, L., Zeisberg, M., and Kalluri, R. (2007). Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res.* 67, 10123–10128.

Zhang, T., Otevrel, T., Gao, Z., Ehrlich, S.M., Fields, J.Z., and Boman, B.M. (2001). Evidence that APC regulates survivin expression: a possible mechanism contributing to the stem cell origin of colon cancer. *Cancer Res.* 61, 8664–8667.

Zhu, Y., Richardson, J.A., Parada, L.F., and Graff, J.M. (1998). Smad3 mutant mice develop metastatic colorectal cancer. *Cell* 94, 703–714.

Zinkevich, N.S., Bosenko, D.V., Link, B.A., and Semina, E.V. (2006). laminin alpha 1 gene is essential for normal lens development in zebrafish. *BMC Dev. Biol.* 6, 13.

ANNEXES

LISTE DES PUBLICATIONS

Mammadova-Bach E, Jivkov I, Edwards M, Klein A, Méchine-Neuville A, Pisarsky L, Keding M, De Wever O, Ambartsumian N, Robine S, Simon-Assmann P, Orend G and Lefebvre O. Laminin alpha 1 promotes angiogenesis in colon cancer involving VEGFA and Notch signaling (submitted)

Simon-Assmann, P., Orend, G., **Mammadova-Bach, E.**, Spenlé, C., and Lefebvre O. Role of laminins in physiological and pathological angiogenesis. *Int. J. Dev. Biol.*, 55: 455-65, 2011

Edwards, M. M., **Mammadova-Bach, E.**, Alpy, F., Klein, A., Hicks, W. L., Roux, M., Simon-Assmann, P., Smith, R. S., Orend, G., Wu, J., Peachey, N. S., Naggert, J. K., Lefebvre O.* and Nishina, P. M.*, co-corresponding authors. Mutations in Lama1 disrupt retinal vascular development and inner limiting membrane formation. *J Biol Chem*, 285: 7697-7711, 2010

**REVUE : ROLE OF LAMININS IN PHYSIOLOGICAL AND
PATHOLOGICAL ANGIOGENESIS**

Role of laminins in physiological and pathological angiogenesis

PATRICIA SIMON-ASSMANN*, GERTRAUD OREND, ELMINA MAMMADOVA-BACH,
CAROLINE SPENLÉ and OLIVIER LEFEBVRE

INSERM, U682 and Université de Strasbourg, Strasbourg, France

ABSTRACT The interaction of endothelial cells and pericytes with their microenvironment, in particular with the basement membrane, plays a crucial role during vasculogenesis and angiogenesis. In this review, we focus on laminins, a major family of extracellular matrix molecules present in basement membranes. Laminins interact with cell surface receptors to trigger intracellular signalling that shapes cell behaviour. Each laminin exerts a distinct effect on endothelial cells and pericytes which largely depends on the adhesion receptor profile expressed on the cell surface. Moreover, proteolytic cleavage of laminins may affect their role in angiogenesis. We report *in vitro* and *in vivo* data on laminin-111, -411, -511 and -332 and their associated signalling that regulates cell behaviour and angiogenesis under normal and pathological conditions. We also discuss how tissue-specific deletion of laminin genes affects the behaviour of endothelial cells and pericytes and thus angiogenesis. Finally, we examine how coculture systems with defined laminin expression contribute to our understanding of the roles of laminins in normal and pathological vasculogenesis and angiogenesis.

KEY WORDS: *laminin, basement membrane, vasculogenesis, angiogenesis, cancer*

Introduction

The lumen of blood vessels is lined by endothelial cells (EC) that interact with a subendothelial basement membrane (BM) that is composed of a complex of several matrix proteins (Fig. 1; Eble and Niland, 2009), and contains growth factors and proteases. The interaction of EC with this microenvironment, especially with the BM components, plays an essential role during angiogenic processes (Ingberg, 1992). During development, blood vessels are formed by two distinct processes described as vasculogenesis and angiogenesis. Vasculogenesis characterizes the generation of vessels from mesodermally derived angioblasts. Angiogenesis describes the formation of vessels through sprouting from a pre-existing plexus (Risau and Flamme, 1995). Both events involve cell migration, proliferation and extracellular matrix (ECM) remodelling. Angiogenesis is also an essential event in tumour growth and metastasis. Similar to physiological angiogenesis, tumour angiogenesis is regulated by BM molecules in particular upon break-down and reconstitution of the vascular BM during tumour progression. Cells within a tumour can promote angiogenesis, e.g. by secretion of soluble and insoluble angiogenic factors as well as by modulating protease activities. In addition to soluble factors such as growth

factors and chemokines that can support or inhibit angiogenesis, matrix molecules of the BM also play a decisive role in angiogenesis. For example the interaction of EC with intact collagen IV promote angiogenesis whereas proteolytic fragments of collagen IV and other collagens counteract this process (for reviews see Kalluri, 2003; Davis and Senger, 2005; Hallmann *et al.*, 2005).

In this review we will focus on the role of LM in vasculogenesis and angiogenesis in normal tissue homeostasis and diseases. LM are multifunctional matrix molecules that are widely expressed forming the major scaffold of the BM (Yurchenco and Patton, 2009). LM display organ, site and developmental specificity (Miner and Yurchenco, 2004). They are cross-shaped trimers which are assembled into a triple-stranded coiled-coil structure. Up to 15 distinct

Abbreviations used in this paper: BM, basement membrane; CAM, chick chorioallantoic membrane assay; EC, endothelial cells; ECM, extracellular matrix; EHS, Engelbreth-Holm-Swarm; FGF, fibroblast growth factor; FGFR, fibroblast growth factor receptor; LM, laminin; MMP, matrix metalloproteinase; PDGF-(BB), platelet-derived growth factor-(BB); PDGF-R β , platelet-derived growth factor receptor β ; PTFE, polytetrafluoroethylene; TGF β , transforming growth factor β ; VE-cadherin, vascular endothelial-cadherin; VEGF, vascular endothelial growth factor; VEGFR, vascular endothelial growth factor receptor.

*Address correspondence to: Patricia Simon-Assmann. INSERM, U682, 3 avenue Molière, 67200 Strasbourg, France. Fax: 33-(0)3-88-26-35-38.
e-mail: Patricia.Simon-Assmann@inserm.fr - web: <http://u682-inserm.u-strasbg.fr>

isoforms have been described today and the functional differences of all LM is not well understood (Durbeej, 2010) (Fig. 1). Integrins, dystroglycan, syndecans and Lutheran are cellular receptors for LM (Barczyk *et al.*, 2009; Durbeej, 2010). The globular domains located in the N- and C-terminus of the LM α chains are critical for interactions with cellular receptors which trigger intracellular signalling (Suzuki *et al.*, 2005).

Determining the function of specific LM isoforms by genetic knockout experiments turned out to be difficult. In particular, early lethality was encountered upon knock-out of several α , β and γ chains (Gustafsson and Fässler, 2000; Li *et al.*, 2003; Rozario and DeSimone, 2010). Moreover, partial compensation by other

isoforms masks the function of the knocked out isoform (Simon-Assmann *et al.*, 2010). Furthermore, since LM are heterotrimeric molecules, it is difficult to assign a conclusive function to a particular $\alpha\beta\gamma$ combination upon deletion of a single chain by antibody staining. For example an anti-pan-LM antibody, that recognizes either the $\alpha 1$, $\beta 1$ or $\gamma 1$ chain, detects 11 distinct isoforms. Yet, specific single chain antibodies had been raised and are now available. They allowed to decipher expression of specific LM isoforms in blood vessels (Sixt *et al.*, 2001; Patarroyo *et al.*, 2002; Hallmann *et al.*, 2005). In most tissues, only LM-411 and LM-511 are found in the endothelial BM (Hallmann *et al.*, 2005). Since only certain LM isoforms are present in vascular BMs, it is assumed that they

TABLE 1

ROLE OF LAMININS IN ANGIOGENESIS - EXPERIMENTAL APPROACHES AND BIOLOGICAL RESPONSES

Experimental approach	Biological response	Reference
Laminin $\alpha 1$ chain		
Purified LM-111 Collagen assay Embryoid body assay CAM assay	Tube formation Angiogenesis Angiogenesis	Dixelius <i>et al.</i> 2004
Overexpression in human cancer cells Xenografting in nude mouse	Increased tumour angiogenesis	De Arcangelis <i>et al.</i> , 2001
Peptide IKVAV Cell adhesion assay <i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> Matrigel assays CAM assay Zymography	EC attachment Inhibition of tubulogenesis, inhibition of angiogenesis Angiogenesis Activation of proteolytic enzymes	Grant <i>et al.</i> 1992 and 1994 Kibbey <i>et al.</i> 1992 Stack <i>et al.</i> 1993 Faisal Khan and Falcone, 1997
Peptide A10, A13, A55, A64, A118, A119, A124, A203 Matrigel assay Aortic ring assay Boyden chamber assay	Tube inhibition Vessel sprouting Migration (A10, A55, A64)	Malinda <i>et al.</i> 1999 Kuratomi <i>et al.</i> 1999
Peptide AG73 CAM and aortic ring assay Immunoblotting	Angiogenesis, vessel sprouting Interaction with Syndecans	Mochizuki <i>et al.</i> 2007 Hoffman <i>et al.</i> 1998
RGD peptide Cell adhesion assay Matrigel assay	EC attachment, EC spreading Tube inhibition	Aumailley <i>et al.</i> 1991 Grant <i>et al.</i> 1989
Zebrafish with mutated Lama1	Delayed EC differentiation Defect in hyaloid vasculature	Semina <i>et al.</i> 2006
Mouse with mutated Lama1, and mouse with conditional Lama1 knockout	Defect in vessel formation Defect in hyaloid vasculature, Impaired angiogenesis	Edwards <i>et al.</i> 2010
Laminin $\beta 1$ chain		
Peptide B7, B49, B77, B97, B160 Matrigel assay Aortic ring assay Boyden chamber assay	Tube inhibition Vessel sprouting Migration (B160)	Malinda <i>et al.</i> 1999
Peptide YIGSR Matrigel assay CAM assay	Tube inhibition Inhibition of angiogenesis	Kubota <i>et al.</i> 1988, Grant <i>et al.</i> 1989 Sakamoto <i>et al.</i> 1991
Laminin $\gamma 1$ chain		
Peptide C16, C25, C30, C38, C64, C75, C102 Matrigel assay Cell adhesion and aortic ring assay CAM assay	Tube inhibition EC attachment, vessel sprouting Angiogenesis (C25, C30, C38, C64)	Ponce <i>et al.</i> 1999
Laminin $\alpha 4$ chain		
Blocking antibodies and recombinant protein Cell adhesion assay Matrigel assay <i>In vivo</i> Matrigel assay	EC adhesion, EC migration, Tube inhibition Stimulation of angiogenesis	Gonzales <i>et al.</i> 2001 Gonzalez <i>et al.</i> 2002
Overexpression in EC Scratch wound assay Collagen assay	EC spreading, EC migration Tube formation	Li <i>et al.</i> 2006
Blocking antibodies Proliferation assay TUNEL assay	Inhibition of proliferation Enhanced apoptosis	DeHahn <i>et al.</i> 2004
Knockout mouse Xenografting of cancer cells into Lama4 knockout mouse	Impaired microvessel maturation Increased tumor angiogenesis	Thyboll <i>et al.</i> 2002 Zhou <i>et al.</i> 2004
Laminin $\alpha 5$ chain		
Knockout mouse Recombinant LM-511 Cell adhesion assay Migration assay	Reduced vessel stability EC attachment EC migration	Miner <i>et al.</i> 1998; Miner, 2008 Doi <i>et al.</i> 2002
Purified LM-511/521 Embryoid body assay	No effect	Dixelius <i>et al.</i> 2004

