ALK1 : une nouvelle voie de signalisation dans le développement vasculaire physiologique et tumoral

Marie Ouarné

▶ **To cite this version:**

Marie Ouarné. ALK1 : une nouvelle voie de signalisation dans le développement vasculaire physiologique et tumoral. Biologie cellulaire. Université Grenoble Alpes, 2017. Français. ⟨NNT : 2017GREAV052⟩. ⟨tel-01706596⟩

HAL Id: tel-01706596

https://theses.hal.science/tel-01706596v1

Submitted on 12 Feb 2018

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.

HAL Authorization

Communauté
UNIVERSITÉ Grenoble Alpes

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTÉ UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Biologie cellulaire**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Marie OUARNÉ

Thèse dirigée par **Sabine BAILLY, Directrice de recherche Inserm, Institut de Biosciences et de Biotechnologies de Grenoble**

préparée au sein du **Laboratoire de Biologie du Cancer et de l'Infection** et de **l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

ALK1, une nouvelle voie de signalisation dans le développement vasculaire physiologique et tumoral

Thèse soutenue publiquement le **16 novembre 2017**,
devant le jury composé de :

Mme Sabine Bailly

Directrice de recherche Inserm, Institut de Biosciences et de Biotechnologies de Grenoble, Directrice de thèse

Mme Catherine PICART
Professeur, Institut National Polytechnique de Grenoble, Président

Mme Barbara GARMY-SUSINI
Directeur de recherche Inserm, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, Rapporteur

M. Thierry JAFFREDO
Directeur de recherche CNRS, Université Pierre et Marie Curie, Rapporteur

Mme Ruth RIMOKH
Directeur de recherche Inserm, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Examinateur

M. Franck VERRECCHIA
Directeur de recherche Inserm, Université de Nantes, Examinateur

La rigueur vient toujours à bout de l'obstacle.
Léonard De Vinci

Remerciements

Je souhaite remercier le Dr. Garmy-Susini et le Dr. Jaffredo d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mon travail de thèse ainsi que le Pr. Picart, le Dr. Rimokh et le Dr. Verrecchia qui ont également accepté d'évaluer mon travail.

Je remercie également Béatrice Eymin et Olivier Peyruchaud qui m'ont accompagnée pendant ces trois ans en participant à mon comité de suivi de thèse. Leurs conseils et leurs remarques m'ont permis d'avancer dans mon travail et d'élargir mon point de vue sur mon sujet.

Merci à Sabine qui a dirigé cette thèse pendant trois années pour les nombreuses connaissances partagées et la patience dont tu as fait preuve (mon esprit un peu trop synthétique t'as donné du fil à retordre). Je retiendrai de toi ta curiosité et ton implication sans faille dans tous les projets de l'équipe. Cela peut parfois (souvent) rendre les réunions d'équipe un peu longues, mais cela permet de souder l'équipe et d'avoir toujours une bonne quantité de conseils pour faire avancer les projets. La recherche est avant tout un travail d'équipe (un seul cerveau ne suffirait pas à lui seul) et je te remercie de m'avoir permis de travailler dans un environnement aussi stimulant.

En parlant d'environnement stimulant, comment ne pas remercier Emma et Agnès ! Je vais avoir du mal à me passer de nos petites discussions plus ou moins scientifiques dans votre bureau, des idées un peu folles qui en émergent et surtout du soutien sans faille dont vous avez fait preuve tout au long de ces trois années. Agnès, merci pour tes conseils professionnels mais aussi pour tous les conseils personnels que tu as pu me donner, ils m'ont permis d'avancer et de mûrir. J'espère que tu continueras à penser à moi quand tu verras une souris un peu bizarre ! Emma, merci pour m'avoir fait découvrir l'enseignement et m'avoir soutenue pendant cette découverte. Merci aussi pour tous les coups de main pendant les manips, je sais que tu es souvent prise par le temps mais tu l'as toujours pris pour m'aider alors merci encore. Merci Christine pour toutes les manips souris, tu as toujours été présente pour m'aider, sans jamais râler et toujours dans la bonne humeur. Je ne suis pas sûre que tout ce travail aurait été possible sans ton aide. Sonia, un grand

merci ! Bien que tu ne sois pas restée très longtemps avec nous, ta présence a été un grand bol d'air frais et ton travail d'une grande aide. Je suis sûre que ton investissement et ta bonne humeur seront des atouts inestimables qui te permettront de réussir quelle que soit la voie que tu choisiras. Jean-Jacques, je ne sais pas si tu t'en rappelles, mais je crois que je garderai toujours cette image de toi, la manche de la chemise remontée jusqu'à l'épaule, le bras plongé dans la machine à glace pour essayer de la déboucher. Je ne suis pas sûre que tous les directeurs de labo mettent autant la main à pâte ! Merci pour ton implication, ton aide et pour les fous rires dès qu'il s'agit de comprendre le fonctionnement d'une Cre recombinase. Merci à Mariela et à Daniel pour tous les conseils qu'ils ont pu me donner. Mariela, merci pour le temps passé à m'apprendre tout ce qu'il y avait à savoir sur le ductus. Daniel, tu m'as impressionnée avec ta rigueur scientifique et ta volonté de toujours te remettre en question.

Déborah, Caro, un immense merci à toutes les deux. Vous avez été d'un soutien inégalé dans cette aventure. Toujours un bon conseil, toujours un mot pour rire et faire oublier les soucis. En arrivant à Grenoble, j'étais loin d'être sûre de trouver d'aussi bonnes amies. J'espère avoir pu vous apporter ne serait-ce que la moitié de ce que vous m'avez donné. Deb, bon courage pour la suite, tu vas y arriver, j'en suis sûre et certaine, tu es suffisamment forte et volontaire pour aller au bout de tes rêves. Caro, je tiens à te remercier pour m'avoir permis de m'intégrer dans le petit cercle du midi et de mieux connaître Deb. Tu permets à beaucoup d'entre nous de tisser des liens, merci. Je voudrais vous dire plein d'autres choses à toutes les deux, mais les écrire en préambule d'une thèse semble bizarre. Promis, vous aurez tous les détails autour d'un verre et d'un bon repas !

Dans le petit cercle du midi, j'ai réussi à trouver deux taties de substitution : Marie Pierre et Christine C. Vous êtes entières et parfaites comme vous êtes, surtout ne changez pas. Christine, j'admire ta bonne humeur perpétuelle, tu mets tous les jours un peu de soleil dans nos cœurs. Marie, je suis heureuse d'avoir appris à te connaître aussi bien (j'en ai mis du temps). Tu a un cœur en or, continue à vivre ta vie avec autant d'enthousiasme et retourne pagayer (au sens littéral du terme), ça te réussit de te lancer des petits défis !

Merci à tous les membres du labo que je n'ai pas encore cités, Odile (merci pour tous les conseils, les anticorps et la bonne ambiance), les Nadias, Claude, Laurent, Virginie, Isabelle, Sophie, Fred, Aude, Josiane, Florian, les PBRC (avec une mention toute spéciale à Emeline, Stéphanie et Philippe) Iza, Irène, Nicolas (sans vous trois, je n'aurai jamais réussi à gérer toutes ces souris !) et ceux qui en sont partis, Manon (et ses fous rires du midi), Benoît (il va falloir la faire cette via ferrata !), Sofia, Wael, Olivier et Abir, Sophie,

Marie P., Mathias, Marlène et tous ceux que j'oublie bien involontairement. Vous avez tous, à un moment ou à un autre, rendu cette expérience un peu plus belle.

En dehors du labo, mais toujours dans un esprit scientifique, il y a une super équipe qui a contribué à faire de ces trois ans à Grenoble un expérience riche et géniale. Merci à tous les membres de Pint of Science pour ces réunions mensuelles et ces trois festivals mémorables. Elise, un merci tout particulier. Te suivre dans cette aventure a été un réel plaisir et je suis fière que tu m'aies confié ton bébé lors de cette dernière année. Emma, Sandy, merci pour votre aide précieuse pour l'organisation du festival, je n'en aurai pas été capable toute seule.

Elvire, Charline, Poncho, Joëlle... Merci à vous tous aussi. Vous resterez mes colocs (et non pas mes ex-colocs) à vie. Merci pour m'avoir soutenue quand je suis allée chercher cette bourse de thèse, pour l'avoir fêtée avec moi, pour m'avoir remonté le moral quand ça a été difficile, pour les relectures actives de ce manuscrit (vous n'allez plus pouvoir le voir en peinture) et pour tout le reste. Merci ! J'ai de la chance d'avoir des amis aussi précieux.

Les papis Michel, mamie Nicole, mamie Marie Paule merci aussi à vous. Je sais que tout mon travail doit vous sembler un peu abstrait mais vous avez toujours fait l'effort de vous y intéresser malgré mes difficultés à l'expliquer !

Papa, Maman, Julie, vous êtes probablement ceux que je souhaite le plus remercier. Je n'en serai probablement pas là sans vous. Vous m'avez toujours soutenue dans mes choix, vous avez su effacer mes doutes, me redonner du courage et de la motivation, me donner confiance en moi. Votre confiance en mes capacités est sûrement l'aide la plus précieuse que j'ai jamais reçue. C'est elle qui m'a donné le courage de me dépasser quand c'était nécessaire, pour vous rendre fiers. Je vous aime.

Clément, je finis par toi. Je ne sais pas combien de fois il faudra que je dise merci pour que cela soit suffisant. Tu m'as soutenue sans faillir pendant ces trois ans. Tu as toujours su quoi dire, quoi faire pour me donner envie de continuer et de persévérer. Ces trois ans de thèse, je ne suis pas sûre qu'ils se seraient aussi bien déroulés si je n'avais pas eu la chance de pouvoir rentrer te retrouver tous les soirs. Je t'aime et il me tarde de commencer une toute nouvelle aventure à l'étranger avec toi.

Table des matières

Table des figures **9**

Liste des tableaux **11**

Abréviations **13**

Introduction **17**

1 Le développement vasculaire physiologique **19**

1.1 Le système vasculaire 19

1.1.1 Le système sanguin 20

1.1.2 Le système lymphatique 22

1.2 La vasculogenèse 23

1.3 L'angiogenèse 25

1.3.1 Angiogenèse par intussusception 25

1.3.2 Angiogenèse par bourgeonnement 26

1.3.3 Acteurs principaux de l'angiogenèse 30

1.4 La lymphangiogenèse 34

2 Le canal artériel **37**

2.1 Le développement du canal artériel 38

2.2 Maintien de l'ouverture chez le fœtus 39

2.2.1 Les prostaglandines 39

2.2.2 Le monoxyde d'azote 40

2.2.3 Le monoxyde de carbone 40

2.3 Mécanismes de fermeture à la naissance 40

2.3.1 Fermeture fonctionnelle 40

2.3.2 Fermeture anatomique 43

2.4 Canal artériel persistant 45

2.4.1 Épidémiologie 45

2.4.2 Conséquences de la présence d'un PDA 46
2.4.3 Diagnostic d'un PDA 47
2.4.4 Traitement du PDA 47
2.5 Pathologies humaines associées au PDA 48
2.5.1 Mutations de *MYH11* et de *ACTA2* 48
2.5.2 Syndrome de Char 49
2.5.3 Syndrome de Loeys-Dietz 49

3 Cancers et vascularisation tumorale 51
3.1 Épidémiologie 51
3.2 Origines et facteurs de risque 53
3.3 La carcinogenèse 54
3.3.1 Un développement multi-étapes 54
3.3.2 Caractéristiques principales des cellules tumorales 55
3.3.3 Soutien du micro-environnement tumoral 60
3.4 La vascularisation tumorale 62
3.4.1 *Angiogenic switch* 62
3.4.2 Différents types d'angiogenèse tumorale 63
3.4.3 Caractéristiques du réseau sanguin tumoral 65
3.4.4 Lymphangiogenèse tumorale 68
3.5 Thérapies anti-angiogéniques 70
3.5.1 Principe originel et évolution 70
3.5.2 Principaux traitements actuels 72
3.5.3 Mécanismes de résistance 76
3.5.4 Avenir des thérapies anti-angiogéniques 79
3.6 Thérapies anti-lymphangiogéniques 81

4 La famille des BMPs 83
4.1 Les ligands 84
4.2 Les voies de signalisations 85
4.2.1 Les récepteurs 86
4.2.2 Signalisation Smad-dépendante 87
4.2.3 Signalisation Smad-indépendante 89
4.2.4 Modulations de la signalisation 90
4.3 Fonctions physiologiques 92
4.3.1 Fonctions principales lors de l'embryogenèse 92
4.3.2 Fonctions principales à l'âge adulte 94
4.3.3 Fonctions vasculaires 94

4.4 BMPs et cancer . . . 97
4.4.1 Prédispositions génétiques . . . 97
4.4.2 Effets directs sur la tumorigenèse et la dissémination . . . 97
4.4.3 Effets sur le micro-environnement tumoral . . . 99
4.4.4 Ciblage thérapeutique . . . 100
4.5 Cas particulier de BMP9 et BMP10 . . . 101
4.5.1 Ligands et signalisation . . . 101
4.5.2 Fonctions physiologiques . . . 105
4.5.3 Implications dans le cancer . . . 109

Objectifs 117

Résultats 121

1 Fermeture du canal artériel 123
1.1 Contexte de l'étude . . . 123
1.2 Article . . . 124
1.3 Résumé de l'article . . . 139
1.4 Discussion et perspectives . . . 139

2 Développement tumoral et métastases 143
2.1 Contexte . . . 143
2.2 Modèles utilisés . . . 145
2.3 Article . . . 147
2.4 Résumé de l'article . . . 175
2.5 Résultats non inclus . . . 175
2.5.1 Étude de confirmation . . . 175
2.5.2 Étude du modèle E0771 dans les souris doubles KO . . . 178
2.5.3 Étude des mécanismes moléculaires induits par BMP9 . . . 179
2.6 Discussion et perspectives . . . 181

Conclusion et perspectives 187

Bibliographie 195

Annexe 223

Table des figures

1.1 Organisation du système vasculaire. 19
1.2 Morphologie des différents vaisseaux du système sanguin. 20
1.3 Morphologie des différents types de capillaires sanguins. 21
1.4 Organisation et morphologie du système lymphatique. 22
1.5 Mécanismes de la vasculogenèse. 24
1.6 Angiogenèse par intussusception : exemple d'un capillaire. 25
1.7 Angiogenèse par intussusception : devenir des vaisseaux. 26
1.8 Angiogenèse par bourgeonnement : phase d'activation. 28
1.9 Angiogenèse par bourgeonnement : phase de maturation. 30
1.10 Principaux acteurs contrôlant l'angiogenèse. 31
1.11 Etapes principales de la lymphangiogenèse. 35

2.1 Canal artériel et *ligamentum arteriosum*. 37
2.2 Remodelage asymétrique des arches pharyngées. 38
2.3 Impact de l'oxygène sur la fermeture fonctionnelle du canal artériel. 41
2.4 Rôle du PGE2 dans l'épaississement de l'intima. 43
2.5 Classification de Krichenko des PDA. 46

3.1 Incidence et mortalité des principaux cancers en fonction du sexe. 51
3.2 Survie associée aux sous-types moléculaires de cancer du sein. 52
3.3 Différentes étapes de la carcinogenèse. 55
3.4 Caractéristiques principales des cancers selon Hanahan et Weinberg. 56
3.5 Cellules composant le micro-environnement tumoral. 61
3.6 *Angiogenic switch* et balance angiogénique. 63
3.7 Différents types d'angiogenèse tumorale. 64
3.8 Caractéristiques du réseau sanguin tumoral. 66
3.9 Remodelage lymphatique tumoral et implications métastatiques. 69
3.10 Principe originel des traitements anti-angiogéniques. 70
3.11 Traitements anti-angiogéniques et normalisation des vaisseaux tumoraux. . 71
3.12 Mécanismes de résistance aux traitements anti-angiogéniques. 77

4.1 Arbre phylogénétique de la super-famille du TGF-β. 83
4.2 Synthèse et maturation des BMPs. 84
4.3 Structure des BMPs : exemples de BMP7 et BMP9 85
4.4 Structure des récepteurs de types I et II des BMPs. 86
4.5 Voies de signalisations des BMPs et leurs régulations. 89
4.6 BMPs et établissement de l'axe dorso-ventral lors de la gastrulation. 93
4.7 Principaux défauts vasculaires associés à une signalisation BMP défectueuse. 95
4.8 Implications des BMPs dans les différentes étapes de la carcinogenèse. . . . 100
4.9 Différentes formes de BMP9 et BMP10 et leurs activités. 101
4.10 Complexes de récepteurs associés à BMP9 et BMP10. 102
4.11 Structure des complexes formés par BMP9 avec ses récepteurs. 103
4.12 Principes des thérapies ciblant ALK1. 109

R.1 Hypothèses sur les rôles de BMP9 et BMP10 dans la tumorigenèse. 144
R.2 Protocoles *in vivo* relatifs à l'étude des modèles 4T1 et E0771. 146
R.3 Étude de confirmation des résultats dans le modèle E0771. 176
R.4 Résultats de l'étude de confirmation dans le modèle E0771. 177
R.5 Effets de la double délétion de *Gdf2* et de *Bmp10* sur le modèle E0771. . . 179
R.6 Identification de facteurs angiogéniques impliqués dans le modèle E0771. . 180
R.7 Hypothèse sur le mode d'action du BMP9 dans le modèle E0771. 185

C.1 Rôles de BMP9 et de BMP10 dans les systèmes cardiaques et vasculaires. . 190
C.2 Potentiel thérapeutique de BMP9 et BMP10. 193

Liste des tableaux

3.1 Anti-angiogéniques spécifiques de la voie du VEGF approuvés. 73
3.2 Anti-angiogéniques inhibiteurs des tyrosine-kinases approuvés. 74
3.3 Autres anti-angioéniques approuvés. 75
3.4 Anti-lymphangiogéniques en cours d'évaluation clinique. 82

4.1 Associations connues entre BMPs et récepteurs de types I et II. 87
4.2 Affinité et activité des co-récepteurs des BMPs. 91
4.3 Essais cliniques menés sur le PF-03446962 dans le traitement des cancers. . 110
4.4 Essais cliniques menés sur le Dalantercept dans le traitement des cancers. . 111
4.5 Essais cliniques menés sur le TRC105 dans le traitement des cancers. . . . 113
4.6 Effets pro ou anti-tumoraux *in vitro* de BMP9 sur différents cancers. . . . 115

Abréviations

AAs	Thérapies anti-angiogéniques
AC	Adénylate cyclase
ACTA2	Gène codant pour l'actine-α
ActRII	Activin Type II Receptor
Acvrl1	Gène codant pour ALK1
ADN	Acide désoxyribonucléique
AEM	Agence Européenne du Médicament
AKT	Protein kinase B
ALs	Thérapies anti-lymphangiogéniques
ALK	Activin receptor-Like Kinase
ALK1-Fc	Dalantercept
AMHR2	AMH type II receptor
AMPc	Adénosine Mono-Phosphate cyclique
Ang1/2	Angiopoïétine 1/2
AngII	Angiotensine II
AP-2β	Facteur de transcription des cellules dérivées de la crête neurale
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
AVM	Malformations artério-veineuses
BAECs	Bovine Aorta Endothelial Cells
BAMBI	Activin membrane-bound inhibitor
BRAM1	BMP Receptor Associated Molecule 1
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMPER	Crossveinless-2
BMPRII	Récepteur aux BMPs de type 2
Bmp10-cKO	Souris *Bmp10*-KO inductibles
BRCA	Gène codant pour les BReast CAncer proteins
Bv8	Bombina Variegata peptide 8
CAF	Fibroblaste associé au cancer
CCL	C-C motif Chemokine Ligand

CCR	C-C motif Chemokine Receptor
CD31	Platelet endothelial cell adhesion molecule
CO	Monoxyde de carbone
Co-Smad	Smad médiatrice
COUP-TFII	Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factor 2
CSCs	Cellules Souches Cancéreuses
CSF-1R	Colony Stimulating Factor 1 Receptor
CTCs	Cellules Tumorales Circulantes
CTLA4	Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4
CYP450	Cytochrome P450
DA	Canal artériel
DLL	Delta-Like
DMLA	Dégénérescence Maculaire Liée à l'Âge
DRAGON	RGMb
Ex.x	Jour embryonnaire x.x
EC50	Concentration efficace médiane
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Récepteur à l'EGF
EMT	Transition épithélio-mésenchymateuse
EndMT	Transition endothélio-mésenchymateuse
Epac	Exchange protein activated by cAMP
EP	Récepteur aux prostaglandines
EPC	Progéniteur endothélial
ERBB2	Gène codant pour HER2
ERK	Extracellular signal-Related Kinase
ET-1	Endothéline 1
FDA	*Food and Drug Administration*
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGFR	Récepteur au FGF
Foxc2	Forkhead box protein C2
Gdf2	Gène codant pour BMP9
GFD	Growth Differentiation Factor
GMPc	Guanosine Mono-Phosphatase
GTPases	Enzymes hydrolysant la guanosine triphosphate
HA	Acide hyaluronique
HER2	Human Epidermal Growth Factor Recepter-2
HGF	Hepatocyte Growth Factor

HHT	Maladie de Rendu-Osler-Weber
HIF	Hypoxia Inducible Factors
HMTV	Human Mammary Tumor Virus
HMVEC-d	Human dermal MicroVascular Endothelial Cells
H_2O_2	Peroxyde d'hydrogène
HPAECs	Human Pulmonary Artery Endothelial Cells
HTAP	HyperTension Artérielle Pulmonaire
HUVECs	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
IGF1	Insulin-like Growth Factor 1
IL	Interleukine
IP	Récepteurs à la prostacyline
I-Smad	Smad inhibitrices
JKN	c-Jun amino-terminal Kinase
KCP	Kielin/Chordin-like Protein
KIT	Récepteur de facteurs de croissances des cellules souches et des mastocytes
LECs	Cellules endothéliales lymphatiques
LKB1	Gène codant pour la kinase hépatique B1
LYVE-1	LYmphatic Vessel Endothelial hyaluronan receptor 1
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MEC	Matrice Extra-Cellulaire
MESEC	Cellules endothéliales embryonnaires
c-MET	Récepteur à l'HGF
MET	Micro-Environnement Tumoral
MH	Mad Homology
MLCK	Kinases des chaînes légères de myosine
MMPs	Métaloprotéases matricielles
MMTV	Mouse Mammary Tumor Virus
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
MYH11	Gène codant pour la chaîne lourde de la myosine-β
NF2	Gène codant pour Merlin
NICD	Fragment intra-cellulaire de Notch
NO	Monoxyde d'azote
NRP	Neuropiline
Px	Jour x après la naissance
PDA	Canal artériel persistant
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDGFR	Récepteur du PDGF

PD-ECGF	Platalet-Derived Endothelial Cell Growth Factor
PFKFB3	6-PhosphoFructo-2-Kinase/Fructose-2,6-Biphosphatase 3 enzyme
PGDH	Prostaglandine déshydrogénase
PGE2	Prostaglandine E2
PGI2	Prostacycline
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PKA	Protéine Kinase A
PLGF	PLacental Growth Factor
pO_2	Pression partielle en oxygène
PROX	Prospero homeobox protein
Raf	Rapidly accelerated fibrosarcoma
RCC	Carcinome cellulaire rénal
RGM	Repulsive Guidance Molecule
rh-BMP	BMP humain recombinant
Ror2	Neurotrophic tyrosine kinase receptor-related 2
R-Smad	Smads régulatrices
SBE	Smad Binding Element
SPJ	Syndrome de la Polypose Juvénile
TAB1	TAK1 Binding protein
TAK1	TGFβ Activated Kinase 1
TFAP2B	Gène codant pour AP-2β
TGF-β	Transforming Growth Factor β
TGFBR	Gène codant pour des récepteurs de la famille du TGF-β
Tie	Récepteur à l'angioïétine
TIMPs	Tissue Inhibitors of MetalloProteinases
TKi	Inhibiteurs des tyrosines kinase
TNF-α	Tumor Necrosis Factor α
TrkC	Tropomyosin receptor kinase C
VD	Voltage-Dépendant
VDA	Agents perturbateurs vasculaires
VE-Cad	Vascular Endothelial Cadherin
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Récepteur du VEGF
VE-PTP	Vascular Endothelial Protein Tyrosine Phosphatase
VSMCs	Cellules de muscle lisse vasculaires
WT	Sauvage
XIAP	X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein

Introduction

Partie 1

Le développement vasculaire physiologique

1.1 Le système vasculaire

Le système vasculaire est apparu tardivement dans l'évolution. En effet, chez les animaux primitifs tels que *C. Elegans*, l'oxygène diffuse à toutes les cellules du fait de la taille réduite de l'organisme. Il apparaît avec les organismes complexes afin de distribuer les gaz, les fluides et les nutriments. Il joue un rôle important dans de nombreuses fonctions physiologiques telles que l'homéostasie, le trafic cellulaire ou l'immunité. Il est délimité par l'endothélium - ensemble des cellules de revêtement interne des vaisseaux autrement appelées cellules endothéliales [Aird, 2007]. Il est composé de deux réseaux complexes, ramifiés et connectés : le système sanguin et le système lymphatique (figure 1.1).

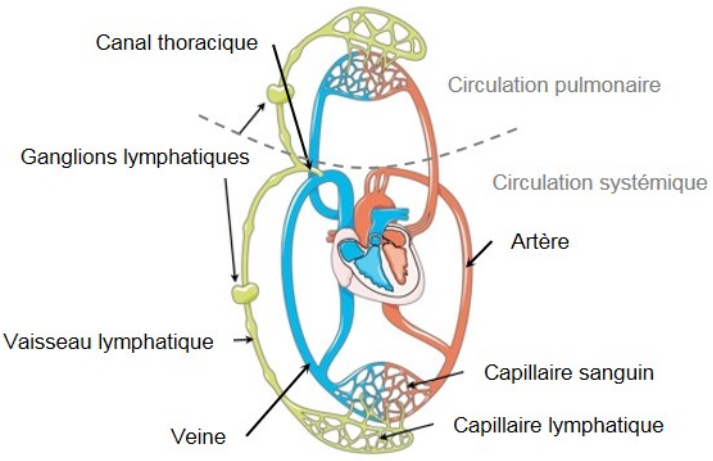


FIGURE 1.1 – Organisation du système vasculaire.
Adapté de www.medixdz.com.

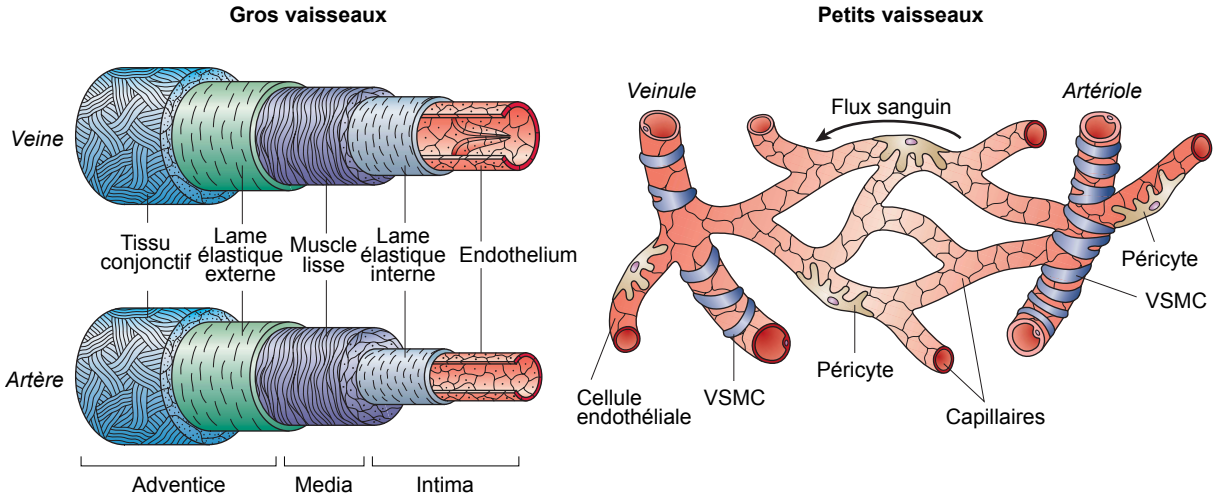


FIGURE 1.2 – Morphologie des différents vaisseaux du système sanguin.
Adapté de [Cleaver and Melton, 2003].

1.1.1 Le système sanguin

Le système sanguin est un réseau fermé composé d'une partie efférente au cœur - le réseau artériel - chargée de distribuer le sang oxygéné (à l'exception de la circulation pulmonaire) et les nutriments aux organes, et d'une partie afférente - le système veineux - qui ramène le sang pauvre en oxygène et les déchets métaboliques des organes vers le cœur. L'ensemble des vaisseaux sanguins possède une structure commune (figure 1.2). La couche interne en contact avec le sang - ou intima - est composée d'une monocouche de cellules endothéliales et de sa lame basale. L'élasticité et la contractilité d'un vaisseau lui sont conférées par la couche intermédiaire autrement appelée media. Celle-ci est formée d'une épaisseur variable de cellules de muscle lisse (VSMCs) organisées en couches concentriques. La couche externe est nommée adventice ; présente uniquement sur les gros vaisseaux, elle est formée de tissu conjonctif, de fibres de collagène et de fibres élastiques [Cleaver and Melton, 2003][Adams and Alitalo, 2007].

Les artères possèdent des parois épaisses aux capacités contractiles importantes (media épaisse) ainsi que des jonctions très resserrées entre les cellules endothéliales de manière à pouvoir résister aux forces de cisaillement imposées par le flux sanguin. Elles sont capables de se dilater et de se contracter pour adapter la pression sanguine. La paroi des veines est fine et extensible. Sa couverture en VSMCs est moindre comparée à celle des artères. Les veines possèdent des valves unidirectionnelles composées de tissu conjonctif et de cellules endothéliales afin de permettre le retour du sang des organes vers le cœur sans reflux. Les capillaires, connexions entre les artères et les veines au niveau des organes, possèdent une paroi très fine non recouverte de VSMCs mais de péricytes de façon discontinue. Ils

fonctionnent comme une barrière entre le sang et les organes contrôlant les échanges de molécules et de protéines (figure 1.2).

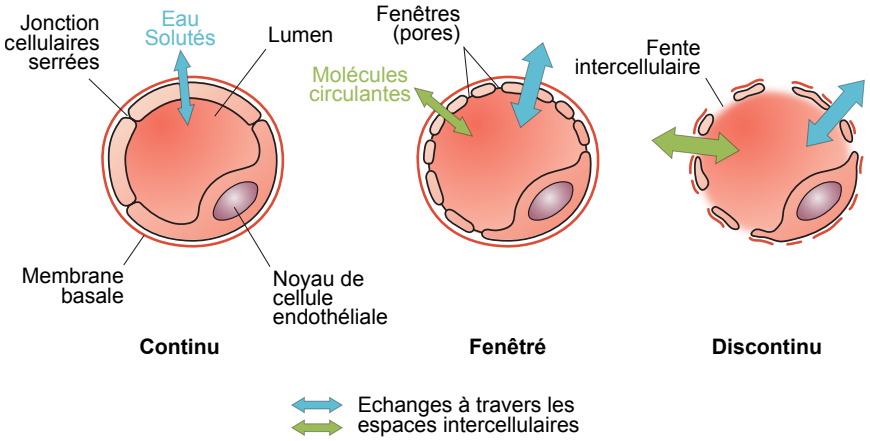


FIGURE 1.3 – Morphologie des différents types de capillaires sanguins.
Adapté de [Cleaver and Melton, 2003].

Il existe une hétérogénéité importante au sein de l'endothélium du fait de la taille des vaisseaux qu'il recouvre mais aussi de leur fonction. Trois types d'endothélium se différencient en fonction de la fenestration du lit vasculaire (figure 1.3) :

- L'endothélium continu : le lit capillaire est composé par des cellules endothéliales jointives et ne laisse passer que l'eau et les sels à travers les espaces intercellulaires ;
- L'endothélium fenêtré : les cellules endothéliales sont espacées de manière à former des pores (recouverts par la lame basale) qui laissent diffuser certaines protéines et macromolécules en plus de l'eau et des sels ;
- L'endothélium discontinu : le lit capillaire est caractérisé par une absence de lame basale et un espacement très important des cellules endothéliales permettant des échanges importants entre le tissu et le sang.

L'endothélium est continu notamment dans les gros vaisseaux qui alimentent les organes tels que le cœur, les poumons, les muscles et la peau. Le cerveau possède également un endothélium continu formant la barrière hémato-encéphalique. Les glandes endocrines et exocrines, les glomérules du rein, le pancréas ou encore la muqueuse intestinale possèdent des capillaires fenestrés, leur fonction nécessitant des échanges importants de fluides. L'endothélium discontinu n'est observé que dans des organes très spécialisés tels que le foie, la rate ou la moelle osseuse pour lesquels les échanges avec le sang sont très importants [Cleaver and Melton, 2003][Potente and Mäkinen, 2017].

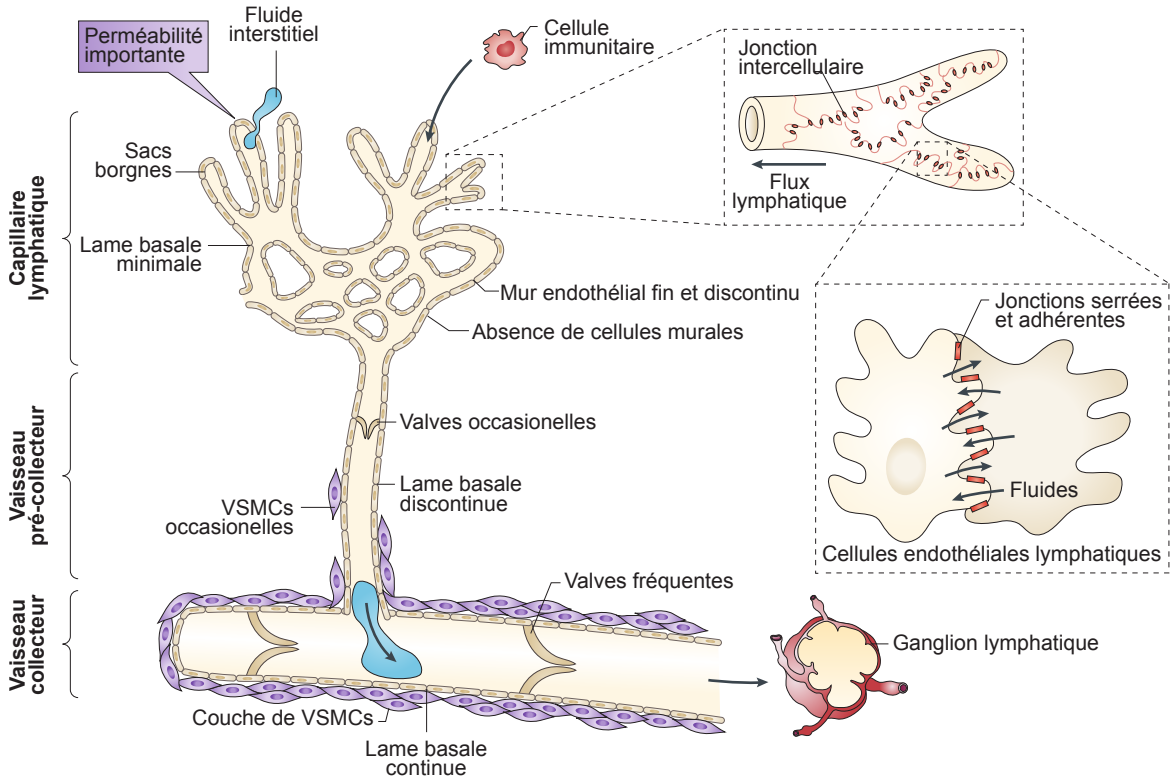


FIGURE 1.4 – Organisation et morphologie du système lymphatique.
Adapté de [Stacker et al., 2014].

1.1.2 Le système lymphatique

Le système lymphatique est un système unidirectionnel à extrémités borgnes. Il est composé d'un réseau hiérarchisé de vaisseaux lymphatiques, des ganglions lymphatiques et des organes lymphoïdes (rate, thymus et amygdale) essentiels pour la réponse immunitaire. Les capillaires, borgnes, collectent les fluides interstitiels en excès et forment un point d'entrée dans le système lymphatique pour les cellules immunitaires présentes dans les tissus. Ils drainent la lymphe jusqu'à des vaisseaux pré-collecteurs qui se déversent eux-même dans les vaisseaux collecteurs. Ces derniers transportent la lymphe jusqu'aux canaux thoracique et lymphatique droit afin de retourner les fluides dans la circulation sanguine (connexion au système veineux respectivement au niveau des veines sous-clavière gauche et subclavière droite). La lymphe est drainée du début à la fin du réseau notamment grâce à la présence de valves intraluminales qui empêchent tout reflux vers les lymphatiques terminaux (figure 1.4). Le système lymphatique participe également à l'absorption des lipides et du cholestérol des tissus. Son action est essentielle pour le trafic des cellules immunitaires, transportant lymphocytes et cellules dendritiques des tissus vers les ganglions et les organes lymphoïdes [Jones et al., 2001][Potente and Mäkinen, 2017].

Comme celui du système sanguin, l'endothélium des vaisseaux lymphatiques présente une certaine hétérogénéité en fonction du rôle des vaisseaux auxquels il appartient. Les cellules endothéliales des capillaires sont reliées entre elles par des jonctions en boutonnière. Positionnées à intervalles réguliers, elles permettent aux cellules de se chevaucher légèrement rendant ainsi la monocouche endothéliale plus perméable. Les capillaires sont associés à une membrane basale discontinue par des filaments d'ancrage et ne sont pas recouverts par des cellules murales. Toutes ces caractéristiques facilitent la collecte des fluides quand la pression interstitielle est importante. Au niveau des vaisseaux collecteurs, les cellules endothéliales possèdent des jonctions serrées continues. Ce type de jonctions permet d'éviter toute fuite de lymphe ou de cellules immunitaires. Leur membrane basale est continue et recouverte d'une couche de VSMC. Ces cellules murales sont essentielles au drainage de la lymphe. En effet, si le reflux de celle-ci est empêché par la présence de nombreuses valves dans ces vaisseaux, son avancée est due à la capacité unique de cette couche musculaire à générer des contractions phasiques et toniques permettant le "pompage" de la lymphe. Les vaisseaux pré-collecteurs présentent une morphologie intermédiaire entre les vaisseaux collecteurs et les capillaires (figure 1.4) [Potente and Mäkinen, 2017].

1.2 La vasculogenèse

La vasculogenèse est l'étape de formation des premiers vaisseaux sanguins dans l'embryon. Elle débute de façon précoce (E6.5 chez la souris), juste après la gastrulation, à la fois à l'extérieur et à l'intérieur de l'embryon [Patel et al., 2011].

En extra-embryonnaire, sous l'induction du FGF-2 (Fibroblast Growth Factor) et de morphogènes de la famille Hegdehog, des cellules primitives du mésoderme migrent au centre du sac vitellin et se différencient en hémangioblastes. Ceux-ci se différencient alors pour former les premiers îlots sanguins composés de deux types cellulaires : les angioblastes, futures cellules endothéliales, en périphérie et les précurseurs hématopoiétiques, futures cellules sanguines, au centre. Grâce à la stimulation par des facteurs de croissance tels que le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), les angioblastes migrent et se différencient ce qui entraîne la fusion des îlots sanguins pour former le plexus vasculaire primitif. La migration et la différenciation des angioblastes entraîne également la formation de deux structures vasculaires intra-embryonnaires : l'aorte dorsale et la veine cardinale (figure 1.5) [Patel et al., 2011][Potente and Mäkinen, 2017]. Par la suite (E8.5), le plexus primitif se connecte au tube cardiaque (non fonctionnel à ce stade) et s'anastomose avec les structures intra-embryonnaires, formant ainsi un réseau vasculaire composé à la fois de tubes endothéliaux intra et extra-embryonnaires peu stables. Ce réseau primi-

tif va se développer dans tout l'organisme et se stabiliser progressivement. Les premiers battements cardiaques initient la circulation sanguine et entraînent un remodelage du plexus en un arbre vasculaire hiérarchisé [Patel et al., 2011].

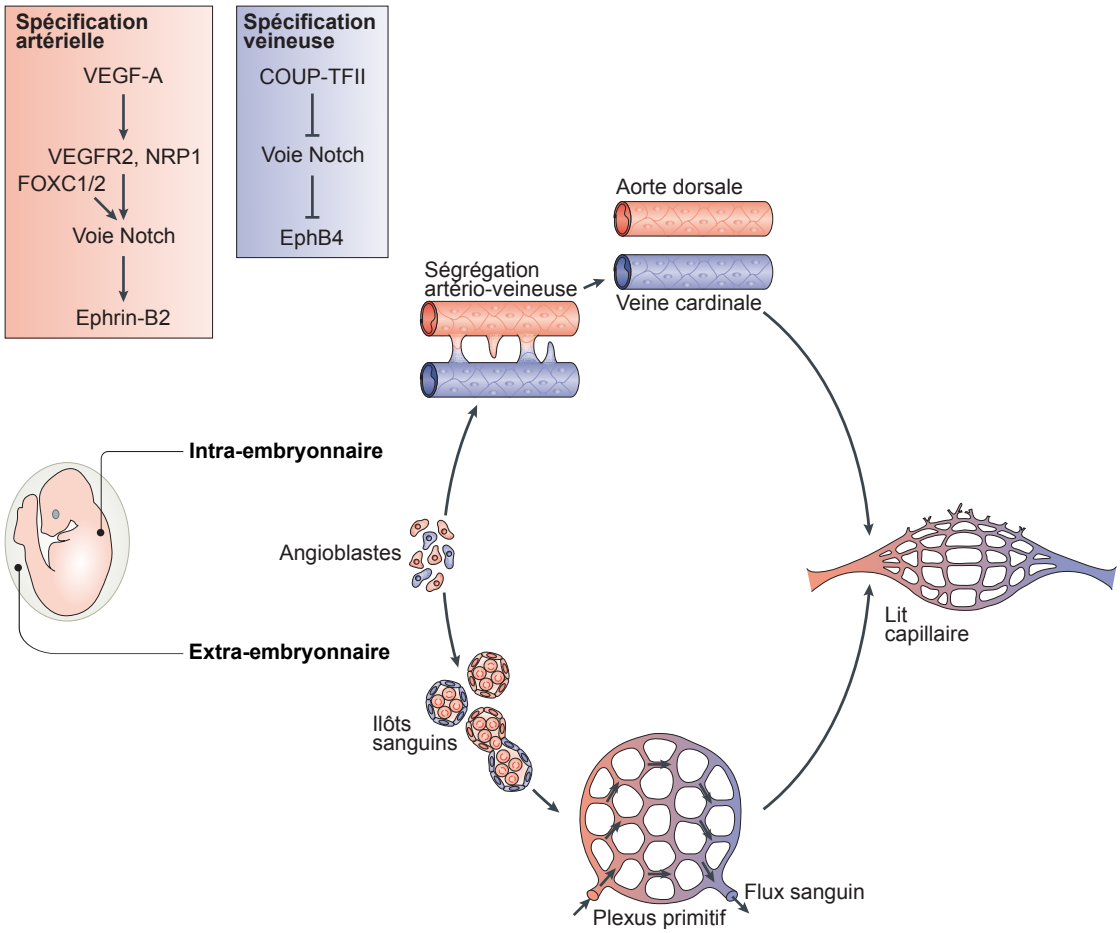


FIGURE 1.5 – Mécanismes de la vasculogenèse.
Adapté de [Adams and Alitalo, 2007] [Herbert and Stainier, 2011] [Potente and Mäkinen, 2017].

La spécialisation des vaisseaux en artères et en veines se fait immédiatement après l'assemblage du vaisseau. Elle est due à des stimuli homéostasiques tels que la pression sanguine et à des facteurs génétiques. La stimulation par le VEGF-A entraîne une activation de la voie de signalisation Notch et la spécialisation artérielle avec notamment l'expression de marqueurs artériels comme EphrinB2. Au contraire, l'expression du récepteur COUP-TFII induit une inhibition de la signalisation Notch et la spécialisation veineuse associée à l'expression de marqueurs veineux comme EphrinB4 (figure 1.5) [Adams and Alitalo, 2007] [Herbert and Stainier, 2011][Potente and Mäkinen, 2017].

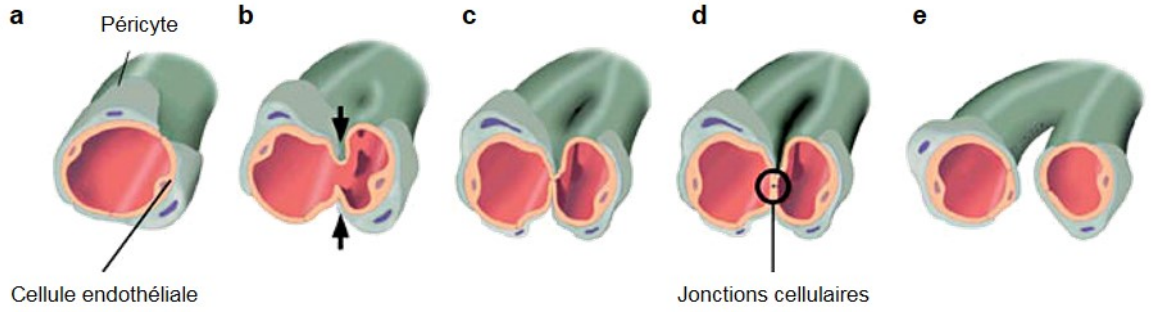


FIGURE 1.6 – Angiogenèse par intussusception : exemple d'un capillaire.
D'après [De Spiegelaere et al., 2012].

1.3 L'angiogenèse

L'angiogenèse fait suite à la vasculogenèse. Il s'agit de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir d'un réseau vasculaire préexistant, et donc à son initiation à partir du plexus vasculaire primitif. Ce phénomène est très actif lors du développement du réseau sanguin qui se déroule autour de la naissance et lors de la croissance. Les artères et les veines subissent alors des remodelages et une augmentation de leur circonférence. Les capillaires bourgeonnent et s'interconnectent de manière à former des réseaux plus importants. A l'âge adulte, l'angiogenèse est principalement quiescente (peu de renouvellement des cellules endothéliales). Elle peut être réactivée par la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques dans certains contextes physiologiques tels que le cycle menstruel, la grossesse ou les processus de cicatrisation. Une réactivation anormale a également été observée dans certaines pathologies comme les cancers, la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) ou encore la rétinopathie diabétique.

L'angiogenèse peut se dérouler selon deux mécanismes différents : l'intussusception ou le bourgeonnement.

1.3.1 Angiogenèse par intussusception

L'angiogenèse par intussusception a été formellement identifiée en 1986 par Caduff et al. lors d'une étude sur le développement pulmonaire [Caduff et al., 1986]. Ce mécanisme permet le développement de nouvelles branches et connections dans l'arbre vasculaire sans passer par la formation de bourgeons. Plusieurs étapes sont nécessaires pour son bon déroulement. Dans un premier temps, les cellules endothéliales opposées s'invaginent et migrent l'une vers l'autre (figure 1.6.b), jusqu'à rentrer en contact et former un pilier (figure 1.6.c). Leurs jonctions sont ensuite réorganisées de manière à former un espace

entre les deux cellules autrement appelé "perforation centrale" (figure 1.6.d). Cet espace est alors envahi par des péricytes et des myofibroblastes qui y déposent de la matrice extra-cellulaire de manière à consolider le pilier. Plusieurs piliers se forment côte à côte et fusionnent jusqu'à induire la séparation du vaisseau pré-existant en deux nouveaux vaisseaux (figure 1.6.e) [De Spiegelaere et al., 2012].

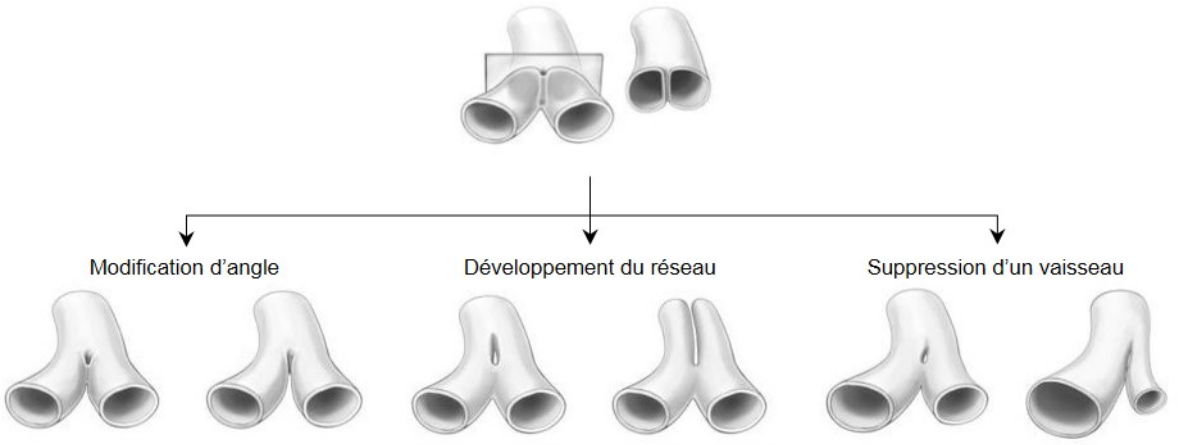


FIGURE 1.7 – Angiogenèse par intussusception : devenir des vaisseaux.
D'après [Mentzer and Konerding, 2014].

Ce phénomène permet non seulement d'étendre le réseau vasculaire en multipliant le nombre de vaisseaux mais aussi de le réorganiser. En effet, en se déroulant de manière asymétrique, l'angiogenèse par intussusception permet de modifier l'angle d'une bifurcation entre deux vaisseaux ou de supprimer un vaisseau redondant ou peu efficace (phénomène de "pruning") (figure 1.7) [Mentzer and Konerding, 2014].

L'angiogenèse par intussusception a longtemps été décrite uniquement dans les réseaux vasculaires pulmonaires et musculaires [Caduff et al., 1986][Egginton et al., 2001]. Aujourd'hui, on sait qu'elle se déroule dans de nombreux tissus en développement comme l'os ou la rétine. Une des hypothèses actuelles est qu'elle intervient après une angiogenèse par bourgeonnement importante de manière à optimiser le réseau vasculaire et l'apport sanguin dans un organe ainsi qu'à lui donner une architecture organe spécifique [De Spiegelaere et al., 2012].

1.3.2 Angiogenèse par bourgeonnement

Les cellules endothéliales sous leur forme quiescente constituent une monocouche de cellules inactives en forme de pavés polarisés qui délimitent la lumière vasculaire. Elles

forment une barrière étanche notamment grâce aux jonctions adhérentes (formées par des molécules de Vascular Endothelial Cadherin et de CD31) et aux jonctions serrées (formées par des occludines, des claudines, des Zonula Occluden 1 et 2 et des Junctional Adhesion Molecules). La stabilité de cette barrière est renforcée par les péricytes acollés aux cellules endothéliales : ils empêchent leur prolifération et limitent leur interaction avec les facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF-A ou les FGF [Herbert and Stainier, 2011].

La fonction principale des vaisseaux étant d'oxygéner les tissus, les cellules endothéliales possèdent des senseurs d'oxygène et des facteurs inductibles par l'hypoxie. Lorsque les cellules d'un tissu sont en manque d'oxygène, elles sécrètent des facteurs pro-angiogéniques qui déclenchent la phase d'activation de l'angiogenèse par bourgeonnement. Au cours de cette phase, les cellules endothéliales sortent de leur quiescence, migrent et prolifèrent de manière à former un nouveau vaisseau. La phase de maturation permet ensuite de stabiliser et de rendre le vaisseau fonctionnel [Carmeliet and Jain, 2011a].

Phase d'activation

En réponse aux signaux pro-angiogéniques produits dans leur environnement, les vaisseaux se dilatent et deviennent plus perméables sous l'action du VEGF-A et du monoxyde d'azote [Carmeliet, 2000]. Les jonctions serrées sont alors dégradées et des enzymes, les métaloprotéases matricielles (MMPs) sont libérées et commencent à dégrader la membrane basale. Les péricytes se détachent alors du vaisseau et de sa membrane basale, permettant aux cellules endothéliales de migrer. Cette migration est facilitée par l'action des MMPs qui dégradent les adhésions cellule-cellule et cellule-matrice. Elles permettent également la libération de facteurs pro-angiogéniques de la matrice tels que le VEGF-A, le FGF-2 et le TGF-β (Transforming Growth Factor β) ce qui augmente la stimulation des cellules endothéliales et leur migration vers le stimulus angiogénique. Lors de cette phase, toutes les cellules endothéliales sont activées par le VEGF-A. Cependant, une seule est sélectionnée pour être à l'origine d'un bourgeon : la "tip cell" (figure 1.8.a). Elle acquiert un phénotype particulier qui est réprimé chez ses voisines (figure 1.8.b) [Carmeliet and Jain, 2011a] [Herbert and Stainier, 2011][Adams and Alitalo, 2007].

La "tip cell" est dotée de fillopodes qui lui permettent de scanner son environnement pour repérer l'origine du stimuli pro-angiogénique (gradient de VEGF-A) et guider le bourgeon [De Smet et al., 2009]. Elle sécrète du PDGF-BB (Platelet Derived Growth Factor BB) tout au long de la croissance du bourgeon de manière à le stabiliser. A ses côtés, les "stalk cells", ou cellules de la tige, sont très prolifératives. Elles permettent de prolonger le bourgeon en migrant derrière la "tip cell". Elles gardent contact avec la membrane

basale du vaisseau d'origine de manière à stabiliser le bourgeon. Les rôles des cellules dans le bourgeon ne sont pas fixes : les cellules sont en compétition constante pour devenir la "tip cell" sous le contrôle de la voie Notch qui régule l'expression du récepteur de type 2 du VEGF (VEGFR-2) [Jakobsson et al., 2010]. De part et d'autre du bourgeon endothélial se trouvent les "phallanx cells". Ces cellules forment une barrière serrée entre le sang et le tissu environnant. Elles prolifèrent peu et servent à stabiliser la liaison entre le bourgeon et le vaisseau d'origine du fait de leurs caractéristiques proches des cellules endothéliales quiescentes : elles reposent sur une membrane basale et sont ancrées les unes aux autres par des jonctions adhérentes et serrées [Herbert and Stainier, 2011] [Adams and Alitalo, 2007].

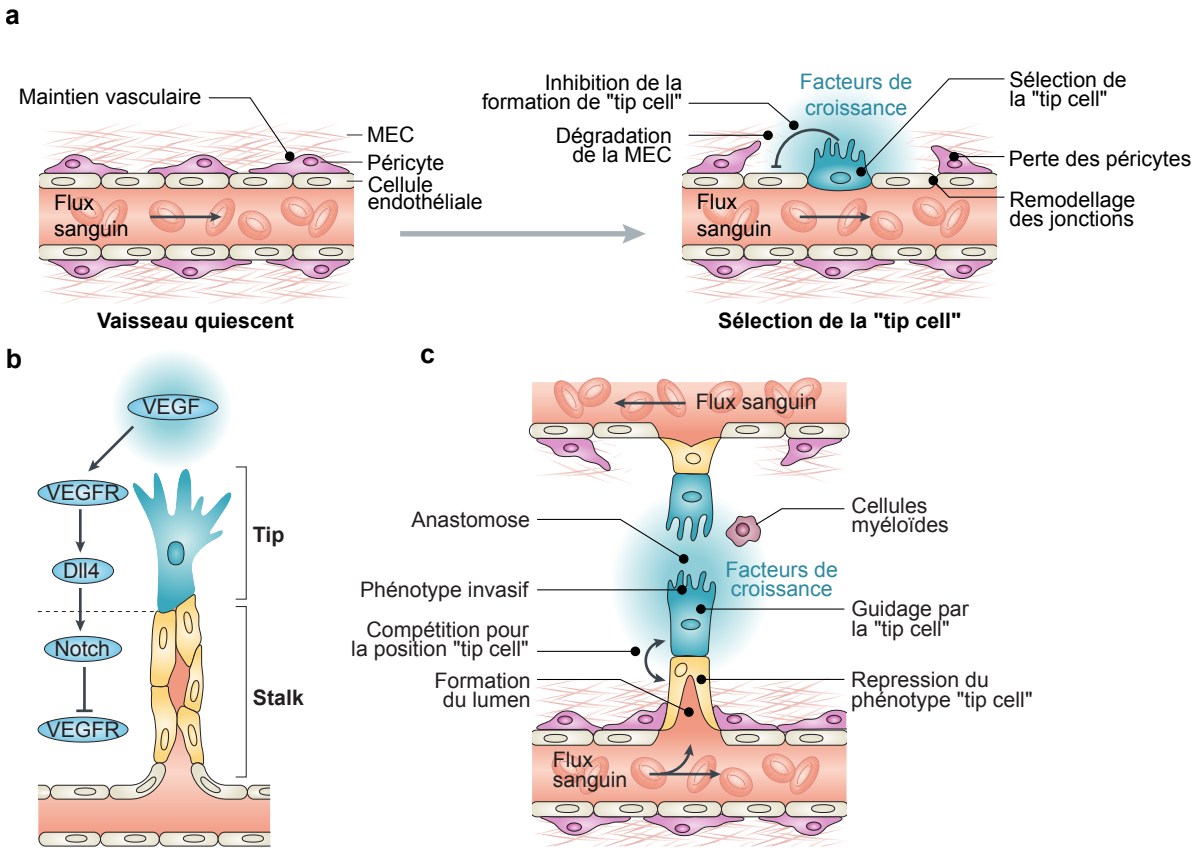


FIGURE 1.8 – Angiogenèse par bourgeonnement : phase d'activation.
a - Du vaisseau quiescent à la sélection de la "tip cell". b - Mécanismes impliqués dans la compétition pour la position "tip cell". c - Fusion des bourgeons et formation de la lumière. D'après [Herbert and Stainier, 2011].

La rencontre entre deux "tip cells" marque la fin de la phase d'élongation en supprimant leur comportement explorateur et leur motilité. A ce stade, les deux bourgeons peuvent fusionner pour donner un nouveau vaisseau ou se repousser avant de régresser en cas d'incompatibilité, processus évitant les jonctions directes artère-veine notamment.

Les macrophages semblent jouer un rôle essentiel dans le guidage et la fusion des deux bourgeons (figure 1.8.c) [Fantin et al., 2010]. Afin de mettre en place un flux sanguin, la formation de la lumière vasculaire est nécessaire. Les "stalk cells" sont les acteurs principaux de cette étape. En effet, contrairement à la "tip cell", les cellules de la tige conservent leur polarité apico-basale tout au long de leur prolifération, permettant ainsi la formation du lumen [Adams and Alitalo, 2007]. Plusieurs mécanismes possibles ont été décrits [Lubarsky and Krasnow, 2003] :

- L'enveloppement des cellules endothéliales sur elles-même ;
- Le bourgeonnement en tube dès l'origine du vaisseau ;
- La cavitation ou l'apoptose de l'agrégat composé de cellules centrales du bourgeon ;
- Le phénomène de "cord hollowing" (ou corde creusée) quand la lumière est formée entre les cellules d'un bourgeon peu épais par aplatissement des cellules ;
- La vacuolisation qui consiste en la fusion de vacuoles intracellulaires dans une cellule endothéliale puis entre les cellules voisines.

La vacuolisation est le phénomène le plus souvent observé, *in vitro* comme *in vivo*. Le type de mécanisme semble dépendre du tissu dans lequel prend place l'angiogenèse [Lubarsky and Krasnow, 2003][De Spiegelaere et al., 2012].

Phase de maturation

L'objectif de cette étape est la stabilisation du néo-vaisseau de manière à ce que l'endothélium redevienne quiescent. Si elle se déroule mal, le bon fonctionnement du vaisseau peut être compromis. En effet, un défaut de stabilisation peut entraîner l'apoptose des cellules endothéliales et la régression du vaisseau lorsque l'environnement s'appauvrit en VEGF, n'étant plus hypoxique.

Le début de la phase de maturation est marqué par l'arrêt de la migration et de la prolifération des cellules endothéliales lors du contact entre deux bourgeons et par leur anastomose. Les jonctions cellulaires entre les différentes cellules des deux bourgeons sont alors resserrées. Les cellules endothéliales synthétisent de la matrice extra-cellulaire pour former la membrane basale sous l'action du TGF-β1 (figure 1.9.a) [Carmeliet and Jain, 2011a].

L'étape cruciale de la phase de maturation est le recrutement des cellules murales par les cellules endothéliales. En effet, les vaisseaux non recouverts sont peu stables et plus facilement dégradés. Les précurseurs des cellules murales - des cellules mésenchymateuses non différenciées - sont recrutés par les cellules endothéliales *via* les voies de signalisation TGF-β1/ALK5 (Activin receptor-Like Kinase 5), PDGF-BB/PDGFR-β (le récepteur est exprimé par les cellules murales alors que PDGF-BB est sécrété par les cellules endothé-

liales) et Ang1/Tie2 (angiopoïétine 1). La différenciation des précurseurs en péricytes (capillaires) ou en VSMCs (vaisseau de diamètre plus important) est notamment médiée par le TGF-β1 sécrété par les cellules endothéliales (figure 1.9.a) [Adams and Alitalo, 2007]. Le recouvrement du vaisseau varie en fonction de son type et de sa fonction (figure 1.9.b). Le recrutement des cellules murales facilite également le dépôt de la membrane basale car elles sécrétent des TIMPs (Tissue Inhibitors of MetalloProteinases) qui inhibent les MMPs [Carmeliet and Jain, 2011a].

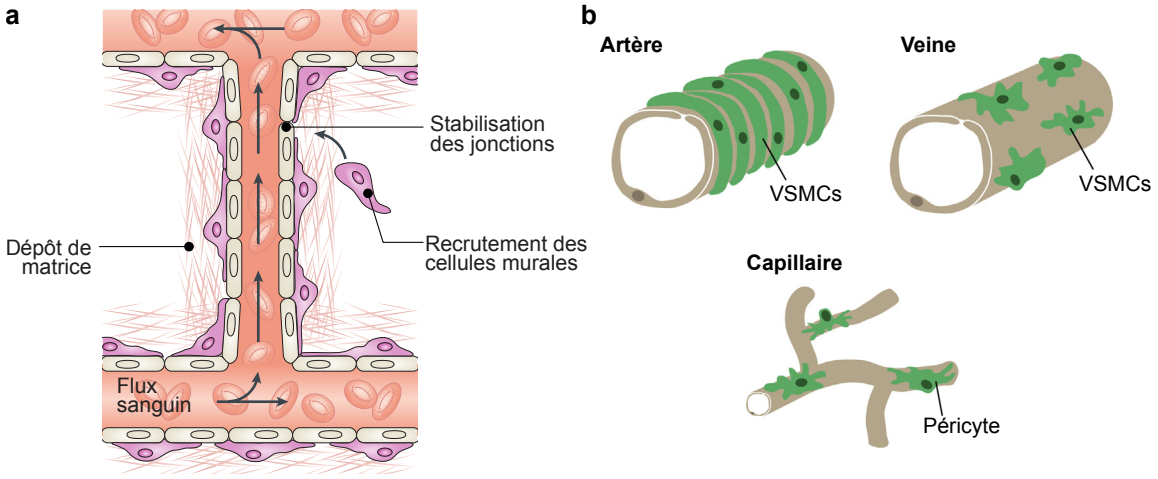


FIGURE 1.9 – Angiogenèse par bourgeonnement : phase de maturation.
a - Maturation du néo-vaisseau. D'après [Herbert and Stainier, 2011]. b - Recouvrement péricytaire en fonction du type de vaisseau. D'après [Trainor, 2013].

1.3.3 Acteurs principaux de l'angiogenèse

Les différentes phases de l'angiogenèse sont dépendantes de plusieurs facteurs et voies de signalisation. Un équilibre entre ces différents acteurs permet au sytème vasculaire de rester quiescent ou de proliférer (figure 1.10).

Famille du VEGF

La famille du VEGF est composée de sept glycoprotéines secrétées (variants d'épissage non compris) : le VEGF-A, le VEGF-B, le VEGF-C, le VEGF-D, le VEGF-E, le VEGF-F et le PLGF (Placental Growth Factor). En fonction de leur affinité, elles peuvent se lier à trois récepteurs à activité tyrosine kinase : VEGFR-1 (ou FLT1), VEGFR-2 (ou FLK1) ou VEGFR-3 (ou FLT4). Il existe également deux co-récepteurs pouvant améliorer la signalisation : NRP1 (neuropiline 1) et NRP2. Ces co-récepteurs sont aussi connus pour avoir leur activité propre (figure 1.10) [Patel et al., 2011].

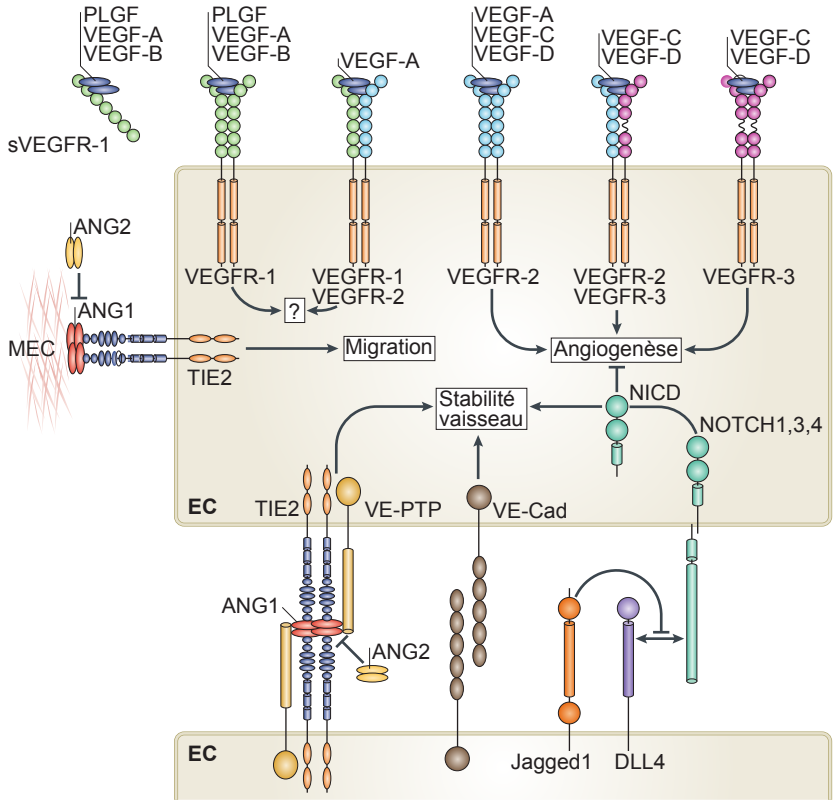


FIGURE 1.10 – Principaux acteurs contrôlant l'angiogenèse.
D'après [Herbert and Stainier, 2011].

Le VEGF-A est le principal membre de cette famille à être impliqué dans l'angiogenèse. Son expression étant régulée par l'hypoxie, il induit la phase d'activation *via* sa fixation au VEGFR-2. Cette voie de signalisation est indispensable à l'angiogenèse et à la vasculogenèse. En effet, la délétion génétique du ligand ou de son récepteur est létal du fait de l'absence de développement du système vasculaire. Le VEGF-A possède plusieurs isoformes dont les rôles dans l'angiogenèse ne sont pas identiques. Les isoformes solubles induisent essentiellement un élargissement des vaisseaux sanguins tandis que les isoformes liées à la matrice extra-cellulaire induisent une augmentation du nombre de vaisseaux. De même, le VEGF-A paracrine tend à augmenter le nombre de branchements alors que le VEGF-A autocrine sert à l'homéostasie des vaisseaux [Carmeliet and Jain, 2011a] [Herbert and Stainier, 2011].

Le VEGF-C est également un membre de la famille jouant un rôle important dans l'angiogenèse. Capable de se lier à la fois au VEGFR-2 et au VEGFR-3, il est impliqué dans la sélection des "tip cells". De plus, sa signalisation *via* VEGFR-3 est nécessaire aux phases précoces de formation des vaisseaux sanguins. Il joue également un rôle important dans la lymphangiogenèse (cf. partie 1.4 p.34) [Carmeliet and Jain, 2011a]

[Herbert and Stainier, 2011].

Le PLGF n'est pas essentiel à l'angiogenèse mais est connu pour la stimuler de façon indirecte ou directe. Il est majoritairement étudié dans le cadre de maladies vasculaires [Carmeliet and Jain, 2011a].

Le VEGFR-1 est également un acteur indispensable de l'angiogenèse. En effet, sa délétion est létale au stade embryonnaire du fait d'une angiogenèse excessive. Capable de lier le VEGF-A avec une affinité plus importante que le VEGFR-2, son activité tyrosine kinase est bien moindre. Il est présent sous forme soluble ou sous forme membranaire. Il semble servir de "piège à ligand", diminuant la quantité de VEGF-A disponible de manière à orienter l'angiogenèse (forme soluble), à la limiter ou à l'inhiber (forme membranaire) [Carmeliet and Jain, 2011a][Herbert and Stainier, 2011].

Voie de signalisation Notch

Chez les mammifères, la voie de signalisation Notch comporte quatre récepteurs transmembranaires Notch - numérotés de 1 à 4 - et cinq ligands transmembranaires - DLL1 (Delta-Like 1), DLL3, DLL4, Jagged1 et Jagged2. La liaison d'un ligand DLL ou Jagged d'une cellule émettrice à un récepteur Notch de la cellule voisine entraîne le clivage de celui-ci et la libération intracellulaire du fragment NICD (Notch Intra-Cellular Domain) qui fonctionne comme régulateur transcriptionnel de plusieurs gènes cibles (figure 1.10) [Patel et al., 2011][Herbert and Stainier, 2011].

Lors de la phase d'activation, la voie de signalisation Notch est essentielle à la régulation du phénotype "tip" ou "stalk cell". En effet, l'activation de la voie VEGF-A/VEGFR-2 entraîne l'expression de DLL4 dans la "tip cell". En se liant au récepteur Notch exprimé par la "stalk cell" voisine, DLL4 déclenche la répression de l'expression de VEGFR-2 et l'augmentation de l'expression de VEGFR-1 dans la "stalk cell", limitant ainsi sa capacité à répondre au VEGF-A et à se différencier en "tip cell" (figure 1.8.b). La liaison DLL4/Notch va également entraîner la signalisation WNT dans ces cellules, induisant ainsi leur prolifération. Le ligand Jagged1 - exprimé par les "stalk cells" dans le cas du bourgeonnement - permet de contrôler la voie de signalisation en agissant comme compétiteur de la liaison DLL4/Notch [Carmeliet and Jain, 2011a][Herbert and Stainier, 2011].

La voie de signalisation Notch, en dehors des "stalk cells", est connue pour induire la quiescence des cellules endothéliales (figure 1.10). En effet, l'inhibition de cette voie conduit à la formation de vaisseaux plus nombreux mais hypoperfusés. La signalisation

DLL4/Notch au niveau des cellules murales entraîne d'ailleurs la maturation des vaisseaux et leur stabilisation [Carmeliet and Jain, 2011a].

Voie de signalisation Ang/Tie

Cette voie de signalisation comporte deux récepteurs - Tie1 et Tie2 - et trois ligands qui sont des glycoprotéines secréetées - Ang1, Ang2 et Ang4. En se liant à Tie2, Ang1 déclenche une cascade de signalisation. Sa liaison est antagonisée de façon compétitive par Ang2. Le rôle d'Ang4 est peu décrit, mais il semble qu'il ait une action similaire à Ang1. Le récepteur Tie1 est un récepteur orphelin qui pourrait agir comme un régulateur négatif de l'activité Tie2 [Carmeliet and Jain, 2011a].

La voie de signalisation Ang/Tie est un système binaire qui permet à la fois de maintenir la quiescence des vaisseaux et de déclencher leur réponse aux stimuli angiogéniques. Ang1 est synthétisé par les cellules murales recouvrant les vaisseaux, facilitant les interactions entre ces cellules et les cellules endothéliales qui présentent Tie2. Au niveau des jonctions cellulaires, Tie2 se complexe avec VE-PTP (Vascular Endothelial Protein Tyrosine Phosphatase) et s'associe à Ang1 afin de maintenir la quiescence vasculaire en favorisant la couverture par les cellules murales et le dépôt de lame basale. Dans le cas où Ang1 est associé à la matrice extra-cellulaire (MEC), son interaction avec Tie2 peut induire la migration des cellules endothéliales, notamment lors de la dégradation de la lame basale pendant la phase d'activation de l'angiogenèse (figure 1.10). Ang2 est sécrété par les cellules endothéliales elles-même en réponse à un stimuli externe. Son activité, antagoniste vis-à-vis de Ang1, induit une déstabilisation des vaisseaux (détachement cellules murales, rupture des jonctions, etc.) et leur bourgeonnement en présence de VEGF-A. Si le micro-environnement ne contient pas de VEGF-A, Tie2 induit alors une régression du vaisseau [Carmeliet and Jain, 2011a][Herbert and Stainier, 2011][Patel et al., 2011].

Famille du PDGF

La famille du PDGF est composée de quatre isoformes - PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C et PDGF-D - qui s'associent pour former des homodimères ou des hétérodimères dans le cas du PDGF-AB. Il existe deux récepteurs à activité tyrosine kinase : PDGFR-α et PDGFR-β [Patel et al., 2011].

Le PDGF-BB et son récepteur PDGFR-β sont essentiels à la stabilisation des vaisseaux *via* leur rôle dans le recouvrement vasculaire. Les cellules endothéliales produisent du PDGF-BB dans le micro-environnement où il sert de chimio-attractant pour les cellules murales qui expriment son récepteur. Les "tip cells" produisent beaucoup de PDGF-

BB, créant un gradient pour le recrutement des cellules murales le long du bourgeon. L'ablation du gène codant pour PDGF-BB entraîne des vaisseaux tortueux, la formation d'anévrismes et de fuites entraînant de nombreux saignements, montrant par-là même le rôle essentiel de cette protéine dans la phase de maturation de l'angiogenèse [Carmeliet and Jain, 2011a][Patel et al., 2011].

Famille du FGF

La superfamille des FGF est composée de 23 membres chez les mammifères capables de se lier à des FGFR (récepteurs aux FGF). Elle contrôle de nombreuses fonctions biologiques [Patel et al., 2011].

A l'instar du VEGF, plusieurs FGF ont des action pro-angiogéniques comme le FGF-2 (autrement appelé FGF basique) et et le FGF-1. Le FGF-9 stimule également l'angiogenèse dans le cas précis de la réparation osseuse. Libéré dans le micro-environnement vasculaire par différents types cellulaires, le FGF-2 peut avoir un effet direct (FGFR-1 exprimé à la surface des cellules endothéliales) ou indirect (induction de la libération d'autres facteurs angiogéniques) sur les vaisseaux stimulant ainsi la prolifération et la migration des cellules endothéliales lors de la phase d'activation et de la vasculogenèse. Au-delà de son rôle pro-prolifératif sur les cellules endothéliales, le FGF-2, à faible concentration, est également nécessaire à la quiescence vasculaire. En effet, l'absence de FGF-2 conduit à un désagencement des vaisseaux [Carmeliet and Jain, 2011a].

Famille du TGF-β

Cette famille est notamment impliquée dans la phase de maturation des vaisseaux sanguins. Son implication sera détaillée dans une section relative à cette famille en fin d'introduction (chapitre 4.3.3 p.94).

1.4 La lymphangiogenèse

La lymphangiogenèse, ou développement des vaisseaux lymphatiques, débute après l'établissement du système sanguin et plus spécifiquement juste après la séparation entre artères et veines. Ainsi, au jour embryonnaire E9.0, des cellules endothéliales sanguines issues principalement de la veine cardinale commencent à exprimer le marqueur lymphatique LYVE-1 puis le facteur de transcription PROX1 (vers E9.75) et à perdre leurs marqueurs sanguins. A E10.5, ces cellules se différencient en cellules endothéliales lymphatiques. Elles bourgeonnent ensuite à partir de la veine cardinale sous l'effet du VEGF-C [Yoshimatsu et al., 2016]. Puis elles migrent dans la région jugulaire grâce à la fixation du

VEGF-C environnant sur le récepteur VEGFR-3 pour former le système lymphatique primitif. Celui-ci est composé du canal thoracique primordial, des vaisseaux lymphatiques périphériques primordiaux dans la zone jugulaire et des sacs lymphatiques issus des autres zones de bourgeonnement. Le plexus lymphatique primitif se sépare du réseau sanguin à ce stade. Il a été mis en évidence, chez la souris, qu'il existerait d'autres progéniteurs des cellules endothéliales lymphatiques non issus du système veineux au niveau du mésentère, du cœur et de la peau. Cependant, leur origine cellulaire précise reste mal définie. Sous l'action du VEGF-C et de NRP2, le système lymphatique primitif s'étend ensuite par bourgeonnement et prolifération entre E11.5 et E14.5 (figure 1.11) [Yoshimatsu et al., 2016][Potente and Mäkinen, 2017].

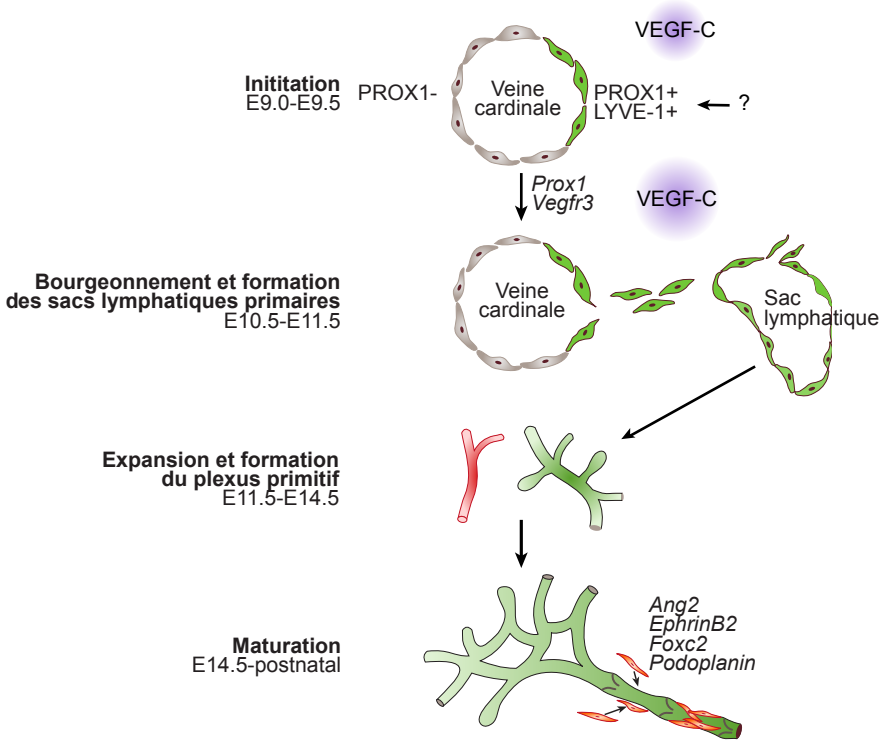


FIGURE 1.11 – Etapes principales de la lymphangiogenèse.
D'après [Alitalo et al., 2005].

A partir de E14.5 et jusqu'après la naissance, le réseau lymphatique subit une phase de maturation. Cette étape comprend son développement en une structure hiérarchisée (figure 1.4) *via* le remodelage du plexus primitif ainsi que par la formation des valves et le recrutement des cellules murales. Plusieurs facteurs sont primordiaux à la maturation. Ang2 est primordial pour la formation des valves ainsi que pour la couverture des vaisseaux. EphrinB2 est nécessaire pour la couverture différenciée des différents vaisseaux lymphatiques. On notera également que Foxc2 et la podoplanine sont nécessaires à la

différenciation des différents vaisseaux (figure 1.11). Lors de la maturation, les vaisseaux lymphatiques deviennent "insensibles" au VEGF-C de manière à éviter toute prolifération ou migration anarchique [Adams and Alitalo, 2007][Yoshimatsu et al., 2016].

Partie 2

Le canal artériel

Le canal artériel - ou *ductus arterisus* (DA) - est un petit vaisseau sanguin qui constitue une dérivation fœtale faisant passer le sang directement de l'artère pulmonaire à l'aorte. Il permet ainsi à la circulation sanguine d'éviter le circuit pulmonaire non fonctionnel (seulement 10% du débit cardiaque passe par les poumons) pour aller s'oxygéner au niveau du cordon. A la naissance, les poumons deviennent fonctionnels et le canal se ferme et se transforme en ligament (figure 2.1) dans des délais très courts : 1 à 3 heures chez la souris, 24 à 48 heures chez l'Homme. L'absence de fermeture ou la réouverture du canal font partie des principales causes de mortalité chez les nouveaux-nés prématurés [Bergwerff et al., 1999][Gournay, 2011].

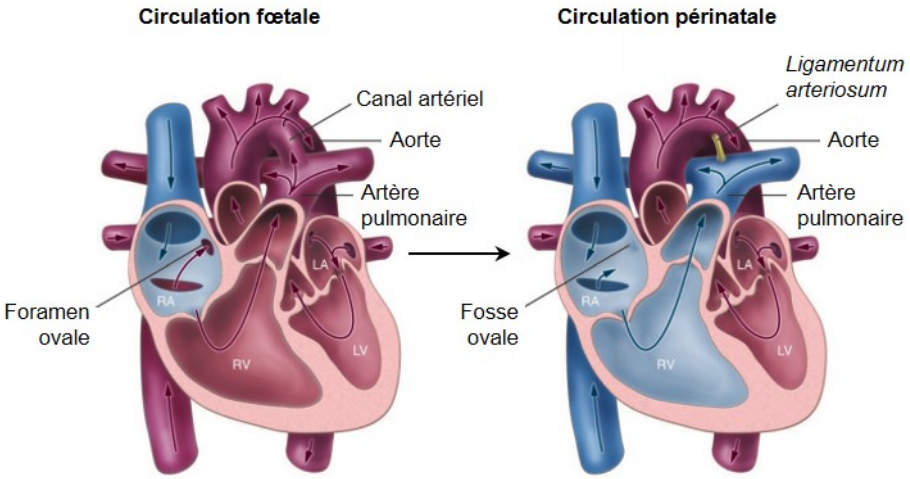


FIGURE 2.1 – Canal artériel et *ligamentum arteriosum*.
RA : oreillette droite. LA : oreillette gauche. RV : ventricule droit. LV : ventricule gauche. Bleu : sang pauvre en oxygène. Rouge : sang riche en oxygène. D'après [Ivey and Srivastava, 2006].

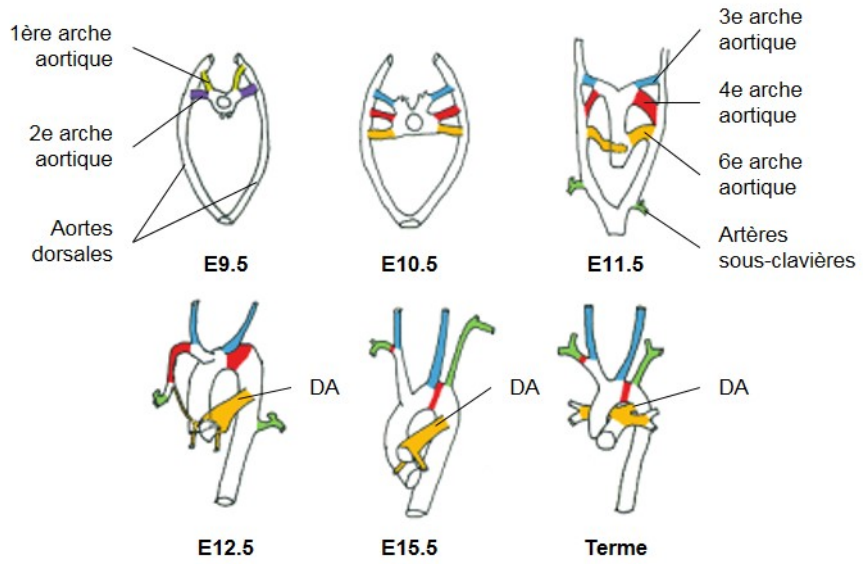


FIGURE 2.2 – Remodelage asymétrique des arches pharyngées.
Jours embryonnaires indiqués chez la souris. Remodelage valable chez les autres mammifères. Adapté de [Iida et al., 1997].

2.1 Le développement du canal artériel

Lors de l'embryogenèse, le cœur est relié aux deux aortes dorsales par les artères des arches pharyngées. Il s'agit de six paires d'artères formées de façon symétrique par vasculogenèse (cf. partie 1.2 p.23) à partir de promoteurs endothéliaux issus du mésoderme entre E8.5 et E9.5 chez la souris. Leur stabilité et leur quiescence sont assurées par leur couverture par des VSMCs dérivées de la crête neurale. Les arches pharyngées subissent un remodelage asymétrique après leur formation afin de former plusieurs vaisseaux du futur système circulatoire adulte. Le canal artériel est issu du remodelage de la sixième paire d'arches pharyngées, et plus précisément de la sixième artère gauche, la droite formant la future artère pulmonaire (figure 2.2) [Frisdal and Trainor, 2014][Plein et al., 2015].

Le canal artériel ainsi formé est capable d'accomplir rapidement sa fonction de dérivation fœtale : il est fonctionnel à partir de E12.5 chez la souris et de 8 semaines chez l'Homme [Schneider, 2012]. A ce stade, il permet à 90% du sang circulant *via* l'artère pulmonaire (2/3 du volume total) de passer directement dans la circulation systémique. Le tiers restant passe dans la circulation sytémique grâce au foramen ovale (figure 2.1), une déviation cardiaque située entre les deux oreillettes destinée à se fermer à la naissance [Gournay, 2011].

2.2 Maintien de l'ouverture chez le fœtus

Le canal artériel est maintenu ouvert *in utero* de manière active. En effet, le DA possède un tonus intrinsèque ce qui le rend prompt à se contracter. Afin d'éviter ce comportement pro-contractile et maintenir une circulation fœtale normale, le DA est soumis à des vasodilatateurs tout au long de la vie utérine [Smith, 1998].

2.2.1 Les prostaglandines

Prostaglandines de la série E

La prostaglandine E2 (PGE2) est le principal acteur de la vasodilatation du canal artériel. Elle agit *via* des récepteurs à sept domaines transmembranaires et couplés à la protéine G. Au niveau des VSMCs du DA, le récepteur EP4 est le plus abondant et est reconnu comme étant responsable de la vasodilatation du canal artériel. Une concentration de l'ordre du picomolaire de PGE2 est suffisante pour médier cet effet. La liaison entre PGE2 et EP4 entraîne l'activation de l'adenylyl cyclase qui induit une augmentation de la concentration d'AMPc (Adénosine Mono-Phosphatase cyclique) intracellulaire. En inhibant l'activité kinase des chaînes légères de la myosine, l'AMPc induit donc une relaxation du canal artériel [Smith, 1998][Yokoyama, 2015].

Le canal artériel est exposé à deux sources de PGE2 : celle qu'il produit lui-même (cellules endothéliales et VSMCs) et la PGE2 circulante. Cependant, la production locale de PGE2 est très faible, laissant supposer que la PEG2 circulante est le principal acteur de la vasodilatation du DA. Produite principalement par le placenta, la concentration circulante de PGE2 augmente graduellement au cours de la gestation (il en est de même pour l'expression d'EP4 dans le DA) jusqu'à atteindre 1 à 2nM chez l'agneau juste avant le terme. Elle n'est que peu dégradée car l'enzyme responsable de sa dégradation, la prostaglandine déshydrogénase (PGDH), est produite principalement dans les poumons où ne circulent que 10% du volume sanguin total [Smith, 1998][Yokoyama, 2015].

Prostacycline

Le canal artériel produit de façon locale une quantité importante (production dix fois plus importante que celle de PGE2) d'une autre prostaglandine : la prostacycline PGI2. L'effet de PGI2 sur la vasodilatation est toutefois 1000 fois moins efficace que celui de PGE2. Cependant la présence de récepteurs de ce lipide (récepteurs IP) à la surface du DA et le fait qu'elle représente à elle seule 90% de la production de prostaglandines par le DA suggère un rôle de PGI2 sur la physiologie du canal artériel [Smith, 1998].

2.2.2 Le monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote (NO) est utile à la vasodilatation du DA *in utero* mais est insuffisant. En effet, en présence d'inhibiteurs des prostaglandines, il ne peut à lui seul empêcher la contraction du DA et l'inhibition de sa synthèse n'entraîne qu'une contraction minime du canal artériel. De plus, l'efficacité de son action diminue avec l'avancée de la gestation. Cependant, sa présence semble potentialiser l'effet vasodilatateur de PGE2 [Momma and Toyono, 1999] [Reese et al., 2009]. Le traitement de DA isolés par des donneurs de NO augmente notamment la concentration intracellulaire d'AMPc et de GMPc (Guanosine Mono-Phosphatase cyclique) qui inhibent la capacité contractile de la myosine [Smith, 1998]. La production de NO se fait de façon locale par les cellules endothéliales du DA et est notamment induite par la signalisation PGE2/EP4 [Reese et al., 2009] [Bökenkamp et al., 2010] et la bradykinine [Bateson et al., 1999].

2.2.3 Le monoxyde de carbone

Le monoxyde de carbone (CO) pourrait jouer un rôle dans la vasodilatation du DA *in utero*. En effet, les VSMCs recouvrant le DA contiennent de l'heme oxydase, une enzyme capable de synthétiser du CO à partir de hème. De plus, l'inhibition de cette enzyme *in vitro* entraîne une contraction du DA. L'effet du CO serait dû soit à sa capacité à augmenter la production de GMPc soit à son action sur les canaux potassiques. Il reste cependant à prouver que le CO agit bien comme vasodilatateur - mineur - du DA dans des conditions physiologiques [Smith, 1998].

2.3 Mécanismes de fermeture à la naissance

La fermeture du DA est un processus multi-étapes qui commence très tôt, avant même la naissance. Après la naissance, la fermeture fonctionnelle dure 18 à 24h chez l'Homme et permet la contraction du DA afin de diminuer le flux sanguin. La fermeture anatomique suit. Elle permet la transformation du DA en bande fibreuse, le *ligamentum arteriosum*, en quelques jours.

2.3.1 Fermeture fonctionnelle

A la naissance, la "perte" du placenta, l'expansion des poumons et donc l'oxygénation pulmonaire du sang ont des conséquences importantes sur la physiologie du nouveau-né. La pO_2 (pression partielle en oxygène) artérielle augmente fortement et les taux de PGE2 circulants diminuent de façon abrupte entraînant la contraction du DA autrement appelée fermeture fonctionnelle [Anilkumar, 2013].

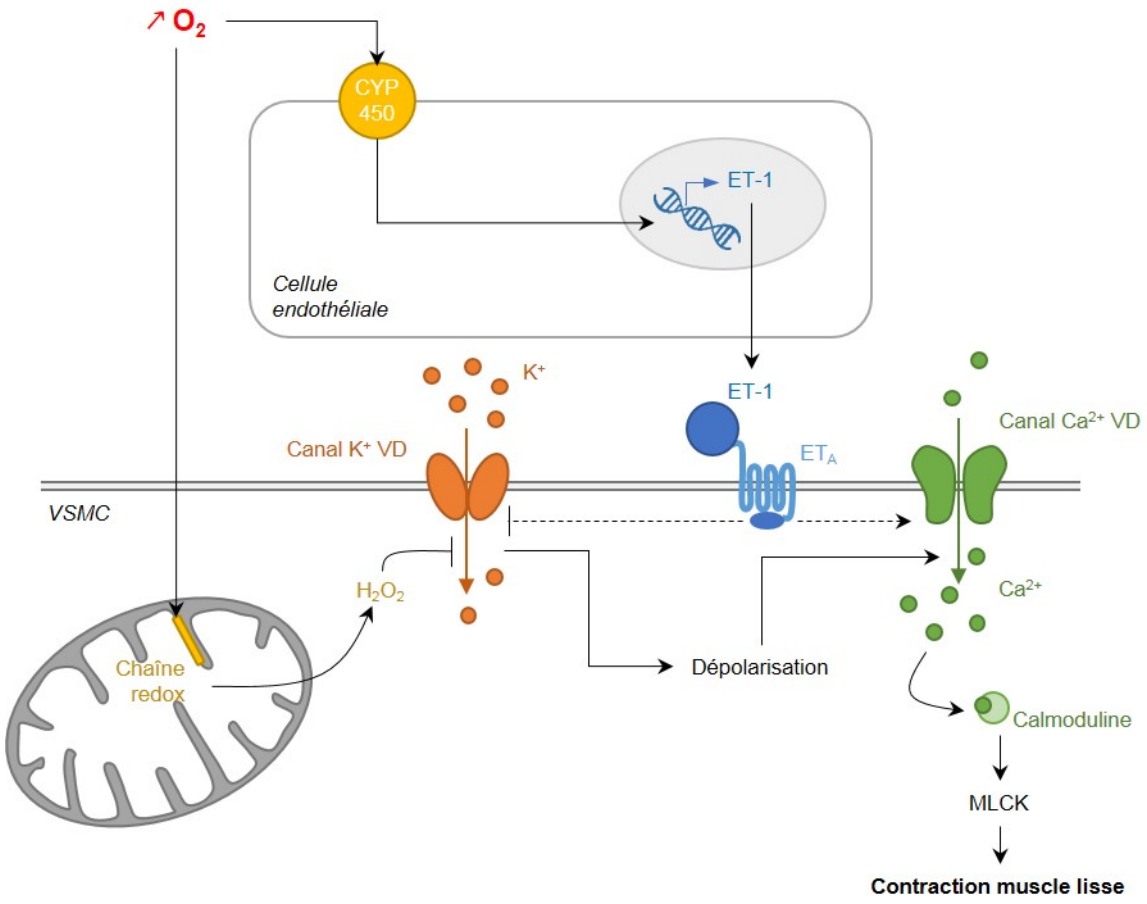


FIGURE 2.3 – Impact de l'oxygène sur la fermeture fonctionnelle du canal artériel.
Réalisé à partir de [Yokoyama et al., 2010] et [Coceani and Baragatti, 2012].

Augmentation de la pO_2

Les effets vasoconstricteurs de l'oxygène sur le DA sont connus depuis les années 1950 mais les mécanismes moléculaires impliqués sont encore mal connus. A ce jour, deux modèles se dégagent.

Les cellules endothéliales possèdent des senseurs d'oxygène à leur membrane : les cytochromes P450 (CYP450). Lorsque ces derniers détectent de l'oxygène, ils induisent la production d'un puissant vasoconstricteur : l'endothéline-1 (ET-1). Les mécanismes d'action de l'ET-1 ne sont pas encore complètement élucidés mais il apparaît qu'elle pourrait induire la vasoconstriction du DA *via* l'inhibition de l'activité de canaux voltage-dépendants (VD) K^+ induisant par-là même une dépolarisation des VSMCs, l'activation des canaux VD Ca^{2+} et donc la contraction du DA par l'activation des kinases des chaînes légères de myosine (MLCK) des VSMCs suite à l'association calcium/calmoduline (figure 2.3) [Yokoyama et al., 2010][Coceani and Baragatti, 2012].

L'augmentation de la pO_2 peut également être détectée grâce à un mécanisme redox mitochondrial présent dans les VSMCs du DA. Lors de la détection d'oxygène, ce système s'active et produit des dérivés oxygénés dont le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui inhibent l'activité des canaux VD K^+. La suite du processus est identique à celui décrit dans le cas du CYP450 (figure 2.3) [Yokoyama et al., 2010][Coceani and Baragatti, 2012].

Les deux modèles décrits reposent sur des mécanismes communs et sont tous les deux dépendants de l'activation de l'acide rétinoïque et des glucocorticoïdes. Ces derniers sont notamment essentiels pour la maturation des systèmes de détection de l'oxygène [Coceani and Baragatti, 2012].

Chute des taux de PGE2

A la naissance, le sang du nouveau-né n'est plus alimenté en PGE2 par le placenta. De plus, la mise en place de la circulation pulmonaire entraîne la dégradation du PGE2 par la PGDH au niveau des poumons. Ce processus est accentué par l'inversion du flux sanguin dans le DA à la naissance. Le taux de PGE2 circulant chute donc de façon dramatique. L'expression d'EP4 est également fortement diminuée à la naissance. L'ensemble de ces conditions entraîne la perte des effets vasodilatateurs du PGE2 [Yokoyama et al., 2010] [Gournay, 2011].

Autres mécanismes

La diminution progressive de la pression sanguine dans le DA - du fait de l'augmentation de la résistance vasculaire pulmonaire - facilite la contraction du DA, le flux sanguin opposant moins de résistance [Gournay, 2011].

L'angiotensine II (AngII) a été décrite comme pouvant impacter la fermeture fonctionnelle du DA. En effet, l'administration d'enalapril, un inhibiteur de synthèse de AngII, peut induire la réouverture du canal artériel après la naissance chez le rat [Takizawa et al., 1994]. Allant dans ce sens, il a été montré que le récepteur de l'AngII est sur-exprimé après la naissance dans le DA, de manière indépendante de la pO_2 [Coceani and Baragatti, 2012].

L'adrénaline, la noradrénaline et l'acétylcholine possèdent une activité vasoconstrictrice sur le DA démontrant l'importance de son innervation [Bergwerff et al., 1999].

Bien qu'induisant un effet vasodilatateur du DA chez le fœtus (cf. partie 2.2.2), la bradykinine possède également un effet vasoconstricteur sur le DA à forte concentration et

lorsque la pO_2 est suffisamment haute. Cette action est notamment permise par l'augmentation importante des taux de bradykinine sanguine à la naissance [Bateson et al., 1999].

2.3.2 Fermeture anatomique

La fermeture anatomique finalise la fermeture du DA en le transformant en bande fibreuse : le *ligamentum arteriosum*. Elle est permise par plusieurs mécanismes dont les principaux sont (a) l'épaississement de l'intima, (b) l'hypoxie intramurale et (c) les interactions entre les cellules endothéliales et les plaquettes.

Épaississement de l'intima

L'épaississement de l'intima est essentiel à la fermeture anatomique du DA. Il est cependant variable en fonction des espèces. Chez les grands mammifères tels que l'Homme ou le chien, il est important. Les petits mammifères comme la souris ne présentent que peu ou pas d'épaississement de l'intima. Ce mécanisme se met en place avant même la naissance, durant le dernier tiers de la gestation, avec le développement des coussins intimaux ("intimal cushions"). Ce phénomène est médié par la PGE2. En effet, en plus de son rôle vasodilatateur, la PGE2 induit la migration des VSMCs et le dépôt de matrice extra-cellulaire (acide hyaluronique HA) dans la zone sous-endothéliale grâce à l'activation respective des voies de signalisation de la PKA (Protein Kinase A) et de la protéine

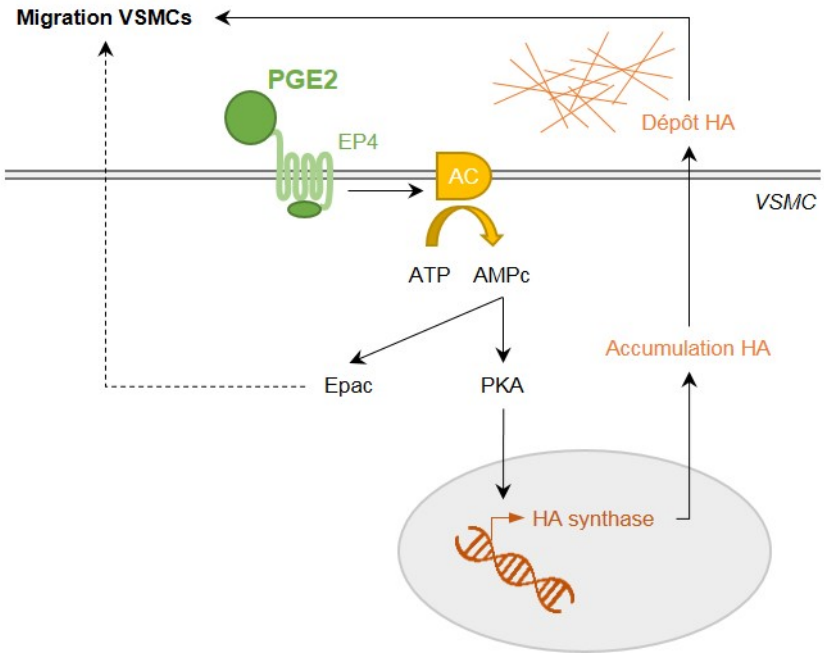


FIGURE 2.4 – Rôle du PGE2 dans l'épaississement de l'intima.
Réalisé à partir de [Yokoyama et al., 2010] et [Coceani and Baragatti, 2012].

Epac (figure 2.4). Ce phénomène est renforcé par l'action du NO (pré-natal) et du TGF-β (post-natal) qui induisent la production de fibronectine et de HA, promouvant ainsi la migration des VSMCs vers l'espace sous-endothélial. L'épaississement de l'intima continue après la naissance *via* l'action du PGE2 résiduel mais aussi grâce à l'activation des canaux Ca^{2+} VD par l'oxygène qui induit l'épaississement de l'intima en plus de la contraction du DA. De plus, lors de la fermeture physiologique, l'ensemble du DA s'invagine pour clore le lumen, élargissant ainsi l'intima [Yokoyama et al., 2010][Coceani and Baragatti, 2012].

La migration des VSMCs est notamment facilitée par la rupture de la lame élastique interne dans la période périnatale. Les fibres d'élastines s'associent en fuseaux et non pas en lame continue comme dans les artères [Smith, 1998].

Hypoxie intramurale

Après la fermeture fonctionnelle, la région sous-endothéliale gonfle avec l'épaississement de l'intima et les cellules endothéliales se détachent alors que les VSMCs continuent de migrer. L'ensemble de ces cellules souffre d'hypoxie du fait de la rupture de la diffusion de l'oxygène dans la paroi du canal artériel avec l'obstruction du lumen. En conséquence, l'ensemble de ces cellules sécrètent des facteurs de croissance pro-angiogéniques comme le VEGF-A et le TGF-β. Ces derniers participent à la fermeture du DA en induisant la migration des VSMCs vers le centre du DA et la prolifération des cellules endothéliales de manière à finaliser l'obstruction du lumen et permettre le processus de fibrose. L'hypoxie induit également un gradient de mort cellulaire dans la paroi permettant d'affiner la structure en place [Coceani and Baragatti, 2012][Anilkumar, 2013].

Interactions plaquettes - canal artériel

Au moment du gonflement de la région sous-endothéliale, le décollement des cellules endothéliales entraîne le recrutement des plaquettes. Ces plaquettes, une fois activées par contact avec la lame basale, participent à l'obstruction du lumen résiduel et facilitent le remodelage. Les cellules immunitaires circulantes participent également au colmatage. Le recrutement des plaquettes se fait dans les minutes suivant la naissance. Il est essentiel à la fermeture définitive du DA et à son remodelage en ligament chez la souris [Echtler et al., 2010]. L'importance des plaquettes dans la fermeture du DA chez l'Homme a cependant été remise en cause par plusieurs groupes montrant que le niveau de plaquettes dans le sang chez les nouveaux-nés n'était pas corrélé à un problème de fermeture [Fujioka et al., 2011][Shah et al., 2011][Sallmon et al., 2012].

Autres mécanismes

Les forces de cisaillement provoquées par les modifications de flux dans la lumière du DA sont également importantes pour le remodelage du canal artériel. Elles induisent notamment l'expression d'intégrines par les cellules endothéliales et les VSMCs ce qui facilite la migration de ces cellules au centre du DA pour colmater le lumen résiduel [Clyman et al., 1996]. Les forces de cisaillement pourraient également induire une action vasoconstrictrice de AngII puisque son récepteur possède des propriétés mécanosensibles [Coceani and Baragatti, 2012].

Le mécanisme de fibrose permettant la transformation du DA en ligament est peu décrit à ce jour. Les dépôts de matrice extra-cellulaire par les cellules les plus centrales du DA et la mort cellulaire des cellules les plus externes semblent être importants dans ce processus, permettant à la fois la solidification du DA et son affinement [Bökenkamp et al., 2010].

2.4 Canal artériel persistant

2.4.1 Épidémiologie

L'absence de fermeture spontanée du DA à la naissance est une pathologie appelée canal artériel persistant (PDA). Il s'agit d'une complication courante chez les prématurés, due principalement à un problème physiologique qu'est le temps de maturation du DA. Le risque de PDA est inversement proportionnel au temps de gestation et au poids à la naissance. A partir de la 23e semaine gestationnelle, le risque de PDA diminue de 9% pour chaque semaine supplémentaire passée *in utero* par le fœtus [Hajj and Dagle, 2012]. Chez les enfants nés à terme, c'est une pathologie plus rare. On dénombre 1 cas sur 2000 naissances ce qui représente 5 à 10% des maladies cardiaques congénitales. Cependant, il semblerait que l'incidence de la maladie soit plus importante, de l'ordre de 1 cas sur 500 naissances, si l'on estime les cas de PDA silencieux. Cette pathologie semble plus commune chez les individus de sexe féminin avec un ratio femelle/mâle d'environ 2/1 [Gournay, 2011][Anilkumar, 2013]. Contrairement aux enfants prématurés, le PDA chez les enfants nés à terme est majoritairement dû à des anomalies génétiques isolées ou associées à des syndromes plus complexes [Hajj and Dagle, 2012].

Au delà de la prématurité et des anomalies génétiques, il existe plusieurs facteurs de risque dans la survenue d'un PDA. L'hypertension artérielle maternelle, une croissance restreinte intra-utérine, l'asphyxie pendant l'accouchement ou encore une naissance à haute altitude augmentent les risques de PDA. Les infections bactériennes pendant la

grossesse peuvent induire un PDA. Par exemple, la contraction de la rubéole pendant le premier trimestre peut mener à un arrêt du développement du DA à un stade très immature, diminuant fortement les chances de fermeture spontanée [Hajj and Dagle, 2012] [Anilkumar, 2013].

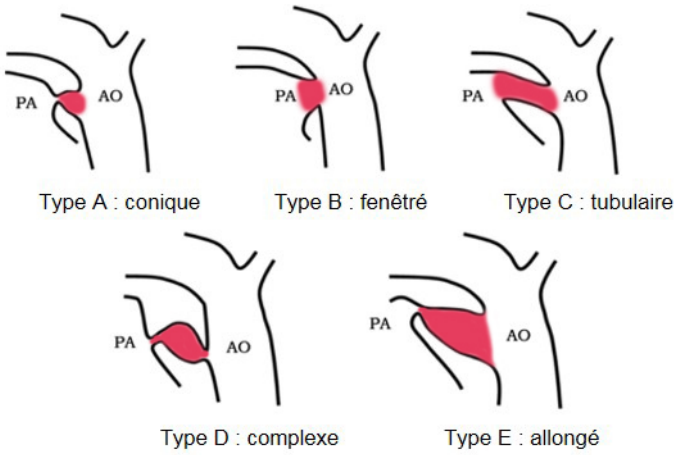


FIGURE 2.5 – Classification de Krichenko des PDA.
PDA représenté en rouge. PA : artère pulmonaire. AO : aorte. D'après [Schneider, 2012].

Un PDA est caractérisé histologiquement par une quantité d'élastine très supérieure à la normale et la présence d'une lame élastique interne non fragmentée. Anatomiquement, il existe plusieurs formes de PDA en fonction de la forme et de la taille du canal persistant qui auront des conséquences différentes sur les symptômes que peuvent présenter les patients touchés (figure 2.5) [Bökenkamp et al., 2010][Schneider, 2012].

2.4.2 Conséquences de la présence d'un PDA

In utero, le DA forme une déviation droite-gauche (artère pulmonaire vers aorte). A la naissance, la pression dans la circulation systémique augmente, devenant supérieure à la pression de la circulation pulmonaire. Le DA devient donc une déviation gauche-droite et une partie du sang oxygéné circulant dans l'aorte repasse dans la circulation pulmonaire. La surcharge de volume induite entraîne un travail accru du ventricule gauche et une augmentation du travail respiratoire et donc une diminution de la compliance pulmonaire. L'ensemble de ces facteurs va induire une hypertrophie du ventricule gauche et une hypertension pulmonaire due à une augmentation de la résistance vasculaire pulmonaire (hypertrophie des artérioles, prolifération de l'intima, oblitération des artérioles, etc.) [Gournay, 2011]. L'impact du PDA dépend de l'efficacité de la déviation, c'est-à-dire du flux circulant dans le DA. Ce flux est lui-même fonction de la résistance du DA - qui

dépend du diamètre, de la longueur et de la configuration du DA - et de la différence de pression entre l'aorte et l'artère pulmonaire - qui est fonction de la résistance vasculaire pulmonaire. Dans l'ensemble, plus le PDA est large, plus le flux est important et plus les conséquences se développent rapidement [Schneider, 2012][Anilkumar, 2013].

Les enfants possédant un large PDA développent une insuffisance cardiaque dans les 8 à 10 semaines suivant la naissance. Si le PDA est petit voire modéré, les conséquences sont généralement bien compensées pendant l'enfance et l'adolescence. Les patients ne développent une insuffisance cardiaque qu'autour de leurs 30 ans [Gournay, 2011].

D'autres conséquences sont associées au PDA. Les patients peuvent développer des œdèmes ou des hémorragies pulmonaires ainsi que des entéroclites nécrosantes. Ils présentent des risques accrus d'asthme et d'intolérance à l'effort. Chez les prématurés, le PDA induit une détresse respiratoire qui s'améliore au bout de deux à trois jours si le DA se ferme spontanément [Gournay, 2011][Schneider, 2012]. Certains patients développent une résistance vasculaire pulmonaire si importante que le sens de circulation du sang dans le DA peut s'inverser : il s'agit du syndrome d'Eisenmenger [Anilkumar, 2013].

2.4.3 Diagnostic d'un PDA

Le diagnostic d'un PDA se fait le plus souvent suite aux observations de symptômes associés à l'insuffisance cardiaque : un retard de croissance lié à des difficultés à se nourrir, de la tachypnée (augmentation de la fréquence respiratoire) ou de la diaphorèse (hypersudation). Le PDA peut également être diagnostiqué suite à l'évaluation d'un murmure cardiaque asymptomatique. Dans ce cas, le diagnostic est confirmé par échocardiogramme, ce qui permet d'évaluer l'impact du PDA et les lésions possibles *via* la mesure de la taille de l'oreillette et du ventricule gauches. La réalisation d'un Doppler permet de détecter des PDA très restreints qui sont souvent silencieux (pas de murmure cardiaque) [Gournay, 2011][Anilkumar, 2013].

2.4.4 Traitement du PDA

Le traitement du PDA se fait prioritairement de manière médicamenteuse. Depuis les années 1970, il repose sur l'utilisation d'inhibiteurs de la synthèse des prostaglandines qui permettent la fermeture du DA dans 80% des cas. L'objectif est de diminuer la concentration de PGE2 circulant et donc son activité vasodilatatrice. Le premier inhibiteur utilisé a été l'indométhacine. Présentant des effets secondaires importants (défaillances rénales, saignements et perforations gastro-intestinales), il est aujourd'hui remplacé par l'ibupro-

fène qui présente bien moins d'effets secondaires pour des taux de succès équivalents. Malgré les taux élevés de fermeture, ce traitement reste imparfait et discuté, notamment sur le moment d'administration chez les prématurés [Gournay, 2011].

En absence de réponse aux traitements médicamenteux ou dans des cas de contre-indication, deux types d'interventions chirurgicales sont proposés : la ligature chirurgicale ou la pose de système d'occlusion par cathétérisme. La première méthode est efficace et présente peu de complications mais nécessite une thoracotomie. La deuxième méthode, développée par la suite, présente également peu de complications mais est impossible dans le cas de petits PDA et chez les enfants de moins de 5 kg. La ligation est également recommandée dans des cas de PDA très élargis [Gournay, 2011][Schneider, 2012]. Dans le cas de PDA silencieux, ni suivi ni traitement ne sont préconisés [Anilkumar, 2013].

2.5 Pathologies humaines associées au PDA

De nombreuses pathologies sont associées à un PDA. La base de données *Online Mendelian Inheritance in Man* en recense plus d'une centaine. Ce nombre important suggère que de nombreux facteurs génétiques isolés peuvent contribuer à l'absence de fermeture du DA après la naissance. En excluant les enfants prématurés et les PDAs associés à des malformations cardiaques congénitales majeures, plusieurs facteurs associés à des syndromes ont été identifiés [Hajj and Dagle, 2012].

2.5.1 Mutations de *MYH11* et de *ACTA2*

Les interactions entre la chaîne lourde de la myosine-β (codée par *MYH11*) et l'actine-α de muscle lisse (codée par*ACTA2*) sont essentielles à la contraction de VSMCs. Il n'est donc pas surprenant que des mutations altérant les deux gènes codant pour ces protéines soient associées à des PDAs [Hajj and Dagle, 2012]. En 2006, des mutations de *MYH11* ont été identifiées comme responsables d'un syndrome associant PDA et anévrismes thoraciques de l'aorte [Zhu et al., 2006]. De façon cohérente, un retard de fermeture du DA a été identifié chez des souris invalidées pour la chaîne lourde de la myosine [Bökenkamp et al., 2010]. En 2007, des mutations de *ACTA2* ont été identifiées dans un syndrome provoquant également des anévrismes thoraciques aortiques ainsi que des dissections aortiques. Parmi elles, des mutations non sens sont associées à des PDAs [Guo et al., 2007].

2.5.2 Syndrome de Char

Le syndrome de Char résulte de mutations du gène *TFAP2B* [Satoda et al., 2000]. Il s'agit d'une maladie familiale rare caractérisée par des dysmorphismes faciaux, des anomalies du squelette au niveau des mains, ainsi que des PDAs. *TFAP2B* est un gène qui code pour un facteur de transcription des cellules dérivées de la crête neurale (AP-2β), comme les VSMCs recouvrant le DA [Hajj and Dagle, 2012]. Les mutations peuvent d'ailleurs interférer avec le remodelage des VSMCs [Anilkumar, 2013]. De façon intéressante, l'invalidation de *TFAP2B* dans des souris affecte la maturation du DA, retardant sa fermeture [Bökenkamp et al., 2010]. De plus, AP-2β régule l'expression de ET-1, vasoconstricteur essentiel à la fermeture du DA (cf. partie 2.3.1 p.41) [Hajj and Dagle, 2012].

2.5.3 Syndrome de Loeys-Dietz

Le syndrome de Loeys-Dietz est caractérisé par une combinaison de symptômes. Les patients présentent à la fois des anomalies cardiovasculaires (anévrisme aortique et tortuosité artérielle), craniofaciales, neurocognitives et de développement du squelette. Ce syndrome est causé par des mutations hétérozygotes des gènes *TGFBR1* et *TGFBR2*, des récepteurs de la famille du TGF-β. Des PDAs ou des anévrismes du DA ont été rapportés chez 54% des patients souffrant du syndrome de Loeys-Dietz [Loeys et al., 2005].

Les mécanismes par lesquels les mutations induisent les symptômes multiples de ce syndrome sont encore mal compris. En effet, les mutations peuvent soit inhiber la signalisation induite par ces récepteurs soit l'augmenter [Loeys et al., 2006]. Le TGF-β joue un rôle important dans la fermeture anatomique du DA (cf. partie 2.3.2 p.44). Il est donc compréhensible qu'une dérégulation de sa signalisation soit à l'origine de PDAs ou d'anévrismes du DA [Bökenkamp et al., 2010].

Partie 3

Cancers et vascularisation tumorale

Ce chapitre a pour objectif de développer les différents aspects communs à l'ensemble des cancers, et plus particulièrement des carcinomes (cancers épithéliaux). Cependant, des notions spécifiques au cancer du sein sont détaillées puisque mon travail a porté sur ce type de cancer.

3.1 Épidémiologie

Les cancers représentent la source majeure de morbidité et de mortalité dans le monde. En 2012, 14,1 millions de nouveaux cas et 8,2 millions de morts liées à des pathologies tumorales ont été recensés dans le monde d'après le GLOBOCAN [Ferlay et al., 2012]. Les pays développés (Amérique du nord, Europe occidentale, Japon, Corée du sud, Australie, Nouvelle Zélande) présentent les taux d'incidence de cancers les plus élevés dans le monde. Les taux les plus bas sont retrouvés en Afrique et en Asie du sud et de l'ouest. Les

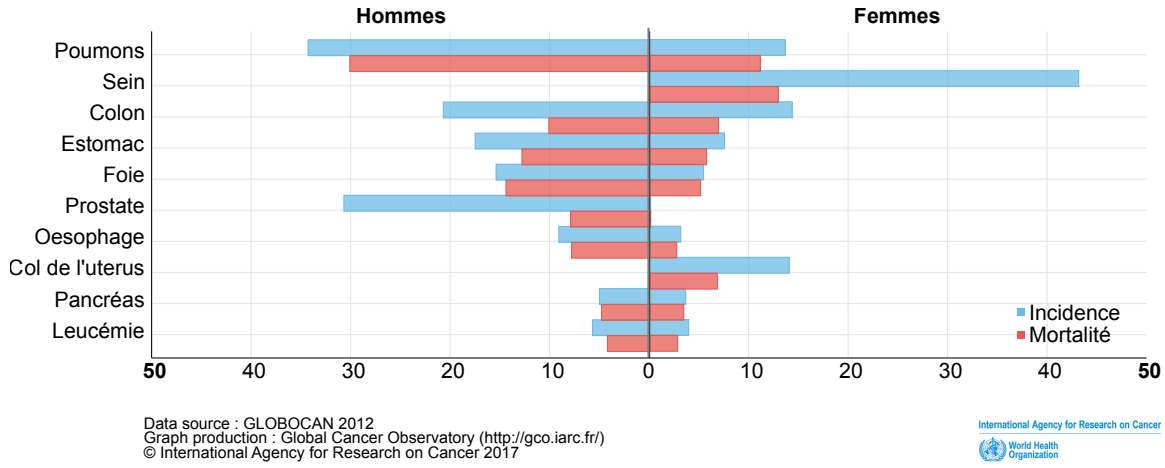


FIGURE 3.1 – Incidence et mortalité des principaux cancers en fonction du sexe.
Résultats en pourcentages de cancers totaux. D'après [Ferlay et al., 2012].

taux de mortalité présentent des différences moins importantes entre les différentes zones géographiques, ce qui s'explique par le fait que les cancers sont pris en charge et traités de façon plus importante dans les pays développés. L'incidence des types de cancer varie en fonction du sexe. Ainsi, les hommes sont plus susceptibles de développer un cancer des poumons que les femmes (figure 3.1) [Ferlay et al., 2012][Steward and Wild, 2014].

Cancer du sein

Le cancer du sein est le plus courant chez la femme avec 1,7 million de nouveaux cas dans le monde en 2012. Il représente la seconde cause de décès liés à une pathologie tumorale chez la femme (522 000 décès en 2012) d'après l'Organisation Mondiale de la Santé [Ferlay et al., 2012][Lauby-Secretan et al., 2015].

Il existe plusieurs classifications du cancer du sein. La classification histopathologique définit plusieurs formes en fonction de la localisation de la tumeur : carcinome non invasif (25% des cas) ou carcinome infiltrant (75% des cas dont 75% canalaires, 15% lobulaires et 10% de formes rares comme le médullaire) [https ://www.ligue-cancer.net, 2017]. La classification moléculaire définit cinq sous-types en fonction des récepteurs exprimés à la surface des cellules cancéreuses (récepteurs hormonaux (oestrogène et/ou progetérone), HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor-2)) :

- Luminal A : les cellules présentent seulement des récepteurs aux hormones ;
- Luminal B : les cellules expriment des récepteurs aux hormones et HER2 ;
- Triple négatif : les cellules ne possèdent aucun de ces récepteurs ;
- HER2 positif : les cellules expriment seulement HER2 ;
- "Claudin-low" : les cellules sont triple négatives et possèdent un faible taux d'expression de molécules jonctionnelles.

Les taux de survie varient en fonction du sous-type moléculaire (figure 3.2).

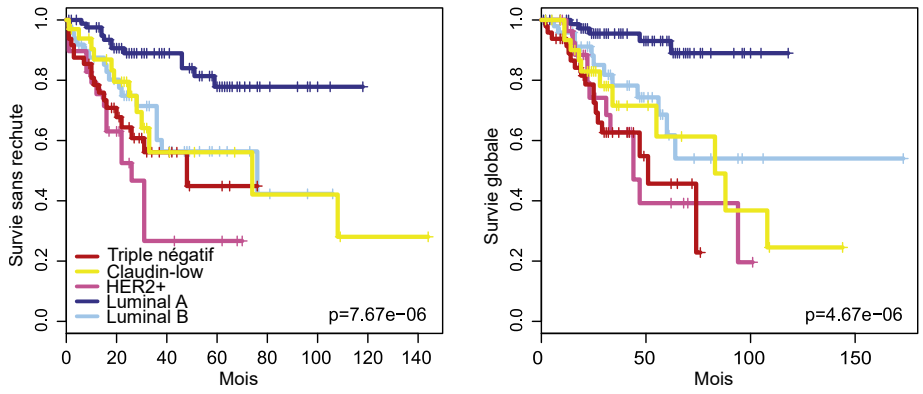


FIGURE 3.2 – Survie associée aux sous-types moléculaires de cancer du sein. D'après [Prat and Perou, 2011].

3.2 Origines et facteurs de risque

Les cancers touchent de nombreux tissus différents et se comportent de façon très variable. Il est donc admis qu'il existe une infinité de combinaisons de modifications génétiques et épigénétiques à leur origine. Ces mutations peuvent être induites par de nombreux facteurs de risque. Il en existe trois classes principales, les facteurs environnementaux, comportementaux et génétiques [Evan and Vousden, 2001].

Parmi les facteurs environnementaux, la pollution de l'air, de l'eau et du sol prend une place importante, exposant la population à de nombreux composés carcinogènes pouvant se lier à l'ADN, le modifier, induire de l'inflammation ou du stress oxydatif et ainsi provoquer des mutations pouvant mener à long terme à un cancer. Les infections bactériennes, virales ou parasitaires représentent également un facteur de risque environnemental important. En effet, en 2008, 16% des nouveaux cas de cancers détectés dans le monde ont pu être reliés à des infections. Certaines souches d'*Helicobacter pylori* sont reconnues pour être impliquées dans des cancers de l'estomac par exemple [Steward and Wild, 2014].

Les facteurs comportementaux sont également étudiés. Il est maintenant mondialement reconnu que la consommation de tabac et d'alcool sont des facteurs de risque importants au même titre que l'exposition au soleil. Le régime alimentaire et l'activité physique sont également des facteurs importants. En effet, l'obésité est reconnue comme un facteur aggravant dans de nombreux cancers. La consommation de certains médicaments et l'exposition prolongée à des ondes électromagnétiques sont aussi des facteurs de risque [Steward and Wild, 2014].

Les prédispositions génétiques comme certaines mutations héréditaires sont des facteurs de risque importants. Elles représentent des susceptibilités qui peuvent être aggravées par les autres facteurs décrits précédemment [Steward and Wild, 2014].

Cancer du sein

Le cancer du sein présente des facteurs de risque spécifiques du fait notamment de sa capacité à répondre aux stimuli hormonaux. L'absence de grossesse et les premières grossesses tardives augmentent les chances de développer un cancer du sein. De même, si les premières menstruations apparaissent tôt ou si la ménopause est tardive, les risques sont plus importants. La consommation de contraceptifs alliant progestérones et œstrogènes est également un facteur de risque.

Il existe d'autres facteurs spécifiques au cancer du sein mais qui ne sont pas liés à son statut hormonal. Dans les pays développés, il a été démontré que 30 à 40% des cancers du sein contiennent des séquences du HMTV (Human Mammary Tumor Virus). Ce virus est un facteur de risque important : un promoteur de son analogue murin MMTV (Murine Mammary Tumor Virus) est d'ailleurs utilisé couplé à des mutations d'HER2 pour générer des modèles de souris présentant des tumeurs mammaires spontanées. Ce virus est connu pour se transmettre de la mère à l'enfant *via* le lait maternel. Il a été retrouvé dans le lait de 8% de femmes américaines en bonne santé [Steward and Wild, 2014].

Certaines mutations héréditaires présentent une forte pénétrance et des risques élevés de cancer du sein. Elles font d'ailleurs l'objet d'un suivi particulier chez les populations les présentant. Il s'agit des mutations de *BRCA1* et *BRCA2*, des gènes dits suppresseurs de tumeur car codant pour des protéines impliquées dans des mécanismes de réparation de l'ADN. Il existe également plusieurs autres gènes touchés par des mutations augmentant le risque de cancer du sein, mais leur pénétrance est faible [Steward and Wild, 2014].

3.3 La carcinogenèse

Chaque cancer est différent, de par les mutations à son origine ou son comportement. Il existe toutefois des mécanismes et caractéristiques essentiels à leur développement qui semblent universels [Weinberg, 1996]. Cette partie développera ceux relatifs aux carcinomes qui sont les plus fréquents.

3.3.1 Un développement multi-étapes

L'ADN de l'Homme compte environ 23 000 gènes dont 3 000 à 5 000 sont impliqués dans des programmes génétiques dérégulés par le cancer, qu'ils soient oncogènes - leur activation promeut la carcinogenèse - ou suppresseurs de tumeur - leur activation ralentit ou supprime la carcinogenèse. Lors du développement d'une tumeur, tous ces gènes ne sont pas touchés dans toutes les cellules tumorales [Boyle and Levin, 2008]. La carcinogenèse est un processus à plusieurs étapes (figure 3.3) qui débute avec une mutation dans une cellule [Weinberg, 1996].

L'étape d'initiation débute suite à l'exposition d'un tissu à un stress. Une des cellules épithéliales subit alors une modification de son ADN qui n'est pas réparé. Sa ca-

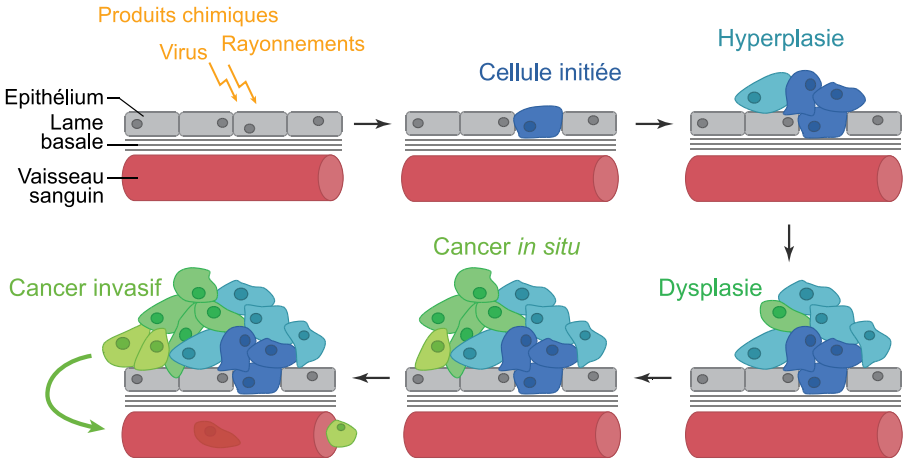


FIGURE 3.3 – Différentes étapes de la carcinogenèse.
Les changements de couleur des cellules représentent l'apparition d'une nouvelle mutation. Réalisé à partir de [Weinberg, 1996][Evan and Vousden, 2001][Steward and Kleihues, 2003][Boyle and Levin, 2008].

pacité à proliférer - comparée aux cellules voisines - est alors augmentée. Elle rentre dans une phase d'expansion clonale sélective grâce à des facteurs de survie locaux et malgré des apports limités en facteurs trophiques, leur restriction spatiale et les risques d'apoptose : c'est le début de l'étape de division. Lors de cette étape, certaines cellules subissent de nouvelles mutations qui créent une hétérogénéité cellulaire de la lésion. La lésion, à l'origine hyperplasique - cellules d'apparence normale mais se reproduisant de manière trop importante - devient dysplasique - perte de contrôle de la reproduction cellulaire et modifications du comportement cellulaire. A partir de là, l'apparition de nouvelles mutations et de modifications épigénétiques entraîne une augmentation de l'agressivité de la lésion qui devient un cancer *in situ*. C'est la phase de progression pendant laquelle la tumeur constitue un bloc non invasif. A la suite de nouvelles mutations, la dernière étape appelée l'invasion se met en place avec l'infiltration des tissus voisins et l'évasion de cellules tumorales de la tumeur par les réseaux sanguins et lymphatiques vers des organes plus distants [Weinberg, 1996][Evan and Vousden, 2001] [Steward and Kleihues, 2003][Boyle and Levin, 2008].

3.3.2 Caractéristiques principales des cellules tumorales

Lors de son développement, un carcinome subit de multiples mutations (figure 3.3) qui lui permettent d'acquérir de nombreuses caractéristiques essentielles (figure 3.4). Celles-ci peuvent être acquises dans n'importe quel ordre sur un principe évolutif. Une cellule possédant une mutation lui conférant un avantage prend le dessus sur les autres cellules tumorales en terme de prolifération et de survie et permet à la tumeur d'évoluer et de s'adapter à son environnement [Hanahan and Weinberg, 2000].

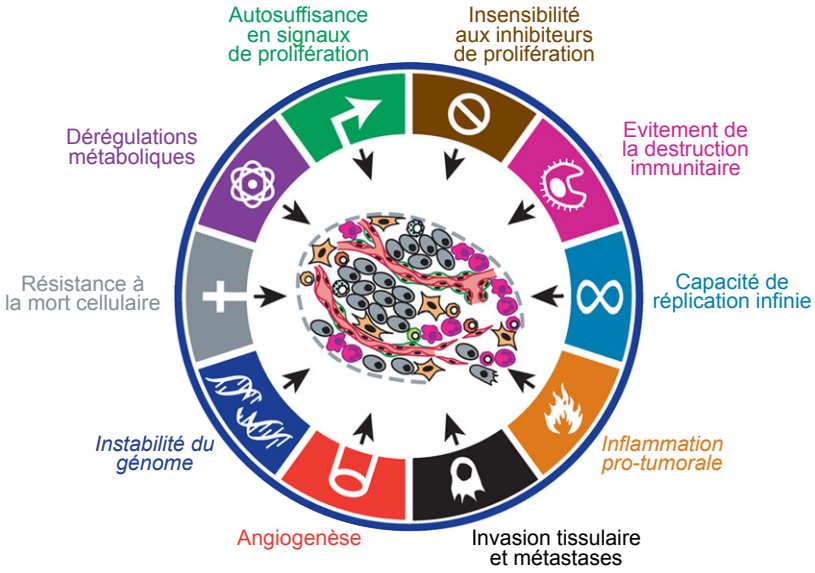


FIGURE 3.4 – Caractéristiques principales des cancers selon Hanahan et Weinberg. Caractéristiques essentielles et *facilitantes*. D'après [Hanahan and Weinberg, 2011].

Avantage prolifératif

Les cellules tumorales possèdent un avantage prolifératif indéniable. Pour l'obtenir, elles doivent acquérir des mutations leur permettant d'échapper à la quiescence. Elles développent plusieurs caractéristiques essentielles pour cela : une autosuffisance en signaux de prolifération, une insensibilité aux inhibiteurs de prolifération et une capacité de réplication infinie.

L'autosuffisance en signaux de prolifération peut être due à différents mécanismes. La cellule tumorale peut devenir sa propre source de facteurs de croissance ou faire sécréter ces facteurs par les cellules du micro-environnement tumoral. Elle peut également agir sur les récepteurs de ces facteurs de croissance en les sur-exprimant à la surface membranaire. Certaines mutations somatiques permettent également une activation constitutive du récepteur qui s'affranchit ainsi de la nécessaire présence de son ligand pour induire la prolifération. Le recyclage et la dégradation des récepteurs peuvent aussi être affectés. Les mutations les plus fréquentes touchent les voies de signalisation en aval des récepteurs de manière à émettre constitutivement des signaux mitogéniques sans stimulation particulière [Hanahan and Weinberg, 2011][Fouad and Aanei, 2017].

Les cellules tumorales deviennent insensibles aux inhibiteurs de prolifération comme les inhibitions de contact (mutations de *NF2* ou de *LKB1*) ou les voies de signalisations induisant la quiescence (surexpression de Myc notamment) [Hanahan and Weinberg, 2011].

Contrairement aux cellules normales, les cellules cancéreuses possèdent une capacité de réplication infinie qui limite leur entrée en sénescence et donc leur mort. Au delà de cet intérêt pour la survie de la cellule, cela permet à la tumeur de se développer plus rapidement. Ce potentiel est notamment acquis grâce à la surexpression de la télomérase (90% des tumeurs). Cette enzyme limite l'érosion progressive des télomères qui est un déclencheur de la sénescence [Hanahan and Weinberg, 2000].

Résistance au stress favorisant la survie

Les cellules normales sont constamment soumises à différents stress (signalisation excessive, lésions de l'ADN, hypoxie, manque de nutriments, etc.) auxquels elles réagissent en s'adaptant ou en déclenchant leur mort. Les tumeurs sont très résistantes au stress comparées aux tissus normaux. Les signaux de stress sont dépendants à la fois des senseurs (récepteurs extra et intra-cellulaires du stress) et des effecteurs (voies de signalisation transduisant le message et déclenchant la mort). Les cellules tumorales possèdent des mutations touchant les deux groupes ce qui les rend insensibles à la mort cellulaire programmée [Hanahan and Weinberg, 2000][Fouad and Aanei, 2017].

Dérégulation du métabolisme cellulaire

Les cellules tumorales "reprogramment" leur métabolisme énergétique. Cela leur permet de survivre dans des conditions moins favorables telles que l'hypoxie ou la baisse de la quantité des nutriments disponibles. Ainsi, même en présence d'oxygène, leur métabolisme est largement limité à la consommation de glucose *via* la glycolyse. L'effet de Warburg définit deux sous-populations tumorales : la première consomme le glucose et sécrète du lactate tandis que la seconde utilise le lactate pour produire à son tour l'énergie nécessaire à sa survie [Hanahan and Weinberg, 2011][Fouad and Aanei, 2017].

Modulations immunitaires

La survie des cellules tumorales est dépendante de leur capacité à échapper au système immunitaire. Il existe plusieurs mécanismes d'échappement. Les cellules tumorales peuvent limiter l'exposition d'antigènes à leur surface afin de limiter leur identification par les lymphocytes. Leur capacité à résister à la mort cellulaire est également un atout puisqu'elle leur permet d'éviter celle induite par les cellules du système immunitaire. Enfin, elles peuvent induire une tolérance voire une ignorance de la part du système immunitaire en sécrétant des facteurs immunosuppresseurs comme le TGF-β (qui promeut en plus leur prolifération) ou recruter des cellules du système immunitaire comme les cellules T régulatrices qui possèdent une activité immunosuppressive limitant l'activité des lymphocytes

cytotoxiques [Hanahan and Weinberg, 2011][Fouad and Aanei, 2017].

Les tumeurs utilisent également les cellules du système immunitaire pour promouvoir leur progression *via* l'inflammation. Par exemple, la nécrose de certaines zones tumorales peut favoriser la progression du cancer. En effet, le processus de nécrose induit une libération de signaux pro-inflammatoires (majoritairement IL-1α) dans le micro-environnement tumoral. Ces signaux induisent directement la prolifération des cellules tumorales et le recrutement des cellules immunitaires pour nettoyer les débris cellulaires restants. Or, ces dernières libèrent des facteurs de croissance qui vont également faciliter le développement de la tumeur [Vakkila and Lotze, 2004][Proskuryakov and Gabai, 2010].

Vascularisation

La vascularisation de la tumeur est une étape essentielle à son développement. Elle sera détaillée dans une section spécifique (partie 3.4 p.62).

Invasion tissulaire et métastases

La capacité d'une tumeur à métastaser est la principale cause des décès dus aux cancers (environ 90%) [Lambert et al., 2017]. L'invasion métastatique des cellules tumorales dans des organes distants est - à l'instar de la carcinogenèse dont elle fait partie - un procédé multi-étapes connu comme la cascade métastatique. Elle débute par l'invasion des tissus environnants (étape de dissémination). Les cellules tumorales pénètrent dans le système vasculaire (phénomène d'intravasation) et y circulent avant de s'arrêter et d'en sortir (phénomène d'extravasation) pour s'implanter dans le parenchyme du tissu atteint. Pour finir, elles prolifèrent jusqu'à former les lésions métastatiques (procédé de colonisation) [Lambert et al., 2017]. De nombreuses caractéristiques doivent être acquises par les cellules tumorales pour réussir cette étape difficile de la carcinogenèse (moins de 0,01% de succès) [Steeg, 2016].

Etape de dissémination Lors de cette phase, certaines cellules tumorales adoptent des traits qui leur donnent la capacité de quitter la tumeur primaire et de voyager vers des organes distants. Pour cela, elles subissent notamment un programme de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) ce qui augmente leur motilité, leur capacité d'invasion et de dégradation de la matrice extra-cellulaire. Ce processus, dans le cadre des carcinomes, permet généralement aux cellules de conserver certaines caractéristiques épithéliales, les laissant avec des phénotypes intermédiaires. Les cellules tumorales peuvent voyager de façon isolée ou en groupe de cellules. Généralement, les groupes de cellules

sont composés à la fois de cellules ayant subi une EMT qui vont diriger la dissémination et de cellules tumorales à phénotype épithélial qui vont maintenir la cohésion du groupe. Tôt ou tard, ces cellules envahissent le système vasculaire tumoral ou périphérique qui constitue une autoroute pour accéder aux organes distants. Cette intravasation est possible grâce aux caractéristiques acquises lors de l'EMT comme la capacité à secréter des MMPs pour dégrader la matrice extra-cellulaire et les liaisons entre les cellules endothéliales [Lambert et al., 2017].

Etape de circulation Les cellules tumorales circulantes (CTCs) font face à de nombreux défis, qu'elles soient isolées ou en groupe. En effet, lors de leur circulation dans le système vasculaire (sanguin ou lymphatique), elles sont confrontées à de nombreux obstacles physiques comme la taille des capillaires, le flux, les forces de cisaillement ou encore l'absence de d'adhésion à une surface. De plus, les CTCs sont vulnérables aux attaques du système immunitaire. Cependant, elles possèdent certaines caractéristiques qui leur permettent de survivre et de continuer leur processus invasif. Elles peuvent notamment s'associer avec les plaquettes sanguines pour se protéger du système immunitaire. Elles utilisent même certaines cellules de ce système immunitaire comme les neutrophiles ou les monocytes pour faciliter leur extravasation à travers le mur endothélial. Elles ont également la capacité de proliférer dans l'espace luminal des vaisseaux jusqu'à rompre la barrière endothéliale et envahir le tissu voisin. Afin d'extravaser, les CTCs peuvent également produire certains perturbateurs de l'intégrité vasculaire (VEGF, MMPs) ou induire la nécroptose des cellules endothéliales [Strilic et al., 2016][Lambert et al., 2017].

Etape de colonisation A leur arrivée dans le parenchyme du tissu atteint, il s'avère que les cellules tumorales sont peu adaptées à leur nouvel environnement. Elles peuvent alors entrer dans une phase de dormance - équilibre entre un faible taux de prolifération et l'élimination de certaines cellules - qui les protège contre les agressions extérieures. Cette phase peut durer plusieurs années dans certains types de carcinomes comme ceux du sein, de la prostate ou des reins. Elle peut être déclenchée par des signaux produits par le micro-environnement tumoral (e.g. TGF-β2) ou par l'absence de signaux de prolifération dont les cellules tumorales dépendaient auparavant. Différents mécanismes leur permettent de sortir de cette phase comme la néoangiogenèse. La prolifération des cellules tumorales dans un organe distant demande un pré-requis important : la capacité à initier une tumeur. Certaines des cellules la possèdent suite à leur EMT ou des modifications épigénétiques. Elles peuvent également rentrer dans une transition mésenchymo-épithéliale qui leur permet de retrouver leurs capacités de prolifération et d'organisation hiérarchique tissulaire facilitant le développement des lésions métastatiques [Lambert et al., 2017].

Tropisme organe-spécifique En fonction du type de carcinome, les cellules tumorales ont tendance à métastaser dans des organes spécifiques. Cette caractéristique peut s'expliquer, dans certains cas, par la structure et l'organisation du système vasculaire [Lambert et al., 2017]. Certaines tumeurs facilitent les processsus métastatiques en amont de la dissémination de leur cellules grâce à leur propension à secréter des chimiokines, des enzymes et des exosomes qui vont pré-modeler les organes cibles pour les CTCs en formant des niches pré-métastatiques [Steeg, 2016].

Cancer du sein

Le cancer du sein métastase principalement dans les poumons, le foie, le cerveau et les os. Les CTCs sont connues pour circuler à la fois dans le réseau lymphatique et le réseau sanguin. L'invasion des ganglions sentinelles est d'ailleurs signe d'un mauvais pronostic. Les cellules tumorales acquièrent différentes caractéristiques qui les destinent à certains organes cibles. L'extravasation des CTCs vers les poumons est facilitée par leur sécrétion d'angiopoïétine-like 4 qui induit la perméabilité de l'endothélium pulmonaire. Cette caractéristique est acquise dans la tumeur primaire grâce à la stimulation des cellules tumorales par le TGF-β présent dans le micro-environnement tumoral. Les CTCs ciblant le cerveau expriment un grand nombre de gènes qui leur permet de passer la barrière hémato-encéphalique. L'implantation des métastases osseuses est préparée par la sécrétion de lysyl oxidase qui crée des lésions pré-métastatiques en activant les ostéoclastes [Cox et al., 2015][Steeg, 2016][Lambert et al., 2017].

Caractéristiques facilitantes

Les tumeurs possèdent en plus de leur caractéristiques principales, des caractéristiques facilitant leur développement. Elles possèdent notamment un statut fortement inflammatoire facilitant leur croissance, leur vascularisation et développant leurs capacités invasives. De plus, leur génome est hautement instable : il devient plus sensible aux agents mutagènes et les mécanismes de vérification et de réparation de l'ADN sont progressivement compromis [Hanahan and Weinberg, 2011].

3.3.3 Soutien du micro-environnement tumoral

Une tumeur n'est pas composée uniquement de cellules tumorales. Le micro-environnement tumoral (MET) représente la composition biochimique et cellulaire de la tumeur. Il est constitué d'une population hétérogène de cellules cancéreuses et non cancéreuses (cellules du stroma), de protéines solubles, de vaisseaux sanguins et lymphatiques et de matrice

extra-cellulaire (figure 3.5). Les nombreux échanges entre les cellules tumorales et les cellules stromales facilitent la prolifération de la tumeur et limitent les attaques du système immunitaire [Steward and Wild, 2014]. Les principaux acteurs de l'influence du MET sur la carcinogenèse sont décrits ci-dessous.

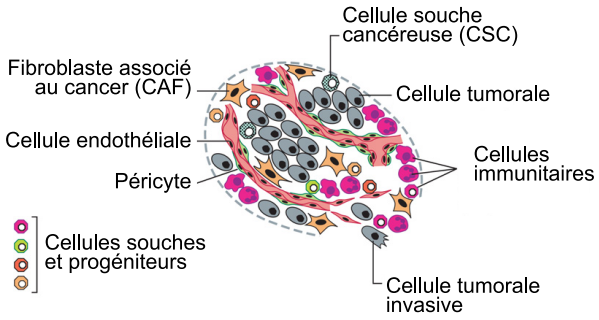


FIGURE 3.5 – Cellules composant le micro-environnement tumoral.
D'après [Hanahan and Weinberg, 2011].

Cellules tumorales et cellules souches cancéreuses (CSCs)

Les cellules tumorales sont les cellules fondatrices de l'environnement tumoral. Elles composent une population relativement homogène qui forme la tumeur en elle-même. Les CSCs sont des cellules possédant une plasticité très importante leur permettant de générer des sous-populations tumorales supportant le développement de la tumeur. Elles vont également participer aux processus métastatiques puisqu'elles possèdent la capacité d'initier de nouvelles tumeurs [Hanahan and Weinberg, 2011].

Cellules endothéliales et péricytes

L'implication de ces cellules sera traitée dans une section spécifique portant sur la vascularisation tumorale (partie 3.4 p.62).

Cellules immunitaires

Deux types de cellules immunitaires s'infiltrent dans le MET : les cellules luttant contre la tumeur (lymphocytes T cytotoxiques, cellules tueuses naturelles) et des cellules soutenant la progression tumorale (macrophages, lymphocytes C et T, neutrophiles, mastocytes). Par exemple, les macrophages représentent une source très importante de MMPs. Ils permettent ainsi le remodelage du tissu environnant et facilitent l'invasion. Les cellules immunitaires pro-tumorales promeuvent également l'angiogenèse et l'inflammation tumorales nécessaires à la progression du carcinome [Hanahan and Weinberg, 2011] [Steward and Wild, 2014].

Fibroblastes associés au cancer (CAFs)

Les CAFs sont présents en quantité variable en fonction du type de carcinome. Ils représentent un ensemble de deux types cellulaires : des cellules similaires aux fibroblastes qui créent des fondations solides pour la tumeur (dépôt de MEC) et des myofibroblastes qui participent à l'inflammation tumorale. Ces cellules favorisent la prolifération, l'invasion, l'angiogenèse tumorales et les processus métastatiques [Hanahan and Weinberg, 2011].

Cellules souches et progéniteurs du stroma

Ces cellules issues de la moelle osseuse migrent jusqu'au MET où elles peuvent se différencier en cellules stromales : cellules immunitaires, endothéliales, etc. Elles soutiennent ainsi l'évolution du cancer [Hanahan and Weinberg, 2011].

3.4 La vascularisation tumorale

3.4.1 *Angiogenic switch*

Comme les tissus normaux, les tumeurs ont besoin d'apports suffisants en oxygène et en nutriments ainsi que d'une solution pour évacuer leurs déchets métaboliques et le dioxyde de carbone. Tant que leur taille le permet, tous ces procédés ont lieu par diffusion. Au delà de 2 à 3 mm^3 de volume, des vaisseaux sanguins sont nécessaires [Folkman, 1971].

L'*angiogenic switch* ou le début de la formation de vaisseaux tumoraux est une étape essentielle de la carcinogenèse. Il existe plusieurs déclencheurs. Les cellules tumorales peuvent être soumises à un stress métabolique (hypoxie, acidification du pH, hypoglycémie) ou mécanique (pression intra-tumorale importante du fait de la prolifération des cellules tumorales). Elles peuvent également être confrontées aux cellules du système immunitaire ou subir des mutations génétiques qui leur permettent de sur-exprimer le VEGF (mutations de *Ras*, *ERBB2*, etc.) [Carmeliet and Jain, 2000][Viallard and Larrivée, 2017].

Quelque soit le déclencheur, l'*angiogenic switch* entraîne une angiogenèse tumorale importante en déstabilisant la balance angiogénique en faveur des facteurs pro-angiogéniques (figure 3.6) qui peuvent être produits par les cellules tumorales, les cellules stromales ou être originaires du sang ou de la MEC. Le VEGF est souvent sur-exprimé par les cellules tumorales. De même les cellules tumorales peuvent induire une sur-expression de Dll4, Ang2 ou VEGFR3 par les cellules endothéliales ce qui entraîne une angiogenèse importante. Certains facteurs anti-angiogéniques ou de maturation peuvent être sous-exprimés comme PDGF-BB [Welti et al., 2013][Viallard and Larrivée, 2017].

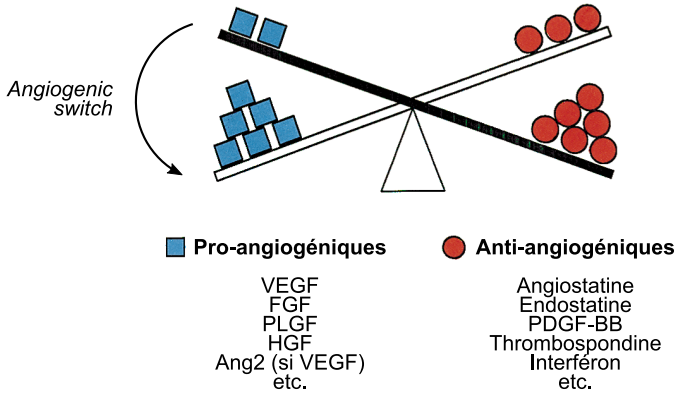


FIGURE 3.6 – *Angiogenic switch* et balance angiogénique.
D'après [Hanahan and Folkman, 1996] et [Bergers and Benjamin, 2003].

L'angiogenèse tumorale est supportée par le MET. Les neutrophiles et les cellules myéloïdes immatures sont essentielles à l'*angiogenic switch* et aux stades précoces de la vascularisation tumorale. En effet, elles sécrètent des facteurs pro-angiogéniques mais surtout elles sont capables de mobiliser le VEGF-A matriciel *via* la sécrétion de MMPs. Les macrophages favorisent également l'angiogenèse tumorale en exprimant des facteurs pro-angiogéniques. Les lymphocytes peuvent avoir une activité pro ou anti-angiogénique en fonction de leur état d'activation. Les plaquettes sécrètent elles aussi à la fois des facteurs pro-angiogéniques et des facteurs angiostatiques. Pour finir, les CAFs et les adipocytes favorisent aussi l'angiogenèse tumorale [De Palma et al., 2017].

Cancer du sein

Les tumeurs mammaires font partie des tumeurs très angiogéniques, le niveau de vascularisation est d'ailleurs un facteur pronostic de survie [Ribatti et al., 2016] [Aalders et al., 2017]. En effet, l'angiogenèse tumorale est essentielle au développement, à l'invasion et aux métastases du cancer du sein. Six facteurs pro-angiogéniques ont été définis comme essentiels au carcinome mammaire. Le principal est le VEGF, dès l'*angiogenic switch*, et tout au long du développement tumoral. Par la suite, lors des stades plus avancés, le FGF-2, le TGF-β1, le PLGF, le PD-ECGF (Platelet-Derived Endothelial Cell Growth Factor) et la pléiotropine sont des acteurs important de l'angiogenèse tumorale mammaire [Khosravi Shahi et al., 2009].

3.4.2 Différents types d'angiogenèse tumorale

L'angiogenèse tumorale se déroule de manière assez semblable à l'angiogenèse physiologique. Cependant, contrairement à cette dernière, dans le cas des tumeurs, l'expression

des facteurs régulant le phénomène est dérégulée et entraîne une angiogenèse anormale [Welti et al., 2013]. L'angiogenèse tumorale peut se dérouler de différentes façons (figure 3.7) en fonction du type de tumeur, de sa localisation et des conditions au moment de l'*angiogenic switch*.

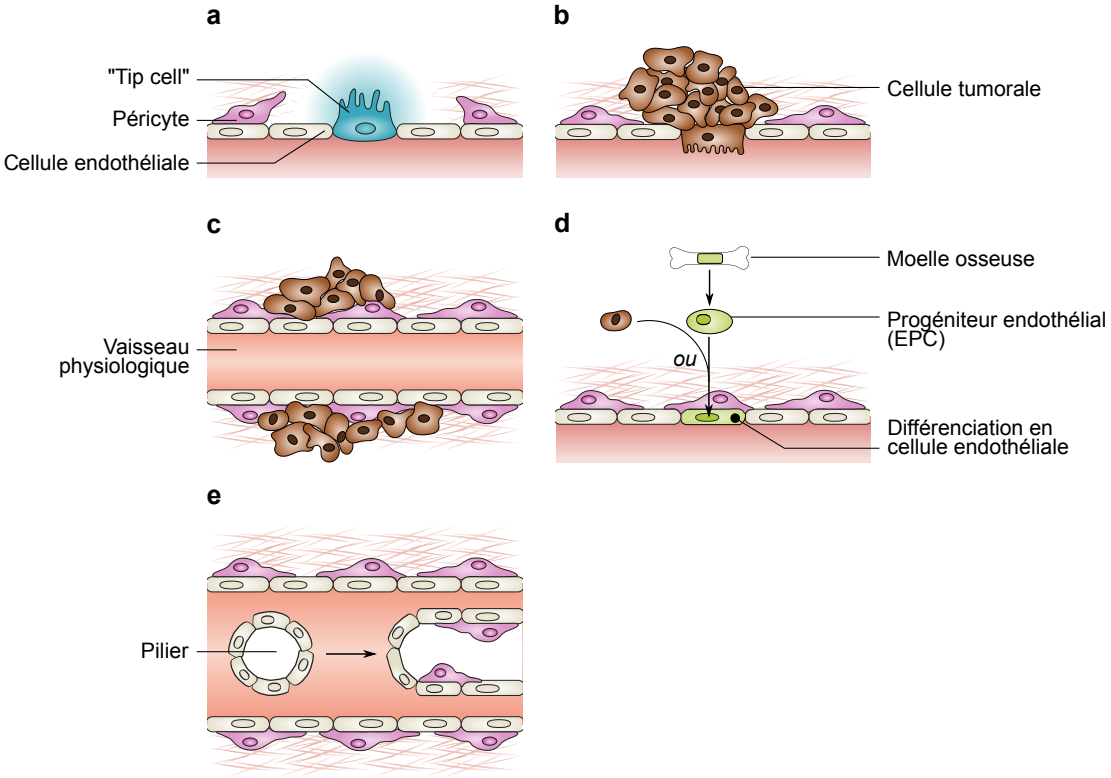


FIGURE 3.7 – Différents types d'angiogenèse tumorale.
a - Angiogenèse par bourgeonnement. b - Mimétisme vasculaire. c - Cooptation vasculaire. d - Néovasculogenèse. e - Angiogenèse par intussusception. Réalisé à partir de [Herbert and Stainier, 2011] et [Welti et al., 2013].

Bourgeonnement

L'angiogenèse tumorale se déroule selon les mêmes étapes et mécanismes que son équivalent physiologique (figure 3.7.a). Cependant, le dérèglement des signaux pro-angiogéniques induit un nombre de bourgeons trop important. De plus, la maturation des nouveaux vaisseaux est incomplète et imparfaite [Fouad and Aanei, 2017].

Mimétisme vasculaire

Des cellules tumorales peuvent se comporter comme des vaisseaux, s'insérant entre des cellules endothéliales de vaisseaux pré-existants (figure 3.7.b) ou formant elles-mêmes des structures similaires à des vaisseaux. Ces cellules sont très plastiques et possèdent

des capacités d'invasion et de migration très développées qui leur permettent de remodeler la MEC afin de libérer de l'espace pour le pseudo-vaisseau et se connecter au réseau vasculaire. Elles portent à la fois des marqueurs tumoraux et endothéliaux. Ces derniers leurs permettent de former une barrière - peu étanche - délimitant le vaisseau et de s'associer avec les cellules endothéliales. Leur position en contact avec le flux sanguin rend facile leur détachement et leur dissémination dans le réseau vasculaire [Viallard and Larrivée, 2017][Ronca et al., 2017].

Cooptation vasculaire

La cooptation est aussi appelée angiogenèse péri-tumorale. Les cellules tumorales prolifèrent et migrent de manière à venir entourer des vaisseaux physiologiques pré-existants pour les intégrer à la tumeur (figure 3.7.c). Si la vasculature est majoritairement obtenue par ce procédé, la tumeur est dite "non angiogénique" car les vaisseaux intra-tumoraux ne possèdent aucune des caractéristiques vasculaires tumorales [Viallard and Larrivée, 2017] [Ronca et al., 2017].

Néovasculogenèse

La néovasculogenèse consiste en l'incorporation des progéniteurs endothéliaux (EPCs) issus de la moelle osseuse dans la barrière endothéliale. Des CSCs peuvent également se différencier en cellules endothéliales dans le même but (figure 3.7.d). La tumeur peut induire ce type d'angiogenèse tumorale en sécrétant des cytokines et des enzymes protéolytiques capables de dégrader la MEC des niches vasculaires retenant les EPCs dans la moelle osseuse [Viallard and Larrivée, 2017][Ronca et al., 2017].

Intussusception

Des cas d'angiogenèse tumorale par intussusception ont également été décrits dans différents carcinomes (figure 3.7.e). Ce mode d'angiogenèse serait utilisé par la tumeur pour s'adapter rapidement aux modifications de son environnement [Viallard and Larrivée, 2017].

3.4.3 Caractéristiques du réseau sanguin tumoral

L'angiogenèse tumorale forme des vaisseaux aux caractéristiques anormales (figure 3.8) du fait de la dérégulation des facteurs angiogènes et de son statut de "blessure qui ne cicatrise pas" [Welti et al., 2013]. Le réseau vasculaire tumoral est tortueux, dilaté et désorganisé avec un flux sanguin très irrégulier. Il possède une perméabilité excessive étant très immature et peu recouvert par des cellules murales. De plus, les tumeurs présentent

une hétérogénéité vasculaire importante avec à la fois des zones hyper et hypo-vascularisées [Hanahan and Folkman, 1996][Viallard and Larrivée, 2017].

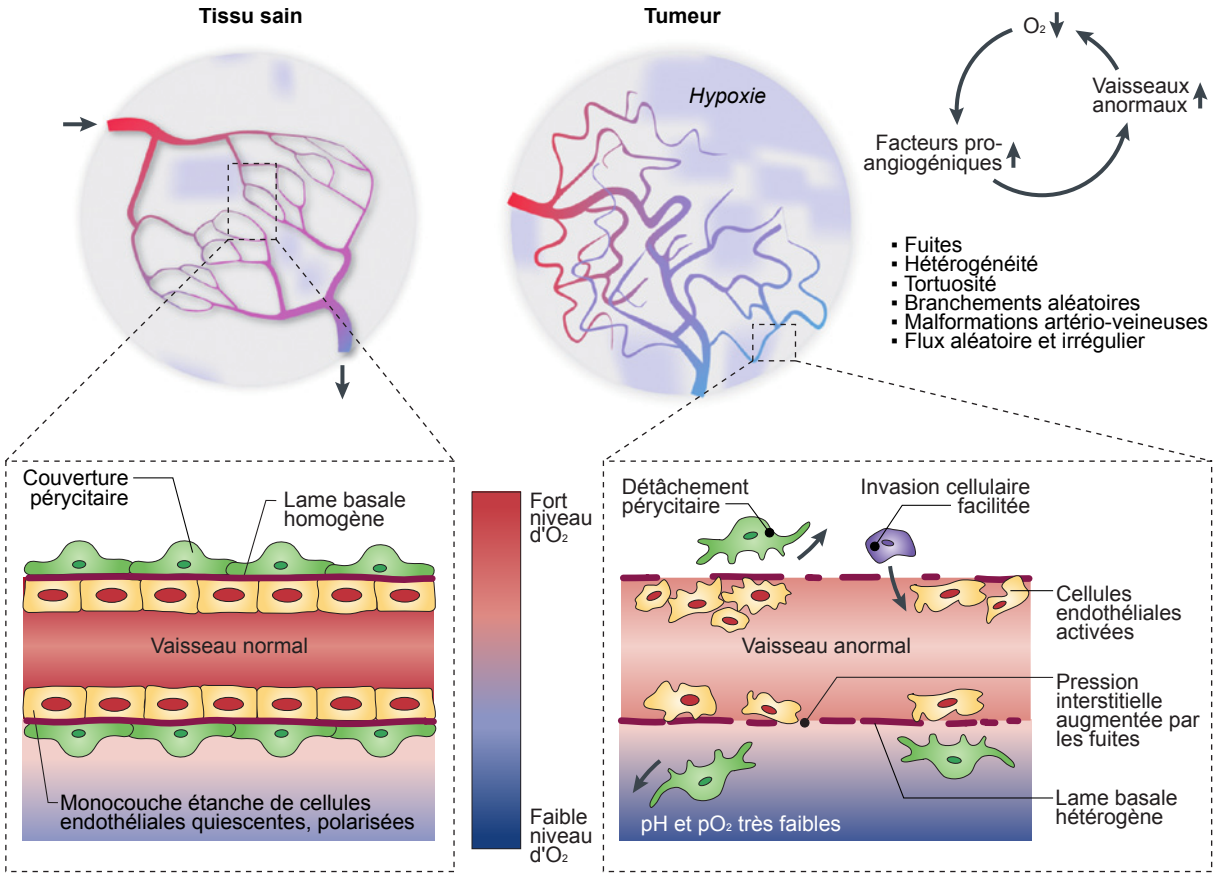


FIGURE 3.8 – Caractéristiques du réseau sanguin tumoral.
D'après [Carmeliet and Jain, 2011b].

Anomalies structurales

Le réseau sanguin tumoral présente une structure anormale (figure 3.8) : il n'y a pas de distinction artère, veine, capillaire mais de gros vaisseaux - les vaisseaux "mères" - et de petits y étant branchés de façon aléatoire. Le nombre de branchements est excessif et les bourgeons si nombreux que certains vaisseaux sont aveugles, constituant des voies sans issue pour le flux sanguin. Le diamètre des vaisseaux ainsi que leur couverture en cellules murales sont très irréguliers. Les cellules endothéliales ne sont plus polarisées et peuvent, lorsqu'elles sont activées par les cellules tumorales, se détacher de la barrière endothéliale et s'accumuler dans la lumière du vaisseau. Ce faisant, elles laissent de la place pour l'insertion de cellules tumorales qui miment le comportement des cellules endothéliales (figure 3.7.b). Les cellules endothéliales des vaisseaux tumoraux ont également un métabolisme particulier, avec de hauts taux de glycolyse, et des profils

d'expression génique spécifiques facilitant leur prolifération irrégulée comme l'expression d'EGFR ou l'activation constitutive de la voie PI3K/AKT. De plus, l'endothélium est très souvent fenestré de façon importante avec des pores pouvant avoir un diamètre jusqu'à 100 fois plus important que dans un tissu sain. Les péricytes sont également anormaux : ils présentent des marqueurs de cellules plus immatures et moins contractiles que ceux présents dans les tissus sains. Le remodelage constant du réseau tumoral rend le dépôt de lame basale complexe. Elle est donc très souvent irrégulière (épaisseur, continuité) [Carmeliet and Jain, 2011b][De Palma et al., 2017].

Perméabilité excessive

Les anomalies structurales présentées par les vaisseaux tumoraux engendrent des problèmes de connexion entre les cellules endothéliales, les cellules murales et la lame basale. Les vaisseaux sont donc instables et la prolifération endothéliale excessive induite par la tumeur mène à des hémorragies. De plus, la perméabilité des vaisseaux est impactée par les enzymes secrétées par les cellules tumorales (MMPs, trypsine, etc.) qui viennent dissocier les jonctions cellulaires notamment en coupant la VE-Cad. Le statut inflammatoire de la tumeur augmente également la perméabilité des vaisseaux. Toutes ces caractéristiques font que la perméabilité des vaisseaux tumoraux est excessive, ce qui conduit à de nombreuses hémorragies et favorise l'extravasation des CTCs dans le réseau vasculaire, facilitant donc les processus métastatiques [Viallard and Larrivée, 2017].

Perfusion chaotique

La prolifération incontrôlée des cellules tumorales et la résistance du tissu environnant créent une forte pression sur les vaisseaux tumoraux qui sont comprimés et tendent à s'effondrer, arrêtant le flux sanguin. La perméabilité excessive du réseau contribue à perturber le flux du fait des hémorragies. Le drainage lymphatique est également altéré (cf. section 3.4.4 p.68). Associé aux hémorragies, il induit une augmentation de la pression interstitielle tumorale ce qui comprime d'autant plus les vaisseaux. La perfusion faible induit une diminution de la disponibilité en oxygène et en nutriments et des zones d'hypoxie se développent au sein de la tumeur. L'hypoxie induit une augmentation de l'expression de VEGF ce qui aggrave la situation tout comme les CAFs. L'hypoxie est également un facteur favorisant l'EMT et donc les processus métastatiques. De façon surprenante, le peu de vaisseaux non comprimés possède un flux sanguin excessif qui augmente d'autant plus la pression interstitielle et la compression des autres vaisseaux. La perfusion est également chaotique du fait des caractéristiques du recouvrement péricytaire anormal qui, dans les tissus sains, régule le flux par son activité contractile [Viallard and Larrivée, 2017].

3.4.4 Lymphangiogenèse tumorale

De façon similaire à l'angiogenèse tumorale, la lymphangiogenèse tumorale est chaotique et hétérogène [Dieterich and Detmar, 2016]. Cependant, contrairement au réseau sanguin tumoral, le réseau lymphatique n'est pas composé majoritairement de nouveaux vaisseaux : il est issu de la prolifération des vaisseaux lymphatiques existants et de leur bourgeonnement [Mumprecht and Detmar, 2009].

Remodelage tumoral du réseau lymphatique

La lymphangiogenèse tumorale remodèle le réseau lymphatique sur plusieurs niveaux (figure 3.9). Le réseau tumoral se développe à la fois dans la tumeur (intra-tumoral) et en périphérie de celle-ci (péri-tumoral) grâce à la sécrétion par les cellules tumorales ou du MET de VEGF-C et de VEGF-D. En se fixant sur le VEGFR-3 exprimé à la surface des cellules endothéliales lymphatiques (LECs), ces deux facteurs induisent à la fois la prolifération (VEGF-C et VEGF-D) et la migration des LECs (VEGF-C). Ainsi, les vaisseaux lymphatiques bourgeonnent et s'élargissent (augmentation de la surface de contact avec la tumeur) suite à cette stimulation [Stacker et al., 2014]. Les vaisseaux intra-tumoraux possèdent un petit diamètre et sont souvent affaissés du fait de la forte pression interstitielle intra-tumorale. Ils sont donc peu fonctionnels. Les vaisseaux péri-tumoraux, au contraire, sont très dilatés, tortueux et souvent encombrés par de nombreuses cellules. Ils représentent les voies majeures du drainage tumoral [Dieterich and Detmar, 2016].

Les vaisseaux collecteurs et les ganglions lymphatiques associés à la tumeur (ganglions sentinelles) sont également remodelés. En effet, le VEGF-C et le VEGF-D sécrétés par les cellules tumorales sont drainés par les vaisseaux péri-tumoraux et agissent sur le réseau lymphatique. Ils induisent un élargissement des vaisseaux collecteurs, le VEGF-C *via* l'induction de la prolifération des LECs et le VEGF-D *via* l'action des prostaglandines qui sont pro-lymphangiogéniques. Cet élargissement des vaisseaux collecteurs permet d'augmenter le flux du drainage. Les ganglions sentinelles subissent une expansion de leur réseau de manière à former des niches pour les futures CTCs [Stacker et al., 2014] [Dieterich and Detmar, 2016].

Une fois des CTCs installées dans les niches lymphovasculaires (cf. section suivante), la concentration de VEGF-C et VEGF-D présente dans le système lymphatique éloigné (post-ganglion sentinelle) augmente, induisant un élargissement des vaisseaux lymphatiques lointains et le remodelage de sa couverture péricytaire (surexpression de NRP2) [Stacker et al., 2014].

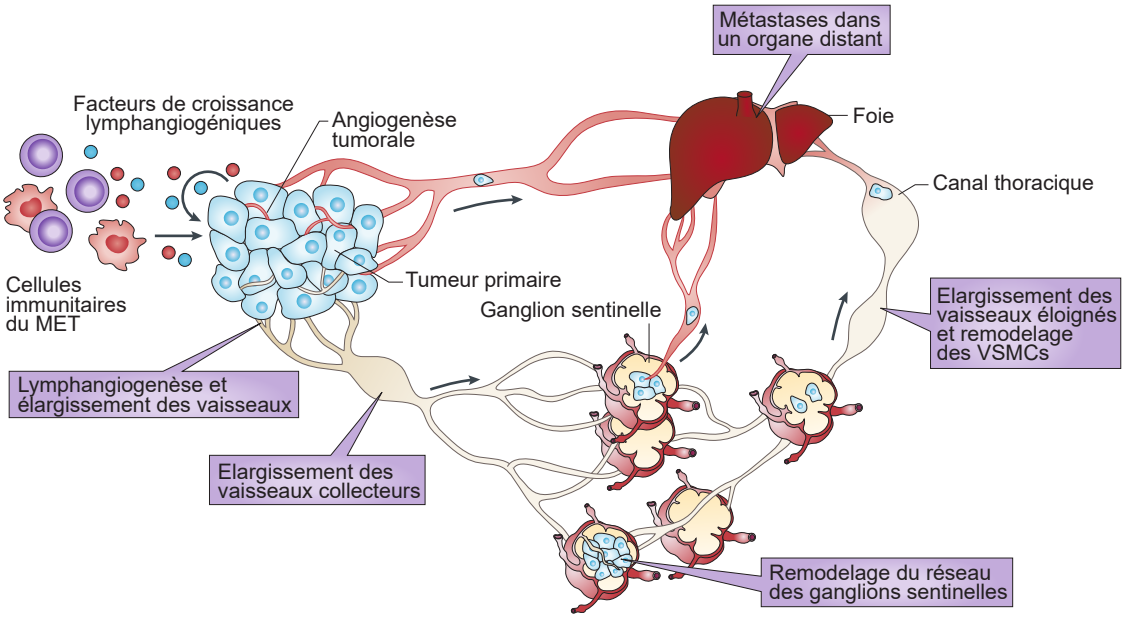


FIGURE 3.9 – Remodelage lymphatique tumoral et implications métastatiques.
D'après [Stacker et al., 2014].

D'autres facteurs sont impliqués dans la lymphangiogenèse tumorale. Le VEGF-A notamment mais aussi Ang1 et Ang2, le FGF-2, le PDGF-BB, etc. ont été décrits comme des facteurs favorisant les processus de remodelage du réseau lymphatique dans la cadre du cancer. Au contraire le TGF-β semble inhiber la lymphangiogenèse dans le contexte tumoral [Stacker et al., 2014][Karaman and Detmar, 2014].

Implication dans les processus métastatiques

La lymphangiogenèse tumorale et tous ses remodelages participent aux processus métastatiques. L'élargissement des vaisseaux et l'augmentation du flux de lymphe facilitent le drainage des CTCs dans le réseau lymphatique. De plus, les LECs et les cellules tumorales interagissent de façon à faciliter l'intravasation des CTCs : les cellules tumorales expriment le récepteur CCR7 ce qui les attire vers les zones où les chemokines CCL19 et CCL21 sont exprimées. Or, les LECs, suite à la stimulation par le VEGF-C, secrètent du CCL21, facilitant ainsi l'intravasation des CTCs dans le réseau lymphatique. Les CTCs sont également guidées dans le réseau lymphatique par ces même chemokines. En effet, la tumeur peut également secréter CCL19 ou CCL21 qui sont drainées par les vaisseaux lymphatiques péri-tumoraux jusqu'aux ganglions sentinelles. Les CTCs suivent le gradient ainsi créé pour aller se nicher dans ces ganglions [Mumprecht and Detmar, 2009][Dieterich and Detmar, 2016].

Une fois dans les ganglions, les CTCs ont plusieurs possibilités : métastaser jusqu'à un organe distant *via* le réseau sanguin ou le réseau lymphatique (figure 3.9) ou se loger dans

les niches lymphovasculaires créées lors du remodelage du réseau lymphatique des ganglions sentinelles [Karaman and Detmar, 2014]. Cette localisation les protège notamment du système immunitaire. En effet, les ganglions lymphatiques expriment des antigènes des tissus périphériques qui induisent une tolérance des lymphocytes T dans une zone proche du ganglion en promouvant l'apoptose de ces lymphocytes. Le VEGF-C produit par les cellules tumorales les protège également du système immunitaire en induisant la prolifération des LECs porteuses d'antigènes des tissus périphériques ou en augmentant leur production de ces antigènes [Dieterich and Detmar, 2016]. La survie des CTCs dans les niches lymphovasculaires est donc facilitée, ce qui permet le développement de micro-métastases dans les ganglions et facilite les métastases distantes sur le long terme [Stacker et al., 2014].

Cancer du sein

Le cancer du sein est présupposé métastaser majoritairement *via* le réseau lymphatique. La densité du réseau péri- et intra-tumoral est d'ailleurs fortement corrélée avec les chances de survie des patients [Niemiec et al., 2017]. Depuis plusieurs années, le diagnostic des métastases est effectué en regardant la dissémination des CTCs dans les ganglions sentinelles. L'invasion par des cellules tumorales de ces ganglions est à l'origine de mauvais pronostics [Rahman and Mohammed, 2015].

3.5 Thérapies anti-angiogéniques

3.5.1 Principe originel et évolution

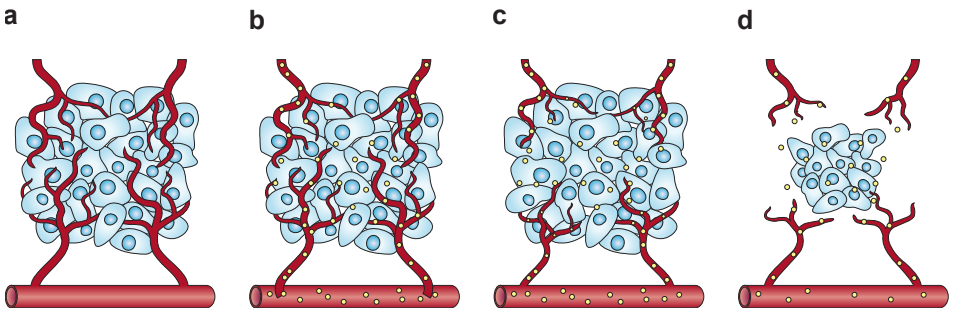


FIGURE 3.10 – Principe originel des traitements anti-angiogéniques.
a - Tumeur vascularisée. b - Début du traitement anti-angiogénique. c - Régression des vaisseaux tumoraux. d - Régression progressive de la tumeur. D'après [Zetter, 2008].

Judah Folkman a été le premier à émettre l'hypothèse que bloquer l'angiogenèse tumorale pourrait permettre la régression des néo-vaisseaux tumoraux et induire la régression de la tumeur (figure 3.10), le but étant d'affamer la tumeur jusqu'à qu'elle meure [Folkman, 1971]. Par la suite, cette hypothèse s'étant vérifiée sur différents modèles, des traitements anti-angiogéniques (AA) ont été développés afin d'agir sur les trois points clés de l'angiogenèse tumorale : a) la sécrétion des facteurs pro-angiogéniques, b) l'activité des récepteurs de ces facteurs de croissance et c) la signalisation en aval de ces récepteurs [Giuliano and Pagès, 2013]. Certains traitements plus agressifs ayant pour but de détruire les vaisseaux ont également été développés : les "vascular disrupting agents" ou agents perturbateurs vasculaires (VDA) [Rivera and Bergers, 2015].

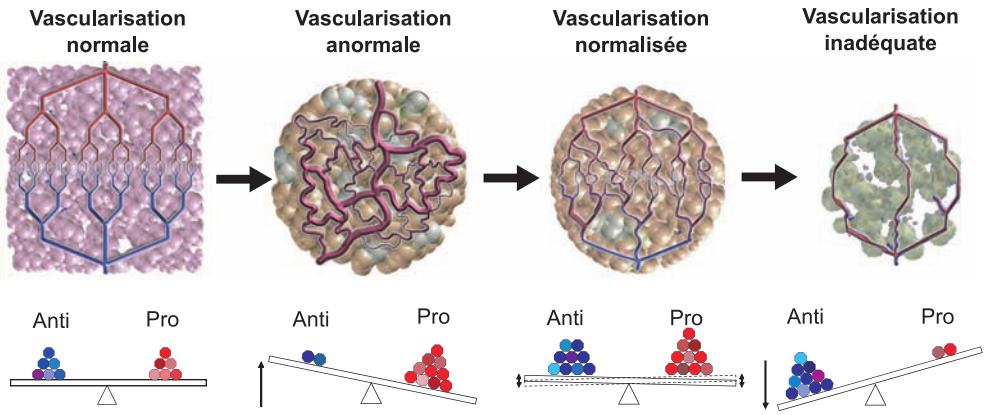


FIGURE 3.11 – Traitements anti-angiogéniques et normalisation des vaisseaux tumoraux. D'après [Jain, 2005].

L'ensemble des traitements développés n'ont pas eu l'effet espéré du fait de nombreuses résistances (cf. partie 3.5.3 p.76). Cependant, la manipulation du réseau vasculaire tumoral reste une cible intéressante. En effet, les thérapies cytotoxiques nécessitent un accès à la tumeur : les vaisseaux. Or ces derniers sont déstructurés et peu perfusés, limitant l'accès des molécules à leur cible. L'objectif est d'homogénéiser et de mieux répartir le flux sanguin dans la tumeur pour faciliter l'accès aux cellules tumorales. Les AA permettent la normalisation des vaisseaux tumoraux pendant un temps grâce au phénomène du "pruning" ou élagage (figure 3.11). L'action des AA induit dans un premier temps la régression des vaisseaux immatures et non perfusés. Elle permet de maintenir un certain équilibre de la balance angiogénique. Les vaisseaux restants sont plus stables, bien que moins matures, et plus perméables que leurs équivalents physiologiques. Dans un second temps seulement, les AA finissent de perturber la vascularisation tumorale - en inversant la balance angiogénique - la laissant inadéquate pour la survie de la tumeur qui s'adapte et trouve des voies parallèles pour s'oxygéner et se fournir en nutriments. Le principe actuel

est donc de travailler sur les doses et la fréquence d'administration des AA pour maintenir le plus longtemps la phase de normalisation et de combiner AA et chimiothérapie ou radiation par exemple [Jain, 2001][Jain, 2005][Rivera and Bergers, 2015].

Les traitements AA représentent actuellement la quatrième branche des traitements anti-cancéreux avec la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie. Plusieurs molécules ont déjà été approuvées et de nombreux essais cliniques étudiant l'effet de molécules ciblant l'angiogénèse tumorale sont en cours encore aujourd'hui [Rivera and Bergers, 2015].

3.5.2 Principaux traitements actuels

Inhibiteurs spécifiques de la voie du VEGF

Le VEGF est surexprimé par l'ensemble des carcinomes vascularisés, ce qui fait de lui une des cibles principales des traitements anti-angiogéniques. Plusieurs traitements spécifiques de sa voie de signalisation ont été développés (table 3.1) [Lin et al., 2016].

Le bevacizumab a été le premier de ces traitements à avoir été autorisé par la *Food and Drug Administration* (FDA) en 2004 pour le traitement du cancer colorectal métastatique en combinaison avec une chimiothérapie. Il s'agit d'un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le VEGF-A. Il empêche la liaison du VEGF-A à ses récepteurs, bloquant ainsi toute signalisation pro-angiogénique en aval. Après 2004, il a été approuvé pour différents cancers (table 3.1), toujours en combinaison sauf dans le traitement du glioblastome où il est utilisé en monothérapie. Le bevacizumab a été autorisé aux États-Unis et en Europe en 2008 pour le traitement du cancer du sein métastatique en combinaison avec une chimiothérapie. Il a cependant été retiré du marché américain en 2011 du fait d'un manque d'efficacité [Tarallo and De Falco, 2015][Lin et al., 2016].