Effects of LM chains on angiogenesis are summarised. Experimental approaches and biological responses of EC such as adhesion, migration and tube formation are presented for each LM as either the full length molecule or specific peptides. Standard procedures such as Boyden chamber assay, CAM assay, aortic ring assay, embryoid body assay, scratch wound assay, collagen assay, TUNEL assay (Cimpean *et al.*, 2011) as well as overexpression and gene ablation were applied to investigate the effect of the various LM on angiogenesis. Note that multiple peptides competed responses of cells toward LM-111 within Matrigel.

are critical for maintenance of vessel stability and/ or integrity. Formation of new vessels during angiogenesis requires degradation of the BM, a process in which EC are exposed to other LM isoforms such as LM-111, that are usually not expressed or weakly expressed in most healthy tissues but are present in the abnormal microenvironment. Most of the data reported in the present review, and summarized in Table 1, are based on *in vitro* and *in vivo* models that were applied to elucidate the angiogenic properties of LM (Cimpean *et al.*, 2011).

In vitro angiogenesis assays with reconstituted basement membrane proteins

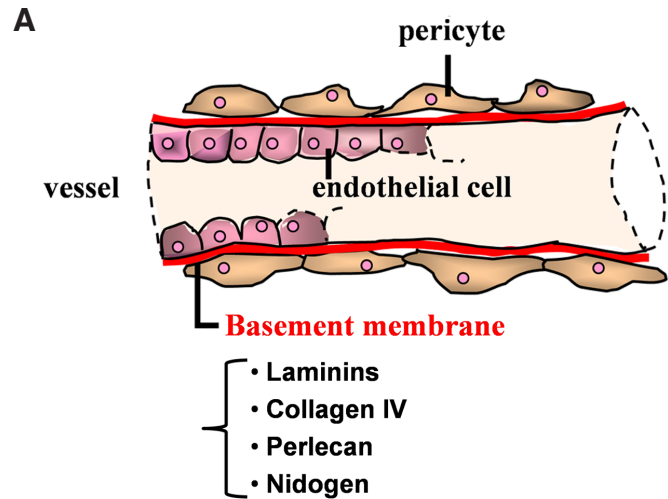
The first LM discovered was isolated from the matrix of the murine EHS tumour (Engelbreth-Holm-Swarm) and is now designated as LM-111 (Timpl *et al.*, 1979). The antibody raised against the EHS LM preparation, formed by $\alpha 1$, $\beta 1$ and $\gamma 1$ chains, was considered to exclusively recognize LM-111 which turned out to be wrong. Indeed, several LM isoforms share the $\alpha 1$, $\beta 1$ or γ chain and therefore can be recognized by the anti-pan laminin antibody. Yet, by using $\alpha 1$ chain-specific antibodies it had been observed that $\alpha 1$ -containing LM are not ubiquitously expressed in BM but exhibit a limited distribution. This is in contrast to $\beta 1\gamma 1$ -containing LM forming trimers with α chains other than $\alpha 1$ that are found ubiquitously in BM. LM-111 is expressed during early embryogenesis (Sasaki *et al.*, 2002) where it plays an essential role in developing kidney tubules, lung alveoli and submandibular glands (Ekblom *et al.*, 2003). LM-111 is essential for embryogenesis due to its expression in the extraembryonic Reichert's BM. Thus it is not surprising that Lama1 knockout mice die by embryonic day 7 (Miner *et al.*, 2004; Alpy *et al.*, 2005). Despite a restricted expression in the adult, LM-111 is expressed in polarized tissues such as the mammary gland and the intestine, which suggests an essential role in cellular polarization in tissues with a high turnover and remodelling (Simo *et al.*, 1991; Streuli *et al.*, 1995; Virtanen *et al.*, 2000; Simon-Assmann *et al.*, 2010). But how LM-111 would induce or regulate polarization is unknown.

Several studies have characterised the behaviour of cells when placed on natural or reconstructed BM. The most widely used example is Matrigel, a commercialized cell culture matrix, extracted from the EHS tumour. EC cultured on Matrigel cease to proliferate, align and form capillary-like structures (Kubota *et al.*, 1988; Pauly *et al.*, 1992). Furthermore, Matrigel has been demonstrated to support the formation of tubules from EC *in vitro* as well as vascular networks when implanted into mice (Passaniti *et al.*, 1992; Garrido *et al.*, 1995). One major application of Matrigel is to support tumour grafting in murine xenograft experiments (Kleinman and Martin, 2005). Yet, due to several growth factors and other components in Matrigel, conclusions to what molecule the result relates to should be taken with caution (Hughes *et al.*, 2010). As LM-111 is the major glycoprotein found in Matrigel, several studies aimed to define its precise function in regulating angiogenesis. In particular, LM-111 recombinant proteins, proteolytic fragments and synthetic peptides have been generated and were used to identify and characterize functional domains of the molecule.

Pro-angiogenic properties of sequences within the laminin $\alpha 1$ chain

It has been shown that matrix-derived synthetic peptides, corresponding to active sites in proteins, could have biological activities

on their own. Using synthetic peptides from the $\alpha 1$ chain, Grant *et al.*, (1992, 1994) had demonstrated that an IKVAV (Ile-Lys-Val-Ala-Val) containing-peptide (Fig. 2) promoted EC migration and invasion into Matrigel and increased angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane assay (CAM). The angiogenic activity of this IKVAV-containing peptide was further confirmed in an *in vivo* model when the peptide was co-injected with melanoma cells



B

Laminin isoforms

Name	Chain composition
Laminin-111	$\alpha 1\beta 1\gamma 1$
Laminin-121	$\alpha 1\beta 2\gamma 1$
Laminin-211	$\alpha 2\beta 1\gamma 1$
Laminin-213	$\alpha 2\beta 1\gamma 3$
Laminin-221	$\alpha 2\beta 2\gamma 1$
Laminin-311	$\alpha 3\beta 1\gamma 1$
Laminin-321	$\alpha 3\beta 2\gamma 1$
Laminin-332	$\alpha 3\beta 3\gamma 2$
Laminin-411	$\alpha 4\beta 1\gamma 1$
Laminin-421	$\alpha 4\beta 2\gamma 1$
Laminin-423	$\alpha 4\beta 2\gamma 3$
Laminin-511	$\alpha 5\beta 1\gamma 1$
Laminin-521	$\alpha 5\beta 2\gamma 1$
Laminin-522	$\alpha 5\beta 2\gamma 2$
Laminin-523	$\alpha 5\beta 2\gamma 3$

Fig. 1. The basement membrane constituents in vessels and presentation of the laminin family. (A) In a quiescent capillary a BM separates endothelial cells from supporting cells such as pericytes and the connective tissue. The BM is composed of 4 major types of molecules: LM, collagen type IV, perlecan and nidogen. **(B)** The 15 different LM isoforms are composed of α , β and γ chains forming heterotrimers. Name and chain composition are presented.

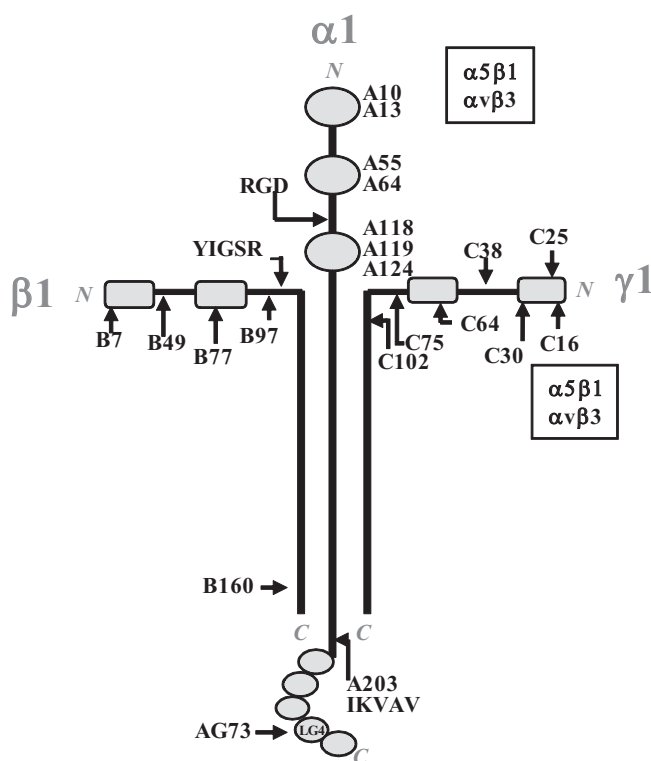


Fig. 2. Schematic model of the LM-111 molecule ($\alpha 1\beta 1\gamma 1$) and its peptide domains active on endothelial cells (EC). The location of LM-111 synthetic peptides that act on angiogenesis is indicated by arrows. Most of the identified peptides located on the α , β or γ arm of LM (designated respectively by A, B or C letters) are positively regulating EC behaviour. Peptide YIGSR located on the $\alpha 1$ chain inhibits angiogenesis. Peptides A13 or C16 bind to integrin $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$ receptors whereas intact LM-111 does not bind to these integrins. Note that B7 peptide is located within the putative signal sequence of the $\beta 1$ chain. Globular domains of LM-111 are represented in grey. N, amino terminus domain; C, carboxy terminus domain; LG4, LM C-terminal G domain (module 4).

and Matrigel into nude mice. Under this condition, the peptide enhanced tumour vascularisation as well as tumour growth over that observed with melanoma cells or Matrigel alone (Kibbey *et al.*, 1992). In order to identify additional active sites within the LM molecule, a screen was performed on 405 synthetic partially overlapping peptides that were derived from the $\alpha 1$ chain (Nomizu *et al.* 1995; Malinda *et al.*, 1999). Using the HUVEC tube formation and EC rat aortic ring sprouting assay, eight peptides A10, A13, A55, A64, A118, A119, A124 and A203 were found to be active in angiogenesis (Fig. 2). Of interest is the fact that the $\alpha 1$ chain peptides are predominantly clustered in the first, second and third globular domain (Malinda *et al.*, 1999). The A13 peptide (RQVFQVAYIIKA), which was the most active in the angiogenesis assays, also promoted melanoma lung colonization (Kuratomu *et al.*, 1999).

The synthetic peptide AG73 derived from the LM $\alpha 1$ chain carboxy-terminal globular domain (G domain, LG4 module) (Fig. 2) turned out to be a very potent stimulator of angiogenesis (Mochizuki *et al.*, 2007). Again, this peptide promoted angiogenesis in the aortic ring and in the CAM assays. Interestingly, peptides with homologous sequences in LM $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ or $\alpha 5$ chain were

not as angiogenic as was AG73 (Mochizuki *et al.*, 2007) which suggests a particular role of the intact as well as the proteolysed LM $\alpha 1$ chain in angiogenesis.

In accordance with this pro-angiogenic effect of the LM $\alpha 1$ chain, its overexpression by transfection in human colon adenocarcinoma cells increased angiogenesis and growth of the arising tumours and promoted recruitment of stromal cells (De Arcangelis *et al.*, 2001; Fig. 3 panel I). In contrast, mutated versions of Lama1 in zebrafish morphants delayed or reduced EC differentiation, formation of capillaries as well as blood flow in the hyaloid vasculature (Semina *et al.*, 2006). In mice with a recessive mutant Lama1 gene that was generated by chemical mutagenesis, EC development was also delayed. A more severe phenotype was observed in a Lama1 null mouse mutant that derived from Sox2-cre induced deletion of the floxed Lama1 gene (Fig. 3 panel II). These mice were blind and exhibited tortuous vessels with persistence of hyaloid vessels in the retina (Edwards *et al.*, 2010). This observation points at a crucial role of the LM $\alpha 1$ chain in proper retinal blood vessel development.

Pro- and anti-angiogenic properties located within the laminin $\beta 1$ chain

As for the $\alpha 1$ chain, short synthetic peptides from the $\beta 1$ chain of LM were screened for their potential effect on EC adhesion in Matrigel, the aortic ring and the Boyden chamber assays (Nomizu *et al.* 1995; Malinda *et al.*, 1999). Five peptides of the $\beta 1$ chain, B49, B77, B97, B160 and B7, were found to be active in angiogenesis (Fig. 2). Yet, another sequence (YIGSR) located in the $\beta 1$ chain had an opposite biological activity since it inhibited angiogenesis (Fig. 2). Kubota *et al.*, (1988) and Grant *et al.*, (1989) found that a peptide containing the YIGSR sequence blocked the morphological differentiation of EC into capillary-like structures. This peptide also inhibited embryonic angiogenesis in the CAM assay (Sakamoto *et al.*, 1991). Of interest is the fact that this peptide also inhibited experimental metastasis formation of melanoma cells (Iwamoto *et al.*, 1987) suggesting that this peptide may not only block angiogenesis but also other steps during metastasis. Thus this peptide may potentially find application in cancer therapy.

Activation of signalling pathways in response to cell interactions with laminin-111

Binding of angiogenic peptides of the laminin $\alpha 1$ and $\gamma 1$ chains to $\alpha v\beta 3$ and $\alpha 5\beta 1$ integrins

To search for angiogenic sequences 154 overlapping synthetic peptides were generated that span the entire LM $\gamma 1$ chain (Ponce *et al.*, 1999). The authors identified 7 peptides (C16, C25, C30, C38, C64, C75 and C102) that inhibited Matrigel-induced formation of capillary-like structures of EC by competition. Moreover, these peptides promoted angiogenesis in the aortic ring assay and in the CAM assay (Fig. 2). The most active peptide C16 (KAFDITYVRLK) bound to integrins $\alpha v\beta 3$ and $\alpha 5\beta 1$ (Ponce *et al.*, 2001). Unexpectedly, the angiogenic peptide A13 located in the N-terminal globular domain of the LM $\alpha 1$ chain represented a redundant active site found in the C16 peptide (Ponce and Kleinman, 2003). Both peptides A13 and C16 bound to the same integrin and competed with each other in cell adhesion and angiogenesis. Binding of these peptides to integrins $\alpha v\beta 3$ and $\alpha 5\beta 1$ was rather surprising since these integrins are not classical LM receptors

(Avraamides *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2008). Since intact LM do not bind to these integrins it is likely that the A13 and C16 sequences represent cryptic sites. Whether and how they are released from the intact molecule is not known. Although A13 and C16 bound to integrins, they did not induce classical integrin signalling such as activation of mitogen-activated protein kinase or serine/threonine kinases (Ponce *et al.*, 2001). There is nothing known about what signalling is induced upon ligation of the integrins by these laminin peptides. It is intriguing that the A13 or C16 sequences are found in almost all LM isoforms: A13 in LM-111 and LM-121, and C16 in 11 out of the 15 isoforms. This high conservation may indicate the importance of this sequence for development and angiogenesis.

In cancer, a peculiar mechanism of tumour cell dissemination was described where tumour cells migrated along the external surface of vessels; this mechanism is called extravascular migratory metastasis (Lugassy and Barnhill, 2007). In the CAM assay, the C16 peptide was shown to increase extravascular migration of human GFP labelled melanoma cells along vessels although it was not addressed whether it affected angiogenesis (Lugassy *et al.*, 2009). Because of the putative significance of this LM γ 1 sequence in modulating angiogenesis, Ponce *et al.*, (2003) had searched for a more potent peptide and discovered C16Y which was five times more active. Intraperitoneal injections of this peptide also inhibited angiogenesis and growth of xenografted breast cancer cells in mice. The minimal active sequence of C16Y was identified as DFKLFAVY and presumably functions as an antagonist for integrins α v β 3 and α 5 β 1 during angiogenesis. Since these integrins are a target in cancer therapy the described LM sequences blocking these integrins have a potential for drug development.

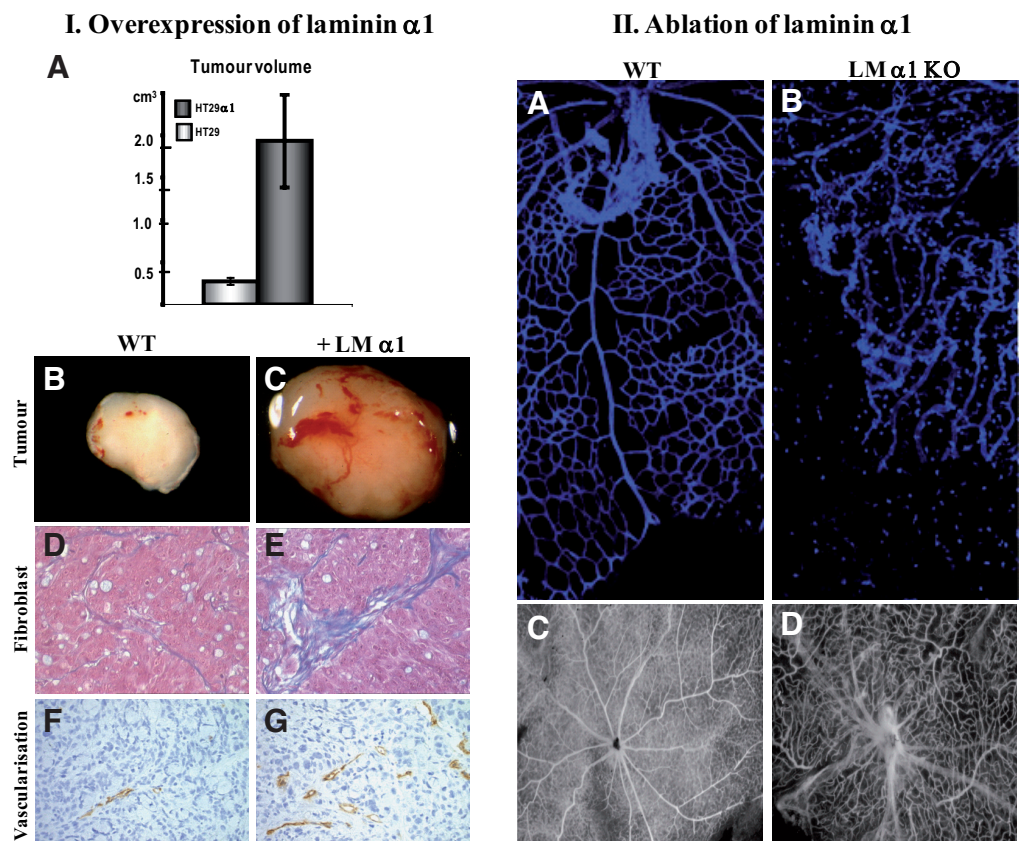
A cryptic RGD domain in the laminin α 1 chain

Binding of various integrins to extracellular ligands is a major initial event in cell-matrix interactions. EC and pericytes express a large subset of integrins that include typical LM receptors such as α 2 β 1, α 3 β 1, α 6 β 1, α 6 β 4, α 7 β 1 (Avraamides *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2008). Interestingly, the repertoire of integrins on EC changes during angiogenesis (Silva *et al.*, 2008). Among these are integrins that recognize the well-known cell-adhesive RGD (Arg-Gly-Asp) site in matrix molecules. Yet, RGD sequences are rarely found in laminins. In the mouse α 1 chain, a cryptic RGD site was identified and was located in the fragment P1 upon pepsin digestion (Aumailley *et al.*, 1991). Although some conflicting results exist in the literature regarding the implication of this RGD site in regulating cell adhesion of EC to LM, it was shown that the differentiation of EC into tube-like structures required an initial integrin-dependent attachment to an RGD-containing sequence present in LM α 1. This initial integrin-mediated interaction was followed by a cell-cell interaction through the YIGSR sequence on the LM β 1 chain (Grant *et al.*, 1989; Aumailley *et al.*, 1991). Thus proteolytic release of the RGD sequence from the α 1 chain was necessary for cell adhesion. This raises the question about the role of this mechanism in normal tissue where proteolytic activity is low. Yet, this mechanism might be relevant in inflammatory and tumorigenic tissues that exhibit a high proteolytic activity.