Depuis, d'autres agents spécifiques de la voie du VEGF ont été approuvés (table 3.1). Le ramucirumab est un anticorps dirigé contre le VEGFR-2, empêchant sa liaison avec le VEGF. L'aflibercept, un récepteur chimérique soluble contenant des éléments du VEGFR-1 et du VEGFR-2, cible la voie de signalisation de façon plus large. En effet, il neutralise les isoformes circulantes du VEGF grâce à leur affinité pour leurs récepteurs. Il a été prouvé qu'il améliore la survie globale et sans progression de la maladie dans le traitement du cancer colorectal métastatique [Shojaei, 2012][Giuliano and Pagès, 2013][Ronca et al., 2017].

TABLE 3.1 – Anti-angiogéniques spécifiques de la voie du VEGF approuvés.
D'après [Limaverde-Sousa et al., 2014] et [Lin et al., 2016].

Molécule	**Type d'inhibiteur**	**Cible(s)**	**Cancer**
Bevacizumab (Avastin)	Anticorps	VEGF-A	Cancer colorectal métastatique Cancer du poumon non squameux avancé Cancer du rein métastatique Cancer ovarien Cancer du col de l'utérus Glioblastome (Cancer du sein métastatique)
Ramucirumab (Cyramza)	Anticorps	VEGFR-2	Adénocarcinome gastrique avancé Adénocarcinome gastro-oesophagique avancé Cancer du poumon non squameux avancé Cancer colorectal avancé
Ziv-Aflibercept (Zaltrap)	Piège à ligand	VEGF-A/B, PLGF	Cancer colorectal métastatique

TABLE 3.2 – Anti-angiogéniques inhibiteurs des tyrosine-kinases approuvés.
D'après [Limaverde-Sousa et al., 2014] et [Lin et al., 2016].

Molécule	**Cibles**	**Cancer**
Sunitinib (Sutent)	VEGFR, PDGFR, KIT, FLT3, CSF-1R, RET	Cancer du rein avancé Cancer du pancréas avancé ou métastatique Tumeurs endocrines Tumeurs gastro-intestinales
Sorafenib (Nexavar)	VEGFR-2/3, PDGFR-β, KIT, Raf	Cancer du rein avancé Carcinome hépatique
Axitinib (Inlyta)	VEGFR, PDGFR, KIT	Cancer du rein avancé
Pazopanib (Votrient)	VEGFR, PDGFR, FGFR, KIT	Cancer du rein avancé Sarcome avancé des tissus mous
Vandetanib (Caprelsa)	VEGFR-2, EGFR, KIT, RET	Cancer médullaire de la thyroïde

Inhibiteurs des tyrosine-kinases

Suite au succès du bevacizumab, des inhibiteurs de l'activité tyrosine-kinase (TKis) ont été développés afin de cibler - à l'origine - l'activité du VEGFR-2. Il s'est ensuite avéré que ces molécules n'étaient pas spécifiques mais restaient sélectives puisque bloquant également l'activité d'autres récepteurs impliqués dans l'angiogenèse (PDGFR, FGFR, etc.) ce qui potentialise leur efficacité [Bergers and Hanahan, 2008].

Plusieurs TKis ont été approuvés par la FDA et l'Agence Européenne du Médicament (AEM) (table 3.2). Il s'agit de petites molécules capables de traverser la membrane cellulaire pour aller cibler le domaine tyrosine-kinase des récepteurs. En entrant en compétition avec l'ATP pour se lier à ce domaine, les TKis empêchent la phosphorylation du récepteur et inhibent ainsi la signalisation en aval en cas de liaison avec le ligand. Bien que basés sur un principe similaire, le spectre de kinases inhibées et les effets secondaires sont différents (table 3.2) en fonction du TKi comme on peut le voir avec le sunitinib et le sorafenib, les deux premiers TKis à avoir été autorisés [Giuliano and Pagès, 2013].

Dans l'ensemble, les TKis présentent des taux de survie améliorés comparés à un placebo. Contrairement aux thérapies spécifiques, ils sont plus efficaces en monothérapie [Ronca et al., 2017]. Cela est probablement dû à leur spectre plus large et à leur potentiel effet direct sur la tumeur comme cela a été démontré pour le sorafenib. Malheureusement, peu de cancers répondent à ce type de traitement [Giuliano and Pagès, 2013].

TABLE 3.3 – Autres anti-angioéniques approuvés.
Liste non exhausitive. D'après [Giuliano and Pagès, 2013] et [Limaverde-Sousa et al., 2014].

Molécule	**Type d'inhibiteur**	**Cible**	**Cancer**
Cetuximab (erbitux)	Anticorps	EGFR	Cancer colorectal métastatique Cancer squameux du cou et de la tête
Panitumumab (vectibix)	Anticorps	EGFR	Cancer colorectal métastatique
Trastuzumab (herceptin)	Anticorps	HER-2	Cancer du sein Cancer gastrique
Temsirolimus (torisel)	Analogue rapamycine	mTOR	Cancer du rein avancé Lymphome du manteau
Everolimus (afinitor)	Analogue rapamycine	mTOR	Cancer du rein avancé Lymphome du manteau Cancer du sein Cancer neuroendocrine du pancréas

Autres cibles

Certains traitements (table 3.3) ciblant des récepteurs de facteurs de croissance épithéliaux comme l'EGFR (Epithelial Growth Factor Receptor) ou HER2 ont finalement été classés dans les AAs, probablement à cause de voies de signalisation communes avec le VEGF.

D'autres molécules que le VEGF peuvent être ciblées pour bloquer l'angiogenèse. En effet, comme vu dans la section précédente (table 3.2), les PDGFR, FGFR et leurs ligands peuvent représenter des cibles efficaces. Des traitements les ciblant ou ciblant Ang1, Ang2, la voie Notch ou encore mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) - protéine régulée par l'hypoxie qui contrôle la prolifération et la sécrétion de VEGF - ont été développés voire même autorisés (liste non-exhaustive : table 3.3).

VDAs

Les VDAs ont pour objectif de détruire l'ensemble des vaisseaux tumoraux et ainsi de provoquer la nécrose de la tumeur, à la différence des AAs qui ciblent les néo-vaisseaux et les processus d'angiogenèse. Il existe deux types de VDAs : les petites molécules et les VDAs dirigés par un ligand. Les petites molécules ne ciblent pas précisément les vaisseaux tumoraux mais leur action est basée sur les différences phénotypiques entre vasculature tumorale et physiologique (prolifération, perméabilité, etc.). Ce sont majoritairement des agents perturbateurs du cytosquelette. Les VDAs dirigés par un ligand sont des molé-

cules chimériques composées d'un fragment de ligand dont le récepteur est sur-exprimé dans les tumeurs et d'un effecteur dont le rôle est de détruire la barrière endothéliale [Thorpe, 2004].

Plusieurs essais cliniques ont débuté ces dernières années mais encore aucun VDA n'a été approuvé par la FDA. Un essai en phase 3 sur le vadimezan a même été arrêté pour absence d'efficacité [Liang et al., 2016]. Le succès clinique des VDAs est en effet entravé par des zones de résistance dans les tumeurs qui entraînent la progression de la maladie pendant ou après le traitement. L'élimination de ces zones insensibles aux VDAs est envisagée *via* la combinaison des traitements avec de la chimiothérapie, de la radiothérapie ou encore des AAs. Un essai clinique en cours combinant le bevacizumab et la fosbretabuline (déstabilisateur des microtubules) pour le traitement du carcinome ovarien montre une amélioration de la survie sans progression de la maladie et de la survie globale malgré un risque plus important d'hypertension [Ronca et al., 2017].

Cancer du sein

Peu de traitements anti-angiogéniques ont jusque là été efficaces pour lutter contre le cancer du sein, malgré son caractère hautement vascularisé. Le bevacizumab a été retiré par la FDA car, même si le temps de survie sans progression de la maladie est significativement meilleur quand il est combiné avec une chimiothérapie (paclitaxel ou capecitabine), la survie globale n'est malheureusement pas améliorée par le traitement. Son utilisation est cependant toujours approuvée en Europe. Le ramucirumab n'a pas démontré d'effets positifs lors des essais cliniques de même que les TKis [Aalders et al., 2017].

3.5.3 Mécanismes de résistance

Les AAs, bien que prometteurs, doivent faire face à des problèmes de résistance. En effet, ils permettent d'améliorer la survie dans de nombreux cancers agressifs, mais ils échouent à engendrer une réponse sur le long terme chez la majorité des patients. Certains patients ne répondent même jamais aux AAs (résistance innée). Quand ils sont efficaces, ces traitements sont bénéfiques de façon transitoire (maladie stable ou en régression) puis la croissance tumorale reprend et le cancer progresse rapidement malgré le traitement (résistance acquise). En conséquence, le bénéfice clinique de ces traitements se compte actuellement en mois seulement. Il existe plusieurs mécanismes permettant d'expliquer les résistances innée et acquise [Bergers and Hanahan, 2008].

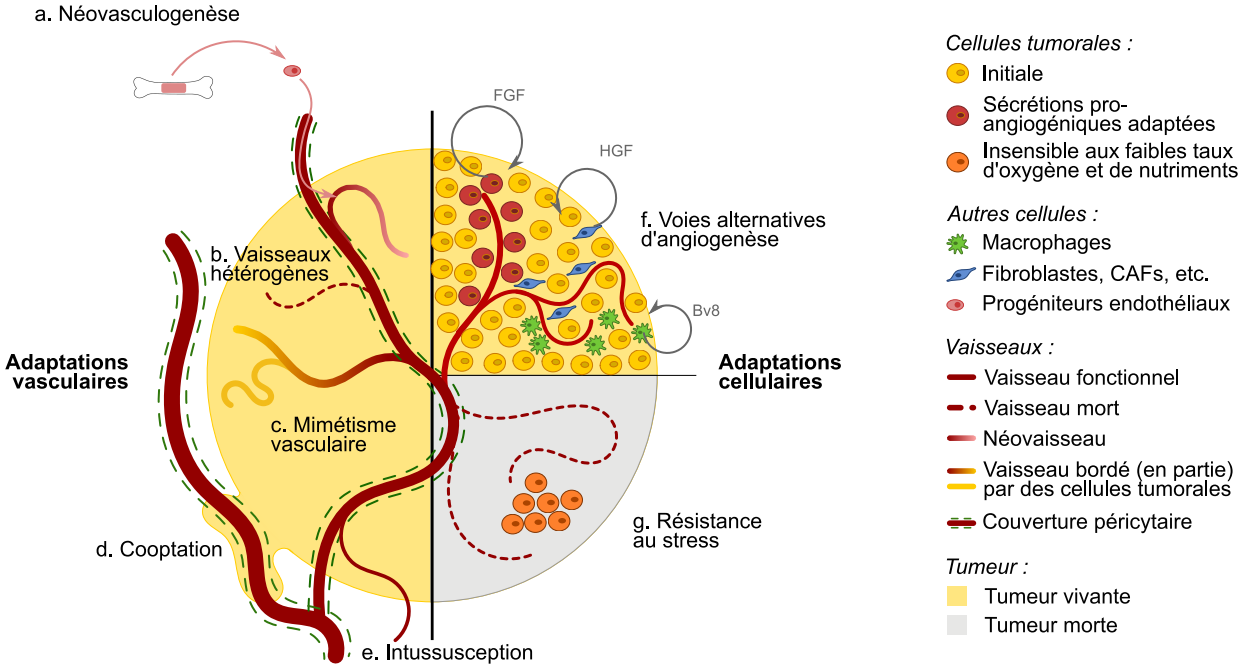


FIGURE 3.12 – Mécanismes de résistance aux traitements anti-angiogéniques.

Résistance innée

Les cas de résistance innée ne concernent qu'une minorité de patients. Les traitements actuels ciblent le VEGF ou les voies de signalisations en aval, bien que pouvant cibler quelques voies parallèles dans le cas des TKis. Un des possibles mécanismes de résistance innée est la pré-existence de plusieurs voies pro-angiogéniques redondantes dans les cellules cancéreuses, faisant que l'angiogenèse tumorale n'est que peu ou pas affectée par le traitement. Il existe également des formes de protection médiées par les cellules inflammatoires qui sécrètent diverses cytokines et facteurs de croissance pro-angiogéniques contournant le traitement. Les AAs ne sont pas efficaces dans le cas de tumeurs hypovasculaires puisqu'elles se développent sans la nécessité d'être vascularisées. Enfin, certaines tumeurs optent uniquement pour des mécanismes de cooptation, phénomène qui n'est pas ciblé par les AAs [Bergers and Hanahan, 2008].

Résistance acquise

La résistance acquise est due au fait que les tumeurs angiogéniques s'adaptent aux AAs en développant des solutions alternatives pour développer leur réseau vasculaire. Plusieurs mécanismes ont été décrits, pouvant se dérouler en parallèle ou de façon isolée (figure 3.12) [Bergers and Hanahan, 2008].

Les tumeurs peuvent adopter des modes de vascularisation indépendants des voies de signalisation de l'angiogenèse par bourgeonnement. Elles sont également capables de recruter des progéniteurs endothéliaux et péricytaires de la moelle osseuse ou d'utiliser des CSCs pour développer leur réseau vasculaire par néovasculogenèse (figure 3.12.a). Elles peuvent également utiliser le mimétisme vasculaire (figure 3.12.c), la cooptation (figure 3.12.d) ou l'intussuception (figure 3.12.e) [Vasudev and Reynolds, 2014].

Une autre des raisons de la résistance acquise est l'hétérogénéité de la vascularisation tumorale (figure 3.12.b). En effet, les vaisseaux hautement instables car peu ou pas maturés sont très sensibles aux AAs. Ils ont notamment besoin des signaux de survie induits par la signalisation du VEGF. Au contraire, les vaisseaux maturés sont plus stables, moins dépendants du VEGF pour leur survie et par conséquent plus résistants aux AAs. Les TKis ciblant la signalisation *via* les PDGFRs sont moins susceptibles d'être confrontés à ce genre de résistance puisqu'ils limitent le recouvrement péricytaire des vaisseaux [Bergers and Hanahan, 2008][Vasudev and Reynolds, 2014].

Les tumeurs peuvent également activer des voies pro-angiogéniques alternatives non touchées par le traitement (figure 3.12.f). Les cellules tumorales peuvent sur-exprimer d'autres facteurs pro-angiogéniques que le VEGF, comme les PDGF, les FGF, les Ang, l'interleukine 6, etc. Il existe également des cas de sur-expression d'isoformes du VEGF n'étant pas reconnus par le traitement dans le cas du bevacizumab. L'hypoxie générée dans la tumeur par les AAs peut permettre à la tumeur de recruter des monocytes pro-angiogéniques de la moelle osseuse qui peuvent induire l'angiogenèse tumorale grâce aux nombreux facteurs qu'ils sécrètent. Les monocytes de la moelle osseuse participent entre autres à la résistance au sunitib *via* la sécrétion de HGF (Hepatocyte Growth Factor). L'hypoxie peut également activer les cellules du stroma tumoral (cellules myéloïdes, CAFs, etc.) et induire la vascularisation de la tumeur *via* les protéines exprimées. Les cellules myéloïdes du stroma sont d'ailleurs connues pour augmenter leur sécrétion du facteur pro-angiogénique Bv8 (Bombina Variegata peptide 8) lors des traitements ciblant la voie du VEGF [Bergers and Hanahan, 2008][Shojaei, 2012][Giuliano and Pagès, 2013].

Pour finir, les tumeurs sont capables de s'adapter au stress induit par l'hypoxie provoquée par les AAs. Certaines cellules tumorales développent des mutations qui leur permettent de survivre et de proliférer dans un environnement pauvre en oxygène et en nutriments (figure 3.12.g). Il existe également des cas où la tumeur rentre en phase de dormance afin d'éviter de succomber au traitement. Ces mécanismes favorisent l'invasion tumorale et les processus métastatiques ce qui va à l'encontre de l'objectif du traitement [Giuliano and Pagès, 2013][Vasudev and Reynolds, 2014].

Cancer du sein

Les tumeurs mammaires sont très efficaces dans les mécanismes de résistance aux AAs. C'est d'ailleurs la raison principale du retrait du bevacizumab aux États-Unis. Un des facteurs principaux de résistance est le stade de la maladie. En effet, lors des phases précoces, l'angiogenèse tumorale est basée presque en exclusivité sur l'activité du VEGF-A. Puis, plus le cancer est à un stade avancé, plus le développement du réseau vasculaire est basé sur des voies pro-angiogéniques redondantes. Cinq facteurs principaux sont connus à ce jour en plus du VEGF-A : le FGF-2, le TGF-β1, le PLGF, le PD-ECGF et la pléiotropine [Khosravi Shahi et al., 2009].

D'autres mécanismes de résistance ont été découverts dans le cadre du cancer du sein. Parmi eux, un cas très intéressant est la capacité des cellules tumorales à relarguer des microvésicules possédant un isoforme du VEGF-A à leur surface capable d'activer les récepteurs du VEGF en présence du bevacizumab [Feng et al., 2017].

3.5.4 Avenir des thérapies anti-angiogéniques

Bien que très prometteurs, les AA n'ont jusqu'ici pas démontré de bénéfices cliniques suffisants. En effet, leur efficacité transitoire est suivie d'une phase de résistance et d'augmentation de l'invasion et des métastases qui limite leurs bénéfices sur la survie globale des patients. Afin de passer au delà de ces limitations, de nouvelles stratégies utilisant les AAs sont développées.

Une des possibilités envisagées est la combinaison d'AAs ciblant différentes voies de signalisation pro-angiogéniques redondantes avec comme constante une inhibition spécifique de la voie du VEGF. Par exemple, l'inhibition des voies du VEGF et du FGF est envisagée comme celle des récepteurs VEGFR et EGFR qui a déjà fait ses preuves dans des modèles précliniques de RCC en diminuant l'apparition de phénomènes de résistance. Les récepteurs ALK1 et ENG, exprimé spécifiquement à la surface des cellules endothéliales, sont également ciblés par de nouvelles études (cf. section 4.5.3 p.109) . Le calcium, étant essentiel à la différenciation des progéniteurs endothéliaux, est également envisagé comme cible complémentaire [Giuliano and Pagès, 2013]. Cependant, un ciblage aussi important des voies de l'angiogenèse pourrait déclencher des effets secondaires plus importants et plus graves. De plus, les problèmes d'invasion et de métastases déclenchés par l'hypoxie induite par ces traitements ne sont pas encore maîtrisés dans ce type de combinaison.

Les AAs sont actuellement combinés avec des chimiothérapies. Il pourrait être intéressant de continuer à exploiter cette piste. En effet, il a été démontré que les AAs induisent

une normalisation des vaisseaux tumoraux ce que facilite l'accès à la tumeur pour les traitements cytotoxiques. Cependant, l'effet normalisateur des AAs n'est que transitoire car il repose sur l'équilibre instable de la balance angiogénique. L'établissement des doses et des temps de traitement dans l'objectif de la normalisation et non pas de la destruction des vaisseaux tumoraux est nécessaire. D'autres cibles angiogéniques comme le métabolisme des cellules endothéliales sont actuellement étudiées dans ce but. En effet, le métabolisme des cellules endothéliales est le point de convergence des voies de signalisation pro-angiogéniques. Par exemple, l'inhibition de PFKFB3, une enzyme glycolytique, induit une diminution de la néovascularisation tumorale ainsi que la normalisation et la consolidation du réseau vasculaire tumoral pré-existant tout en diminuant l'invasion et les métastases dans des modèles précliniques [Ronca et al., 2017]. L'utilisation de promoteurs vasculaires est également envisagée. En augmentant le réseau tumoral, l'accès à la tumeur n'en deviendrait que plus important. Il a d'ailleurs été démontré que cette stratégie permettrait de diminuer les doses de chimiothérapie tout en augmentant l'efficacité de son action. De plus, la diminution de l'hypoxie intra-tumorale est supposée limiter l'invasion et les métastases [Rivera and Bergers, 2015][Lin et al., 2016].

Les AAs pourraient également être combinés avec d'autres thérapies que la chimiothérapie. Du fait des problèmes importants de métastases aves la résistance aux AAs, il est envisagé de les combiner avec des anti-invasifs et des anti-métastatiques comme des traitements ciblant HIF, HGF ou IGF1 [Bergers and Hanahan, 2008]. L'angiogenèse tumorale a un rôle immunosuppresseur au sein de la tumeur. L'hypothèse a donc été émise que les AAs permettraient d'augmenter l'efficacité des immunothérapies. Les premiers essais semblent prometteurs. En effet, la combinaison du bevacizumab et de l'ipilumab (anticorps dirigé contre CTLA4, protéine associée aux lymphocytes T cytotoxiques) a permis d'augmenter significativement la survie globale de patients atteints de mélanomes métastatiques [Ronca et al., 2017].

De nouvelles technologies sont envisagées pour rendre les traitements plus efficaces. En effet, seulement 0.015% des anticorps injectés à un patient sont retrouvés dans la tumeur. L'utilisation de nanoparticules permettrait une meilleure pénétration dans la tumeur ainsi qu'une meilleure rétention du traitement du fait du drainage lymphatique intra-tumoral inefficace. La concentration augmentée sur un plus long terme permettrait au traitement d'agir de façon plus importante et plus longue [Shojaei, 2012]. De nombreux tests restent cependant à mener afin de prouver l'efficacité de cette technique.

Pour finir, il semble nécessaire d'identifier des biomarqueurs de l'angiogenèse tumorale et de la réponse aux traitements. En effet, à ce jour, nous ne disposons pas de moyens

pour identifier le potentiel de réponse des patients ni pour étudier l'évolution de leur réponse aux AAs [Giuliano and Pagès, 2013]. Or, des biomarqueurs pourraient nous permettre d'anticiper les résistances et de nous y adpater. Ils pourraient également être un moyen d'identifier les meilleures combinaisons thérapeutiques pour chaque patient et ainsi participer à l'individualisation des traitements.

3.6 Thérapies anti-lymphangiogéniques

Les thérapies anti-lymphangiogéniques (ALs) représentent un moyen clinique prometteur de réduire les métastases (cf. partie 3.4.4 p.68). De nombreuses études précliniques ciblant la lymphangiogenèse tumorale ont démontré l'efficacité des traitements ciblant les axes de signalisation VEGF-C/VEGFR-3 et VEGF-D/VEGFR-3 notamment du fait d'une diminution importante des processus métastatiques. Ces traitements pourraient être utilisés dans différents cas de figure. Dans le cas de tumeurs résécables avec des risques de métastases après chirurgie, ils pourraient être combinés avec des chimiothérapies. Ils pourraient également être utilisés en pré-opératoire pour diminuer la taille de la tumeur et ainsi faciliter la résection. Pour finir, dans le cas de tumeurs non opérables, ils pourraient permettre de limiter l'invasion métastatique [Stacker et al., 2014].

Les axes VEGF-C/VEGFR-3 et VEGF-D/VEGFR-3 sont les plus étudiés dans le cadre de la lymphangiogenèse tumorale. En effet, ils constituent des cibles prometteuses dans le cadre des ALs car ce sont les axes les plus spécifiques de la lymphangiogenèse connus à ce jour. De plus, ils sont également impliqués dans l'angiogenèse tumorale et des traitements les bloquant permettraient de jouer sur deux fronts de la vascularisation tumorale [Stacker et al., 2014]. A ce jour, deux anticorps monoclonaux ciblant le VEGF-C (VGX-100) et le VEGFR-3 (IMC-3C5) sont en phase 1 d'essai clinique pour étudier leur activité anti-lymphangiogénique (table 3.4). L'étude sur le VGX-100 étant encore en cours, les résultats ne sont pas connus [Dieterich and Detmar, 2016]. L'étude sur l'IMC-3C5 est finie et démontre une bonne tolérance du traitement mais un effet anti-tumoral limité dans le cancer colorectal [Saif et al., 2016]. Malgré le peu d'éléments connus sur l'efficacité de ces traitements, certaines réticences ont déjà été émises sur la trop grande spécificité de ces drogues. Le VGX-100 ne cible que le VEGF-C et n'empêche donc aucune activité pro-lymphangiogénique du VEGF-D. Pour ce qui est de l'IMC-3C5, il bloque effectivement la signalisation du VEGF-C et du VEGF-D par le VEGFR-3. Cependant, le VEGF-C possède également une activité pro-lymphangiogénique *via* le VEGFR-2 qui n'est pas évitée. D'autres molécules sont en cours d'étude pour bloquer ces axes, comme un récepteur soluble afin de piéger les deux ligands (table 3.4). [Dieterich and Detmar, 2016].

TABLE 3.4 – Anti-lymphangiogéniques en cours d'évaluation clinique.
Liste non exhausitive. D'après [Stacker et al., 2014] et [Dieterich and Detmar, 2016].

Molécule	**Type d'inhibiteur**	**Cible**	**Stade essai clinique**
VGX-100	Anticorps	VEGF-C	Phase 1 (en cours)
cVE199	Anticorps	VEGF-D	Préclinique
VGX-300	Récepteur soluble	VEGF-C/D	Préclinique
IMC-3C5	Anticorps	VEGFR-3	Phase 1 (terminée)
AMG337	Petite molécule	c-MET	Phases 1 et 2 (en cours)
Capmatinib	Petite molécule	c-MET	Phase 2 (en cours)
Ficlatuzumab	Anticorps	HGF	Phase 1 (en cours)
Rilotumumab	Anticorps	HGF	Phase 3 (terminée)
Trebananib	Anticorps	Ang1/2	Phases 2 et 3 (en cours)
AMG780	Anticorps	Ang1/2	Phase 1 (en cours)
ARRY-614	Petite molécule	Tie-2	Phase 1 (terminée)

D'autres voies de signalisation impliquées à la fois dans l'angiogenèse et la lymphangiogenèse sont également prises pour cible dans le cadre de ces traitements. Parmi les principales, la voie Ang/Tie-2 et la voie HGF/c-MET (table 3.4) [Dieterich and Detmar, 2016].

Les traitements anti-inflammatoires sont également étudiés comme potentiels ALs puisque l'inflammation est un facteur important de l'initiation de la lymphangiogenèse tumorale. A ce jour, les premières études sur modèles animaux démontrent un effet anti-lymphangiogénique de plusieurs anti-inflammatoires non stéroïdiens notamment *via* une inhibition de la sécrétion de VEGF-C par les cellules tumorales et les cellules du système immunitaire [Dieterich and Detmar, 2016].

Partie 4

La famille des BMPs

La famille des BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) constitue le sous-groupe le plus important de la super-famille du TGF-β, avec plus d'une douzaine de BMPs identifiés sur les 33 peptides dimériques (figure 4.1). Plusieurs groupes ayant travaillé à leur identification, les BMPs peuvent posséder plusieurs noms comme BMP9 qui est aussi connu en tant que GDF2 (figure 4.1) [Katagiri and Watabe, 2016].

Les BMPs sont à l'origine de la très conservée super-famille du TGF-β [Hinck, 2012]. Ils partagent des caractéristiques fondamentales avec les autres membres de la super-famille, mais la complexité de la régulation de leur signalisation est bien plus importante [Bragdon et al., 2011]. Leur classification repose sur leurs homologies de structure. Quatre groupes principaux ont ainsi été définis : le groupe BMP2/4, le groupe BMP5/6/7/8A/8B, le groupe BMP9/10 et le groupe BMP12/13/14 (figure 4.1) [Katagiri and Watabe, 2016].

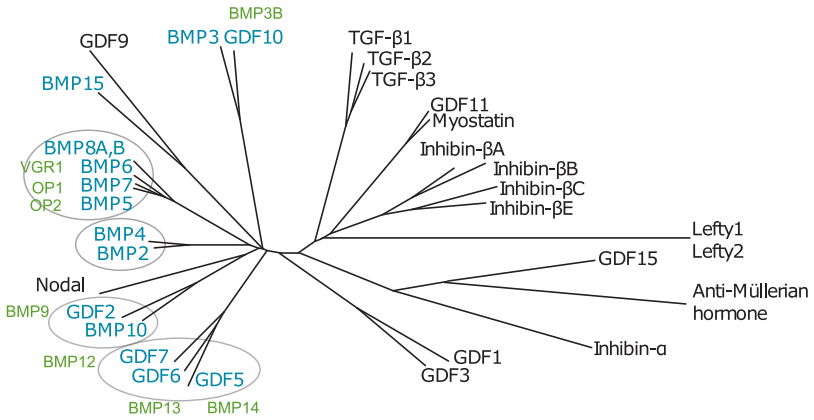


FIGURE 4.1 – Arbre phylogénétique de la super-famille du TGF-β.
Basé sur l'alignement de la séquence en acides aminés. Membres de la famille des BMPs en bleu. Dénominations alternatives en vert. Adapté de [Shi et al., 2011].

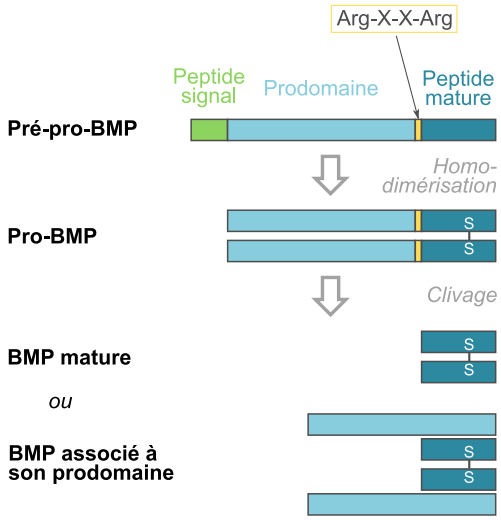


FIGURE 4.2 – Synthèse et maturation des BMPs.

4.1 Les ligands

Les BMPs sont synthétisés sous forme de grands précurseurs (pré-pro-protéines) d'environ 400 à 500 acides aminés. Ils sont composés d'un peptide signal et d'un pro-domaine (essentiel au bon repliement de la protéine mature) à l'extrémité N-terminale et d'un peptide mature à l'extrémité C-terminale. Une zone de clivage caractérisée par un motif Arg-X-X-Arg est située entre le pro-domaine et le peptide mature (figure 4.2) [Bragdon et al., 2011]. Le peptide signal guide les précurseurs dans l'appareil de Golgi où ils sont dimérisés *via* des ponts disulfures et où ils peuvent également être glycosylés. La dimérisation se fait dans la majorité des cas entre deux monomères identiques, mais il existe des cas d'hétérodimérisation formant du BMP2/5, BMP2/6 ou encore du BMP2/7 [Sieber et al., 2009]. Notre équipe a également mis en évidence l'existence d'un hétérodimère BMP9/10 *in vitro* et *in vivo* (article soumis, cf. Annexe p.225). Une fois dimérisés, les pro-BMPs sont clivées par des sérine endoprotéases. Le clivage permet l'obtention d'un BMP mature d'une centaine d'acides aminés [Carreira et al., 2014] actif qui est ensuite secrété (figure 4.2). Dans certains cas, le pro-domaine reste associé à la forme mature de façon non covalente lors de la sécrétion (figure 4.2). Tous les BMPs sauf BMP2 et BMP4 sont capables d'être secrétés sous cette forme. Les pro-domaines des BMPs possédent une affinité forte pour la MEC. Il est donc possible que les formes actives solubles soient destinées à la diffusion tandis que les formes complexées de façon stable avec les pro-domaines soient stockées dans la MEC [Bragdon et al., 2011]. Cependant, le pro-domaine ne confère pas obligatoirement de latence aux BMPs comme c'est le cas pour le TGF-β et des formes complexées peuvent être circulantes et actives [Goumans et al., 2017].

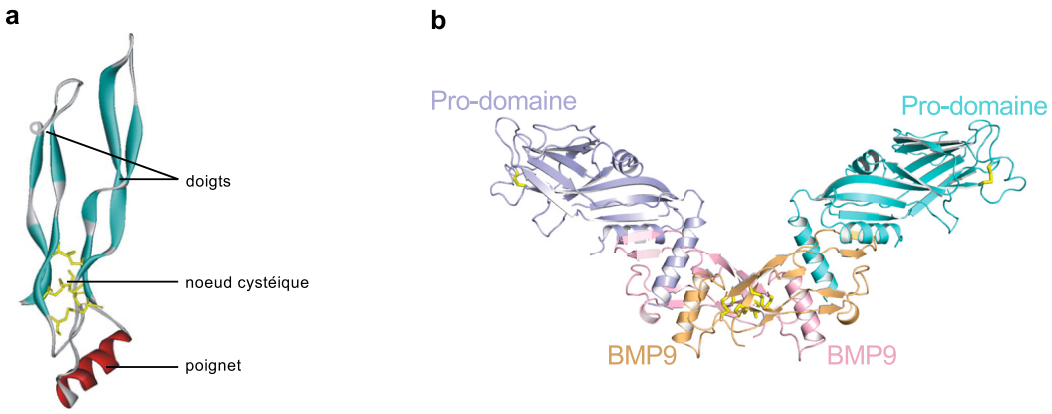


FIGURE 4.3 – Structure des BMPs : exemple de BMP7 et BMP9.
a. Structure d'un monomère mature de BMP7. Bleu : feuillets β. Rouge : hélices α. Jaune : nœeud cystéique. D'après [Rider and Mulloy, 2010] b. Structure d'un homodimère de BMP9 associé aux pro-domaines. Orange et rose : monomères matures. Violet et vert : pro-domaines. Jaune : ponts disulfures. D'après [Mi et al., 2015].

Les monomères matures des BMPs possèdent tous une structure commune. Ils sont organisés autour de sept cystéines. Six d'entre elles sont impliquées dans trois ponts disulfures intra-chaîne formant le nœud cystéique essentiel à la structure du monomère. La septième cystéine permet la liaison avec le second monomère grâce à un pont disulfure inter-chaînes [Bragdon et al., 2011]. Deux longues séquences en feuillets β entre les cystéines 1 et 2 et les cystéines 5 et 6 forment des structures dites en doigts à l'opposé des extrémités N- et C-terminales. La séquence entre les cystéines 3 et 4 est formée par une boucle de taille variable en hélice α. Avec le nœud cystéique, elle forme une structure dite de poignet (figure 4.3.a). La liaison entre les deux monomères s'effectue au niveau du poignet (figure 4.3.b) [Rider and Mulloy, 2010].

Lors de l'embryogenèse, la majorité des BMPs est exprimée dans de nombreux tissus. A la naissance, l'expression de plusieurs membres est restreinte à des tissus spécifiques. Par exemple, les os sont une source importante de BMPs (BMP3, BMP4, BMP6) qui sont aussi exprimés de façon importante dans les poumons. L'expression de BMP7 est très abondante dans les reins [Katagiri and Watabe, 2016]. BMP4, BMP6, BMP9 et BMP10 ont été détectés dans la circulation sanguine [Goumans et al., 2017]. Ainsi, les BMPs sont capables d'agir de façon locale mais aussi systémique [Katagiri and Watabe, 2016].

4.2 Les voies de signalisations

La cascade de signalisation des BMPs est initiée par la liaison d'un dimère de BMP à un complexe hétéro-tétramérique de récepteurs transmembranaires de type I et de type

II à activité sérine/thréonine kinase. Leur activation peut conduire à deux voies de signalisations différentes : Smad-dépendante ou Smad-indépendante. Sept récepteurs de type I - Activin receptor-Like Kinase (ALK) 1 à 7 - et cinq récepteurs de type II - TGFβR-2, BMPRII, Activin type II Receptor A (ActRIIA), ActRIIB, AMH type II receptor (AMH-RII) - ont été identifiés en tant que récepteurs de la famille du TGF-β. La diversité de la cascade de signalisation est permise par différentes combinaisons de récepteurs et de ligands.

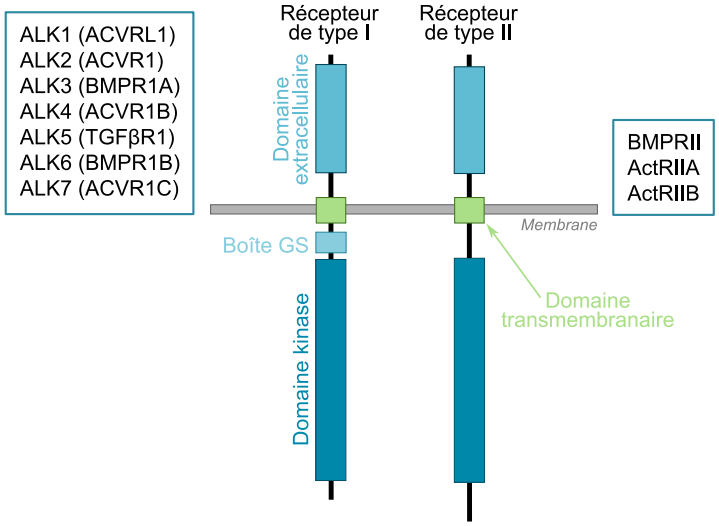


FIGURE 4.4 – Structure des récepteurs de types I et II des BMPs.
Réalisé à partir de [Mueller and Nickel, 2012].

4.2.1 Les récepteurs

Il existe trois sous-groupes de récepteurs de type I : le groupe ALK1 (ALK1/2), le groupe BMPR (ALK3/6) et le groupe TGFβR (ALK4/5/7). Les deux premiers groupes servent de récepteurs de type I principaux pour les BMPs. ALK2 et ALK3 sont exprimés à la surface de nombreuses cellules différentes tandis qu'ALK1 est exprimé spécifiquement à la surface des cellules endothéliales et de certaines autres cellules. Les BMPs ne se lient qu'à trois des cinq récepteurs de type II de la famille des récepteurs du TGFβ : BMPRII, ActRIIA et ActRIIB. BMPRII est spécifique des BMPs mais les ActR sont partagés avec d'autres membres de la famille du TGFβ [Katagiri and Watabe, 2016].

Les récepteurs de types I et II sont composés d'un domaine extra-cellulaire de liaison au ligand, d'un domaine transmembranaire, et d'un domaine intracellulaire comportant un domaine à activité sérine/thréonine kinase (figure 4.4). Les récepteurs de type I possèdent deux domaines additionnels : une boîte GS précédant le domaine à activité kinase et une

petite région de 8 acides aminés, la boucle L45, dans le domaine kinase, responsable de la reconnaissance des Smads [Sieber et al., 2009].

La transduction du signal s'effectue par la liaison d'un BMP à son complexe de récepteurs. Dans la majorité des cas, la liaison initiale s'effectue entre le ligand et un monomère ou un dimère de récepteur(s) de type I pour lesquels les BMPs ont, en général, plus d'affinité. La liaison initiale avec un monomère de récepteur nécessite de plus fortes concentrations de BMPs et le recrutement d'un second monomère pour former le complexe de signalisation. Par la suite, les BMPs recrutent les récepteurs de type II. Le récepteur avec lequel chaque BMP spécifique interagit est dépendant de leur affinité (table 4.1) ainsi que de la disponibilité du récepteur [Bragdon et al., 2011].

TABLE 4.1 – Associations connues entre BMPs et récepteurs de types I et II.
D'après [Ren and Dijke, 2017].

Ligands	**Récepteurs de type I**	**Récepteurs de type II**
BMP2	ALK3	BMPRII
BMP4	ALK6	ActRIIA
		ActRIIB
BMP5	ALK2	BMPRII
BMP6	ALK3	ActRIIA
BMP7	ALK6	ActRIIB
BMP8		
BMP9	ALK1	BMPRII
BMP10	ALK2 (BMP9)	ActRIIA
	ALK3 (BMP10)	ActRIIB
BMP12	ALK3	BMPRII
BMP13	ALK6	ActRIIA
BMP14		ActRIIB

Les récepteurs de type II - dont la kinase est constitutivement active - phosphorylent des résidus sérine et thréonine de la boîte GS des récepteurs de type I lors de liaison du ligand. Cette transphosphorylation active les récepteurs de type I qui peuvent à leur tour activer, en les phosphorylant, les premiers acteurs des voies de signalisation en aval [Katagiri and Watabe, 2016].

4.2.2 Signalisation Smad-dépendante

La voie de signalisation la mieux connue des BMPs est la voie canonique, autrement appelée voie Smad-dépendante. Huit protéines Smad (Smad1 à 8) ont été identifiées chez

les mammifères. Elles sont réparties en trois classes en fonction de leur activité : les Smads régulatrices ou R-Smads (Smad1 à 3, Smad5 et Smad8), les Smads inhibitrices ou I-Smad (Smad6 et 7) et la Smad médiatrice ou Co-Smad (Smad4) [Sieber et al., 2009]. Les Smads sont composées de deux domaines principaux très conservés : le domaine MH1 (Mad Homology) à l'extrémité N-terminale et le domaine MH2 à l'extrémité C-terminale. Ces deux domaines sont reliés par une région très variable. Le domaine MH2 est présent dans les trois classes de Smads alors que le domaine MH1 n'a été conservé que dans les R-Smads et la Co-Smad. Les R-Smads possèdent un motif SSXS caractéristique à l'extrémité C-terminale qui peut être phosphorylé par un récepteur de type I. Le domaine MH2 est responsable de l'interaction avec les récepteurs, de le formation d'oligomères avec d'autres Smads, des interactions avec diverses protéines de liaison à l'ADN et de l'activation transcriptionnelle des Smads. Le domaine MH1 est reponsable de la liaison à l'ADN, d'interactions avec certaines protéines de liaison à l'ADN, de la translocation nucléaire et, de façon très importante, de la répression des fonctions du domaine MH2. En effet, en absence d'activation par un récepteur, les deux domaines se lient entre eux afin de supprimer toute fonction de l'un et de l'autre [Miyazono et al., 2010].

L'activation des récepteurs de type I suite à la formation du complexe de signalisation induit le recrutement des R-Smads spécifiques des BMPs : les Smads1,5,8. BMP9 a également été décrit pour activer Smad2 qui est normalement associé à la signalisation du TGFβ [Goumans et al., 2017]. Une fois les R-Smads phosphorylées par les récepteurs de type I au niveau de leurs motifs SSXS, elles s'associent à Smad4 pour former un complexe composé de deux R-Smads et d'une Co-Smad. Ainsi, elles peuvent transloquer dans le noyau où elles s'associent avec divers co-activateurs ou co-répresseurs transcriptionnels [Katagiri and Watabe, 2016]. L'ensemble du complexe se lie ensuite à l'ADN au niveau de SBEs (Smad Binding Elements, séquences AGAC ou GTCT) afin de réguler la transcription de divers gènes cibles (figure 4.5) [Miyazono et al., 2010].

Les gènes ciblés par la signalisation des BMPs peuvent être classés dans plusieurs catégories. Les gènes à réponse immédiate ou rapide dans lesquels se trouvent les gènes codant pour les inhibiteurs de différenciation ou de liaison à l'ADN Id1 à 3, pour Smad6 et Smad7, et Snail par exemple. Les gènes à réponse tardive comprennent notamment les gènes codant pour des facteurs de transcriptions, Hey1 et Tcf7, régulant les voies de signalisation Notch et Wnt [Miyazono et al., 2010].

Les I-Smads sont des inhibiteurs de cette voie de signalisation. Leur action sera détaillée dans la partie relative aux moyens de modulation de la signalisation des BMPs (partie 4.2.4 p.90).

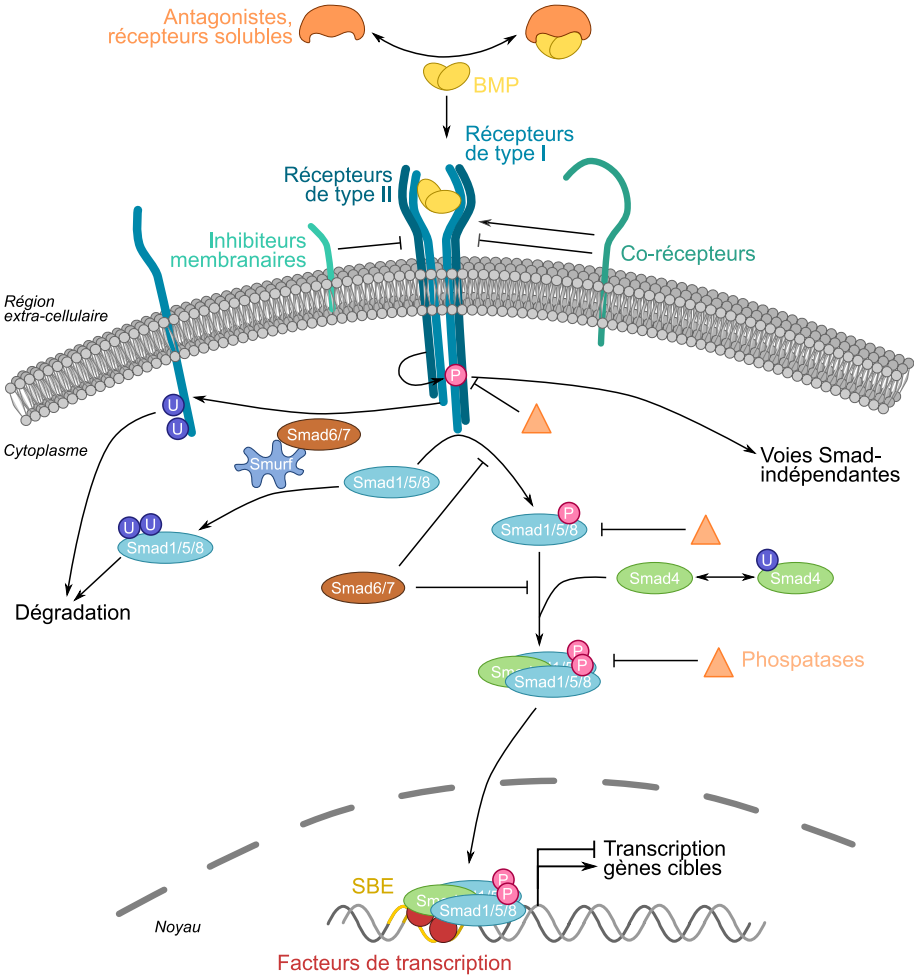


FIGURE 4.5 – Voies de signalisations des BMPs et leurs régulations.
Les interactions avec d'autres voies de signalisation ne sont pas représentées. Réalisé à partir de [Katagiri and Watabe, 2016] et [Ren and Dijke, 2017].

4.2.3 Signalisation Smad-indépendante

L'assemblage du complexe de signalisation et l'activation des récepteurs de type I peut également mener à plusieurs voies de signalisation Smad-indépendantes. Les BMPs ont notamment été décrits pour activer la voie des MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinases), la voie de p38, la voie de JNK (c-Jun amino-terminal Kinase), la voie PI3K/AKT et la voie des petites GTPases. L'ensemble de ces voies Smad-indépendantes coopèrent avec la voie Smad-dépendante afin de réguler la réponse cellulaire [Katagiri and Watabe, 2016].

Les mécanismes permettant l'activation des voies de signalisation Smad-indépendantes sont encore mal connus. Il est possible que l'activation de certaines voies (JNK, MAPK, p38) soit réalisée grâce à l'intervention de BRAM1 (BMP Receptor Associated Molecule 1) et de XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein) qui permettraient d'associer les

récepteurs de type I activés avec le complexe TAK1 (TGFβ Activated Kinase 1) TAB1 (TAK1 Bindind protein) [Bragdon et al., 2011]. Une autre hypothèse est que la voie de signalisation est dépendante du mode d'endocytose du complexe de signalisation. L'internalisation des récepteurs par les puits de clathrine favoriserait la voie Smad-dépendante tandis que l'endocytose au niveau des radeaux lipidiques par les calvéoles privilégierait les voies Smad-indépendantes [Sieber et al., 2009].

4.2.4 Modulations de la signalisation

La signalisation des BMPs est régulée à plusieurs niveaux : au niveau extra-cellulaire par la présence de protéines capables de se lier aux ligands pour en bloquer ou augmenter l'activité, au niveau membranaire grâce à l'activité de co-récepteurs et de pseudo-récepteurs, et au niveau intracellulaire *via* de nombreuses interactions protéiques.

Régulations extra-cellulaires

A l'extérieur de la cellule, des antagonistes peuvent se lier aux BMPs et empêcher leur association avec les récepteurs. Comme les BMPs, ces protéines sont des homodimères possédant un nœud cystéique qui stabilise leur structure. Il existe trois familles d'antagonistes de la signalisation des BMPs : la famille noggine/chordine, la famille DAN/cerberus et le Tsg (Twisted gastrulation) [Sieber et al., 2009]. L'expression de certains antagonistes comme noggine et gremlin (famille DAN/Cerberus) est augmentée par la signalisation des BMPs de manière à établir une boucle de rétro-contrôle négatif [Katagiri and Watabe, 2016]. Toutes ces protéines possèdent une affinité variable pour les différents BMPs. Par exemple, la chordine inhibe l'activité de BMP2, BMP4 et BMP7 tandis que noggine bloque l'activité de BMP5, BMP6, BMP13 et BMP14 en plus [Bragdon et al., 2011]. La signalisation des BMPs peut également être inhibée par la présence de récepteurs solubles qui peuvent les séquestrer et les empêcher de se lier aux récepteurs transmembranaires (figure 4.5) [Ren and Dijke, 2017].

Il existe également des potentialisateurs extra-cellulaires de la signalisation des BMPs. BMP1 est une métalloprotéinase clivant les pro-collagènes ce qui lui permet de libérer les BMPs associées à la chordine par exemple. La KCP (Kielin/Chordin-like Protein) est, elle, capable de se lier directement aux BMPs pour augmenter la signalisation de façon paracrine. Le signal induit par les BMPs peut également être potentialisé par la présence de polysaccharides sulfatés comme l'héparine. Certains antagonistes comme la BMPER (Crossveinless-2, famille de la chordine) et Tsg peuvent également agir comme agoniste du signal en fonction du contexte et des concentrations de chaque protéine [Katagiri and Watabe, 2016].

TABLE 4.2 – Affinité et activité des co-récepteurs des BMPs.
D'après [Lowery and de Caestecker, 2010].

Récepteur	**Partenaire(s)**	**Activité**
Endogline	BMP2, BMP7, BMP9	Activateur
Betaglycan	BMP2, BMP4, BMP7, BMP14	Activateur
RGMa	BMP2, BMP4, BMP12	Activateur
DRAGON	BMP2, BMP4, BMP12	Activateur
RGMc	BMP2, BMP4, BMP6, BMP12	Activateur
BAMBI	ALK1, ALK3, ALK6, ActRIIA	Inhibiteur
Ror2	BMPRII	Inhibiteur
TrkC	ALK6	Inhibiteur

Régulations à la membrane

Les BMPs possèdent des co-récepteurs qui régulent leur signalisation (figure 4.5). Les RGM (Repulsive Guidance Molecules) a, b (aussi appelée DRAGON) et c, le récepteur à activité tyrosine kinase c-Kit ainsi que l'endogline et le betaglycan potentialisent les effets de la formation du complexe de signalisation en fonction de leur affinité pour les BMPs et leurs récepteurs (table 4.2). L'activité de ces co-récepteurs est tissu-spécifique [Sieber et al., 2009]. Par exemple, l'endogline - principalement exprimée à la surface des cellules endothéliales - et le betaglycan - expression ubiquitaire - sont impliqués dans le développement vasculaire [Lowery and de Caestecker, 2010].

Certains co-récepteurs peuvent également avoir une activité inhibitrice de la signalisation des BMPs. Par exemple, l'endogline et le betaglycan peuvent subir un clivage protéolytique et être relargués dans l'espace extra-cellulaire pour agir comme pièges à ligands. De la membrane, ils sont également capable d'inhiber l'interaction entre les BMPs et les récepteurs en séquestrant les BMPs dans des complexes inactifs avec l'inhibine [Lowery and de Caestecker, 2010]. L'activité de l'endogline dépend notamment de sa concentration à la surface de la cellule, ainsi que de celles des ligands et des récepteurs [Goumans et al., 2017]. Des récepteurs leurres sont aussi responsables de l'inhibition de la signalisation des BMPs (figure 4.5) comme la protéine membranaire BAMBI et les récepteurs à activité tyrosine kinase Ror2 et TskC (table 4.2). Par exemple, BAMBI agit en remplaçant les récepteurs de type I dans les complexes de signalisation [Sieber et al., 2009].

Régulations intracellulaires

La signalisation des BMPs est également régulée grâce à plusieurs facteurs intracellulaires et à des interactions avec d'autres voies de signalisation. Ces régulations intracellu-

laires sont importantes pour contrôler l'intensité et la durée du signal.

La signalisation peut être inhibée en intracellulaire dès le niveau des récepteurs. En effet, ces derniers peuvent être déphosphorylés par des phosphatases ou entrer en interaction avec les I-Smads qui bloqueront toute liaison des R-Smads et donc toute transmission du signal. Les I-Smads peuvent également recruter des E3 ubiquitine ligases (Smurf1, Smurf2 ou NEDD4-2) qui vont induire la dégradation des récepteurs par le protéasome *via* leur ubiquitination (figure 4.5) [Miyazono et al., 2010].

Au niveau des Smads, les I-Smads peuvent entrer en compétitions avec les R-Smads pour former des complexes inactifs avec Smad4. Les R-Smads peuvent également être déphosphorylées par des phosphatases, les rendant inactives. L'activité de Smad4 est aussi contrôlée : son ubiquitination empêche toute liaison avec les autres Smads, et sa désubiquitination réhabilite ses capacités à participer à la signalisation. Enfin, des ubiquitine ligases peuvent induire l'ubiquitination des R-Smads et donc leur dégradation par le protéasome (figure 4.5) [Miyazono et al., 2010].

Pour finir, il existe aussi des régulations nucléaires de la signalisation des BMPs. Les I-Smads peuvent se lier avec le SBE et induire une déstructuration du complexe R-Smads/Co-Smad [Miyazono et al., 2010]. De plus, les différents facteurs de transcription s'associant avec ce complexe peuvent moduler la réponse cellulaire. Il est d'ailleurs important de noter que la plupart des inhibiteurs de la signalisation des BMPs sont des cibles de cette même signalisation, formant ainsi une boucle de rétro-contrôle négatif permettant de limiter le signal dans le temps [Katagiri and Watabe, 2016].

4.3 Fonctions physiologiques

Bien qu'originellement décrits comme facteurs de croissances impliqués dans la formation ectopique d'os, les BMPs sont des cytokines multi-fonctionnelles. Ils sont impliqués à la fois dans le développement embryonnaire et dans l'homéostasie à l'âge adulte [Katagiri and Watabe, 2016].

4.3.1 Fonctions principales lors de l'embryogenèse

Les BMPs possèdent plusieurs rôles importants lors de l'embryogenèse. Le premier est l'établissement de l'axe dorso-ventral de la blastula et de la gastrula. Un gradient de la signalisation des BMPs est établi par l'expression de BMPs (BMP4, BMP7) côté ventral et l'expression d'antagonistes des BMPs (noggine, chordine) côté dorsal. Ce gradient est

essentiel à l'orientation du fœtus et à la formation des feuillets embryonnaires (figure 4.6) [Sieber et al., 2009][Zinski et al., 2017].

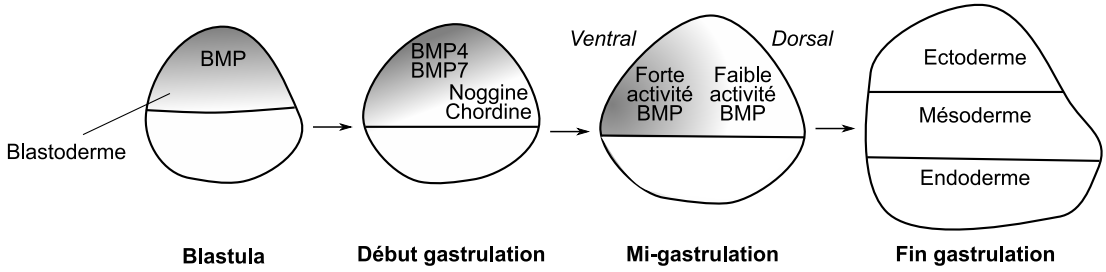


FIGURE 4.6 – BMPs et établissement de l'axe dorso-ventral lors de la gastrulation. D'après [Sieber et al., 2009].

Au cours de l'embryogenèse précoce, les BMPs sont également impliqués dans l'organisation du système nerveux. L'inhibition de leur signalisation est essentielle à la formation de la plaque neurale après la gastrulation. Ensuite, lors de l'organisation du système nerveux, l'activation et l'inhibition de leur signalisation de façon spatio-temporelle est essentielle à la formation du tube neural. Plus tard, lors du développement cérébral, les BMPs sont responsables du guidage et de la migration des axones [Meyers and Kessler, 2017].

Les BMPs sont évidemment impliqués dans le développement du squelette. Ils possèdent une activité ostéogénique permettant la formation de cartilage et d'os. Ils sont nécessaires à la différenciation des cellules mésenchymateuses en ostéoblastes et en chondrocytes lors des phénomènes d'ossification endochondrale et intramembranaire [Katagiri and Watabe, 2016]. Leur action est notamment dépendante de leur concentration et de l'étape du développement : BMP2 induit la formation de cartilage à E7 et la formation d'os à E12.5 [Wang et al., 1990]. Des anomalies du squelette ont été remarquées en cas de mutations des gènes codant pour les BMPs chez l'Homme et la souris [Katagiri and Watabe, 2016]. Par exemple, les souris invalidées pour *Bmp7* présentent des défauts osseux au niveau de la cage thoracique, du crâne et des pattes arrières [Luo et al., 1995]. A l'heure actuelle, BMP2 est utilisé en clinique pour son activité ostéogénique [Chen et al., 2004a].

Le développement cardiaque est aussi dépendant de l'activité des BMPs. La différenciation de cellules souches pluripotentes dans le lignage cardiaque est régulée partiellement par les BMPs et notamment par le contrôle spatio-temporel exercé par la collaboration entre BMP4 et FGF2 qui est critique pour la différenciation terminale des cardiomyocytes. BMP2 est exprimé dans le croissant cardiaque puis dans le canal atrioventriculaire avec BMP4/5/6/7 lors de la formation du cœur [Bernardo et al., 2011]. BMP10 est exprimé

dans le ventricule trabéculaire lors de la croissance et de la maturation des ventricules. Les souris invalidées pour *Bmp2* ou *Bmp10* meurent précocement de défauts cardiaques ou de l'absence de développement du cœur [Ma et al., 2005][Chen et al., 2004b]. De minces fluctuations des niveaux d'expression de BMP10 peuvent également générer des anomalies de développement du trabécule ou de maturation du mur ventriculaire. L'ensemble de ces observations démontre l'implication importante des BMPs dans le développement cardiaque [Morrell et al., 2016].

Les BMPs sont impliqués dans de nombreux autres aspects du développement embryonnaire tels que l'hématopoïèse, le développement vasculaire (cf. partie 4.3.3 p.94) le développement des muscles squelettiques, des dents, des follicules pileux ou encore des reins [Katagiri and Watabe, 2016].

4.3.2 Fonctions principales à l'âge adulte

Les BMPs possèdent aussi des rôles dans le fonctionnement de l'organisme adulte. Ils sont notamment important dans l'angiogenèse et la quiescence vasculaire (cf. partie 4.3.3 p.94).

Les BMPs et notamment BMP2, BMP4 et BMP7, sont impliqués dans l'adipogénèse. Ils permettent la différenciation de plusieurs progéniteurs en pré-adipocytes et la maturation des pré-adipocytes en adipocytes matures. Afin d'éviter la maturation, les pré-adipocytes sécrètent d'ailleurs l'antagoniste des BMPs gremlin. BMP7 et BMP8A sont également impliqué dans la formation et le maintien du tissu adipeux brun [Katagiri and Watabe, 2016].

L'homéostasie du fer est régulée par l'activité des BMPs. BMP2, BMP4 et BMP9 permettent d'augmenter l'expression de l'hepcidine - l'hormone responsable de l'homéostasie du fer - par les hépatocytes. Smad4 a également été démontré comme étant un régulateur positif de l'hepcidine dans le foie [Wang et al., 2005]. Les souris invalidées pour *Bmp6* ou *Smad4* développent d'ailleurs une surcharge de fer pouvant aller jusqu'à l'hémochromatose, démontrant l'importance des BMPs dans l'homéostasie du foie [Katagiri and Watabe, 2016].

4.3.3 Fonctions vasculaires

L'importance des BMPs dans la formation et le maintien du système vasculaire est connu depuis des années grâce à des observations à la fois cliniques et expérimentales. Des mutations génétiques à différents niveaux de la signalisation des BMPs ont pour

conséquence le développement de maladies vasculaires héréditaires : la maladie de Rendu-Osler-Weber (ou Hémorragie Télangiectasique Héréditaire) et HTAP (HyperTension Artérielle Pulmonaire). La maladie de Rendu-Olser-Weber peut être causée par des mutations des gènes codants pour ALK1 (*Acvrl1*) [Johnson et al., 1996] ou l'endogline (*Eng*) [McAllister et al., 1994]. L'HTAP familiale est principalement associée à des mutations du gène codant pour le récepteur de type II BMPRII [Lane et al., 2000][Deng et al., 2000]. Des mutations de *Acvrl1* [Harrison et al., 2003] ou de *Eng* [Machado et al., 2009] ont également été identifiées mais elles sont plus rares. Des phénotypes vasculaires importants ont également été détectés dans des modèles expérimentaux altérés à différents niveaux de la signalisation BMP [Morrell et al., 2016][Goumans et al., 2017]. Les principaux défauts vasculaires associés à une signalisation des BMPs défectueuse sont résumés dans la figure 4.7. BMP9 est le ligand ayant les fonctions vasculaires les plus importantes au sein des BMPs. Ses fonctions, ainsi que celles de BMP10 seront détaillées dans la section leur étant dédiée (partie 4.5.2 p.105).

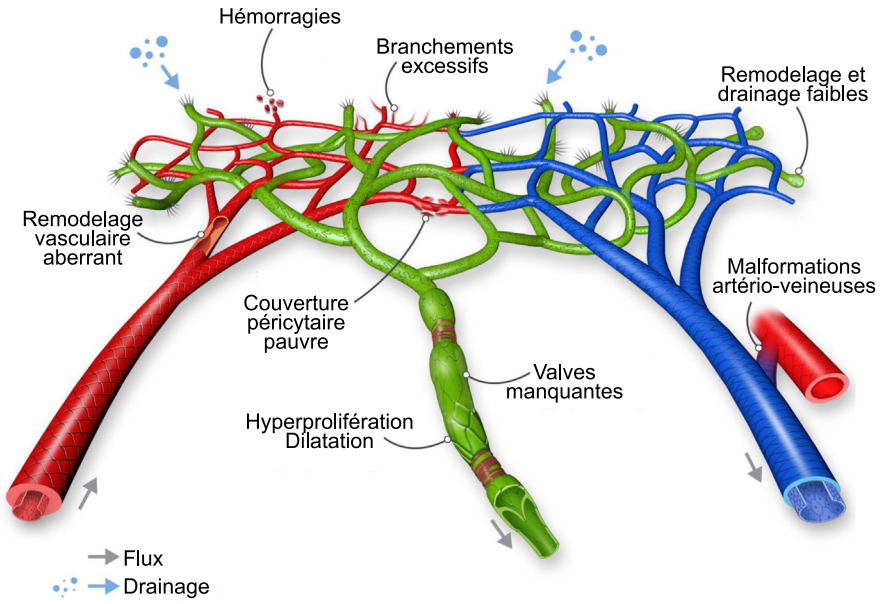


FIGURE 4.7 – Principaux défauts vasculaires associés à une signalisation BMP défectueuse. D'après [García de Vinuesa et al., 2016].

Fonctions vasculaires sanguines

Les rôles vasculaires des BMPs commencent dès l'embryogenèse. En effet, les souris déficientes pour *Eng*, *Acvrl1* ou *Smad5* meurent toutes au stade embryonnaire (vers E11.5) à cause de défauts vasculaires importants [Goumans et al., 2017] tels que l'absence de couverture péricytaire (*Eng*-KO) [Li et al., 1999][Arthur et al., 2000], des mal-

formations artério-veineuses (AVM) et des vaisseaux dilatés (*Acvrl1*-KO) [Oh et al., 2000] [Urness et al., 2000]. BMP2 et BMP4 sont notamment nécessaires pour la formation des veines caudale et axiale [Dyer et al., 2014]. L'expression de BMP2 et de ses récepteurs est restreinte aux veines et permet d'initier la morphogenèse des vaisseaux sans que les artères dorsales voisines ne répondent [Wiley et al., 2011].

Le flux sanguin est un paramètre important de l'homéostasie vasculaire sanguine. En effet, des perturbations de ce flux entraînent une réponse des cellules endothéliales et des VSMCs dans laquelle sont impliquées les BMPs. En cas de flux normal, l'expression d'ALK1 est induite, traduisant là une fonction de quiescence vasculaire du récepteur. En cas de présence de forces de cisaillement laminaires ou oscillatoires dues à un flux altéré, BMP4 peut augmenter l'expression des molécules d'adhésion pour maintenir la cohésion vasculaire. BMP2, au contraire de BMP4, n'agit pas en réponse au stress induit par des forces de cisaillement, mais est capable d'induire des réponses inflammatoires [García de Vinuesa et al., 2016].

Les BMPs peuvent promouvoir l'angiogenèse en induisant la prolifération, la migration et la motilité endothéliale. BMP2, BMP4, BMP6 et BMP7 ont été décrits pour avoir des effets pro-angiogéniques *in vitro* et *in vivo* sur différents types de cellules endothéliales (HUVECs, BAECs). BMP4 promeut la prolifération et la migration des cellules endothéliales *via* la stimulation des voies de signalisation du VEGF-A et de Ang1 [Suzuki et al., 2008]tandis que BMP7 agit sur les niveaux d'expression de VEGFR2 [Akiyama et al., 2014]. Cependant, le niveau d'expression du ligand est crucial pour la régulation de l'angiogenèse. En effet, des souris transgéniques sur-exprimant BMP4 dans la rétine présentent un angiogenèse réduite dans le modèle de la néo-vascularisation choroïdienne [Dyer et al., 2014][García de Vinuesa et al., 2016].

Les fonctions des BMPs dans l'angiogenèse sont finement régulées par leurs antagonistes, notamment BMPER et Tsg. Leur activité est dépendante de la dose et du contexte. Par exemple, une faible concentration de BMPER induit le bourgeonnement des vaisseaux tandis qu'à plus fortes doses il l'inhibe [David et al., 2009]. BMPER co-régule également l'inflammation associée au stress induite par les forces de cisaillements du flux [Goumans et al., 2017].

Même si la famille des BMPs est souvent considérée comme pro-angiogénique, il est important de se souvenir que le contexte affecte l'activité pro ou anti-angiogénique des BMPs. Ces variations sont probablement dues aux différences d'expression des récepteurs et co-récepteurs des BMPs à la surface des différentes cellules endothéliales [Dyer et al., 2014].

Fonctions vasculaires lymphatiques

La signalisation des BMPs est également importante pour le développement lymphatique [García de Vinuesa et al., 2016]. En effet, l'injection d'un anticorps neutralisant dirigé contre ALK1 ou d'un ALK1 soluble dans un souriceau nouveau-né perturbe le développement lymphatique au niveau de la queue et de l'intestin. L'induction de la délétion d'*Acvrl1* - toujours dans des souriceaux nouveau-nés - induit un élargissement des vaisseaux lymphatiques dans la cornée, l'intestin et le diaphragme suggérant un rôle antiprolifératif d'ALK1 sur les LECs [Niessen et al., 2010]. BMP2 régule aussi le développement lymphatique. Il inhibe la différenciation des LECs dans deux modèles embryonnaires chez le poisson zèbre et chez la souris [Dunworth et al., 2014].

4.4 BMPs et cancer

La dérégulation de la signalisation des BMPs est impliquée dans les différents processus de carcinogenèse. Les rôles de BMPs dans ce phénomène sont encore mal compris du fait de l'identification de fonctions divergentes à la fois pro et anti-tumorales. Les BMPs peuvent influer les cellules tumorales mais aussi les cellules du MET. L'ensemble des rôles des BMPs dans le cancer semble dépendant du contexte, du tissu et des BMPs comme le démontre cette section.

4.4.1 Prédispositions génétiques

Des mutations de la signalisation des BMPs ont été identifiées comme une prédisposition au cancer colorectal. Le syndrome de la polypose juvénile (SPJ) est une maladie autosomale dominante qui prédispose à la formation de polypes gastro-intestinaux et augmente significativement le risque de développer un cancer colorectal. Dans presque 50% des cas de SPJ, les patients présentent des mutations des gènes codant pour Smad4 ou ALK3. De plus, des mutations des gènes codant pour BMPRII et Smad4 ont également été observées dans la majorité des cancers sporadiques colorectaux. Ainsi, il semble que la perte de signalisation BMP *via* Smad4 ou ALK3 dans les tissus gastro-intestinaux soit un facteur augmentant les risques de développement d'un cancer colorectal [Jiramongkolchai et al., 2016] [Katagiri and Watabe, 2016].

4.4.2 Effets directs sur la tumorigenèse et la dissémination

Les effets directs des BMPs sur les cellules tumorales sont paradoxaux. Premièrement, les BMPs peuvent avoir un rôle pro ou anti-tumoral en fonction du type de cancer. Par exemple, dans le cadre de cancer de la prostate, l'expression de BMP2, BMP4 et BMP7

est diminuée dans les cancers de stade avancé contrairement à BMP6 qui est sur-exprimé dans les tumeurs les plus agressives [Jiramongkolchai et al., 2016]. De plus, la fonction des BMPs sur la progression tumorale est également dépendante du stade du cancer. En effet, dans le cancer colorectal, l'initiation de la tumeur nécessite une diminution de la signalisation des BMPs, et notamment de BMP7, pour que les cellules épithéliales puissent se transformer. Même si seules des mutations de la voie des BMPs ne permettent pas le développement du cancer, il a été observé que la phosphorylation des Smads1/5/8 est inactivée dans 70% des cancers colorectaux. Par la suite, lors des stades avancés, la voie des BMPs est activée dans les tumeurs *via* un activation de BMPRII et la sur-expression de BMP4 et BMP7. L'activation de la signalisation des BMPs est d'ailleurs considérée comme un facteur de mauvais pronostic et d'augmentation des probabilités de métastases [Jiramongkolchai et al., 2016]. Le cancer de la prostate est également soumis à ces expressions différentielles de BMPs en fonction du stade d'avancement de la maladie : la suppression de l'expression de BMP7 dans les tumeurs primaires facilite l'apparition de métastases osseuses, métastases qui sur-expriment BMP7 [Masuda et al., 2003][Ye and Jiang, 2015].

Les BMPs influencent également le devenir des CSCs. En fonction du contexte, la signalisation BMP peut être favorable au développement des CSCs en maintenant leurs capacités fonctionnelles (prolifération autonome, résistance aux traitements, initiation de tumeurs) ou leur être défavorable en induisant leur différenciation, leur apoptose ou encore leur sensibilité aux traitements [Zhang et al., 2016b]. Par exemple, au contraire des signaux transmis par le TGF-β, la voie Smad-dépendante des BMPs induit la différenciation des CSCs du glioblastome [Ehata et al., 2013]. Dans le cas du cancer du sein, l'hyper-activation de la signalisation des BMPs accélère l'amplification de la population de CSCs [Zhang et al., 2016b].

L'EMT est aussi un paramètre sur lequel jouent les BMPs. BMP4 promeut l'EMT et par-là même l'invasion, la motilité et l'agressivité des cellules tumorales des cancers du sein et de l'ovaire *via* la dégradation des jonctions cellulaires notamment. BMP2 et BMP7 induisent également ce phénomène dans les cancers de la prostate et de l'estomac. Au contraire, BMP7 induit une transition mésenchymato-épithéliale dans les cellules de mélanome, réduisant ainsi les capacités métastatiques de ces cellules [Zhang et al., 2016b].

Le profil d'action des BMPs, de leurs récepteurs et de la signalisation intra-cellulaire peut être modifié par des hormones, des facteurs de croissance afin de coordonner le comportement des cellules cancéreuses pendant la progression de la maladie. Cela explique leurs fonctions dépendantes du cancer et de sa progression en plus de leur activité individuelle [Ye and Jiang, 2015].

4.4.3 Effets sur le micro-environnement tumoral

Les BMPs peuvent promouvoir et inhiber la progression des cancers en influant le MET. Ils jouent par exemple sur le comportement des fibroblastes. BMP4 induit l'activation des fibroblastes mammaires et donc le dépôt de MEC qui est corrélé positivement avec l'avancement de la maladie. Au contraire, BMP7 est connu pour inhiber l'activation des fibroblastes de la cornée. Les BMPs sont aussi impliqués dans l'inflammation. La perte de la signalisation des BMPs (suppression de l'expression de BMPRII) dans les fibroblastes promeut l'infiltration des cellules myéloïdes dans le MET et augmente donc l'inflammation tumorale [Pickup et al., 2017].

Les BMPs influencent également la réponse immunitaire liée à la tumeur. La stimulation BMP des cellules dendritiques activerait la réponse immunitaire adaptative en induisant l'expression d'IL-8 et de TNF-α. Elle faciliterait également la stimulation des lymphocytes T et des cellules tueuses naturelles. La signalisation des BMPs induit également la réponse immunitaire innée en activant les macrophages *via* une expression augmentée de IL-6, TNF-α et de protéines chimio-attractives pour les monocytes. Ces résultats restent préliminaires et contradictoires avec d'autres démontrant que l'utilisation d'inhibiteurs des BMPs conduisait à une augmentation globale des cellules du systèmes immunitaire [Pickup et al., 2017]. De nouvelles études doivent être menées sur le sujet, de façon plus spécifique puisque les rôles des BMPs sont dépendants de nombreux facteurs.

Les BMPs jouent un rôle important dans l'angiogenèse tumorale. De nombreuses études démontrent que les BMPs peuvent induire l'angiogenèse tumorale indirectement en augmentant l'expression de VEGF par les cellules tumorales et les ostéoblastes dans le cancer de la prostate. BMP7 promeut également l'angiogenèse tumorale en augmentant l'expression de VEGFR à la surface des cellules endothéliales [Ye and Jiang, 2015]. Les co-récepteurs des BMPs sont également impliqués. Par exemple, dans les cancers du sein et de la prostate, la sur-expression de DRAGON à la surface des cellules endothéliales, induite par l'HGF, promeut l'angiogenèse tumorale en cas de présence de BMP7. Les BMPs possèdent également des fonctions anti-angiogéniques dans le cancer. L'expression de BMP4 est diminuée dans les veinules à endothélium épais des ganglions lymphatiques de tumeurs métastatiques. De plus, BMP6 est capable d'induire l'apoptose des cellules endothéliales dans le mélanome, inhibant ainsi l'angiogenèse tumorale et conduisant à la suppression de la croissance de la tumeur [Zhang et al., 2016b]. Comme pour l'angiogenèse physiologique, la voie de BMP9 est très importante dans l'angiogenèse tumorale aux BMPs et ses fonctions seront détaillées dans la partie lui étant réservée (partie 4.5.2 p.105).

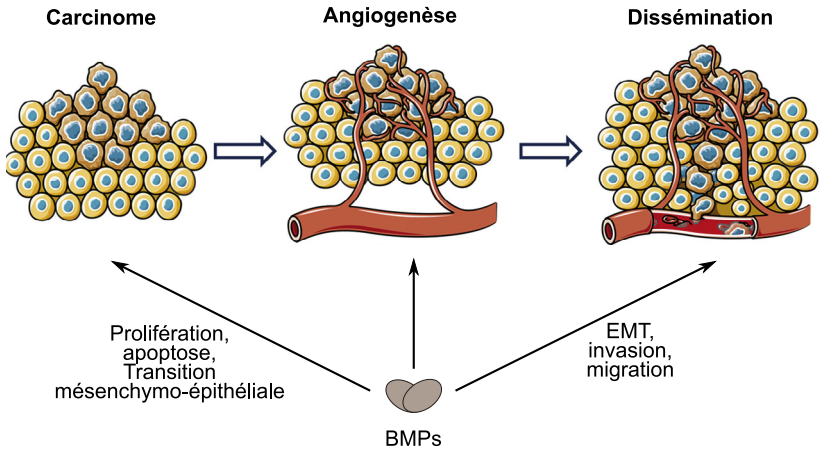


FIGURE 4.8 – Implications des BMPs dans les différentes étapes de la carcinogenèse.
Adapté de [Ye and Jiang, 2015].

4.4.4 Ciblage thérapeutique

Du fait de leur forte implication dans la carcinogenèse (figure 4.8), les BMPs sont étudiés en tant que cibles pour des traitements anti-cancéreux. En raison de leur potentiel anti-cancéreux, des inhibiteurs des ALKs sont actuellement testés comme la dorsomorphine ou ses dérivés le LDN-193189 et les DMH1/2/3. Ces derniers ont fait leurs preuves *in vitro* et *in vivo* (modèles pré-cliniques) dans plusieurs cancers comme le cancer du poumon ou du sein [Jiramongkolchai et al., 2016].

Cependant, les BMPs possèdent également des activités anti-cancéreuses. Des activateurs de la voie des BMPs pourraient également être utilisés afin de limiter la progression de certains cancers comme le glioblastome ou le cancer colorectal [Ehata et al., 2013]. L'action de BMPs recombinants est étudiée actuellement. Ainsi, le rh-BMP7 possède des effets anti-cancéreux dans les cancers à cellules squameuses de la tête et du cou et il permet d'induire l'apoptose d'ostéosarcomes [Zhang et al., 2016b].

Pour conclure, les BMPs possèdent à la fois des fonctions promouvant la tumeur et inhibant le développement tumoral. L'utilisation d'inhibiteurs ou d'activateurs de la voie des BMPs doit donc être étudiée avec de grandes précautions - ciblage de quelles BMPs, dans quel contexte - avant de développer des stratégies thérapeutiques contre les cancers.

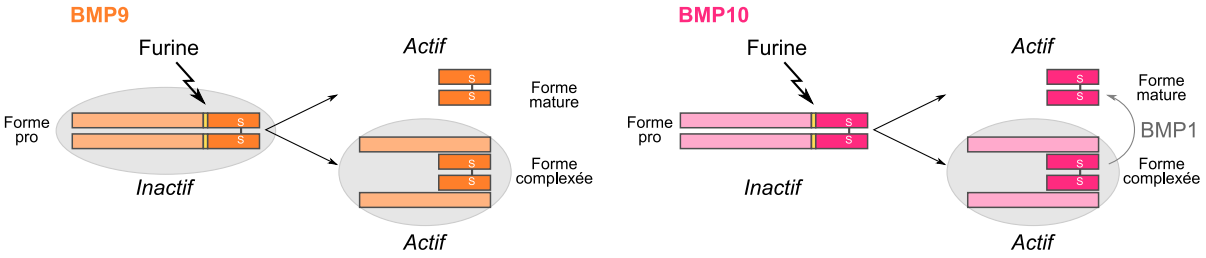


FIGURE 4.9 – Différentes formes de BMP9 et BMP10 et leurs activités.
L'activité est définie en fonction de la capacité à activer ALK1. Les formes sur fond gris correspondent au formes circulantes.

4.5 Cas particulier de BMP9 et BMP10

4.5.1 Ligands et signalisation

Structures, synthèse et formes circulantes

BMP9 et BMP10 forment un groupe de famille des BMPs du fait de leur forte homologie de séquence protéique (65% d'homologie) [David et al., 2007a].

La synthèse de BMP9 a lieu dans le foie. Deux hypothèses s'opposent quant aux cellules responsables de son expression. Notre équipe a démontré que les hépatocytes et les cellules épithéliales des canaux biliaires en sont la source principale [Bidart et al., 2012]. Cependant des travaux plus récents ont démontré que les cellules stellaires en seraient plutôt la source [Breitkopf-Heinlein et al., 2017]. De récentes expériences dans notre équipe (article soumis, cf. Annexe p.225) utilisant la technique du RNA-Scope confirment cette dernière hypothèse chez la souris. Le BMP9 est synthétisé sous la forme d'une pro-protéine qui est clivée par la furine pour obtenir une forme mature de 25kDa ou une forme complexée au prodomaine de 100kDa toutes deux actives (figure 4.9) [Brown et al., 2005]. Le BMP9 circule dans le sang sous deux formes : une forme complexée active capable d'activer le récepteur ALK1 (60%) et une forme dimérique non clivée (pro-BMP9) inactive (40%) [Bidart et al., 2012]. Chez l'Homme, la forme biologiquement active circule dans le plasma à des taux compris entre 2 et 12 ng/mL [David et al., 2008].

Le BMP10 pour sa part est synthétisé principalement dans l'oreillette droite (cellules myocardiales formant les trabécules) chez l'adulte. De faibles taux d'expression sont également retrouvés au niveau du foie et des poumons [Neuhaus et al., 1999]. Chez l'embryon, le BMP10 est initialement exprimé par le ventricule trabéculaire puis son expression est progressivement restreinte aux oreillettes en fin de gestation et finalement à l'oreillette droite chez l'adulte [Chen et al., 2004b]. Comme pour le BMP9, la furine est respon-

sable du clivage de la pro-protéine (figure 4.9). Elle agit principalement dans le milieu intra-cellulaire mais le clivage peut également avoir lieu à la surface de la membrane plasmique [Susan-Resiga et al., 2011]. Une fois le clivage effectué, le prodomaine de BMP10 peut interagir avec le fibrilline. La forme complexée ainsi associée à la MEC est inactive. Le complexe inactif peut être activé par l'action du BMP1 qui libère la forme mature active [Sengle et al., 2011]. Le BMP10 circule dans le sang à des taux compris respectivement entre 0,5 et 2 ng/mL et 1 à 3 ng/mL dans les sérums murins et humains [Ricard et al., 2012][Chen et al., 2013]. La forme circulante de BMP10 semble être sa forme complexée au pro-domaine. A l'origine, cette forme était considérée comme inactive pour deux raisons : la présence du pro-domaine semble limiter l'activation de cellules C2C12 [Sengle et al., 2011] et les souris déficientes pour BMP9 (*Gdf2*-KO) ne présentent qu'une activité mineure [Bidart et al., 2012]. Cependant, des travaux récents ont démontré que la forme complexée au prodomaine présente dans des plasmas humain et murin est active quand elle est testée sur des cellules endothéliales, de même que celle présente dans l'oreillette droite [Jiang et al., 2016].

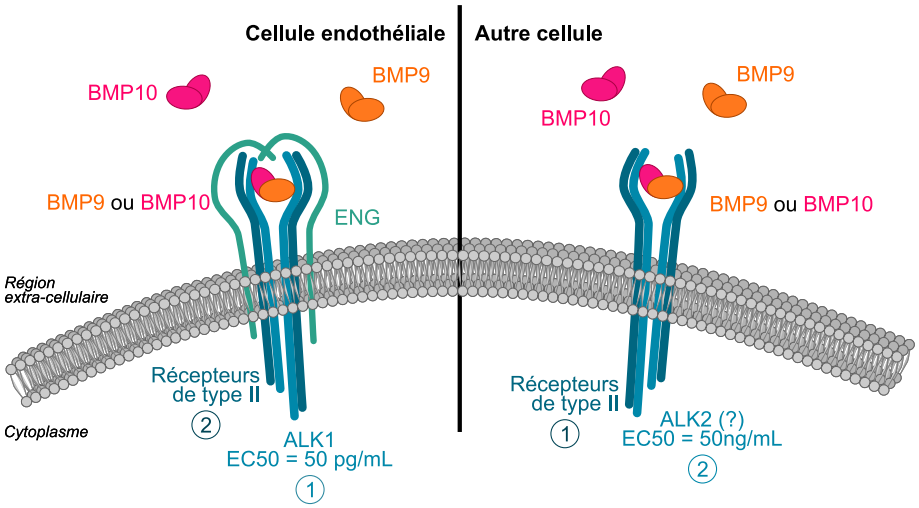


FIGURE 4.10 – Complexes de récepteurs associés à BMP9 et BMP10.
Numéros : ordre de liaison de BMP9 ou BMP10 aux récepteurs.

Récepteurs

BMP9 et BMP10 ont été identifiés en 2007 par notre équipe comme les ligands de haute affinité du récepteur ALK1 [David et al., 2007a] ce qui a par la suite été confirmé par d'autres groupes [Scharpfenecker et al., 2007][Upton et al., 2009]. L'affinité de BMP9 et de BMP10 pour ce récepteur (EC50 autour de 50 pg/mL) est très importante comparée aux affinités classiques des BMPs pour leurs récepteurs (EC50 autour de 50ng/mL) (figure 4.10) [Mahlawat et al., 2012]. L'analyse structurale du complexe BMP9/ALK1 a permis

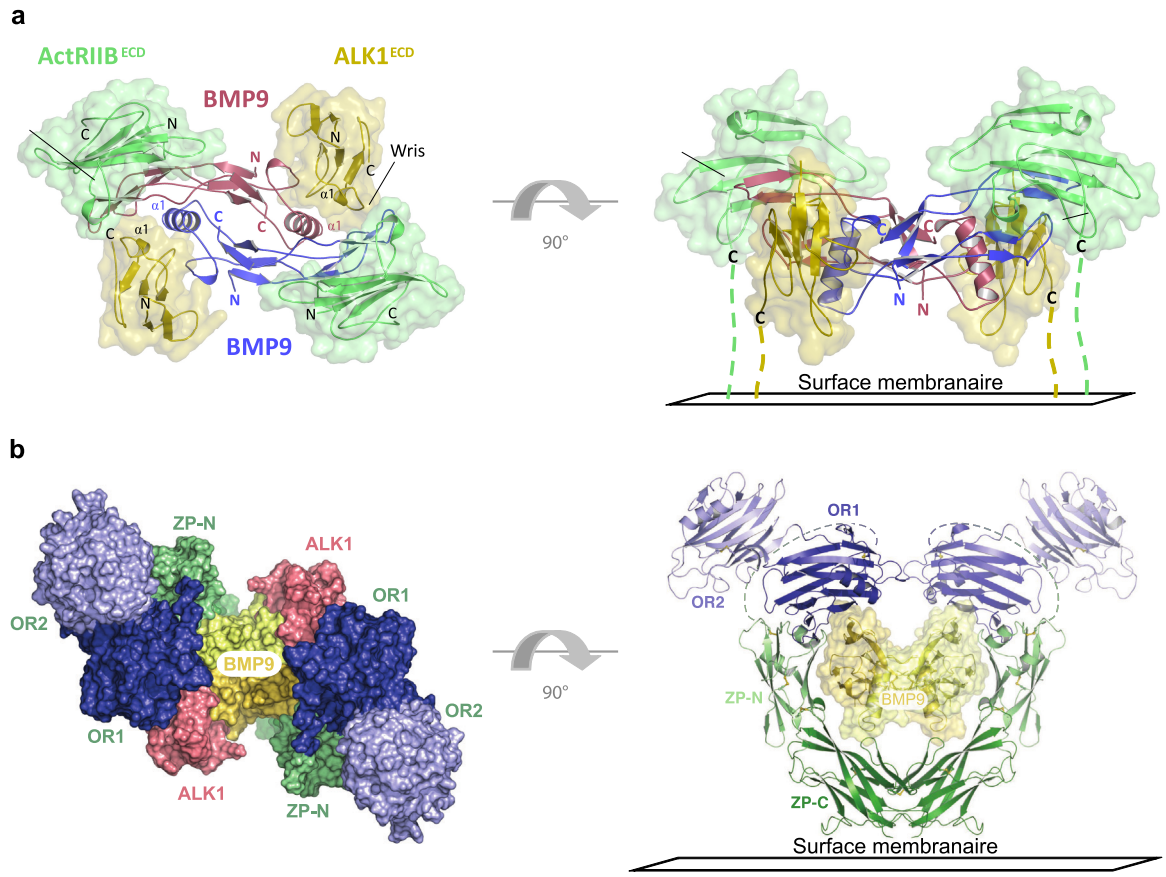


FIGURE 4.11 – Structure des complexes formés par BMP9 avec ses récepteurs.
a. Structure d'un complexe BMP9/ALK1/ActRIIB. Bleu et rouge : dimère de BMP9. Jaune : ALK1^{ECD}. Vert : ActRIIB^{ECD}. D'après [Townson et al., 2012]. b. Structure de complexes BMP9/ALK1/ENG et BMP9/ENG. Jaune : dimère de BMP9. Rose : ALK1. Violet, bleu et vert : ENG D'après [Saito et al., 2017].

de mettre en évidence la présence de trois sites d'interaction entre le ligand et le récepteur contre deux dans le cas des autres BMPs, ce qui pourrait expliquer ces différences d'affinité (figure 4.11) [Townson et al., 2012]. La structure du complexe BMP10/ALK1 n'a pas été étudiée.

Le modèle actuel est que BMP9 (ou BMP10) se lie dans un premier temps avec ALK1 puis recrute un des récepteurs de type II des BMPs (figure 4.10) [Scharpfenecker et al., 2007]. BMP10 ne semble pas avoir de différences d'affinité pour les différents récepteurs de type II, mais BMP9 forme préférentiellement son complexe de signalisation avec ActRIIB puis avec BMPRII et enfin avec ActRIIA [Townson et al., 2012]. Cependant, des travaux précédents avaient démontré que BMP9, dans sa forme complexée au prodomaine, a une meilleure affinité pour BMPRII [Brown et al., 2005]. Ces résultats différents sont probablement dus aux différences d'affinité induite par la présence ou non du prodomaine.

Dans des cellules n'exprimant pas ALK1, il a été démontré que BMP9 est capable de se lier à ALK2 mais avec une affinité bien moindre (figure 4.10) et seulement en présence d'un récepteur de type II. Cela suggère que dans ce cas précis, BMP9 se lie dans un premier temps au récepteur de type II avant de recruter le récepteur de type I [Scharpfenecker et al., 2007]. A de fortes doses, BMP10 est également capable de se lier à ALK3 et à ALK6 en formant un complexe avec BMPRII ou ActRIIA. Le rôle d'ActRIIB n'a pas été étudié dans ces travaux [Mazerbourg et al., 2005].

La signalisation de BMP9 et BMP10 peut être potentialisée par la présence de l'endogline (figure 4.10). Celle-ci se lie avec une très haute affinité aux deux ligands. Son affinité pour BMP10 est cependant un peu plus faible que celle pour BMP9 [Castonguay et al., 2011]. Il est probable que l'endogline potentialise la signalisation de BMP9 et BMP10 en favorisant leur liaison avec ALK1 en les maintenant proches de la surface cellulaire (figure 4.11)[Saito et al., 2017].

Il est intéressant de noter que les récepteurs de haute affinité pour BMP9 et BMP10, ALK1 et l'endogline, sont principalement exprimés à la surface des cellules endothéliales [Roelen et al., 1997][Niessen et al., 2010][Lowery and de Caestecker, 2010]. Cela suggère des fonctions importantes des deux ligands et de leurs récepteurs dans l'angiogenèse, la lymphangiogenèse et l'homoéostasie vasculaire.

Voies de signalisation

La formation des complexes de signalisation BMP9/ALK1 ou BMP10/ALK1 active la voie des Smads1/5/8 [David et al., 2007a][Scharpfenecker et al., 2007]. Une étude menée sur des HPAECs (Human Pulmonary Artery Endothelial Cells) a également montré que la signalisation BMP9/ALK1 peut induire la phosphorylation de Smad2 en fonction du récepteur de type II utilisé [Upton et al., 2009]. ALK1, sous une forme constitutivement active, est également capable d'activer des voies de signalisation Smad-indépendantes comme les voies de JNK et d'ERK [David et al., 2007b].

La signalisation BMP9/ALK1 est régulée par BMPER qui lie et inhibe préférentiellement BMP9. De façon intéressante, le gène codant pour BMPER est un des gènes cibles de la signalisation BMP9/ALK1. De ce fait, BMPER participe au rétro-contrôle négatif de cette voie de signalisation. Le rôle de BMPER est cependant assez complexe puisqu'il peut agir comme agoniste ou antagoniste de BMP9 [Yao et al., 2012]. BMP9 induit également l'expression de la noggine, autre antagoniste des BMPs [Lopez-Coviella et al., 2005]. Cependant, BMP9 et BMP10 ne sont pas sensibles à la noggine contrairement aux autres

BMPs [Seemann et al., 2009]. Cet antagoniste ne régule donc pas leurs voies de signalisation.

4.5.2 Fonctions physiologiques

Rôles dans l'angiogenèse

Les premières données relatives à l'implication de la voie BMP9/BMP10/ALK1 dans l'angiogenèse ont été obtenues grâce à l'étude d'ALK1. Les souris *Acvrl1*-KO meurent à mi-gestation (environ E11.5) du fait d'anomalies vasculaires sévères (AVM, pas de couverture péricytaire, etc.) [Urness et al., 2000][Oh et al., 2000]. Ce phénotype démontre l'importance de la voie de signalisation d'ALK1 dans le développement vasculaire sanguin. Après la découverte des ligands d'ALK1 en 2007, les études se sont tournées vers les rôles plus spécifiques de BMP9 et BMP10 dans l'angiogenèse.

Les fonctions de BMP9 sur les cellules endothéliales sanguines sont controversées. L'effet pro- ou anti-angiogénique de BMP9 semble être fonction du type de cellules endothéliales utilisées et des conditions d'expérimentations. Des études *in vitro* sur des cellules primaires (HMVEC-d, BAEC, HUVEC) montrent que BMP9 inhibe la prolifération et la migration des cellules endothéliales et pourrait être impliqué dans la stabilisation des vaisseaux [David et al., 2007a][Scharpfenecker et al., 2007][van Meeteren et al., 2012]. Cet effet stabilisateur est cohérent avec l'effet pro-différenciation de BMP9 sur les progéniteurs endothéliaux [Kim et al., 2015]. Au contraire la stimulation de cellules endothéliales embryonnaires (MESEC) par BMP9 induit la prolifération de ces cellules notamment par l'induction de l'expression de VEGFR-2 et Tie-2 [Suzuki et al., 2010]. Les résultats relatifs à l'influence de BMP9 sur le bourgeonnement *in vitro* des cellules endothéliales sont aussi controversés. Il a été démontré que BMP9 induit la tubulogenèse d'HPAEC [Park et al., 2012] alors qu'il inhibe celle des HUVECs [Larrivée et al., 2012]. L'utilisation d'antagonistes de la voie de signalisation n'a pas résolu le dilemme puisque la tubulogenèse d'HUVEC est en partie bloquée par l'utilisation d'anticorps neutralisants contre ALK1 [van Meeteren et al., 2012] ou activée par l'utilisation d'anticorps neutralisants dirigés contre BMP9 [Chen et al., 2013]. *In vivo*, notre équipe a montré que BMP9 agit comme un facteur de quiescence vasculaire. BMP9 inhibe la néo-angiogenèse dans le test de l'éponge chez la souris et induit une forte vasocontriction des vaisseaux de la membrane chorioallantoïdienne (CAM) d'embryons de poulet [David et al., 2008]. Cependant, une autre équipe a montré que BMP9 induit la néo-angiogenèse d'implants de matrigel *in vivo* [Suzuki et al., 2010]. Peu de données relatives aux fonctions de BMP10 dans l'angiogenèse sont disponibles. Notre équipe a montré que BMP10 possède un rôle similaire à

celui de BMP9 *in vitro* [David et al., 2007a]. Ces données ont été confirmées par un autre groupe montrant que la signalisation BMP10/ALK1 limite la prolifération des cellules endothéliales et stabilise le diamètre des artères chez le poisson zèbre [Laux et al., 2013]. Cependant, dans le modèle de la CAM, BMP10 induit une néo-angiogenèse importante [Mitchell et al., 2010].

Les différentes fonctions cellulaires présentées semblent dépendre de plusieurs paramètres et notamment de l'interaction avec d'autres voies de signalisation. Par exemple, en présence de Nrp1, l'effet anti-bourgeonnement d'ALK1 serait inhibé [Aspalter et al., 2015]. De plus, le flux semble avoir une forte influence sur l'efficacité de la signalisation *via* ALK1 [Laux et al., 2013] : un flux important favorise l'association ALK1-endogline et augmente donc la signalisation de BMP9 et de BMP10 [Franco and Gerhardt, 2016].

Les rôles de BMP9 et de BMP10 dans l'angiogenèse étant complexes à comprendre, des souris déficientes pour *Gdf2* et *Bmp10* ont été générées et étudiées. Il est apparu que les souris *Gdf2*-KO sont viables et ne présentent pas de défauts vasculaires [Ricard et al., 2012] [Chen et al., 2013]. BMP9 n'est donc pas indispensable pour le développement vasculaire. Cependant, l'injection d'anticorps neutralisants dirigés contre BMP10 dans des souriceaux *Gdf2*-KO induit une augmentation de la densité vasculaire de la rétine ainsi qu'une diminution de l'expansion du réseau vasculaire rétinien qui n'est pas observée lors de l'injection du même anticorps dans des souris sauvages [Ricard et al., 2012][Chen et al., 2013]. Des délais de vascularisation du nerf optique, une diminution de la couverture péricytaire et une désorganisation des vaisseaux de la trachée ont également été observés [Chen et al., 2013]. De façon plus grave, ces souriceaux présentent des défauts de croissance, des hémorragies pulmonaires importantes et ne survivent pas au delà de cinq jours [Ricard et al., 2012]. Ces résultats démontrent que BMP9 et BMP10 possèdent des rôles redondants dans la vascularisation néo-natale. Cette redondance semble également être présente pour le développement vasculaire embryonnaire au vu des différences entre les souris *Gdf2*-KO et *Acvrl1*-KO. L'étude des souris *Bmp10*-KO, bien que embryo-létales du fait de problèmes cardiaques, a permis de mettre en évidence que BMP10 est nécessaire, indépendamment de BMP9, au développement vasculaire embryonnaire. En effet, les embryons *Bmp10*-KO présentent un péricarde élargi (signe de défauts de développement vasculaire), une absence de vascularisation du sac vitellin et de nombreux AVM entre l'aorte dorsale et les veines cardinales à E9.5. Ces défauts sont absents chez les embryons exprimant BMP9 au lieu de BMP10 contrairement aux défauts cardiaques. L'absence de redondance entre BMP9 et BMP10 à ce stade chez les souris *Bmp10*-KO s'explique par les différences temporelles d'expression des deux facteurs de croissance : l'expression de BMP10 débute à E8.5 (comme celle d'ALK1) tandis que celle de BMP9 n'apparaît qu'à

E9.75-E10 [Chen et al., 2013].

L'implication de cette voie de signalisation dans l'angiogenèse est aussi démontrée par son rôle dans plusieurs maladies vasculaires. En effet, comme mentionné précédemment (cf. section 4.3.3 p.94) des mutations d'*Acvrl1* ou d'*Eng* sont impliquées dans la maladie de Rendu-Osler-Weber et dans l'HTAP [Morrell et al., 2016][Goumans et al., 2017]. De plus, des mutations de *Gdf2* ont récemment été observées chez des patients souffrant d'HTAP [Wang et al., 2016a](FASEB 2017 sur la super-famille du TGF-β, résultats non publiés). Il d'ailleurs est actuellement envisagé de traiter des patients souffrant d'HTAP avec du BMP9 [Long et al., 2015]. Des résultats dans des modèles murins ont également montré que le BMP9 permettrait de prévenir la néo-angiogenèse pathologique liée aux cas de DMLA [Ntumba et al., 2016].

L'ensemble des données recueillies ne permettent pas de définir de mécanismes clairs pour la voie de signalisation BMP9/BMP10/ALK1 mais prouvent son implication indispensable dans le développement vasculaire sanguin. A ce jour, notre modèle de travail est que BMP9 et BMP10, circulant dans le sang à des concentrations biologiquement actives, agissent *via* ALK1 comme des facteurs de quiescence sur l'endothélium sanguin.

Rôles dans la lymphangiogenèse

ALK1 est également exprimé à la surface des LECs. Les souris *Acvrl1*-KO meurent avant le développement du réseau lymphatique et ne peuvent donc pas nous informer sur le rôle du récepteur dans la lymphangiogenèse. Cependant, l'injection d'ALK1-Fc (forme soluble d'ALK1) chez le souriceau induit un mauvais développement des micro-vaisseaux lymphatiques à P5 et un traitement plus tardif provoque des problèmes de maturation du réseau lymphatique [Niessen et al., 2010]. L'utilisation de souris *Acvlr1*-KO inductibles a permis de montrer la présence d'un élargissement des vaisseaux lymphatiques et d'une augmentation du nombre de filopodes après la naissance suggérant une croissance active des vaisseaux lymphatiques [Yoshimatsu et al., 2013]. Ces résultats démontrent que l'implication de la voie de signalisation d'ALK1 participe au bon fonctionnement de la lymphangiogenèse.

L'ajout de BMP9 ou de BMP10 sur des LECs permet d'induire l'expression de Smad6 *via* les Smads1/5/8 [Niessen et al., 2010] suggérant un rôle de cette voie de signalisation dans la lymphangiogenèse. L'étude des souris *Gdf2*-KO a montré que ces souris présentent des défauts du système lymphatique. Elles présentent dès la naissance des vaisseaux lymphatiques mésentériques élargis du fait d'une hyperplasie des LECs ainsi

qu'une diminution du nombre de valves. Cette diminution du nombre de valves est observée au niveau des valves matures et immatures au stade embryonnaire. Elle ne concerne plus que les valves matures après la naissance. *In vitro*, BMP9 régule d'ailleurs positivement l'expression dans les LECs de plusieurs gènes impliqués dans la maturation du réseau lymphatique (LYVE-1) et dans la formation des valves (Foxc2, Nrp1, connexine37, EphrB2) [Levet et al., 2013]. BMP9 permet également de limiter la prolifération des LECs [Yoshimatsu et al., 2013]. Les souris *Gdf2*-KO présentent également un défaut de drainage lymphatique [Levet et al., 2013] que l'on peut supposer être dû au manque de valves ou à l'élargissement des vaisseaux. L'ensemble de ces données démontre l'importance de BMP9 dans la stabilisation des vaisseaux lymphatiques. *In vitro*, BMP9 est également capable d'inhiber de façon transitoire l'expression de PROX1 [Yoshimatsu et al., 2013] ce qui suggère que la voie BMP9/ALK1 pourrait réguler la différenciation des progéniteurs endothéliaux en cellules endothéliales sanguines ou lymphatiques [Derynck and Akhurst, 2013].

Autres rôles physiologiques

Comme tous les membres de la famille des BMPs, les fonctions de BMP9 et de BMP10 sont nombreuses et ne se limitent pas à leurs effets vasculaires. BMP9 et BMP10 possèdent des propriétés ostéogéniques, BMP9 étant notamment connu pour être le plus ostéogénique des BMPs [Bessa et al., 2009]. Chez le rat, l'injection d'un adénovirus exprimant BMP9 permet de réparer des lésions osseuses [Li et al., 2003]. BMP9 est également impliqué dans la différenciation de progéniteurs neuraux en neurones cholinergiques [Lopez-Coviella et al., 2005] [Lauzon et al., 2017].

D'autres fonctions sont directement liées à leur site d'expression. Ainsi, BMP10 est indispensable à la formation du cœur [Chen et al., 2004a]. BMP9 est quant à lui impliqué dans l'homéostasie du foie. Il participe à la régulation de la glycémie *via* l'inhibition de la néo-glucogenèse et l'activation des voie de synthèse des acides gras et du glycogène [Chen et al., 2003]. L'injection d'anticoprs neutralisants dirigés contre BMP9 chez le rat induit d'ailleurs une intolérance au glucose et une résistance à l'insuline [Caperuto et al., 2008]. Ces résultats ont été récemment confirmés par une étude clinique qui montre une forte corrélation entre la résistance à l'insuline et un faible taux de BMP9 circulant chez des patients souffrant de diabète de type 2 [Luo et al., 2017]. BMP9 participe également à l'homéostasie du foie. Il régule notamment l'expression de l'hepcidine [Truksa et al., 2006] et a été décrit pour être un facteur pro-fibrotique hépatique [Muñoz-Félix et al., 2016][Breitkopf-Heinlein et al., 2017]. Pour finir, BMP9 agit comme un facteur anti-prolifératif et stabilisateur sur les hépatocytes en maintenant leur polarisation et l'expression d'enzymes métaboliques essentielles [Breitkopf-Heinlein et al., 2017].

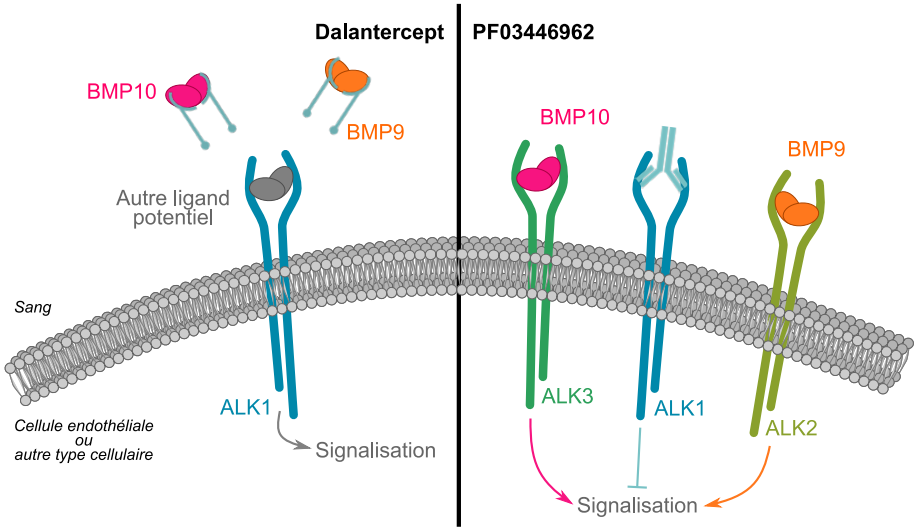


FIGURE 4.12 – Principes des thérapies ciblant ALK1.

4.5.3 Implications dans le cancer

Ciblage de la voie ALK1

Du fait de son expression endothélio-spécifique et de son rôle - bien que controversé - dans l'angiogenèse, ALK1 a été défini comme une cible anti-angiogénique potentielle dans le traitement des cancers. Deux stratégies ont été développées : un anticorps neutralisant dirigé contre ALK1 (PF-03446962, Pfizer) et une protéine de fusion (ALK1-Fc) composée du domaine extra-cellulaire d'ALK1 associé à un domaine Fc humain (Dalantercept ou ACE-041, Acceleron Pharma). La première approche cible uniquement les cellules exprimant ALK1 et bloque la signalisation ALK1 spécifique. Au contraire, la seconde est basée sur le principe d'un piège à ligand et cible tous les ligands d'ALK1 pouvant s'y lier sans présence de récepteurs de type II - soit principalement BMP9 et BMP10 [Mitchell et al., 2010] - et bloque toute signalisation de ces ligands *via* ALK1 ou tout autre récepteur (figure 4.12).

Dans un premier temps, ces traitements ont été étudiés sur des modèles murins (un équivalent murin du Dalentercept, RAP-041, a été utilisé). Malgré leurs différences de fonctionnement, leurs effets sont similaires : une diminution de la taille des tumeurs et de leur vascularisation a été observée dans de nombreux types de cancer induits ou spontanés (pancréas, mélanome, sein, rein) [Cunha et al., 2010][Mitchell et al., 2010] [Hu-Lowe et al., 2011][Cunha et al., 2015][Wang et al., 2016c]. Une étude a également mis en évidence une diminution des métastases dans les cancers du pancréas et du sein [Cunha et al., 2015]. Bien qu'efficace dans ces modèles en monothérapie, il semble que

TABLE 4.3 – Essais cliniques menés sur le PF-03446962 dans le traitement des cancers. * : résultats disponibles. D'après [https ://clinicaltrials.gov/, 2017].

Drogue(s)	**Phase**	**Cancer**	**Statut**	**Début / Fin**
PF-033446962 et regorafenib	1	Cancer colorectal	Complété	08/2014 05/2016
PF-033446962	2	Cancer urothélial réfractaire Cancer urothélial récidivant	Inconnu	07/2012 10/2013
PF-033446962	2	Mésothélium malin de la plèvre avancé	Complété	11/2011 02/2015
PF-033446962	1	Néoplasmes	Complété*	07/2011 03/2014
PF-033446962	1	Tumeurs solides avancées	Complété*	11/2007 03/2013
PF-033446962	2	Carcinome hépatocellulaire	Complété*	10/2013 07/2014

la combinaison du dalantercept avec des chimiothérapies [Hawinkels et al., 2016] ou des inhibiteurs de la voie du VEGF [Wang et al., 2016c][Akatsu et al., 2017] améliore les effets sur la taille des tumeurs et sur la vascularisation en diminuant les risques de résistance.

A la suite des résultats prometteurs obtenus dans les modèles pré-cliniques, de nombreux essais cliniques sur les deux molécules ont été lancés et certains sont encore en cours (tables 4.3 et 4.4). Les deux traitements sont bien tolérés mais ne montrent pas ou peu d'efficacité suffisante en monothérapie dans le cadre du cancer urothélial pour le PF-03446962 [Necchi et al., 2014] ou des cancers squameux de la tête et du cou [Jimeno et al., 2016] ou de l'endomètre [Makker et al., 2015] pour le Dalantercept. Lors de l'utilisation du PF-03446962, une augmentation des taux de VEGF plasmatique a été observée, suggérant un possible mécanisme de résistance [Necchi et al., 2014]. A partir de cette observation et du fait que les thérapies combinées sont plus efficaces dans les modèles pré-cliniques, il semble intéressant d'étudier le potentiel de ces drogues en combiné. L'étude DART combine le Dalantercept et l'axitinib dans le traitement du cancer du rein avancé. La première partie de l'étude a conclu à une très bonne tolérance du traitement et à une activité anti-tumorale intéressante avec 25% de patients présentant une réponse partielle [Voss et al., 2016]. Cependant, la deuxième partie de l'étude visant à étudier plus spécifiquement l'efficacité de la combinaison a conclu qu'aucun bénéfice suffisant n'avait été démontré. A la suite de cette étude, Acceleron Pharma a décidé d'arrêter le développement du Dalantercept [Melao, 2017].

TABLE 4.4 – Essais cliniques menés sur le Dalantercept dans le traitement des cancers.
* : résultats disponibles. # : date supposée. D'après [https ://clinicaltrials.gov/, 2017].

Drogue(s)	**Phase**	**Cancer**	**Statut**	**Début / Fin**
Dalantercept	2	Carcinome squameux de la tête et du cou	Complété*	10/2011 09/2015
Dalantercept et sorafenib	2	Carcinome du hépatocellulaire avancé de l'adulte	Actif, sans recrutement	06/2014 09/2017
Dalantercept	2	Carcinomes de l'endomètre	Complété*	09/2012 01/2016
Dalantercept	2	Carcinome ovarien récurent Carcinome des trompes de Fallope récurent Carcinome primaire du péritoine récurrent	Inconnu	11/2012 10/2015#
Dalantercept et axitinib	2	Carcinome rénal avancé	Actif, sans recrutement	12/2012 12/2018
Dalantercept	1	Tumeurs solides avancées Myélomes multiples	Complété	10/2009 10/2012

Pour conclure, malgré des résultats prometteurs sur les modèles murins, l'efficacité du ciblage de la voie de signalisation d'ALK1 n'est pas reconnue par les essais cliniques. Il est important de noter que les deux traitements développés bloquent toujours plusieurs voies de signalisation différentes. Par exemple, le Dalantercept inhibe toute signalisation par BMP9 et par BMP10 et ce quelque soit le récepteur transduisant le signal. Le PF-03446962 bloque toute la signalisation passant par ALK1 qui possède plusieurs ligands pouvant avoir des fonctions différentes. Cette "non-spécificité" peut être dommageable dans le sens où il est connu que le rôle des BMPs dans le cancer est fortement dépendant du contexte et du récepteur utilisé. Ainsi, bloquer à la fois BMP9 et BMP10 sans connaître leurs rôles spécifiques pourrait avoir des conséquences inattendues. Il semble nécessaire d'étudier de plus près les rôles de BMP9 et de BMP10 dans le cancer pour mieux comprendre les impacts de ces traitements et déterminer s'il ne serait pas plus intéressant de bloquer un des deux ligands seulement.

Ciblage de l'endogline

L'endogline est exprimée principalement à la surface des cellules endothéliales. Elle fait office de co-récepteur pour ALK1 et se lie préférentiellement à BMP9 et BMP10 parmi tous les autres BMPs. De plus, son expression est fortement sur-exprimée lors de l'angiogenèse tumorale et son niveau d'expression est négativement corrélé avec la survie moyenne des patients atteints de cancers. Ainsi, l'endogline est une cible de choix pour les thérapies anti-angiogéniques mais également comme marqueur de l'angiogenèse tumorale [Jonker, 2014].

Des études *in vivo* chez la souris ont confirmé l'intérêt de cibler l'endogline dans le traitement des cancers. L'étude du développement du cancer du poumon de Lewis dans des souris $Eng^{+/-}$ a permis de montrer que le poids tumoral et la vascularisation sont réduits de 30% comparés à ceux obtenus pour des souris sauvages [Düwel et al., 2007]. Ces souris présentent des tumeurs moins nombreuses et moins angiogéniques dans un modèle spontané de cancer du pancréas [Anderberg et al., 2013]. De plus, l'utilisation de formes solubles de l'endogline permet de diminuer le volume tumoral et de bloquer l'angiogenèse tumorale induite par le VEGF dans un modèle de cancer du colon [Castonguay et al., 2011]. Dans le cancer du sein, l'injection d'endogline soluble permet également de réduire fortement la vascularisation tumorale - sans impacter la croissance tumorale - et la dissémination métastatique [Paauwe et al., 2016].

De nombreux essais cliniques sont en cours afin d'étudier le potentiel thérapeutique du TRC105, un anticorps monoclonal chimérique dirigé contre l'endogline(table 4.5). Il a été

démontré *in vitro* que cet anticorps est capable de bloquer la signalisation induite par BMP9 [Nolan-Stevaux et al., 2012]. Une étude de phase 1 sur divers cancers réfractaires à tous traitements a démontré que le traitement présente peu d'effets secondaires et que 47% des patients ont vu leur maladie se stabiliser [Rosen et al., 2012]. La bonne tolérance a été confirmée par une autre étude de phase 1 mais le cancer a progressé dans 81% des cas (cancer de la prostate métastatique) [Karzai et al., 2015]. Un essai clinique de phase 2 sur des patients atteints de cancer hepatocellulaire résistant au sorafenib n'a pas pu montrer d'amélioration de l'état de santé des patients [Duffy et al., 2015]. Une seconde étude de phase 2 a confirmé l'absence d'efficacité du TRC105 en monothérapie dans le cadre de cancers urothéliaux métastatiques [Apolo et al., 2017]. De nouvelles pistes sont actuellement explorées afin de combiner le TRC105 à des chimiothérapies, des inhibiteurs du VEGF ou encore des immunothérapies [https ://clinicaltrials.gov/, 2017].

TABLE 4.5 – Essais cliniques menés sur le TRC105 dans le traitement des cancers.
* : résultats disponibles. # : date supposée. D'après [https ://clinicaltrials.gov/, 2017].

Drogue(s)	**Phase**	**Cancer**	**Statut**	**Début / Fin**
TRC105 et bevacizumab	2	Carcinome rénal	Complété	11/2012 08/2017
TRC105 et bevacizumab	1/2	Glioblastome Cancer du cerveau	Actif, sans recrutement	11/2012 12/2016
TRC105	1/2	Cancer du sein métastatique	Inconnu	06/2011 12/2014#
TRC105 et bevacizumab	1	Tumeur solide (adulte)	Complété*	04/2011 12/2013
TRC105 et nivolumab	1	Carcinome pulmonaire	Recrutement non commencé	07/2017 12/2018
TRC105 et bevacizumab	2	Cancer gestationnel	Recrutement en cours	03/2016 08/2017
TRC105 et pazopanib	1/2	Sarcome des tissus mous avancés	Recrutement en cours	12/2013 12/2017
TRC105 et pazopanib	3	Angiosarcome avancé	Recrutement en cours	02/2017 12/2018
TRC105 et sorafenib	1/2	Carcinome hépatocellulaire	Recrutement en cours	01/2016 07/2017

BMP9, pro ou anti-tumoral ?

De nombreux travaux ont étudié le rôle de BMP9 dans différents cancers. Cependant, l'aspect vasculaire n'a quasiment jamais été étudié, la grande majorité des publications s'intéressant seulement à l'effet direct de BMP9 sur les cellules tumorales. Les résultats à ce sujet sont très controversés même au sein d'études portant sur le même cancer. Ainsi, il a été montré que la sur-expression de BMP9 *in vitro* ou un traitement avec du BMP9 diminue la prolifération et la migration tout en augmentant l'apoptose de cellules tumorales de cancers du colon (activation de la voie de p38), du foie (voie p38), de l'estomac (inhibition PI3K/AKT), du poumon (inhibition ERK et NF-κB), de la prostate (voie Smad-dépendante), du sein (inhibition ERK et AKT, activation Wnt), d'ostéosarcome (inhibition PI3K/AKT et MMPs) et de myélome (effet médié par ALK2 inhibé par l'endogline) (table 4.6). Certaines de ces études ont également montré que l'effet anti-tumoral détecté *in vitro* est également valable *in vivo* avec des tumeurs donc la croissance est réduite en présence de BMP9 dans le cas des cancers du foie [Jung et al., 2016], du poumon [Wang et al., 2016b], du sein (toutes les études), de l'estomac [Duan et al., 2015] et de l'ostéosarcome [Li et al., 2012][Zhang et al., 2016a]. Des diminutions des lésions métastatiques dues à la présence de BMP9 ont également été observées dans le cancer du sein [Ren et al., 2014b][Wan et al., 2014]. Au contraire, d'autres travaux ont montré que, *in vitro*, la sur-expression de BMP9 ou un traitement avec du BMP9 améliore la prolifération, la migration et la survie de cellules tumorales de cancers du foie (*via* ALK2), de l'ovaire (*via* ALK2) et d'ostéosarcome (coopération voie Notch) (table 4.6). *In vivo*, la sur-expression de BMP9 peut aussi accélérer la croissance tumorale d'ostéosarcomes [Li et al., 2014]. La majorité de ces études a été réalisée induisant la sur-expression de BMP9 (table 4.6) dans des lignées tumorales n'exprimant pas de BMP9 à l'origine. Cette approche est discutable car s'éloignant des conditions "physiologiques" des cellules tumorales. Une première étude utilisant des souris *Gdf2*-KO montre que ces dernières présentent des tumeurs moins nombreuses et moins volumineuses dans un modèle spontané de cancer du pancréas (Rip1-Tag2). Elles présentent cependant plus de métastases [Eleftheriou et al., 2016]. Ainsi, au vu de l'ensemble de la littérature disponible, il semble difficile de conclure quant à un rôle direct de BMP9 sur les cellules tumorales.

Les variations des niveaux d'expression de BMP9 dans le cancer sont également assez variées. Dans le cancer du foie, deux études montrent que les patients possédant un carcinome hépatocellulaire présentent une expression augmentée de BMP9 [Herrera et al., 2013] que l'on retrouve également dans les lignées cellulaires étudiées [García-Álvaro et al., 2015]. Une autre affirme au contraire que l'expression de BMP9 est diminuée dans les tumeurs hépatiques comparées aux tissus hépatiques sains [Jung et al., 2016]. Dans les can-

TABLE 4.6 – Effets pro ou anti-tumoraux *in vitro* de BMP9 sur différents cancers. T : traitement. SE : sur-expression par un adénovirus. KO : souris *Gdf2*-KO.

Cancer	**Pro-tumoral (méthode)**	**Anti-tumoral (méthode)**
Foie	[Herrera et al., 2013] (T) [Li et al., 2013] (T) [García-Álvaro et al., 2015] (T)	[Jung et al., 2016] (T)
Ostéosarcome	[Li et al., 2014] (SE) [Liu et al., 2016] (SE)	[Li et al., 2012] (SE) [Lv et al., 2013] (SE) [Lv et al., 2014] (SE) [Zhang et al., 2016a] (SE)
Ovaire	[Herrera et al., 2009] (T)	[Varadaraj et al., 2015] (T)
Pancréas	[Eleftheriou et al., 2016] (KO)	
Sein		[Wang et al., 2011] (SE) [Ren et al., 2014a] (SE) [Ren et al., 2014b] (SE) [Wan et al., 2014] (SE) [Wang et al., 2015] (SE) [Wang et al., 2017a] (SE)
Colon		[Yuan et al., 2016] (SE)
Estomac		[Duan et al., 2015] (SE)
Poumon		[Wang et al., 2016b] (SE)
Prostate		[Ye et al., 2008] (SE)
Myélome		[Olsen et al., 2014] (T)

cers du sein [Wang et al., 2011], de la prostate [Ye et al., 2008] et dans l'ostéosarcome [Zhang et al., 2016a], une expression diminuée de BMP9 a également été observée dans les tissus tumoraux comparés aux tissus sains.

Au vu des rôles vasculaires importants de BMP9, il est intéressant de se pencher sur la question de son impact sur l'angiogenèse tumorale afin d'éclaircir son rôle global dans le cancer. Peu d'études existent à ce sujet à ce jour. La plus ancienne montre que, dans un modèle de croissance tumorale en matrigel, la présence de BMP9 permet de diminuer la taille des tumeurs du sein et du pancréas tout en augmentant la densité vasculaire tumorale [Suzuki et al., 2010]. L'expression forcée de BMP9 dans un modèle de cancer mammaire murin ne semble pas impacter la croissance tumorale mais induire une augmentation de la densité vasculaire sanguine et une diminution du réseau lymphatique tumoral [Yoshimatsu et al., 2013]. Un article plus récent dans un modèle de cancer du pancréas spontané dans des souris *Gdf2*-KO que la densité vasculaire est inchangée (tumeurs plus

petites) mais que le nombre de bourgeons et de branchement ainsi que la couverture péricytaire sont plus importants que dans les souris sauvages [Eleftheriou et al., 2016].

Pour conclure, les effets de BMP9 dans le cancer sont controversés et semblent en partie cancer-dépendants. Au vu de la qualité de certaines études, on peut supposer que le BMP9 possèderait plutôt un rôle anti-tumoral dans l'ostéosarcome et un rôle pro-tumoral dans le cancer du foie. Dans le cancer du sein, la majorité des études ont été faites par le même groupe et la technique de l'expression forcée dans des lignées n'exprimant pas de base le BMP9 est discutable, mais il semble que BMP9 possède plutôt un rôle anti-tumoral qu'il faudra confirmer. Les études sur les effets de BMP9 sur l'angiogenèse tumorale ne sont pas encore assez avancées pour en tirer de conclusions. Un travail important reste à faire pour mieux comprendre l'implication de BMP9 dans la carcinogenèse.

BMP10, un acteur peu étudié

Les fonctions tumorales de BMP10, au contraire de celles de BMP9, n'ont été que peu étudiées. Dans le cas du myélome, BMP10 n'a pas d'impact sur la prolifération ou l'apoptose des cellules tumorales [Olsen et al., 2014]. Son expression est diminuée dans les tissus tumoraux de cancers de la prostate [Ye et al., 2009], du sein [Ye et al., 2010] et de la vessie [Zhang et al., 2013] et son expression forcée diminue la motilité, la prolifération et l'invasion des cellules tumorales *in vitro*. C'est également le cas dans le cadre du cancer de l'estomac [Lei et al., 2015]. *In vivo*, la sur-expression de BMP10 limite la croissance tumorale dans le cancer du sein [Ye et al., 2010] mais augmente la prise métastatique pulmonaire lors d'injection de cellules tumorales de l'estomac dans le système sanguin par la veine caudale chez la souris [Lei et al., 2015]. Au vu de l'ensemble de ces résultats, BMP10 peut être défini comme un facteur anti-tumoral bien que ses fonctions vasculaires tumorales n'aient pas été étudiées.

Objectifs

L'équipe du Dr. Bailly travaille depuis plusieurs années sur la signalisation d'ALK1 dans le cadre de l'angiogenèse et de la lymphangiogenèse du fait de la spécificité de ce récepteur pour les cellules endothéliales. En 2007, elle a démontré que BMP9 et BMP10 sont les ligands physiologiques de haute affinité d'ALK1 [David et al., 2007a] puis que BMP9 circule dans le sang sous forme active [Ricard et al., 2012]. Après la découverte des ligands, l'équipe a orienté ses recherches sur leurs rôles dans les processus vasculaires. Elle a pu démontrer que BMP9 est impliqué dans la quiescence de l'angiogenèse [David et al., 2008] et dans la maturation du système lymphatique [Levet et al., 2013], et que BMP9 et BMP10 jouent des rôles redondants dans la vascularisation de la rétine chez le nouveau-né [Bidart et al., 2012]. Au delà des rôles physiologiques de ces deux facteurs de croissance, l'équipe a également étudié l'impact de la voie de signalisation BMP9/BMP10/ALK1/ENG dans des pathologies vasculaires (HHT et HTAP) [Ricard et al., 2010][Mallet et al., 2015].

Dans la lignée des travaux déjà effectués, l'objectif principal de ma thèse était d'étudier les rôles de BMP9 et de BMP10 dans le développement vasculaire (a) physiologique et (b) tumoral. J'ai pu aborder l'implication de BMP9 et BMP10 dans le développement vasculaire physiologique grâce à l'étude du processus de fermeture du DA, projet en cours dans l'équipe lors de mon arrivée. La partie principale de ma thèse a porté sur les rôles de BMP9 et de BMP10 dans le développement et la dissémination métastatique de modèles précliniques de cancers mammaires murins et plus précisément sur la vascularisation tumorale dans ce cadre.

Au début de ma thèse, l'équipe possédait des souris invalidées pour BMP9 (*Gdf2*-KO) sous trois fonds génétiques (BALB/c, C57BL/6 et Ola), ce qui a facilité la mise en place des études sur les différents rôles de BMP9. L'invalidation de *Bmp10* étant létale au stade embryonnaire du fait de graves défauts cardiaques [Chen et al., 2004b], le seul outil à notre disposition pour étudier son rôle était l'utilisation d'anticorps neutralisants dirigés contre BMP10. Afin d'améliorer notre compréhension de cette voie de signalisation, l'équipe a fait générer des souris $Bmp10^{lox/lox}$ par l'Institut clinique de la souris à Strasbourg grâce à un financement de la Fondation Maladies Rares. Daniel Metzger et Pierre Chambon (Institut de Génomique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg) nous ont fourni des souris exprimant la Cre recombinase $CreER^{T2}$ sous différents promoteurs (Rosa26 et Albumine). A partir de l'ensemble de ces souris, un des objectifs de ma thèse a été de générer des souris *Bmp10*-KO inductibles (*Bmp10*-cKO) ainsi que des souris dites "doubles KO", c'est-à-dire invalidées pour *Gdf2* et invalidables pour *Bmp10*.

Résultats

Partie 1

Fermeture du canal artériel

1.1 Contexte de l'étude

Ce projet est un prolongement du travail sur l'implication de BMP9 et de BMP10 dans la vascularisation de la rétine publié en 2012 par notre équipe [Ricard et al., 2012]. Dans cet article, notre équipe a démontré la redondance de BMP9 et de BMP10 dans l'angiogenèse de la rétine en traitant des souriceaux *Gdf2*-KO avec un anticorps neutralisant dirigé contre BMP10 à P1 et à P3. Il a été observé un phénotype sévère chez ces souriceaux, en plus de leurs défauts de vascularisation de la rétine. En effet, ils ne prennent plus de poids après deux jours de traitement, ils présentent des hémorragies pulmonaires et meurent entre P5 et P6. Notre équipe a donc cherché à comprendre les causes de cette mortalité précoce. Devant les symptômes observés, il a été émis l'hypothèse d'un défaut de fermeture du canal artériel (DA).

Au début de ma thèse, Sandrine Levet avait montré que les souriceaux *Gdf2*-KO présentent des défauts d'épaississement et de remodelage de leur DA à P0 et à P4, anomalies qui sont viables. Cependant, l'injection d'anticorps anti-BMP10 dans ces souriceaux induit une réouverture tardive de leur DA. En accord avec ces résultats, elle avait également montré que COX2 (enzyme produisant du PGE2) et HAS2 (enzyme produisant du HA) sont des cibles moléculaires de BMP9 et BMP10. De plus, des données de génétique humaine identifient une région minimale critique de 700kb, codant pour 8 gènes dont *Bmp10*, comme corrélée à la présence d'un PDA.

Mon objectif principal dans ce projet a été d'étudier les mécanismes d'action impliqués dans la fermeture anatomique du DA ainsi que l'implication de BMP9 et BMP10 dans ce processus.

1.2 Article

Les résultats ont fait l'objet d'un article dans *PNAS* en 2015 sous le titre "BMP9 and BMP10 are necessary for proper closure of the ductus arteriosus" dans lequel je figure en co-premier auteur [Levet et al., 2015].

J'ai participé au travail sur l'implication de BMP9 et de BMP10 dans le remodelage matriciel lors de la fermeture du DA. J'ai également réalisé l'ensemble des expériences relatives aux processus de fermeture anatomique du DA.

PNAS PLUS

BMP9 and BMP10 are necessary for proper closure of the ductus arteriosus

Sandrine Levet[a,b,c,1], Marie Ouarné[a,b,c,1], Delphine Ciais[a,b,c], Charles Coutton[c,d,e], Mariela Subileau[a,b,c], Christine Mallet[a,b,c], Nicolas Ricard[a,b,c], Marie Bidart[a,b,c], Thierry Debillon[f], Francesca Faravelli[g], Caroline Rooryck[h], Jean-Jacques Feige[a,b,c], Emmanuelle Tillet[a,b,c,2], and Sabine Bailly[a,b,c,2,3]

[a]Institut National de la santé et de la Recherche Médicale (INSERM, U1036), Grenoble, France F-38000; [b]Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Energies Alternatives, Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant, Laboratoire Biologie du Cancer et de l'Infection, Grenoble, France F-38000; [c]Université Grenoble-Alpes, Grenoble, France F-38000; [d]Laboratoire de Génétique Chromosomique, Département de Génétique et Procréation, Hôpital Couple Enfant, Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble, Grenoble F-38000, France; [e]Equipe "Génétique, Infertilité et Thérapeutique," Laboratoire Andrologie Gérontechnologie Inflammation Modélisation, CNRS FRE3405, Grenoble, France F-38000; [f]Service de Médecine et Réanimation Néonatale, Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble, Grenoble, France F-38000; [g]Division of Medical Genetics, Galliera Hospital, Genoa, Italy; and [h]Service de Génétique Médicale, Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, Bordeaux, France F-33000

Edited by Napoleone Ferrara, University of California, San Diego, La Jolla, CA, and approved May 19, 2015 (received for review April 30, 2015)

The transition to pulmonary respiration after birth requires rapid alterations in the structure of the mammalian cardiovascular system. One dramatic change that occurs is the closure of the ductus arteriosus (DA), an arterial connection in the fetus that directs blood flow away from the pulmonary circulation. Two members of the TGFβ family, bone morphogenetic protein 9 (BMP9) and BMP10, have been recently involved in postnatal angiogenesis, both being necessary for remodeling of newly formed microvascular beds. The aim of the present work was to study whether BMP9 and BMP10 could be involved in closure of the DA. We found that *Bmp9* knockout in mice led to an imperfect closure of the DA. Further, addition of a neutralizing anti-BMP10 antibody at postnatal day 1 (P1) and P3 in these pups exacerbated the remodeling defect and led to a reopening of the DA at P4. Transmission electron microscopy images and immunofluorescence stainings suggested that this effect could be due to a defect in intimal cell differentiation from endothelial to mesenchymal cells, associated with a lack of extracellular matrix deposition within the center of the DA. This result was supported by the identification of the regulation by BMP9 and BMP10 of several genes known to be involved in this process. The involvement of these BMPs was further supported by human genomic data because we could define a critical region in chromosome 2 encoding eight genes including *BMP10* that correlated with the presence of a patent DA. Together, these data establish roles for BMP9 and BMP10 in DA closure.

ductus arteriosus | BMP9 | BMP10 | endMT | pediatric

The ductus arteriosus (DA) is a large blood vessel whose obstruction is essential for the transition from fetal to neonatal circulation. It is a fetal arterial shunt connecting the pulmonary artery with the aortic arch. During fetal life, the DA directs deoxygenated blood away from the pulmonary circulation and toward the descending aorta, bypassing the nonventilated fetal lungs. After birth, the DA closes spontaneously within 1–3 h in small rodents or within 24–48 h in human newborns (1, 2). Although an open DA is required for fetal survival, the persistence of a patent DA (PDA) after birth is a major cause of morbidity and mortality, particularly in preterm neonates, leading to severe complications, including pulmonary hypertension, right ventricular dysfunction, postnatal infections, and respiratory failure. The incidence of PDA has been estimated to be one in 500 interm newborns and accounts for the majority of all cases of congenital heart disease in preterm newborns. It is currently believed that DA closure involves a two-step process (3, 4). The first, provisional closure, also called functional closure, occurs at birth and is accomplished by smooth muscle cell contraction and DA constriction. The second step, named anatomical closure, involves a profound remodeling of cells within the former DA lumen and permits permanent closure of the DA. Although several factors have been implicated in DA closure (oxygen tension, prostaglandin E2, laminin, growth hormone, and platelets), the precise molecular and cellular signals that promote the transition from initial constriction to definitive DA closure are not yet fully understood.

Bone morphogenetic protein 9 (BMP9) and BMP10 are two members of the BMP family that have been demonstrated to play major roles in vascular development (5). In 2007, it was demonstrated that BMP9 and BMP10 bind with high affinity to the endothelial-specific receptor activin receptor-like kinase 1 (ALK1), a type 1 receptor of the TGFβ family (6) whose mutations are involved in vascular diseases (5). Both BMP9 and BMP10 are present in blood, and their circulating levels are particularly elevated in mice around birth (7, 8), suggesting that they could play a role in pre- and postnatal development. In the present work, we addressed whether BMP9 and BMP10 could be involved in DA closure. For this purpose, we used *Bmp9*-KO mice and neutralizing anti-BMP10 antibody. Herein, we show that injection of a neutralizing anti-BMP10 antibody into *Bmp9*-KO pups led to an open DA and identified several targets that may be involved in this closure defect. This work is further supported by human genomic data, based on the definition of a 700-kb minimal critical region in chromosome 2 encoding eight genes, including *BMP10*, that correlated with the presence of a

Significance

At birth, newborns must switch from the fetal aquatic life to the aerial one, by closure of a vessel named the ductus arteriosus. During fetal life, it allows blood to bypass the lungs, and a failure of its closure at birth is a major cause of mortality, particularly in preterm neonates. This pathological condition is known as patent ductus arteriosus and occurs in approximately 60% of preterm infants born before 28 wk of gestation. Herein, we show, for the first time to our knowledge, the involvement of two circulating growth factors, bone morphogenetic proteins BMP9 and BMP10, in the anatomical closure of this vessel. This finding will have potential clinical applications in the management of this pathology.

Author contributions: S.L., M.O., D.C., J.-J.F., E.T., and S.B. designed research; S.L., M.O., D.C., M.S., C.M., N.R., M.B., E.T., and S.B. performed research; C.C., F.F., and C.R. contributed new reagents/analytic tools; S.L., M.O., D.C., C.C., T.D., E.T., and S.B. analyzed data; and S.L., M.O., J.-J.F., E.T., and S.B. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

[1]S.L. and M.O. contributed equally to this work.

[2]E.T. and S.B. contributed equally to this work.

[3]To whom correspondence should be addressed. Email: sabine.bailly@cea.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1508386112/-/DCSupplemental.

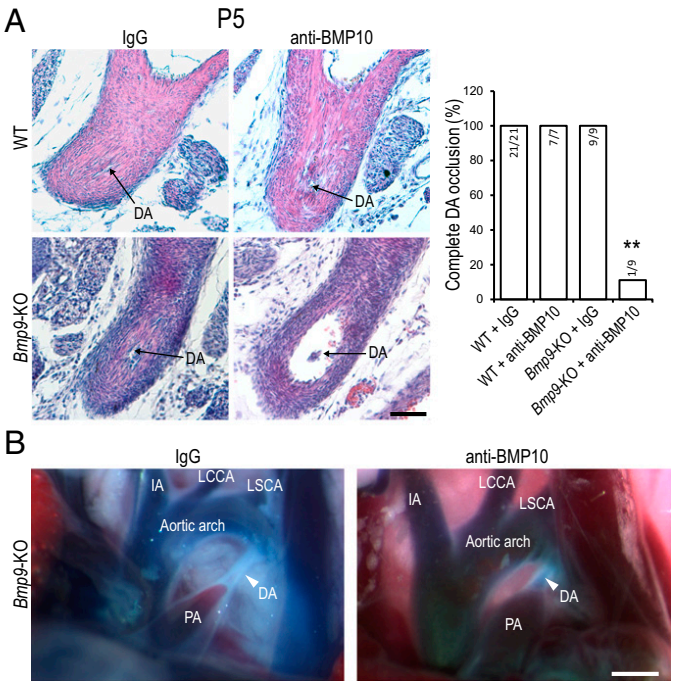


Fig. 1. *Bmp9*-KO pups treated with an anti-BMP10 antibody have an open ductus arteriosus (DA) at P5. *Bmp9*-KO pups were treated at P1 and P3 with IgG or an anti-BMP10 antibody and killed at P5. (*A*) Representative hematoxylin and eosin (H&E) staining of transverse sections of DA. WT pups treated with IgG ($n = 21$) from 10 littermates or with anti-BMP10 ($n = 7$) from 3 littermates; *Bmp9*-KO pups treated with IgG ($n = 9$) from 7 littermates or with anti-BMP10 ($n = 9$) from 6 littermates. (Scale bars: 50 μm.) The graph bar indicates the number of mice with complete DA occlusion over the total number of mice investigated. The Fisher's exact test was used to compare the different groups (**$P \leq 0.01$). (*B*) Representative angiographic images after Evans blue injection of the great arteries and the DA. B*mp9*-KO pups treated with IgG ($n = 3$) or with anti-BMP10 ($n = 5$) from 3 littermates. IA, innominate artery; LCCA, left common carotid artery; LSCA, left subclavian artery; PA, pulmonary artery. (Scale bars: 500 μm.)

PDA in two patients. This work thus identifies a previously unidentified signaling pathway, the BMP9/10 pathway, in the anatomical closure of the DA.

Results

Injection of Antibodies Directed Against BMP10 in *Bmp9*-KO Pups Leads to an Open DA at P5. To address the role of BMP9 and BMP10 in postnatal vascular remodeling, we used *Bmp9*-KO pups, which are fine and viable. They were injected at postnatal day 1 (P1) and P3 with a neutralizing anti-BMP10 antibody as previously described (8) because we could not use *Bmp10*-KO pups, which die at midgestation due to cardiac defects (9). We first analyzed transverse sections of the DA at P5 after hematoxylin and eosin (H&E) staining. We found that *Bmp9*-KO pups treated with an anti-BMP10 antibody had an open DA whereas the other pups (WT pups injected or not with an anti-BMP10 antibody or *Bmp9*-KO pups) had a closed DA at P5 (Fig. 1*A*); only 1 out of 9 *Bmp9*-KO pups injected with anti-BMP10 antibody presented a DA with a complete occlusion. This result was confirmed by angiography of the DA after injecting Evans blue in the ventricles. Indeed, whereas we could not detect any dye within the DA of *Bmp9*-KO pups, supporting that this DA is obstructed, we could see some blue dye in the center of the DA of *Bmp9*-KO pups treated with anti-BMP10 antibody, confirming that, in this case, the DA is open (Fig. 1*B*). Similar results were obtained with another anti-BMP10 neutralizing antibody developed in our laboratory (Fig. S1*A*). The specificity of these two neutralizing BMP10 antibodies versus other BMPs was also checked (Fig. S1*B*).

***Bmp9* Knockout Leads to Abnormal Closure of the DA at P4.** DA closure in mice has been shown to take place within a time frame of 1–3 h after birth (1). To understand what happened in these pups, we analyzed their DA at P0 (i.e., at least 8 h after birth), P3, and P4 through staining of semithin sections. In WT pups at P0, the center of the DA as delineated by the internal elastic lamina (IEL) was filled by cuboidal cells, which have previously been designated as intimal cells (ICs) because the nature of these cells is not clearly understood (1). These ICs were bordered by several layers of vascular smooth muscle cells (VSMCs) and elastic lamina (EL) (Fig. 2*A*). No difference could be detected at P0 between WT and *Bmp9*-KO pups, demonstrating that the absence of BMP9 did not affect the closure of the DA at this time point (Fig. 2*A*). At P3, WT, *Bmp9*-KO, and *Bmp9*-KO pups treated with an anti-BMP10 antibody still presented a closed DA (Fig. 2*B*). On the other hand, at P4, we observed major differences between these pups (Fig. 2*C*). Indeed, in contrast to WT pups, the center of the DA of *Bmp9*-KO pups was not completely

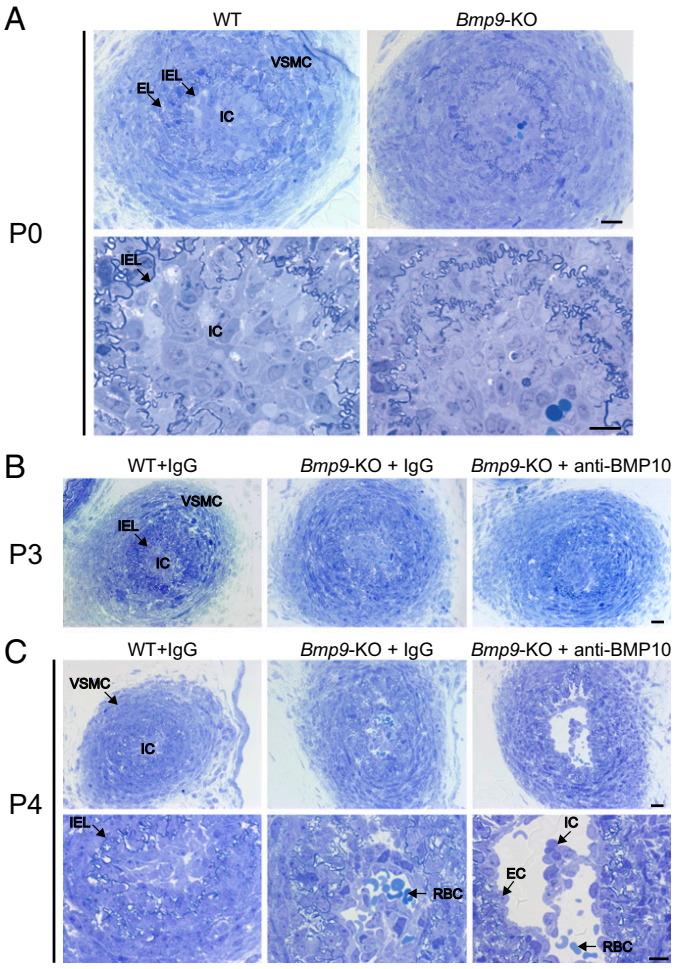


Fig. 2. Abnormal closure of the DA in *Bmp9*-KO pups at P4. Representative semithin transverse sections. (*A*) WT pups and *Bmp9*-KO pups were killed at P0. The DA center was filled with ICs, encircled by the IEL (the tortuous dark blue ribbon, seen at higher magnification) and surrounded by several layers of VSMCs and EL. (*B* and *C*) WT pups and *Bmp9*-KO pups were treated at P1 and P3 with IgG or an anti-BMP10 antibody and killed at P3 (*B*) or P4 (*C*). EC, endothelial cells; EL, elastic lamina; IC, intimal cells; IEL, internal elastic lamina; RBC, red blood cells; VSMC, vascular smooth muscle cells. [Scale bars: *A* and *C*, 20 μm (low magnification) and 10 μm (high magnification); *B*, 20 μm.]

filled with ICs, and red blood cells (RBCs) could be observed. This phenotype was exacerbated in *Bmp9*-KO pups treated with an anti-BMP10 antibody (Fig. 2*C*): the lumen was open, lined with a layer of flattened cells that looked like endothelial cells (ECs), and RBCs and islets of ICs could be detected in the lumen (Fig. 2*C*). Semithin cross-sections through the entire length of the DA and quantification of the remaining lumen area confirmed these results (Fig. S2). Taken together, these data demonstrate that injection of a neutralizing anti-BMP10 antibody to *Bmp9*-KO pups led to a reopening of the DA at P4. We could not determine whether this open DA eventually closes later on because *Bmp9*-KO pups treated with anti-BMP10 antibodies died between P4 and P6. We next asked whether the reopening process was time-dependent and thus treated *Bmp9*-KO pups with anti-BMP10 antibody at later times (P3 and P5). Interestingly, we did not observe a reopening of the DA at P6 or P7, demonstrating that BMP9 and BMP10 are critical during a short time window (between P1 and P3) for the proper remodeling of the DA into an irreversibly obstructed vessel.

***Bmp9* Knockout Leads to a Defect in DA Wall Thickening at Birth.** To better address the role of BMP9 in DA closure, we examined the first events associated with the closure. For this purpose, we performed a kinetic analysis of DA closure (0–5 h) in WT and *Bmp9*-KO pups immediately after caesarian section. As shown in Fig. 3*A*, the DA of both WT and *Bmp9*-KO pups was closed within 3 h after caesarian section. These data demonstrated that *Bmp9* inactivation did not affect functional closure of the DA.

Wall thickening is an important feature in the process of anatomical closure of the DA, which starts around birth in mice (1). We observed that DA wall thickness increased within the first hour after birth in WT pups whereas this increase was significantly reduced in *Bmp9*-KO pups (Fig. 3*B*). We next analyzed the DA of newborn pups at P0. Similarly, DA diameter was significantly reduced in *Bmp9*-KO pups versus WT pups (Fig. 3*C*). Hyaluronan (HA) production under the control of prostaglandins has been recently described to play a key role in DA closure (10). We therefore tested whether hyaluronan synthases (HAS) and cyclooxygenases (COX1 and -2), which were described as being the key enzymes for prostaglandin production in the DA (11), could be targets of BMP9 or BMP10 in endothelial cells [human pulmonary arterial endothelial cells (HPAECs)]. We found that BMP9 and BMP10 strongly increased *COX2* mRNA levels after 2 h stimulation whereas it did not affect *COX1* mRNA expression (Fig. 3*D*). HA is synthesized by three isoforms of HAS (HAS1, HAS2, and HAS3); we therefore studied mRNA expression of these three enzymes. Both *HAS2* and *HAS3* were detected in HPAECs whereas *HAS1* mRNA was not detectable. Interestingly, BMP9 and BMP10 were found to strongly increase *HAS2* mRNA levels after 4 h stimulation whereas it did not affect *HAS3* mRNA expression (Fig. 3*D*).

BMP9 and BMP10 Are Necessary for Matrix Deposition During DA Remodeling. To understand why the DA reopens in *Bmp9*-KO pups treated with anti-BMP10 antibodies, we analyzed transmission electron microscopy (TEM) images of the center of the DA at P0, P3, and P4. At P0, as previously described on semithin sections (Fig. 2*A*), the center of the DA was filled with compact cuboidal, referred to as ICs, and no difference could be detected between WT and *Bmp9*-KO pups (Fig. 4*A*). These cells were in both cases highly synthetic, containing abundant rough endoplasmic reticulum, and tiny desmosome-like junctions (DLJs) were occasionally observed between cells (see *Insets* in Fig. 4*A*). At P3, in WT pups, numerous ICs were surrounded by matrix deposition (MD) (Fig. 4*B*), which could not be detected at P0 (Fig. 4*A*). Interestingly, in contrast to WT pups, we could not detect MD between ICs at P3 in *Bmp9*-KO pups treated with an anti-BMP10 antibody whereas DLJ could still be observed (Fig. 4*B*). *Bmp9*-KO pups, at P3, gave an intermediary phenotype with areas of ICs with MD and areas without. At P4, in WT pups, nearly all of the cells within the DA center were surrounded with MD (Fig. 4*C*). In contrast, at P4, the DA of *Bmp9*-KO pups treated with an anti-BMP10 antibody was open, and, interestingly, this lumen was lined with a layer of flattened endothelial cells (ECs), tightly connected, polarized toward the lumen and containing Weibel–Palade bodies (WPBs) (Fig. 4*C*). Similar features, although not as pronounced, were observed in *Bmp9*-KO pups treated with IgG (Fig. 4*C*). Several extracellular matrix (ECM) proteins have been described to be involved in DA closure, among which is fibronectin (12). Because we observed defect in matrix deposition in *Bmp9*-KO mice, we tested whether

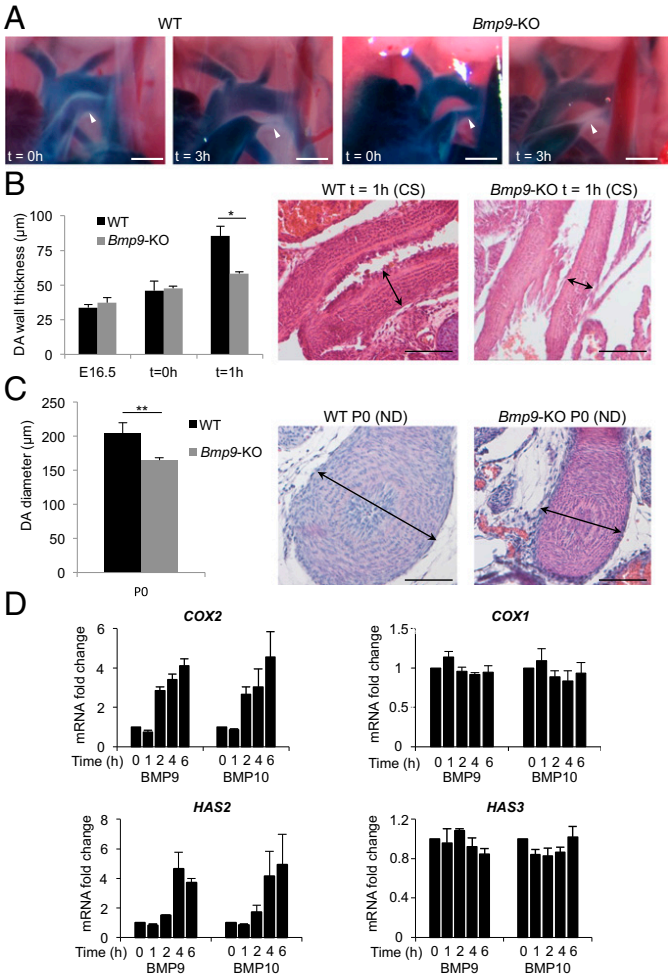


Fig. 3. Thickening defects in the DA of *Bmp9*-KO mice after birth. (*A*) Representative angiographic images of the DA (arrowhead) after Evans blue injection in the ventricles after caesarian section at term (E18.5, $t = 0$ h) and 3 h later ($t = 3$ h) in WT and *Bmp9*-KO pups. (WT, $n = 2$, $n = 2$, and *Bmp9*-KO, $n = 2$, $n = 2$, respectively from two littermates). (Scale bars: 500 μm.) (*B*) Quantification of the DA wall thickness in WT and B*mp9*-KO pups at E16.5, immediately after caesarian section (CS) at term (E18.5, $t = 0$ h) and 1 h later ($t = 1$ h) (WT, $n = 7$, $n = 4$, $n = 3$ and *Bmp9*-KO, $n = 5$, $n = 5$, $n = 3$, respectively) of H&E-stained longitudinal sections (representative images of 1 h after CS are shown). (Scale bars: 100 μm.) (*C*) Quantification of the DA diameter at P0 in WT and *Bmp9*-KO pups born by natural delivery (ND) ($n = 6$ in each group) of H&E-stained transverse sections of the DA (representative images are shown). (Scale bars: 100 μm.) $^{**}P \leq 0.01$ and $^{*}P \leq 0.05$ significantly different. (*D*) mRNA fold changes of *COX2*, *COX1*, *HAS2*, and *HAS3* expression in HPAECs stimulated with BMP9 or BMP10 (0.5 ng/mL). The results are represented as mRNA fold changes measured in BMP9- or BMP10-treated cells versus untreated cells at each time point. Data are the mean ± SEM from three independent experiments conducted in duplicate.

BMP9 and BMP10 could regulate the protein expression of fibronectin and also type I collagen. We found that BMP9 and BMP10 strongly induced the expression of fibronectin in endothelial cells whereas they did not affect the expression of type I collagen (Fig. 4*D*). Quantitative RT-PCR of isolated DA demonstrated the presence of the receptors ALK1, BMPR2, and ActR2A and the coreceptor endoglin, supporting that cells from the DA can respond to the BMP9/BMP10 signaling pathway (Table S1). Accordingly, 48-h BMP9 treatment of ex vivo cultures of great arteries (i.e., DA, PA, and aortic arch) induced the expression of the specific transcription factor inhibitor of differentiation 1 (Id1) and fibronectin (Fig. 4*E*).

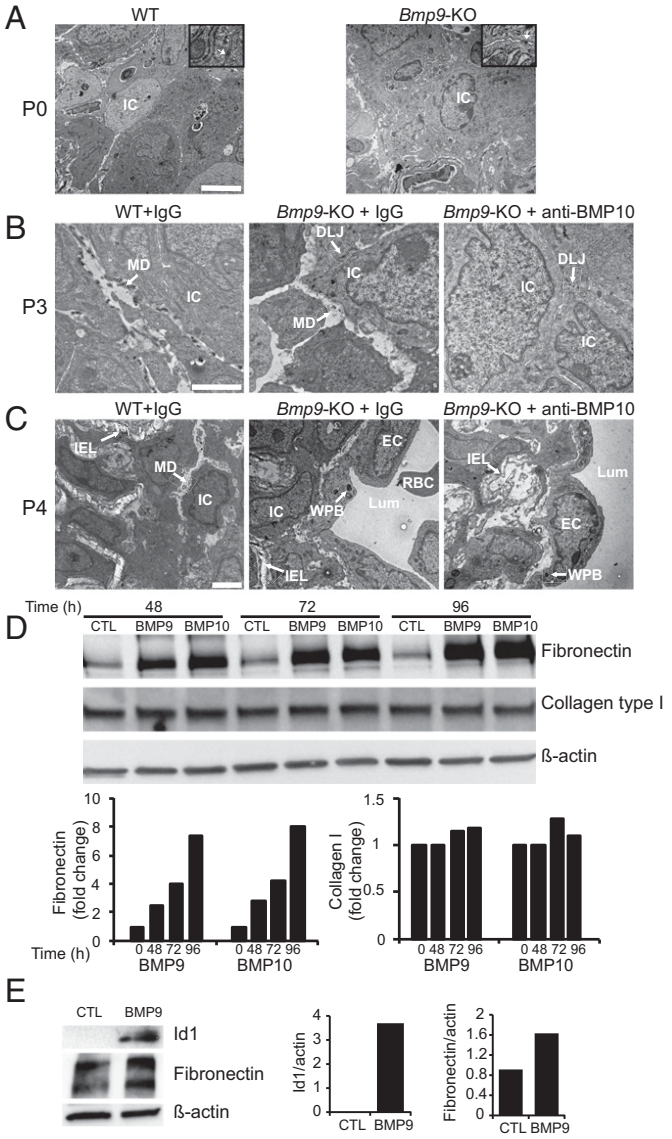


Fig. 4. BMP9 and BMP10 are necessary for matrix deposition during DA remodeling. (*A*–*C*) Transmission electron microscopy (TEM) images of the DA center. (*A*) At P0 in WT and *Bmp9*-KO pups. (Scale bar: 5 μm.) (*Insets*) Sevenfold higher magnifications (white arrows show desmosome-like junctions (DLJs). (*B*) At P3 in WT pups and *Bmp9*-KO pups treated at P1 with IgG or an anti-BMP10 antibody. (Scale bar: 2 μm.) (*C*) At P4 in WT pups and *Bmp9*-KO pups treated at P1 and P3 with IgG or an anti-BMP10 antibody. (Scale bar: 2 μm.) DLJ, desmosome-like junctions; EC, endothelial cells; IC, intimal cells; IEL, internal elastic lamina; Lum, Lumen; MD, matrix deposition; RBC, red blood cells; WPB, Weibel–Palade bodies. (*D*) HPAECs were incubated with or without BMP9 or BMP10 (10 ng/mL) for the indicated times. (*E*) WT great arteries (pool of three pups), dissected at P1, were stimulated with or without BMP9 (10 ng/mL) for 48 h. (*D* and *E*) Cell lysates (20- and 10-μg proteins, respectively) were resolved by SDS/PAGE and immunoblotted with antibodies against fibronectin, collagen type I, Id1, and β-actin. Quantifications of the Western blots normalized to β-actin are shown (one representative experiment out of four and two, respectively).

BMP9 and BMP10 Are Involved in the Process of DA Anatomical Closure. We next addressed what was the origin of the ICs that filled the center of the DA at P0. For this purpose, we performed double immunofluorescence staining for CD31, also known as PECAM, an endothelial specific marker and fibronectin. We found that, at P0, the majority of ICs were CD31-positive, supporting that ICs are endothelial cells (ECs) (Fig. 5*A*). Analysis of the center of the DA between P0 and P5 clearly demonstrated that the number of $CD31^+$ cells significantly decreased with time. Inversely, fibronectin staining within the DA center increased from P0 to P5, supporting that fibronectin is one of the protein of the MD (Fig. 5*A*). We next searched for the mechanism responsible for the loss of ECs in the DA center. Apoptotic ECs, identified via active caspase 3 staining, and dense fragmented nuclei (white arrows) could already be detected at P0 (Fig. 5*B*, *Left*). Apoptosis was further supported by TEM images; picnotic nuclei (white asterisk) and apoptotic bodies (black arrow) could be identified (Fig. 5*B*, *Middle*). We also observed, on TEM images, large double-membrane vesicles that resembled autophagosomes (white asterisk, Fig. 5*B*, *Right*). Thus, EC loss could be at least partially due to cell death.

The center of the DA can be delineated by elastin staining, which decorates all elastic lamina, including the IEL. Interestingly, costaining of the DA at P5 with an antibody directed against elastin, and CD31 or the mesenchymal marker α smooth muscle actin (α-SMA), revealed that, within the DA center, the remaining CD31 cells were surrounded by α-SMA–positive cells (Fig. 5*C*, *Left*). This result suggested that some ECs had acquired a mesenchymal phenotype. Indeed, we detected as soon as P0 some cells that expressed both CD31 and α-SMA (white arrowhead) reflecting early endothelial-to-mesenchymal transition (endMT) (Fig. 5*C*, *Middle*). This result was further supported by TEM image: Fig. 5*C*, *Right* shows a polarized EC cell (cell 1) facing the lumen still connected (white arrowhead) to another cell (cell 2) acquiring a mesenchymal phenotype surrounded by MD (asterisks).

Interestingly, the number of CD31-positive cells at P3 in *Bmp9*-KO pups injected with anti-BMP10 antibodies was significantly higher than in WT pups, suggesting an impairment in the decrease of ECs under these conditions (Fig. 5*D*). This result was further supported by measuring the expressions of CD31 and p120-catenin, a cytoplasmic scaffold protein binding to VE-cadherin that determines the stability of adheren junctions (13), which were higher in *Bmp9*-KO pups injected with anti-BMP10 antibodies versus WT pups (Fig. 5*E*). Taken together, these results support that BMP9 and BMP10 could take part in a process of endMT occurring during DA vascular remodeling.

BMP9 and BMP10 Up-Regulate the Expression of Transcription Factors Involved in endMT. To further support this hypothesis and to extend our findings beyond the KO mouse, we analyzed the effect of BMP9 and BMP10 in HPAECs on the expression of transcription factors known to be involved in the process of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) and endMT (14). We found that BMP9 and BMP10 very rapidly (within 1 h) and transiently up-regulated (between four- and sevenfold) the expression of *SNAI1* and *SNAI2* (Fig. 6 *A* and *B*). Interestingly, BMP9 and BMP10 also up-regulated the expression of *ZEB2, TWIST1*, and *FOXC2,* although in a delayed manner in comparison with *SNAI1* and *SNAI2*, without affecting the expression of *ZEB1* (Fig. 6 *C*–*F*).

Identification of a Deleted Minimal Critical Region Linked with Patent Ductus Arteriosus in Humans. Several genes and chromosomal deletions have been associated with PDA (4, 15). We therefore

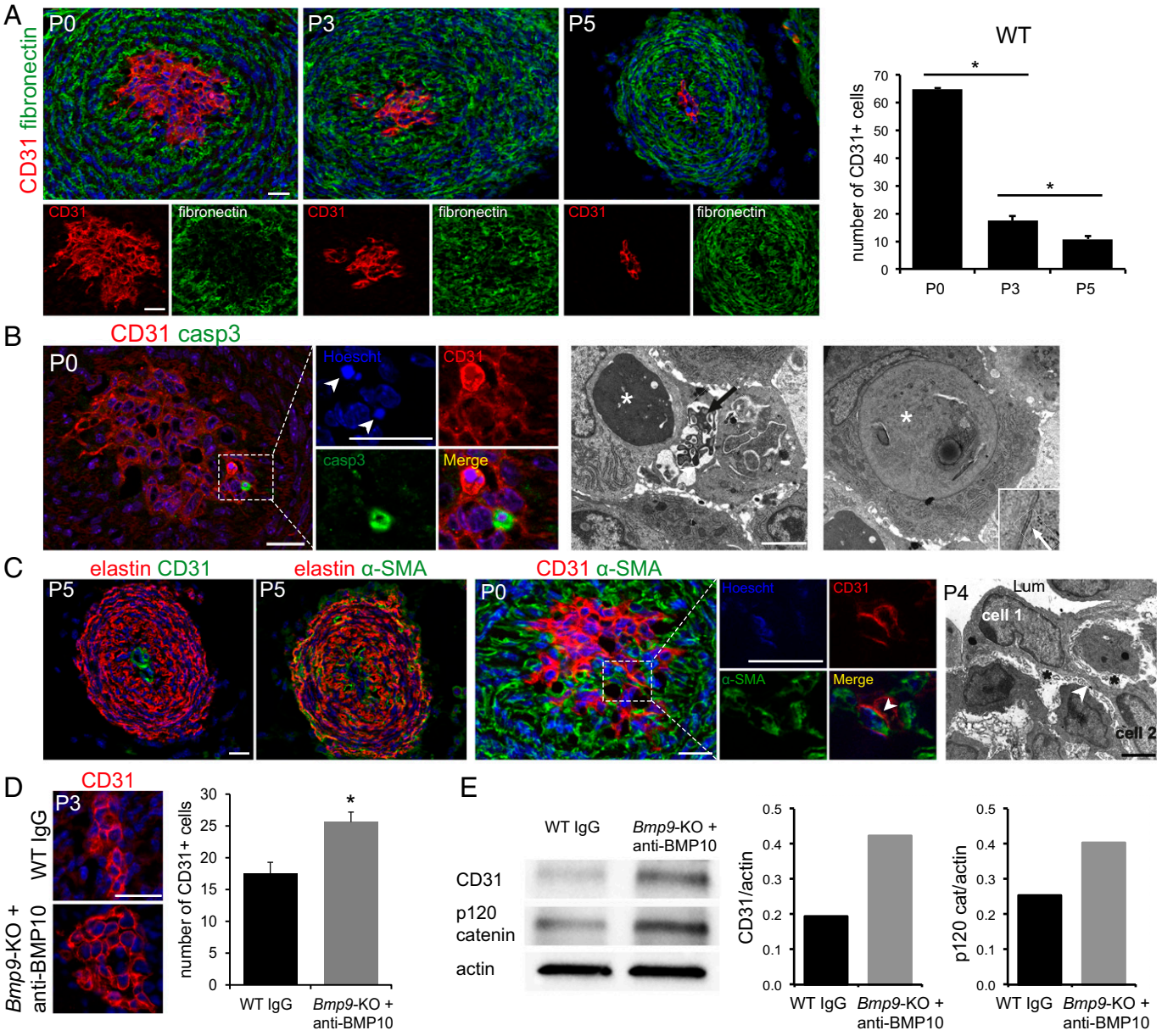


Fig. 5. BMP9 and BMP10 are involved in the process of DA anatomical closure. (*A*) Representative immunofluorescence staining of CD31 and fibronectin of a WT DA at P0, P3, and P5 and higher magnifications. The graph bar indicates the number of CD31$^+$ cells (P0 $n = 3$ from two littermates, P3 $n = 6$ from four littermates, and P5 $n = 3$ from two littermates), data are the mean ± SEM. (*B*) Active caspase-3 staining (*Left*) and higher magnifications, and TEM images. (*Middle*) Picnotic nuclei (white asterisk) and apoptotic bodies (black arrow). (*Right*) Double-membrane vesicle that could correspond to an autophagosome (white asterisk). (*Inset*) A higher magnification (white arrow shows the double-membrane). (*C*) Double immunofluorescence staining of elastin and CD31, elastin and α-SMA, and CD31 and α-SMA, and higher magnifications (white arrowhead pointing a double CD31 and α-SMA–positive cell), and TEM image of the DA center (*Right*) showing a cell (cell 1) polarized facing the lumen (Lum) connected (arrow) to another cell (cell 2) acquiring a mesenchymal phenotype surrounded by matrix (black asterisks). (*D*) Representative immunofluorescence staining of CD31 at P3 of a WT DA and a *Bmp9*-KO pup treated with anti-BMP10 antibodies at P1. The graph bar indicates the number of CD31$^+$ cells ($n = 6$ from four littermates and $n = 5$ from two littermates, respectively; data are the mean ± SEM). (*E*) Ten micrograms of cell lysates obtained at P3 from WT and *Bmp9*-KO DA injected with anti-BMP10 antibodies at P1 (n = 6 for each sample from three littermates) were resolved by SDS/PAGE and immunoblotted with antibodies against CD31, p120-catenin, and β-actin. Quantifications of the Western blots normalized to β-actin are shown (one representative experiment out of two). (Scale bars: IF, 20 μm and TEM, 5 μm.) *$P \leq 0.05$ significantly different.

looked whether patients with PDA would present a chromosomal deletion of *BMP9* or *BMP10*. The information gathered in the database of genomic variants (DGV) showed the presence of many polymorphic copy number variations (CNVs) in the *BMP9* gene. These data suggest that haploinsufficiency of the *BMP9* gene is not directly involved in a specific disease. In contrast, no polymorphic CNVs including *BMP10* were found. Moreover, we identified two patients with a syndromic PDA that had a large heterozygous deletion including the entire *BMP10* gene, each presenting a PDA among other clinical features (Fig. 7). In patient 1, array-comparative genomic hybridization (CGH) analysis showed a 4.62-Mb deletion in chromosome band 2p14-p13.3 extending from base pair 65,561,711 to 70,187,280 [National Center for Biotechnology Information (NCBI); hg 19] from the 2p telomere (Fig. 7). This 4.62-Mb heterozygous deletion arose de novo because it could not be found in the parental analysis and contained more than 28 known protein-coding genes. Patient 2 also harbored a de novo 7-Mb deletion in chromosome

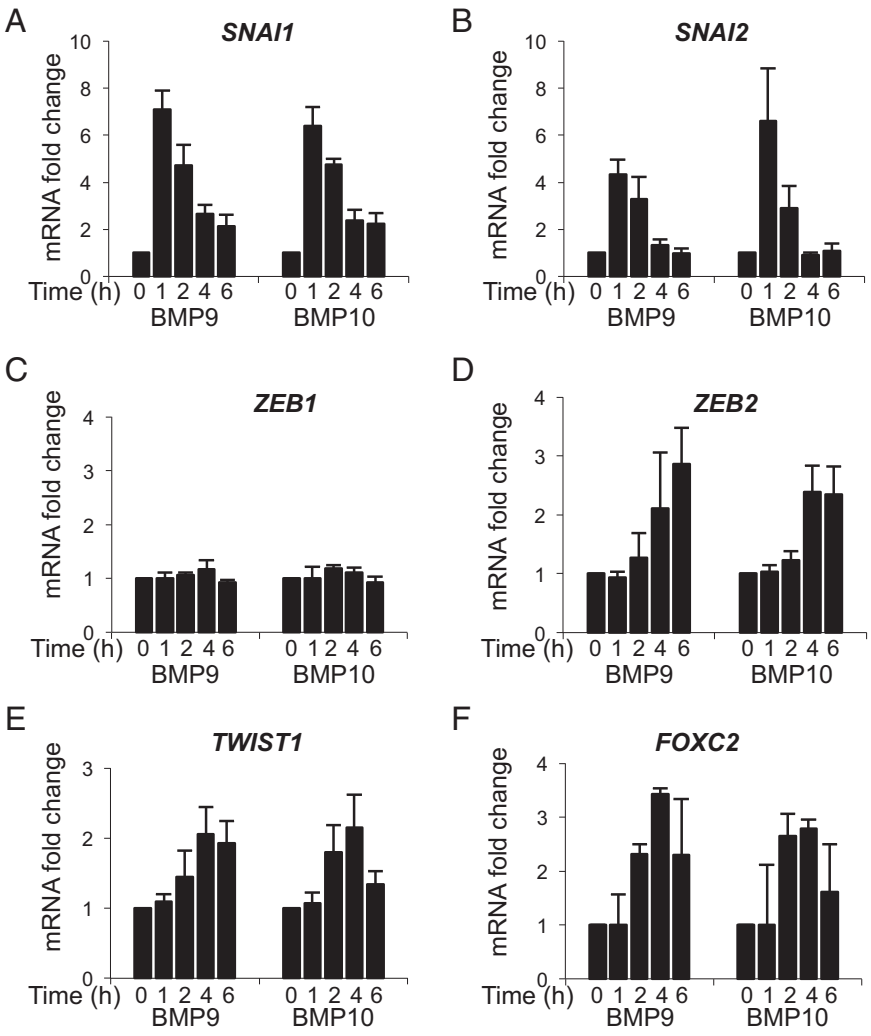


Fig. 6. BMP9 and BMP10 regulate several transcription factors known to be involved in epithelial-to-mesenchymal transition. (*A–F*) HPAECs were stimulated with BMP9 or BMP10 (0.5 ng/mL) for the indicated times. Expression of HPRT was used to normalize the samples. The results are represented as mRNA fold changes measured in BMP9- or BMP-10 treated cells versus nontreated cells at each time point. Data are the mean ± SEM from three independent experiments performed in duplicates.

bands 2p15-p13.3, including about 75 known protein-coding genes. This deletion extended from base pair 63,921,609 to 70,915,279 from the 2p telomere (NCBI; hg 19) (Fig. 7). Six other patients, with several deletions overlapping these two anomalies, but excluding *BMP10*, did not show any cardiac abnormality (no PDA). By collecting all these data, we were able to define a 700-kb minimal critical region (MCR) that correlated with the presence of a PDA. This MCR included *BMP10* among seven other genes (*APLF, PLEK, FBX048, GKN2, PROKR1, CNRIP1, ARHGAP25*). Although preliminary, these results of human genetics provided an additional argument for the involvement of at least BMP10 in the physiopathology of the PDA.

Discussion

This study shows, for the first time, to our knowledge, a critical role for BMP9 and BMP10 in the closure of the DA. This process has been described to occur following two phases, the functional and the anatomical (3). Our data demonstrate that BMP9 is not necessary for the functional closure of the DA. On the other hand, the data reveal that BMP9 is important for proper anatomical closure to occur and that BMP9 can be partially replaced by BMP10. However, if we add an anti-BMP10 antibody to *Bmp9*-KO pups during a specific time window (between P1 and P3), then the anatomical closure process fails and the DA reopens.

Anatomical closure of the DA starts with intimal thickening of the DA. This process is initiated prenatally or at birth, depending on the size of the animal, with the development of intimal cushions, and is completed postnatally by humoral and mechanical stimuli (3, 4). PGE_2 elicits the deposition of HA within the intimal tissue and stimulates the inward migration of VSMCs (10). The present data further support that wall thickening, in mice, starts within the first hour after birth (1). Interestingly, we found that this process is significantly reduced in *Bmp9*-KO, demonstrating that BMP9 is necessary for this step and that it cannot be compensated by BMP10. Several glycoproteins and glycosaminoglycans are involved in wall thickening of the DA. Especially, HA is produced by both ECs and VSMCs, and its deposition creates a hygroscopic environment suitable for cell migration (16, 17). In accordance with a previous study in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) (18), only *HAS2* and *HAS3* mRNA were detected in HPAECs. We showed that BMP9 and BMP10 specifically regulated *HAS2* mRNA expression. This result further supported the work reported by Yokoyama et al., who found that, among the three HAS isoforms, HAS2 was largely responsible for HA production in the DA (10). PGE_2 is the principal activator of HA production in the DA, and COX2 has been described as the most important COX in the closure of the DA (11). Interestingly, we found that *COX2* mRNA expression, but not *COX1*, was strongly induced by BMP9 and

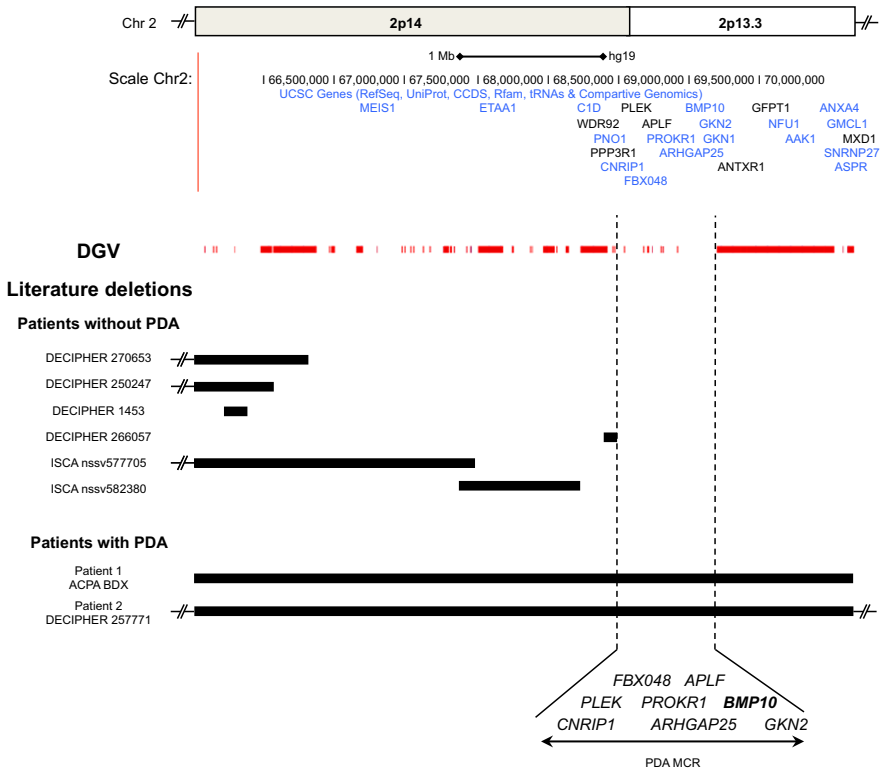


Fig. 7. Identification of a deleted minimal critical region of 700 kb associated with patent ductus arteriosus (PDA) in humans. Schematic representation of the human chromosome region 2p13.3–2p14 using the University of California, Santa Cruz (UCSC) genome browser (genome.ucsc.edu/). (*Upper*) Ideogram of the chromosome region 2p13.3–2p14 with the physical positions of the genes. (*Lower*) All genomic deletions in this region reported in the literature and in our patients are represented with solid black bars. Well-known benign deletions reported in the DGV (Database of Genomic Variants) are represented with solid red bars. The 700-kb minimal critical region (MCR) correlated with the presence of a PDA is highlighted by dashed lines. The candidate genes included in this MCR are highlighted. Interestingly, among them was identified *BMP10* (bold).

BMP10. These data thus suggest that BMP9 and BMP10 are important regulators of HAS2 and COX2 expression and that downregulation of their expression could in part result in the defect in wall thickening observed in *Bmp9*-KO pups.

We show in the present work that, at P0, the DA center, as delineated by the IEL, is filled by endothelial cells (ECs) (Fig. 5), in accordance with the work of Echtler et al. (19). Thus, the intimate cells that obstruct the DA are mostly of endothelial origin. Analyses of TEM images of WT pups showed, at P0, that ECs were arranged densely and compactly. However, at P3, these cells became gradually dissociated from one another and were surrounded by matrix deposition. Fibronectin has been shown to be critical in DA closure and in particular for smooth muscle migration into the subendothelium and intimal cushion formation (12). Our data support that fibronectin is one of the matrix proteins surrounding these intimal cells. Importantly, we show that the number of ECs strongly decreased between P0 and P5. This loss of endothelial cells together with an increase in matrix deposition recalls the process of endMT. This hypothesis is supported by TEM images but also by the coexpression of endothelial and mesenchymal markers within few cells. Still, the loss of ECs from P0 to P5 might not only be due to endMT because apoptosis, as shown by active caspase 3 staining and TEM images, could be observed in the DA in agreement with previous works (20, 21). We also observed on TEM images double-membrane vesicles that resemble autophagosomes and therefore suggest that autophagy could also occur in DA remodeling. Taken together, these data would propose that anatomical remodeling of the DA involves endMT and apoptosis, as depicted in the working model in Fig. 8*A*.

The involvement of the TGFβ family has been previously described in DA remodeling (12, 22, 23). The present work further supports that this signaling family could play a major role in this process. We show here that injection of anti-BMP10 antibodies to *Bmp9*-KO pups during a very short time window (P1 to P3) leads to a reopening of the DA at P4. Analysis of these DA at P3 showed a defect of MD and a higher number of ECs correlated to an increase in the expression of CD31 and p120-catenin proteins. In parallel, we found that BMP9 and BMP10 induced the expression of fibronectin in isolated HPAECs but also in isolated DA. We also found that BMP9 and BMP10 strongly induced the mRNA expression of several transcription factors (*SNAI1, SNAI2, ZEB2, TWIST1*, and *FOXC2*) known to be important in the initiation of EMT or endMT (14). In accordance, it has already been described that BMP9 and BMP10 transiently induce the expression of *HEY1, HEY2*, and *HES1* (8, 24), which are transcription factors of the Notch signaling pathway also known to be involved in EMT (14). Taken together, these data allow us to propose that, in *Bmp9*-KO pups injected with anti-BMP10 antibody (P1 and P3), ECs fail to go through a transition into a mesenchymal-like phenotype, and this defect of remodeling leads to loose cell interactions that will result in the reopening of the DA. This working model, which calls for further work to be validated, is presented in Fig. 8*B*. Our data further support the involvement of the BMP signaling pathway in endMT. Indeed, although TGFβ is one of the most potent inducers of EMT (14), the role of BMPs is still not completely clear (25). BMPs have been described as either inhibitors of endMT (BMP7 in cardiac fibrosis) (26) or inducers of endMT [BMP6 in cerebral cavernous malformations (27) and BMP2 in cardiac valve formation (28)]. BMP9 has been recently shown to induce EMT in hepatocellular carcinoma cells (29), and our data support that BMP9 and BMP10 can also induce endMT.