Signalling events triggered by cell adhesion to laminin-111

It is not yet clear how small peptides or the entire LM-111 molecule exhibit a biological response. In the CAM assay, Dixelius *et al.*, (2004) demonstrated that intact LM-111 was as potent as FGF-2

Fig. 3. Documentation of the pro-angiogenic properties of the LM α 1 chain. (Panel I) Ectopic expression of LM α 1 under control of the cytomegalovirus promoter in HT29 colorectal carcinoma cells that do not express endogenously LM α 1 in cell culture. Overexpression of LM α 1 caused an increased tumour growth (A;C versus B), a strong recruitment of fibroblasts (Masson's Trichrome staining), (E,D) and enhanced angiogenesis (immunostaining for CD31) (G,F) upon xenografting under the skin of nude mice (De Arcangelis *et al.*, 2001). (Panel II) The absence of LM α 1 in knockout mice interfered with normal blood vessel development in the retina (Edward *et al.*, 2010). Retinas from postnatal day 7 LM α 1 knockout mice (B) exhibited a poor primary retinal plexus in contrast to wildtype mice that showed an organised vasculature with capillaries and small branched vessels (A) as visualised with Griffonia simplicifolia isolectin staining. Abnormal blood vessel organisation is still obvious in the adult stage as visualised by staining for ADPase showing tortuous capillaries and larger vessels extending into the vitreous (D,C).



to induce angiogenesis, that vascular development in embryoid bodies was stimulated in a synergistic manner by FGF-2 together with LM-111, and that formation of tubular structures was accompanied by increased expression of Jagged-1, a ligand of the Notch receptor family and a marker of endothelial differentiation. They further showed that the combined presence of LM-111 and FGF-2 led to a transient increase of FGFR-1, VEGF-A and VEGFR-2 mRNA levels. Yet, LM-111 failed to activate classical angiogenic growth factor-induced signalling such as phospho-ERK-1/2 or phospho-Akt. Cell attachment to LM is mediated by cell adhesion receptors such as integrins, syndecans, dystroglycan and Lutheran (Durbeej, 2010). Although studies were not done with EC, one can assume that the pro-angiogenic A13 peptide of the $\alpha 1$ chain likely binds to an integrin containing the $\beta 1$ subunit since an interaction of A13 with a $\beta 1$ integrin was found in HT-1080 human fibrosarcoma cells and hepatocytes (Nomizu *et al.*, 1998; Kikkawa *et al.*, 2009). Moreover, the angiogenic AG73 peptide also found in the $\alpha 1$ chain, was shown to interact with members of the transmembrane syndecan family of proteoglycans, syndecan-1 and presumably syndecan-4 (Hoffman *et al.*, 1998; Mochizuki *et al.*, 2007) that are critical regulators of angiogenesis.

Potential role of proteolytic processing of laminin in angiogenesis

Except a role of Notch and VEGF signalling (Jakobsson *et al.*, 2009), little is known how EC are stimulated to form a branch from a parental vessel. The BM itself or BM associated factors and enzymes might play a decisive role in branching of capillaries. Matrix remodelling is a key step in vessel branching and LM-111 might play a role in this process. In particular, the IKVAV-containing peptide in the $\alpha 1$ chain was shown to promote endothelial collagenase IV activity (Grant *et al.*, 1992; Schnaper *et al.*, 1993). This peptide also increased plasminogen activation, resulting in the degradation of LM, as well as of matrix metalloproteinase MMP9 in melanoma cells and macrophages (Stack *et al.*, 1993; Faisal Khan and Falcone, 1997). An increased protease activity could also trigger release of matrix bound growth factors such as VEGF, FGF, PDGF and thus the action of IKVAV would be rather indirect. In contrast to the IKVAV peptide, all other angiogenic peptides derived from the globular domains of the LM $\alpha 1$ chain, including the A13 sequence, did not stimulate MMP activity in a zymogram assay (Malinda *et al.*, 1999).

Summary

Several sequences within the LM $\alpha 1$ -, $\beta 1$ - and $\gamma 1$ chains regulate angiogenesis. Some of them such as the RGD and IKVAV sites are presumably cryptic in the intact LM-111 molecule and need to be unmasked by proteases to be active. These sequences promote early steps in angiogenesis such as cell migration, formation of differentiated spindle-shaped cells, production of proteases, loss of contact inhibition, and expression of matrix molecules that facilitate cell attachment to the ECM (Grant *et al.*, 1994). Another class of pro-angiogenic peptides located in the N-terminal domain of the LM $\alpha 1$ chain, such as the A13 peptide, is also active in context of the intact molecule and may be accessible upon a conformational change. The reason for the large number of pro-angiogenic peptides in LM-111 is not clear. Depending on the surrounding microenvironment and proteolytic activities, alternative peptides may be generated from the LM $\alpha 1$ chain which may modulate angiogenesis

by different mechanisms. Finally, synthetic peptides of LM-111 could be used to improve our understanding of the biological functions of this laminin in angiogenesis and may provide the basis for drug development to regulate angiogenesis in pathological situations.

The laminin $\alpha 4$ chain regulates endothelial cell behaviour and angiogenesis

The LM $\alpha 4$ chain is a component of two laminins, LM-411 ($\alpha 4\beta 1\gamma 1$) and LM-421 ($\alpha 4\beta 2\gamma 1$) and is widely distributed in vascular endothelial BMs of several tissues. Since the $\beta 2$, $\beta 3$, $\gamma 2$ and $\gamma 3$ chains have not been found in capillaries, LM-411 is presumably the only LM trimer in the capillary BMs of most embryonic and neonatal tissues (Hallmann *et al.*, 2005). The widespread and exclusive expression of the $\alpha 4$ chain in BM of developing microvessels suggests a role in angiogenic processes. Indeed, it was shown that the LM $\alpha 4$ subunit has a strong impact on EC behaviour (Gonzales *et al.*, 2001; Gonzalez *et al.*, 2002). In addition it was demonstrated that the G domain of LM $\alpha 4$ is a specific high affinity ligand for $\alpha v\beta 3$ and $\alpha 3\beta 1$ integrins. These two integrins together with the $\alpha 6\beta 1$ integrin cooperatively mediate EC interactions with $\alpha 4$ containing LM by promoting cell adhesion and migration (Gonzalez *et al.*, 2002). Similarly, the overexpression of the LM $\alpha 4$ chain in human dermal microvascular EC promoted cell spreading and migration in a scratch wound assay and accelerated angiogenic tube formation in collagen gel overlay assays (Li *et al.*, 2006). By using a panel of dominant-negative mutants of Rho family GTPases, Fujiwara *et al.*, (2004) showed the importance of Rac activation in $\alpha 6\beta 1$ integrin-mediated EC adhesion and migration on LM-411. Other *in vitro* studies suggested that the $\alpha 4$ LM chain can directly regulate cell proliferation and inhibit apoptosis. In particular an antibody directed against the G domain was able to trigger a mitochondrial-dependent programmed cell death pathway in EC (DeHahn *et al.*, 2004) which suggests that cell binding to the LM $\alpha 4$ chain is essential for survival. The authors further showed that the anti-apoptotic signal emanating from the interaction with the $\alpha 4$ LM chain was transduced via integrin $\alpha 3\beta 1$ and/or $\alpha 6\beta 1$.

Studies of LM- $\alpha 4$ deficient mice revealed that this chain is not required for blood vessel formation; yet, Lama4 knock-out mice displayed certain vascular abnormalities. In particular they exhibited an unstable and weakened capillary BM. Rupturing of the microvascular wall led to mild transient haemorrhages in the skin of newborn mice. Within the first week after birth, however, the vascular phenotype of Lama4 deficient mice disappeared most likely due to compensation by LM-511 which was largely deposited under these conditions (Thyboll *et al.*, 2002). In adult Lama4 null corneas, the formation of new blood vessels was dramatically affected. In response to FGF-2 an extensive bleeding and disorganisation of the microvessel growth was observed in Lama4 deficient corneas (Thyboll *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2004). In contrast to most microvessels where the $\alpha 4$ chain is produced by EC, in the kidney LM $\alpha 4$ is expressed by specialized pericytes, the mesangial cells. In Lama4 null mice the lack of the LM $\alpha 4$ chain caused a progressive renal lesion which was presumably due to deregulated PDGF-R β signalling. In consequence pericyte recruitment and vessel lining was reduced (Abrass *et al.*, 2010).

Comparing the expression between normal brain tissue and gliomas using a gene array approach combined with qRT-PCR and immunohistochemical staining revealed that the Lama4 gene was

consistently overexpressed in the tumorigenic blood vessels as opposed to low levels found in normal brain tissue (Ljubimova *et al.*, 2001). Moreover, in gliomas, LM-411 potentially plays a role in tumour regrowth since a high LM-411 expression correlated with a more rapid recurrence, but the underlying mechanism is unknown. Data suggest that during tumour progression a switch from β 2-containing LM to LM with a β 1 chain occurs. Indeed, normal blood vessels of brain and breast tissue expressed LM-421 which was in contrast to vessels in high grade gliomas and breast carcinoma that expressed LM-411 (Fujita *et al.*, 2005; Ljubimova *et al.*, 2006).

Yet, opposing data on the role of LM α 4 on tumour angiogenesis were obtained by Zhou *et al.*, (2004). To determine the role of LM-411 in tumour growth and angiogenesis, they xenografted lung carcinoma cells under the skin of a Lama4 knockout mouse. Under these conditions the absence of host LM α 4 accelerated tumour growth in comparison to control mice expressing the Lama4 gene. This was accompanied by an increased tumour vascularisation in the Lama4 knockout mice. These surprising data could be due to compensation by other LM such as α 5 or α 1 which may be induced in the absence of LM α 4. An expression analysis of other α chains in tumours of Lama4 knockout mice may clarify this issue.

Potential role of laminin α 5 during angiogenesis

LM α 5 expression is developmentally regulated in vessels. In the mouse embryo, the α 5 chain is only detected in large vessels; its expression in capillaries becomes evident only at 3-4 weeks after birth (Sorokin *et al.*, 1997). Data on the influence of α 5-containing LM on angiogenesis are still fragmentary and not conclusive. Targeted inactivation of the Lama5 gene encoding the LM α 5 chain resulted in disturbed placental vessel development (Miner *et al.*, 1998). As the Lama5 knockout embryo died at day 17, no data on later stages are available. But in the very early Lama5 knockout embryo it appears that the lack of this LM chain affects vessel stability and / or maturation (Miner, 2008). Using recombinant human LM-511 as substratum, Doi *et al.*, (2002) showed that human vein EC adhered and migrated on this LM molecule in an integrin α 2 β 1- and α 3 β 1-mediated manner. Quantitative cell adhesion assays revealed that cells bound to LM-511 upon ligation of β 1 and α v β 3 integrins which acted in concert with Lutheran, another α 5 specific transmembrane adhesion receptor (Vainionpää *et al.*, 2006). Yet, α 5-containing LM seems to be unable to stimulate angiogenesis in the embryoid body model when ES cells were cultured together with purified LM. This is in contrast to LM-111 that had strongly induced angiogenesis (Dixelius *et al.*, 2004).

It is possible that there is a balance between LM α 4 and LM α 5 chains since both are expressed in blood vessels. In the Lama4 knockout situation, compensation by the α 5 chain presumably rendered mice viable. In contrast, Lama5 knockout mice are embryonic lethal despite local compensation in certain organs by other LM (Miner *et al.*, 1998; Bolcato-Bellemin *et al.*, 2003). No data are available regarding the vessel BM composition in the Lama5 mutants. In Lama4 knockout mice an increased expression of LM α 5 was found that presumably stabilized the vessels. But these vessels were far from normal since they were dilated and fragile which may explain why mice developed cardiomyopathy with increased age (Thybolli *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2006b). A well controlled balance between LM α 4 and LM α 5 chain expression in the endothelial BM was demonstrated in an experimental autoimmune

encephalomyelitis model (Wu *et al.*, 2009). The authors showed that focal extravasation of leukocytes via integrin α 6 β 1 was due to the patchy distribution of LM α 5 in the BM. Transmigration of leukocytes occurred preferentially at sites that expressed high α 4 containing LM but low amounts of α 5 LM showing for the first time an instructive role of endothelial BM on T lymphocyte migration.

To identify adhesive sequences within LM α 5, 113 overlapping synthetic peptides of the globular domains had been tested in cell attachment assays (Hibino *et al.*, 2004). Four peptides (A5G27, A5G73, A5G81, A5G101) were found to inhibit FGF-induced angiogenesis in the CAM assay. One of these peptides, A5G27, was able to bind the CD44 receptor that is present on EC and inhibited angiogenesis in a dominant-negative manner. It is interesting to note that CD44 is expressed in the vasculature of tumours as a result of an exposure to angiogenic factors such as bFGF and VEGF (Griffioen *et al.*, 1997). Whether this peptide is generated *in vivo* or whether the A5G27 sequence is binding to CD44 in context of the intact LM molecule is not known. This information would be useful for tumour angiogenesis intervention strategies.

Laminin-332 in matrix channels and the vasculature

LM-332, composed of an α 3, β 3 and γ 2 subunit, is typically expressed in the BM of epithelial tissues such as skin, stomach, lung, breast and intestine. In stratified epithelia such as the skin, LM-332 is detected in type I hemidesmosomes, adhesion structures containing α 6 β 4 integrin, cytokeratins and several hemidesmosomal proteins (de Pereda *et al.*, 2009). Because LM-332 plays a key role in controlling migration of cells (Giannelli and Antonaci, 2001), it is possible that it plays a similar role in mesodermal tissues. The γ 2 chain, found in LM-332 and LM-522, is expressed in the intestinal smooth muscle coat (Orian-Rousseau *et al.*, 1996) and at low levels in the tunica media of aorta and pulmonary arteries (Kingsley *et al.*, 2002a). Interestingly these vascular smooth muscle cells responded to soluble growth factors such as PDGF and TGF- β 1 by increasing their endogenous levels of LM-332 while reducing adhesion to this substratum (Kingsley *et al.*, 2002a). PDGF-BB enhanced cell migration of vascular smooth muscle cells on LM-332 via an ERK1/2 signalling pathway (Kingsley *et al.*, 2002b). The importance of the mesenchyme-derived cells in producing and secreting LM-332 is further supported by interspecies tissue recombination experiments using endodermal and mesenchymal anlagen of mouse and chicken, respectively. Species-specific antibodies were used to show that the LM γ 2 chain was deposited by the mesenchymal cells only (Orian-Rousseau *et al.*, 1996). These data suggest that LM γ 2-containing LM might be important for mesodermal tissue identity.

The available literature regarding the function of LM-332 in vascular biology is limited. Adhesion of cells to LM-332 appears to promote migration through integrin α 3 β 1 and to facilitate hemidesmosome formation through integrin α 6 β 4 (Litjens *et al.*, 2006). Kikkawa *et al.*, (1996) showed that EC bound to this isoform (formerly called ladsin) via integrin α 3 β 1 and this interaction increased cell migration. In contrast, Homan *et al.*, (1998) demonstrated that a LM-332 rich matrix in concert with integrin α 6 β 4 and vimentin promoted the assembly of stable hemidesmosome-like adhesion structures in EC. This knowledge is already applied in bioengineering of biomedical implants (Kidd and Williams, 2004; Kidd *et al.*, 2005). It was shown that LM-332 enriched polytetrafluoroethylene

(PTFE) scaffolds (a porous polymer that permits vessel ingrowth through the pores of the material) increased tissue vascularisation. More importantly, the authors had shown that LM-332 accelerated neovascularisation upon implantation of the PTFE scaffolds into the mouse (Kidd *et al.*, 2005).

In highly aggressive melanomas, cells form a matrix network that appears to be connected to the vasculature and that has been coined "vasculogenic mimicry" (Maniotis *et al.*, 1999) or tubular channel formation (Kaariainen *et al.*, 2006). These conducting structures are rich in LM γ 2 containing laminins but are not lined by EC thus potentially recapitulating embryonic vasculogenesis (Hendrix *et al.*, 2003). These channels may play a role in transporting plasma and blood and potentially serve as short distance route for tumour cells (Kaariainen *et al.*, 2006). Interestingly, a high level of similarity between the vasculogenic mimicry of tumours and the ancestral vascular tube formation -found in the invertebrate blood vessels- was noted (Kucera *et al.*, 2009). Similar to the invertebrate blood vessels, LM-containing ECM lined these vessels within the tumour. Upregulation of the *lamc2* gene (encoding the γ 2 chain) and of other genes implicated in angiogenesis and vasculogenesis such as cadherin 15, ephrin receptor A2 and several MMPs was found in aggressive melanoma cells (Seftor *et al.*, 2001; Hendrix *et al.*, 2003). An important role of γ 2 LM in tube formation was demonstrated upon reducing expression of this isoform by an antisense oligonucleotide knockout strategy in aggressive melanoma cells. Downregulation of the LM γ 2 chain resulted in the inability to form vasculogenic-like networks in 3D-cultures (Seftor *et al.*, 2001). A similar matrix-based tube formation had been described in various carcinomas (Hendrix *et al.*, 2003; Kucera and Lammert, 2009). The potential role of LM γ 2 in tumour angiogenesis is unknown. It is interesting to note that cathepsin S cleaved the γ 2 chain giving rise to pro-migratory fragments (Giannelli and Antonaci, 2001). Deficiency of cathepsin S in the RIP1-Tag2 model of pancreatic islet carcinogenesis impaired angiogenesis (Wang *et al.*, 2006a).

Role of laminin during basement membrane assembly in angiogenesis

An important step in angiogenesis is the formation of an endothelial lumen giving rise to a tube. On their basal surface EC are first in contact with the BM which maintain the tube structure. This BM and in particular LM appear to be instrumental in forming capillary-like structures (Kubota *et al.*, 1988) by potentially serving as guiding cue for pericytes that will extend cellular processes to contacting EC (von Tell *et al.*, 2006). The recruitment of pericytes to EC-lined tubes will stabilize the vessels and lead to neosynthesis and assembly of BM molecules (Davis *et al.*, 2007) which had been nicely demonstrated in a coculture assay (Stratman *et al.*, 2009). By using species-specific primers in heterospecific cocultures (human EC with bovine pericytes) it was shown that certain LM chains were induced which did not occur if each cell type was cultured alone (Stratman *et al.*, 2009). In particular the α 4, α 5, β 2 and γ 1 chains were induced in the coculture setting which points at a possible role of the associated LM, most importantly LM-511 and LM-521 in vascular BM assembly (Miner and Yurchenco, 2004). Coincident with these events, upregulation of integrins α 5 β 1, α 3 β 1, α 6 β 1 and α 1 β 1 occurred in EC-pericyte cocultures that may strengthen the physical interaction between cells and their substratum (Stratman *et al.*, 2009). These findings confirm the essential role of hetero-

typic cell-cell interactions in controlling BM matrix assembly, a phenomenon not restricted to the vascular BM (Simon-Assmann *et al.*, 2010). These data also emphasise the active participation of pericytes in vessel stabilisation since they are able to produce multiple LM isoforms and type IV collagen (Jeon *et al.*, 1996). The tight interaction between pericytes and EC is presumably further stabilized by cell-cell contacts through integrins and the vascular cell adhesion molecule 1 (Desgrosellier and Cheresh, 2010). Importantly, abnormal interactions of pericytes with EC or the complete lack of pericytes play a role in the pathogenesis of some diseases such as cancer and diabetes (Davis *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2010).

Another example of an important role of BM molecules in the vasculature had been described in the endocrine pancreas (Nikolova *et al.*, 2006). The authors showed that EC provided pancreatic β -cells with a vascular BM which was essential for proliferation and insulin secretion. First, β -cells secreted VEGF-A which attracted EC and triggered formation of a LM-rich BM coat around the capillaries. Subsequently, integrin mediated β -cell interactions with LM promoted insulin expression and β -cell proliferation. In summary it appears that a coordinated binding of cells to LM and other BM components serves as prerequisite for a stable interaction between EC and pericytes that would allow vessel maturation as well as insulin secretion of the endocrine pancreas.

Conclusion and future perspectives

Angiogenesis is a complex process that involves many participants. Amongst them the LM within the BM not only provide a structural basis but also trigger cellular signalling, thus supporting or inhibiting vessel formation. These opposing effects of LM on angiogenesis do reside in their structural configuration that differs if LM are linked to other BM molecules or to cell adhesion receptors. Also cell responses are different if the LM are present as intact molecules or as peptides. The use of recombinant LM proteins or peptides allowed to decipher cell binding sites on individual LM chains. This approach did not take into account glycosylation and the native folding found in the entire molecule, and thus might have missed some interactions. Nevertheless, the fact that some of these sequences were cryptic points to the notion that proteolysis within the tissue is important to generate active or inactive sites. Proteolytic processing of LM appears to be particularly important in tumour angiogenesis.