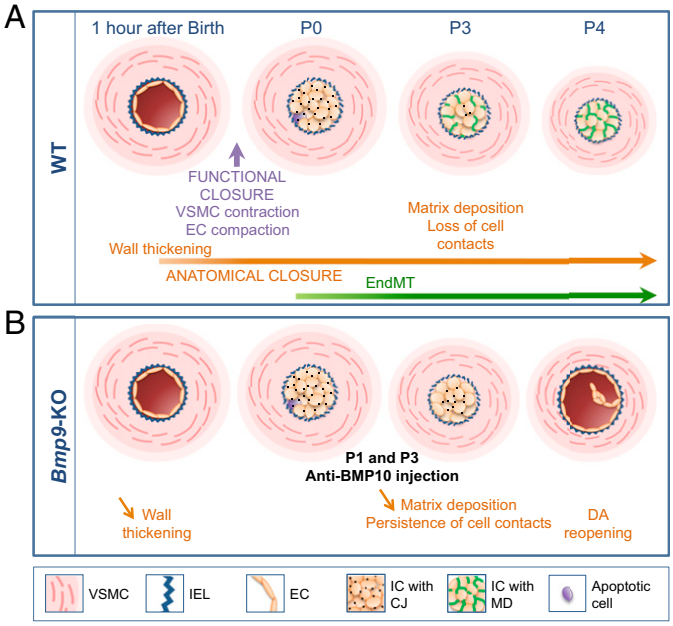


Fig. 8. A schematic working model of DA closure in WT and *Bmp9*-KO pups treated with anti-BMP10 antibodies. (*A*) In WT pups, functional closure occurs within 3 h after birth due to VSMC contraction and EC compaction. Anatomical closure encompasses wall thickening that starts within the first hour after birth and vascular remodeling, which takes several days. At P0, the DA center is filled by cuboidal intimal cells (ICs) that we show here to be endothelial cells (ECs). These ECs are connected to each other by cell junctions (CJs). These ECs will rapidly lose their intercellular contacts (P3) and increase their matrix deposition (MD): We propose that this process involves endothelial-to-mesenchymal transition (endMT). A few apoptotic cells within the center of the DA could also be found. (*B*) In *Bmp9*-KO pups, functional closure normally occurs. The first steps of anatomical closure, corresponding to wall thickening and vascular remodeling, are partially affected. Injection of anti-BMP10 antibodies to these pups seems to exacerbate this imperfect vascular remodeling, resulting in the persistence of cell contacts with CJs, the absence of MD between ICs at P3, and the maintenance of CD31-positive cells. We propose that the observed defect in anatomical closure occurs through endMT inhibition. In the absence of endMT, subjected to the pressure of blood flow, these ECs will return to a flattened phenotype and will ultimately lead to the reopening of the DA at P4.

PDA in human infants can be divided into two groups: a common condition present in very preterm infants that would not be present if these infants had been born at term and a relatively rare condition seen in term infants that is associated with genetic abnormalities. In this case, PDA exists as part of a constellation of other physical anomalies. Online Mendelian Inheritance in Man (www.ncbi.nlm.nih.gov/omim) lists more than 100 disorders in which PDA is found, supporting the idea that single genes can contribute to syndromic PDA (15). The presence of a PDA with only minor cardiac defects has been particularly well-characterized with mutations in three genes (*MYH11, ACTA2, TFAP2B*) (15). In the present study, genetic analysis in national and international databases allowed us to define a 700-kb minimal critical region (MCR) including *BMP10* along with only seven other genes (*APLF, PLEK, FBX048, GKN2, PROKR1, CNRIP1, ARHGAP25*). These results provided an additional argument for the involvement of BMP10 in the physiopathology of PDA. However, these encouraging results require confirmation and further molecular analyses of the *BMP10* gene in a larger cohort of patients with isolated PDA. It is interesting to note that mutations in the TGFβ signaling pathway have been previously associated with PDA, such as in Loeys–Dietz syndrome (4).

Our research emphasizes the role of the TGFβ family and more particularly of BMP9 and BMP10 in vascular development and postnatal vascular remodeling. In addition to their roles in lymphatic development, cardiac development, and postnatal retinal vascularization (8, 30, 31), we now show that BMP9 and BMP10 are also important for the closure of the DA. This result is in accordance with the high circulating levels of BMP9 and BMP10 in mice around birth (7, 8). It will be interesting in the future to measure circulating levels of BMP9 and BMP10 in term and preterm infants to test whether there is also an increase in these two factors around birth, and whether we can correlate the circulating levels of these BMPs with the risk of PDA.

Research on PDA has already provided clinical applications. Nevertheless, management of premature infants with PDA remains troublesome and calls for alternative approaches to the prostaglandin E_2 inhibitors now in use (32). The involvement of BMP9 and BMP10 in the anatomical closure of the DA process is an important finding with potential clinical applications in the management of this pathology.

Materials and Methods

Mice. All animal studies were approved by the institutional guidelines and those formulated by the European Community for the Use of Experimental Animals. Heterozygous offspring of chimeras were mated out of nine generations to C57BL6/J as previously described (8). Anti-BMP10 (15 mg/kg, MAB2926; R&D Systems; or clone 13C11; from our laboratory) monoclonal antibodies or control IgG were injected intraperitoneally (i.p.) in mice at P1 and P3. Pups were killed at P0, P3, P4, or P5. Preterm and term fetuses were delivered by cesarean section at 16.5 and 18.5 d postcoitum, respectively. For the later, corresponding to a few hours before natural delivery, pups were killed every hour (until 5 h) for histological analysis.

Microscopy. For light microscopy and immunofluorescence, embryos from embryonic day 16.5 (E16.5) and E18.5 obtained after Caesarean section and pups from P0 and P5 were fixed in 4% (wt/vol) paraformaldehyde overnight at 4 °C and embedded in OCT for frozen sections or in paraffin. Frozen sections were stained using antibodies to fibronectin (AB2033; Millipore), CD31 (clone MEC13; BD), α-SMA (A5228; Sigma), elastin (PR385, tropoelastin; Elastin Products), and active caspase-3 (AF835; R&D Systems) and paraffin sections using antibodies to CD31 (53332, Anaspec; Eurogentec). For transmission electron microscopy, chest cavities of P0, P3, and P4 mice were filled with 2.5% (wt/vol) glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate (pH 7.2), and DA were then dissected and fixed overnight at 4 °C. Semithin (0.5-μm) and thin (90-nm) sections were observed by light and electron microscopy, respectively. For further details, see *SI Materials and Methods*.

Endothelial Cell Culture, Treatment, Quantitative Real-Time PCR, and Western Blot Analysis. Human pulmonary arterial endothelial cells (HPAECs) were stimulated with recombinant human BMP9 or BMP10 (R&D Systems), and Real-Time PCR (RT-PCR) and Western blot analyses were performed as indicated in *SI Materials and Methods*.

Protein Extraction from DA. To study the ex vivo effect of BMP9 on the DA, great arteries (including the DA and the aortic arch arteries) were dissected from WT pups at P1 after killing by decapitation. Great arteries were cultured for 48 h in DMEM with or without BMP9 (10 ng/mL), and then lysed in radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer. At least three great arteries were pooled for each condition.

To study the in vivo effect of anti-BMP10 injection at P1 in *Bmp9*-KO pups versus WT pups treated with IgG, isolated DA were dissected at P3 from killed pups after decapitation. At least six DA were pooled for each condition.

In both cases, proteins were extracted using Precellys lysing tubes and analyzed by Western blot as indicated in *SI Materials and Methods*.

Human Genomic Analysis. All samples were obtained from subjects after an institutional review board approved informed consent (DGS 2004/0341). The study protocol was approved by the Grenoble institutional review board (IRB no. 6705). A search for individuals carrying CNVs encompassing *BMP9* or *BMP10* genes was made in French (AchroPuce) and international databases [Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources (DECIPHER) and (International Standards for Cytogenomic Arrays Consortium (ISCA)] of patients and healthy controls (DGV) analyzed by array-CGH. For further details, see *SI Materials and Methods*.

Statistical Analysis. Statistical data analysis was assessed using the Mann–Whitney test or Fisher's exact test, as indicated.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank the animal unit staff at Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant (iRTSV) for animal husbandry, Dr. S. J. Lee (Johns Hopkins University School of Medicine) and Dr. T. Zimmers (Thomas Jefferson University) for providing the *Bmp9*$^{-/-}$ mice, and Dr. O. Filhol and M. Prioux for sharing some PCR primers. This work was supported by INSERM (U1036), CEA, Université Joseph Fourier (UJF), Association pour la Recherche sur le Cancer Grant SFI20111203720, the Groupement d'Entreprises Françaises de Lutte Contre le Cancer (GEFLUC) Dauphiné-Savoie, the Ligue Contre le Cancer de la Loire et de la Savoie, Association Maladie de Rendu-Osler (AMRO), and a Fondation Lefoulon-Delalande postdoctoral grant (to D.C.).

1. Tada T, Kishimoto H (1990) Ultrastructural and histological studies on closure of the mouse ductus arteriosus. *Acta Anat (Basel)* 139(4):326–334.
2. Bergwerff M, DeRuiter MC, Gittenberger-de Groot AC (1999) Comparative anatomy and ontogeny of the ductus arteriosus, a vascular outsider. *Anat Embryol (Berl)* 200(6):559–571.
3. Coceani F, Baragatti B (2012) Mechanisms for ductus arteriosus closure. *Semin Perinatol* 36(2):92–97.
4. Bökenkamp R, DeRuiter MC, van Munsteren C, Gittenberger-de Groot AC (2010) Insights into the pathogenesis and genetic background of patency of the ductus arteriosus. *Neonatology* 98(1):6–17.
5. Bailly S (2014) BMP9, BMP10 and ALK1: An emerging vascular signaling pathway with therapeutic applications. *Molecular Mechanisms of Angiogenesis: From Ontogenesis to Oncogenesis*, eds Feige JJ, Pagès G, Soncin F (Springer, Paris), pp 99–119.
6. David L, Mallet C, Mazerbourg S, Feige JJ, Bailly S (2007) Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood* 109(5):1953–1961.
7. Bidart M, et al. (2012) BMP9 is produced by hepatocytes and circulates mainly in an active mature form complexed to its prodomain. *Cell Mol Life Sci* 69(2):313–324.
8. Ricard N, et al. (2012) BMP9 and BMP10 are critical for postnatal retinal vascular remodeling. *Blood* 119(25):6162–6171.
9. Chen H, et al. (2004) BMP10 is essential for maintaining cardiac growth during murine cardiogenesis. *Development* 131(9):2219–2231.
10. Yokoyama U, et al. (2006) Chronic activation of the prostaglandin receptor EP4 promotes hyaluronan-mediated neointimal formation in the ductus arteriosus. *J Clin Invest* 116(11):3026–3034.
11. Loftin CD, et al. (2001) Failure of ductus arteriosus closure and remodeling in neonatal mice deficient in cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(3):1059–1064.
12. Rabinovitch M (1996) Cell-extracellular matrix interactions in the ductus arteriosus and perinatal pulmonary circulation. *Semin Perinatol* 20(6):531–541.
13. Ranchoux B, et al. (2015) Endothelial-to-mesenchymal transition in pulmonary hypertension. *Circulation* 131(11):1006–1018.
14. Lamouille S, Xu J, Derynck R (2014) Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15(3):178–196.
15. Hajj H, Dagle JM (2012) Genetics of patent ductus arteriosus susceptibility and treatment. *Semin Perinatol* 36(2):98–104.
16. De Reeder EG, et al. (1988) Hyaluronic acid accumulation and endothelial cell detachment in intimal thickening of the vessel wall: The normal and genetically defective ductus arteriosus. *Am J Pathol* 132(3):574–585.
17. Boudreau N, Turley E, Rabinovitch M (1991) Fibronectin, hyaluronan, and a hyaluronan binding protein contribute to increased ductus arteriosus smooth muscle cell migration. *Dev Biol* 143(2):235–247.
18. Vigetti D, et al. (2010) Proinflammatory cytokines induce hyaluronan synthesis and monocyte adhesion in human endothelial cells through hyaluronan synthase 2 (HAS2) and the nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) pathway. *J Biol Chem* 285(32):24639–24645.
19. Echtler K, et al. (2010) Platelets contribute to postnatal occlusion of the ductus arteriosus. *Nat Med* 16(1):75–82.
20. Tananari Y, et al. (2000) Role of apoptosis in the closure of neonatal ductus arteriosus. *Jpn Circ J* 64(9):684–688.
21. Imamura S, Nishikawa T, Hiratsuka E, Takao A, Matsuoka R (2000) Behavior of smooth muscle cells during arterial ductal closure at birth. *J Histochem Cytochem* 48(1):35–44.
22. Boudreau N, Clausell N, Boyle J, Rabinovitch M (1992) Transforming growth factor-beta regulates increased ductus arteriosus endothelial glycosaminoglycan synthesis and a post-transcriptional mechanism controls increased smooth muscle fibronectin, features associated with intimal proliferation. *Lab Invest* 67(3):350–359.
23. Tannenbaum JE, et al. (1995) Transforming growth factor beta 1 inhibits fetal lamb ductus arteriosus smooth muscle cell migration. *Pediatr Res* 37(5):561–570.
24. Larrivée B, et al. (2012) ALK1 signaling inhibits angiogenesis by cooperating with the Notch pathway. *Dev Cell* 22(3):489–500.
25. Medici D, Kalluri R (2012) Endothelial-mesenchymal transition and its contribution to the emergence of stem cell phenotype. *Semin Cancer Biol* 22(5-6):379–384.
26. Zeisberg EM, et al. (2007) Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med* 13(8):952–961.
27. Maddaluno L, et al. (2013) EndMT contributes to the onset and progression of cerebral cavernous malformations. *Nature* 498(7455):492–496.
28. Luna-Zurita L, et al. (2010) Integration of a Notch-dependent mesenchymal gene program and Bmp2-driven cell invasiveness regulates murine cardiac valve formation. *J Clin Invest* 120(10):3493–3507.
29. Li Q, et al. (2013) Bone morphogenetic protein-9 induces epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Sci* 104(3):398–408.
30. Levet S, et al. (2013) Bone morphogenetic protein 9 (BMP9) controls lymphatic vessel maturation and valve formation. *Blood* 122(4):598–607.
31. Chen H, et al. (2013) Context-dependent signaling defines roles of BMP9 and BMP10 in embryonic and postnatal development. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(29):11887–11892.
32. Hamrick SE, Hansmann G (2010) Patent ductus arteriosus of the preterm infant. *Pediatrics* 125(5):1020–1030.

Supporting Information

Levet et al. 10.1073/pnas.1508386112

SI Materials and Methods

Endothelial Cell Culture, Treatment, Quantitative Real-Time PCR, and Western Blot Analysis. Human pulmonary arterial endothelial cells (HPAECs) were obtained from Lonza and cultured in endothelial cell growth medium 2 (ECGM-2) containing endothelial cell growth supplements with 2% FBS. They were used between passage 5 and 7.

For quantitative RT-PCR analyses, cells were stimulated in serum-free medium with 0.5 ng/mL recombinant human BMP9 or BMP10 (R&D Systems) at the different times indicated. Total RNAs were extracted at the indicated times using the Nucleospin RNA XS kit (Macherey-Nagel). First-strand cDNAs were synthesized from 1 μg of total RNA by reverse transcription using the iScript system (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions. Quantitative RT-PCR was performed using a Bio-Rad CFX96 apparatus and qPCR Master Mix (Promega). Relative quantification of gene expression was normalized to the *HPRT* mRNA expression level. Sequences of the PCR primers were as follows: COX2, F-TAGGAATGTTCCACCCGCAGTACAG; R-CAGCATCGATGTCACCATAGAGTGC; COX1, F-AAAGATTGCCCCACACCCAT; R-ACATGAGGTTGGTGCCTTGG; HAS1, F-CGGCAAGCGCGAGGTCATGT; R-CACGTCCCCACCAACAGCCC; HAS2, F-AGCCTTCAGAGCACTGGGACGA; R-TCTCCCCCAACACCTCCAACCA; HAS3, F-CAAGGCCCTCGGCGATTCGG; R-CCCCCGACTCCCCCTACTTGG; SNAI1, F-TTTCTGGTTCTGTGTCCTCTGCCT; R-TTCCCAGTGAGTCTGTCAGCCTTT; SNAI2, F-TTTCTGGGCTGGCCAAACATAAGC; R-ACACAAGGTAATGTGTGGGTCCGA; ZEB1, F-CGTCTCTTTCAGCATCACCA; R-TGCACTGAGTGTGGAAAAGC; ZEB2, F-CGCGGCTTCTTCATGCTTTT; R-CCTGGGATTGGCTTGTTTGC; TWIST1, F-AGCCACTGAAAGGAAAGGCA; R-CAGGCCAGTTTGATCCCAGT; HPRT, F-ATGGACAGGACTGAACGTCTTGCT; R-TTGAGCACACAGAGGGCTACAATG.

For Western blot analysis, cells were stimulated in 0.5% serum with 10 ng/mL recombinant human BMP9 or BMP10 (R&D Systems) at the different times indicated. Cell extracts were lysed in radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (pH 7.4, Tris·HCl 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Triton 1%, sodium desoxycholate 0.5%, and SDS 0.1%).

Twenty micrograms of proteins from HPAECs were separated on a SDS/PAGE, 4–20% (Bio-Rad) and analyzed by immunoblotting with anti-collagen type I (AB765P) and anti-fibronectin (AB2033) antibodies (Merck Millipore). The same membrane was stripped and reprobed with a monoclonal antibody against β-actin (clone AC-15; Sigma) to confirm equal protein loading.

Proteins from great arteries (10 μg) or isolated DA (10 μg) were separated on an SDS/PAGE, 4–20% (Bio-Rad) and analyzed by immunoblotting with anti-Id1 (sc-133103; Santa Cruz Biotechnology), anti-fibronectin antibodies (as above), anti-CD31 (610133; BD Transduction Laboratories,), and anti-p120-catenin (610133; BD Transduction Laboratories). The same membrane was stripped and reprobed with a monoclonal antibody against β-actin (clone AC-15; Sigma) to confirm equal protein loading.

Human Genomic Analysis. For each patient with a CNV, detailed clinical features were obtained directly from the corresponding clinical geneticist. The Galliera Genetic Bank member of the Telethon Network of Genetic Biobanks (project no. GTB12001), funded by Telethon Italy, provided us with specimens.

Angiographic Images. For angiographic images, Evans blue 1% was injected intracardially in both ventricles using a 10-μL Hamilton syringe and immediately photographed with a Zeiss AxioCam Icc1 camera.

Microscopy. For light microscopy, chest cavities were embedded in paraffin, and transverse sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E). Images were acquired with a Zeiss Axioplan microscope and analyzed using Axiovision 4.8 software. Fluorescent images were acquired with a Zeiss Apo Tome microscope and analyzed using Zen software. For transmission electron microscopy, chest cavities were postfixed in 1% osmium tetroxide in 0.15 M sodium cacodylate (pH 7.4) for 1 h. Semithin sections (500 nm) were stained with Epoxy Tissue Stain (14950; EMS). Images were acquired with a Zeiss Axioplan microscope and analyzed using Axiovision 4.8 software. Ultrathin sections (70 nm) were collected on a 200-mesh copper grid and stained with 5% uranyl acetate and lead citrate, and then viewed on a JEOL 1200 EX transmission electron microscope at 80 kV.

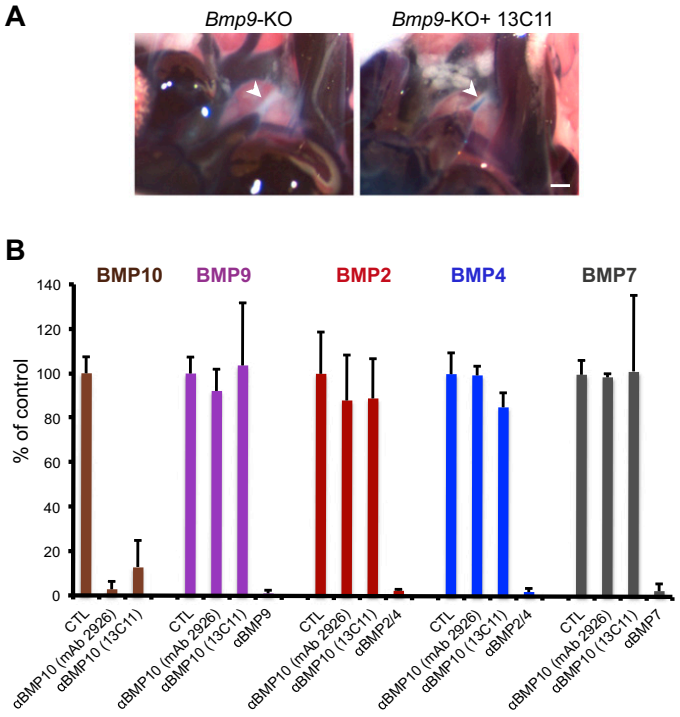


Fig. S1. *Bmp9*-KO pups treated with a home-made anti-BMP10 antibody have an open ductus arteriosus (DA) at P4. Anti-BMP10 monoclonal antibody (clone 13C11) was generated in mice using standard mouse hybridoma techniques after injection of human recombinant BMP10 produced in HEK-293 cells. *Bmp9*-KO pups were treated at P1 and P3 with IgG or an anti-BMP10 antibody (15 mg/kg) (clone 13C11) and killed at P4. (*A*) Representative angiographic images after Evans blue injection of the great arteries and the DA. B*mp9*-KO pups treated with IgG ($n = 3$) or with anti-BMP10 ($n = 3$) from two littermates. (Scale bars 500 μm.) (*B*) Characterization of anti-BMP10 antibodies specificity using the BMP responsive element (BRE) assay as previously described (6). Briefly, NIH 3T3 cells were cotransfected in Opti-MEM (Life Technologies) using lipofectamine with a mixture of (*i*) the reporter plasmid pGL3(BRE)2-luc encoding firefly luciferase downstream of a BMP response element (200 ng), (*ii*) pRL-TK luc encoding Renilla luciferase (20 ng; Promega), and (*iii*) a plasmid encoding WT ALK1 (5 ng). Four hours after transfection, cells were stimulated or not overnight with BMP10 (100 pg/mL), BMP9 (100 pg/mL), BMP2 (50 ng/mL), BMP4 (50 ng/mL), or BMP7 (50 ng/mL) that had been preincubated for 1 h with the indicated neutralizing antibodies [anti-BMP9 (AF3209), anti-BMP2/4 (MAB3552), anti-BMP7 (MAB3541) at 0.5 μg/mL; R&D Systems]. Luciferases activities were measured as described previously (6). Results are expressed as the relative ratio of the indicated BMP-stimulated cells taken as 100%. Data represent means of two independent experiments performed in duplicate.

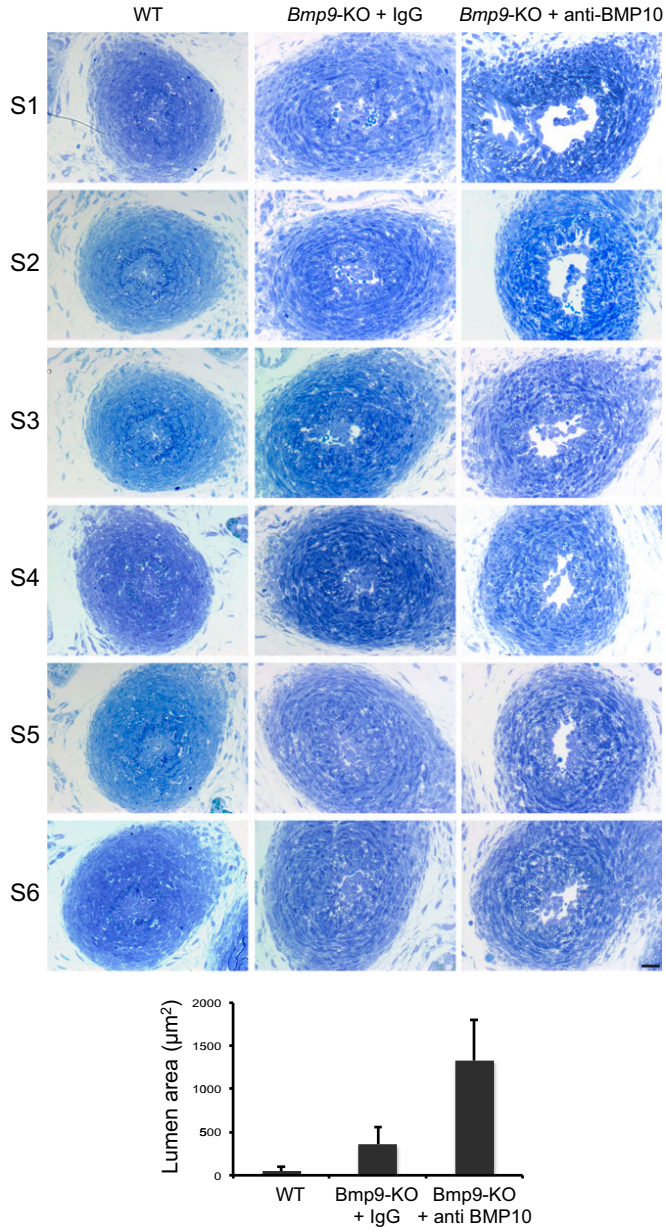


Fig. S2. Abnormal closure of the DA in *Bmp9*-KO pups at P4. Semithin transverse sections obtained through the whole ductus were analyzed from WT and *Bmp9*-KO pups injected at P1 and P3 with mouse IgG or with anti-BMP10 antibodies and killed at P4. DA were sectioned from the pulmonary artery toward the aorta every 30 µm. The graph bar indicates the mean lumen area of the different sections (S1–S6) obtained using Axiovision software (Zeiss). (Scale bar: 20 µm.)

Table S1. mRNA expression of the BMP signaling pathway in DA at P0

Gene	Cq mean
BMP9	Not detected
BMP10	Not detected
ALK1	26.1
ENG	28.6
BMPR2	23.1
ActR2A	26.7
ActR2B	31.3

For quantitative RT-PCR analyses, total RNAs were extracted from isolated ductus arteriosus dissected from pups killed at P0 using the Nucleospin RNA XS kit (Macherey–Nagel). First-strand cDNAs were synthesized from 1 μg of total RNA by reverse transcription using the iScript system (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions. Quantitative RT-PCR was performed using a Bio-Rad CFX96 apparatus and qPCR Master Mix (Promega). Results are expressed as Cq mean. ActR2A, activin receptor 2 A; ActR2B, activin receptor 2 B; BMPR2, bone morphogenetic receptor 2; ENG, endoglin. Sequences of the PCR primers used are as follows: BMP9, F-CAGATACACAACGGACAAATCGTC; B-TTGGCAGGAGACATAGAGTCGG; BMP10, F-TCCATGCCGTCTGCTAACATCATC; B-ACATCATGCGATCTCTCTGCACCA; ALK1, F-CCTCACGAGATGAGCAGTCC; B-GGCGATGAAGCCTAGGATGTT; ENG, F-AGGCATCCAAGCAAAATGGC; B-GCTTCTGGCAAGCACAAGAATG; BMPR2, F-TGGCAGTGAGGTCACTCAAG; B-TTGCGTTCATTCTGCATAGC; ActR2A, F-AGCAAGGGGAAGATTTGGTT; B-FGGTGCCTCTTTTCTCTGCAC; ActR2B, F-CTGTGCGGACTCCTTTAAGC; B-TCTTCACAGCCACAAAGTCG. Cq, quantification cycle; F, forward; B, backward.

1.3 Résumé de l'article

1. Les souriceaux *Gdf2*-KO présentent des défauts d'épaississement et de remodelage de leur DA qui sont viables et n'entraînent pas de PDA.
2. L'injection d'un anticorps neutralisant dirigé contre BMP10 à ces souriceaux *Gdf2*-KO amplifie les défauts observés et entraîne une réouverture tardive de leur DA.
3. BMP9 et BMP10 sont nécessaires au dépôt de matrice lors du remodelage du DA.
4. La fermeture anatomique du DA implique une diminution du nombre de cellules intimales notamment *via* des processus de transition endothélio-mésenchymateuse (EndMT), d'apoptose et d'autophagocytose.
5. BMP9 et BMP10 sont impliqués dans la fermeture anatomique du DA et semblent jouer un rôle dans l'EndMT puisqu'ils régulent l'expression de facteurs de transcription impliqués dans ce processus.
6. Le rôle de BMP9 et de BMP10 dans la fermeture du DA est renforcé par des données de génétique humaine, *Bmp10* se trouvant dans une région minimale critique de 700kb corrélée à la présence d'un PDA.

1.4 Discussion et perspectives

Ce travail a permis pour la première fois de démontrer l'implication de BMP9 et de BMP10 dans la fermeture du DA et plus précisément dans les processus de fermeture anatomique. Nos résultats suggèrent que l'injection d'anticorps neutralisants dirigés contre BMP10 dans les souriceaux *Gdf2*-KO entraîne une réouverture du DA du fait de l'impossibilité - ou du moins, de la possibilité limitée - des cellules intimales à effectuer une EndMT. Cette hypothèse doit cependant être validée, le phénomène d'EndMT étant un phénomène très transitoire et de ce fait difficile à repérer. De plus, nos données montrant que BMP9 et BMP10 induisent fortement l'expression de facteurs de transcriptions impliqués dans l'EndMT ou l'EMT ont été obtenus à partir de cellules endothéliales d'artère pulmonaire qui pourraient répondre différemment des cellules endothéliales du DA à BMP9 et BMP10. En effet, les connaissances actuelles montrent que BMP9 et BMP10 peuvent induire des réponses différentes en fonction des cellules endothéliales utilisées voire même du contexte d'étude (cf. Introduction partie 4.5.2 p.105). Il serait donc intéressant dans le futur de confirmer ces résultats à partir de cellules endothéliales de DA isolées ou, à défaut, de DA dissocié de la crosse aortique cultivé *ex vivo*. De plus, la confirmation de l'implication de BMP9 et de BMP10 dans le phénomène de l'EndMT pourrait également améliorer la compréhension d'autres pathologies. En effet, le phénomène d'EndMT est im-

pliqué dans l'hypertension artérielle pulmonaire [Ranchoux et al., 2015], maladie connue pour être associée à des mutations de la voie d'ALK1 (cf. Introduction partie 4.3.3 p.94).

BMP9 et BMP10 sont impliqués dans le dépôt de matrice lors du remodelage du DA ainsi que dans l'épaississement du mur du DA. Ces processus permettent notamment le maintien de la contraction liée à la fermeture physiologique et la différenciation des VSMCs du DA lors de la fermeture anatomique, phénomènes essentiels à la fermeture du DA. Il serait intéressant d'étudier l'interaction entre les voies de signalisation BMP9/BMP10 et Notch dans ce contexte. En effet, ces deux voies sont interdépendantes dans les cellules endothéliales [Larrivée et al., 2012][Ricard et al., 2012][Rostama et al., 2015] et participent aux interactions entre cellules endothéliales et VSMCs [Tachida et al., 2017]. De plus, la signalisation de la voie Notch est nécessaire dans les VSMCs du DA pour obtenir une fermeture correcte [Wu et al., 2016][Baeten et al., 2015][Krebs et al., 2016]. Jagged1, acteur important de la signalisation Notch (cf. Introduction partie 1.3.3 p.30) et cible de BMP9 et BMP10 [Larrivée et al., 2012], est d'ailleurs essentiel à la fermeture du DA sous peine d'absence de différenciation des VSMCs [Feng et al., 2010]. Il est donc possible que BMP9 et BMP10 affectent la différenciation des VSMCs du DA en collaboration avec Notch, et qu'en leur absence, un défaut du maintien de la contraction du DA soit observé dans les jours suivant la naissance.

Les plaquettes ont été décrites comme impliquées dans le fermuture du DA : une fois activées, elles participent à l'obstruction du lumen [Echtler et al., 2010]. Bien que nous n'ayons pas observé cette caractéristique lors de nos analyses du DA à P0, il semble intéressant de se pencher sur cet aspect de la fermeture du DA. En effet, BMP9 a été décrit comme étant libéré par l'activation des plaquettes de même que le TGF-β, autre facteur important de la fermeture du DA [Osada et al., 2012]. Il est donc possible que lors de la fermeture du DA, le BMP9 libéré par les plaquettes soit nécessaire à la fermeture normale du DA.

Lors de ma thèse, j'ai généré des souris *Bmp10*-cKO et des souris *Gdf2*-KO ;*Bmp10*-cKO. Il serait intéressant d'étudier la fermeture du DA dans ces souris en induisant la délétion de *Bmp10* dans la même fenêtre de temps que notre étude. Les souris *Bmp10*-cKO nous permettraient d'étudier de potentiels rôles spécifiques de BMP10 dans la fermeture du DA. Cet aspect est d'autant plus intéressant que *Bmp10* se trouve dans la région minimale critique associée à la présence de PDA chez l'humain, suggérant un rôle plus important de BMP10, comparé à BMP9, dans la fermeture du DA. Les souris doubles KO pourraient valider le phénotype obtenu, à condition que la double délétion génétique

ait les même conséquences que l'injection d'anticorps neutralisants dirigés contre BMP10 dans les souriceaux *Gdf2*-KO.

Nous avons démontré que BMP9 et BMP10 sont des acteurs importants de la fermeture du DA chez la souris. Des données de génétique humaine étayent ces résultats. Afin de montrer la cohérence entre nos résultats dans le modèle murin et la pathologie humaine, il serait intéressant de prélever du sang chez des nouveaux-nés prématurés et à terme afin d'effectuer des dosages de BMP9 et de BMP10. Ces échantillons nous permettraient d'évaluer une possible corrélation entre le risque de PDA et les niveaux circulants de BMP9 et BMP10.

Partie 2

Développement tumoral et métastases

2.1 Contexte

La voie de signalisation BMP9/BMP10/ALK1 est connue pour impacter le développement vasculaire. En effet, la délétion d'*Acvrl1* ou d'*Eng* sont létales chez l'embryon du fait de défauts vasculaires [Urness et al., 2000][Arthur et al., 2000]. De plus, des mutations de *Gdf2*, *Acvrl1* et *Eng* sont associées à des maladies vasculaires [Goumans et al., 2017]. Deux hypothèses s'opposent actuellement concernant le rôle de cette voie de signalisation dans le contexte endothélial physiologique : (a) un rôle de quiescence vasculaire et (b) un rôle de prolifération endothéliale. Les fonctions d'ALK1 et de ses ligands dans l'angiogenèse semblent être fortement dépendantes de leur concentration et du contexte d'action [Goumans et al., 2017] (cf. Introduction 4.5.2 p.105).

Du fait de son implication dans l'angiogenèse et de sa localisation spécifique à la surface des cellules endothéliales, ALK1 est devenu une cible dans la recherche de nouvelles thérapies anti-angiogéniques. Deux approches différentes ont été utilisées. Pfizer a développé un anticorps dirigé contre ALK1 (PF-03446962), empêchant toute signalisation *via* ce récepteur. Acceleron Pharma a développé une forme soluble d'ALK1 (Dalantercept) ayant pour but de bloquer directement les ligands dans la circulation. Ces deux approches altèrent l'angiogenèse tumorale dans plusieurs modèles de cancer chez la souris [Cunha et al., 2010] [Mitchell et al., 2010][Hu-Lowe et al., 2011][Cunha et al., 2015]. La forme soluble d'ALK1 semble également diminuer la dissémination métastatique dans des modèles de cancers du pancréas et du sein [Cunha et al., 2015]. Au vu de ces résultats prometteurs, des études cliniques ont été lancées pour les deux traitements. Cependant, les résultats, non parus au début de ma thèse, ne sont pas concluants (cf. Introduction partie 4.5.3 p.109).

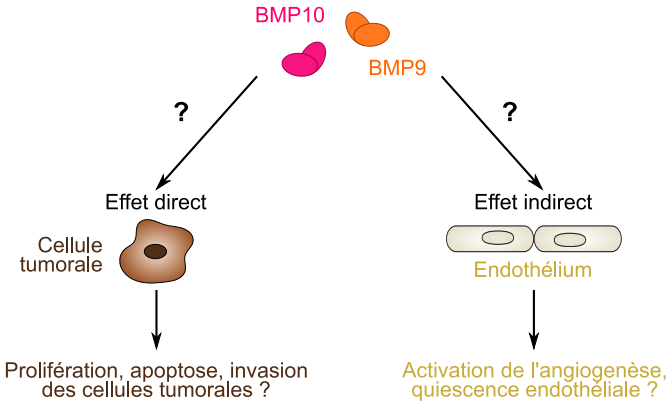


FIGURE R.1 – Hypothèses sur les rôles de BMP9 et BMP10 dans la tumorigenèse.

Malgré ce ciblage thérapeutique de la voie de signalisation BMP9/BMP10/ALK1, les fonctions des différents acteurs dans la tumorigenèse et plus précisément dans l'angiogenèse tumorale sont encore mal compris. Le rôle d'ALK1 n'a quasiment été étudié qu'au travers de traitements testés et les deux articles étudiant spécifiquement le rôle du récepteur montrent des résultats contradictoires. En effet, la surexpression d'un ALK1 constitutivement actif dans une lignée cellulaire de cancer du pancréas [Ungefroren et al., 2007] ou l'utilisation de souris *Acvrl1*$^{+/-}$ développant spontanément des tumeurs pancréatiques (modèle Rip1-Tag2) [Cunha et al., 2010] semblent induire les même résultats, c'est-à-dire un ralentissement de la croissance tumorale et une inhibition de l'angiogenèse tumorale. BMP9 et BMP10 n'ont que très peu été étudiés dans le contexte tumoral. La majorité des articles parus sur BMP9 n'étudient que son potentiel effet direct sur les cellules tumorales et sont contradictoires. BMP9, *via* ALK2, semble notamment jouer un rôle proprolifératif sur des cellules d'hépatocarcinome [Herrera et al., 2013] et de cancer de l'ovaire [Herrera et al., 2009] et un rôle anti-prolifératif dans le myélome [Olsen et al., 2014]. De nombreuses publications étudient également l'effet direct de BMP9 et de BMP10 sur différentes lignées cellulaires surexprimant l'un ou l'autre des ligands d'ALK1. Elles montrent majoritairement que BMP9 et BMP10 agissent en tant que suppresseurs de tumeur [Ye et al., 2008][Li et al., 2012][Ren et al., 2014b]. Cependant, ces résultats sont discutables car la majorité des lignées tumorales utilisées dans ces publications n'expriment ni BMP9 ni BMP10 de façon physiologique. Le rôle de BMP9 a été très succinctement étudié dans l'angiogenèse tumorale avant le début de ma thèse, montrant que BMP9 (modèle en matrigel sous cutané ou sur-expression de BMP9) augmentait l'angiogenèse tumorale [Suzuki et al., 2010][Yoshimatsu et al., 2013] et diminuait la lymphangiogenèse tumorale [Yoshimatsu et al., 2013].

Les résultats contradictoires disponibles sur BMP9, le peu de données sur BMP10 et l'absence de résultats dans les essais cliniques ciblant ALK1 ont montré qu'il était urgent d'avancer dans la compréhension des rôles des différents acteurs de la voie de signalisation BMP9/BMP10/ALK1 afin de pouvoir évaluer son intérêt thérapeutique alors que des études menées sur l'Homme sont en cours. De plus, il est possible que bloquer spécifiquement l'un ou l'autre des ligands d'ALK1 soit plus intéressant que les approches actuelles si BMP9 et BMP10 possèdent des rôles spécifiques dans la tumorigenèse. Il semble essentiel de déterminer quels sont les fonctions de ces deux facteurs de croissance dans l'angiogenèse tumorale mais aussi quels sont leurs potentiels effets directs sur les cellules tumorales dans des conditions proches des conditions physiologiques (figure R.1).

L'objectif de ce projet était donc de comprendre le(s) rôle(s) de BMP9 et de BMP10 dans le développement tumoral, l'angiogenèse tumorale et les processus métastatiques afin d'apporter des éléments nouveaux permettant de lutter contre le cancer du sein et d'autres pathologies malignes.

2.2 Modèles utilisés

Notre objectif étant principalement de mieux comprendre le rôle de BMP9 et de BMP10 dans l'angiogenèse tumorale, nous avons choisi de travailler sur le cancer du sein. En effet, il s'agit d'un cancer hautement vascularisé et ciblé par les traitements anti-angiogéniques, même si leur efficacité sur le long terme est de plus en plus remise en cause.

Nous avons fait le choix de travailler sur des modèles de lignées cellulaires cancéreuses issues de tumeurs spontanées capables de développer des métastases car ils présentent un développement tumoral plus rapide et une dissémination métastatique plus efficace que les modèles spontanés génétiquement modifiés [Yang et al., 2017]. Le micro-environnement tumoral jouant un rôle important dans l'angiogenèse tumorale, nous avons décidé de travailler avec des modèles syngéniques qui ont l'avantage d'être immunocompétents et de ne présenter aucune incompatibilité dans les interactions paracrines entre la tumeur et le stroma [Yang et al., 2017].

Peu de modèles répondant à nos critères existent actuellement, la majorité d'entre eux étant issus de tumeurs humaines. De plus, nos modèles murins dédiés à l'étude de BMP9 et de BMP10 ont été développés dans trois fonds génétiques pour les souris *Gdf2*-KO (C57BL/6, BALB/c et 129/Ola) et seulement dans le fond génétique C57BL/6 pour les souris *Bmp10*-cKO et *Gdf2*-KO ;*Bmp10*-cKO, limitant les possibilités. Cependant au

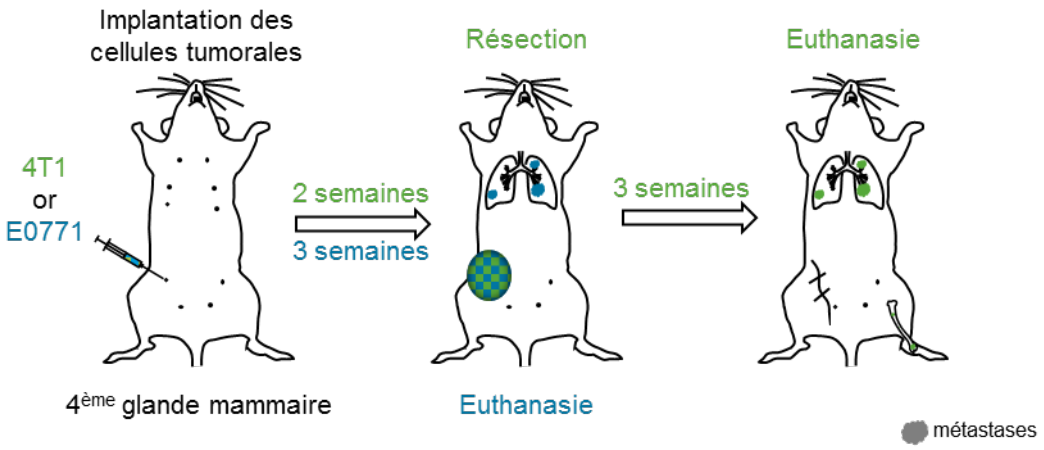


FIGURE R.2 – Protocoles *in vivo* relatifs à l'étude des modèles 4T1 et E0771.
Evènements relatifs au modèle 4T1 : vert. Evènements relatifs au modèle E0771 : bleu.

vu de l'hétérogénéité des cancers du sein chez l'Homme et des différences de phénotype possibles entre différents fonds génétiques murins, il nous a semblé essentiel d'étudier deux lignées tumorales mammaires murines différentes.

Nous avons sélectionné le modèle 4T1, un des modèles de cancer mammaire murin les plus étudiés. Dérivé d'une tumeur mammaire spontané de souris BALB/c, il est naturellement résistant à la thioguanine et métastase spontanément dans les poumons ainsi que dans le foie et dans les os [Aslakson and Miller, 1992][Heppner et al., 2000]. Bien qu'originalement décrit comme étant un modèle triple négatif, une étude récente le classe plutôt dans la catégorie luminal A [Yang et al., 2017]. Le choix de travailler dans le fond génétique BALB/c présente un inconvénient important qu'est l'absence de phénotype vasculaire dans les souris *Gdf2*-KO.

Nous avons choisi de travailler avec la lignée cellulaire E0771, décrite comme un modèle de cancer mammaire de type luminal B, du fait de son caractère syngénique dans le fond génétique C57BL/6. Une fois implanté orthotopiquement, il métastase spontanément dans les poumons [Ewens et al., 2005]. Cette lignée cellulaire issue d'un adénocarcinome spontané est connue pour présenter de forts taux de nécrose. Une étude récente a montré qu'il s'agissait d'un bon modèle du sous-type humain de cancer mammaire "claudin-low" (exprimant peu de claudine). Ce type de cancer a généralement un mauvais pronostic, possédant une grande capacité à rentrer en transition épithélio-mésenchymateuse [Yang et al., 2017].

Afin d'étudier ces deux modèles nous avons mis en place des protocoles adaptés à chacun grâce à une collaboration avec l'équipe du Dr. Peyruchaud (Inserm U1033, Lyon). Les

deux modèles sont injectés dans la quatrième glande mammaire droite de souris du fond génétique correspondant sous forme d'une suspension cellulaire (10 millions de cellules par mL dans du PBS, 10μL par souris). Le modèle 4T1 est très agressif. De ce fait, deux semaines après l'injection, lorsque les tumeurs possèdent un volume proche de 1cm^3, elles sont résequées. Trois semaines après la résection, temps nécessaire au développement de métastases visibles, les souris sont euthanasiées afin de prélever les organes potentiellement métastatasés. Le modèle E0771 étant moins agressif, les souris sont euthanasiées trois semaines après l'implantation des cellules tumorales lorsque les tumeurs possèdent un volume proche de 1cm^3, les métastases ayant eu le temps de se développer sans étape de résection. Les différentes étapes de ces protocoles sont décrites dans la figure R.2.

2.3 Article

Les résultats de ce projet sont présentés sous la forme d'un article en cours de préparation.

J'ai généré toutes les souris utilisées et réalisé l'ensemble des expériences présentées. Christine Mallet a été d'une grande aide en réalisant l'ensemble des génotypages des souris utilisées et en participant aux expériences *in vivo*.

Respective roles of BMP9 and BMP10 in tumor growth, angiogenesis and metastasis in mammary preclinical cancer models

Marie Ouarné[1,2,3], Christine Mallet[1,2,3], Johnny Ribeiro[4,5,6], Agnès Desroches-Castan[1,2,3], Emmanuelle Soleilhac[3,7,8], Emmanuelle Tillet[1,2,3], Olivier Peyruchaud[4,5,6], Sabine Bailly[1,2,3]

[1] Inserm, U1036, Grenoble ;
[2] CEA, Institut de Biosciences et Biotechnologies de Grenoble (BIG), Laboratoire Biologie du Cancer et de l'Infection ;
[3] Université Grenoble Alpes ;
[4] Inserm, U1033, Lyon ;
[5] Université Claude Bernard Lyon 1 ;
[6] Faculté de Médecine de Lyon Est ;
[7] Inserm, U1038, Grenoble ;
[8] CEA, BIG, Laboratoire de Biologie à Grande Echelle, Gen&Chem.

Key words BMP9, BMP10, ALK1, tumor angiogenesis, E0771

Total number of figures 4 figures and 2 supplementary figures

Abstract

Angiogenesis has become an attractive target for cancer therapy. However, despite the initial success of targeting VEGF, the overall survival is only modestly improved and resistance to therapy often develops and thus the need for other anti-angiogenic targets are needed. The predominant expression of the type I receptor ALK1 in endothelial cell made it an attractive tool. ALK1 binds with strong affinity to two ligands BMP9 and BMP10. BMP9 and BMP10 play redundant roles in post-natal angiogenesis, while BMP9 specifically affects lymphatic maturation. Their specific roles in tumor angiogenesis, cancer development and metastases dissemination have not yet been addressed. The aim of the present work was to study their respective roles using specific knockdown mice (*Gdf2*-deficient (codes for BMP9) and inducible *Bmp10*-deficient) in two preclinical mammary models (4T1 and E0771 cells). Our studies demonstrate specific roles for BMP9 and BMP10 in the E0771 mammary carcinoma. While, *Bmp10* deletion did not affect this mammary cancer model, *Gdf2* deletion increased tumor growth and tumor angiogenesis while inhibiting vessel maturation. Interestingly, *Gdf2* deletion decreased lung metastatic occurrence while the number and size of lung metastases were significantly increased. Together, these data support specific roles for BMP9 and BMP10 in tumor angiogenesis, cancer development and metastatic dissemination. Thus, we propose that it could be more interesting to specifically target BMP9 rather than ALK1, which will affect the function of both BMP9 and BMP10.

Introduction

Induction of neo-angiogenesis is a compulsory hallmark of cancer and an early event during tumor progression. The vascular tree provides tumor with its metabolic requirements, while simultaneously creating an escape route by which the tumor will disseminate [1]. Substantial efforts to develop angiogenesis inhibitors to treat cancer have resulted in a set of clinically approved drugs with blockade of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling as a common mechanism of action. Despite the fact that VEGF inhibitors are included in the first-line therapy against advanced and metastatic cancer of the colon, kidney, lung, liver and neuroendocrine pancreas, the search for alternative and/or complementary targets for drug development is highly warranted due to a lack of persistent efficacy or substantial improvements of overall survival with currently used compounds [2].

The transforming growth factor (TGF)-β family consists of more than 30 ligands (known as TGF-βs, BMPs (Bone morphogenetic proteins) and GDFs (Growth and differentiation factors)) that bind and signal through serine/threonine kinase receptors TGF-β type I (activin receptor-like kinase (ALK)1-7) and type II receptors (TGF-βRII, BMPRII, ActRIIA, ActRIIB and AMHRII) and accessory transmembrane proteins (TGF-β type III receptors, betaglycan and endoglin). Among the different members of this family, the discovery of the binding of BMP9 and BMP10 to the endothelial specific type I receptor ALK1 demonstrated the key role of this signaling pathway in vascular development [3, 4]. The receptor ALK1 is indeed an essential receptor in vascular development, as genetic ablation of *Acvrl1* in mice results in embryonic lethality due to vasculogenic or angiogenic defects [5, 6]. In addition, mutations of the gene *ACVRL1* encoding ALK1 and *ENG* encoding the co-receptor endoglin were found to play a causal role in the genetic vascular deficiency Rendu-Osler syndrome also known as hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT) [7, 8]. Concerning its high affinity ligands, although BMP9 and BMP10 are very similar at the amino-acids levels they differ in several ways. First the site of expression is different, BMP9 is mainly produced by the liver [9, 10] while BMP10 is mostly produced by the heart [11] but they are both detected in blood [10, 12]. The other point is that they both bind to ALK1 with high affinity but BMP9 has also been shown to bind to ALK2 [13] and their affinities for the type II receptors differ [14]. Knockout mice for *Gdf2* (encoding BMP9) are viable and fertile with no overt defect in blood vessel development [15] while *Bmp10*$^{-/-}$ mice are embryonic lethal due heart defects [16]. However, interestingly it was recently shown that these two BMPs play redundant roles in retinal vascularization and ductus arteriosus closure [12, 15, 17]. On the other hand, it was also found that *Gdf2*-deficient mice presented an abnormal lymphatic vessel maturation and deficiency in lymphatic valve formation and lymph drainage [18], supporting a specific role for BMP9 in lymphatic maturation. Together these data clearly demonstrate the crucial roles of ALK1 and its two ligands, BMP9 and BMP10, in vascular development. However, the precise role of ALK1 and its ligands during the complex process of angiogenesis has proven difficult to pinpoint from *in vitro* studies, as their actions appear highly concentration and context dependent [19, 20].

Still due to its specific endothelial expression ALK1 has been identified as an interesting target in tumor angiogenesis [21, 22]. Pharmacologic targeting of ALK1 has been tested using either a neutralizing anti-ALK1 antibody (PF-03446962) or a soluble form of ALK1 (Darlantercept) that will trap the biological ligands of ALK1, which are mainly BMP9 and BMP10 [23, 24]. These approaches result in an impairment of tumor angiogenesis [25–28]. In addition, ALK1 inhibition substantially impacts metastatic dissemination by reducing the colonization of distant organs in a range of mouse models of cancer, including mammary carcinoma and pancreatic neuroendocrine tumor [27]. There are currently several phase I/II studies using these components. However, despite being generally well tolerated no efficacy has been demonstrated to date [29–32].

Not much is known concerning the respective roles of BMP9 and BMP10 in tumor angiogenesis and cancer development. BMP9 has been shown to play a direct role on tumor growth as an autocrine growth factor for ovarian cancer cells and in hepatocarcinoma but this was due to a direct effect of BMP9 on tumor cells via ALK2 [33, 34]. The roles of BMP9 and BMP10 have also been studied in different cancers via the use of tumor cells overexpressing either BMP9 or BMP10 [35–38]. In these works, BMP9 and BMP10 acted as tumor suppressors, however these data are not very physiological as BMP9 and BMP10 are most of the times not expressed in tumors. The role of BMP9 and BMP10 in tumor angiogenesis was not studied in these works.

Herein, we have aimed to study the respective roles of BMP9 and BMP10 in tumor angiogenesis using two mammary cancer models. To understand the contribution of BMP9 and BMP10 ligand binding, we made use of *Gdf2*-deficient and inducible *Bmp10*-deficient mice. Our studies demonstrated specific roles for BMP9 in tumor growth and tumor angiogenesis. *Bmp10* deletion did not seem to significantly affect the mammary cancer model used. On the other hand, *Gdf2*-deletion increased tumor growth and tumor angiogenesis while it inhibited vessel maturation. Interestingly, Gdf2 deletion decreased lung metastatic occurrence and this might be due to a defect in lymphatic drainage. However, the number and size of lung metastases were significantly increased.

Results

Loss of BMP9 reduces tumor growth in the mouse E0771 mammary carcinoma model but not in the 4T1 model

To understand the contribution of BMP9 in tumor angiogenesis and tumor growth, we used two different syngeneic mouse mammary carcinoma models (4T1 and E0771) that were orthotopically injected into the fourth mammary gland of 6 week-old *Gdf2*-deficient mice in the BALB/c and C57BL/6 background, respectively. *Gdf2*$^{-/-}$ mice are viable and fertile with no overt defect in these two backgrounds. The 4T1 cell line is derived from a spontaneous tumor, ER negative and very invasive [39]. As shown in Figure 1A and B, we could not observe any difference between WT and *Gdf2*$^{-/-}$ mice in tumor volume and weight in the 4T1 model. We next tested the E0771 cell line, which is also derived from a spontaneous adenocarcinoma, although less invasive. Initially referred to as ER+, it was more recently described as ER negative [40, 41]. We found that *Gdf2*$^{-/-}$ mice presented significantly larger and heavier tumors than WT mice in this mammary model (Fig. 1C and D). We next tested whether these effects could be due to a direct effect of BMP9 on these cells. First, we analyzed by quantitative RT-PCR the expression levels of the different BMP type I and type II receptors (Suppl Fig. 1A and B). We found very little amount of ALK1 in E0771 cells versus the endothelial cell line H5V and no ALK1 in 4T1 cells or EpH4 cells, a primary mammary epithelial cell line. All cell types expressed ALK2 at similar levels and ALK3 was only expressed in 4T1, E0771 and EpH4 cells. All cell types also expressed BMPR2 and ActrIIA but the level of ActRIIB was below detection. We next tested if BMP9 could induce the phosphorylation of Smad1 and Smad5 in these two cancer cell lines. We found that only high doses of BMP9 (5 ng/mL) induced pSmad1/5 in both E0771 and 4T1 mammary cancer cells (Suppl Fig. 1C). We then tested whether BMP9 could directly affect 4T1 and E0771 cell proliferation. However, we could not see any differences in cell growth between BMP9 treated cells and control cells in both 4T1 or E0771 cells (Suppl Fig. 1D and E). In parallel, we also analyzed tumor cell proliferation on E0771 tumor sections by counting the number of PCNA positive nucleus and found no differences between WT and *Gdf2*$^{-/-}$ mice (Fig. 1E and F). We also looked whether BMP9 loss would affect apoptosis and found a slight but not significant increase in caspase-3 positive nuclei in *Gdf2*$^{-/-}$ mice versus WT mice (Fig. 1G and H). We also looked at tumor necrosis and found that necrosis was significantly higher in *Gdf2*$^{-/-}$ mice versus WT mice (Fig. 1I).

Loss of BMP9 increases tumor angiogenesis but decreases vessel maturation in the mouse E0771 mammary carcinoma

As we could not observe any differences in proliferation or apoptosis that could explain the increase in tumor size, we next addressed whether the loss of BMP9 could affect E0771 tumor angiogenesis. To do that, tumor sections were stained for the luminal endothelial cell marker podocalyxin. Podocalyxin staining showed a significant increase in *Gdf2*$^{-/-}$ mice versus WT mice (Fig. 2A and B) and this was not due to an increase in vessel size as there was no differ-

ence in vessel diameter (Fig. 2C). We next analyzed whether these vessels were functional by performing intravenous injection of FITC-conjugated lectin that has a strong affinity for vessels. The percentage of lectin positive vessels was significantly reduced in *Gdf2*$^{-/-}$ versus WT mice (Fig. 2A and D) supporting a defect in vessel perfusion in absence of BMP9. Cancer vessels are often tortuous, leaky and not very functional due to a defect in vessel coverage. We thus addressed vessel maturation by looking at α-smooth muscle actin (α-SMA) staining in tumor sections. We observed a significant decrease in α-SMA positive vessels in *Gdf2*$^{-/-}$ versus WT mice (Fig. 2E and F) supporting the presence of less mature vessels in *Gdf2*$^{-/-}$ mice. Tumor angiogenesis was also studied in the 4T1 model. However as for tumor growth, loss of BMP9 did not affect vessel density (Suppl Fig. 2A and B).

Loss of BMP9 decreases lung metastasis occurrence but increases the number and size of lung metastasis in the mouse E0771 mammary carcinoma

We next addressed whether the loss of BMP9 could affect metastasis. We observed that while all WT animals developed lung metastases, only 74% of *Gdf2*$^{-/-}$ mice developed metastases (Fig. 3A). On the other hand, in mice that presented metastases, the number and the size of the metastases were significantly increased in *Gdf2*$^{-/-}$ mice (Fig. 3B and C). Because lymphatic vessels are the main route or metastases, we looked at tumor lymphangiogenesis using Lyve-1 immunostaining. However, we could not detect intratumoral lymphangiogenesis but only peritumoral lymphangiogenesis (data not shown). We also studied the loss of BMP9 on lung metastasis in the 4T1 mammary model. As far tumor growth and tumor angiogenesis, loss of BMP9 in this model did not affect lung metastasis (Suppl Fig. 2).

Loss of BMP10 does not affect tumor growth, tumor angiogenesis and metastasis in the mouse E0771 mammary carcinoma

We next addressed the role of BMP10, the other ALK1's ligand, in mammary cancer development. As *Bmp10* deletion is embryonic lethal due to cardiac defects [16], we generated a conditional Rosa26 CreER^{T2};*Bmp10*$^{lox/lox}$ mice that allowed to delete *Bmp10* after tamoxifen injection. Three week-old females were injected each day for five days with 1 mg of tamoxifen. At the age of six weeks, E0771 cells were injected as described above (Fig. 4A). The day of euthanasia blood was taken and circulating BMP10 was measured by ELISA. We found that tamoxifen treatment significantly decreased BMP10 circulating levels (64 versus 7 pg/mL, in WT and *Bmp10*-cKO, respectively, Fig. 4B). We found that loss of BMP10 did not significantly modified tumor volume nor weight (Fig. 4C and D). We next analyzed tumor vascularization and again we could not detect any difference in tumor vessel density (podocalyxin staining) nor in vessel perfusion between control and *Bmp10*-deleted mice (Fig. 4E-G). We also studied lung metastasis in these mice and could not detect any difference in the occurrence or in the number or size of the metastases between control and *Bmp10*-cKO mice. Finally, we checked for BMP9 compensation in these mice but we found similar levels of BMP9 mRNA in the liver of WT and *Bmp10*-cKO mice (data not shown).

Discussion

In the present work, we show for the first time specific roles of BMP9 and BMP10 in tumor growth, tumor angiogenesis and metastasis dissemination. We show that that loss of BMP9 is accompanied by increased growth of the primary tumor, combined with increased tumor vascularization while loss of BMP10 did not show any significant effect. This work thus demonstrates that targeting ALK1, either by its soluble receptor or an anti-ALK1 antibody, might not be the best strategy as it will affect both BMP9 and BMP10 while the two ligands do not play similar roles in cancer development. Therefore, it might be more interesting to only target BMP9.

We found that loss of BMP10 did not affect E0771 tumor growth, or its vascularization or metastasis. One possibility could be that the *Bmp10* deletion performed here is not sufficient to completely block all BMP10 activity, as we obtained a 90% reduction of circulating BMP10 and that thus the little remaining BMP10 could be sufficient. Another interesting point is that we found no redundancy between BMP9 and BMP10 in tumor angiogenesis, as BMP9's loss was sufficient to affect tumor growth and angiogenesis. This is different from previous works that had shown redundancy between BMP9 and BMP10 in postnatal vascularization of the retina [12, 15]. This absence of redundancy could be due to differences between physiological and tumor angiogenesis or due to the fact that the role of BMP9 and BMP10 might be different in newborns and adults. We have previously shown that circulating levels of BMP9 and BMP10 vary with age [10, 15].

Interestingly, we obtained different results using two different mammary spontaneous models. Loss of BMP9 did not modify tumor growth, tumor angiogenesis nor metastasis in the 4T1 model while it significantly affected all these parameters in the E0771 model. These models differ in two ways, first the type of mammary cancer is not the same and second it is not the same genetic background. The angiogenic response has been shown to differ with the genetic background [42]. This is a possible hypothesis as the lymphatic phenotype that we observed in *Gdf2*$^{-/-}$ mice was observed in the C57BL/6 background [18] but not in the BALB/c background (data not shown).

We show that BMP9's loss led to an increase in tumor volume, still we could not detect a direct role of BMP9 on tumor cell proliferation neither *in vitro* nor *in vivo*. However, we found an increase in necrosis that might be responsible of this increase. Another possible explanation, is an indirect effect of BMP9 on the stroma via binding to its high affinity receptor expressed on endothelial cells. Indeed, we found an increase in vessel density in *Gdf2*$^{-/-}$ versus WT mice. Interestingly, we found that the loss of BMP9 led to increased vessel density but decreased vessel perfusion and pericyte coverage. These data thus support that BMP9 is not only a quiescence factor under physiological context as previously proposed [43] but also and in a tumor context. The increase in vessel density could explain the increase in tumor size in absence of BMP9 but it does not completely fit with the fact that these vessels are less functional. In order

to reconcile these two results we need to imagine that at the early stages of tumor growth, there are more vessel in absence of BMP9 so the tumor grow faster but because the vessels are not matured properly they will collapse at reduced blood perfusion at later stage. In order to test this hypothesis we would need to perform a kinetic of tumor angiogenesis.

Most patients died of their metastases rather than their primary tumor so therapeutic strategies have recently focused to target metastases. In the E0771 model, we found fewer mice that developed metastases but mice that developed metastases had more and larger metastases. It is thus difficult at this stage to know if it would be better to block or activate BMP9 in order to decrease metastasis. We have previously shown that BMP9 deletion in the C57BL/6 background leads to lymphatic drainage deficiency [18]. This defect could explain the decrease in metastatic occurrence observed in *Gdf2*$^{-/-}$ mice. We could not detect, in this model, intratumoral vessels and only few peri-tumoral vessels and thus it was difficult to address directly the role of BMP9 in metastasis dissemination. To differentially address this point, it could be interesting in the future to study extravasation by injection intravenously tumor cells. Concerning the increase in metastasis growth it could be, as for tumor growth, that loss of BMP9 increases expansion of these cells.

The role of BMP9, using a similar approach of knockdown has recently been published in another cancer model using the pancreatic RIP1-TAg2 model [44]. However, in this model BMP9 ablation led to a reduced tumor volume, no effect in vessel density but an increase in vessel branching and pericyte coverage and an increase in metastases. These results, apart for the increase in metastases, differ from our results. This might be due to differences in cancer models. However interestingly, in this paper they analyzed different components of the same signaling pathway (*Eng*$^{+/-}$, *Acvrl1*$^{+/-}$ and *Gdf2*$^{-/-}$ mice) in the same pancreatic model and found different responses in these different mice [44], highlighting the difficulties of understanding the role of this BMP9/Endoglin/ALK1 pathway in cancer and tumor angiogenesis.

There are currently several anticancer drugs targeting ALK1 or its ligands in phase I/II of clinical development [21,22,45]. Our present work highlights the importance of performing detailed mechanistic studies prior to commencing clinical testing of drugs impinging this pathway. Our studies suggest that targeting BMP9 or BMP10 might differently affect tumor growth and angiogenesis and that further studies should better address this point. Drugs for cancer are rarely used as monotherapy and clinical trials are already in motion for combinations of inhibitors of ALK1 and well-established VEGF-targeting drugs or chemotherapies [46]. The added value of combining anti-angiogenic therapies with different mechanisms of action is at this stage a challenge and it will be interesting in the future to combine anti-VEGF pathway with BMP9 rather than ALK1.

Material and Methods

Cell lines

4T1 and E0771 breast cancer mouse cells were maintained in culture in RPMI-1640 (Life Technologies) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). Mouse endothelial cells H5V were maintained in culture in DMEM 4.5g/L glucose (Life Technologies) supplemented with 10% FCS. Breast epithelial cells EpH4 were maintained in culture in DMEM/F12 (Life Technologies) supplemented with 10% FCS.

Gdf2-KO and *Bmp10*-cKO mice

All animal studies were approved by the institutional guidelines and those formulated by the European Community for the Use of Experimental Animals. *Gdf2*-KO mice generation was previously described [15]. To circumvent the early embryonic lethality of *Bmp10*-KO mice [16], the Institut Clinique de la Souris (Illkirch, France) generated for us a *Bmp10*$^{lox/lox}$ mice by flanking loxP sites around exon2. These mice were then crossed with the ROSA-26-CreER^{T2} mice provided by Pr. P. Chambon (IGBMC, Illkirch, France) [47] to generate conditional KO of *Bmp10* (*Bmp10*-cKO mice). Intraperitoneal injections of tamoxifen (1mg) were performed for five days in 3-week-old control (*Bmp10*$^{lox/lox}$) and *Bmp10*-cKO (RosaCreER^{T2};*Bmp10*$^{lox/lox}$) in order to delete *Bmp10*. All mice described were viable. *Bmp10*-cKO mice were maintained in the C57BL/6 background. *Gdf2*-KO mice were maintained in the BALB/c and C57BL/6 backgrounds.

Tumor establishment

To establish E0771 tumors, 10^5 cells were injected orthotopically into the fourth mammary fat pad of isofluran-anesthesized C57BL/6 CTL and KO females at 6 weeks of age. Mice were sacrificed at 9 weeks of age 10 minutes after intravenous injection of 50μL of tomato lectin (DyLight 488 Lycopersicon Esculentum, DL-1174, Vector Laboratories, 1mg/mL). 4T1 tumors were established by orthotopical injection of 10^5 cells into the fourth mammary fat pad of isofluran-anesthesized wild type and *Gdf2*-KO BALB/c females at 6 weeks of age. Tumors were removed at 8 weeks of age and mice sacrificed at 11 weeks of age in order to let time for metastases to develop. In all cases, tumor size was measured with calipers, and the volume was calculated according to the formula (L*w^2)/2 where L and w stand for length and width respectively.

Tissue preparation and immunostainings

Tumors were fixed in 4% paraformaldehyde over night at 4°C and embedded in OCT for frozen sections or in paraffin.
For immunohistochemistry, paraffin-embedded sections were deparaffinized and rehydrated followed by citrate antigen retrieval. Blocking was performed in 2% BSA in TBS. Sections were

stained using antibodies to PCNA (dilution 1:6000; Abcam [PC10] Ab29) and active caspase-3 (dilution 1:1000; R&D AF835). Appropriate biotinylated secondary antibodies were used (Vector Laboratories). Sections were incubated with an avidin-biotin complex (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories) and staining revealed by addition of 3.3'-diaminobenzidine (Liquid DAB+ Substrate Chromogen System; Dako) Counterstaining was performed using hematoxylin or fast nuclear red. Images were acquired with a Zeiss Axioplan microscope and analyzed using Axiovision 4.8 software.
For immunofluorescence, frozen sections were fixed in 4% paraformaldehyde and permeabilized in 0.5% triton in PBS. Blocking was performed in 2% BSA in PBS. Sections were stained using antibodies to podocalyxin (dilution 1:50; R&D AF1556), FITC (dilution 1:100; Alexa Fluor 488 conjugated; Jackson Immunoresearch Laboratories [1F8-1E4] 200-542-037) and α-SMA (dilution 1:200; Cy3 conjugated; Sigma Aldrich [1A4] C6198). Appropriate secondary antibodies conjugated with fluorochromes were uses (Jackson Immunoresearch Laboratories). Nucleus were stained using Hoechst (33342). Images were acquired with a Zeiss Apo Tome microscope, treated using Zen Blue software and analyzed using ImageJ software.
For necrosis quantification, paraffin-embedded sections were stained with hematoxylin and eosin. Images were acquired using AxioScan Z1 (Zeiss) slide scanner and analyzed using Zen Blue software.

Quantification of lung metastases

After being inflated using 4% paraformaldehyde, lungs were embedded in paraffin upon tissue fixation in 4% paraformaldehyde. The metastatic burden was assessed by serial sectioning of the entire lungs. Hematoxylin and eosin staining was performed on sections every 200μm. Images were acquired using AxioScan Z1 (Zeiss) slide scanner and analyzed using Zen Blue software.

Western blot analysis

Cells were stimulated in 0% FCS with recombinant BMP9 (R&D Systems) at the concentration indicated for 1h after 1h30 of serum deprivation. Cell extracts were lysed in 50 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 0.5 mol/L NaCl and a cocktail of proteases inhibitors (Sigma) by sonication. 20μg of proteins from cell lysates were separated on a SDS/PAGE, 4?20% (Bio-Rad) and analyzed by immunoblotting with anti-pSmad1/5/8 antibody (Cell Signaling #9511). The same membrane was reprobed with a monoclonal antibody against β-actin (clone AC-15; Sigma) to confirm equal protein loading.

RT-PCR analyses

Total RNAs were extracted at the indicated times using the Nucleospin RNA XS kit (Macherey-Nagel). First-strand cDNAs were synthesized from 1 ?g of total RNA by reverse transcription using the iScript system (Bio-Rad) according to the manufacturer?s instructions. Quantitative

RT-PCR was performed using a Bio-Rad CFX96 apparatus and qPCR Master Mix (Promega). Relative quantification of gene expression was normalized to the RPL13a mRNA expression level. Sequences of the PCR primers were as follows:
ALK1: F-CCTCACGAGATGAGCAGTCC, R- GGCGATGAAGCCTAGGATGTT;
ALK2: F-GTCATGGTTCAGGGAGACGG, R-CCAGAGTAGTGAGCTGAAGGT;
ALK3: F-ATGCAAGGATTCACCGAAAGC, R-AACAACAGGGGGCAGTGTAG;
BMPRII: F-TGGCAGTGAGGTCACTCAAG, R-TTGCGTTCATTCTGCATAGC;
ActRIIA: F-AGCAAGGGGAAGATTTGGTT, R-GGTGCCTCTTTTCTCTGCAC;
ActRIIB: F-CTGTGCGGACTCCTTTAAGC, R-TCTTCACAGCCACAAAGTCG;
BMP9: F-CAGATACACAACGGACAAATCGTC, R-TTGGCAGGAGACATAGAGTCGG;
BMP10: F- CCATGCCGTCTGCTAACATCATC, R-ACATCATGCGATCTCTCTGCACCA;
RPL13a: F- CCCTCCACCCTATGACAAGA, R- TTCTCCTCCAGAGTGGCTGT.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

BMP10 ELISA was performed with a commercially available assay (Human/Mouse BMP-10 DuoSet ELISA, R&D Systems) that recognizes mouse mature BMP10. VEGF-A ELISA was performed with a commercially available assay (Mouse VEGF Quantikine ELISA Kit, R&D Systems).

Cell proliferation

Cells were treated with 10ng/mL of BMP9 or BMP10 in 0% FCS RPMI-1064 medium. Cell proliferation was assessed by counting cells every 24 hours using an automated cell counter (TC20, Biorad).

Statistical analysis

Statistical data analysis was assessed using the Mann-Whitney test except for tumor growth analysis which was assessed by the two-way Annova test.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest None

Acknowledgments We thank Dr S.J. lee (Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, USA) and Dr. T. Zimmers (Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA, USA) for providing *Gdf2*$^{-/-}$ mice and Dr. D Metzger (IGBMC, Illkirch, France) for providing us the Rosa26-CreER^{T2} mouse, and the animal facility staff at Institut de Biosciences et Biotechnologies de Grenoble (BIG, Grenoble, France) for animal husbandry.

Grant support M.O. was supported by the PhD program of CEA/DSV (IRTELIS). This work was supported by INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1036), CEA (Commisariat à l?Energie Atomique et aux Energies Alternatives, DRF/BIG/BCI), UGA (University Grenoble-Alpes, BCI), the Ligue contre le Cancer de la Loire et de la Savoie, The association Maladie de Rendu-Osler (AMRO) and the Association Pour la Recherche sur le Cancer. We thank the Fondation Maladies Rares (FMR) for its financial support to the generation of *Bmp10*$^{lox/lox}$ mice.

References

[1] Roberto Ronca, Mohammed Benkheil, Stefania Mitola, Sofie Struyf, and Sandra Liekens. Tumor angiogenesis revisited: Regulators and clinical implications. *Med Res Rev*, pages n/a–n/a, 2017.

[2] Rakesh K. Jain. Antiangiogenesis strategies revisited: from starving tumors to alleviating hypoxia. *Cancer Cell*, 26(5):605–622, November 2014.

[3] Laurent David, Jean-Jacques Feige, and Sabine Bailly. Emerging role of bone morphogenetic proteins in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 20(3):203–212, June 2009.

[4] Amaya García de Vinuesa, Salim Abdelilah-Seyfried, Petra Knaus, An Zwijsen, and Sabine Bailly. BMP signaling in vascular biology and dysfunction. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 27:65–79, February 2016.

[5] S. Paul Oh, Tsugio Seki, Kendrick A. Goss, Takeshi Imamura, Youngsuk Yi, Patricia K. Donahoe, Li Li, Kohei Miyazono, Peter ten Dijke, Seongjin Kim, and En Li. Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-β1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(6):2626–2631, March 2000.

[6] L. D. Urness, L. K. Sorensen, and D. Y. Li. Arteriovenous malformations in mice lacking activin receptor-like kinase-1. *Nat. Genet.*, 26(3):328–331, November 2000.

[7] D. W. Johnson, J. N. Berg, M. A. Baldwin, C. J. Gallione, I. Marondel, S. J. Yoon, T. T. Stenzel, M. Speer, M. A. Pericak-Vance, A. Diamond, A. E. Guttmacher, C. E. Jackson, L. Attisano, R. Kucherlapati, M. E. Porteous, and D. A. Marchuk. Mutations in the activin receptor-like kinase 1 gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *Nat. Genet.*, 13(2):189–195, June 1996.

[8] K. A. McAllister, K. M. Grogg, D. W. Johnson, C. J. Gallione, M. A. Baldwin, C. E. Jackson, E. A. Helmbold, D. S. Markel, W. C. McKinnon, and J. Murrell. Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat. Genet.*, 8(4):345–351, December 1994.

[9] A. F. Miller, S. A. Harvey, R. S. Thies, and M. S. Olson. Bone morphogenetic protein-9. An autocrine/paracrine cytokine in the liver. *J. Biol. Chem.*, 275(24):17937–17945, June 2000.

[10] Marie Bidart, Nicolas Ricard, Sandrine Levet, Michel Samson, Christine Mallet, Laurent David, Mariela Subileau, Emmanuelle Tillet, Jean-Jacques Feige, and Sabine Bailly. BMP9 is produced by hepatocytes and circulates mainly in an active mature form complexed to its prodomain. *Cell. Mol. Life Sci.*, 69(2):313–324, January 2012.

[11] H. Neuhaus, V. Rosen, and R. S. Thies. Heart specific expression of mouse BMP-10 a novel member of the TGF-beta superfamily. *Mech. Dev.*, 80(2):181–184, February 1999.

[12] Hao Chen, John Brady Ridgway, Tao Sai, Joyce Lai, Søren Warming, Hanying Chen, Merone Roose-Girma, Gu Zhang, Weinian Shou, and Minhong Yan. Context-dependent signaling defines roles of BMP9 and BMP10 in embryonic and postnatal development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 110(29):11887–11892, July 2013.

[13] O. E. Olsen, K. F. Wader, K. Misund, T. K. Våtsveen, T. B. Rø, A. K. Mylin, I. Turesson, B. F. Størdal, S. H. Moen, T. Standal, A. Waage, A. Sundan, and T. Holien. Bone morphogenetic protein-9 suppresses growth of myeloma cells by signaling through ALK2 but is inhibited by endoglin. *Blood Cancer J*, 4:e196, March 2014.

[14] Sharon A. Townson, Erik Martinez-Hackert, Chloe Greppi, Patricia Lowden, Dianne Sako, June Liu, Jeffrey A. Ucran, Katia Liharska, Kathryn W. Underwood, Jasbir Seehra, Ravindra Kumar, and Asya V. Grinberg. Specificity and structure of a high affinity activin receptor-like kinase 1 (ALK1) signaling complex. *J. Biol. Chem.*, 287(33):27313–27325, August 2012.

[15] Nicolas Ricard, Delphine Ciais, Sandrine Levet, Mariela Subileau, Christine Mallet, Teresa A. Zimmers, Se-Jin Lee, Marie Bidart, Jean-Jacques Feige, and Sabine Bailly. BMP9 and BMP10 are critical for postnatal retinal vascular remodeling. *Blood*, 119(25):6162–6171, June 2012.

[16] Hanying Chen, Shu Shi, Lourdes Acosta, Weiming Li, Jonathan Lu, Shideng Bao, Zhuang Chen, Zuocheng Yang, Michael D. Schneider, Kenneth R. Chien, Simon J. Conway, Mervin C. Yoder, Laura S. Haneline, Diego Franco, and Weinian Shou. BMP10 is essential for maintaining cardiac growth during murine cardiogenesis. *Development*, 131(9):2219–2231, May 2004.

[17] Sandrine Levet, Marie Ouarné, Delphine Ciais, Charles Coutton, Mariela Subileau, Christine Mallet, Nicolas Ricard, Marie Bidart, Thierry Debillon, Francesca Faravelli, Caroline Rooryck, Jean-Jacques Feige, Emmanuelle Tillet, and Sabine Bailly. BMP9 and BMP10 are necessary for proper closure of the ductus arteriosus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 112(25):E3207–3215, June 2015.

[18] Sandrine Levet, Delphine Ciais, Galina Merdzhanova, Christine Mallet, Teresa A. Zimmers, Se-Jin Lee, Fabrice P. Navarro, Isabelle Texier, Jean-Jacques Feige, Sabine Bailly, and Daniel Vittet. Bone morphogenetic protein 9 (BMP9) controls lymphatic vessel maturation and valve formation. *Blood*, 122(4):598–607, July 2013.

[19] Marie-José Goumans, An Zwijsen, Peter Ten Dijke, and Sabine Bailly. Bone Morphogenetic Proteins in Vascular Homeostasis and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, March 2017.

[20] Emmanuelle Tillet and Sabine Bailly. Emerging roles of BMP9 and BMP10 in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Front Genet*, 5:456, 2014.

[21] Sara I. Cunha and Kristian Pietras. ALK1 as an emerging target for antiangiogenic therapy of cancer. *Blood*, 117(26):6999–7006, June 2011.

[22] Amaya García de Vinuesa, Matteo Bocci, Kristian Pietras, and Peter Ten Dijke. Targeting tumour vasculature by inhibiting activin receptor-like kinase (ALK)1 function. *Biochem. Soc. Trans.*, 44(4):1142–1149, August 2016.

[23] Dianne Mitchell, Eileen G. Pobre, Aaron W. Mulivor, Asya V. Grinberg, Roselyne Castonguay, Travis E. Monnell, Nicolas Solban, Jeffrey A. Ucran, R. Scott Pearsall, Kathryn W. Underwood, Jasbir Seehra, and Ravindra Kumar. ALK1-Fc inhibits multiple mediators of angiogenesis and suppresses tumor growth. *Mol. Cancer Ther.*, 9(2):379–388, February 2010.

[24] Laurens A. van Meeteren, Midory Thorikay, Simon Bergqvist, Evangelia Pardali, Corrado Gallo Stampino, Dana Hu-Lowe, Marie-José Goumans, and Peter ten Dijke. Anti-human activin receptor-like kinase 1 (ALK1) antibody attenuates bone morphogenetic protein 9 (BMP9)-induced ALK1 signaling and interferes with endothelial cell sprouting. *J. Biol. Chem.*, 287(22):18551–18561, May 2012.

[25] Sara I. Cunha, Evangelia Pardali, Midory Thorikay, Charlotte Anderberg, Lukas Hawinkels, Marie-José Goumans, Jasbir Seehra, Carl-Henrik Heldin, Peter ten Dijke, and Kristian Pietras. Genetic and pharmacological targeting of activin receptor-like kinase 1 impairs tumor growth and angiogenesis. *J. Exp. Med.*, 207(1):85–100, January 2010.

[26] Dana D. Hu-Lowe, Enhong Chen, Lianglin Zhang, Katherine D. Watson, Patrizia Mancuso, Patrick Lappin, Grant Wickman, Jeffrey H. Chen, Jianying Wang, Xin Jiang, Karin Amundson, Ronald Simon, Andreas Erbersdobler, Simon Bergqvist, Zheng Feng, Terri A. Swanson, Brett H. Simmons, John Lippincott, Gerald F. Casperson, Wendy J. Levin, Corrado Gallo Stampino, David R. Shalinsky, Katherine W. Ferrara, Walter Fiedler, and Francesco Bertolini. Targeting activin receptor-like kinase 1 inhibits angiogenesis and tumorigenesis through a mechanism of action complementary to anti-VEGF therapies. *Cancer Res.*, 71(4):1362–1373, February 2011.

[27] Sara I. Cunha, Matteo Bocci, John Lövrot, Nikolas Eleftheriou, Pernilla Roswall, Eugenia Cordero, Linda Lindström, Michael Bartoschek, B. Kristian Haller, R. Scott Pearsall, Aaron W. Mulivor, Ravindra Kumar, Christer Larsson, Jonas Bergh, and Kristian Pietras. Endothelial ALK1 Is a Therapeutic Target to Block Metastatic Dissemination of Breast Cancer. *Cancer Res.*, 75(12):2445–2456, June 2015.

[28] Lukas Jac Hawinkels, Amaya Garcia de Vinuesa, and Peter Ten Dijke. Activin receptor-like kinase 1 as a target for anti-angiogenesis therapy. *Expert Opin Investig Drugs*, 22(11):1371–1383, November 2013.

[29] Vicky Makker, Virginia L. Filiaci, Lee-May Chen, Christopher J. Darus, James E. Kendrick, Gregory Sutton, Katherine Moxley, and Carol Aghajanian. Phase II evaluation of dalanter-

cept, a soluble recombinant activin receptor-like kinase 1 (ALK1) receptor fusion protein, for the treatment of recurrent or persistent endometrial cancer: an NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group Study 0229n. *Gynecol. Oncol.*, 138(1):24–29, July 2015.

[30] Antonio Jimeno, Marshall R. Posner, Lori J. Wirth, Nabil F. Saba, Roger B. Cohen, Elizabeta C. Popa, Athanassios Argiris, Kenneth F. Grossmann, Ammar Sukari, Dawn Wilson, Xiaosha Zhang, Jade Sun, Chad Glasser, Kenneth M. Attie, Matthew L. Sherman, Susan S. Pandya, and Jared Weiss. A phase 2 study of dalantercept, an activin receptor-like kinase-1 ligand trap, in patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer*, September 2016.

[31] Paul Wheatley-Price, Quincy Chu, Maria Bonomi, Jean Seely, Ashish Gupta, Glenwood Goss, John Hilton, Ronald Feld, Christopher W. Lee, John R. Goffin, Andrew Maksymiuk, Nevin Murray, Linda Hagerman, and Penelope A. Bradbury. A Phase II Study of PF-03446962 in Patients with Advanced Malignant Pleural Mesothelioma. CCTG Trial IND.207. *J Thorac Oncol*, 11(11):2018–2021, November 2016.

[32] A. Necchi, P. Giannatempo, L. Mariani, E. Farè, D. Raggi, M. Pennati, N. Zaffaroni, F. Crippa, A. Marchianò, N. Nicolai, M. Maffezzini, E. Togliardi, M. G. Daidone, A. M. Gianni, R. Salvioni, and F. De Braud. PF-03446962, a fully-human monoclonal antibody against transforming growth-factor β (TGFβ) receptor ALK1, in pre-treated patients with urothelial cancer: an open label, single-group, phase 2 trial. *Invest New Drugs*, 32(3):555–560, June 2014.

[33] Blanca Herrera, Maarten van Dinther, Peter Ten Dijke, and Gareth J. Inman. Autocrine bone morphogenetic protein-9 signals through activin receptor-like kinase-2/Smad1/Smad4 to promote ovarian cancer cell proliferation. *Cancer Res.*, 69(24):9254–9262, December 2009.

[34] Blanca Herrera, María García-Álvaro, Silvia Cruz, Peter Walsh, Margarita Fernández, Cesáreo Roncero, Isabel Fabregat, Aránzazu Sánchez, and Gareth J. Inman. BMP9 is a proliferative and survival factor for human hepatocellular carcinoma cells. *PLoS ONE*, 8(7):e69535, 2013.

[35] Shaoheng Wan, Yuehong Liu, Yaguang Weng, Wei Wang, Wei Ren, Chang Fei, Yingying Chen, Zhihui Zhang, Ting Wang, Jinshu Wang, Yayun Jiang, Lan Zhou, Tongchuan He, and Yan Zhang. BMP9 regulates cross-talk between breast cancer cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Cell Oncol (Dordr)*, 37(5):363–375, October 2014.

[36] Ke Wang, Honglei Feng, Wei Ren, Xiaoxiao Sun, Jinyong Luo, Min Tang, Lan Zhou, Yaguang Weng, Tong-Chuan He, and Yan Zhang. BMP9 inhibits the proliferation and invasiveness of breast cancer cells MDA-MB-231. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 137(11):1687–1696, November 2011.

[37] Wei Ren, Xiaoxiao Sun, Ke Wang, Honglei Feng, Yuehong Liu, Chang Fei, Shaoheng Wan, Wei Wang, Jinyong Luo, Qiong Shi, Min Tang, Guowei Zuo, Yaguang Weng, Tongchuan He, and Yan Zhang. BMP9 inhibits the bone metastasis of breast cancer cells by downregulating CCN2 (connective tissue growth factor, CTGF) expression. *Mol. Biol. Rep.*, 41(3):1373–1383, March 2014.

[38] Lin Ye, Sivan Bokobza, Jin Li, Muhammad Moazzam, Jinfeng Chen, Robert E. Mansel, and Wen G. Jiang. Bone morphogenetic protein-10 (BMP-10) inhibits aggressiveness of breast cancer cells and correlates with poor prognosis in breast cancer. *Cancer Sci.*, 101(10):2137–2144, October 2010.

[39] C. J. Aslakson and F. R. Miller. Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer Res.*, 52(6):1399–1405, March 1992.

[40] Andrew Ewens, Enrico Mihich, and M. Jane Ehrke. Distant metastasis from subcutaneously grown E0771 medullary breast adenocarcinoma. *Anticancer Res.*, 25(6B):3905–3915, December 2005.

[41] Yuan Yang, Howard H. Yang, Ying Hu, Peter H. Watson, Huaitian Liu, Thomas R. Geiger, Miriam R. Anver, Diana C. Haines, Philip Martin, Jeffrey E. Green, Maxwell P. Lee, Kent W. Hunter, and Lalage M. Wakefield. Immunocompetent mouse allograft models for development of therapies to target breast cancer metastasis. *Oncotarget*, 8(19):30621–30643, February 2017.

[42] R. M. Rohan, A. Fernandez, T. Udagawa, J. Yuan, and R. J. D'Amato. Genetic heterogeneity of angiogenesis in mice. *FASEB J.*, 14(7):871–876, May 2000.

[43] Laurent David, Christine Mallet, Michelle Keramidas, Noël Lamandé, Jean-Marie Gasc, Sophie Dupuis-Girod, Henri Plauchu, Jean-Jacques Feige, and Sabine Bailly. Bone morphogenetic protein-9 is a circulating vascular quiescence factor. *Circ. Res.*, 102(8):914–922, April 2008.

[44] Nikolas M. Eleftheriou, Jonas Sjölund, Matteo Bocci, Eliane Cortez, Se-Jin Lee, Sara I. Cunha, and Kristian Pietras. Compound genetically engineered mouse models of cancer reveal dual targeting of ALK1 and endoglin as a synergistic opportunity to impinge on angiogenic TGF-β signaling. *Oncotarget*, October 2016.