Since BM are critically involved in blood vessel formation in normal and pathological tissue homeostasis their components are currently an area of intensive research for identification of novel anti-cancer therapies and controlled angiogenesis in tissue repair. One difficulty to encounter is that vascular BMs in distinct tissues and organs exhibit different compositions. In contrast to most organs that express LM-411 and LM-511, blood vessels in the central nervous system express LM-111 and LM-211 (Ljubimova *et al.*, 2001). Under pathological conditions such as in tumour vessels other LM isoforms are expressed than in normal tissue. In particular α 2, α 3 and β 2 containing LM are frequently found in tumour microvessels while they are usually not expressed in healthy tissues (Patarroyo *et al.*, 2002). In addition to LM, also other molecules of the BM are critically involved in regulating vessel homeostasis. Type IV collagen is one such molecule that directly interacts with LM which may affect cell responses to LM. Moreover, in contrast to full length type IV

collagen that supports and promotes angiogenesis, peptides of the N-terminal domain of collagen type IV, known as arrestin, canstatin and tumstatin, are potent inhibitors of angiogenesis (Kalluri, 2003). Similar ambiguous properties, supporting angiogenesis as intact molecule but inhibiting angiogenesis when presented as peptides may also apply to LM. Yet, the underlying mechanisms need to be investigated in more detail.

In the future, a combination of complete or conditional deletion of LM-subunit genes in EC and pericytes will further improve our understanding of the particular function of LM in developmental and pathological angiogenesis. In this respect transgenic mice expressing Cre recombinase by cell type specific promoters such as the EC specific Tie-1, Tie-2, VE-cadherin promoters or the pericyte specific PDGF-R β promoter will be useful to remove floxed LM genes.

Finally, the knowledge about the function of LM in the BM of the vasculature can also be used for tissue engineering and tissue repair. Cells derived from host organs are hampered to assemble into a functional tissue without a proper scaffold of a BM and connective tissue. In mice Matrigel presents a scaffold that supports growth of grafted cells (Kleinman and Martin, 2005). But for tissue engineering in humans the mouse-derived Matrigel cannot be used since it would raise an antigenic response. Therefore artificial biomimetic matrices have to be designed to support BM assembly and cell attachment that would provide signals for cell growth and differentiation (Lutolf and Hubbell, 2005). One step in direction of tissue engineering had been done by Nakamura *et al.*, (2008 and 2009). The authors had developed biomimetic supports with collagen-binding activities that promoted the formation of a vascular network to provide artificial tissue substitutes as an alternative for donor tissue and organs.

Acknowledgments

The recent author's work has been supported by Inserm and grants from INCa (Institut National contre le Cancer) and ARC (Association pour la recherche sur le Cancer) to PSA and GO. PSA and OL were supported by grants from the Ligue Contre le Cancer. GO acknowledges support from University of Strasbourg and the CHU Strasbourg. CS and EM-B are recipients of grants from Ligue Contre le Cancer and the Atropatena Technological Equipment Company (Azerbaijan Republic), respectively. We also like to thank M. Kedinger for her constant support, C. Arnold and A. Klein for their skilful technical assistance throughout the years and Dr MM Edwards (Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA) for sharing data concerning the angiogenic properties in retina.

References

- ABRASS CK, HANSEN KM, PATTON BL (2010). Laminin alpha4-null mutant mice develop chronic kidney disease with persistent overexpression of platelet-derived growth factor. *Am J Pathol* 176: 839-849.
- ALPY F, JIVKOV I, SOROKIN L, KLEIN A, ARNOLD C, HUSS Y, KEDINGER M, SIMON-ASSMANN P, LEFEBVRE O (2005). Generation of a conditionally null allele of the laminin alpha1 gene. *Genesis* 43: 59-70.
- AUMAILLEY M, TIMPL R, RISAU W (1991). Differences in laminin fragment interactions of normal and transformed endothelial cells. *Exp Cell Res* 196: 177-183.
- AVRAAMIDES CJ, GARMY-SUSINI B, VARNER JA (2008). Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Cancer* 8: 604-617.
- BARCZYK M, CARRACEDO S, GULLBERG D (2009). Integrins. *Cell Tissue Res* 339: 269-280.
- BOLCATO-BELLEMIN AL, LEFEBVRE O, ARNOLD C, SOROKIN L, MINER JH, KEDINGER M, SIMON-ASSMANN P (2003). Laminin alpha5 chain is required for intestinal smooth muscle development. *Dev Biol* 15:376-390.
- CIMPEAN AM, RIBATTI D, RAICA M. (2011). A brief history of angiogenesis assays. *Int J Dev Biol* 55: 377-382.
- DAVIS GE, KOHW, STRATMANAN (2007). Mechanisms controlling human endothelial lumen formation and tube assembly in three-dimensional extracellular matrices. *Birth Defects Res C Embryo Today* 81: 270-285.
- DAVIS GE, SENGDR DR (2005). Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. *Circ Res* 97: 1093-1107.
- DE ARCANGELIS A, LEFEBVRE O, MÉCHINE-NEUVILLE A, ARNOLD C, KLEIN A, RÉMY L, KEDINGER M, SIMON-ASSMANN P (2001). Overexpression of laminin α 1 chain in colonic cancer cells induces an increase in tumor growth. *Int J Cancer* 94: 44-53.
- DE PEREDA JM, ORTEGA E, ALONSO-GARCIA N, GOMEZ-HERNANDEZ M, SONNENBERG A (2009). Advances and perspectives of the architecture of hemidesmosomes: lessons from structural biology. *Cell Adh Migr* 3: 361-364.
- DEHAHN KC, GONZALES M, GONZALEZ AM, HOPKINSON SB, CHANDEL NS, BRUNELLE JK, JONES JCR (2004). The alpha4 laminin subunit regulates endothelial cell survival. *Exp Cell Res* 294: 281-289.
- DESGROSELLIER JS, CHERESH DA (2010). Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 10: 9-22.
- DIXELIUS J, JAKOBSSON L, GENERSCHE E, BOHMAN S, EKBLOM P, CLAESSE WELSH L (2004). Laminin-1 promotes angiogenesis in synergy with fibroblast growth factor by distinct regulation of the gene and protein expression profile in endothelial cells. *J Biol Chem* 279: 23766-23772.
- DOI M, THYBOLL J, KORTESMAA J, JANSSON K, IIVANAINEN A, PARVARDEH M, TIMPL R, HEDIN U, SWEDENBORG J, TRYGGVASON K (2002). Recombinant human laminin-10 (alpha5beta1gamma1). Production, purification, and migration-promoting activity on vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 277: 12741-12748.
- DURBEEJ M (2010). Laminins. *Cell Tissue Res* 339: 259-268.
- EBLE JA, NILAND S (2009). The extracellular matrix of blood vessels. *Current Pharmaceutical Design* 15: 1385-1400.
- EDWARDS MM, MAMMADOVA-BACH E, ALPY F, KLEIN A, HICKS WL, ROUX M, SIMON-ASSMANN P, SMITH RS, OREND G, WU J, PEACHEY NS, NAGGERT JK, LEFEBVRE O, NISHINAPM (2010). Mutations in Lama1 disrupt retinal vascular development and inner limiting membrane formation. *J Biol Chem* 285: 7697-7711.
- EKBLOM P, LONAI P, TALTS JF (2003). Expression and biological role of laminin-1. *Matrix Biol* 22: 35-47.
- FAISAL KHAN MF, FALCONE DJ (1997). Role of laminin in matrix induction of macrophage urokinase-type plasminogen activator and 92-kDa metalloproteinase expression. *J Biol Chem* 272: 8270-8275.
- FUJITA M, KHAZENON N, BOSE S, SEKIGUCHI K, SASAKI T, CARTER W, LJUBIMOVA A, BLACK K, LJUBIMOVA J (2005). Overexpression of beta1-chain-containing laminins in capillary basement membranes of human breast cancer and its metastases. *Breast Cancer Research* 7: R411-R421.
- FUJIWARAH, GU J, SEKIGUCHI K (2004). Rac regulates integrin-mediated endothelial cell adhesion and migration on laminin-8. *Exp Cell Res* 292: 67-77.
- GARRIDO T, RIESE HH, ARACIL M, PEREZ-ARANDA A (1995). Endothelial cell differentiation into capillary-like structures in response to tumour cell conditioned medium: a modified chemotaxis chamber assay. *Br J Cancer* 71: 770-775.
- GIANNELLI G, ANTONACI S (2001). Biological and clinical relevance of Laminin-5 in cancer. *Clin Exp Metastasis* 18: 439-443.
- GONZALES M, WEKSLER D, TSURUTAD, GOLDMAN RD, YOON KJ, HOPKINSON SB, FLITNEY FW, JONES JCR (2001). Structure and function of a vimentin-associated matrix adhesion in endothelial cells. *Mol Biol Cell* 12:85-100.
- GONZALEZ AM, GONZALES M, HERRON GS, NAGAVARAPU U, HOPKINSON SB, TSURUTAD, JONES JCR (2002). Complex interactions between the laminin alpha 4 subunit and integrins regulate endothelial cell behavior *in vitro* and angiogenesis *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 16075-16080.
- GRANT DS, TASHIRO K-I, SEGUI-REAL B, YAMADA Y, MARTIN GR, KLEINMAN HK (1989). Two different laminin domains mediate the differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures *in vitro*. *Cell* 58: 933-943.
- GRANT DS, KINSELLA JL, FRIDMAN R, AUERBACH R, PIASECKI BA, YAMADA Y, ZAIN M, KLEINMAN HK (1992). Interaction of endothelial cells with a Laminin-A chain peptide (SIKVAV) *in vitro* and induction of angiogenic behavior *in vivo*. *J Cell Physiol* 153: 614-625.