[45] Leon Jonker. TGF-β & BMP receptors endoglin and ALK1: overview of their functional role and status as antiangiogenic targets. *Microcirculation*, 21(2):93–103, February 2014.

[46] Yuichi Akatsu, Yasuhiro Yoshimatsu, Taishi Tomizawa, Kazuki Takahashi, Akihiro Katsura, Kohei Miyazono, and Tetsuro Watabe. Dual targeting of vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic protein-9/10 impairs tumor growth through inhibition of angiogenesis. *Cancer Sci.*, 108(1):151–155, January 2017.

[47] Itaru Imayoshi, Toshiyuki Ohtsuka, Daniel Metzger, Pierre Chambon, and Ryoichiro Kageyama. Temporal regulation of Cre recombinase activity in neural stem cells. *Genesis*, 44(5):233–238, May 2006.

Figure 1

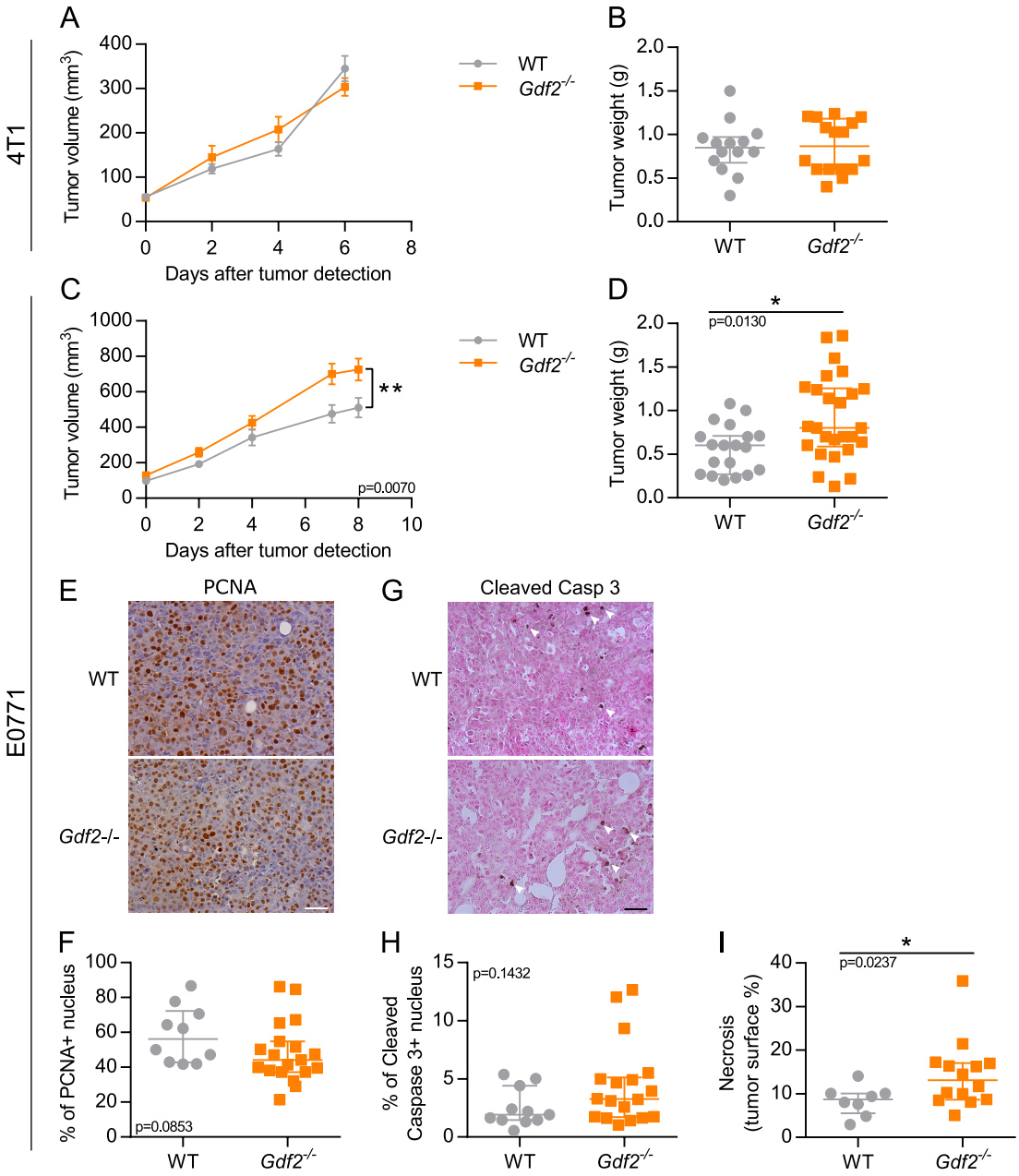


Figure 1: Bmp9 deletion increases tumor growth in E0771 but not 4T1 breast cancer cells

(A) 4T1 cells were injected in the 4th mammary gland and tumor growth assessed by caliper measurement every 2 to 3 days after tumor detection. (WT n=9, *Gdf2*$^{-/-}$ n=9, 1 group). (B) 4T1 tumor weight 6 days after tumor detection (WT n=14, *Gdf2*$^{-/-}$ n=16, 2 groups). (C) E0771 cells were injected in the 4th mammary gland and tumor growth was assessed by caliper measurement every 2 to 3 days after tumor detection (WT n=19, *Gdf2*$^{-/-}$ n=26, 3 groups). (D) E0771 tumor weight measured at the end of the experiment 8 days after tumor detection (WT n=19, *Gdf2*$^{-/-}$ n=26, 3 groups). (E) Representative immunohistochemistry staining for PCNA of WT and *Gdf2*$^{-/-}$ E0771 tumors. Scale bar 50μm. (F) PCNA positive cell quantification. Quantifications were performed by assessing 3 to 5 images per mice (WT n=11, *Gdf2*$^{-/-}$ n=18, 2 groups). (G) Representative immunohistochemistry staining for cleaved-caspase 3 of WT and *Gdf2*$^{-/-}$ E0771 tumors. Scale bar 50μm. (H) Cleaved-caspase 3 positive cell quantification. Quantifications were performed by assessing 3 to 5 images per mice (WT n=11, *Gdf2*$^{-/-}$ n=18, 2 groups). (I) Quantification of necrosis percentage (WT n=8, *Gdf2*$^{-/-}$ n=14, 2 groups). (A, C) Data are the mean $\pm$ SEM. (B, D, F, H, I) Data are the median $\pm$ interquartile range. *P $\leq$ 0.05 and **P $\leq$ 0.01 significantly different.

Figure 2

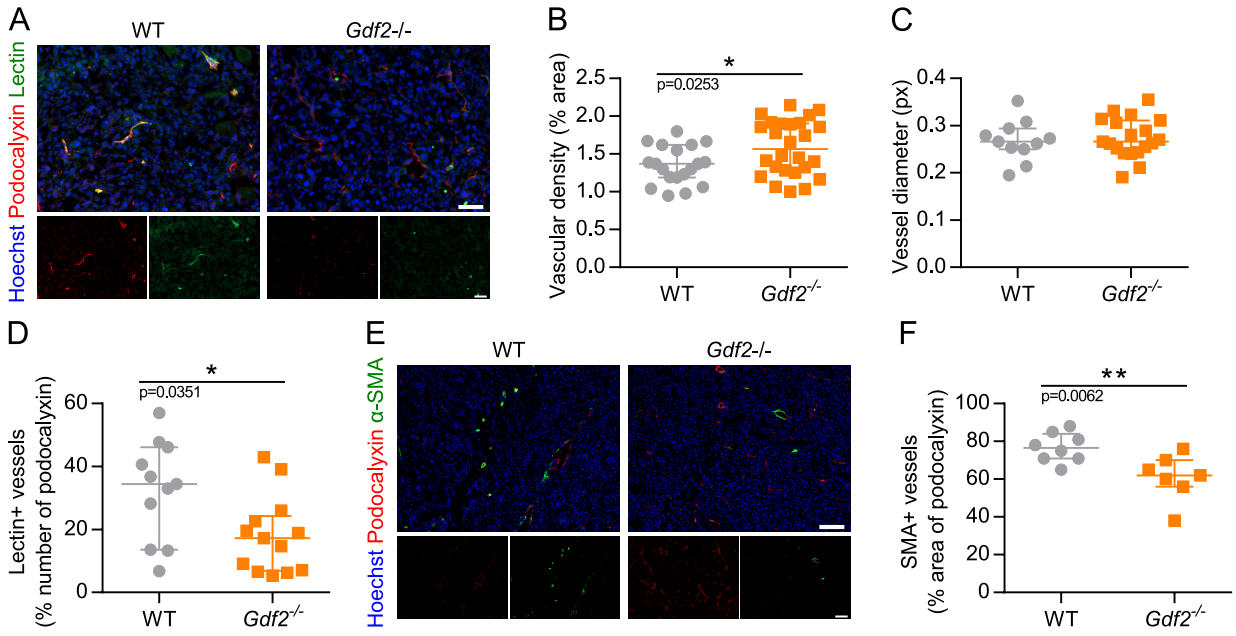


Figure 2: Bmp9 deletion impacts tumor vascularization in E0771 breast cancer cells

E0771 cells were injected in the 4th mammary gland of WT and *Gdf2*$^{-/-}$ mice and tumor vascularization was analyzed 8 days after tumor detection. (A) Representative immunofluorescence staining for podocalyxin (red) and lectin (green) and counterstaining for cell nuclei (blue, Hoechst) of the tumors. Scale bar 50μm. (B) Podocalyxin positive area quantification (% area of the tumor). Quantifications were performed by assessing 3 to 5 images per mice (WT n=19, *Gdf2*$^{-/-}$ n=26, 3 groups). (C) Assessment of vessel diameter using Ferret's theorem. Quantifications were performed by assessing 3 to 5 images per mice (WT n=11, *Gdf2*$^{-/-}$ n=19, 2 groups). (D) Quantification of the number of lectin-positive vessels relative to the total number of vessel (podocalyxin-positive). Quantifications were performed by assessing 3 to 5 images per mice (WT n=11, *Gdf2*$^{-/-}$ n=13, 2 groups). (E) Representative immunofluorescence staining for podocalyxin (red) and ?-smooth muscle actin (α-SMA, green) and counterstaining for cell nuclei (blue, Hoechst) of the tumors. Scale bar 100μm. (F) Quantification of positively-stained pixels of α-SMA relative to podocalyxin. Quantifications were performed by assessing 3 to 5 images per mice (WT n=8, *Gdf2*$^{-/-}$ n=7, 1 group). (B, C, D, F) Data are the median $\pm$ interquartile range. *P $\leq$ 0.05 and **P $\leq$ 0.01 significantly different.

Figure 3

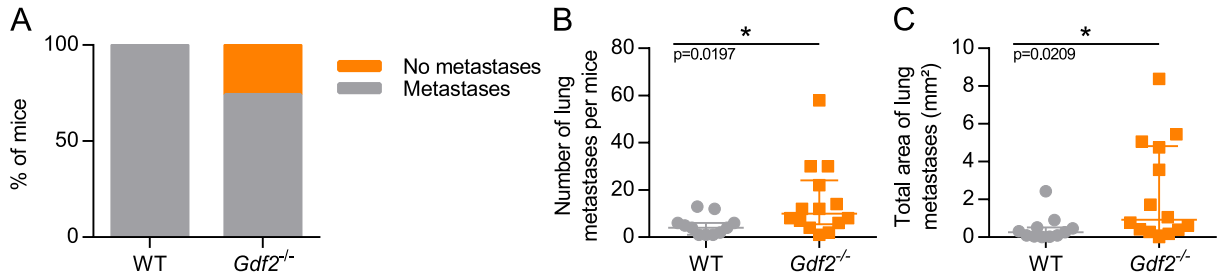


Figure 3: Bmp9 deletion decreases lung metastasis occurrence while increasing their size in the E0771 breast cancer model

E0771 cells were injected in the 4th mammary gland of WT and *Gdf2*$^{-/-}$ mice and lung metastases were analyzed 8 days after tumor detection. (A) Percentage of mice with lung metastases (WT n=11, *Gdf2*$^{-/-}$ n=19, 2 groups). (B) Number of lung metastases per mice bearing metastases. (WT n=11, *Gdf2*$^{-/-}$ n=14, 2 groups). (C) Total area of lung metastases per mice bearing metastases (WT n=11, *Gdf2*$^{-/-}$ n=14, 2 groups). Data are the median $\pm$ interquartile range. *P $\leq$ 0.05 significantly different.

Figure 4

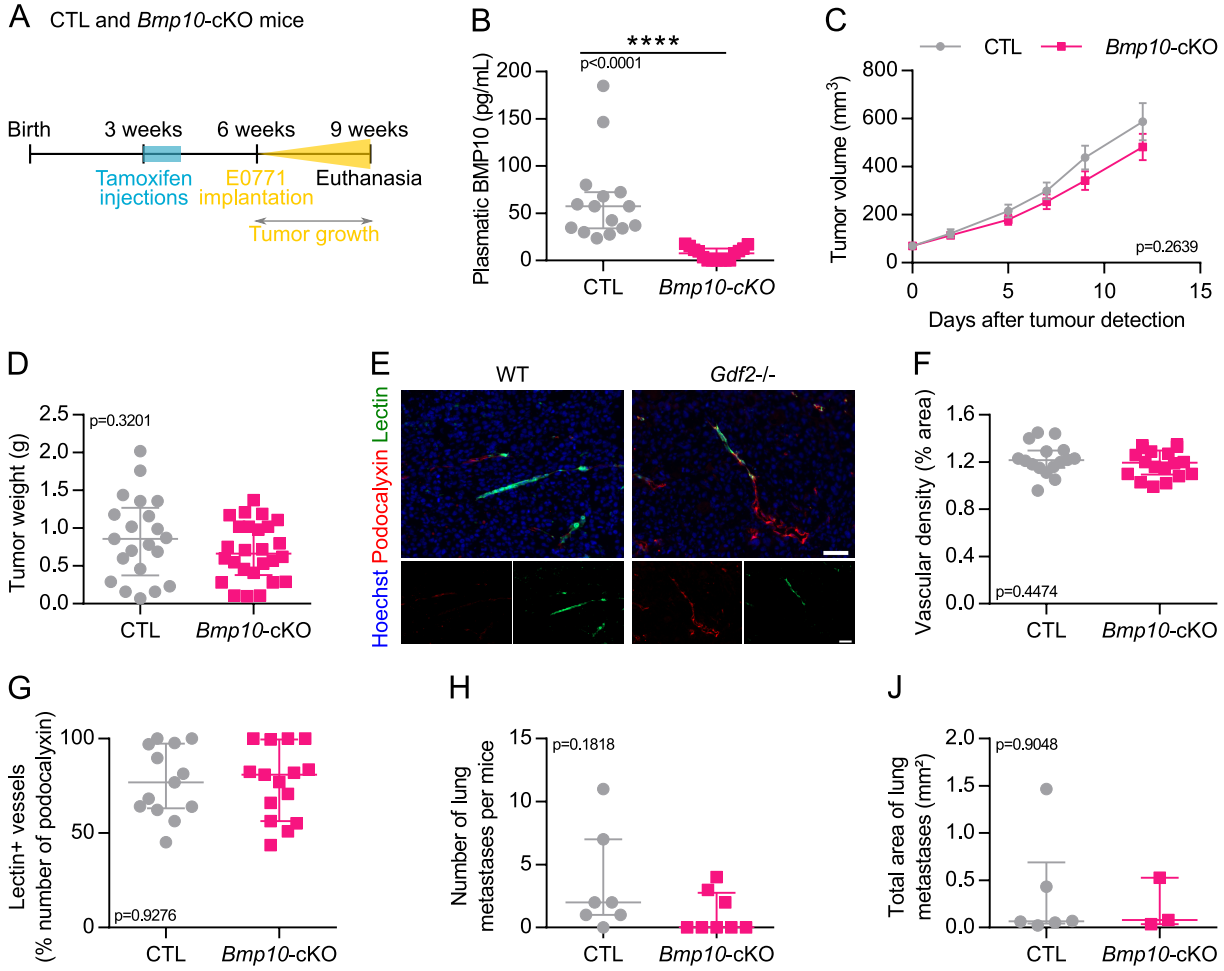
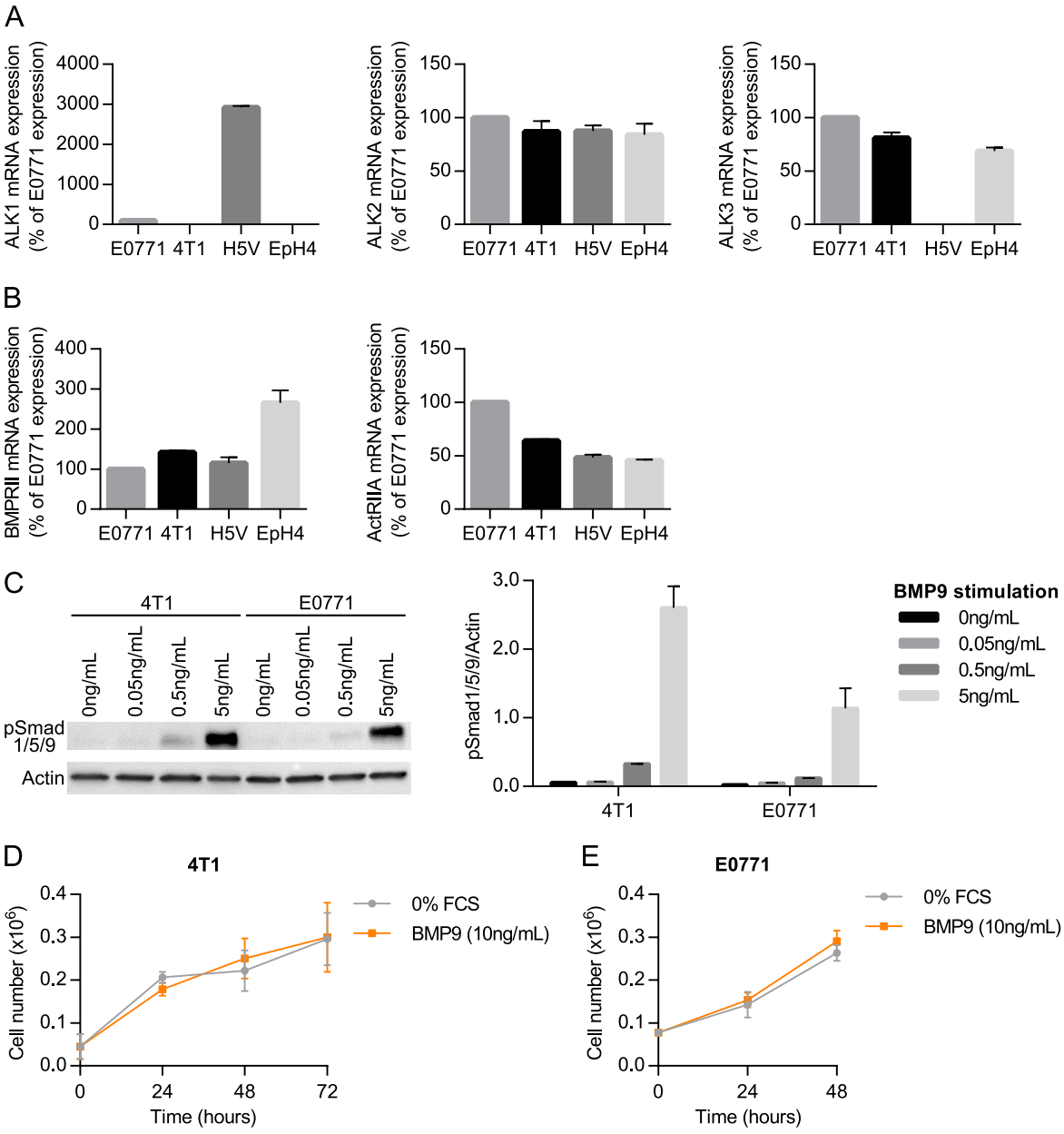


Figure 4: Bmp10 conditional deletion has no impact on tumor growth or angiogenesis in the E0771 breast cancer model

E0771 cells were injected in the 4th mammary gland of WT and Bmp10-cKO mice. (A) Schematic representation of the experimental protocol for *Bmp10* specific deletion and E0771 cells implantation. Tamoxifen was injected in all 3 week-old mice and 3 weeks later E0771 cells were injected and tumor growth was analyzed for 3 weeks. (B) Plasmatic levels of BMP10 in control (CTL, n=6) and *Bmp10* conditional KO (*Bmp10*-cKO, n=9) mice by ELISA assessed at the end of the experiment. (C) Tumor growth was assessed by caliper measurement every 2 to 3 days after tumor detection. Data are the mean ± SEM (CTL n=20, *Bmp10*-cKO n=25, 3 groups). (D) Tumor weight measured at the end of the experiment 12 days after tumor detection (CTL n=21, *Bmp10*-cKO n=26, 3 groups). (E) Representative immunofluorescence staining for podocalyxin (red) and lectin (green) and counterstaining for cell nuclei (blue, Hoechst) of tumors. Scale bar 50μm. (F) Podocalyxin positive area quantification (% area of the tumor). Quantifications were performed by assessing 3 to 5 images per mice (CTL n=16, Bmp10-cKO n=18, 2 groups). G - Quantification of the number of lectin-positive vessels relative to the total number of vessel (podocalyxin-positive). Quantifications were performed by assessing 3 to 5 images per mice (CTL n=13, Bmp10-cKO n=15, 2 groups). (H) Number of lung metastases per mice 12 days after tumor detection (CTL n=7, Bmp10-cKO n=8, 1 group). (I) Total area of lung metastases per mice bearing metastases 12 days after tumor detection (CTL n=6, Bmp10-cKO n=3, 1 replicate). (B, D, F, G, H, I) Data are the median ± interquartile range ***P $\leq$ 0.005 significantly different.

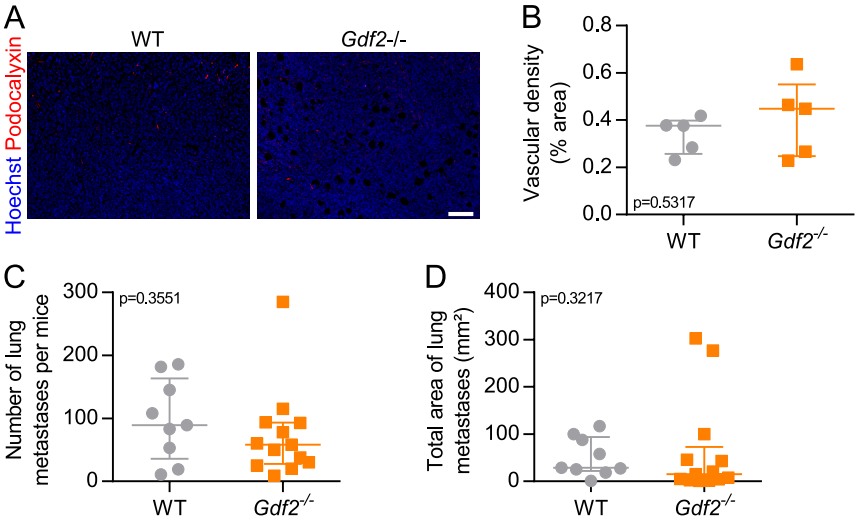
Supplemental figure 1



Supplemental Figure 1: Characterization of 4T1 and E0771 cells *in vitro*

(A) mRNA normalized expression of TGF-β type I receptors in 4T1, E0771, H5V and EpH4 cell lines. Expression normalized on E0771 expression (%). From left to right, normalized expression of ALK1, ALK2 and ALK3 compared to RPL13a expression. (B) mRNA normalized expression of TGF-β type II receptors in 4T1, E0771, H5V and EpH4 cell lines. Expression normalized on E0771 expression (%). From left to right, normalized expression of BMPRII and ActRIIA compared to RPL13a expression. (C) pSmad1/5/9 response to BMP9 (10 ng/mL) stimulation of 4T1 and E0771 cell lines. Response after 1h of stimulation (2 replicates). (D) Proliferation of 4T1 cells with or without BMP9 stimulation (10 ng/mL) (2 replicates). (E) Proliferation of E0771 cells with or without BMP9 stimulation (10 ng/mL) (2 replicates). (A, B, C, D, E) Data are the mean $\pm$ SEM.

Supplemental figure 2



Supplemental Figure 2: Characterization of 4T1 and E0771 cells *in vitro*

(A) Representative immunofluorescence staining for podocalyxin (red) and counterstaining for cell nuclei (blue, Hoechst) of WT and *Gdf2*$^{-/-}$ tumors. Scale bar 50μm. (B) Podocalyxin positive area quantification (% area of the tumor). Quantifications were performed by assessing 3 to 5 images per mice (WT n=5, *Gdf2*$^{-/-}$ n=5, 1 group). (C) Number of lung metastases per mice 6 days after tumor detection (WT n=9, *Gdf2*$^{-/-}$ n=13, 2 groups). (D) Total area of lung metastases per mice bearing metastases 3 weeks after tumor resection (WT n=9, *Gdf2*$^{-/-}$ n=13, 2 groups). (B, C, D) Data are the median $\pm$ interquartile range.

2.4 Résumé de l'article

1. Dans le modèle E0771, la délétion de *Gdf2* augmente la croissance tumorale et la densité vasculaire tumorale. Cependant, la perfusion des vaisseaux tumoraux est diminuée probablement du fait de la maturation vasculaire elle aussi diminuée. Les métastases sont plus importantes chez les souris *Gdf2*-KO bien que leur occurrence soit diminuée.
2. Dans le modèle 4T1, la délétion de *Gdf2* n'a aucun impact sur le développement tumoral et la dissémination métastatique.
3. Dans le modèle E0771, la délétion de *Bmp10* n'a aucun impact sur le développement tumoral et la dissémination métastatique.

2.5 Résultats non inclus

2.5.1 Étude de confirmation

Les résultats obtenus avec le modèle E0771 dans les souris *Gdf2*-KO étant intéressants, nous avons souhaité les confirmer en traitant des souris sauvages (WT) avec un anticorps neutralisant dirigé contre BMP9 (Genentech) dès l'implantation des cellules tumorales et tout au long du développement tumoral (figure R.3.A). Nous avons également traité des souris avec un anticorps neutralisant dirigé contre BMP10 (clone 13C11, produit au laboratoire) pour confirmer l'absence d'effet de BMP10 et des souris avec un ALK1-Fc (forme soluble du récepteur ALK1, Genentech) afin d'étudier si la réponse dans notre modèle était équivalente à celle obtenue dans les essais pré-cliniques publiés. Les activités plasmatiques ALK1 spécifiques ont été évaluées à l'aide d'un test Dual Luciférase afin de vérifier l'efficacité des injections (figure R.3.B).

L'étude de la croissance tumorale n'a pas confirmé les résultats obtenus avec les souris *Gdf2*-KO. En effet, les tumeurs des souris injectées avec un anticorps anti-BMP9 tendent à être plus petites que celles des souris contrôles (figure R.4.A), alors que les souris *Gdf2*-KO possédaient des tumeurs plus grosses que les souris WT. Cette tendance est également retrouvée lorsque le poids des tumeurs est analysé (figure R.4.B). Ainsi, l'injection d'un traitement à base d'anticorps dirigé contre BMP9 semble avoir un effet opposé à celui de la délétion de *Gdf2* sur la croissance tumorale. L'analyse de la croissance tumorale et du poids des tumeurs dans le groupe de souris injectées avec l'anticorps anti-BMP10 ne montre pas de différences significatives avec le groupe de souris contrôles (figure R.4.A et B). Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus avec la souris *Bmp10*-cKO. De façon surprenante, le groupe de souris traitées avec le ALK1-Fc tend à développer des

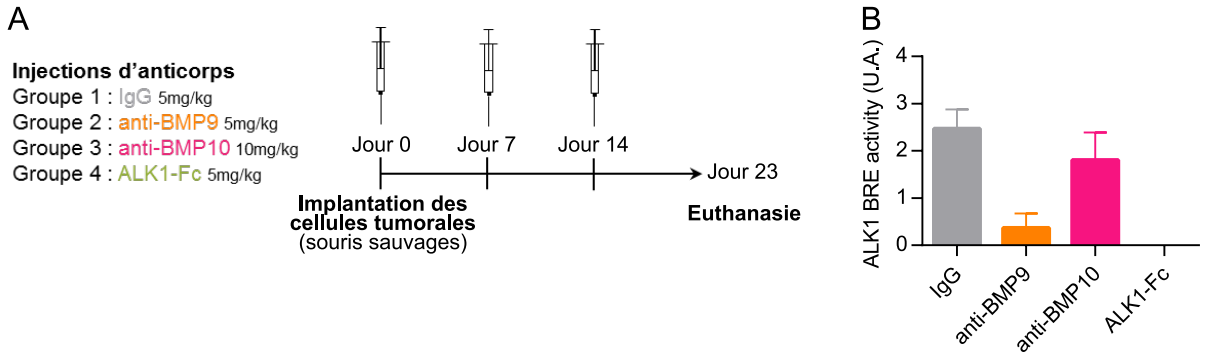


FIGURE R.3 – Étude de confirmation des résultats dans le modèle E0771.
A - Protocole d'injection suivi. Les doses injectées ont été mises au point dans l'équipe et l'efficacité des injections vérifiées grâce à des dosages d'activité plasmatiques ALK1 spécifiques. Le protocole suivi pour l'étude des processus tumoraux est identique à celui suivi dans l'article en cours de préparation. B - Activité plasmatique ALK1 spécifique des quatre groupes étudiés au jour 23 du protocole. Représentation : moyenne et écart-type.

tumeurs de façon plus rapide que les souris contrôles (figure R.4.A), tendance également présente au niveau du poids des tumeurs (figure R.4.B). Or les études pré-cliniques utilisant ce traitement ont montré que la croissance tumorale était diminuée dans ce modèle [Cunha et al., 2015]. Le traitement n'était cependant pas délivré ni aux mêmes doses, ni de la même manière (12 mg/kg, deux fois par semaines, 7 jours après l'établissement de la tumeur).

Nous avons également étudié la vascularisation tumorale des différents groupes. Nous n'avons pu détecter aucune différence de densité vasculaire (figure R.4.C) ni de perfusion vasculaire (figure R.4.D). Ces résultats sont de nouveau cohérents avec ceux obtenus avec les souris *Bmp10*-cKO mais restent surprenants au vu de ceux obtenus avec les souris *Gdf2*-KO. Les études pré-cliniques portant sur ALK1-Fc démontraient une diminution de la densité vasculaire non observée ici dans d'autres modèles tumoraux [Cunha et al., 2010][Cunha et al., 2015][Hawinkels et al., 2016]. Le groupe des souris ALK1-Fc présente une légère tendance allant dans ce sens, mais ces résultats nécessiteraient d'être confirmés.

L'étude des métastases a apporté un degré de complexité supérieur à la compréhension des résultats de cette étude. En effet, si l'ensemble des résultats précédents obtenus avec le groupe traité avec un anti-BMP10 est cohérent avec ceux obtenus avec la délétion conditionnelle de *Bmp10*, le nombre de métastases ne l'est pas. En effet, il est significativement plus important dans le groupe traité avec l'anticorps dirigé contre BMP10 comparé au groupe contrôle (figure R.4.E). Or aucune différence dans le nombre de métastases n'a été détectée entre les souris contrôles et les souris *Bmp10*-cKO (résultats encore préli-

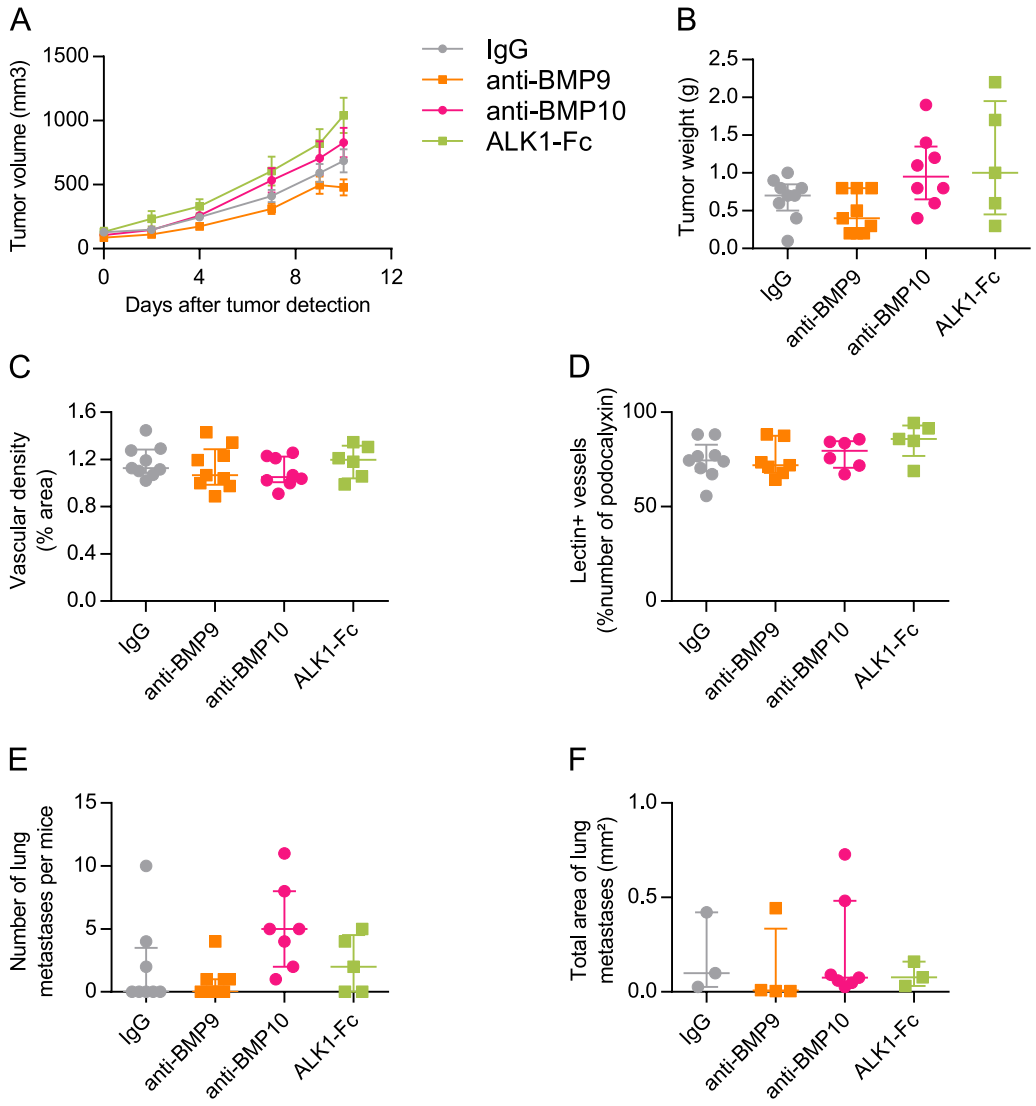


FIGURE R.4 – Résultats de l'étude de confirmation dans le modèle E0771.
A - Suivi de la croissance tumorale (IgG n=9, anti-BMP9 n=8, anti-BMP10 n=8, ALK1-Fc n=5). Représentation : moyenne et écart-type. B - Poids des tumeurs 10 jours après la détection (IgG n=9, anti-BMP9 n=9, anti-BMP10 n=8, ALK1-Fc n=5). Représentation : médiane et interquartiles. C - Densité vasculaire quantifiée à partir d'immunofluoresences dirigées contre la podocalyxine (IgG n=9, anti-BMP9 n=9, anti-BMP10 n=8, ALK1-Fc n=6). Représentation : médiane et interquartiles. D - Pourcentage de vaisseaux perfusés par rapport aux vaisseaux totaux (IgG n=9, anti-BMP9 n=7, anti-BMP10 n=6, ALK1-Fc n=5). Vaisseaux perfusés dénombrés par quantification des vaisseaux positifs pour la lectine (protocole : cf. article en préparation). Représentation : médiane et interquartiles. E - Nombre de métastases pulmonaires par souris (IgG n=8, anti-BMP9 n=9, anti-BMP10 n=7, ALK1-Fc n=5). Représentation : médiane et interquartiles. F - Surface totale métastatique pulmonaire (IgG n=3, anti-BMP9 n=4, anti-BMP10 n=7, ALK1-Fc n=3). Représentation : médiane et interquartiles. *P<0.05, test de Mann-Whtiney.

minaires). L'étude de la surface totale métastatique pulmonaire est cependant cohérente puisqu'aucune différence n'a été remarquée entre le groupe contrôle et le groupe injecté avec un anticorps anti-BMP10 (figure R.4.F). Les groupes injectés avec un anti-BMP9 ou avec ALK1-Fc ne présentent pas de différence de nombre ou de surface totale métastatique avec le groupe contrôle (figure R.4.E et F). Ces résultats sont une nouvelle fois différents de ceux obtenus avec les souris *Gdf2*-KO (surface totale métastatique supérieure à celle des WT) ou dans les études pré-cliniques publiées (diminution de nombre de métastases [Cunha et al., 2015]).

Ainsi, l'injection d'anticorps neutralisants dirigés contre BMP9 ou BMP10 ne reproduit pas - pour BMP9 - ou pas totalement - pour BMP10 - les résultats obtenus avec les souris transgéniques dans le modèle E0771. Il est possible que les différences observées entre les souris *Gdf2*-KO et le groupe injecté avec un anti-BMP9 soient dues au développement d'un système de compensation de la perte de l'expression de BMP9 chez la souris *Gdf2*-KO que les souris WT injectées avec l'anticorps ne peuvent mettre en place durant la courte période de l'expérience. Pour les souris *Bmp10*-cKO, les différences sont minimes et nécessitent d'être confirmées. Nous pouvons cependant supposer que BMP10 n'a effectivement pas d'impact dans ce modèle de cancer mammaire murin. Les résultats obtenus avec le traitement ALK1-Fc ne sont pas cohérents avec les études pré-cliniques publiées [Cunha et al., 2010][Mitchell et al., 2010][Cunha et al., 2015][Akatsu et al., 2017]. De nouvelles expériences seraient nécessaires afin de confirmer les tendances observées avant de tirer toute conclusion cette expérience n'ayant été réalisée qu'une seule fois.

2.5.2 Étude du modèle E0771 dans les souris doubles KO

De la même manière que nous avons étudié l'impact de la délétion de *Gdf2* ou de *Bmp10* dans le modèle E0771, nous avons débuté l'étude de la double délétion de *Gdf2* et de *Bmp10* (conditionnelle) grâce aux souris doubles KO (*Gdf2*-KO ;*Bmp10*-cKO).

Nos premiers résultats obtenus sur un groupe de souris montrent que la croissance tumorale des souris doubles KO semble accélérée comparée à celle des souris contrôles (figure R.5.A) comme c'est le cas avec les souris *Gdf2*-KO (cf. article en préparation) bien que le poids des tumeurs des deux groupes ne semblent pas différents (figure R.5.B). Nous avons également étudié le phénotype vasculaire des tumeurs doubles KO. Contrairement à la délétion simple de *Gdf2*, la densité vasculaire tumorale ne semble pas affectée par la double délétion de *Gdf2* et *Bmp10* (figure R.5.C). Cependant, la perfusion (figure R.5.D) et la maturation vasculaire (figure R.5.E) des tumeurs doubles KO tendent à être diminuées comme c'est le cas dans les tumeurs développées par les souris *Gdf2*-KO.

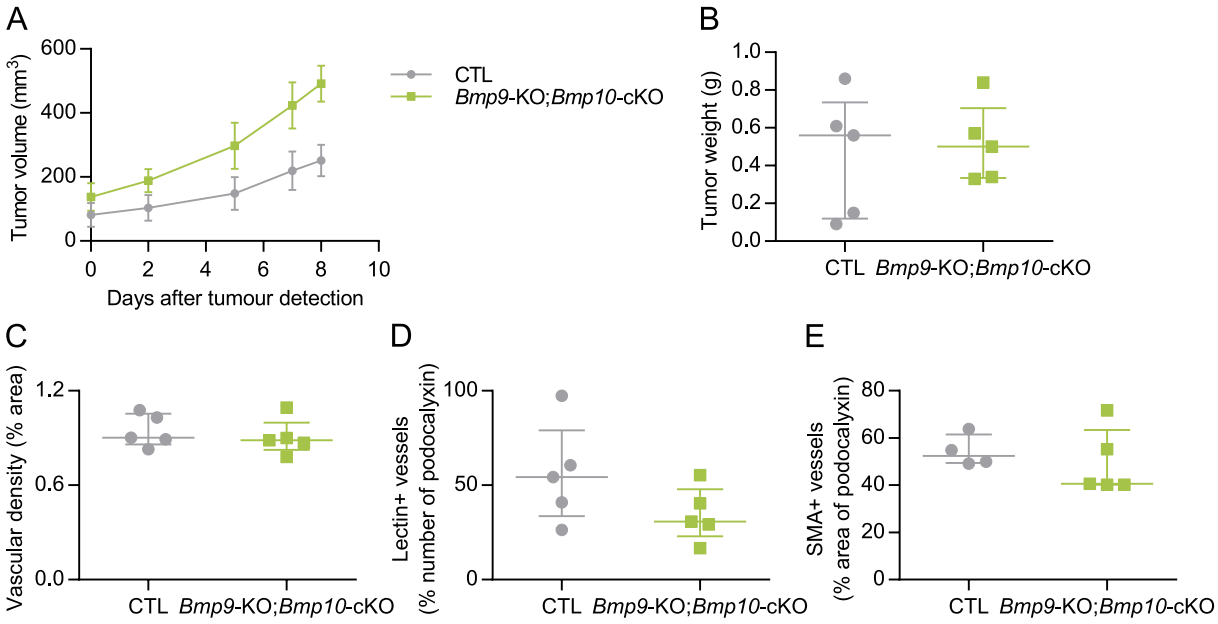


FIGURE R.5 – Effets de la double délétion de *Gdf2* et de *Bmp10* sur le modèle E0771.
A - Suivi de la croissance tumorale (CTL n=5, *Gdf2*-KO ;*Bmp10*-cKO n=5). Représentation : moyenne et écart-type. B - Poids des tumeurs 8 jours après la détection (CTL n=5, *Gdf2*-KO ;*Bmp10*-cKO n=5). Représentation : médiane et interquartiles. C - Densité vasculaire quantifiée à partir d'immunofluoresences dirigées contre la podocalyxine. Représentation : médiane et interquartiles (CTL n=5, *Gdf2*-KO ;*Bmp10*-cKO n=5). D - Pourcentage de vaisseaux perfusés par rapport aux vaisseaux totaux (CTL n=5, *Gdf2*-KO ;*Bmp10*-cKO n=5). Vaisseaux perfusés dénombrés par quantification des vaisseaux positifs pour la lectine (protocole : cf. article en préparation). Représentation : médiane et interquartiles. E - Pourcentage de surface vasculaire maturée par rapport à la surface vasculaire totale (CTL n=5, *Gdf2*-KO ;*Bmp10*-cKO n=5). Surface maturée déterminée par quantification de la surface positive pour α-SMA (protocole : cf. article en préparation). Représentation : médiane et interquartiles.

L'étude des métastases n'a pas encore été réalisée.

Ces résultats, bien que très préliminaires et demandant à être confirmés par d'autres groupes de souris, tendent à montrer un phénotype similaire entre les souris *Gdf2*-KO et doubles KO dans le modèle E0771. Cela suggère que BMP9 et BMP10 ne possèdent pas de rôles redondants dans le développement tumoral, et donc que seul BMP9 joue un rôle spécifique dans le développement tumoral de ce modèle de cancer mammaire préclinique.

2.5.3 Étude des mécanismes moléculaires induits par BMP9

L'étude de la délétion de *Gdf2* dans le développement tumoral du modèle de cancer mammaire E0771 nous a permis de montrer que BMP9 est impliqué dans l'angiogenèse tumorale en tant que facteur de maturation vasculaire (cf. article en cours de préparation). Le VEGF-A étant un des acteurs principaux de l'angiogenèse tumorale, nous avons étudié son expression tumorale et son taux circulant dans les souris sauvages et les souris *Gdf2*-

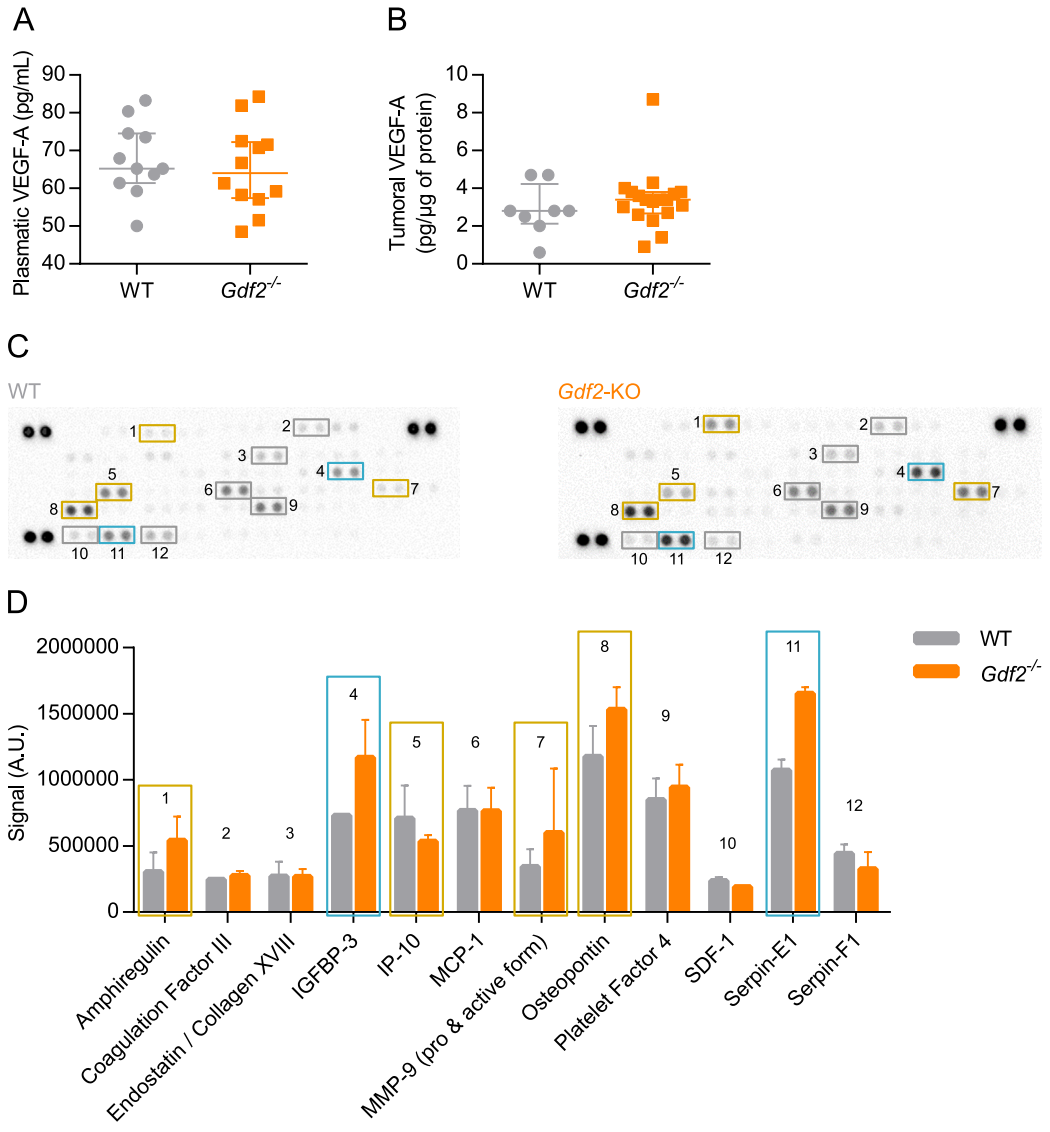


FIGURE R.6 – Identification de facteurs angiogéniques impliqués dans le modèle E0771.
A - Taux plasmatiques de VEGF-A. Détermination par ELISA (R&D) sur des plasmas prélevés 8 jours après détection de la tumeur (WT n=12, *Gdf2*-KO n=14, 2 groupes). B - Taux tumoraux de VEGF-A. Détermination par ELISA (R&D) sur des extraits de tumeurs prélevées 8 jours après détection (WT n=8, *Gdf2*-KO n=18, 2 groupes). C,D - Criblage protéique de 52 facteurs angiogéniques (R&D, Mouse Angiogenesis Antibody Array, ARY015) effectué sur deux tumeurs de souris sauvages et deux tumeurs de souris *Gdf2*-KO (extraits protéiques de tumeurs 8 jours après la détection). Cadres bleus : cibles principales identifiées. Cadres jaunes : cibles secondaires identifiées. Cadres gris : protéines dont l'expression ne varie pas. C - Membranes représentatives. D - Quantifications de l'ensemble des membranes. Représentation : moyenne et écart-type.

KO. Nos résultats montrent que le VEGF-A n'est pas impliqué dans l'action du BMP9, ses taux plasmatiques et tumoraux ne variant pas en fonction du génotype (figure R.6.A et B). Afin de mieux comprendre le phénotype vasculaire observé dans les tumeurs des souris n'exprimant pas de BMP9, nous avons souhaité identifier les facteurs angiogéniques dont les concentrations varient entre les tumeurs des souris sauvages et *Gdf2*-KO. Nous avons donc effectué un criblage de 52 protéines impliquées dans l'angiogenèse sur des extraits protéiques de deux tumeurs de souris sauvages et deux tumeurs de souris *Gdf2*-KO à l'aide d'un kit de criblage protéique (R&D, Mouse Angiogenesis Antibody Array, ARY015).

L'analyse des résultats obtenus démontre une certaine variabilité d'expression entre les deux tumeurs d'un même groupe. Nous avons cependant pu identifier plusieurs cibles intéressantes. Les deux plus convaincantes sont PAI-1(inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 ou Serpin-E1) et IGFBP3 (Insulin-like Growth Factor-Binding Protein 3) étant sur-exprimées dans les tumeurs des souris *Gdf2*-KO (figure R.6, cadres bleus). Certaines autres protéines, bien que leur expression soit plus variable, ont également attiré notre attention (figure R.6, cadres jaunes) comme l'amphireguline, IP10, MMP9 et l'osteopontine. A ce jour, l'ensemble de ces cibles n'a pas encore été validé sur un groupe plus important de tumeurs et nécessite une étude plus approfondie des mécanismes les reliant à BMP9.

2.6 Discussion et perspectives

Ce travail a permis de mettre en évidence que le rôle de BMP9 dans le cancer mammaire dépend du modèle utilisé. En effet, la délétion de *Gdf2* n'impacte ni le développement tumoral, ni la dissémination métastatique du modèle 4T1 contrairement au modèle E0771. Cette différence peut être attribuée aux différences présentes entre les deux modèles (sous-types différents de cancers mammaires) ou au fond génétique dans lequel ces modèles syngéniques sont étudiés. Le modèle 4T1 est implanté dans le fond génétique BALB/c dans lequel aucun phénotypes vasculaires n'a été observé dans les souris *Gdf2*-KO tandis que le modèle E0771 est implanté dans le fond génétique C57BL/6 dans lequel un phénotype lymphatique a été observé dans les souris *Gdf2*-KO.

BMP9 est donc impliqué dans le développement du cancer mammaire dans le modèle E0771. En effet, nous avons montré que la délétion de *Gdf2* augmente la croissance tumorale probablement *via* son effet sur la néo-angiogenèse tumorale. La perte de BMP9 induit une augmentation de la densité vasculaire tumorale. Le réseau vasculaire tumoral est cependant moins perfusé dans les souris *Gdf2*-KO ce qui peut s'expliquer par le manque de

maturation observé en comparaison avec celui des souris WT. Bien que la perfusion plus faible semble incohérente avec la taille augmentée des tumeurs, une explication existe. En effet, la perte de BMP9 induit une augmentation du nombre de vaisseaux tumoraux. Ces vaisseaux sont perfusés pendant un temps, permettant à la tumeur de se développer rapidement. Puis, du fait de leur manque de maturation et donc de stabilité, ils s'effondrent ne laissant que peu de vaisseaux perfusés visibles lors de l'analyse. Afin de démontrer cette hypothèse, il serait nécessaire d'étudier des échantillons de tumeurs à différents stades de leur développement.
Le fait que la délétion de *Gdf2* diminue la maturation des vaisseaux tumoraux est très intéressant. En effet, il a été montré que BMP9 et BMP10 sont des acteurs essentiels mais redondants de la quiescence et de la maturation vasculaire physiologique [Ricard et al., 2012] [Chen et al., 2013](cf. Introduction 4.5.2 p.105). Or d'après nos observations, dans le cadre du cancer mammaire, la perte de BMP9 seule impacte la maturation des vaisseaux. Ainsi, la maturation des vaisseaux par la voie de signalisation d'ALK1 est différente en fonction des conditions physiologiques ou tumorales ou en fonction du stade de développement de la souris, la redondance de BMP9 et de BMP10 dans le remodelage et la maturation vasculaire n'ayant été montrée que chez des nouveaux-nés [Ricard et al., 2012][Chen et al., 2013].

Notre étude, bien que démontrant des effets vasculaires de la délétion de *Gdf2* dans le cadre du modèle de cancer mammaire E0771, ne donne pas les clés de compréhension moléculaires des phénomènes observés. Il serait pourtant intéressant de connaître les mécanismes impliqués afin de mieux comprendre l'impact de BMP9 sur la vascularisation tumorale. Dans ce but, nous avons mené un criblage des protéines angiogéniques exprimées par les tumeurs des souris WT et *Gdf2*-KO et identifié deux cibles principales, PAI-1 et IGFBP3 qu'il nous faut encore investiguer. PAI-1 est une cible très intéressante, que nous trouvons sur-exprimée par les tumeurs E0771 des souris *Gdf2*-KO. Dans le modèle Rip2-Tag1, les tumeurs de souris *Gdf2*-KO présentent également une augmentation de l'expression de PAI-1 [Eleftheriou et al., 2016]. Cette protéine promeut l'angiogenèse tumorale *via* la protection de la matrice extra-cellulaire. De plus, PAI-1 est utilisé comme biomarqueur dans cancer du sein : de forts taux d'expression de PAI-1 sont associés à un mauvais pronostic et à plus de risques de rechutes une fois le cancer traité [Duffy et al., 2014].

Nos résultats montrent que BMP9 agit sur le développement tumoral du modèle E0771 en agissant*a priori* uniquement sur le microenvironnement tumoral (MET) et plus particulièrement sur le réseau vasculaire tumoral. Or l'angiogenèse tumorale est influencée par les différents acteurs du MET (cf. Introduction partie 3.4 p.62) et notamment par l'inflammation et le système immunitaire. Or BMP9 et BMP10 ont été décrit pour participer au recrutement des monocytes [Mitrofan et al., 2017] et l'endogline semble essentielle à

la réponse immunitaire des macrophages [Ojeda-Fernández et al., 2016]. Il serait donc intéressant d'étudier le statut inflammatoire et immunitaire de ces tumeurs.

L'impact de BMP9 sur la dissémination métastatique est difficile à classer comme étant favorable ou défavorable à la progression tumorale dans le modèle E0771. En effet, même si l'occurrence d'apparition de métastases pulmonaires est plus faible chez les souris *Gdf2*-KO, si ces dernières possèdent des métastases, leur développement est plus important que chez les souris WT. Ce dernier point est à corréler avec la capacité des souris *Gdf2*-KO à développer des tumeurs plus importantes. Il est possible que la différence d'occurrence métastatique soit due à un problème de drainage lymphatique. En effet, la route principale de dissémination des métastases dans le cancer du sein semble être le réseau lymphatique (cf. Introduction partie 3.4.4 p.68). Or, les souris *Gdf2*-KO possèdent un drainage lymphatique peu ou pas efficace dans le fond génétique C57BL/6 [Levet et al., 2013]. Nous étudions actuellement l'efficacité du drainage lymphatique tumoral dans le modèle E0771 en injectant des lipidots fluorescents dans la tumeur et en analysant l'accumulation de fluorescence dans le ganglion sentinelle (ganglion axillaire).

Nous avons montré que BMP9 impacte le développement tumoral dans le modèle de cancer mammaire E0771. Un des défauts de ce modèle est qu'il ne permet pas d'étudier l'initiation des tumeurs. En effet, n'étant pas un modèle spontané, nous ne pouvons pas étudier l'impact de la délétion de *Gdf2* sur l'apparition des tumeurs. Pour répondre à cette problématique, nous générons actuellement un modèle spontané de cancer mammaire murin délété pour *Gdf2* : le modèle MMTV-NeuT ;*Gdf2*-KO. Les souris possédant l'oncogène NeuT contrôles ($Gdf2^{+/+}$) développent des tumeurs spontanément entre 14 et 20 semaines [Barbieri et al., 2010]. Nous étudierons si les souris $Gdf2^{+/-}$ ou $Gdf2^{-/-}$ développent plus ou moins rapidement des tumeurs.

Ce travail n'a pas mis en évidence de rôle pour BMP10 dans le développement et la dissémination métastatique du cancer mammaire. Trois hypothèses peuvent expliquer ces résultats. Soit BMP10 n'a effectivement aucun effet sur le modèle étudié et n'a donc pas d'intérêt pour la recherche de solutions thérapeutiques dans le cancer du sein, soit BMP10 possède un ou plusieurs rôles redondants avec BMP9 dans le cancer mammaire. Cette hypothèse est cependant peu probable au vu du phénotype de cancer mammaire observé chez les souris doubles KO, qui est identique - résultats à confirmer - à celui obtenu dans les souris *Gdf2*-KO. Pour finir, la dernière hypothèse est que la délétion conditionnelle de *Bmp10* pourrait ne pas être suffisamment efficace pour que nous puissions observer un phénotype dans le modèle E0771. Cependant, nos vérifications de concentration plasmatique et d'activité plasmatique ALK1 spécifiques nous ont confirmé que la délétion

conditionnelle est significativement efficace bien qu'incomplète dans certaines souris (10% de BMP10 résiduel).

Ainsi, nous avons montré que BMP9 et BMP10 ne possèdent pas les mêmes rôles dans les processus tumoraux du modèle E0771. En effet, BMP9 est impliqué dans la néo-angiogenèse tumorale, participant ainsi à la régulation du développement tumoral et de la dissémination métastatique tandis que BMP10 ne semble pas impliqué dans le développement du cancer mammaire murin. Ainsi, l'altération de la voie de signalisation BMP9/BMP10/ALK1 ne produit pas le même phénotype dans le même modèle murin de cancer mammaire en fonction du ligand touché, suggérant des différences de signalisation encore mal comprises. Quel est donc l'impact de l'altération générale de la voie de signalisation BMP9/BMP10/ALK1 dans le modèle E0771 ? L'existence de possibles rôles redondants de BMP9 et de BMP10 dans ce modèle pourrait justifier l'intérêt d'utiliser des thérapies ciblant ALK1 plutôt que des thérapies ciblant spécifiquement BMP9.
Afin de répondre à cette problématique, nous avons mené des études préliminaires dans le modèle E0771 en utilisant des souris doubles KO pour mesurer l'impact de la double délétion en comparaison avec les délétions simples de *Gdf2* et de *Bmp10*. Les résultats obtenus n'ont pour l'instant pas permis de mettre en évidence de rôles redondants entre BMP9 et BMP10, le phénotype cancéreux se dégageant semblant équivalent à celui obtenu lors de la délétion simple de *Gdf2* (cf. section 2.5.2 p.178). L'utilisation de traitements ciblant ALK1 plutôt que spécifiquement BMP9 ne semble donc pas nécessaire. En effet, quelle est la nécessité de bloquer les activités physiologiques de BMP10 au risque de provoquer des effets secondaires ? Surtout, nos résultats montrent qu'il semble plus utile d'augmenter l'activité de BMP9 afin de diminuer le nombre de vaisseaux tumoraux et de les stabiliser. Cela permettrait une augmentation de la perfusion tumorale et donc un meilleur accès à l'ensemble des cellules tumorales pour des traitements tels que la chimiothérapie. Une étude plus poussée des processus métastatique serait à menée avant de commencer ce traitement, l'occurence des métastases pulmonaires étant augmentée en présence de BMP9. Cependant, il faut noter que les effets obtenus dans notre modèle ne sont pas très marqués. La voie de signalisation BMP9/BMP10/ALK1 ne joue donc probablement pas un rôle critique dans la vascularisation tumorale, d'autres voies telles que celle du VEGF, semblant prendre le dessus et limiter ses effets. Ainsi, le ciblage (positif ou négatif) de cette voie de signalisation ne semble pas avoir un intérêt thérapeutique suffisant pour être développé dans le cadre du traitement du cancer et plus spécifiquement dans le traitement du cancer du sein. Allant dans ce sens, le développement du Dalantercept a récemment été arrêté pour le traitement du cancer du rein du fait d'une absence de résultats cliniques [Melao, 2017]. D'autres études sont cependant nécessaires afin de confirmer cette

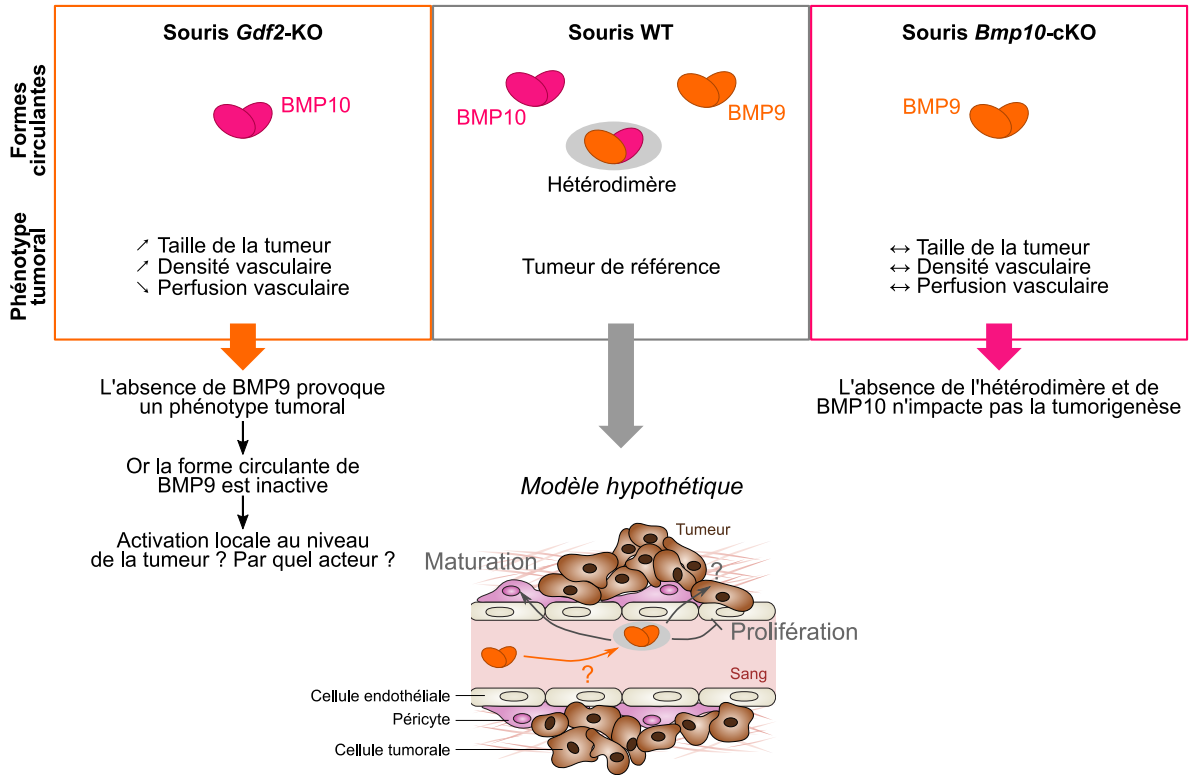


FIGURE R.7 – Hypothèse sur le mode d'action du BMP9 dans le modèle E0771.
Formes circulantes actives sur fond gris. Formes circulantes inactives sans fond.

hypothèse, notamment sur d'autres types de cancer.

Les différents phénotypes de cancer mammaire observés entre les souris *Gdf2*-KO et les souris *Bmp10*-cKO associés à une activité plasmatique ALK1 spécifique équivalente dans les deux génotypes posent en fait la question des formes circulantes de BMP9 et BMP10. En effet, l'absence d'activité dans les souris *Gdf2*-KO est logique puisque BMP9 a été décrit circulant sous forme active dans le sang [Bidart et al., 2012]. Cependant, BMP10 est plutôt considéré comme circulant majoritairement sous une forme inactive (cf. Introduction partie 4.5.1 p.101) et son inactivation conditionnelle ne devrait pas induire de modification drastique de l'activité plasmatique ALK1 spécifique. Cette incohérence est expliquée par l'étude réalisée dans notre équipe montrant que la forme majeure circulante active de BMP9 et BMP10 est en fait un hétérodimère BMP9-BMP10 (article soumis, cf. Annexe p.225). A partir de ce nouveau résultat, il est donc logique que l'activité plasmatique ALK1 spécifique soit nulle dans les deux génotypes étudiés. La différence de phénotype cancéreux observée serait donc due à des formes non actives circulantes d'homodimères de BMP9 ou de BMP10. En effet, absent des souris *Gdf2*-KO et *Bmp10*-cKO, l'hétérodimère ne peut être responsable du phénotype de vascularisation tumorale observé dans les premières puisque ce phénotype n'est pas observé dans les secondes (figure

R.7). Les modifications d'angiogenèse tumorale sont donc probablement dues à l'absence de l'homodimère de BMP9 (figure R.7). Or, d'après les dernières découvertes de l'équipe (article soumis, cf. Annexe p.225), ce dernier circulerait sous forme inactive. Son activation locale serait donc nécessaire avant tout effet sur la vascularisation tumorale (figure R.7). Afin d'évaluer cette hypothèse, nous souhaitons étudier l'activité ALK1 spécifique d'extraits tumoraux afin de déterminer si une telle activation a bien lieu dans les souris sauvages contrairement aux souris *Gdf2*-KO. Nous étudierons également l'activation des Smads dans ces tumeurs ainsi que les taux de réponses aux gènes cibles de la voie ALK1 comme Id1. Si les tumeurs des souris WT présentent une activité ALK1 spécifique plus importante que les tumeurs des souris *Gdf2*-KO, nous nous pencherons ensuite sur le facteur responsable de l'activation locale de l'homodimère de BMP9.

Pour conclure, cette étude nous a permis de montrer que, parmi les deux ligands de haute affinité d'ALK1, BMP9 est le seul à être impliqué dans les processus de carcinogenèse mammaire dans le modèle E0771. Cependant, les effets obtenus ne sont pas suffisamment importants pour être utilisés d'un point de vue thérapeutique, remettant en cause l'utilisation de traitements ciblant ALK1 dans le traitement du cancer. Plusieurs points restent toutefois à aborder afin de définir plus précisément le rôle de BMP9. En effet, même si les découvertes à venir ne permettent pas de trouver de solution dans le traitement des maladies malignes, elles peuvent apporter des pistes pour le traitement de maladies vasculaires impliquant la voie BMP9/ALK1.

Conclusion et perspectives

Conclusion

L'objectif de ma thèse était d'étudier le(s) rôles(s) de la voie de signalisation d'ALK1, et plus précisément de ses deux ligands BMP9 et BMP10, dans le développement vasculaire physiologique et tumoral à l'aide de modèles murins et de souris invalidées pour ces deux facteurs.

J'ai étudié l'impact de BMP9 et BMP10 dans le développement vasculaire physiologique grâce à un modèle original, la fermeture du canal artériel (DA). Ce projet a permis de mettre en évidence plusieurs processus physiologiques importants dans la fermeture anatomique du DA et de montrer l'effet non négligeable de BMP9 et de BMP10 dans ce phénomène. En effet, ils sont essentiels au dépôt de matrice extra-cellulaire et à la diminution du nombre de cellules intimales, processus importants pour une fermeture définitive du DA. Pour la première fois, nous avons donc pu démontrer l'implication de facteurs de croissance circulant dans le remodelage de cette dérivation embryonnaire vasculaire, amenant un éclairage nouveau sur ce processus et de nouvelles pistes dans le traitement des canaux artériels persistants comme l'administration de BMP9 et de BMP10.

L'étude de l'implication de BMP9 et de BMP10 dans l'angiogenèse tumorale a été le travail le plus important de ma thèse. J'ai généré de nouveaux modèles murins transgéniques (souris *Bmp10*-cKO et *Gdf2*-KO ;*Bmp10*-cKO) indispensables à cette étude mais qui permettront également, dans un futur proche, l'étude des rôles de la voie de signalisation d'ALK1 dans le développement vasculaire physiologique. De plus, mon travail a permis de mettre en évidence que BMP9 possède un rôle spécifique dans le développement et la dissémination tumorale du cancer du sein et plus particulièrement un rôle de facteur de maturation des vaisseaux tumoraux contrairement à BMP10. Cette non redondance dans le contexte de l'angiogenèse tumorale chez l'adulte nous permet d'envisager que l'importance de ces deux facteurs de croissance dans l'angiogenèse varie en fonction du contexte et/ou du stade de développement. Cette étude avait également pour objectif d'étudier leur implication dans la lymphangiogenèse tumorale. A ce stade, l'avancement

de notre travail ne nous permet pas de conclure. De façon plus générale, ce travail remet en cause les traitements ciblant ALK1, puisque BMP9 et BMP10, ses deux ligands de haute affinité, ne possèdent pas les mêmes rôles dans le cancer du sein. Nos résultats permettent de plus d'envisager qu'il serait plus intéressant d'activer la signalisation de BMP9 afin de normaliser les vaisseaux tumoraux et de permettre un meilleur accès à la tumeur dans le cadre d'une combinaison thérapeutique avec une chimiothérapie par exemple. Cette perspective thérapeutique est cependant à confirmer au vu des possibles effets pro-métastatiques de BMP9.

Pour conclure, mon travail a permis plusieurs avancées dans la compréhension des rôles de BMP9 et de BMP10 dans l'angiogenèse physiologique et tumorale. L'ensemble des connaissances à ce sujet est résumé dans la figure C.1 (mes contributions personnelles sont en texte gras). J'ai ainsi pu montrer que ces deux facteurs de croissance, et plus spécifiquement BMP9 dans le contexte du cancer du sein, sont indispensables au bon fonctionnement et au bon remodelage du réseau vasculaire sanguin. BMP9 et BMP10 sont des acteurs importants de l'angiogenèse, et l'étude de plus en plus fine de leurs différents rôles permet d'envisager des solutions thérapeutiques à des pathologies telles que la persistance du canal artériel.

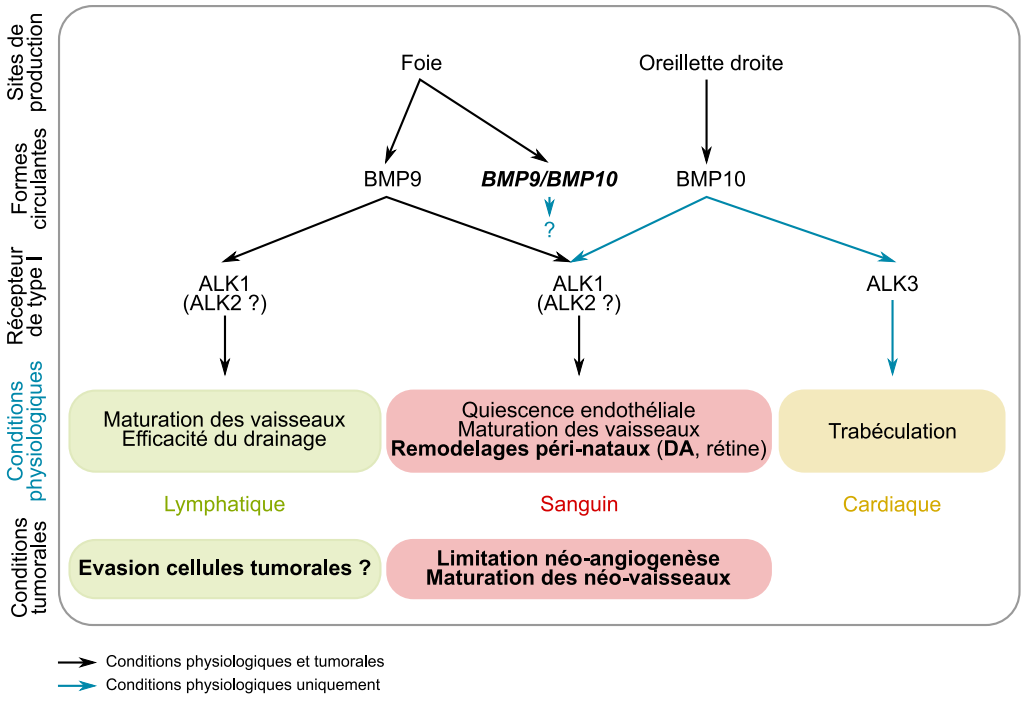


FIGURE C.1 – Rôles de BMP9 et de BMP10 dans les systèmes cardiaques et vasculaires. BMP9 : homodimère BMP9. BMP10 : homodimère BMP10. BMP9/BMP10 : hétérodimère BMP9 et BMP10. Texte gras : contributions personnelles.

Perspectives

Les résultats obtenus au cours de ma thèse, associés à ceux obtenus dans notre équipe et d'autres groupes, prouvent l'importance de la voie BMP9/BMP10/ALK1 dans l'angiogenèse physiologique et tumorale. Ils démontrent la nécessité de continuer à étudier cette voie afin de mieux comprendre son implication dans diverses pathologies et son intérêt thérapeutique. Plusieurs points méritent, à mon sens, une attention plus particulière, au delà de ceux décrits dans la partie *Résultats*.

Notre étude sur l'implication de BMP9 et BMP10 dans le cancer du sein a démontré un rôle spécifique de BMP9 dans l'angiogenèse tumorale. Bien que le phénotype observé soit trop faible pour faire de BMP9 une cible thérapeutique, il semble essentiel de finir de caractériser le rôle de la voie de signalisation d'ALK1 dans ce contexte. En effet, des essais cliniques ciblant ALK1 sont encore en cours malgré l'arrêt de développement du Dalantercept du fait d'une absence de résultats dans le traitement du cancer du rein [Melao, 2017]. De plus, une meilleure connaissance des effets de cette voie de signalisation dans le contexte tumoral permettra aussi de mieux évaluer son potentiel dans le traitement de certains effets secondaires des cancers comme le lymphœdème. En effet, BMP9 étant un acteur important du maintien des valves lymphatiques, il serait intéressant de mener des études sur son potentiel thérapeutique dans l'augmentation du drainage lymphatique. Si ce potentiel s'avérait être réel, la connaissance de l'impact de BMP9 sur la dissémination métastatique serait alors essentielle pour éviter tout risque trop important.

Il est également indispensable de mieux comprendre le rôle et l'activité des formes circulantes de BMP9 et de BMP10. Notre équipe a pu montrer que la forme active circulante de ces facteurs de croissance est en fait un hétérodimère BMP9-BMP10 (article soumis, cf. Annexe p.225). A ce jour, nous n'avons pas observé de différences de signalisation entre les homodimères et l'hétérodimère. Il semble cependant que ces derniers possèdent des rôles différents puisque l'absence de l'hétérodimère n'impacte pas de la même manière le modèle de cancer mammaire E0771 dans les souris *Gdf2*-KO et *Bmp10*-cKO. Il est donc important de se pencher sur les rôles spécifiques des formes circulantes et leur

potentielle activation ou inactivation locale par un acteur encore inconnu. L'identification des possibles complexes de signalisation spécifiques de ces différentes formes est également importante. La compréhension des rôles spécifiques - vasculaires ou tissu-spécifiques - de BMP9, de BMP10 et de l'hétérodimère est un point clé de la compréhension de cette voie de signalisation.

Une connaissance plus profonde des rôles physiologiques de cette voie de signalisation dans le développement vasculaire est essentielle. En effet, toute connaissance à ce sujet permet de mieux appréhender tout dysfonctionnement de la voie de signalisation dans des pathologies comme la maladie de Rendu-Osler-Weber et l'hypertension artérielle pulmonaire. Il est donc indispensable de commencer à caractériser les souris *Bmp10*-cKO et *Gdf2*-KO ;*Bmp10*-cKO générées au cours de cette thèse. En effet, aucune étude phénotypique n'a été effectuée sur ces souris. Les souris *Bmp10*-cKO n'ont jusqu'ici montré aucun défaut évident mais il semble notamment important d'étudier la potentielle apparition de défauts cardiaques voire vasculaires avec le temps. L'étude de la vascularisation de la rétine serait également intéressante sur ces souris afin de confirmer la redondance de BMP9 et de BMP10 dans l'angiogenèse péri-natale. Les souris doubles KO présentent également un potentiel très intéressant au niveau de l'étude de la redondance de BMP9 et de BMP10 à la naissance et à l'âge adulte. Au moment où je rédige cette thèse, nous avons notamment observé des hémorragies non expliquées au niveau des poumons et de la peau de ces souris. Une étude approfondie des réseaux vasculaires sanguin et lymphatique ainsi que de possibles altérations au niveau des organes s'impose. Il est connu depuis un certain temps que le fond génétique dans lequel sont développées les souris influence les phénotypes observés [Rohan et al., 2000][Bourdeau et al., 2000][Bourdeau et al., 2001]. C'est une observation que nous avons pu faire également dans notre équipe avec les souris *Gdf2*-KO dans le fond 129/Ola (données non publiées à ce jour). Il sera donc probablement intéressant de changer le fond génétique des souris générées lors de ma thèse si elles ne présentent pas de phénotype particulier.

Pour finir, l'ensemble de ces recherches et des connaissances doit permettre d'envisager des solutions thérapeutiques. A l'heure actuelle, il est envisagé de traiter avec du BMP9 des patients atteints l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) [Long et al., 2015] ou de DMLA [Ntumba et al., 2016]. Ces solutions thérapeutiques ne doivent pas être envisagées uniquement dans le cadre de maladies vasculaires, BMP9 semble également être une possibilité dans le traitement de la maladie d'Alzheimer [Burke et al., 2013][Wang et al., 2017b], le traitement de la dysplasie bronchopulmonaire chez le nouveau né [Chen et al., 2017] et dans le traitement de défauts osseux [Dumanian et al., 2017][Saulacic et al., 2017]. Ainsi, il est important de continuer à explorer les implications de cette voie de signalisation dans

de nombreux domaines (les modèles murins développés pendant cette thèse pouvant être des outils pré-cliniques utiles) afin d'appréhender l'ensemble de son potentiel thérapeutique qui semble pouvoir s'étendre des maladies vasculaires, aux réparations osseuses en passant par les problèmes neuronaux, cardiaques (BMP10 ?) et à ceux associés à la fibrose ou l'inflammation (figure C.2).

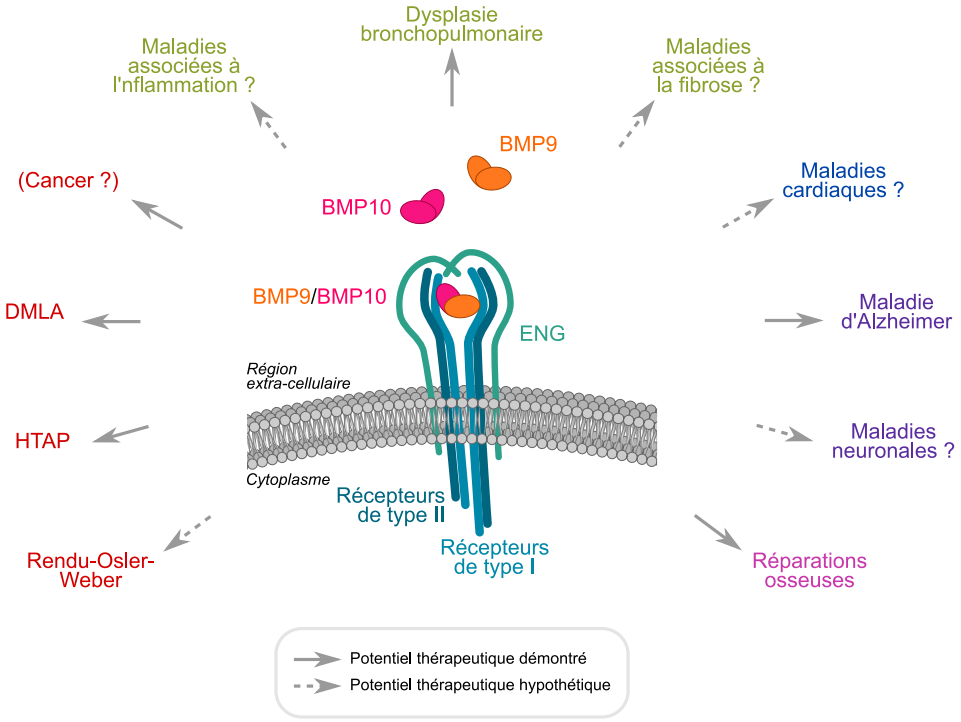


FIGURE C.2 – Potentiel thérapeutique de BMP9 et BMP10.
Rouge : vasculaire. Vert : fibrose et inflammation. Bleu : cardiaque. Violet : neuronal. Rose : os. BMP9 : homodimère BMP9. BMP10 : homodimère BMP10. BMP9/BMP10 : hétérodimère BMP9 et BMP10.

Bibliographie

[Aalders et al., 2017] Aalders, K. C., Tryfonidis, K., Senkus, E., and Cardoso, F. (2017). Anti-angiogenic treatment in breast cancer : Facts, successes, failures and future perspectives. *Cancer Treatment Reviews*, 53 :98–110.

[Adams and Alitalo, 2007] Adams, R. H. and Alitalo, K. (2007). Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8(6) :464–478.

[Aird, 2007] Aird, W. C. (2007). Phenotypic heterogeneity of the endothelium : I. Structure, function, and mechanisms. *Circ. Res.*, 100(2) :158–173.

[Akatsu et al., 2017] Akatsu, Y., Yoshimatsu, Y., Tomizawa, T., Takahashi, K., Katsura, A., Miyazono, K., and Watabe, T. (2017). Dual targeting of vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic protein-9/10 impairs tumor growth through inhibition of angiogenesis. *Cancer Sci.*, 108(1) :151–155.

[Akiyama et al., 2014] Akiyama, I., Yoshino, O., Osuga, Y., Shi, J., Harada, M., Koga, K., Hirota, Y., Hirata, T., Fujii, T., Saito, S., and Kozuma, S. (2014). Bone morphogenetic protein 7 increased vascular endothelial growth factor (VEGF)-a expression in human granulosa cells and VEGF receptor expression in endothelial cells. *Reprod Sci*, 21(4) :477–482.

[Alitalo et al., 2005] Alitalo, K., Tammela, T., and Petrova, T. V. (2005). Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature*, 438(7070) :946–953.

[Anderberg et al., 2013] Anderberg, C., Cunha, S. I., Zhai, Z., Cortez, E., Pardali, E., Johnson, J. R., Franco, M., Páez-Ribes, M., Cordiner, R., Fuxe, J., Johansson, B. R., Goumans, M.-J., Casanovas, O., ten Dijke, P., Arthur, H. M., and Pietras, K. (2013). Deficiency for endoglin in tumor vasculature weakens the endothelial barrier to metastatic dissemination. *J. Exp. Med.*, 210(3) :563–579.

[Anilkumar, 2013] Anilkumar, M. (2013). Patent ductus arteriosus. *Cardiol Clin*, 31(3) :417–430.

[Apolo et al., 2017] Apolo, A. B., Karzai, F. H., Trepel, J. B., Alarcon, S., Lee, S., Lee, M.-J., Tomita, Y., Cao, L., Yu, Y., Merino, M. J., Madan, R. A., Parnes, H. L., Steinberg, S. M., Rodriguez, B. W., Seon, B. K., Gulley, J. L., Arlen, P. M., Dawson, N. A., Figg, W. D., and Dahut, W. L. (2017). A Phase II Clinical Trial of TRC105 (Anti-Endoglin Antibody) in Adults With Advanced/Metastatic Urothelial Carcinoma. *Clin Genitourin Cancer*, 15(1) :77–85.

[Arthur et al., 2000] Arthur, H. M., Ure, J., Smith, A. J., Renforth, G., Wilson, D. I., Torsney, E., Charlton, R., Parums, D. V., Jowett, T., Marchuk, D. A., Burn, J., and Diamond, A. G. (2000). Endoglin, an ancillary TGFbeta receptor, is required for extraembryonic angiogenesis and plays a key role in heart development. *Dev. Biol.*, 217(1) :42–53.

[Aslakson and Miller, 1992] Aslakson, C. J. and Miller, F. R. (1992). Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer Res.*, 52(6) :1399–1405.

[Aspalter et al., 2015] Aspalter, I. M., Gordon, E., Dubrac, A., Ragab, A., Narloch, J., Vizán, P., Geudens, I., Collins, R. T., Franco, C. A., Abrahams, C. L., Thurston, G., Fruttiger, M., Rosewell, I., Eichmann, A., and Gerhardt, H. (2015). Alk1 and Alk5 inhibition by Nrp1 controls vascular sprouting downstream of Notch. *Nat Commun*, 6 :7264.

[Baeten et al., 2015] Baeten, J. T., Jackson, A. R., McHugh, K. M., and Lilly, B. (2015). Loss of Notch2 and Notch3 in vascular smooth muscle causes patent ductus arteriosus. *Genesis*, 53(12) :738–748.

[Barbieri et al., 2010] Barbieri, I., Pensa, S., Pannellini, T., Quaglino, E., Maritano, D., Demaria, M., Voster, A., Turkson, J., Cavallo, F., Watson, C. J., Provero, P., Musiani, P., and Poli, V. (2010). Constitutively active Stat3 enhances neu-mediated migration and metastasis in mammary tumors via upregulation of Cten. *Cancer Res.*, 70(6) :2558–2567.

[Bateson et al., 1999] Bateson, E. A. J., Schulz, R., and Olley, P. M. (1999). Response of Fetal Rabbit Ductus Arteriosus to Bradykinin : Role of Nitric Oxide, Prostaglandins, and Bradykinin Receptors. *Pediatr Res*, 45(4, Part 1 of 2) :568–574.

[Bergers and Benjamin, 2003] Bergers, G. and Benjamin, L. E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer*, 3(6) :401–410.

[Bergers and Hanahan, 2008] Bergers, G. and Hanahan, D. (2008). Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat. Rev. Cancer*, 8(8) :592–603.

[Bergwerff et al., 1999] Bergwerff, M., DeRuiter, M. C., and Gittenberger-de Groot, A. C. (1999). Comparative anatomy and ontogeny of the ductus arteriosus, a vascular outsider. *Anat. Embryol.*, 200(6) :559–571.

[Bernardo et al., 2011] Bernardo, A. S., Faial, T., Gardner, L., Niakan, K. K., Ortmann, D., Senner, C. E., Callery, E. M., Trotter, M. W., Hemberger, M., Smith, J. C., Bardwell, L., Moffett, A., and Pedersen, R. A. (2011). BRACHYURY and CDX2 mediate BMP-induced differentiation of human and mouse pluripotent stem cells into embryonic and extraembryonic lineages. *Cell Stem Cell*, 9(2) :144–155.

[Bessa et al., 2009] Bessa, P. C., Cerqueira, M. T., Rada, T., Gomes, M. E., Neves, N. M., Nobre, A., Reis, R. L., and Casal, M. (2009). Expression, purification and osteogenic bioactivity of recombinant human BMP-4, -9, -10, -11 and -14. *Protein Expr. Purif.*, 63(2) :89–94.

[Bidart et al., 2012] Bidart, M., Ricard, N., Levet, S., Samson, M., Mallet, C., David, L., Subileau, M., Tillet, E., Feige, J.-J., and Bailly, S. (2012). BMP9 is produced by hepatocytes and circulates mainly in an active mature form complexed to its prodomain. *Cell. Mol. Life Sci.*, 69(2) :313–324.

[Bökenkamp et al., 2010] Bökenkamp, R., DeRuiter, M. C., van Munsteren, C., and Gittenberger-de Groot, A. C. (2010). Insights into the pathogenesis and genetic background of patency of the ductus arteriosus. *Neonatology*, 98(1) :6–17.

[Bourdeau et al., 2000] Bourdeau, A., Faughnan, M. E., and Letarte, M. (2000). Endoglin-deficient mice, a unique model to study hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Trends Cardiovasc. Med.*, 10(7) :279–285.

[Bourdeau et al., 2001] Bourdeau, A., Faughnan, M. E., McDonald, M. L., Paterson, A. D., Wanless, I. R., and Letarte, M. (2001). Potential role of modifier genes influencing transforming growth factor-beta1 levels in the development of vascular defects in endoglin heterozygous mice with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Am. J. Pathol.*, 158(6) :2011–2020.

[Boyle and Levin, 2008] Boyle, P. and Levin, P. (2008). *World Cancer Report 2008*. World Cancer Reports. IARC.

[Bragdon et al., 2011] Bragdon, B., Moseychuk, O., Saldanha, S., King, D., Julian, J., and Nohe, A. (2011). Bone morphogenetic proteins : a critical review. *Cell. Signal.*, 23(4) :609–620.

[Breitkopf-Heinlein et al., 2017] Breitkopf-Heinlein, K., Meyer, C., König, C., Gaitantzi, H., Addante, A., Thomas, M., Wiercinska, E., Cai, C., Li, Q., Wan, F., Hellerbrand, C., Valous, N. A., Hahnel, M., Ehlting, C., Bode, J. G., Müller-Bohl, S., Klingmüller, U., Altenöder, J., Ilkavets, I., Goumans, M.-J., Hawinkels, L. J. A. C., Lee, S.-J., Wieland, M., Mogler, C., Ebert, M. P., Herrera, B., Augustin, H., Sánchez, A., Dooley, S., and Ten Dijke, P. (2017). BMP-9 interferes with liver regeneration and promotes liver fibrosis. *Gut*, 66(5) :939–954.

[Brown et al., 2005] Brown, M. A., Zhao, Q., Baker, K. A., Naik, C., Chen, C., Pukac, L., Singh, M., Tsareva, T., Parice, Y., Mahoney, A., Roschke, V., Sanyal, I., and Choe, S. (2005). Crystal structure of BMP-9 and functional interactions with pro-region and receptors. *J. Biol. Chem.*, 280(26) :25111–25118.

[Burke et al., 2013] Burke, R. M., Norman, T. A., Haydar, T. F., Slack, B. E., Leeman, S. E., Blusztajn, J. K., and Mellott, T. J. (2013). BMP9 ameliorates amyloidosis and the cholinergic defect in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 110(48) :19567–19572.

[Caduff et al., 1986] 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(2) :154–164.

[Caperuto et al., 2008] Caperuto, L. C., Anhê, G. F., Cambiaghi, T. D., Akamine, E. H., do Carmo Buonfiglio, D., Cipolla-Neto, J., Curi, R., and Bordin, S. (2008). Modulation of bone morphogenetic protein-9 expression and processing by insulin, glucose, and glucocorticoids : possible candidate for hepatic insulin-sensitizing substance. *Endocrinology*, 149(12) :6326–6335.

[Carmeliet, 2000] Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Med.*, 6(4) :389–395.

[Carmeliet and Jain, 2000] Carmeliet, P. and Jain, R. K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407(6801) :249–257.

[Carmeliet and Jain, 2011a] Carmeliet, P. and Jain, R. K. (2011a). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 473(7347) :298–307.

[Carmeliet and Jain, 2011b] Carmeliet, P. and Jain, R. K. (2011b). Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat Rev Drug Discov*, 10(6) :417–427.

[Carreira et al., 2014] Carreira, A. C., Alves, G. G., Zambuzzi, W. F., Sogayar, M. C., and Granjeiro, J. M. (2014). Bone Morphogenetic Proteins : structure, biological function and therapeutic applications. *Arch. Biochem. Biophys.*, 561 :64–73.

[Castonguay et al., 2011] Castonguay, R., Werner, E. D., Matthews, R. G., Presman, E., Mulivor, A. W., Solban, N., Sako, D., Pearsall, R. S., Underwood, K. W., Seehra, J., Kumar, R., and Grinberg, A. V. (2011). Soluble endoglin specifically binds bone morphogenetic proteins 9 and 10 via its orphan domain, inhibits blood vessel formation, and suppresses tumor growth. *J. Biol. Chem.*, 286(34) :30034–30046.

[Chen et al., 2003] Chen, C., Grzegorzewski, K. J., Barash, S., Zhao, Q., Schneider, H., Wang, Q., Singh, M., Pukac, L., Bell, A. C., Duan, R., Coleman, T., Duttaroy, A., Cheng, S., Hirsch, J., Zhang, L., Lazard, Y., Fischer, C., Barber, M. C., Ma, Z.-D., Zhang, Y.-Q., Reavey, P., Zhong, L., Teng, B., Sanyal, I., Ruben, S. M., Blondel, O., and Birse, C. E. (2003). An integrated functional genomics screening program reveals a role for BMP-9 in glucose homeostasis. *Nat. Biotechnol.*, 21(3) :294–301.

[Chen et al., 2004a] Chen, D., Zhao, M., and Mundy, G. R. (2004a). Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*, 22(4) :233–241.

[Chen et al., 2013] Chen, H., Brady Ridgway, J., Sai, T., Lai, J., Warming, S., Chen, H., Roose-Girma, M., Zhang, G., Shou, W., and Yan, M. (2013). Context-dependent

signaling defines roles of BMP9 and BMP10 in embryonic and postnatal development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 110(29) :11887–11892.

[Chen et al., 2004b] Chen, H., Shi, S., Acosta, L., Li, W., Lu, J., Bao, S., Chen, Z., Yang, Z., Schneider, M. D., Chien, K. R., Conway, S. J., Yoder, M. C., Haneline, L. S., Franco, D., and Shou, W. (2004b). BMP10 is essential for maintaining cardiac growth during murine cardiogenesis. *Development*, 131(9) :2219–2231.

[Chen et al., 2017] Chen, X., Orriols, M., Walther, F. J., Laghmani, E. H., Hoogeboom, A. M., Hogen-Esch, A. C. B., Hiemstra, P. S., Folkerts, G., Goumans, M.-J. T. H., Ten Dijke, P., Morrell, N. W., and Wagenaar, G. T. M. (2017). Bone Morphogenetic Protein 9 Protects against Neonatal Hyperoxia-Induced Impairment of Alveolarization and Pulmonary Inflammation. *Front Physiol*, 8 :486.

[Cleaver and Melton, 2003] Cleaver, O. and Melton, D. A. (2003). Endothelial signaling during development. *Nat Med*, 9(6) :661–668.

[Clyman et al., 1996] Clyman, R. I., Goetzman, B. W., Chen, Y. Q., Mauray, F., Kramer, R. H., Pytela, R., and Schnapp, L. M. (1996). Changes in Endothelial Cell and Smooth Muscle Cell Integrin Expression during Closure of the Ductus Arteriosus : An Immunohistochemical Comparison of the Fetal, Preterm Newborn, and Full-Term Newborn Rhesus Monkey Ductus. *Pediatr Res*, 40(2) :198–208.

[Coceani and Baragatti, 2012] Coceani, F. and Baragatti, B. (2012). Mechanisms for ductus arteriosus closure. *Semin. Perinatol.*, 36(2) :92–97.

[Cox et al., 2015] Cox, T. R., Rumney, R. M. H., Schoof, E. M., Perryman, L., Høye, A. M., Agrawal, A., Bird, D., Latif, N. A., Forrest, H., Evans, H. R., Huggins, I. D., Lang, G., Linding, R., Gartland, A., and Erler, J. T. (2015). The hypoxic cancer secretome induces pre-metastatic bone lesions through lysyl oxidase. *Nature*, 522(7554) :106–110.

[Cunha et al., 2015] Cunha, S. I., Bocci, M., Lövrot, J., Eleftheriou, N., Roswall, P., Cordero, E., Lindström, L., Bartoschek, M., Haller, B. K., Pearsall, R. S., Mulivor, A. W., Kumar, R., Larsson, C., Bergh, J., and Pietras, K. (2015). Endothelial ALK1 Is a Therapeutic Target to Block Metastatic Dissemination of Breast Cancer. *Cancer Res.*, 75(12) :2445–2456.

[Cunha et al., 2010] Cunha, S. I., Pardali, E., Thorikay, M., Anderberg, C., Hawinkels, L., Goumans, M.-J., Seehra, J., Heldin, C.-H., ten Dijke, P., and Pietras, K. (2010). Genetic and pharmacological targeting of activin receptor-like kinase 1 impairs tumor growth and angiogenesis. *J. Exp. Med.*, 207(1) :85–100.

[David et al., 2009] David, L., Feige, J.-J., and Bailly, S. (2009). Emerging role of bone morphogenetic proteins in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 20(3) :203–212.

[David et al., 2008] David, L., Mallet, C., Keramidas, M., Lamandé, N., Gasc, J.-M., Dupuis-Girod, S., Plauchu, H., Feige, J.-J., and Bailly, S. (2008). Bone morphogenetic protein-9 is a circulating vascular quiescence factor. *Circ. Res.*, 102(8) :914–922.

[David et al., 2007a] David, L., Mallet, C., Mazerbourg, S., Feige, J.-J., and Bailly, S. (2007a). Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood*, 109(5) :1953–1961.

[David et al., 2007b] David, L., Mallet, C., Vailhé, B., Lamouille, S., Feige, J.-J., and Bailly, S. (2007b). Activin receptor-like kinase 1 inhibits human microvascular endothelial cell migration : potential roles for JNK and ERK. *J. Cell. Physiol.*, 213(2) :484–489.

[De Palma et al., 2017] De Palma, M., Biziato, D., and Petrova, T. V. (2017). Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*, advance online publication.

[De Smet et al., 2009] De Smet, F., Segura, I., De Bock, K., Hohensinner, P. J., and Carmeliet, P. (2009). Mechanisms of vessel branching : filopodia on endothelial tip cells lead the way. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 29(5) :639–649.

[De Spiegelaere et al., 2012] De Spiegelaere, W., Casteleyn, C., Van den Broeck, W., Plendl, J., Bahramsoltani, M., Simoens, P., Djonov, V., and Cornillie, P. (2012). Intussusceptive angiogenesis : a biologically relevant form of angiogenesis. *J. Vasc. Res.*, 49(5) :390–404.

[Deng et al., 2000] Deng, Z., Morse, J. H., Slager, S. L., Cuervo, N., Moore, K. J., Venetos, G., Kalachikov, S., Cayanis, E., Fischer, S. G., Barst, R. J., Hodge, S. E., and Knowles, J. A. (2000). Familial primary pulmonary hypertension (gene PPH1) is caused by mutations in the bone morphogenetic protein receptor-II gene. *Am. J. Hum. Genet.*, 67(3) :737–744.

[Derynck and Akhurst, 2013] Derynck, R. and Akhurst, R. J. (2013). BMP-9 balances endothelial cell fate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 110(47) :18746–18747.

[Dieterich and Detmar, 2016] Dieterich, L. C. and Detmar, M. (2016). Tumor lymphangiogenesis and new drug development. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 99, Part B :148–160.

[Duan et al., 2015] Duan, L., Ye, L., Wu, R., Wang, H., Li, X., Li, H., Yuan, S., Zha, H., Sun, H., Zhang, Y., Chen, X., Zhang, Y., and Zhou, L. (2015). Inactivation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway is involved in BMP9-mediated tumor-suppressive effects in gastric cancer cells. *J. Cell. Biochem.*, 116(6) :1080–1089.

[Duffy et al., 2015] Duffy, A. G., Ulahannan, S. V., Cao, L., Rahma, O. E., Makarova-Rusher, O. V., Kleiner, D. E., Fioravanti, S., Walker, M., Carey, S., Yu, Y., Venkatesan, A. M., Turkbey, B., Choyke, P., Trepel, J., Bollen, K. C., Steinberg, S. M., Figg, W. D.,

and Greten, T. F. (2015). A phase II study of TRC105 in patients with hepatocellular carcinoma who have progressed on sorafenib. *United European Gastroenterol J*, 3(5) :453–461.

[Duffy et al., 2014] Duffy, M. J., McGowan, P. M., Harbeck, N., Thomssen, C., and Schmitt, M. (2014). uPA and PAI-1 as biomarkers in breast cancer : validated for clinical use in level-of-evidence-1 studies. *Breast Cancer Res*, 16(4).

[Dumanian et al., 2017] Dumanian, Z. P., Tollemar, V., Ye, J., Lu, M., Zhu, Y., Liao, J., Ameer, G. A., He, T.-C., and Reid, R. R. (2017). Repair of critical sized cranial defects with BMP9-transduced calvarial cells delivered in a thermoresponsive scaffold. *PLoS ONE*, 12(3) :e0172327.

[Dunworth et al., 2014] Dunworth, W. P., Cardona-Costa, J., Bozkulak, E. C., Kim, J.-D., Meadows, S., Fischer, J. C., Wang, Y., Cleaver, O., Qyang, Y., Ober, E. A., and Jin, S.-W. (2014). Bone morphogenetic protein 2 signaling negatively modulates lymphatic development in vertebrate embryos. *Circ. Res.*, 114(1) :56–66.

[Düwel et al., 2007] Düwel, A., Eleno, N., Jerkic, M., Arevalo, M., Bolaños, J. P., Bernabeu, C., and López-Novoa, J. M. (2007). Reduced tumor growth and angiogenesis in endoglin-haploinsufficient mice. *Tumour Biol.*, 28(1) :1–8.

[Dyer et al., 2014] Dyer, L. A., Pi, X., and Patterson, C. (2014). The role of BMPs in endothelial cell function and dysfunction. *Trends Endocrinol. Metab.*, 25(9) :472–480.

[Echtler et al., 2010] Echtler, K., Stark, K., Lorenz, M., Kerstan, S., Walch, A., Jennen, L., Rudelius, M., Seidl, S., Kremmer, E., Emambokus, N. R., von Bruehl, M.-L., Frampton, J., Isermann, B., Genzel-Boroviczény, O., Schreiber, C., Mehilli, J., Kastrati, A., Schwaiger, M., Shivdasani, R. A., and Massberg, S. (2010). Platelets contribute to postnatal occlusion of the ductus arteriosus. *Nat. Med.*, 16(1) :75–82.

[Egginton et al., 2001] Egginton, S., Zhou, A. L., Brown, M. D., and Hudlická, O. (2001). Unorthodox angiogenesis in skeletal muscle. *Cardiovasc. Res.*, 49(3) :634–646.

[Ehata et al., 2013] Ehata, S., Yokoyama, Y., Takahashi, K., and Miyazono, K. (2013). Bi-directional roles of bone morphogenetic proteins in cancer : another molecular Jekyll and Hyde ? *Pathol. Int.*, 63(6) :287–296.

[Eleftheriou et al., 2016] Eleftheriou, N. M., Sjölund, J., Bocci, M., Cortez, E., Lee, S.-J., Cunha, S. I., and Pietras, K. (2016). Compound genetically engineered mouse models of cancer reveal dual targeting of ALK1 and endoglin as a synergistic opportunity to impinge on angiogenic TGF-β signaling. *Oncotarget*.

[Evan and Vousden, 2001] Evan, G. I. and Vousden, K. H. (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, 411(6835) :342–348.

[Ewens et al., 2005] Ewens, A., Mihich, E., and Ehrke, M. J. (2005). Distant metastasis from subcutaneously grown E0771 medullary breast adenocarcinoma. *Anticancer Res.*, 25(6B) :3905–3915.

[Fantin et al., 2010] Fantin, A., Vieira, J. M., Gestri, G., Denti, L., Schwarz, Q., Prykhozhij, S., Peri, F., Wilson, S. W., and Ruhrberg, C. (2010). Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood*, 116(5) :829–840.

[Feng et al., 2017] Feng, Q., Zhang, C., Lum, D., Druso, J. E., Blank, B., Wilson, K. F., Welm, A., Antonyak, M. A., and Cerione, R. A. (2017). A class of extracellular vesicles from breast cancer cells activates VEGF receptors and tumour angiogenesis. *Nat Commun*, 8 :14450.

[Feng et al., 2010] Feng, X., Krebs, L. T., and Gridley, T. (2010). Patent ductus arteriosus in mice with smooth muscle-specific Jag1 deletion. *Development*, 137(24) :4191–4199.

[Ferlay et al., 2012] Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D., Forman, D., and Bray, F. (2012). GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide : IARC CancerBase No. 11.

[Folkman, 1971] Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis : therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.*, 285(21) :1182–1186.

[Fouad and Aanei, 2017] Fouad, Y. A. and Aanei, C. (2017). Revisiting the hallmarks of cancer. *Am J Cancer Res*, 7(5) :1016–1036.

[Franco and Gerhardt, 2016] Franco, C. A. and Gerhardt, H. (2016). Blood flow boosts BMP signaling to keep vessels in shape. *J. Cell Biol.*, 214(7) :793–795.

[Frisdal and Trainor, 2014] Frisdal, A. and Trainor, P. A. (2014). Development and Evolution of the Pharyngeal Apparatus. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 3(6) :403–418.

[Fujioka et al., 2011] Fujioka, K., Morioka, I., Miwa, A., Morikawa, S., Shibata, A., Yokoyama, N., and Matsuo, M. (2011). Does thrombocytopenia contribute to patent ductus arteriosus ? *Nat Med*, 17(1) :29–30.

[García-Álvaro et al., 2015] García-Álvaro, M., Addante, A., Roncero, C., Fernández, M., Fabregat, I., Sánchez, A., and Herrera, B. (2015). BMP9-Induced Survival Effect in Liver Tumor Cells Requires p38mapk Activation. *Int J Mol Sci*, 16(9) :20431–20448.

[García de Vinuesa et al., 2016] García de Vinuesa, A., Abdelilah-Seyfried, S., Knaus, P., Zwijsen, A., and Bailly, S. (2016). BMP signaling in vascular biology and dysfunction. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 27 :65–79.

[Giuliano and Pagès, 2013] Giuliano, S. and Pagès, G. (2013). Mechanisms of resistance to anti-angiogenesis therapies. *Biochimie*, 95(6) :1110–1119.

[Goumans et al., 2017] Goumans, M.-J., Zwijsen, A., Ten Dijke, P., and Bailly, S. (2017). Bone Morphogenetic Proteins in Vascular Homeostasis and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*.

[Gournay, 2011] Gournay, V. (2011). The ductus arteriosus : physiology, regulation, and functional and congenital anomalies. *Arch Cardiovasc Dis*, 104(11) :578–585.

[Guo et al., 2007] Guo, D.-C., Pannu, H., Tran-Fadulu, V., Papke, C. L., Yu, R. K., Avidan, N., Bourgeois, S., Estrera, A. L., Safi, H. J., Sparks, E., Amor, D., Ades, L., McConnell, V., Willoughby, C. E., Abuelo, D., Willing, M., Lewis, R. A., Kim, D. H., Scherer, S., Tung, P. P., Ahn, C., Buja, L. M., Raman, C. S., Shete, S. S., and Milewicz, D. M. (2007). Mutations in smooth muscle alpha-actin (ACTA2) lead to thoracic aortic aneurysms and dissections. *Nat. Genet.*, 39(12) :1488–1493.

[Hajj and Dagle, 2012] Hajj, H. and Dagle, J. M. (2012). Genetics of patent ductus arteriosus susceptibility and treatment. *Semin. Perinatol.*, 36(2) :98–104.

[Hanahan and Folkman, 1996] Hanahan, D. and Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86(3) :353–364.

[Hanahan and Weinberg, 2000] Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1) :57–70.

[Hanahan and Weinberg, 2011] Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer : the next generation. *Cell*, 144(5) :646–674.

[Harrison et al., 2003] Harrison, R. E., Flanagan, J. A., Sankelo, M., Abdalla, S. A., Rowell, J., Machado, R. D., Elliott, C. G., Robbins, I. M., Olschewski, H., McLaughlin, V., Gruenig, E., Kermeen, F., Halme, M., Räisänen-Sokolowski, A., Laitinen, T., Morrell, N. W., and Trembath, R. C. (2003). Molecular and functional analysis identifies ALK-1 as the predominant cause of pulmonary hypertension related to hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J. Med. Genet.*, 40(12) :865–871.

[Hawinkels et al., 2016] Hawinkels, L. J. A. C., de Vinuesa, A. G., Paauwe, M., Kruithof-de Julio, M., Wiercinska, E., Pardali, E., Mezzanotte, L., Keereweer, S., Braumuller, T. M., Heijkants, R. C., Jonkers, J., Löwik, C. W., Goumans, M.-J., ten Hagen, T. L., and ten Dijke, P. (2016). Activin Receptor-like Kinase 1 Ligand Trap Reduces Microvascular Density and Improves Chemotherapy Efficiency to Various Solid Tumors. *Clin. Cancer Res.*, 22(1) :96–106.

[Heppner et al., 2000] Heppner, G. H., Miller, F. R., and Shekhar, P. M. (2000). Nontransgenic models of breast cancer. *Breast Cancer Res.*, 2(5) :331–334.

[Herbert and Stainier, 2011] Herbert, S. P. and Stainier, D. Y. R. (2011). Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 12(9) :551–564.

[Herrera et al., 2013] Herrera, B., García-Álvaro, M., Cruz, S., Walsh, P., Fernández, M., Roncero, C., Fabregat, I., Sánchez, A., and Inman, G. J. (2013). BMP9 is a proliferative and survival factor for human hepatocellular carcinoma cells. *PLoS ONE*, 8(7) :e69535.

[Herrera et al., 2009] Herrera, B., van Dinther, M., Ten Dijke, P., and Inman, G. J. (2009). Autocrine bone morphogenetic protein-9 signals through activin receptor-like kinase-2/Smad1/Smad4 to promote ovarian cancer cell proliferation. *Cancer Res.*, 69(24) :9254–9262.

[Hinck, 2012] Hinck, A. P. (2012). Structural studies of the TGF-βs and their receptors – insights into evolution of the TGF-β superfamily. *FEBS Letters*, 586(14) :1860–1870.

[https ://clinicaltrials.gov/, 2017] https ://clinicaltrials.gov/ (2017). Clinical Trials.

[https ://www.ligue-cancer.net, 2017] https ://www.ligue-cancer.net (2017). Cancer du sein | Ligue contre le Cancer.

[Hu-Lowe et al., 2011] Hu-Lowe, D. D., Chen, E., Zhang, L., Watson, K. D., Mancuso, P., Lappin, P., Wickman, G., Chen, J. H., Wang, J., Jiang, X., Amundson, K., Simon, R., Erbersdobler, A., Bergqvist, S., Feng, Z., Swanson, T. A., Simmons, B. H., Lippincott, J., Casperson, G. F., Levin, W. J., Stampino, C. G., Shalinsky, D. R., Ferrara, K. W., Fiedler, W., and Bertolini, F. (2011). Targeting activin receptor-like kinase 1 inhibits angiogenesis and tumorigenesis through a mechanism of action complementary to anti-VEGF therapies. *Cancer Res.*, 71(4) :1362–1373.

[Iida et al., 1997] Iida, K., Koseki, H., Kakinuma, H., Kato, N., Mizutani-Koseki, Y., Ohuchi, H., Yoshioka, H., Noji, S., Kawamura, K., Kataoka, Y., Ueno, F., Taniguchi, M., Yoshida, N., Sugiyama, T., and Miura, N. (1997). Essential roles of the winged helix transcription factor MFH-1 in aortic arch patterning and skeletogenesis. *Development*, 124(22) :4627–4638.

[Ivey and Srivastava, 2006] Ivey, K. N. and Srivastava, D. (2006). The paradoxical patent ductus arteriosus. *J Clin Invest*, 116(11) :2863–2865.

[Jain, 2001] Jain, R. K. (2001). Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy : a new paradigm for combination therapy. *Nat. Med.*, 7(9) :987–989.

[Jain, 2005] Jain, R. K. (2005). Normalization of tumor vasculature : an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science*, 307(5706) :58–62.

[Jakobsson et al., 2010] Jakobsson, L., Franco, C. A., Bentley, K., Collins, R. T., Ponsioen, B., Aspalter, I. M., Rosewell, I., Busse, M., Thurston, G., Medvinsky, A., Schulte-Merker, S., and Gerhardt, H. (2010). Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting. *Nat. Cell Biol.*, 12(10) :943–953.

[Jiang et al., 2016] Jiang, H., Salmon, R. M., Upton, P. D., Wei, Z., Lawera, A., Davenport, A. P., Morrell, N. W., and Li, W. (2016). The Prodomain-bound Form of Bone

Morphogenetic Protein 10 Is Biologically Active on Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.*, 291(6) :2954–2966.

[Jimeno et al., 2016] Jimeno, A., Posner, M. R., Wirth, L. J., Saba, N. F., Cohen, R. B., Popa, E. C., Argiris, A., Grossmann, K. F., Sukari, A., Wilson, D., Zhang, X., Sun, J., Glasser, C., Attie, K. M., Sherman, M. L., Pandya, S. S., and Weiss, J. (2016). A phase 2 study of dalantercept, an activin receptor-like kinase-1 ligand trap, in patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer*.

[Jiramongkolchai et al., 2016] Jiramongkolchai, P., Owens, P., and Hong, C. C. (2016). Emerging roles of the bone morphogenetic protein pathway in cancer : potential therapeutic target for kinase inhibition. *Biochem. Soc. Trans.*, 44(4) :1117–1134.

[Johnson et al., 1996] Johnson, D. W., Berg, J. N., Baldwin, M. A., Gallione, C. J., Marondel, I., Yoon, S. J., Stenzel, T. T., Speer, M., Pericak-Vance, M. A., Diamond, A., Guttmacher, A. E., Jackson, C. E., Attisano, L., Kucherlapati, R., Porteous, M. E., and Marchuk, D. A. (1996). Mutations in the activin receptor-like kinase 1 gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *Nat. Genet.*, 13(2) :189–195.

[Jones et al., 2001] Jones, N., Iljin, K., Dumont, D. J., and Alitalo, K. (2001). Tie receptors : new modulators of angiogenic and lymphangiogenic responses. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2(4) :257–267.

[Jonker, 2014] Jonker, L. (2014). TGF-β & BMP receptors endoglin and ALK1 : overview of their functional role and status as antiangiogenic targets. *Microcirculation*, 21(2) :93–103.

[Jung et al., 2016] Jung, J. W., Yoon, S.-M., Kim, S., Jeon, Y.-H., Yoon, B.-H., Yang, S.-G., Kim, M. K., Choe, S., and Kuo, M. M.-C. (2016). Bone morphogenetic protein-9 is a potent growth inhibitor of hepatocellular carcinoma and reduces the liver cancer stem cells population. *Oncotarget*.

[Karaman and Detmar, 2014] Karaman, S. and Detmar, M. (2014). Mechanisms of lymphatic metastasis. *J. Clin. Invest.*, 124(3) :922–928.

[Karzai et al., 2015] Karzai, F. H., Apolo, A. B., Cao, L., Madan, R. A., Adelberg, D. E., Parnes, H., McLeod, D. G., Harold, N., Peer, C., Yu, Y., Tomita, Y., Lee, M.-J., Lee, S., Trepel, J. B., Gulley, J. L., Figg, W. D., and Dahut, W. L. (2015). A phase I study of TRC105 anti-endoglin (CD105) antibody in metastatic castration-resistant prostate cancer. *BJU Int.*, 116(4) :546–555.

[Katagiri and Watabe, 2016] Katagiri, T. and Watabe, T. (2016). Bone Morphogenetic Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 8(6).

[Khosravi Shahi et al., 2009] Khosravi Shahi, P., Soria Lovelle, A., and Pérez Manga, G. (2009). Tumoral angiogenesis and breast cancer. *Clin Transl Oncol*, 11(3) :138–142.

[Kim et al., 2015] Kim, J., Kim, M., Jeong, Y., Lee, W.-B., Park, H., Kwon, J.-Y., Kim, Y.-M., Hwang, D., and Kwon, Y.-G. (2015). BMP9 Induces Cord Blood-Derived Endothelial Progenitor Cell Differentiation and Ischemic Neovascularization via ALK1. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 35(9) :2020–2031.

[Krebs et al., 2016] Krebs, L. T., Norton, C. R., and Gridley, T. (2016). Notch signal reception is required in vascular smooth muscle cells for ductus arteriosus closure. *Genesis*, 54(2) :86–90.

[Lambert et al., 2017] Lambert, A. W., Pattabiraman, D. R., and Weinberg, R. A. (2017). Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell*, 168(4) :670–691.

[Lane et al., 2000] Lane, K. B., Machado, R. D., Pauciulo, M. W., Thomson, J. R., Phillips, J. A., Loyd, J. E., Nichols, W. C., and Trembath, R. C. (2000). Heterozygous germline mutations in BMPR2, encoding a TGF-beta receptor, cause familial primary pulmonary hypertension. *Nat. Genet.*, 26(1) :81–84.

[Larrivée et al., 2012] Larrivée, B., Prahst, C., Gordon, E., del Toro, R., Mathivet, T., Duarte, A., Simons, M., and Eichmann, A. (2012). ALK1 signaling inhibits angiogenesis by cooperating with the Notch pathway. *Dev. Cell*, 22(3) :489–500.

[Lauby-Secretan et al., 2015] Lauby-Secretan, B., Scoccianti, C., Loomis, D., Benbrahim-Tallaa, L., Bouvard, V., Bianchini, F., and Straif, K. (2015). Breast-Cancer Screening — Viewpoint of the IARC Working Group. *New England Journal of Medicine*, 372(24) :2353–2358.

[Laux et al., 2013] Laux, D. W., Young, S., Donovan, J. P., Mansfield, C. J., Upton, P. D., and Roman, B. L. (2013). Circulating Bmp10 acts through endothelial Alk1 to mediate flow-dependent arterial quiescence. *Development*, 140(16) :3403–3412.

[Lauzon et al., 2017] Lauzon, M.-A., Drevelle, O., and Faucheux, N. (2017). Peptides derived from the knuckle epitope of BMP-9 induce the cholinergic differentiation and inactivate GSk3beta in human SH-SY5y neuroblastoma cells. *Sci Rep*, 7(1) :4695.

[Lei et al., 2015] Lei, H., Wang, J., Lu, P., Si, X., Han, K., Ruan, T., and Lu, J. (2015). BMP10 inhibited the growth and migration of gastric cancer cells. *Tumour Biol.*

[Levet et al., 2013] Levet, S., Ciais, D., Merdzhanova, G., Mallet, C., Zimmers, T. A., Lee, S.-J., Navarro, F. P., Texier, I., Feige, J.-J., Bailly, S., and Vittet, D. (2013). Bone morphogenetic protein 9 (BMP9) controls lymphatic vessel maturation and valve formation. *Blood*, 122(4) :598–607.

[Levet et al., 2015] Levet, S., Ouarné, M., Ciais, D., Coutton, C., Subileau, M., Mallet, C., Ricard, N., Bidart, M., Debillon, T., Faravelli, F., Rooryck, C., Feige, J.-J., Tillet, E., and Bailly, S. (2015). BMP9 and BMP10 are necessary for proper closure of the ductus arteriosus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 112(25) :E3207–3215.

[Li et al., 2012] Li, B., Yang, Y., Jiang, S., Ni, B., Chen, K., and Jiang, L. (2012). Adenovirus-mediated overexpression of BMP-9 inhibits human osteosarcoma cell growth and migration through downregulation of the PI3k/AKT pathway. *Int. J. Oncol.*, 41(5) :1809–1819.

[Li et al., 1999] 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(5419) :1534–1537.

[Li et al., 2003] Li, J. Z., Hankins, G. R., Kao, C., Li, H., Kammauff, J., and Helm, G. A. (2003). Osteogenesis in rats induced by a novel recombinant helper-dependent bone morphogenetic protein-9 (BMP-9) adenovirus. *J Gene Med*, 5(9) :748–756.

[Li et al., 2013] Li, Q., Gu, X., Weng, H., Ghafoory, S., Liu, Y., Feng, T., Dzieran, J., Li, L., Ilkavets, I., Kruithof-de Julio, M., Munker, S., Marx, A., Piiper, A., Augusto Alonso, E., Gretz, N., Gao, C., Wölfl, S., Dooley, S., and Breitkopf-Heinlein, K. (2013). Bone morphogenetic protein-9 induces epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Sci.*, 104(3) :398–408.

[Li et al., 2014] Li, R., Zhang, W., Cui, J., Shui, W., Yin, L., Wang, Y., Zhang, H., Wang, N., Wu, N., Nan, G., Chen, X., Wen, S., Deng, F., Zhang, H., Zhou, G., Liao, Z., Zhang, J., Zhang, Q., Yan, Z., Liu, W., Zhang, Z., Ye, J., Deng, Y., Luu, H. H., Haydon, R. C., He, T.-C., and Deng, Z.-L. (2014). Targeting BMP9-promoted human osteosarcoma growth by inactivation of notch signaling. *Curr Cancer Drug Targets*, 14(3) :274–285.

[Liang et al., 2016] Liang, W., Ni, Y., and Chen, F. (2016). Tumor resistance to vascular disrupting agents : mechanisms, imaging, and solutions. *Oncotarget*, 7(13) :15444–15459.

[Limaverde-Sousa et al., 2014] Limaverde-Sousa, G., Sternberg, C., and Ferreira, C. G. (2014). Antiangiogenesis beyond VEGF inhibition : a journey from antiangiogenic single-target to broad-spectrum agents. *Cancer Treat. Rev.*, 40(4) :548–557.

[Lin et al., 2016] Lin, Z., Zhang, Q., and Luo, W. (2016). Angiogenesis inhibitors as therapeutic agents in cancer : Challenges and future directions. *Eur. J. Pharmacol.*, 793 :76–81.

[Liu et al., 2016] Liu, P., Man, Y., Wang, Y., and Bao, Y. (2016). Mechanism of BMP9 promotes growth of osteosarcoma mediated by the Notch signaling pathway. *Oncol Lett*, 11(2) :1367–1370.

[Loeys et al., 2005] Loeys, B. L., Chen, J., Neptune, E. R., Judge, D. P., Podowski, M., Holm, T., Meyers, J., Leitch, C. C., Katsanis, N., Sharifi, N., Xu, F. L., Myers, L. A., Spevak, P. J., Cameron, D. E., De Backer, J., Hellemans, J., Chen, Y., Davis, E. C., Webb, C. L., Kress, W., Coucke, P., Rifkin, D. B., De Paepe, A. M., and Dietz, H. C.

(2005). A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFBR1 or TGFBR2. *Nat. Genet.*, 37(3) :275–281.

[Loeys et al., 2006] Loeys, B. L., Schwarze, U., Holm, T., Callewaert, B. L., Thomas, G. H., Pannu, H., De Backer, J. F., Oswald, G. L., Symoens, S., Manouvrier, S., Roberts, A. E., Faravelli, F., Greco, M. A., Pyeritz, R. E., Milewicz, D. M., Coucke, P. J., Cameron, D. E., Braverman, A. C., Byers, P. H., De Paepe, A. M., and Dietz, H. C. (2006). Aneurysm syndromes caused by mutations in the TGF-beta receptor. *N. Engl. J. Med.*, 355(8) :788–798.

[Long et al., 2015] Long, L., Ormiston, M. L., Yang, X., Southwood, M., Gräf, S., Machado, R. D., Mueller, M., Kinzel, B., Yung, L. M., Wilkinson, J. M., Moore, S. D., Drake, K. M., Aldred, M. A., Yu, P. B., Upton, P. D., and Morrell, N. W. (2015). Selective enhancement of endothelial BMPR-II with BMP9 reverses pulmonary arterial hypertension. *Nat. Med.*, 21(7) :777–785.

[Lopez-Coviella et al., 2005] Lopez-Coviella, I., Follettie, M. T., Mellott, T. J., Kovacheva, V. P., Slack, B. E., Diesl, V., Berse, B., Thies, R. S., and Blusztajn, J. K. (2005). Bone morphogenetic protein 9 induces the transcriptome of basal forebrain cholinergic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102(19) :6984–6989.

[Lowery and de Caestecker, 2010] Lowery, J. W. and de Caestecker, M. P. (2010). BMP signaling in vascular development and disease. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 21(4) :287–298.

[Lubarsky and Krasnow, 2003] Lubarsky, B. and Krasnow, M. A. (2003). Tube morphogenesis : making and shaping biological tubes. *Cell*, 112(1) :19–28.

[Luo et al., 1995] Luo, G., Hofmann, C., Bronckers, A. L., Sohocki, M., Bradley, A., and Karsenty, G. (1995). BMP-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning. *Genes Dev.*, 9(22) :2808–2820.

[Luo et al., 2017] Luo, Y., Li, L., Xu, X., Wu, T., Yang, M., Zhang, C., Mou, H., Zhou, T., Jia, Y., Cai, C., Liu, H., Yang, G., and Zhang, X. (2017). Decreased circulating BMP-9 levels in patients with Type 2 diabetes is a signature of insulin resistance. *Clin. Sci.*, 131(3) :239–246.

[Lv et al., 2014] Lv, Z., Wang, C., Yuan, T., Liu, Y., Song, T., Liu, Y., Chen, C., Yang, M., Tang, Z., Shi, Q., and Weng, Y. (2014). Bone morphogenetic protein 9 regulates tumor growth of osteosarcoma cells through the Wnt/β-catenin pathway. *Oncol. Rep.*, 31(2) :989–994.

[Lv et al., 2013] Lv, Z., Yang, D., Li, J., Hu, M., Luo, M., Zhan, X., Song, P., Liu, C., Bai, H., Li, B., Yang, Y., Chen, Y., Shi, Q., and Weng, Y. (2013). Bone morphogenetic

protein 9 overexpression reduces osteosarcoma cell migration and invasion. *Mol. Cells*, 36(2) :119–126.

[Ma et al., 2005] Ma, L., Lu, M.-F., Schwartz, R. J., and Martin, J. F. (2005). Bmp2 is essential for cardiac cushion epithelial-mesenchymal transition and myocardial patterning. *Development*, 132(24) :5601–5611.

[Machado et al., 2009] Machado, R. D., Eickelberg, O., Elliott, C. G., Geraci, M. W., Hanaoka, M., Loyd, J. E., Newman, J. H., Phillips, J. A., Soubrier, F., Trembath, R. C., and Chung, W. K. (2009). Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 54(1 Suppl) :S32–42.

[Mahlawat et al., 2012] Mahlawat, P., Ilangovan, U., Biswas, T., Sun, L.-Z., and Hinck, A. P. (2012). Structure of the Alk1 extracellular domain and characterization of its bone morphogenetic protein (BMP) binding properties. *Biochemistry*, 51(32) :6328–6341.

[Makker et al., 2015] Makker, V., Filiaci, V. L., Chen, L.-M., Darus, C. J., Kendrick, J. E., Sutton, G., Moxley, K., and Aghajanian, C. (2015). Phase II evaluation of dalantercept, a soluble recombinant activin receptor-like kinase 1 (ALK1) receptor fusion protein, for the treatment of recurrent or persistent endometrial cancer : an NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group Study 0229n. *Gynecol. Oncol.*, 138(1) :24–29.

[Mallet et al., 2015] Mallet, C., Lamribet, K., Giraud, S., Dupuis-Girod, S., Feige, J.-J., Bailly, S., and Tillet, E. (2015). Functional analysis of endoglin mutations from hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1 patients reveals different mechanisms for endoglin loss of function. *Hum. Mol. Genet.*, 24(4) :1142–1154.

[Masuda et al., 2003] Masuda, H., Fukabori, Y., Nakano, K., Takezawa, Y., CSuzuki, T., and Yamanaka, H. (2003). Increased expression of bone morphogenetic protein-7 in bone metastatic prostate cancer. *Prostate*, 54(4) :268–274.

[Mazerbourg et al., 2005] Mazerbourg, S., Sangkuhl, K., Luo, C.-W., Sudo, S., Klein, C., and Hsueh, A. J. W. (2005). Identification of receptors and signaling pathways for orphan bone morphogenetic protein/growth differentiation factor ligands based on genomic analyses. *J. Biol. Chem.*, 280(37) :32122–32132.

[McAllister et al., 1994] McAllister, K. A., Grogg, K. M., Johnson, D. W., Gallione, C. J., Baldwin, M. A., Jackson, C. E., Helmbold, E. A., Markel, D. S., McKinnon, W. C., and Murrell, J. (1994). Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat. Genet.*, 8(4) :345–351.

[Melao, 2017] Melao, A. (2017). Acceleron Discontinues Development of Dalantercept for RCC.

[Mentzer and Konerding, 2014] Mentzer, S. J. and Konerding, M. A. (2014). Intussusceptive angiogenesis : expansion and remodeling of microvascular networks. *Angiogenesis*, 17(3) :499–509.

[Meyers and Kessler, 2017] Meyers, E. A. and Kessler, J. A. (2017). TGF-β Family Signaling in Neural and Neuronal Differentiation, Development, and Function. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, page a022244.

[Mi et al., 2015] Mi, L.-Z., Brown, C. T., Gao, Y., Tian, Y., Le, V. Q., Walz, T., and Springer, T. A. (2015). Structure of bone morphogenetic protein 9 procomplex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 112(12) :3710–3715.

[Mitchell et al., 2010] Mitchell, D., Pobre, E. G., Mulivor, A. W., Grinberg, A. V., Castonguay, R., Monnell, T. E., Solban, N., Ucran, J. A., Pearsall, R. S., Underwood, K. W., Seehra, J., and Kumar, R. (2010). ALK1-Fc inhibits multiple mediators of angiogenesis and suppresses tumor growth. *Mol. Cancer Ther.*, 9(2) :379–388.

[Mitrofan et al., 2017] Mitrofan, C.-G., Appleby, S. L., Nash, G. B., Mallat, Z., Chilvers, E. R., Upton, P. D., and Morrell, N. W. (2017). Bone morphogenetic protein 9 (BMP9) and BMP10 enhance tumor necrosis factor-α-induced monocyte recruitment to the vascular endothelium mainly via activin receptor-like kinase 2. *J. Biol. Chem.*, 292(33) :13714–13726.

[Miyazono et al., 2010] Miyazono, K., Kamiya, Y., and Morikawa, M. (2010). Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J. Biochem.*, 147(1) :35–51.

[Momma and Toyono, 1999] Momma, K. and Toyono, M. (1999). The Role of Nitric Oxide in Dilating the Fetal Ductus Arteriosus in Rats. *Pediatr Res*, 46(3) :311–315.

[Morrell et al., 2016] Morrell, N. W., Bloch, D. B., ten Dijke, P., Goumans, M.-J. T. H., Hata, A., Smith, J., Yu, P. B., and Bloch, K. D. (2016). Targeting BMP signalling in cardiovascular disease and anaemia. *Nat Rev Cardiol*, 13(2) :106–120.

[Mueller and Nickel, 2012] Mueller, T. D. and Nickel, J. (2012). Promiscuity and specificity in BMP receptor activation. *FEBS Letters*, 586(14) :1846–1859.

[Mumprecht and Detmar, 2009] Mumprecht, V. and Detmar, M. (2009). Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *J Cell Mol Med*, 13(8a) :1405–1416.

[Muñoz-Félix et al., 2016] Muñoz-Félix, J. M., Cuesta, C., Perretta-Tejedor, N., Subileau, M., López-Hernández, F. J., López-Novoa, J. M., and Martínez-Salgado, C. (2016). Identification of bone morphogenetic protein 9 (BMP9) as a novel profibrotic factor in vitro. *Cell. Signal.*, 28(9) :1252–1261.

[Necchi et al., 2014] Necchi, A., Giannatempo, P., Mariani, L., Farè, E., Raggi, D., Pennati, M., Zaffaroni, N., Crippa, F., Marchianò, A., Nicolai, N., Maffezzini, M., Togliardi,

E., Daidone, M. G., Gianni, A. M., Salvioni, R., and De Braud, F. (2014). PF-03446962, a fully-human monoclonal antibody against transforming growth-factor β (TGFβ) receptor ALK1, in pre-treated patients with urothelial cancer : an open label, single-group, phase 2 trial. *Invest New Drugs*, 32(3) :555–560.

[Neuhaus et al., 1999] Neuhaus, H., Rosen, V., and Thies, R. S. (1999). Heart specific expression of mouse BMP-10 a novel member of the TGF-beta superfamily. *Mech. Dev.*, 80(2) :181–184.

[Niemiec et al., 2017] Niemiec, J. A., Adamczyk, A., Ambicka, A., Mucha-Małecka, A., Wysocki, W. M., Biesaga, B., Ziobro, M., Cedrych, I., Grela-Wojewoda, A., Domagała-Haduch, M., Wysocka, J., Ryś, J., and Sas-Korczyńska, B. (2017). Prognostic role of lymphatic vessel density and lymphovascular invasion in chemotherapy-naive and chemotherapy-treated patients with invasive breast cancer. *Am J Transl Res*, 9(3) :1435–1447.

[Niessen et al., 2010] Niessen, K., Zhang, G., Ridgway, J. B., Chen, H., and Yan, M. (2010). ALK1 signaling regulates early postnatal lymphatic vessel development. *Blood*, 115(8) :1654–1661.

[Nolan-Stevaux et al., 2012] Nolan-Stevaux, O., Zhong, W., Culp, S., Shaffer, K., Hoover, J., Wickramasinghe, D., and Ruefli-Brasse, A. (2012). Endoglin requirement for BMP9 signaling in endothelial cells reveals new mechanism of action for selective anti-endoglin antibodies. *PLoS ONE*, 7(12) :e50920.

[Ntumba et al., 2016] Ntumba, K., Akla, N., Oh, S. P., Eichmann, A., and Larrivée, B. (2016). BMP9/ALK1 inhibits neovascularization in mouse models of age-related macular degeneration. *Oncotarget*, 7(35) :55957–55969.

[Oh et al., 2000] Oh, S. P., Seki, T., Goss, K. A., Imamura, T., Yi, Y., Donahoe, P. K., Li, L., Miyazono, K., ten Dijke, P., Kim, S., and Li, E. (2000). Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-β1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(6) :2626–2631.

[Ojeda-Fernández et al., 2016] Ojeda-Fernández, L., Recio-Poveda, L., Aristorena, M., Lastres, P., Blanco, F. J., Sanz-Rodríguez, F., Gallardo-Vara, E., de las Casas-Engel, M., Corbí, Á., Arthur, H. M., Bernabeu, C., and Botella, L. M. (2016). Mice Lacking Endoglin in Macrophages Show an Impaired Immune Response. *PLoS Genet.*, 12(3) :e1005935.

[Olsen et al., 2014] Olsen, O. E., Wader, K. F., Misund, K., Våtsveen, T. K., Rø, T. B., Mylin, A. K., Turesson, I., Størdal, B. F., Moen, S. H., Standal, T., Waage, A., Sundan, A., and Holien, T. (2014). Bone morphogenetic protein-9 suppresses growth of myeloma cells by signaling through ALK2 but is inhibited by endoglin. *Blood Cancer J*, 4 :e196.

[Osada et al., 2012] Osada, M., Inoue, O., Ding, G., Shirai, T., Ichise, H., Hirayama, K., Takano, K., Yatomi, Y., Hirashima, M., Fujii, H., Suzuki-Inoue, K., and Ozaki, Y. (2012). Platelet activation receptor CLEC-2 regulates blood/lymphatic vessel separation by inhibiting proliferation, migration, and tube formation of lymphatic endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 287(26) :22241–22252.

[Paauwe et al., 2016] Paauwe, M., Heijkants, R. C., Oudt, C. H., van Pelt, G. W., Cui, C., Theuer, C. P., Hardwick, J. C. H., Sier, C. F. M., and Hawinkels, L. J. a. C. (2016). Endoglin targeting inhibits tumor angiogenesis and metastatic spread in breast cancer. *Oncogene*.

[Park et al., 2012] Park, J. E. S., Shao, D., Upton, P. D., Desouza, P., Adcock, I. M., Davies, R. J., Morrell, N. W., Griffiths, M. J. D., and Wort, S. J. (2012). BMP-9 induced endothelial cell tubule formation and inhibition of migration involves Smad1 driven endothelin-1 production. *PLoS ONE*, 7(1) :e30075.

[Patel et al., 2011] Patel, L. R., Camacho, D. F., Shiozawa, Y., Pienta, K. J., and Taichman, R. S. (2011). Mechanisms of cancer cell metastasis to the bone : a multistep process. *Future Oncol*, 7(11) :1285–1297.

[Pickup et al., 2017] Pickup, M. W., Owens, P., and Moses, H. L. (2017). TGF-β, Bone Morphogenetic Protein, and Activin Signaling and the Tumor Microenvironment. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 9(5).

[Plein et al., 2015] Plein, A., Fantin, A., and Ruhrberg, C. (2015). Neural Crest Cells in Cardiovascular Development. *Current Topics in Developmental Biology*, 111 :183–200.

[Potente and Mäkinen, 2017] Potente, M. and Mäkinen, T. (2017). Vascular heterogeneity and specialization in development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*

[Prat and Perou, 2011] Prat, A. and Perou, C. M. (2011). Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol*, 5(1) :5–23.

[Proskuryakov and Gabai, 2010] Proskuryakov, S. Y. and Gabai, V. L. (2010). Mechanisms of tumor cell necrosis. *Curr. Pharm. Des.*, 16(1) :56–68.

[Rahman and Mohammed, 2015] Rahman, M. and Mohammed, S. (2015). Breast cancer metastasis and the lymphatic system. *Oncol Lett*, 10(3) :1233–1239.

[Ranchoux et al., 2015] Ranchoux, B., Antigny, F., Rucker-Martin, C., Hautefort, A., Péchoux, C., Bogaard, H. J., Dorfmüller, P., Remy, S., Lecerf, F., Planté, S., Chat, S., Fadel, E., Houssaini, A., Anegon, I., Adnot, S., Simonneau, G., Humbert, M., Cohen-Kaminsky, S., and Perros, F. (2015). Endothelial-to-mesenchymal transition in pulmonary hypertension. *Circulation*, 131(11) :1006–1018.

[Reese et al., 2009] Reese, J., O'Mara, P. W., Poole, S. D., Brown, N., Tolentino, C., Eckman, D. M., and Aschner, J. L. (2009). Regulation of the fetal mouse ductus

arteriosus is dependent on interaction of nitric oxide and COX enzymes in the ductal wall. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 88(3–4) :89–96.

[Ren and Dijke, 2017] Ren, J. and Dijke, P. t. (2017). Bone Morphogenetic Proteins in the Initiation and Progression of Breast Cancer. In *Bone Morphogenetic Proteins : Systems Biology Regulators*, Progress in Inflammation Research, pages 409–433. Springer, Cham. DOI : 10.1007/978-3-319-47507-3_18.

[Ren et al., 2014a] Ren, W., Liu, Y., Wan, S., Fei, C., Wang, W., Chen, Y., Zhang, Z., Wang, T., Wang, J., Zhou, L., Weng, Y., He, T., and Zhang, Y. (2014a). BMP9 inhibits proliferation and metastasis of HER2-positive SK-BR-3 breast cancer cells through ERK1/2 and PI3k/AKT pathways. *PLoS ONE*, 9(5) :e96816.

[Ren et al., 2014b] Ren, W., Sun, X., Wang, K., Feng, H., Liu, Y., Fei, C., Wan, S., Wang, W., Luo, J., Shi, Q., Tang, M., Zuo, G., Weng, Y., He, T., and Zhang, Y. (2014b). BMP9 inhibits the bone metastasis of breast cancer cells by downregulating CCN2 (connective tissue growth factor, CTGF) expression. *Mol. Biol. Rep.*, 41(3) :1373–1383.

[Ribatti et al., 2016] Ribatti, D., Nico, B., Ruggieri, S., Tamma, R., Simone, G., and Mangia, A. (2016). Angiogenesis and Antiangiogenesis in Triple-Negative Breast cancer. *Transl Oncol*, 9(5) :453–457.

[Ricard et al., 2010] Ricard, N., Bidart, M., Mallet, C., Lesca, G., Giraud, S., Prudent, R., Feige, J.-J., and Bailly, S. (2010). Functional analysis of the BMP9 response of ALK1 mutants from HHT2 patients : a diagnostic tool for novel ACVRL1 mutations. *Blood*, 116(9) :1604–1612.

[Ricard et al., 2012] Ricard, N., Ciais, D., Levet, S., Subileau, M., Mallet, C., Zimmers, T. A., Lee, S.-J., Bidart, M., Feige, J.-J., and Bailly, S. (2012). BMP9 and BMP10 are critical for postnatal retinal vascular remodeling. *Blood*, 119(25) :6162–6171.

[Rider and Mulloy, 2010] Rider, C. C. and Mulloy, B. (2010). Bone morphogenetic protein and growth differentiation factor cytokine families and their protein antagonists. *Biochemical Journal*, 429(1) :1–12.

[Rivera and Bergers, 2015] Rivera, L. B. and Bergers, G. (2015). CANCER. Tumor angiogenesis, from foe to friend. *Science*, 349(6249) :694–695.

[Roelen et al., 1997] Roelen, B. A., van Rooijen, M. A., and Mummery, C. L. (1997). Expression of ALK-1, a type 1 serine/threonine kinase receptor, coincides with sites of vasculogenesis and angiogenesis in early mouse development. *Dev. Dyn.*, 209(4) :418–430.

[Rohan et al., 2000] Rohan, R. M., Fernandez, A., Udagawa, T., Yuan, J., and D'Amato, R. J. (2000). Genetic heterogeneity of angiogenesis in mice. *FASEB J.*, 14(7) :871–876.

[Ronca et al., 2017] Ronca, R., Benkheil, M., Mitola, S., Struyf, S., and Liekens, S. (2017). Tumor angiogenesis revisited : Regulators and clinical implications. *Med Res Rev*, pages n/a–n/a.

[Rosen et al., 2012] Rosen, L. S., Hurwitz, H. I., Wong, M. K., Goldman, J., Mendelson, D. S., Figg, W. D., Spencer, S., Adams, B. J., Alvarez, D., Seon, B. K., Theuer, C. P., Leigh, B. R., and Gordon, M. S. (2012). A phase I first-in-human study of TRC105 (Anti-Endoglin Antibody) in patients with advanced cancer. *Clin. Cancer Res.*, 18(17) :4820–4829.

[Rostama et al., 2015] Rostama, B., Turner, J. E., Seavey, G. T., Norton, C. R., Gridley, T., Vary, C. P. H., and Liaw, L. (2015). DLL4/Notch1 and BMP9 Interdependent Signaling Induces Human Endothelial Cell Quiescence via P27kip1 and Thrombospondin-1. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 35(12) :2626–2637.

[Saif et al., 2016] Saif, M. W., Knost, J. A., Chiorean, E. G., Kambhampati, S. R. P., Yu, D., Pytowski, B., Qin, A., Kauh, J. S., and O'Neil, B. H. (2016). Phase 1 study of the anti-vascular endothelial growth factor receptor 3 monoclonal antibody LY3022856/IMC-3c5 in patients with advanced and refractory solid tumors and advanced colorectal cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 78(4) :815–824.

[Saito et al., 2017] Saito, T., Bokhove, M., Croci, R., Zamora-Caballero, S., Han, L., Letarte, M., de Sanctis, D., and Jovine, L. (2017). Structural Basis of the Human Endoglin-BMP9 Interaction : Insights into BMP Signaling and HHT1. *Cell Rep*, 19(9) :1917–1928.

[Sallmon et al., 2012] Sallmon, H., Weber, S. C., Hüning, B., Stein, A., Horn, P. A., Metze, B. C., Dame, C., Bührer, C., Felderhoff-Müser, U., Hansmann, G., and Koehne, P. (2012). Thrombocytopenia in the first 24 hours after birth and incidence of patent ductus arteriosus. *Pediatrics*, 130(3) :e623–630.

[Satoda et al., 2000] Satoda, M., Zhao, F., Diaz, G. A., Burn, J., Goodship, J., Davidson, H. R., Pierpont, M. E. M., and Gelb, B. D. (2000). Mutations in TFAP2b cause Char syndrome, a familial form of patent ductus arteriosus. *Nat Genet*, 25(1) :42–46.

[Saulacic et al., 2017] Saulacic, N., Fujioka-Kobayashi, M., Kobayashi, E., Schaller, B., and Miron, R. J. (2017). Guided bone regeneration with recombinant human bone morphogenetic protein 9 loaded on either deproteinized bovine bone mineral or a collagen barrier membrane. *Clin Implant Dent Relat Res*, 19(4) :600–607.

[Scharpfenecker et al., 2007] Scharpfenecker, M., van Dinther, M., Liu, Z., van Bezooijen, R. L., Zhao, Q., Pukac, L., Löwik, C. W. G. M., and ten Dijke, P. (2007). BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis. *J. Cell. Sci.*, 120(Pt 6) :964–972.

[Schneider, 2012] Schneider, D. J. (2012). The patent ductus arteriosus in term infants, children, and adults. *Semin. Perinatol.*, 36(2) :146–153.

[Seemann et al., 2009] Seemann, P., Brehm, A., König, J., Reissner, C., Stricker, S., Kuss, P., Haupt, J., Renninger, S., Nickel, J., Sebald, W., Groppe, J. C., Plöger, F., Pohl, J., Schmidt-von Kegler, M., Walther, M., Gassner, I., Rusu, C., Janecke, A. R., Dathe, K., and Mundlos, S. (2009). Mutations in GDF5 reveal a key residue mediating BMP inhibition by NOGGIN. *PLoS Genet.*, 5(11) :e1000747.

[Sengle et al., 2011] Sengle, G., Ono, R. N., Sasaki, T., and Sakai, L. Y. (2011). Prodomains of transforming growth factor beta (TGFbeta) superfamily members specify different functions : extracellular matrix interactions and growth factor bioavailability. *J. Biol. Chem.*, 286(7) :5087–5099.

[Shah et al., 2011] Shah, N. A., Hills, N. K., Waleh, N., McCurnin, D., Seidner, S., Chemtob, S., and Clyman, R. (2011). Relationship between circulating platelet counts and ductus arteriosus patency after indomethacin treatment. *J. Pediatr.*, 158(6) :919–923.e1–2.

[Shi et al., 2011] Shi, M., Zhu, J., Wang, R., Chen, X., Mi, L., Walz, T., and Springer, T. A. (2011). Latent TGF-β structure and activation. *Nature*, 474(7351) :343–349.

[Shojaei, 2012] Shojaei, F. (2012). Anti-angiogenesis therapy in cancer : current challenges and future perspectives. *Cancer Lett.*, 320(2) :130–137.

[Sieber et al., 2009] Sieber, C., Kopf, J., Hiepen, C., and Knaus, P. (2009). Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 20(5-6) :343–355.

[Smith, 1998] Smith, G. C. S. (1998). The Pharmacology of the Ductus Arteriosus. *Pharmacol Rev*, 50(1) :35–58.

[Stacker et al., 2014] Stacker, S. A., Williams, S. P., Karnezis, T., Shayan, R., Fox, S. B., and Achen, M. G. (2014). Lymphangiogenesis and lymphatic vessel remodelling in cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 14(3) :159–172.

[Steeg, 2016] Steeg, P. S. (2016). Targeting metastasis. *Nat Rev Cancer*, 16(4) :201–218.

[Steward and Kleihues, 2003] Steward, B. and Kleihues, P. (2003). *World Cancer Report 2003*. World Cancer Reports. IARC.

[Steward and Wild, 2014] Steward, B. and Wild, C. (2014). *World Cancer Report 2014*. World Cancer Reports. IARC.

[Strilic et al., 2016] Strilic, B., Yang, L., Albarrán-Juárez, J., Wachsmuth, L., Han, K., Müller, U. C., Pasparakis, M., and Offermanns, S. (2016). Tumour-cell-induced endothelial cell necroptosis via death receptor 6 promotes metastasis. *Nature*, 536(7615) :215–218.

[Susan-Resiga et al., 2011] Susan-Resiga, D., Essalmani, R., Hamelin, J., Asselin, M.-C., Benjannet, S., Chamberland, A., Day, R., Szumska, D., Constam, D., Bhattacharya, S., Prat, A., and Seidah, N. G. (2011). Furin is the major processing enzyme of the cardiac-specific growth factor bone morphogenetic protein 10. *J. Biol. Chem.*, 286(26) :22785–22794.

[Suzuki et al., 2008] Suzuki, Y., Montagne, K., Nishihara, A., Watabe, T., and Miyazono, K. (2008). BMPs promote proliferation and migration of endothelial cells via stimulation of VEGF-A/VEGFR2 and angiopoietin-1/Tie2 signalling. *J. Biochem.*, 143(2) :199–206.

[Suzuki et al., 2010] Suzuki, Y., Ohga, N., Morishita, Y., Hida, K., Miyazono, K., and Watabe, T. (2010). BMP-9 induces proliferation of multiple types of endothelial cells in vitro and in vivo. *J. Cell. Sci.*, 123(Pt 10) :1684–1692.

[Tachida et al., 2017] Tachida, Y., Izumi, N., Sakurai, T., and Kobayashi, H. (2017). Mutual interaction between endothelial cells and mural cells enhances BMP9 signaling in endothelial cells. *Biol Open*, 6(3) :370–380.

[Takizawa et al., 1994] Takizawa, T., Oda, T., Arishima, K., Yamamoto, M., Somiya, H., Eguchi, Y., and Shiota, K. (1994). Inhibitory effect of enalapril on the constriction of the ductus arteriosus in newborn rats. *J. Vet. Med. Sci.*, 56(3) :605–606.

[Tarallo and De Falco, 2015] Tarallo, V. and De Falco, S. (2015). The vascular endothelial growth factors and receptors family : Up to now the only target for anti-angiogenesis therapy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 64 :185–189.

[Thorpe, 2004] Thorpe, P. E. (2004). Vascular targeting agents as cancer therapeutics. *Clin. Cancer Res.*, 10(2) :415–427.

[Townson et al., 2012] Townson, S. A., Martinez-Hackert, E., Greppi, C., Lowden, P., Sako, D., Liu, J., Ucran, J. A., Liharska, K., Underwood, K. W., Seehra, J., Kumar, R., and Grinberg, A. V. (2012). Specificity and structure of a high affinity activin receptor-like kinase 1 (ALK1) signaling complex. *J. Biol. Chem.*, 287(33) :27313–27325.

[Trainor, 2013] Trainor, P. (2013). *Neural Crest Cells : Evolution, Development and Disease*. Academic Press.

[Truksa et al., 2006] Truksa, J., Peng, H., Lee, P., and Beutler, E. (2006). Bone morphogenetic proteins 2, 4, and 9 stimulate murine hepcidin 1 expression independently of Hfe, transferrin receptor 2 (Tfr2), and IL-6. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103(27) :10289–10293.

[Ungefroren et al., 2007] Ungefroren, H., Schniewind, B., Groth, S., Chen, W.-B., Müerköster, S. S., Kalthoff, H., and Fändrich, F. (2007). Antitumor activity of ALK1 in pancreatic carcinoma cells. *Int. J. Cancer*, 120(8) :1641–1651.

[Upton et al., 2009] Upton, P. D., Davies, R. J., Trembath, R. C., and Morrell, N. W. (2009). Bone morphogenetic protein (BMP) and activin type II receptors balance BMP9 signals mediated by activin receptor-like kinase-1 in human pulmonary artery endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 284(23) :15794–15804.

[Urness et al., 2000] Urness, L. D., Sorensen, L. K., and Li, D. Y. (2000). Arteriovenous malformations in mice lacking activin receptor-like kinase-1. *Nat. Genet.*, 26(3) :328–331.

[Vakkila and Lotze, 2004] Vakkila, J. and Lotze, M. T. (2004). Inflammation and necrosis promote tumour growth. *Nat. Rev. Immunol.*, 4(8) :641–648.

[van Meeteren et al., 2012] van Meeteren, L. A., Thorikay, M., Bergqvist, S., Pardali, E., Stampino, C. G., Hu-Lowe, D., Goumans, M.-J., and ten Dijke, P. (2012). Anti-human activin receptor-like kinase 1 (ALK1) antibody attenuates bone morphogenetic protein 9 (BMP9)-induced ALK1 signaling and interferes with endothelial cell sprouting. *J. Biol. Chem.*, 287(22) :18551–18561.

[Varadaraj et al., 2015] Varadaraj, A., Patel, P., Serrao, A., Bandyopadhay, T., Lee, N. Y., Jazaeri, A. A., Huang, Z., Murphy, S. K., and Mythreye, K. (2015). Epigenetic Regulation of GDF2 Suppresses Anoikis in Ovarian and Breast Epithelia. *Neoplasia*, 17(11) :826–838.

[Vasudev and Reynolds, 2014] Vasudev, N. S. and Reynolds, A. R. (2014). Anti-angiogenic therapy for cancer : current progress, unresolved questions and future directions. *Angiogenesis*, 17(3) :471–494.

[Viallard and Larrivée, 2017] Viallard, C. and Larrivée, B. (2017). Tumor angiogenesis and vascular normalization : alternative therapeutic targets. *Angiogenesis*, pages 1–18.

[Voss et al., 2016] Voss, M. H., Bhatt, R. S., Plimack, E. R., Rini, B. I., Alter, R. S., Beck, J. T., Wilson, D., Zhang, X., Mutyaba, M., Glasser, C., Attie, K. M., Sherman, M. L., Pandya, S. S., and Atkins, M. (2016). The DART Study : Results from the dose-escalation and expansion cohorts evaluating the combination of dalantercept plus axitinib in advanced renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.*

[Wan et al., 2014] Wan, S., Liu, Y., Weng, Y., Wang, W., Ren, W., Fei, C., Chen, Y., Zhang, Z., Wang, T., Wang, J., Jiang, Y., Zhou, L., He, T., and Zhang, Y. (2014). BMP9 regulates cross-talk between breast cancer cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Cell Oncol (Dordr)*, 37(5) :363–375.

[Wang et al., 1990] Wang, E. A., Rosen, V., D'Alessandro, J. S., Bauduy, M., Cordes, P., Harada, T., Israel, D. I., Hewick, R. M., Kerns, K. M., and LaPan, P. (1990). Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87(6) :2220–2224.

[Wang et al., 2016a] Wang, G., Fan, R., Ji, R., Zou, W., Penny, D. J., Varghese, N. P., and Fan, Y. (2016a). Novel homozygous BMP9 nonsense mutation causes pulmonary arterial hypertension : a case report. *BMC Pulm Med*, 16 :17.

[Wang et al., 2016b] Wang, J., Weng, Y., Zhang, M., Li, Y., Fan, M., Guo, Y., Sun, Y., Li, W., and Shi, Q. (2016b). BMP9 inhibits the growth and migration of lung adenocarcinoma A549 cells in a bone marrow stromal cell-derived microenvironment through the MAPK/ERK and NF-κB pathways. *Oncol. Rep.*, 36(1) :410–418.

[Wang et al., 2011] Wang, K., Feng, H., Ren, W., Sun, X., Luo, J., Tang, M., Zhou, L., Weng, Y., He, T.-C., and Zhang, Y. (2011). BMP9 inhibits the proliferation and invasiveness of breast cancer cells MDA-MB-231. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 137(11) :1687–1696.

[Wang et al., 2005] Wang, R.-H., Li, C., Xu, X., Zheng, Y., Xiao, C., Zerfas, P., Cooperman, S., Eckhaus, M., Rouault, T., Mishra, L., and Deng, C.-X. (2005). A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression. *Cell Metab.*, 2(6) :399–409.

[Wang et al., 2017a] Wang, T., Zhang, Z., Wang, K., Wang, J., Jiang, Y., Xia, J., Gou, L., Liu, M., Zhou, L., He, T., and Zhang, Y. (2017a). Inhibitory effects of BMP9 on breast cancer cells by regulating their interaction with pre-adipocytes/adipocytes. *Oncotarget*.

[Wang et al., 2015] Wang, W., Weng, Y., Ren, W., Zhang, Z., Wang, T., Wang, J., Jiang, Y., Chen, Y., Zhou, L., He, T., and Zhang, Y. (2015). Biological roles of human bone morphogenetic protein 9 in the bone microenvironment of human breast cancer MDA-MB-231 cells. *Am J Transl Res*, 7(9) :1660–1674.

[Wang et al., 2016c] Wang, X., Solban, N., Khanna, P., Callea, M., Song, J., Alsop, D. C., Pearsall, R. S., Atkins, M. B., Mier, J. W., Signoretti, S., Alimzhanov, M., Kumar, R., Bhasin, M. K., and Bhatt, R. S. (2016c). Inhibition of ALK1 signaling with dalantercept combined with VEGFR TKI leads to tumor stasis in renal cell carcinoma. *Oncotarget*.

[Wang et al., 2017b] Wang, Z., Xiong, L., Wan, W., Duan, L., Bai, X., and Zu, H. (2017b). Intranasal BMP9 Ameliorates Alzheimer Disease-Like Pathology and Cognitive Deficits in APP/PS1 Transgenic Mice. *Front Mol Neurosci*, 10 :32.

[Weinberg, 1996] Weinberg, R. A. (1996). How cancer arises. *Sci. Am.*, 275(3) :62–70.

[Welti et al., 2013] Welti, J., Loges, S., Dimmeler, S., and Carmeliet, P. (2013). Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. *J. Clin. Invest.*, 123(8) :3190–3200.

[Wiley et al., 2011] Wiley, D. M., Kim, J.-D., Hao, J., Hong, C. C., Bautch, V. L., and Jin, S.-W. (2011). Distinct signalling pathways regulate sprouting angiogenesis from the dorsal aorta and the axial vein. *Nat. Cell Biol.*, 13(6) :686–692.

[Wu et al., 2016] Wu, J.-R., Yeh, J.-L., Liou, S.-F., Dai, Z.-K., Wu, B.-N., and Hsu, J.-H. (2016). Gamma-secretase Inhibitor Prevents Proliferation and Migration of Ductus Arteriosus Smooth Muscle Cells through the Notch3-HES1/2/5 Pathway. *Int. J. Biol. Sci.*, 12(9) :1063–1073.

[Yang et al., 2017] Yang, Y., Yang, H. H., Hu, Y., Watson, P. H., Liu, H., Geiger, T. R., Anver, M. R., Haines, D. C., Martin, P., Green, J. E., Lee, M. P., Hunter, K. W., and Wakefield, L. M. (2017). Immunocompetent mouse allograft models for development of therapies to target breast cancer metastasis. *Oncotarget*, 8(19) :30621–30643.

[Yao et al., 2012] Yao, Y., Jumabay, M., Ly, A., Radparvar, M., Wang, A. H., Abdmaulen, R., and Boström, K. I. (2012). Crossveinless 2 regulates bone morphogenetic protein 9 in human and mouse vascular endothelium. *Blood*, 119(21) :5037–5047.

[Ye et al., 2010] Ye, L., Bokobza, S., Li, J., Moazzam, M., Chen, J., Mansel, R. E., and Jiang, W. G. (2010). Bone morphogenetic protein-10 (BMP-10) inhibits aggressiveness of breast cancer cells and correlates with poor prognosis in breast cancer. *Cancer Sci.*, 101(10) :2137–2144.

[Ye and Jiang, 2015] Ye, L. and Jiang, W. G. (2015). Bone morphogenetic proteins in tumour associated angiogenesis and implication in cancer therapies. *Cancer Lett.*

[Ye et al., 2008] Ye, L., Kynaston, H., and Jiang, W. G. (2008). Bone morphogenetic protein-9 induces apoptosis in prostate cancer cells, the role of prostate apoptosis response-4. *Mol. Cancer Res.*, 6(10) :1594–1606.

[Ye et al., 2009] Ye, L., Kynaston, H., and Jiang, W. G. (2009). Bone morphogenetic protein-10 suppresses the growth and aggressiveness of prostate cancer cells through a Smad independent pathway. *J. Urol.*, 181(6) :2749–2759.

[Yokoyama, 2015] Yokoyama, U. (2015). Prostaglandin E-mediated molecular mechanisms driving remodeling of the ductus arteriosus. *Pediatrics International*, 57(5) :820–827.

[Yokoyama et al., 2010] Yokoyama, U., Minamisawa, S., and Ishikawa, Y. (2010). Regulation of vascular tone and remodeling of the ductus arteriosus. *J Smooth Muscle Res*, 46(2) :77–87.

[Yoshimatsu et al., 2013] Yoshimatsu, Y., Lee, Y. G., Akatsu, Y., Taguchi, L., Suzuki, H. I., Cunha, S. I., Maruyama, K., Suzuki, Y., Yamazaki, T., Katsura, A., Oh, S. P., Zimmers, T. A., Lee, S.-J., Pietras, K., Koh, G. Y., Miyazono, K., and Watabe, T. (2013). Bone morphogenetic protein-9 inhibits lymphatic vessel formation via activin receptor-like kinase 1 during development and cancer progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 110(47) :18940–18945.

[Yoshimatsu et al., 2016] Yoshimatsu, Y., Miyazaki, H., and Watabe, T. (2016). Roles of signaling and transcriptional networks in pathological lymphangiogenesis. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 99(Pt B) :161–171.

[Yuan et al., 2016] Yuan, S.-X., Wang, D.-X., Wu, Q.-X., Ren, C.-M., Li, Y., Chen, Q.-Z., Zeng, Y.-H., Shao, Y., Yang, J.-Q., Bai, Y., Zhang, P., Yu, Y., Wu, K., Sun, W.-J., and He, B.-C. (2016). BMP9/p38 MAPK is essential for the antiproliferative effect of resveratrol on human colon cancer. *Oncol. Rep.*, 35(2) :939–947.

[Zetter, 2008] Zetter, B. R. (2008). The scientific contributions of M. Judah Folkman to cancer research. *Nat Rev Cancer*, 8(8) :647–654.

[Zhang et al., 2016a] Zhang, J., Liang, J. H., and Huang, J. G. (2016a). Bone morphogenetic protein 9 facilitates osteocarcinoma cell apoptosis and inhibits in vivo tumor growth. *Genet. Mol. Res.*, 15(3).

[Zhang et al., 2016b] Zhang, L., Ye, Y., Long, X., Xiao, P., Ren, X., and Yu, J. (2016b). BMP signaling and its paradoxical effects in tumorigenesis and dissemination. *Oncotarget*, 7(47) :78206–78218.

[Zhang et al., 2013] Zhang, N., Ye, L., Wu, L., Deng, X., Yang, Y., and Jiang, W. G. (2013). Expression of bone morphogenetic protein-10 (BMP10) in human urothelial cancer of the bladder and its effects on the aggressiveness of bladder cancer cells in vitro. *Anticancer Res.*, 33(5) :1917–1925.

[Zhu et al., 2006] Zhu, L., Vranckx, R., Khau Van Kien, P., Lalande, A., Boisset, N., Mathieu, F., Wegman, M., Glancy, L., Gasc, J.-M., Brunotte, F., Bruneval, P., Wolf, J.-E., Michel, J.-B., and Jeunemaitre, X. (2006). Mutations in myosin heavy chain 11 cause a syndrome associating thoracic aortic aneurysm/aortic dissection and patent ductus arteriosus. *Nat. Genet.*, 38(3) :343–349.

[Zinski et al., 2017] Zinski, J., Tajer, B., and Mullins, M. C. (2017). TGF-β Family Signaling in Early Vertebrate Development. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, page a033274.

Annexe

Article The circulating active ligand of the ALK1 receptor is a BMP9-BMP10 heterodimer

Cet article, dont je suis co-auteur, est en cours de révision dans *Circulation Research*. J'ai généré les souris nécessaires aux études *in vivo*.

The circulating active ligand of the ALK1 receptor is a BMP9-BMP10 heterodimer

Emmanuelle Tillet[1,2,3,*], Marie Ouarné[1,2,3], Agnès Castan[1,2,3], Christine Mallet[1,2,3], Mariela Subileau[1,2,3], Robin Didier[1,2,3,4], Anna Lioutsko[1,2,3,5], Guillaume Belthier[1,2,3,6], Jean-Jacques Feige[1,2,3], Sabine Bailly[1,2,3]

[1] Inserm, U1036, Grenoble, F-38000 France ;

[2] CEA, DRF, BIG, Laboratoire Biologie du Cancer et de l'Infection, Grenoble, F-38000 France ;

[3] Univ. Grenoble-Alpes, Grenoble, F-38000 France ;

[4] Present address: Inserm, U1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Université Côte d?Azur, Nice, France ;

[5] Present address: Inserm, U1184, Université Paris Sud 11, CEA Fontenay-aux-Roses, France ;

[6] Present address: Inserm, U661, CNRS UMR 5203, Université de Montpellier, France.

* Corresponding author: Emmanuelle Tillet, UMR1036 CEA-G/BIG/BCI, 17 rue des Martyrs 38054 Grenoble Cedex FRANCE

tel: (+33) 438784464 ; fax: (+33) 438785058 ; email: emmanuelle.tillet@cea.fr

Short title BMP9 and BMP10 circulates as active BMP9-10 heterodimers.

Subject codes Angiogenesis, Growth factors/Cytokines, Cell signaling/Signal transduction, Vascular biology

Abstract

Rationale BMP9 and BMP10 are two high affinity ligands for the endothelial-specific receptor ALK1 that are present in plasma. BMP9 is mainly expressed by the liver and has been proposed to act as a circulating vascular quiescence factor. BMP10, on the other hand, is mainly expressed by the cardiac atria and is critical for heart development. Both BMPs are involved in vascular development, and to some extent, play redundant roles. Whereas BMP9 is biologically active in plasma, the latency of BMP10 is a matter of debate.

Objective The aim of the present work was to better characterize the circulating forms of ALK1-stimulating ligands in order to understand the in vivo regulation of their activity.

Methods and Results By cotransfecting BMP9 and BMP10 into HEK 293 cells, we could demonstrate that BMP9 and BMP10 can heterodimerize in vitro. Using purified recombinant BMP9-10 heterodimer, we set-up a specific ELISA demonstrating that BMP9-10 heterodimer is present in human and mouse plasma. In addition to the available Bmp9-KO mice, we generated a conditional Bmp10-KO mouse. Global deletion of BMP10 in adult mice induced a nearly complete loss of BMP10-10 homodimer as well as a loss of BMP9-10 heterodimer in plasma. More importantly, the plasma from Bmp10-cKO mice, similarly to that of Bmp9-KO mice, completely lost its ALK1-stimulating activity, indicating that the ALK1-stimulating ligands of mouse plasma mostly consist of a BMP9-10 heterodimer. In addition, isolation of BMP9-10 heterodimer from human plasma by affinity chromatography further demonstrated that it is the major biologically active ALK1 ligand in blood. Finally, we provide evidence that the liver could be the source of BMP9-10 heterodimer.

Conclusion Our data demonstrate that, in both mice and humans, the main circulating active ligand of the ALK1 receptor is a BMP9-10 heterodimer. This heterodimer could mediate specific localization and biological responses.

Non-standard abbreviations and acronyms

ALK: Activin receptor-Like Kinase
BMP: Bone Morphogenetic Protein
BRE: BMP Responsive Element
cKO : conditional knockout
CM: Conditioned Medium
ECM: Extracellular Matrix
HHT: Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia
HSC: Hepatic Stellate Cells
HUVECs: Human umbilical venous endothelial cells
KO: Knockout
TGF: Transforming Growth Factor
WT: Wild-type

Introduction

Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) are members of the Transforming Growth Factor ß superfamily that regulate cellular events essential for embryonic development and tissue homeostasis [1]. BMPs bind to, and activate a receptor complex consisting of type I and type II transmembrane serine/threonine kinases [2]. Following ligand binding, activated receptors propagate signaling by phosphorylating the receptor-regulated SMAD-1, -5, or -8, which, in association with SMAD4, translocate to the cell nucleus and regulate expression of the SMAD pathway-responsive genes [3]. BMPs are synthesized as pro-proteins, consisting of an N-terminal prodomain, and a receptor-binding C-terminal mature region [4]. A single disulfide bond within the terminal mature region allows dimerization of the pro-protein, which is further processed through proteolytic cleavage by furin proconvertases [5, 6].

Among the TGFß growth factor family, BMP9 and BMP10 are two high affinity ligands for the endothelial-specific type I receptor activin receptor-like kinase 1 (ALK1) [7, 8]. The signaling pathway activated through the ALK1 receptor is critical for vascular development. Indeed, mutations in ACVLR1, encoding ALK1, cause an autosomal dominant disease, Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia type 2 (HHT2), characterized by vascular disorders including abundant epistaxis, dilated blood vessels and arteriovenous malformations [9]. Accordingly, in mice, inactivation of Acvlr1 is lethal at mid-gestation with severe vascular defects [10, 11].

In adults, BMP9 is mainly produced by the liver [12] whereas BMP10 is synthesized by the right atria [13]. Gene knockout (KO) of either Bmp9 (Gdf2) or Bmp10 in mice revealed that BMP9 is dispensable during embryonic development [14] whereas BMP10 is required for proper cardiac development [15]. In adults, BMP9 has been shown to circulate in blood at a biologically active concentration, and has been considered as a physiological ALK1 ligand controlling adult blood vasculature quiescence [16]. We have more recently shown that both BMP9 and BMP10 play a redundant role in postnatal vascular development [14, 17] and a careful evaluation of the early vasculature of Bmp10-KO mice indicated that BMP10 is also involved in vascular development [18]. So, the timing and sites of expression of BMP9 and BMP10 appear to dictate the in vivo role of each ligand. Nevertheless, there are also some physiological functions for which BMP9 and 10 exert specific roles. Indeed, BMP10 cannot replace BMP9 for lymphatic vessel maturation and consequently, Bmp9-KO mice display a decrease in lymphatic drainage efficiency [19, 20]. On the other hand, BMP10 is crucial for cardiac development [15], and BMP9 expression, even when driven by the BMP10 promoter, cannot substitute for BMP10 for this function. This indicates a unique signaling capacity for BMP10 in cardiac development and raises the possibility that distinct signaling capacities could be discriminant for differentiation and proliferation of non-endothelial cells [18].

ELISAs have shown that human plasma contains both BMP9 (2-6 ng/mL) and BMP10 (0.5-2 ng/mL) [12, 18]. However, although it is widely admitted that BMP9 circulates under a biolog-

ically active form [7, 12], there is still a debate about the latency of BMP10. Functional and structural studies have confirmed that the binding of mature BMP9 to its prodomain does not prevent its binding to signaling receptors [12, 21]. In contrast, it has been shown that, when bound to its pro-domain, mature BMP10 is inactive [22], similarly to other members of the TGFß family, including TGFß [23] itself and myostatin [24]. Along this line, the prodomain of BMP10 has been shown to potently inhibit mature BMP10 activity on C2C12 cells [22]. However, a more recent report indicates that the BMP10 prodomain is unable to inhibit BMP10 activity on several types of endothelial cells [25]. Accordingly, recombinant human BMP10 produced in mammalian cells appears to form a very stable complex, composed of the mature form associated with the prodomain, that is fully active on endothelial cells [25]. Similarly, in plasma, controversial results have been published about the activity or latency of BMP10. Chen et al. [18] have shown that anti-BMP10 antibodies could decrease Smad6 gene induction by mouse serum, and that both anti-BMP9 and anti-BMP10 antibodies were required for complete inhibition of this response. Therefore, it seems that mouse plasma contains active BMP10. These data thus appear in contradiction with the absence of ALK1-stimulating activity measured in Bmp9-KO mouse plasma [14].

The aim of the present work was to better characterize the circulating active ligands of ALK1 receptor and to reconcile these apparently discrepant results. We provide evidence that, when co-expressed, BMP9 and BMP10 can associate to form a disulfide-bonded heterodimer. More importantly, we report the presence of BMP9-10 heterodimers in human and mouse plasma, which represent the major ALK1-stimulating ligand in blood. Therefore, we report here for the first time that heterodimerization of the two closely-related BMP9 and BMP10 form a physiological ALK1 ligand that can regulate vascular development and endothelial quiescence. More broadly, our data indicate that heterodimeric BMPs could be involved in normal physiology in mammals, not only during embryonic development but also for tissue homeostasis in adults.

Material and Methods

BMP9 and BMP10 expressions

Description of vector constructs, recombinant protein production and purification procedures are described in the detailed methods in the supplemental material.

BMP10 purification from human plasma

10-30 mL of human plasma (Biopredic International, pool of healthy donors) was applied to an anti-BMP10-engrafted antibody column (clone 13C11 [17]) and eluted first with high salt (2 mol/L NaCl) in phosphate buffer followed by acidic elution (glycine-HCl pH 2.7).

Cell culture, transfection and dual luciferase activity assay

NIH-3T3 cells were transfected as previously described [7]. HUVECs were grown in EBM-2 (Lonza) and transfected by pGL3(BRE)2-luc and pRL-TK luc in the absence of serum with lipofectamine 3000 accordingly to recommended protocols (Thermofisher). Cells were stimulated 2 hours after transfection and lysed after 12 hours for luciferase assay measurement. When indicated, ligands were mixed with blocking agents (anti-BMP9 antibody (Genentech, 0.1μg/mL), anti-BMP10 (clone 13C11, 1 μg/mL), Act RIIA-Fc, Act RIIB-Fc, BMPRII-Fc (R&D Systems) (0.5 μg/mL) and incubated for 1 hour at room temperature before stimulation.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

BMP10 ELISA was performed with a commercially available assay (R&D Systems) that recognizes both human and mouse mature BMP10. BMP9 and heterodimeric BMP9-10 ELISA measurements are described in the detailed methods. Standard curves (15-1000 pg/mL) were obtained with recombinant BMP9 and BMP10 (R&D Systems) or purified BMP9-10 that had been quantified by western blotting.

In situ Hybridization by RNAscope

RNAscope® (Advanced Cell Diagnostics) was carried out on fixed and paraffin-embedded tissues according to the manufacturer instructions. Target retrieval was achieved by heating the slides at 100°C for 18 minutes. RNAscope® probes (Mm-Gdf2, Mm-Bmp10, negative Control Probe, positive Control Probe) were incubated for 2 hours at 40°C on individual slides followed by hybridation amplification and staining. Sections were counter-stained for two minutes with hematoxylin.

Bmp9- and *Bmp10*-cKO mice

The generation of *Bmp9*-KO mice was described previously [14]. To circumvent the early embryonic lethality of *Bmp10*-KO mice 15, the Institut Clinique de la Souris (Illkirch, France)

generated for us a *Bmp10*$^{lox/lox}$ mice by flanking loxP sites around exon2. These mice were then crossed with the ROSA-26-CreERT2 mice provided by Pr. P. Chambon (IGBMC, Illkirch, France) [26] to generate conditional KO of *Bmp10* (*Bmp10*-cKO mice). Intraperitoneal injections of tamoxifen (1 mg/kg) were performed for five days in 3-week-old mice. Blood was taken 6 weeks later. All animal studies were approved by the institutional guidelines and those formulated by the European Community for the Use of Experimental Animals. *Bmp9*-KO and *Bmp10*-cKO mice were viable. They were maintained in the C57BL/6 background.

Results

Plasmatic ALK1-stimulating (BRE) activity is distinct from mature BMP9

To address the relative roles of BMP9 and BMP10 in human plasma, we first performed a neutralization experiment using validated neutralizing anti-BMP9 and anti-BMP10 antibodies. Briefly, ALK1-transfected NIH-3T3 fibroblasts expressing the firefly luciferase gene under the control of multiple BMP-response elements from the Id1 gene promoter were stimulated overnight by plasma or purified BMPs, and the quantitation of the luciferase activity was then used as readout for ALK1 stimulation. As shown in Figure 1A, the anti-BMP9 and anti-BMP10 antibodies did not cross-react at all with recombinant mature BMP10 or BMP9, respectively. The addition of either anti-BMP9 or anti-BMP10 antibodies to human plasma resulted in a 65% and 40% inhibition of luciferase activity, respectively. Addition of both antibodies left only 10% of residual activity, suggesting the presence of both active BMP9 and active BMP10 in plasma (Fig.1A).

BMP9 and BMP10 are known to have a similar affinity for ALK1 and their activity can be blocked by soluble ALK1 (ALK1-Fc). In contrast, they show distinct affinities for the three type II receptors BMPRII, ActRIIA and ActRIIb [27, 28]. This prompted us to compare the effects of these three soluble type II receptors on the activation of ALK1 by mature BMP9, mature BMP10 or human plasma (Fig. 1B). We observed that soluble ActRIIA and ActRIIB did not inhibit BMP9 activity whereas they inhibited 75% of BMP10 activity. In contrast, addition of soluble BMPRII completely inhibited BMP10 activity but only 50% of BMP9 activity. Interestingly, the activity present in human plasma was strongly (90%) inhibited by soluble BMPRII, but only partially (50%) by soluble ActRIIA or ActRIIB. Altogether, these results demonstrated that the activity of human plasma was distinct to that of mature BMP9 as it was inhibited by soluble ActRIIA or ActRIIB. Together, these results rather suggested the presence of both active BMP9 and active BMP10 in plasma. However, we found, in accordance with our previous work [14], that the plasma of Bmp9-KO mice was devoided of ALK1 active ligands (Fig.1C). Similarly, liver extracts from Bmp9-KO mice were unable to stimulate ALK1 (Fig.1C).

One possible explanation for this discrepancy is that genetic inactivation of BMP9 triggers genetic repression of BMP10 expression. This is not the case, as we observed that the right atria displayed a very high ALK1 ligand specific activity, that was not changed in Bmp9-KO mice, supporting that expression and activity of BMP10 is not affected in this organ (Fig. 1C). One possible hypothesis that could reconcile these results is that plasmatic ALK1?s ligand is a heterodimer between one chain of BMP9 and one chain of BMP10 rather than a mixture of homodimeric BMP9 and BMP10. If so, then genetic deletion of BMP9 should result in total suppression of the plasmatic ALK1-stimulating activity. We thus decided to evaluate whether such a BMP9-10 heterodimer can form in cells transfected with both BMP9 and BMP10 cDNAs and whether we could detect a BMP9-10 heterodimer in human and mouse plasma.