- GRANT DS, KIBBEY MC, KINSELLA JL, CID MC, KLEINMAN HK (1994). The role of basement membrane in angiogenesis and tumor growth. *Pathol Res Pract* 190: 854-863.
- GRIFFIOEN AW, COENEN MJH, DAMEN CA, HELLWIG SMM, VAN WEERING HJ, VOOYS W, BLIJHAM GH, GROENEWEGEN G (1997). CD44 is involved in tumor angiogenesis; an activation antigen on human endothelial cells. *Blood* 90: 1150-1159.
- GUSTAFSSON E, FÄSSLER R (2000). Insights into extracellular matrix functions from mutant mouse models. *Exp Cell Res* 261: 52-68.
- HALLMANN R, HORN N, SELG M, WENDLER O, PAUSCH F, SOROKIN LM (2005). Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiol Rev* 85: 979-1000.
- HENDRIX MJ, SEFTOR EA, HESS AR, SEFTOR RE (2003). Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nat Rev Cancer* 3: 411-421.
- HIBINO S, SHIBUYA M, ENGBRING JA, MOCHIZUKI M, NOMIZU M, KLEINMAN HK (2004). Identification of an active site on the Laminin alpha5 chain globular domain that binds to CD44 and inhibits malignancy. *Cancer Res* 64: 4810-4816.
- HOFFMAN MP, NOMIZU M, ROQUE E, LEE S, JUNG DW, YAMADA Y, KLEINMAN HK (1998). Laminin-1 and laminin-2 G-domain synthetic peptides bind syndecan-1 and are involved in acinar formation of a human submandibular gland cell line. *J Biol Chem* 273: 28633-28641.
- HOMAN SM, MERCURIO AM, LAFLAMME SE (1998). Endothelial cells assemble two distinct $\alpha 6 \beta 4$ -containing vimentin-associated structures: roles for ligand binding and the $\beta 4$ cytoplasmic tail. *J Cell Sci* 111: 2717-2728.
- HUANG FJ, YOU WK, BONALDO P, SEYFRIED TN, PASQUALE EB, STALLCUP WB (2010). Pericyte deficiencies lead to aberrant tumor vascularization in the brain of the NG2 null mouse. *Dev Biol* 344: 1035-1046.
- HUGHES CS, POSTOVIT LM, LAJOIE GA (2010). Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics* 10: 1886-1890.
- INGBER DE (1992). Extracellular matrix as a solid-state regulator in angiogenesis: identification of new targets for anti-cancer therapy. *Semin Cancer Biol* 3: 57-63.
- IWAMOTO Y, ROBEY FA, GRAF J, SASAKI M, KLEINMAN HK, YAMADA Y, MARTIN GR (1987). YIGSR, a synthetic laminin pentapeptide, inhibits experimental metastasis formation. *Science* 238: 1132-1134.
- JAKOBSSON L, BENTLEY K, GERHARDT H (2009). VEGFRs and Notch: a dynamic collaboration in vascular patterning. *Biochem Soc Trans* 37, 1233-1236.
- JEON H, ONO M, KUMAGAI C, MIKI K, MORITA A, KITAGAWA Y (1996). Pericytes from microvessel fragment produce type IV collagen and multiple laminin isoforms. *Biosci Biotechnol Biochem* 60: 856-861.
- KAARIAINEN E, NUMMELA P, SOIKKELI J, YIN M, LUKK M, JAHKOLA T, VIROLAINEN S, ORA A, UKKONEN E, SAKSELA O, HOLTTA E (2006). Switch to an invasive growth phase in melanoma is associated with tenascin-C, fibronectin, and procollagen-I forming specific channel structures for invasion. *J Pathol* 210: 181-191.
- KALLURI R (2003). Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 3: 422-433.
- KIBBEY MC, GRANT DS, KLEINMAN HK (1992). Role of the SIKVAV site of laminin in promotion of angiogenesis and tumor growth - An *in vivo* matrigel model. *J Nat Cancer Inst* 84: 1633-1638.
- KIDD KR, WILLIAMS SK (2004). Laminin-5-enriched extracellular matrix accelerates angiogenesis and neovascularization in association with ePTFE. *J Biomed Mater Res A* 69: 294-304.
- KIDD KR, DAL PONTE D, STONE AL, HOYING JB, NAGLE RB, WILLIAMS SK (2005). Stimulated endothelial cell adhesion and angiogenesis with laminin-5 modification of expanded polytetrafluoroethylene. *Tissue Eng* 11: 1379-1391.
- KIKKAWA Y, AKAOGI K, MIZUSHIMA H, YAMANAKA N, UMEDA M, MIYAZAKI K (1996). Stimulation of endothelial cell migration in culture by ladsin, a laminin-5-like cell adhesion protein. *In vitro Cell Dev Biol-Animal* 32: 46-52.
- KIKKAWA Y, TAKAHASHI N, MATSUDA Y, MIWAT, AKIZUKI T, KATAOKA A, NOMIZU M (2009). The influence of synthetic peptides derived from the laminin [alpha]1 chain on hepatocyte adhesion and gene expression. *Biomaterials* 30: 6888-6895.
- KINGSLEY K, RUST WL, HUFF JL, SMITH RC, PLOPPER GE (2002a). PDGF-BB enhances expression of, and reduces adhesion to, laminin-5 in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 294: 1017-1022.
- KINGSLEY K, HUFF JL, RUST WL, CARROLL K, MARTINEZ AM, FITCHMUN M, PLOPPER GE (2002b). ERK1/2 mediates PDGF-BB stimulated vascular smooth muscle cell proliferation and migration on laminin-5. *Biochem Biophys Res Commun* 293: 1000-1006.
- KLEINMAN HK, MARTIN GR (2005). Matrigel: Basement membrane matrix with biological activity. *Semin. Cancer Biol.* 15: 378-386.
- KUBOTA Y, KLEINMAN HK, MARTIN GR, LAWLEY TJ (1988). Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *J Cell Biol* 107: 1589-1598.
- KUCERAT, STRILIC B, REGENER K, SCHUBERT M, LAUDET V, LAMMERT E (2009). Ancestral vascular lumen formation via basal cell surfaces. *PLoS ONE* 4: e4132.
- KUCERA T, LAMMERT E (2009). Ancestral vascular tube formation and its adoption by tumors. *Biol Chem* 390: 985-994.
- KURATOMI Y, NOMIZU M, NIELSEN PK, TANAKA K, SONG SY, KLEINMAN HK, YAMADAY (1999). Identification of metastasis-promoting sequences in the mouse laminin alpha-1 chain. *Exp Cell Res* 249: 386-395.
- LI J, ZHOU L, TRAN HT, CHEN Y, NGUYEN NE, KARASEK MA, MARINKOVICH MP (2006). Overexpression of laminin-8 in human dermal microvascular endothelial cells promotes angiogenesis-related functions. *J Invest Dermatol* 126: 432-440.
- LI S, EDGAR D, FASSLER R, WADSWORTH W, YURCHENCO PD (2003). The role of laminin in embryonic cell polarization and tissue organization. *Dev Cell* 4: 613-624.
- LITJENS SHM, de PEREDA JM, SONNENBERG A (2006). Current insights into the formation and breakdown of hemidesmosomes. *Trends Cell Biol* 16: 376-383.
- LJUBIMOVA JY, LAKHTER AJ, LOKSH A, YONG WH, RIEDINGER MS, MINER JH, SOROKIN LM, LJUBIMOV AV, BLACK KL (2001). Overexpression of alpha4 chain-containing laminins in human glial tumors identified by gene microarray analysis. *Cancer Res* 61: 5601-5610.
- LJUBIMOVA JY, FUJITA M, KHAZENON NM, LJUBIMOV AV, BLACK KL (2006). Changes in laminin isoforms associated with brain tumor invasion and angiogenesis. *Front Biosci* 11: 81-88.
- LUGASSY CM, BARNHILL RLM (2007). Angiotropic melanoma and extravascular migratory metastasis: A review. *Adv Anat Pathol* 14: 195-201.
- LUGASSY C, TORRES-MUNOZ JE, KLEINMAN HK, GHANEM G, VERNON S, BARNHILL RL (2009). Overexpression of malignancy-associated laminins and laminin receptors by angiotropic human melanoma cells in a chick chorioallantoic membrane model. *J Cutan Pathol* 36: 1237-1243.
- LUTOLF MP, HUBBELL JA (2005). Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat Biotech* 23: 47-55.
- MALINDA KM, NOMIZU M, CHUNG M, DELGADO M, KURATOMI Y, YAMADA Y, KLEINMAN HK, PONCE ML (1999). Identification of laminin $\alpha 1$ and $\beta 1$ chain peptides active for endothelial cell adhesion, tube formation, and aortic sprouting. *FASEB J* 13: 53-62.
- MANIOTIS AJ, FOLBERG R, HESS A, SEFTOR EA, GARDNER LMG, PE'ER J, TRENT JM, MELTZER PS, HENDRIX MJC (1999). Vascular channel formation by human melanoma cells *in vivo* and *in vitro*: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 155: 739-752.
- MINER JH, CUNNINGHAM J, SANES JR (1998). Roles for laminin in embryogenesis: Exencephaly, syndactyly, and placentopathy in mice lacking the laminin alpha 5 chain. *J Cell Biol* 143: 1713-1723.
- MINER JH, YURCHENCO PD (2004). Laminin functions in tissue morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 255-284.
- MINER JH, LI C, MUDD JL, GO G, SUTHERLAND AE (2004). Compositional and structural requirements for laminin and basement membranes during mouse embryo implantation and gastrulation. *Development* 131: 2247-2256.
- MINER JH (2008). Laminins and their roles in mammals. *Microsc Res Tech* 71: 349-356.
- MOCHIZUKI M, PHILP D, HOZUMI K, SUZUKI N, YAMADA Y, KLEINMAN HK, NOMIZU M (2007). Angiogenic activity of syndecan-binding laminin peptide AG73 (RKRLQVLSIRT). *Arch. Biochem. Biophys.* 459: 249-255.
- NAKAMURAM, MIE M, MIHARA H, NAKAMURAM, KOBATAKE E (2008). Construction of multi-functional extracellular matrix proteins that promote tube formation of endothelial cells. *Biomaterials* 29: 2977-2986.
- NAKAMURAM, YAMAGUCHI K, MIEM, NAKAMURAM, AKITAK, KOBATAKE E (2009). Promotion of angiogenesis by an artificial extracellular matrix protein containing the laminin-1 derived IKVAV sequence. *Bioconjugate Chemistry* 20: 1759-1764.
- NIKOLOVA G, JABS N, KONSTANTINOVA I, DOMOGATSKAYA A, TRYGGVASON K, SOROKIN L, FASSLER R, GU G, GERBER HP, FERRARA N (2006). The vascular basement membrane: a niche for insulin gene expression and [beta]

- cell proliferation. *Dev Cell* 10: 397-405.
- NOMIZU M, KIM WH, YAMAMURA K, UTANI A, SONG SY, OTAKA A, ROLLER PP, KLEINMAN HK, YAMADA Y (1995). Identification of cell binding sites in the laminin α 1 chain carboxyl-terminal globular domain by systematic screening of synthetic peptides. *J Biol Chem* 270: 20583-20590.
- NOMIZU M, KURATOMI Y, MALINDAKM, SONG SY, MIYOSHI K, OTAKA A, POWELL SK, HOFFMAN MP, KLEINMAN HK, YAMADA Y (1998). Cell binding sequences in mouse laminin α 1 chain. *J Biol Chem* 273: 32491-32499.
- ORIAN-ROUSSEAU V, ABERDAM D, FONTAO L, CHEVALIER L, MENEGUZZI G, KEDINGER M, SIMON-ASSMANN P (1996). Developmental expression of laminin-5 and HD1 in the intestine: Epithelial to mesenchymal shift for the laminin γ 2 chain subunit deposition. *Dev Dyn* 206: 12-23.
- PASSANITI A, TAYLOR RM, PILI R, GUO Y, LONG PV, HANEY JA, PAULY RR, GRANT DS, MARTIN GR (1992). A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor. *Lab Invest* 67: 519-528.
- PATARROYO M, TRYGGVASON K, VIRTANEN I (2002). Laminin isoforms in tumor invasion, angiogenesis and metastasis. *Semin Cancer Biol* 12: 197-207.
- PAULY RR, PASSANITI A, CROW M, KINSELLA JL, PAPADOPOULOS N, MONTICONE R, LAKATTA EG, MARTIN GR (1992). Experimental models that mimic the differentiation and dedifferentiation of vascular cells. *Circulation* 86: III68-73.
- PONCE ML, KLEINMAN HK (2003). Identification of redundant angiogenic sites in laminin alpha1 and gamma1 chains. *Exp Cell Res* 285: 189-195.
- PONCE ML, NOMIZU M, DELGADO MC, KURATOMI Y, HOFFMAN MP, POWELL S, YAMADA Y, KLEINMAN HK, MALINDA KM (1999). Identification of endothelial cell binding sites on the laminin gamma1 chain. *Circ Res* 84: 688-694.
- PONCE ML, NOMIZU MOTO, KLEINMAN HK (2001). An angiogenic laminin site and its antagonist bind through the alpha5beta3 and alpha5beta1 integrins. *FASEB J* 15: 1389-1397.
- PONCE ML, HIBINO S, LEBIODA AM, MOCHIZUKI M, NOMIZU M, KLEINMAN HK (2003). Identification of a potent peptide antagonist to an active laminin-1 sequence that blocks angiogenesis and tumor growth. *Cancer Res* 63: 5060-5064.
- RISAU W, FLAMME I (1995). Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11: 73-91.
- ROZARIO T, DESIMONE DW (2010). The extracellular matrix in development and morphogenesis: A dynamic view. *Dev Biol* 341: 126-140.
- SAKAMOTO N, IWAHANA M, TANAKA NG, OSADA Y (1991). Inhibition of angiogenesis and tumor growth by a synthetic laminin peptide, CDPGYIGSR-NH2. *Cancer Res* 51: 903-906.
- SASAKI T, GILTAY R, TALTS U, TIMPL R, TALTS JF (2002). Expression and distribution of laminin alpha1 and alpha2 chains in embryonic and adult mouse tissues: an immunohistochemical approach. *Exp Cell Res* 275: 185-199.
- SCHNAPER HW, KLEINMAN HK, GRANT DS (1993). Role of laminin in endothelial cell recognition and differentiation. *Kidney Int* 43: 20-25.
- SEFTOR RE, SEFTOR EA, KOSHIKAWA N, MELTZER PS, GARDNER LM, BILBAN M, STETLER-STEVENSON WG, QUARANTA V, HENDRIX MJ (2001). Cooperative interactions of laminin 5 gamma2 chain, matrix metalloproteinase-2, and membrane type-1-matrix/metalloproteinase are required for mimicry of embryonic vasculogenesis by aggressive melanoma. *Cancer Res* 61: 6322-6327.
- SEMINEAEV, BOSENKODV, ZINKEVICH NC, SOULES KA, HYDE DR, VIHELICTS, WILLER GB, GREGG RG, LINK BA (2006). Mutations in laminin alpha1 result in complex, lens-independent ocular phenotypes in zebrafish. *Dev Biol* 299: 63-77.
- SILVA R, D'AMICO G, HODIVALA-DILKE KM, REYNOLDS LE (2008). Integrins: the keys to unlocking angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 1703-1713.
- SIMO P, SIMON-ASSMANN P, BOUZIGES F, LEBERQUIER C, KEDINGER M, EKBLOM P, SOROKIN L (1991). Changes in the expression of laminin during intestinal development. *Development* 112: 477-487.
- SIMON-ASSMANN P, SPENLE C, LEFEBVRE O, and KEDINGER M. (2010). The role of the basement membrane as a modulator of intestinal epithelial-mesenchymal interactions. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science - Molecular Biology of Digestive Organs* (Ed. P.M. Conn). Academic Press 96, pp. 175-206.
- SIXT M, ENGELHARDT B, PAUSCH F, HALLMANN R, WENDLER O, SOROKIN LM (2001). Endothelial cell laminin isoforms, laminins 8 and 10, play decisive roles in T cell recruitment across the blood-brain barrier in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Cell Biol* 153: 933-946.
- SOROKIN LM, PAUSCH F, FRIESER M, KROGER S, OHAGE E, DEUTZMANN R (1997). Developmental regulation of the laminin α 5 chain suggests a role in epithelial and endothelial cell maturation. *Dev Biol* 189: 285-300.
- STACK MS, GRAY RD, PIZZO SV (1993). Modulation of murine B16F10 melanoma plasminogen activator production by a synthetic peptide derived from the laminin A chain. *Cancer Res* 53: 1998-2004.
- STRATMAN AN, MALOTTE KM, MAHAN RD, DAVIS MJ, DAVIS GE (2009). Pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly stimulates endothelial basement membrane matrix formation. *Blood* 114: 5091-5101.
- STREULI CH, SCHMIDHAUSER C, BAILEY N, YURCHENCO P, SKUBITZ APN, ROSKELLEY C, BISSELL MJ (1995). Laminin mediates tissue-specific gene expression in mammary epithelia. *J Cell Biol* 129: 591-603.
- SUZUKI N, YOKOYAMA F, NOMIZU M (2005). Functional sites in the laminin alpha chains. *Connect Tissue Res* 46: 142-152.
- THYBOLL J, KORTESMAA J, CAO R, SOININEN R, WANG L, IIVANAINEN A, SOROKIN L, RISLING M, CAO Y, TRYGGVASON K (2002). Deletion of the laminin alpha4 chain leads to impaired microvessel maturation. *Mol Cell Biol* 22: 1194-1202.
- TIMPL R, ROHDE H, ROBEY PG, RENNARD SI, FOIDART JM, MARTIN GR (1979). Laminin. A glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem* 254: 9933-9937.
- VAINIONPAAAN, KIKKAWAY, LOUNATMAAK, MINER JH, ROUSSELLE P, VIRTANEN I (2006). Laminin-10 and Lutheran blood group glycoproteins in adhesion of human endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 290: C764-C775.
- VIRTANEN I, GULLBERG D, RISSANEN J, KIVILAAKSO E, KIVILUOTO T, LAITINEN LA, LEHTO VP, EKBLOM P (2000). Laminin α 1-chain shows a restricted distribution in epithelial basement membranes of fetal and adult human tissues. *Exp Cell Res* 257: 298-309.
- VON TELL D, ARMULIK A, BETSHOLTZ C (2006). Pericytes and vascular stability. *Exp Cell Res* 312: 623-629.
- WANG B, SUN J, KITAMOTO S, YANG M, GRUBB A, CHAPMAN HA, KALLURI R, SHI GP (2006a). Cathepsin S controls angiogenesis and tumor growth via matrix-derived angiogenic factors. *J Biol Chem* 281: 6020-6029.
- WANG J, HOSHIJIMA M, LAM J, ZHOU Z, JOKIEL A, DALTON ND, HULTENBY K, RUIZ-LOZANOP, ROSS J, TRYGGVASON K, CHIEN KR (2006b). Cardiomyopathy associated with microcirculation dysfunction in laminin alpha4 chain-deficient mice. *J Biol Chem* 281: 213-220.
- WU C, IVARS F, ANDERSON P, HALLMANN R, VESTWEBER D, NILSSON P, ROBENEK H, TRYGGVASON K, SONG J, KORPOS E, LOSER K, BEISSERT S, GEORGES-LABOUESSE E, SOROKIN LM (2009). Endothelial basement membrane laminin alpha5 selectively inhibits T lymphocyte extravasation into the brain. *Nat Med* 15: 519-527.
- YURCHENCO PD, PATTON BL (2009). Developmental and pathogenic mechanisms of basement membrane assembly. *Curr Pharm Des* 15: 1277-1294.
- ZHOU Z, DOI M, WANG J, CAO R, LIU B, CHAN KM, KORTESMAA J, SOROKIN L, CAO Y, TRYGGVASON K (2004). Deletion of laminin-8 results in increased tumor neovascularization and metastasis in mice. *Cancer Res* 64: 4059-4063.

Further Related Reading, published previously in the *Int. J. Dev. Biol.*

Insulin-like growth factor-2 regulates early neural and cardiovascular system development in zebrafish embryos

Lori Hartnett, Catherine Glynn, Catherine M. Nolan, Maura Grealy and Lucy Byrnes
Int. J. Dev. Biol. (2010) 54: 573-583

The seminal work of Werner Risau in the study of the development of the vascular system

Domenico Ribatti
Int. J. Dev. Biol. (2010) 54: 567-572

Estrogen regulation of placental angiogenesis and fetal ovarian development during primate pregnancy

Eugene D. Albrecht and Gerald J. Pepe
Int. J. Dev. Biol. (2010) 54: 397-407

Uteroplacental vascular development and placental function: an update

Lawrence P. Reynolds, Pawel P. Borowicz, Joel S. Caton, Kimberly A. Vonnahme, Justin S. Luther, David S. Buchanan, Shireen A. Hafez, Anna T. Grazul-Bilska and Dale A. Redmer
Int. J. Dev. Biol. (2010) 54: 355-365

Critical growth factors and signalling pathways controlling human trophoblast invasion

Martin Knöfler
Int. J. Dev. Biol. (2010) 54: 269-280

Over-expression of thymosin beta4 promotes abnormal tooth development and stimulation of hair growth

Hee-Jae Cha, Deborah Philp, Soo-Hyun Lee, Hye-Sung Moon, Hynda K. Kleinman and Takashi Nakamura
Int. J. Dev. Biol. (2010) 54: 135-140

The contribution of Roberto Montesano to the study of interactions between epithelial sheets and the surrounding extracellular matrix

Domenico Ribatti
Int. J. Dev. Biol. (2010) 54: 1-6

5 yr ISI Impact Factor (2009) = 3.253