BMP9 and BMP10 can form heterodimers in vitro

We first undertook the demonstration that BMP9 and 10 can indeed heterodimerize in vitro. For this, we engineered recombinant BMP9 and BMP10 using two different tags placed between the prodomain and the mature BMP peptide, i.e. downstream of the furin cleavage site (Fig.2A). BMP9 was tagged with a 6-histidine motif while BMP10 was tagged with a myc epitope. Tagged BMP9 and BMP10 were transfected into HEK-293 cells, either solely or together, and secreted BMPs were evaluated by western blotting of conditioned media (CM) using antibodies directed against the mature forms (Fig.2B). Both BMPs were produced as incompletely processed molecules: antibody detection revealed at least three bands around 110 kDa (unprocessed pro-BMP), 50-65 kDa (monomer or partially processed BMP), and 23 kDa (mature BMP) under non-reducing conditions. To determine if heterodimeric BMP9-10 could be produced by double-transfected cells, we separated the two BMPs using their specific tag. First, CM was applied onto a his-trap column to retain his-BMP9, elution was then performed using 200 mmol/L imidazole, and fractions were analyzed by western blotting. As expected, His-BMP9 was fully retained by the His-trap column and only detected in the 200 mmol/L imidazole elution (Fig.2C). Myc-BMP10, on the other hand, bound weakly to the His-trap column and was eluted by the first wash (10-20 mmol/L imidazole) (Fig.2D). In CM containing both his-BMP9 and myc-BMP10 (Fig.2E), myc-BMP10 was partially detected in the unbound or weakly bound fractions (FT, Wash) but could also be observed in the elution, demonstrating that BMP9 and BMP10 interacted when they were co-transfected (Fig.2E). We then analyzed whether BMP9 and BMP10 could still interact under denaturing conditions; Heterodimeric disulfide-bonded molecules should still co-elute while oligomeric non-covalent BMP9/BMP10 complexes should be disrupted by denaturation. For this, CM was treated with 8 mol/L urea and heated for 20 minutes at 65°C before being applied to the His-trap column. Myc-BMP10 could still interact with his-BMP9 (Fig.2F). Similar results were obtained after 1% SDS denaturation (not shown). On the contrary, further treatment resulting in reduction and alkylation of disulfide-bonds completely disrupted myc-BMP10 binding, as shown by anti-myc antibody detection, albeit BMP9 was still retained on the column (Fig.2G). We also found that, when we mixed CM from his-BMP9 transfected cells with CM from myc-BMP10 transfected cells, we could not detect a BMP9/BMP10 interaction, supporting that BMP9-10 association has to form intracellularly (not shown). Altogether, these results demonstrated that BMP9 and BMP10 could form heterodimeric disulfide-bonded molecules.

To further support BMP9-10 heterodimerization, we generated BMP constructs that would not be able to be processed, by mutating amino acids in the furin cleavage site, and we co-transfected a mutated BMP9 with a wild-type (WT) BMP10 or vice versa. To do this, we also removed the tags between the pro- and mature BMP domains. Interestingly, we observed that removal of the tag enabled the full processing of pro-BMP9 and pro-BMP10, as shown by the single 23 kDa band revealed by western blot of CM issued from WT BMP9 or WT BMP10 transfections (Fig.2H). The BMP9 furin cleavage site RK^{317}KR was mutated to RQ^{317}KR, RQ^{317}A^{318}R or RQ^{317}A^{318}A^{319} (Supplemental Fig.1). The first mutant was generated

to mimic a substitution mutation identified in a patient suffering from HHT 29. The two others replaced basic amino acids by alanine residues to avoid furin cleavage. The single substitution of K^{317} to Q^{317} did not impair BMP9 maturation, thus indicating that HHT disease in this patient is not linked to a BMP9 processing defect as it had been suggested [29]. The double mutant RQAR was only partially processed but could be completely cleaved when furin was overexpressed, while the triple mutant RQAA was not cleaved at all (Fig.2H), even in the presence of overexpressed furin (Supplemental Fig.1). Similarly, BMP10 $RIR^{315}R^{316}$ sequence was mutated to RIAA. Figure 2H shows that, similarly to the BMP9 RQAA mutant, the BMP10 RIAA mutant was expressed as a 110 kDa precursor and that no mature 23 kDa BMP could be detected by western blot. However, monomers of 50 kDa could still be detected. Interestingly, co-transfection of BMP10 RIAA mutant with WT BMP9 gave rise to a new 65 kDa BMP9 immune-reactive band (arrow) likely corresponding to the association of mature WT BMP9 to BMP10 precursor. Similar results could be obtained with the co-transfection of BMP9 RQAA mutant together with WT BMP10 (Fig.2H). In accordance with these results, CM from BMP9 RQAA or BMP10 RIAA mutants could not activate ALK1?s BRE activity (Fig.2I). Importantly, cotransfection of a mutant BMP with a WT isoform inhibited the activity of the WT BMP (Fig.2I), demonstrating a dominant negative effect of the inactive mutant on the active WT BMP9 or 10. Altogether, these results further support that BMP9 and BMP10 form a disulfide-bonded heterodimer when coexpressed in the same cells.

BMP9-10 heterodimer is biologically active

BMP9-10 heterodimers were purified in two steps using a Histrap column followed by an affinity column grafted with anti-myc antibodies. This allowed separating his-BMP9 homodimers from BMP9-10 heterodimers. Elution was performed by lowering the pH to 3 and then to 2. The pH 3 fractions contained mainly BMP9 whereas BMP10 was barely detectable (Supplemental Fig.2). On the other hand, BMP9 and BMP10 were both detected at similar levels in the pH 2 fractions. Therefore, the pH 3 fractions contained homodimeric his-BMP9, while the more strongly bound proteins that eluted at pH2 contained heterodimeric BMP9-10.

The mature 23 kDa form of BMP9-10 heterodimer was carefully quantified by western blotting using known quantities of commercial BMP9 and BMP10 as standards (Fig.3A). The quantity of purified BMP9-10 heterodimer was calculated from the 23 kDa BMP9 and BMP10 immune-reactive bands. The activities of the different homo- or hetero-dimeric BMP9 and BMP10 forms were then determined on ALK1-transfected 3T3 mouse fibroblasts with the standard BRE luciferase assay (Fig.3B). All forms stimulated ALK1 at similar doses and with a roughly similar fold of induction. We next tested these different forms on endothelial cells and set-up a BRE assay on HUVECs by transfecting the BRE-luc reporter plasmid. Again, no difference in luciferase activity stimulation could be observed between the three forms. Cells responded to low doses (25 pg/mL) of ligand and a plateau could be observed with doses higher than 250 pg/mL (Fig.3C). In addition, the three forms stimulated also the phosphorylation of Smad1/5 with a similar dose-response (data not shown).

Development of an ELISA able to detect BMP9-10 heterodimer

In order to quantify BMP9-10 heterodimers, we then set-up a cross ELISA, using a capture anti-BMP9 antibody and a detection anti-BMP10 antibody, or the other way round, i.e. a capture anti-BMP10 antibody and a detection anti-BMP9 antibody and compared their reactivity with standard BMP9 [12] and BMP10 ELISAs (R&D Systems). All ELISAs were performed using antibodies directed against epitopes in the mature domain of BMP9 or BMP10. We measured the ELISA immune-reactivity of CM from his-BMP9, myc-BMP10, a 1:1 mixture of his-BMP9 and myc-BMP10 (BMP9+BMP10), and purified BMP9-10 heterodimers. As shown on Fig.4A and 4B, BMP9 ELISA and BMP10 ELISAs both recognized homodimeric BMP9 or BMP10, respectively, with no cross-reactivity for BMP10 or BMP9, respectively. They also allowed the detection of a mixture of homodimeric BMP9 and BMP10 (BMP9+BMP10) and that of purified BMP9-10 heterodimer. On the contrary, cross BMP9-10 or cross BMP10-9 ELISAs failed to detect his-BMP9 or myc-BMP10 homodimers but detected purified BMP9-10 heterodimers (Fig.4C, 4D). Moreover, CM containing a mixture of BMP9 and BMP10 gave no signal, demonstrating that only disulfide-bonded heterodimer is recognized by these cross ELISAs. Similarly, a mixture of purified recombinant BMP9 and 10 from R&D Systems was also not detected (not shown). Standard curves using purified BMP9-10 could be established and showed a sensitivity threshold around 30 pg/mL for both cross ELISAs (Fig.4E, F).

BMP9-10 heterodimer is present in mouse plasma and is the only active ALK1-stimulating form

We then sought for the presence of heterodimeric BMP9-10 in mouse plasma. To do this, we took advantage of comparing WT and KO mice in which the expression of *Bmp9* or *Bmp10* has been genetically invalidated. *Bmp9*-KO mice displayed no BMP9 homodimer when measured with a standard BMP9 ELISA (Fig.5A) and no ALK1-stimulating (BRE-luc) activity in their plasma (Fig.5G) in agreement with our previous work [14]. Interestingly, using a cross BMP9-10 ELISA, we could detect the presence of BMP9-10 heterodimers in WT mouse plasma, ranging from 200-660 ng/mL (Fig.5E). As expected, the loss of *Bmp9*-gene led to the total absence of BMP9-10 heterodimer (Fig.5E). The circulating level of BMP10 in WT mice was between 80-170 pg/mL. We also found a strong decrease in BMP10 levels in the plasma of the *Bmp9*-KO mice (mean 40 pg/mL versus 130 pg/mL in WT mice, Fig 5C). This is due to the loss of BMP9-10 heterodimers as the BMP10 ELISA can detect both BMP10 homodimers and BMP9-10 heterodimers (Fig.4B).

We next addressed the same question using *Bmp10*-cKO mice. As *Bmp10*-KO is embryonic lethal, we generated conditional Bmp10-KO mice by crossing Bmp10-floxed mice with Rosa26-CreERT2 mice [26]. Deletion of *Bmp10* was performed in 3-week-old mice by daily injection of tamoxifen for five days. Following *Bmp10* deletion, mice were viable and did not display any obvious phenotype. The mouse plasmas were analyzed 6 weeks later. As expected, circulating BMP10 levels measured with the BMP10 ELISA were strongly reduced, although not completely (10% residual immune-reactivity) (Fig.5D). BMP10 knock-down efficiency could also be

evaluated by measuring BRE activity of protein extracts from the right atria, the main site of homodimeric BMP10 production: only 10% of BRE activity remained 3 weeks after tamoxifen injections (supplemental Fig.3). As expected, the genetic inactivation of *Bmp10* was associated with the loss of BMP9-10 heterodimer (Fig.5F). We also observed a strong decrease in BMP9 levels with the classical BMP9 ELISA (Fig. 5B), supporting that a large part of BMP9 immune-reactivity can be attributed to BMP9-10 heterodimer. We then evaluated the BRE activity of the plasma from *Bmp10*-cKO mice as compared to control mice that were also treated with tamoxifen. Surprisingly, 90% of ALK1-stimulating activity was lost in the plasma of these *Bmp10*-cKO mice (Fig.5H), suggesting that the main circulating activity can be attributed to BMP9-10 heterodimers. On the contrary, the BMP activity of *Bmp10*-cKO mouse liver extracts was unchanged (Supplemental Fig.3), highlighting that the activity in the liver is due to a different BMP9 form than the one in plasma.

BMP9-10 heterodimer circulates as an active ligand in human plasma

We then sought whether we could detect also BMP9-10 heterodimers in human plasma. Indeed, we found that the BMP10-9 cross ELISA was able to detect significant amounts (around 2 ng/mL) of BMP9-10 heterodimers from plasma issued from a pool of five donors (Fig.6A). Treatment of plasma with 1% SDS, to remove any non-covalent protein-protein interactions, did not decrease the signal (Fig.6A, grey bars). To appreciate BMP9-10 plasmatic concentrations, we measured BMP9, BMP10, and BMP9-10 in the plasmas of 19 individual humans (Fig.6 B-D). We detected BMP9-10 heterodimers with a great heterogeneity between individuals (below detection up to 10 000 pg/mL; Median = 770 pg/mL) (Fig.6D). It is worth noting that we could measure higher amounts of BMP9-10 heterodimer with the cross ELISA than with the individual BMP9 ELISA (below detection up to 2600 pg/mL, median = 100 pg/mL) and BMP10 ELISA (2 to 1760 pg/mL, median = 24 pg/mL). Therefore, the BMP9 and BMP10 ELISAs appear less prone to recognize plasmatic BMP9-10 heterodimers than recombinant BMP9-10 heterodimer. To further characterize plasmatic human BMP9-10 heterodimer, we undertook its isolation from human plasma by affinity chromatography on anti-BMP10 antibodies. For this, we passed the pool of human plasma (10 mL) through an affinity chromatography column grafted with anti-BMP10 antibodies and eluted bound BMPs by acidic pH. ELISA and ALK1-dependent BRE assay were then performed on the flow through (FT) and elution. A large part of the BMP9 immune-reactivity was detected in the FT fraction, probably corresponding to BMP9 homodimers that do not bind to the anti-BMP10 column, as it was not recognized by a BMP10-9 ELISA (Fig.7A). Conversely, the form detected in the elution probably corresponded to BMP9-10 heterodimers as it was also detected by the cross BMP10-9 ELISA. Surprisingly, BMP10 immune-reactivity (measured by the BMP10 ELISA), which is really low in the plasma, was considerably enhanced (nearly 50 ng for 10 mL of plasma) after passing through the anti-BMP10 column, suggesting that the chromatography has released new epitopes for BMP10 antibodies (Fig.7B). As a similar amount of BMP9-10 heterodimer is detected in the elution, this suggests that BMP10 ELISA can now detect BMP9-10 heterodimer, although it could not in plasma.

Interestingly, most of the ALK1 BRE activity was detected in the elution containing the BMP9-10 heterodimer. The flow-through, containing mostly homodimeric BMP9, was not very active. Altogether, these data demonstrate that in human plasma BMP9-10 heterodimer is the major active circulating form of ALK1 receptor.

Hepatic stellate cells synthesize BMP9 and BMP10

Heterodimeric BMP9-10 bonding implies that BMP9 and BMP10 has to be produce by a common cell. We previously described, using mRNA from 20 human tissues (Clontech), that BMP9 mRNA is mostly expressed by the liver [12]. Using the same samples, we measured BMP10 mRNA expression. We found that BMP10 was, as expected, mostly expressed in the heart but also, though at a lower level, in the liver (Fig.8A). We thus hypothesized that the liver could be the organ responsible for the expression of circulating BMP9-10 heterodimer. We used the RNAscope technology (Advance Cell Diagnostics) to identify BMP9- and BMP10-producing cells in mouse liver sections. BMP10 probe was first validated on mouse adult heart cross sections. As expected, a strong pink labeling was specifically observed in the right atria, while the ventricle was completely negative (Fig.8B). No BMP9 mRNA expression could be detected in the heart (Fig.8B). On the contrary, liver sections showed BMP9-positive cells throughout the liver lobules (Fig.8C). Higher magnification indicated that positive cells were triangular- or stellate-shaped cells, spread between hepatocytes and sinusoids, having a typical morphology of hepatic stellate cells (HSCs). To the opposite, no staining was observed in other hepatic cells i.e. hepatocytes, sinusoidal endothelial cells, or Kupffer cells (Fig.8C). Interestingly, BMP10 staining, albeit weaker than BMP9 staining, was also specifically observed in HSCs (Fig.8C). Therefore, we conclude that HSCs can synthesize both BMP9 and 10 and could be the source of BMP9-10 heterodimer.

Discussion

Our work demonstrates for the first time that BMP9 and BMP10, two BMPs from the same subfamily, which share 65% protein sequence identity, can heterodimerize by disulfide bonding in the C-terminal mature domain to produce an active BMP9-10 heterodimer. It also shows that this heterodimer is present in both human and mouse plasma, and that the main biologically active circulating form capable of activating ALK1 is this BMP9-10 heterodimer.

Most TGFßs and BMPs have been described as homodimeric proteins, but several reports demonstrate that they can also, to some extent, heterodimerize [1]. In most cases so far, these combinations imply two monomers from members of distinct subfamilies [30]. Heterodimeric BMPs, including BMP2-BMP7, BMP4-BMP7 and BMP2-BMP6, have been shown to play critical roles in embryonic development in various organisms including Drosophila [31, 32], zebrafish [33], xenopus [34] and mammals [35]. Nodal-GDF1 heterodimers have also been shown to be involved during left-right patterning [36,37]. There is however only little evidence of the expression of these heterodimers in adults. One example is illustrated by the discovery of cumulin, a GDF9-BMP15 heterodimer, which is an oocyte specific growth factor involved in granulosa cell differentiation and a key regulator of ovarian function [38,39]. In the present work, we identify a new heterodimeric BMP ligand, BMP9-10, which is circulating in adult blood and is likely a key factor for blood vessel homeostasis. To measure its circulating levels, we have set-up a cross ELISA that specifically recognizes heterodimeric BMP9-10 and does not cross-react with the homodimeric forms. To our knowledge, this is the first time that BMP heterodimers can be quantified from in vivo sources and similar ELISAs could be developed for other BMPs to more generally assess the occurrence of BMP heterodimers in tissues.

Our previous work on Bmp9-KO mice showed no ALK1-stimulating activity in the plasma of these mice. We therefore proposed that circulating BMP9 was the main active ALK1 ligand in blood [14]. In the present report, we show that *Bmp10*-cKO mice have also lost most of their circulating ALK1-stimulating activity and we demonstrate that BMP9-10 heterodimer is the main circulating active ligand for ALK1. It might thus be surprising that *Bmp9*-KO mice are viable and healthy and that they do not present any obvious blood vessel developmental defects, although plasma from these mice is biologically inactive on ALK1 [14]. However, in the present study, low level of homodimeric BMP10 (20-100 pg/mL) could still be measured by ELISA in the plasma of *Bmp9*-KO mice, which may even be underestimated as our BMP10 ELISA does seem to recognize all BMP10 epitopes (see Fig.5, 6, 7). In accordance with our work, it was recently shown that quantification of serum BMPs by western blot or ELISA vastly underestimates the concentration of BMPs in serum [40]. We propose that this low circulating level of BMP10 could be sufficient to activate the high affinity receptor ALK1 (EC50 = 50 pg/mL 7) and thus stimulate endothelial cells, but is below the detection threshold of the ALK1-BRE assay used here (stimulation with 1% plasma).

Most heterodimeric BMPs, when produced as recombinant proteins, usually show an increased activity, as compared to their homodimeric counterparts [41–44]. It is admitted that this high potency of heterodimers is due to their increased versatility regarding receptor binding. Indeed,

heterodimers often consist of the association of a member of the BMP2/4 subgroup, having a high affinity to type I receptor, but a low affinity to type II receptors 45 and a member of the BMP5/6/7/8/8b subgroup, having a higher affinity to type II receptors than to type I receptors 46. The combination of both would then enhance the global affinity for the receptor complex. To this respect, BMP2-6 heterodimer displays high affinity for both type I and type II receptors [42]. Moreover, heterodimeric association could induce the recruitment of two different type I receptors in the same signaling complex, thus inducing a stronger downstream signaling [42]. Such a mechanism has been elegantly demonstrated in the zebrafish embryo, where the signaling by BMP2-7 induces a synergistic activity of ALK3 and ALK6, which is required for dorsoventral patterning [33]. Although these studies enable insight into signaling, structural characterization of receptor complexes with BMP heterodimers will be necessary [4].

In contrast to these studies, in our assays, the BMP9-10 heterodimer did not display any higher activity than its homodimeric counterparts. The BMP9-10 heterodimer has however only been challenged on cells expressing ALK1 receptor (ALK1-transfected 3T3 cells, primary endothelial cells). ALK1 is a type I receptor of very high affinity, explained by a unique receptor orientation toward its ligands that is distinct from the other type I receptors [28, 45]. ALK1 has a similar affinity for BMP9 and BMP10 and is stimulated with very low concentrations of ligand (as low as 10 pg/mL). To this regard, it might not be surprising that BMP9-10 heterodimer displays the same activation pattern as BMP9 and BMP10 homodimers. It may be possible that this heterodimer differentially activates cells that do not express ALK1. Indeed, BMP9 and BMP10 present differential affinities toward the three type II receptors [28] (see Fig1B) and the initial binding of the BMP9-10 heterodimer to a given subset of type II receptors might allow the subsequent recruitment of a lower affinity type I receptor such as ALK2 or ALK3. BMP9 has been shown to signal through ALK2 [46, 47] and BMP10 through ALK3 [48] in non-endothelial cell types. It is tempting to speculate that BMP9-10 heterodimer could drive a specific signal through this receptor set. Further work is needed to characterize ALK1-independent cellular responses. Interestingly, ALK2 and ALK3 have been recently involved as key receptors that mediate proangiogenic BMP signaling in the early postnatal retina [49]. However, one has to keep in mind that not all heterodimers produce a synergistic signal due to the recruitment of different receptors. In Drosophila, the Dpp/Gbb heterodimer does not lead to a stronger signal but its more effective signaling is attributed to its better transport [50].

Biosynthesis of disulfide-bonded heterodimeric BMPs supposes a common production site for both BMPs. Analysis of BMP10 mRNA expression in twenty different tissues confirmed that BMP10 was mostly expressed by the heart but that some BMP10 expression could also be found in the liver (Fig.8A). Using the powerful RNAscope technology, we found that BMP9 and to a lower extent BMP10 are localized in hepatic stellate cells (HSCs). The source of BMP9 expression has been debated for a long time [12, 51], but HSCs have been recently described as the cellular source for BMP9 protein [52], in agreement with mRNA detection in the present work (Fig.8). We propose that HSCs could be the cells that produce the BMP9-10 heterodimer but further data are needed to confirm this hypothesis. In particular, it will be very interesting to measure the synthesis of this heterodimer by isolated HSCs.

The ALK1-stimulating activity in the right atria is significantly decreased in *Bmp10*-cKO mice (Supp Fig.3). This supports the hypothesis that the heart only produces BMP10 homodimer and that this homodimer is not secreted into the circulation since no circulating activity is found in *Bmp9*-KO mice (Fig.1C). On the other hand, the activity in the liver is strongly reduced in *Bmp9*-KO mice but not in *Bmp10*-cKO mice (Supp Fig.3), indicating that the activity present in the liver is related to BMP9 homodimers that are not secreted into plasma. This would suggest that BMP9-10 heterodimer, produced by the liver represent only a small portion of total active ALK1 ligand from the liver. One hypothesis is that BMP9-10 is very rapidly delivered into the circulation. Differential ECM proteins interactions, mediated by BMP prodomains could be involved in such regulation [53]. Another possibility would be that BMP9-10 heterodimer activity is specifically negatively regulated compared to BMP9 homodimer in the liver. This could be achieved through discriminant inhibitory activity. Namely, it has been shown that BMP antagonists could differently bind and inhibit homodimeric versus heterodimeric BMPs [54]. Furthermore, specific binding and cleavage [55] play essential roles in spatial regulation of the BMPs activity, as shown in embryonic patterning and vein development with Dpp/Scw heterodimer in Drosophilia [1, 31, 32]. Such mechanisms could be implicated in the control of the activity and transport of the BMP9-10 heterodimer. Taken together, our results open a new field of investigation for BMP heterodimers, as we show for the first time the presence of a BMP9-10 heterodimer in the plasma of adult humans and mice. Which additional functions are triggered by this circulating heterodimer that its homodimeric counterparts do not fulfill is still an open question and will require further studies in cellular contexts where various combinations of type I and type II receptors are expressed. Which mechanisms control the differential synthesis and bioavailability of BMP9 and BMP10 homo- and heterodimers in liver and heart is also an intriguing question to be addressed in the future.

Acknowledgements We thank Dr. D. Constam (Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Switzerland) for his gift of PCR3-furin plasmid, Dr S.J. lee (Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, USA) and Dr. T. Zimmers (Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA, USA) for providing Bmp9-KO mice, Dr. D Metzger (IGBMC, Illkirch, France) for providing us the Rosa26-CreERT2 mouse, and the animal facility staff at Institut de Biosciences et Biotechnologies de Grenoble (BIG, Grenoble, France) for animal husbandry.

Source of funding This work was supported by INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1036), CEA (Commisariat à l?Energie Atomique et aux Energies Alternatives, DRF/BIG/BCI), UGA (University Grenoble-Alpes), the Ligue contre le Cancer de la Loire et de la Savoie, The association Maladie de Rendu-Osler (AMRO) and the Association Pour la Recherche sur le Cancer. M.O. was supported by the PhD program of CEA/DSV (IRTELIS). We thank the Fondation Maladies Rares (FMR) for its financial support to the generation of Bmp10 lox/lox mice.

Disclosures None

References

[1] Joseph Zinski, Benjamin Tajer, and Mary C. Mullins. TGF-β Family Signaling in Early Vertebrate Development. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, page a033274, June 2017.

[2] Kohei Miyazono, Yuto Kamiya, and Masato Morikawa. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J. Biochem.*, 147(1):35–51, January 2010.

[3] Amaya García de Vinuesa, Salim Abdelilah-Seyfried, Petra Knaus, An Zwijsen, and Sabine Bailly. BMP signaling in vascular biology and dysfunction. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 27:65–79, February 2016.

[4] Andrew P. Hinck, Thomas D. Mueller, and Timothy A. Springer. Structural Biology and Evolution of the TGF-β Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 8(12), December 2016.

[5] Daniel B. Constam. Regulation of TGFβ and related signals by precursor processing. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 32:85–97, August 2014.

[6] Thomas D. Mueller and Joachim Nickel. Promiscuity and specificity in BMP receptor activation. *FEBS Letters*, 586(14):1846–1859, July 2012.

[7] Laurent David, Christine Mallet, Sabine Mazerbourg, Jean-Jacques Feige, and Sabine Bailly. Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood*, 109(5):1953–1961, March 2007.

[8] Marion Scharpfenecker, Maarten van Dinther, Zhen Liu, Rutger L. van Bezooijen, Qinghai Zhao, Laurie Pukac, Clemens W. G. M. Löwik, and P. ten Dijke. BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis. *J. Cell. Sci.*, 120(Pt 6):964–972, March 2007.

[9] D. W. Johnson, J. N. Berg, M. A. Baldwin, C. J. Gallione, I. Marondel, S. J. Yoon, T. T. Stenzel, M. Speer, M. A. Pericak-Vance, A. Diamond, A. E. Guttmacher, C. E. Jackson, L. Attisano, R. Kucherlapati, M. E. Porteous, and D. A. Marchuk. Mutations in the activin receptor-like kinase 1 gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *Nat. Genet.*, 13(2):189–195, June 1996.

[10] S. Paul Oh, Tsugio Seki, Kendrick A. Goss, Takeshi Imamura, Youngsuk Yi, Patricia K. Donahoe, Li Li, Kohei Miyazono, Peter ten Dijke, Seongjin Kim, and En Li. Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-β1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(6):2626–2631, March 2000.

[11] L. D. Urness, L. K. Sorensen, and D. Y. Li. Arteriovenous malformations in mice lacking activin receptor-like kinase-1. *Nat. Genet.*, 26(3):328–331, November 2000.

[12] Marie Bidart, Nicolas Ricard, Sandrine Levet, Michel Samson, Christine Mallet, Laurent David, Mariela Subileau, Emmanuelle Tillet, Jean-Jacques Feige, and Sabine Bailly.

BMP9 is produced by hepatocytes and circulates mainly in an active mature form complexed to its prodomain. *Cell. Mol. Life Sci.*, 69(2):313–324, January 2012.

[13] H. Neuhaus, V. Rosen, and R. S. Thies. Heart specific expression of mouse BMP-10 a novel member of the TGF-beta superfamily. *Mech. Dev.*, 80(2):181–184, February 1999.

[14] Nicolas Ricard, Delphine Ciais, Sandrine Levet, Mariela Subileau, Christine Mallet, Teresa A. Zimmers, Se-Jin Lee, Marie Bidart, Jean-Jacques Feige, and Sabine Bailly. BMP9 and BMP10 are critical for postnatal retinal vascular remodeling. *Blood*, 119(25):6162–6171, June 2012.

[15] Hanying Chen, Shu Shi, Lourdes Acosta, Weiming Li, Jonathan Lu, Shideng Bao, Zhuang Chen, Zuocheng Yang, Michael D. Schneider, Kenneth R. Chien, Simon J. Conway, Mervin C. Yoder, Laura S. Haneline, Diego Franco, and Weinian Shou. BMP10 is essential for maintaining cardiac growth during murine cardiogenesis. *Development*, 131(9):2219–2231, May 2004.

[16] Laurent David, Christine Mallet, Michelle Keramidas, Noël Lamandé, Jean-Marie Gasc, Sophie Dupuis-Girod, Henri Plauchu, Jean-Jacques Feige, and Sabine Bailly. Bone morphogenetic protein-9 is a circulating vascular quiescence factor. *Circ. Res.*, 102(8):914–922, April 2008.

[17] Sandrine Levet, Marie Ouarné, Delphine Ciais, Charles Coutton, Mariela Subileau, Christine Mallet, Nicolas Ricard, Marie Bidart, Thierry Debillon, Francesca Faravelli, Caroline Rooryck, Jean-Jacques Feige, Emmanuelle Tillet, and Sabine Bailly. BMP9 and BMP10 are necessary for proper closure of the ductus arteriosus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 112(25):E3207–3215, June 2015.

[18] Hao Chen, John Brady Ridgway, Tao Sai, Joyce Lai, Søren Warming, Hanying Chen, Merone Roose-Girma, Gu Zhang, Weinian Shou, and Minhong Yan. Context-dependent signaling defines roles of BMP9 and BMP10 in embryonic and postnatal development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 110(29):11887–11892, July 2013.

[19] Sandrine Levet, Delphine Ciais, Galina Merdzhanova, Christine Mallet, Teresa A. Zimmers, Se-Jin Lee, Fabrice P. Navarro, Isabelle Texier, Jean-Jacques Feige, Sabine Bailly, and Daniel Vittet. Bone morphogenetic protein 9 (BMP9) controls lymphatic vessel maturation and valve formation. *Blood*, 122(4):598–607, July 2013.

[20] Yasuhiro Yoshimatsu, Yulia G. Lee, Yuichi Akatsu, Luna Taguchi, Hiroshi I. Suzuki, Sara I. Cunha, Kazuichi Maruyama, Yuka Suzuki, Tomoko Yamazaki, Akihiro Katsura, S. Paul Oh, Teresa A. Zimmers, Se-Jin Lee, Kristian Pietras, Gou Young Koh, Kohei Miyazono, and Tetsuro Watabe. Bone morphogenetic protein-9 inhibits lymphatic vessel formation via activin receptor-like kinase 1 during development and cancer progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 110(47):18940–18945, November 2013.

[21] Li-Zhi Mi, Christopher T. Brown, Yijie Gao, Yuan Tian, Viet Q. Le, Thomas Walz, and Timothy A. Springer. Structure of bone morphogenetic protein 9 procomplex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 112(12):3710–3715, March 2015.

[22] Gerhard Sengle, Robert N. Ono, Takako Sasaki, and Lynn Y. Sakai. Prodomains of transforming growth factor beta (TGFbeta) superfamily members specify different functions: extracellular matrix interactions and growth factor bioavailability. *J. Biol. Chem.*, 286(7):5087–5099, February 2011.

[23] Minlong Shi, Jianghai Zhu, Rui Wang, Xing Chen, Lizhi Mi, Thomas Walz, and Timothy A. Springer. Latent TGF-β structure and activation. *Nature*, 474(7351):343–349, June 2011.

[24] Neil M. Wolfman, Alexandra C. McPherron, William N. Pappano, Monique V. Davies, Kening Song, Kathleen N. Tomkinson, Jill F. Wright, Liz Zhao, Suzanne M. Sebald, Daniel S. Greenspan, and Se-Jin Lee. Activation of latent myostatin by the BMP-1/tolloid family of metalloproteinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100(26):15842–15846, December 2003.

[25] He Jiang, Richard M. Salmon, Paul D. Upton, Zhenquan Wei, Aleksandra Lawera, Anthony P. Davenport, Nicholas W. Morrell, and Wei Li. The Prodomain-bound Form of Bone Morphogenetic Protein 10 Is Biologically Active on Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.*, 291(6):2954–2966, February 2016.

[26] Itaru Imayoshi, Toshiyuki Ohtsuka, Daniel Metzger, Pierre Chambon, and Ryoichiro Kageyama. Temporal regulation of Cre recombinase activity in neural stem cells. *Genesis*, 44(5):233–238, May 2006.

[27] Senem Aykul and Erik Martinez-Hackert. Transforming Growth Factor-β Family Ligands Can Function as Antagonists by Competing for Type II Receptor Binding. *J. Biol. Chem.*, 291(20):10792–10804, May 2016.

[28] Sharon A. Townson, Erik Martinez-Hackert, Chloe Greppi, Patricia Lowden, Dianne Sako, June Liu, Jeffrey A. Ucran, Katia Liharska, Kathryn W. Underwood, Jasbir Seehra, Ravindra Kumar, and Asya V. Grinberg. Specificity and structure of a high affinity activin receptor-like kinase 1 (ALK1) signaling complex. *J. Biol. Chem.*, 287(33):27313–27325, August 2012.

[29] Felicia Hernandez, Robert Huether, Lester Carter, Tami Johnston, Jennifer Thompson, James R. Gossage, Elizabeth Chao, and Aaron M. Elliott. Mutations in RASA1 and GDF2 identified in patients with clinical features of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Hum Genome Var*, 2:15040, 2015.

[30] Jing Guo and Gang Wu. The signaling and functions of heterodimeric bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 23(1-2):61–67, April 2012.

[31] Michael B. O'Connor, David Umulis, Hans G. Othmer, and Seth S. Blair. Shaping BMP morphogen gradients in the Drosophila embryo and pupal wing. *Development*, 133(2):183–193, January 2006.

[32] Osamu Shimmi, David Umulis, Hans Othmer, and Michael B. O'Connor. Facilitated transport of a Dpp/Scw heterodimer by Sog/Tsg leads to robust patterning of the Drosophila blastoderm embryo. *Cell*, 120(6):873–886, March 2005.

[33] Shawn C. Little and Mary C. Mullins. Bone morphogenetic protein heterodimers assemble heteromeric type I receptor complexes to pattern the dorsoventral axis. *Nat. Cell Biol.*, 11(5):637–643, May 2009.

[34] A. Suzuki, E. Kaneko, J. Maeda, and N. Ueno. Mesoderm induction by BMP-4 and -7 heterodimers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 232(1):153–156, March 1997.

[35] Samantha J. Butler and Jane Dodd. A role for BMP heterodimers in roof plate-mediated repulsion of commissural axons. *Neuron*, 38(3):389–401, May 2003.

[36] Christophe Fuerer, M. Cristina Nostro, and Daniel B. Constam. Nodal-Gdf1 heterodimers with bound prodomains enable serum-independent nodal signaling and endoderm differentiation. *J. Biol. Chem.*, 289(25):17854–17871, June 2014.

[37] Chinatsu Tanaka, Rui Sakuma, Tetsuya Nakamura, Hiroshi Hamada, and Yukio Saijoh. Long-range action of Nodal requires interaction with GDF1. *Genes Dev.*, 21(24):3272–3282, December 2007.

[38] David G. Mottershead, Satoshi Sugimura, Sara L. Al-Musawi, Jing-Jie Li, Dulama Richani, Melissa A. White, Georgia A. Martin, Andrew P. Trotta, Lesley J. Ritter, Junyan Shi, Thomas D. Mueller, Craig A. Harrison, and Robert B. Gilchrist. Cumulin, an Oocyte-secreted Heterodimer of the Transforming Growth Factor-β Family, Is a Potent Activator of Granulosa Cells and Improves Oocyte Quality. *J. Biol. Chem.*, 290(39):24007–24020, September 2015.

[39] Jia Peng, Qinglei Li, Karen Wigglesworth, Adithya Rangarajan, Chandramohan Kattamuri, Randall T. Peterson, John J. Eppig, Thomas B. Thompson, and Martin M. Matzuk. Growth differentiation factor 9:bone morphogenetic protein 15 heterodimers are potent regulators of ovarian functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 110(8):E776–785, February 2013.

[40] Ines Wagner, Heng Wang, Philipp M. Weissert, Werner L. Straube, Anna Shevchenko, Marc Gentzel, Goncalo Brito, Akira Tazaki, Catarina Oliveira, Takuji Sugiura, Andrej Shevchenko, András Simon, David N. Drechsel, and Elly M. Tanaka. Serum Proteases Potentiate BMP-Induced Cell Cycle Re-entry of Dedifferentiating Muscle Cells during Newt Limb Regeneration. *Dev. Cell*, 40(6):608–617.e6, March 2017.

[41] A. Aono, M. Hazama, K. Notoya, S. Taketomi, H. Yamasaki, R. Tsukuda, S. Sasaki, and Y. Fujisawa. Potent ectopic bone-inducing activity of bone morphogenetic protein-4/7 heterodimer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 210(3):670–677, May 1995.

[42] Michael J. Isaacs, Yasuhiko Kawakami, George P. Allendorph, Byung-Hak Yoon, Juan Carlos Izpisua Belmonte, and Senyon Choe. Bone morphogenetic protein-2 and -6 heterodimer illustrates the nature of ligand-receptor assembly. *Mol. Endocrinol.*, 24(7):1469–1477, July 2010.

[43] D. I. Israel, J. Nove, K. M. Kerns, R. J. Kaufman, V. Rosen, K. A. Cox, and J. M. Wozney. Heterodimeric bone morphogenetic proteins show enhanced activity in vitro and in vivo. *Growth Factors*, 13(3-4):291–300, 1996.

[44] Elvira Valera, Michael J. Isaacs, Yasuhiko Kawakami, Juan Carlos Izpisúa Belmonte, and Senyon Choe. BMP-2/6 heterodimer is more effective than BMP-2 or BMP-6 homodimers as inductor of differentiation of human embryonic stem cells. *PLoS ONE*, 5(6):e11167, June 2010.

[45] Pardeep Mahlawat, Udayar Ilangovan, Tanuka Biswas, Lu-Zhe Sun, and Andrew P. Hinck. Structure of the Alk1 extracellular domain and characterization of its bone morphogenetic protein (BMP) binding properties. *Biochemistry*, 51(32):6328–6341, August 2012.

[46] Blanca Herrera, Maarten van Dinther, Peter Ten Dijke, and Gareth J. Inman. Autocrine bone morphogenetic protein-9 signals through activin receptor-like kinase-2/Smad1/Smad4 to promote ovarian cancer cell proliferation. *Cancer Res.*, 69(24):9254–9262, December 2009.

[47] Jinyong Luo, Min Tang, Jiayi Huang, Bai-Cheng He, Jian-Li Gao, Liang Chen, Guo-Wei Zuo, Wenli Zhang, Qing Luo, Qiong Shi, Bing-Qiang Zhang, Yang Bi, Xiaoji Luo, Wei Jiang, Yuxi Su, Jikun Shen, Stephanie H. Kim, Enyi Huang, Yanhong Gao, Jian-Zhong Zhou, Ke Yang, Hue H. Luu, Xiaochuan Pan, Rex C. Haydon, Zhong-Liang Deng, and Tong-Chuan He. TGFbeta/BMP type I receptors ALK1 and ALK2 are essential for BMP9-induced osteogenic signaling in mesenchymal stem cells. *J. Biol. Chem.*, 285(38):29588–29598, September 2010.

[48] Sabine Mazerbourg, Katrin Sangkuhl, Ching-Wei Luo, Satoko Sudo, Cynthia Klein, and Aaron J. W. Hsueh. Identification of receptors and signaling pathways for orphan bone morphogenetic protein/growth differentiation factor ligands based on genomic analyses. *J. Biol. Chem.*, 280(37):32122–32132, September 2005.

[49] Heon-Woo Lee, Diana C. Chong, Roxana Ola, William P. Dunworth, Stryder Meadows, Jun Ka, Vesa M. Kaartinen, Yibing Qyang, Ondine Cleaver, Victoria L. Bautch, Anne Eichmann, and Suk-Won Jin. Alk2/ACVR1 and Alk3/BMPR1a Provide Essential Function for Bone Morphogenetic Protein–Induced Retinal Angiogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 37(4):657–663, April 2017.

[50] Osamu Shimmi, Amy Ralston, Seth S. Blair, and Michael B. O'Connor. The crossveinless gene encodes a new member of the Twisted gastrulation family of BMP-binding proteins which, with Short gastrulation, promotes BMP signaling in the crossveins of the Drosophila wing. *Dev. Biol.*, 282(1):70–83, June 2005.

[51] A. F. Miller, S. A. Harvey, R. S. Thies, and M. S. Olson. Bone morphogenetic protein-9. An autocrine/paracrine cytokine in the liver. *J. Biol. Chem.*, 275(24):17937–17945, June 2000.

[52] Katja Breitkopf-Heinlein, Christoph Meyer, Courtney König, Haristi Gaitantzi, Annalisa Addante, Maria Thomas, Eliza Wiercinska, Chen Cai, Qi Li, Fengqi Wan, Claus Hellerbrand, Nektarios A. Valous, Maximilian Hahnel, Christian Ehlting, Johannes G. Bode, Stephanie Müller-Bohl, Ursula Klingmüller, Jutta Altenöder, Iryna Ilkavets, Marie-José Goumans, Lukas J. A. C. Hawinkels, Se-Jin Lee, Matthias Wieland, Carolin Mogler, Matthias P. Ebert, Blanca Herrera, Hellmut Augustin, Aránzazu Sánchez, Steven Dooley, and Peter Ten Dijke. BMP-9 interferes with liver regeneration and promotes liver fibrosis. *Gut*, 66(5):939–954, May 2017.

[53] Judith M. Neugebauer, Sunjong Kwon, Hyung-Seok Kim, Nathan Donley, Anup Tilak, Shailaja Sopory, and Jan L. Christian. The prodomain of BMP4 is necessary and sufficient to generate stable BMP4/7 heterodimers with enhanced bioactivity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 112(18):E2307–2316, May 2015.

[54] Wei Zhu, Jaehon Kim, Christina Cheng, Bernard A. Rawlins, Oheneba Boachie-Adjei, Ronald G. Crystal, and Chisa Hidaka. Noggin regulation of bone morphogenetic protein (BMP) 2/7 heterodimer activity in vitro. *Bone*, 39(1):61–71, July 2006.

[55] Mihaela Serpe, Amy Ralston, Seth S. Blair, and Michael B. O'Connor. Matching catalytic activity to developmental function: tolloid-related processes Sog in order to help specify the posterior crossvein in the Drosophila wing. *Development*, 132(11):2645–2656, June 2005.

Fig. 1

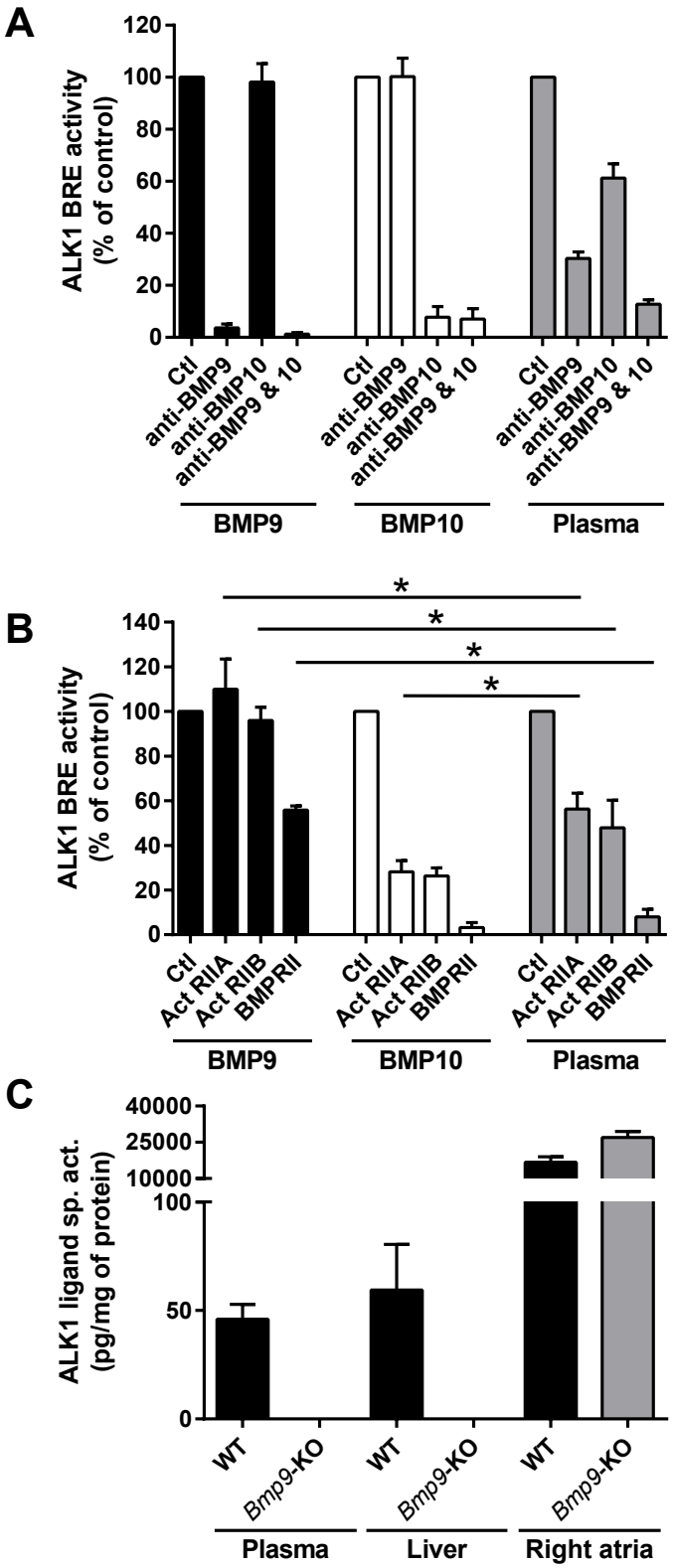


Figure 1: **Plasmatic ALK1-stimulating (BRE) activity is distinct from mature BMP9**

(A-B), Inhibition of ALK1 BMP activity using blocking anti-BMP9 or -10 antibodies (A) or soluble type II receptors (B). The assay measures active BMP with a standard BRE luciferase assay on 3T3 cells transfected with ALK1. Monoclonal antibodies (anti-BMP9, Genentech 8512, 0.1µg/mL; anti-BMP10 clone 13C11, 1µg/mL) or soluble receptor II (ActRIIA-Fc, ActRIIB-Fc, BMPRII-Fc, 0.5 µg/mL each) were mixed with 50 pg/mL of ligands (BMP9 or BMP10) or 1% human plasma 1h prior to stimulation on cells. The results are expressed as a percentage of control values without inhibitory molecules. Data represent means ± SEM of 4 to 6 independent experiments. * p value <0,05 (Mann Whitney).

(C) ALK1-stimulating BMP activity from mouse tissue extracts from wild type (WT) or *Bmp9*-KO mice. Values represent the specific activities expressed as pg of active BMP/mg of total protein. Recombinant BMP9 was used as standard. Results are the mean values ± SEM obtained of 6 to 14 mice analyzed in duplicates.

Fig. 2

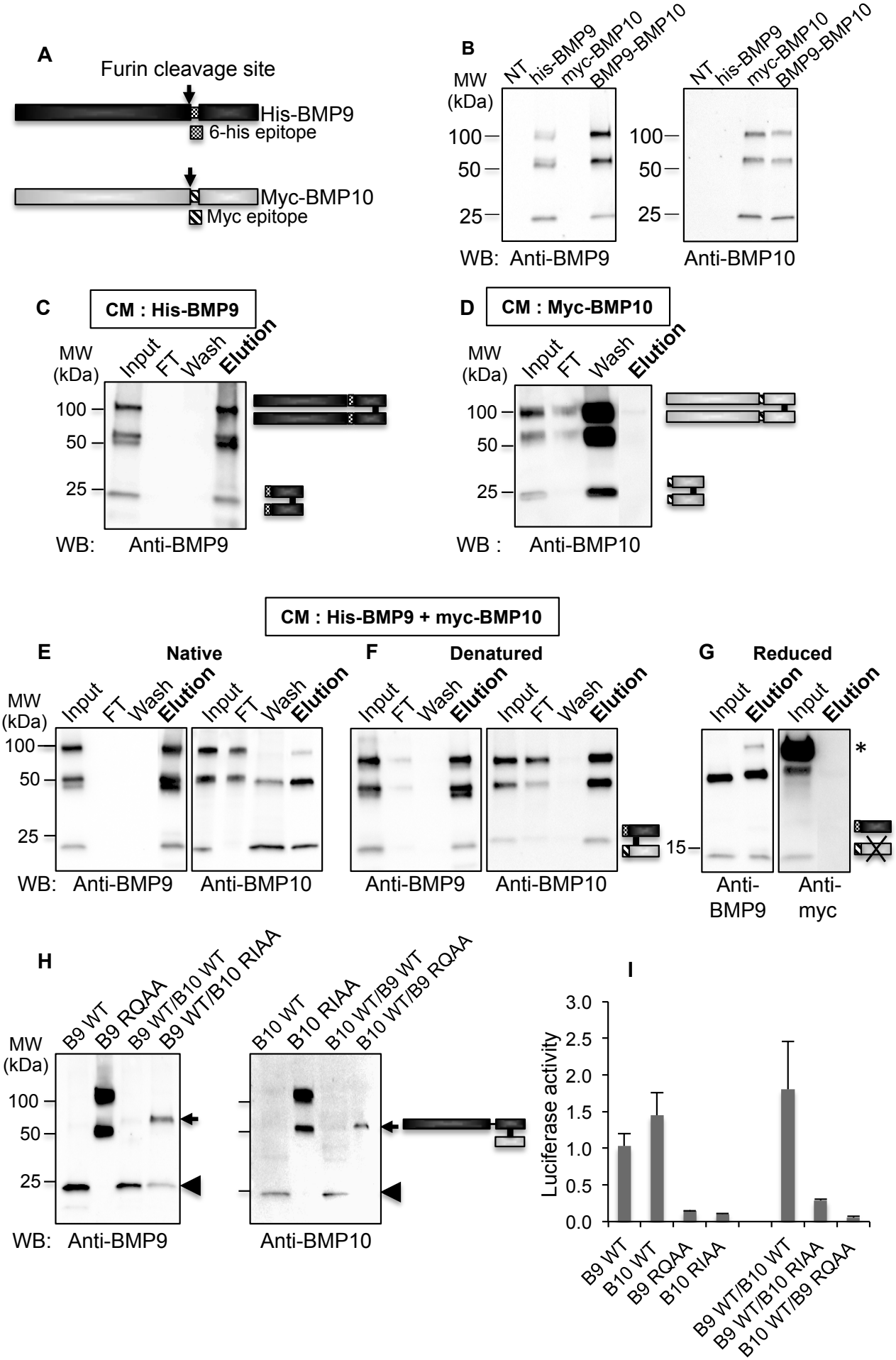

A
Furin cleavage site
His-BMP9
6-his epitope
Myc-BMP10
Myc epitope
B
NT
his-BMP9
myc-BMP10
BMP9-BMP10
MW (kDa)
100
50
25
WB: Anti-BMP9
Anti-BMP10
C
CM : His-BMP9
Input
FT
Wash
Elution
WB: Anti-BMP9
D
CM : Myc-BMP10
WB : Anti-BMP10
CM : His-BMP9 + myc-BMP10
E
Native
F
Denatured
G
Reduced
15
*
Anti-BMP9
Anti-myc
H
B9 WT
B9 RQAA
B9 WT/B10 WT
B9 WT/B10 RIAA
B10 WT
B10 RIAA
B10 WT/B9 WT
B10 WT/B9 RQAA
I
Luciferase activity
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0

Figure 2: **BMP9 and BMP10 can form a heterodimer in vitro**
(A) Schematic representation of recombinant BMP9 and BMP10 (pro-BMPs), containing respectively a 6-his epitope and a myc epitope downstream of the furin cleavage site. **(B)** Western blot analysis of conditioned medium (CM) from HEK 293-transfected cells. HEK-293 cells were stably transfected with plasmids encoding his-BMP9, myc-BMP10 or both plasmids (indicated BMP9-BMP10). Proteins were detected with antibodies directed against the mature domain of BMP9 or BMP10 as indicated. All samples were run under unreduced conditions. NT: non-transfected cells **(C-G)** Histrap chromatography of CM from cells transfected with (C) his-BMP9, (D) myc-BMP10, (E-G) his-BMP9/myc-BMP10. E: CM applied under native conditions. F: CM denaturated by 8 mol/L urea and heated at 65°C for 20 minutes before being loaded onto the column. G: CM denatured as above, then reduced by DTT and alkylated before loading. CM was applied onto a Histrap column in phosphate buffer pH 8. Flow through (FT) was collected. Columns were washed with 20 mol/L imidazole (wash) and eluted by 200 mol/L imidazole (elution). Fractions were analyzed by western blot with the indicated antibodies under unreduced (C-F) or reduced conditions (G). In G, an antibody recognizing the myc epitope was used as the anti-BMP10 antibody could not detect BMP10 under reduced conditions. Note that the myc antibody gives a strong non-specific band around 100 kDa (*). **(H)** Heterodimerization of a mutant BMP and a wild-type (WT) counterpart. Fully-cleaved mature WT BMP9 and BMP10 have been produced by removing the tag sequence downstream to the furin cleavage site. BMP9 and BMP10 furin cleavage sites have been mutated to create uncleavable sequences, respectively RQAA and RIAA. Wild type and mutant BMPs have been solely transfected (0.5 ng of plasmid in each condition), or co-transfected (0.5 ng of plasmid coding for WT BMP and 1.5 ng of mutant BMP) into HEK 293 cells. CM were analyzed by Western blotting with the indicated antibodies directed against mature BMPs. Arrowheads show the bands corresponding to mature BMPs. Arrows point to a 65kDa band resulting from the dimerization of a wild type BMP and a mutant pro-BMP. **(I)** Dominant negative effect of mutant BMP on ALK1 BRE stimulation. ALK1-transfected 3T3 cells were stimulated with serum-free CM produced like in (H). Values represent relative firefly luciferase normalized to renilla luciferase activity.

Fig. 3

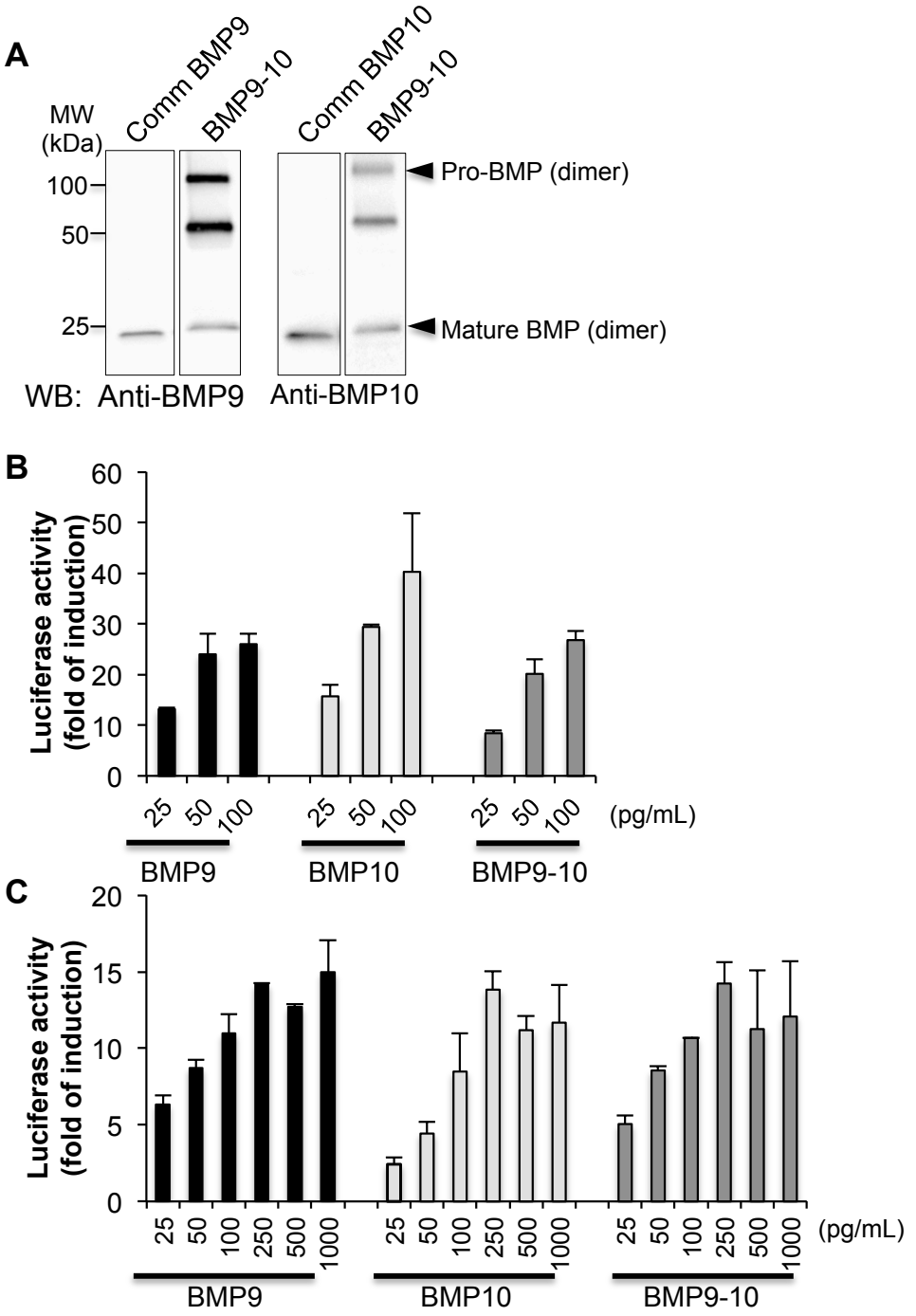


Figure 3**: Purification and activity of recombinant BMP9-10 heterodimer**
(A) Western blot detection of purified BMP9-10 heterodimer. BMP9-10 was purified through a Histrap column followed by anti-myc-agarose column and bound heterodimer was eluted by glycine pH 2 (see Supp. Fig.2). BMP9-10 was quantified using image Lab (Biorad) after Western blotting. Band intensity was measured on the mature 23 kDa active form and compared to known amount of commercial (comm) BMP9 or BMP10. The figure shows lanes with 5 ng of each BMP. (**B, C**) Cellular response of BMP9-10 heterodimer compared to homodimers. (**B)** NIH-3T3 cells were transfected with a standard BRE luciferase assay and stimulated with 25 to 100 pg/mL of commercial BMP9 or 10 (R&D Systems) or purified BMP9-10 heterodimer. (**C)** HUVECs cells were transfected with pGL3(BRE)2-luc and pRL-TK-luc and stimulated with the same ligands in a range from 25 to 1000 pg/mL. Firefly and renilla luciferase expression were quantified 12 to 15 hours later and results are expressed as fold of induction over control unstimulated cells.

Fig. 4

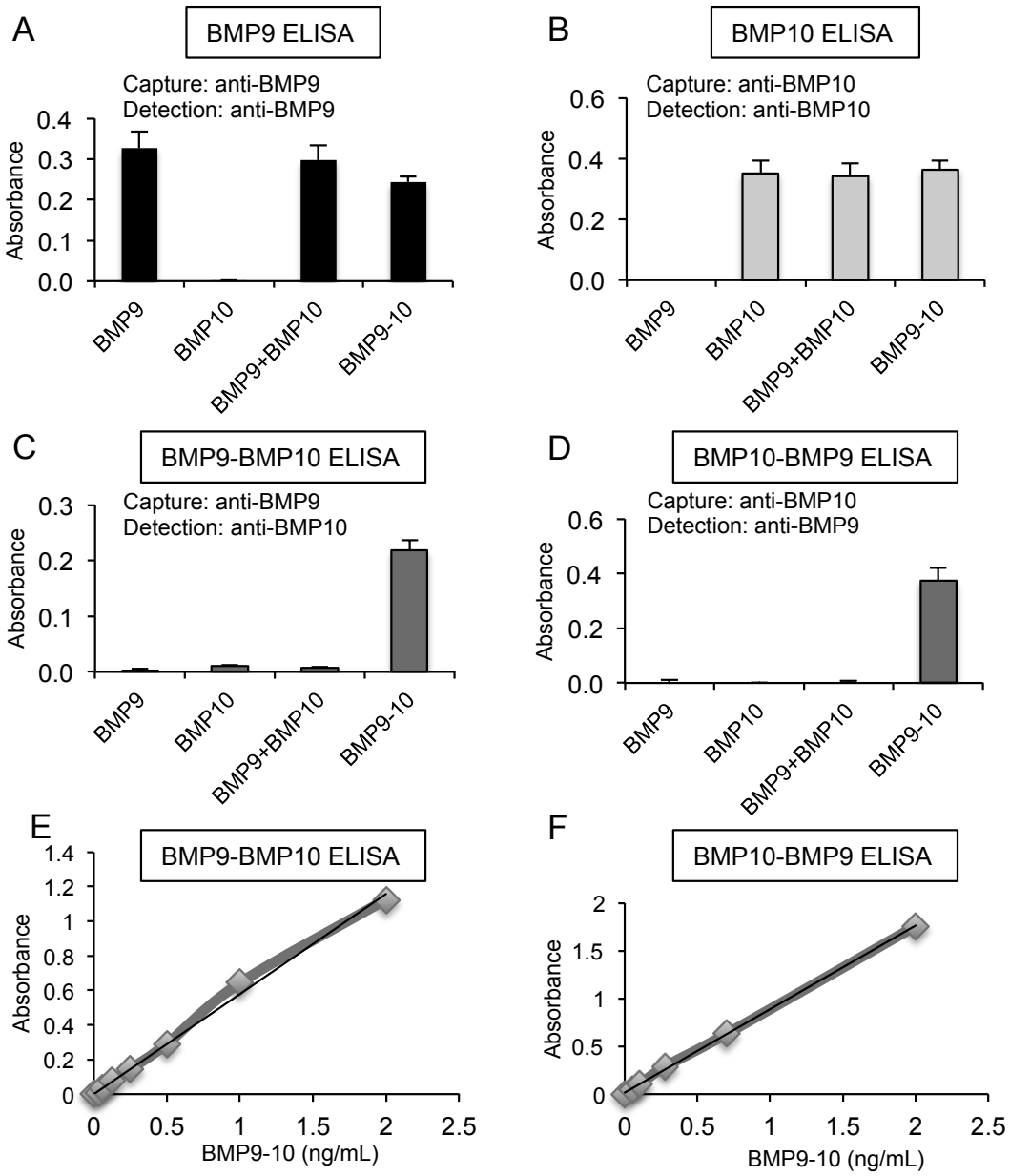


Figure 4: **Development of BMP9-BMP10 cross ELISA for the specific detection of the BMP9-10 heterodimer.**

Conditioned medium with his-BMP9 (BMP9), myc-BMP10 (BMP10), a mixture 1:1 of his-BMP9 and myc-BMP10 (BMP9+BMP10) or BMP9-10 heterodimer were analyzed by the following ELISAs.

(A) Standard BMP9 ELISA with anti-mature BMP9 monoclonal antibody as a capture antibody and anti-mature BMP9 polyclonal biotinylated antibody as a detection antibody **(B)** Commercial ELISA for mature BMP10 (R&D Systems) **(C)** ELISA with anti-mature BMP10 monoclonal antibody (clone 13C11) as a capture antibody and anti-mature BMP9 polyclonal biotinylated antibody as a detection antibody **(D)** ELISA with anti-mature BMP9 monoclonal antibody as a capture antibody and anti-mature BMP10 biotinylated (from the commercial BMP10 ELISA kit, R&D Systems). **(E-F)** standard curve with purified recombinant BMP9-10 heterodimer (0.03-2 ng/mL) obtained with the BMP9-BMP10 ELISA (E) or the BMP10-BMP9 ELISA (F).

Fig. 5

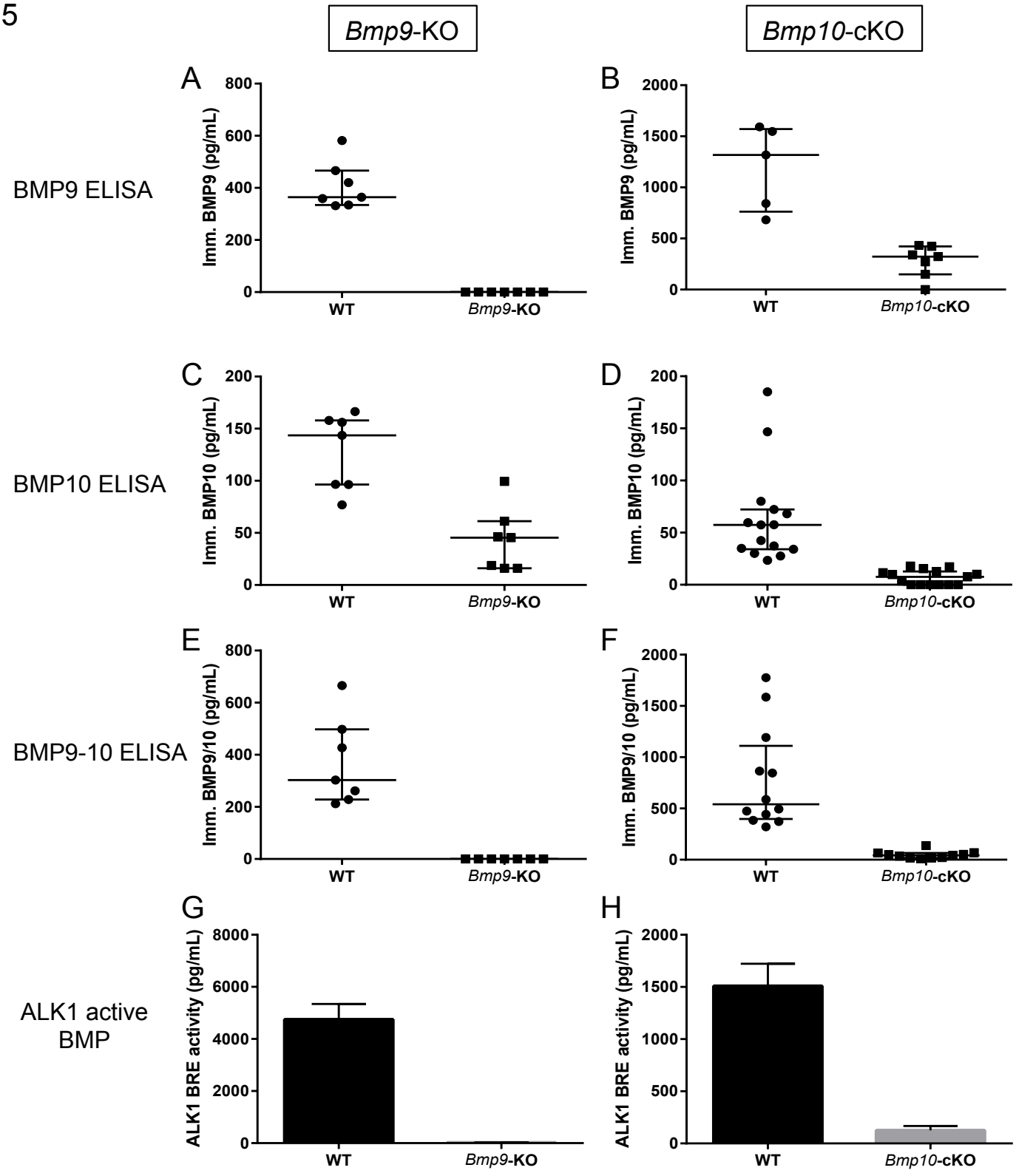


Figure 5: BMP9-10 heterodimer is present in mouse plasma and is the only active ALK1-stimulating form

(A-F) ELISA measurements of circulating BMP9, BMP10 or BMP9-10 heterodimer in plasma from WT, *Bmp9*-KO mice (left panels) or *Bmp10*-cKO mice (right panels). ELISA used are indicated on the left. BMP9-10 ELISA was realized using a capture antibody against mature BMP9 and a biotinylated detection antibody against BMP10. Recombinant BMP9 and BMP10 (R&D Systems), or purified BMP9-10 heterodimer were used as standard. n=5 to 15 mice analyzed in duplicates. Results are presented as the median ± interquartile range. Imm. BMP : Immune reactive BMP **(G, H)** ALK1 BRE activity of plasma from WT, *Bmp9*-KO mice (G) and *Bmp10*-cKO mice (H) using a BRE assay on 3T3 transfected cells (recombinant BMP9 as standard). Values are mean ± SEM. n=8 to 15.

Fig.6

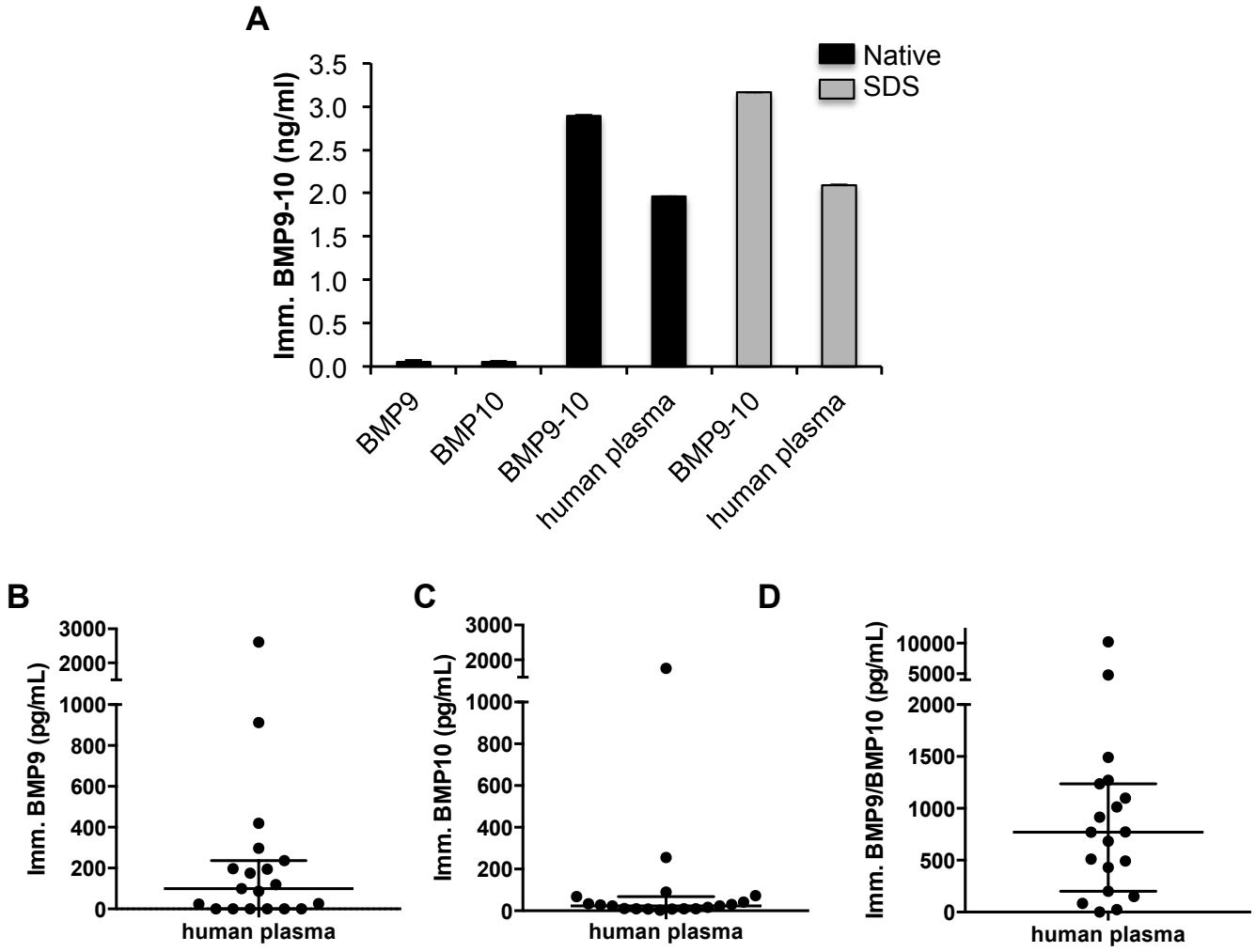


Figure 6: Presence and quantification of BMP9-10 heterodimer in human plasma
(A) Detection of BMP9-10 heterodimer in human plasma (pool of donors) with a cross ELISA using capture anti-BMP10 antibody (clone 13C11) and biotinylated anti-BMP9 for the detection. Black bars: samples were diluted in 1% triton X-100. Grey bars: heterodimer BMP9-10 and human plasma were denaturated by 1% SDS prior to ELISA measurement. BMP9, BMP10: commercial recombinant proteins. BMP9-10: purified recombinant heterodimer. Values are the mean ± SD of duplicates of one representative experiment **(B-D)** Quantification of immune-reactive BMP9 (B), BMP10 (C) and BMP9-10 heterodimer (D) in 19 human plasma as described in Fig.4. Results are presented as the median ± interquartile range.

Fig.7

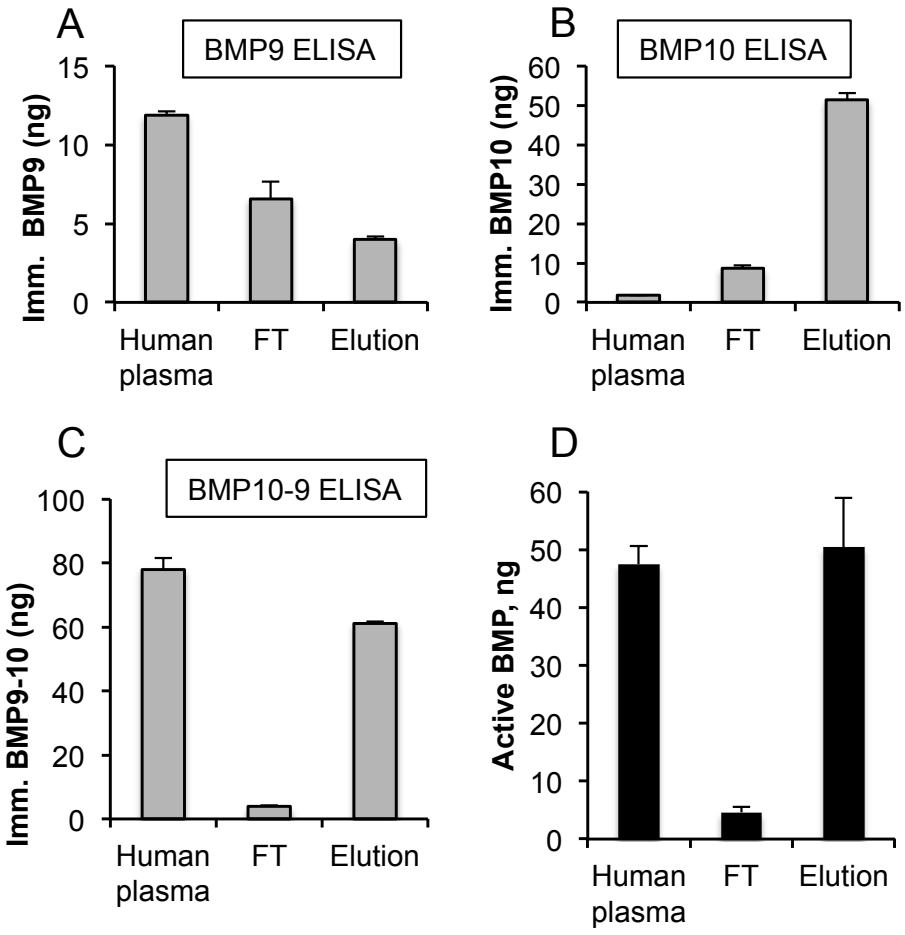


Figure 7: Purification and activity of BMP9-10 heterodimer from human plasma
BMP9-10 heterodimer was purified by affinity chromatography on an anti-BMP10 column: 10 mL of a pool of human plasma was applied to an anti-BMP10 column, and eluted by glycine pH 2.7. **(A-C)** Plasma, flow through (FT) and elution were quantified by ELISA to detect mature BMP9 (A) mature BMP10 (B) or BMP9-10 heterodimer (C) (Capture anti-BMP10/Detection anti-BMP9) **(D)** ALK1 BRE activity of the fractions was measured with a standard "BRE luciferase assay". Recombinant BMP9 (R&D Systems) was used as standard. Axes represent the total amount of BMP9, BMP10 or BMP9-10 or active BMP in each fraction. Values are the mean ± SD of duplicate determinations by ELISA or BRE-luc assays from one representative experiment out of 3.

Fig. 8

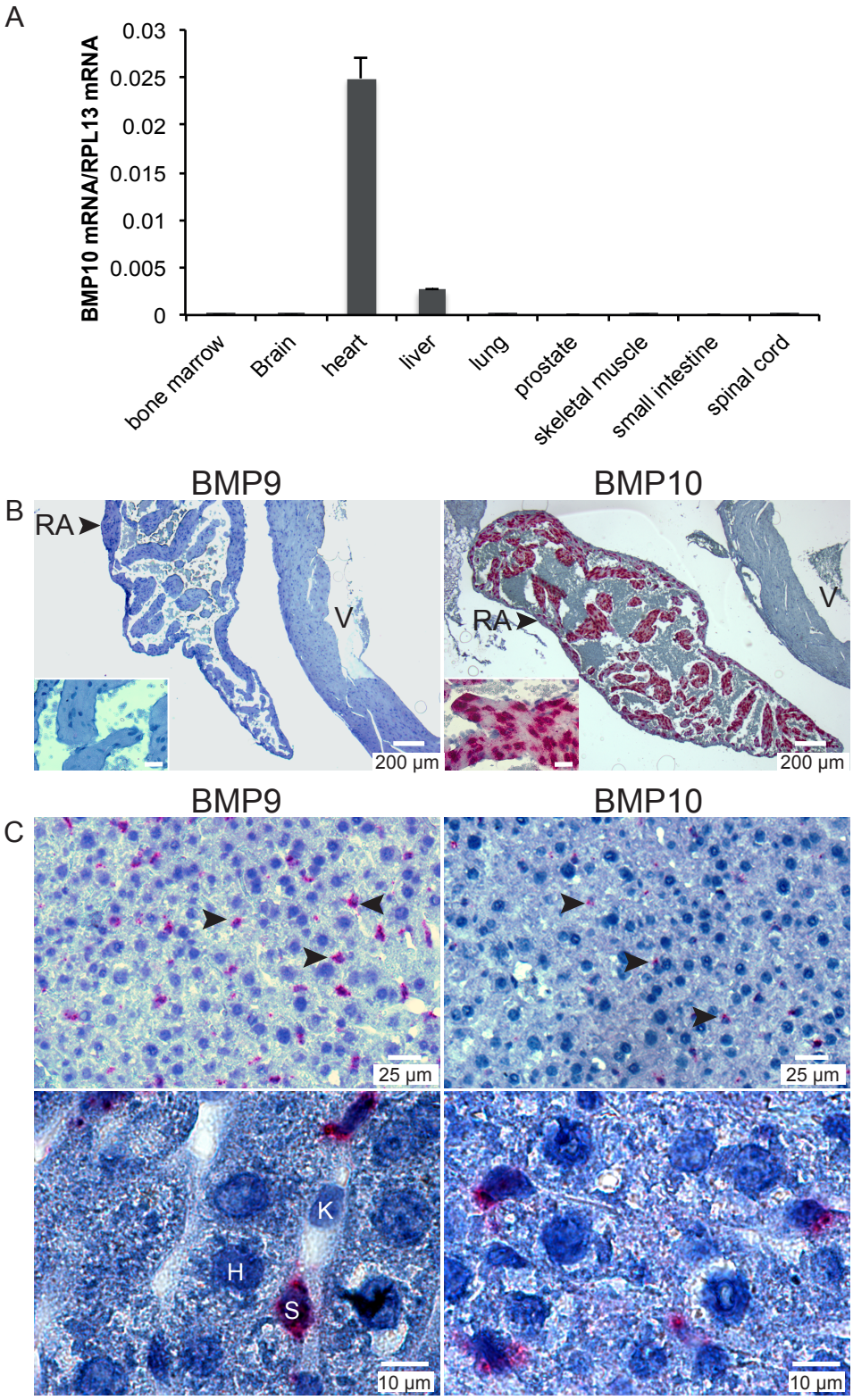


Figure 8: Hepatic stellate cells synthesize both BMP9 and BMP10
(A) BMP10 mRNA expression in human tissues (Clontech, 9 tissues out of 20 analyzed) determined by quantitative RT-PCR. Results are shown as the mean ± SD of BMP10 mRNA level normalized to RPL13 mRNA levels. (B-C) Localization of BMP9 or BMP10 mRNA by RNAscope on mouse adult heart sections (B) or liver sections (C). Paraffin-embedded sections were labeled with BMP9 probe (left panels) or BMP10 probe (right panel) revealed by fast-red pink staining and counter-stained with hematoxylin. In (B): RA: Right atria, V: Ventricule. Inserts show higher magnification of the right atria (scale bar, 25 µm). In (C) Upper panels show low magnification with several positive pink cells (arrowheads). Lower panels are high magnification showing hepatocytes (H), a Kupffer cell (K), lining the wall of a sinusoid and stellate cells (S) between hepatocytes and sinusoids.
Note the pink labeling of stellate cells.

Supplemental material

Detailled methods

BMP9 and BMP10 expressions

Human full-length BMP9 and BMP10 were respectively cloned into pCEP4 vector or pcDNA3.1 zeo vector (ThermoFischer Scientific). An additional sequence was inserted between the prodomain and the mature region for specific tagging of each BMP: a 6-histidine motif for BMP9 or a myc epitope for BMP10. BMPs without tags were also generated and used as templates to create mutants in the furin cleavage site of each BMPs through site-directed mutagenesis using the Stratagene QuickChange kit (BMP9: R317Q, $K^{318}A$, $K^{319}A$; BMP10: $R^{315}A$, $R^{316}A$). All vectors and mutants were verified by DNA sequencing.

Constructs (BMP9 and BMP10, either solely or together) were transfected in HEK 293-EBNA cells using lipofectamine 2000. Transfected cells were selected using the appropriate antibiotics (300 μg/mL of hygromycin for PCEP4-BMP9, 200 μg/mL of zeocin for pcDNA3-BMP10) and screened for protein expression by western blotting of serum-free conditioned medium (CM) using anti-BMP9 (kind gift of Dr Yan, Genentech, South San Francisco, CA, USA) or anti-BMP10 (mAB2926, R&D Systems, Abingdon, UK).

For purification of BMP9-10 heterodimer, 200-500 mL of CM were dialyzed against 50 mmol/L sodium phosphate buffer, pH 8.0 and applied onto a Histrap column (GE Healthcare, Äkta purification system). Columns were washed with 10 and 20 mmol/L imidazole and eluted with 200 mmol/L imidazole in phosphate buffer. In some cases, CM was first denaturated by dialysis against 8 mol/L urea, or alternatively by 1% SDS, followed by 20 minutes heating at 65°C. CM could even undergo a further reduction step with 10 mmol/L DTT followed by alkylation of reduced cysteines by 25 mmol/L iodoacetamide. DTT was then removed by dialysis before loading CM onto the column.

Histrap's eluates were further purified by affinity chromatography on anti-c-myc-agarose (ThermoFischer Scientific). Sample were loaded in PBS Tween 20 0.1%, extensively washed with the same buffer and sequentially eluted by glycine 0.1 mol/L pH 3 then pH 2. BMP9 and BMP10 were quantified in all fractions by western blot with anti-mature BMP9 (Genentech) and BMP10 (clone 13C11, home-made monoclonal antibody previously used in 16) using commercial recombinant BMP9 or -10 (R&D systems) as standard (1-10 ng/lane). Band intensities were quantified using Image Lab software (Biorad).

BMP10 purification from human plasma

Anti-BMP10 antibody (clone 13C11) was coupled to NHS-activated Sepharose (2mg/mL of resin) using standard protocols (GE Healthcare). 10-30 mL of human plasma (Biopredic International, pool of donors) was diluted 1:1 in PBS and applied to the column with a Äkta chromatography system. The column was washed with phosphate buffer containing 0.5 mol/L NaCl, and eluted first with high salt (2 mol/L NaCl) in phosphate buffer followed by acidic elution

(glycine-HCl pH 2.7).

Mouse tissue extracts

Liver, right atria were retrieved from 1-2 months-old euthanized mice. Tissues were homogenized in 50 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 0.5 mol/L NaCl and a cocktail of proteases inhibitors (Sigma) with a MagNA Lyser (Roche). Liver and atria extracts were used at 200 μg protein/mL and 2 μg protein/mL, repectively, for BMP activity measurements.

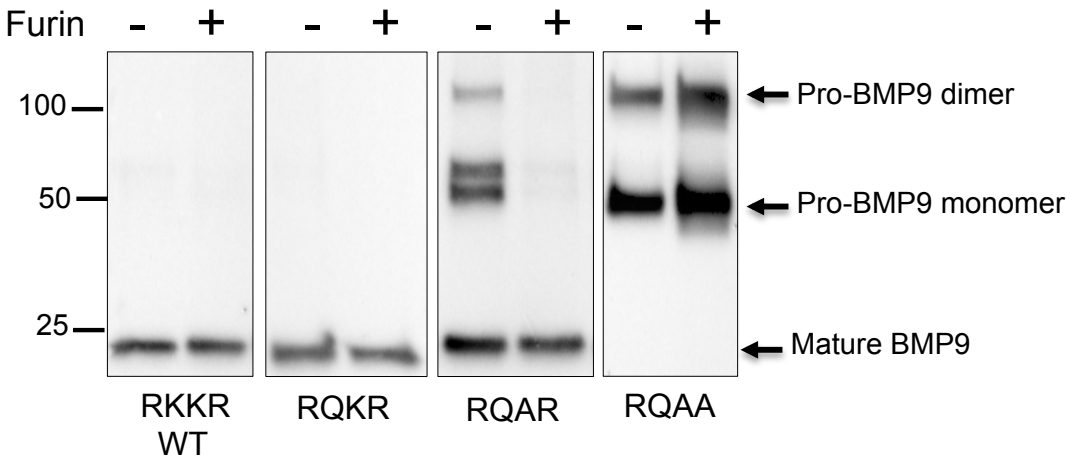
Cell culture, transfection and dual luciferase activity assay

NIH-3T3 cells were transfected in Opti-MEM (Life Technologies) using lipofectamine with a mixture of (1) the reporter plasmid pGL3(BRE)2-luc encoding firefly luciferase downstream of a BMP response element (200 ng), (2) pRL-TK luc encoding Renilla luciferase (Promega, 20 ng), (3) a plasmid encoding human ALK1 (10 ng). Four hours after transfection, cells were stimulated overnight with the indicated ligands and luciferase activities were measured.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

96-well microplate were coated with the capture antibody: MAB3209 (R&D Systems) for BMP9, 13C11 for BMP10 and incubated overnight at room temperature. After blocking with 5% BSA in PBS, samples were diluted in PBS containing 1% BSA, 0.1% Tween-20, added into the wells and incubated for 2 hours at room temperature. Alternatively, plasma samples were diluted in PBS, 0.05% Tween-20, 0.5% Triton X-100. Biotinylated detection antibodies (anti mature BMP9: BAF3209, R&D Systems; anti mature BMP10: DuoSet R&D Systems, DY2926) were incubated for 2 hours at room temperature. Plates were then revealed and read at 450 nm.

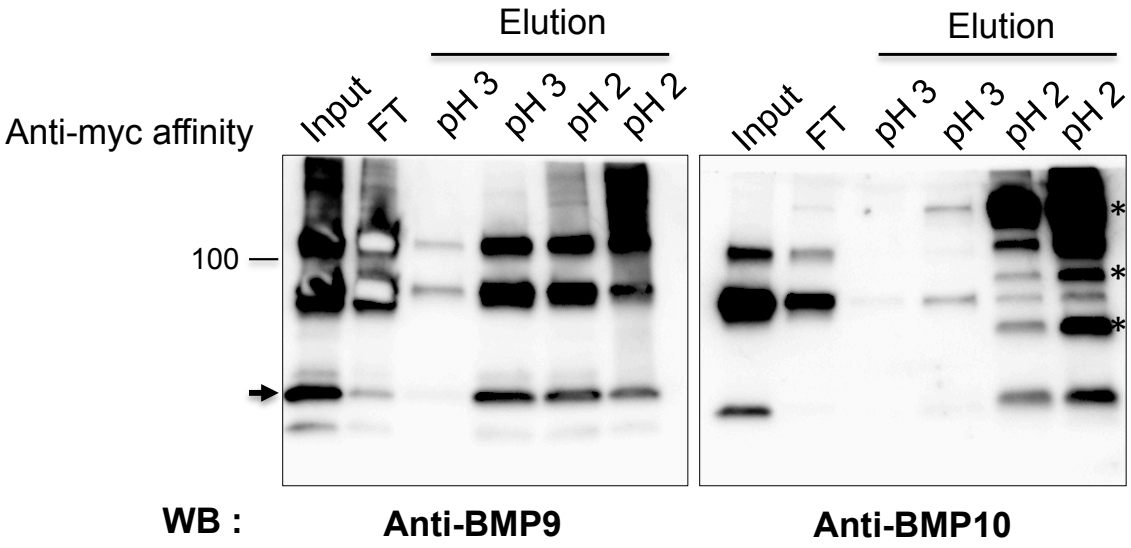
Supplemental figure 1



Supp Fig. 1: BMP9 processing in mutants of the furin cleavage site

HEK 293 cells were transfected with PCEP4-BMP9 either solely (-) or together with a plasmid encoding furin (+) in a 2:1 ratio. BMP9 WT sequence (R^{316}KKR) was mutated to RQKR, RQAR, or RQAA as indicated. Conditioned media were analyzed by immunoblotting with anti-BMP9 antibodies. Single mutation of K317Q (RQKR) did not hamper BMP9 processing. RQAR mutant was incompletely processed, although overexpression of furin allowed complete cleavage. RQAA mutant could not be processed, even when furin was overexpressed. The 50 kDa band in RQAA or RQAR samples likely corresponds to monomeric BMP9. The additional 65 kDa band visible in RQAR sample is believed to be due to a processing on only one member of the dimer.

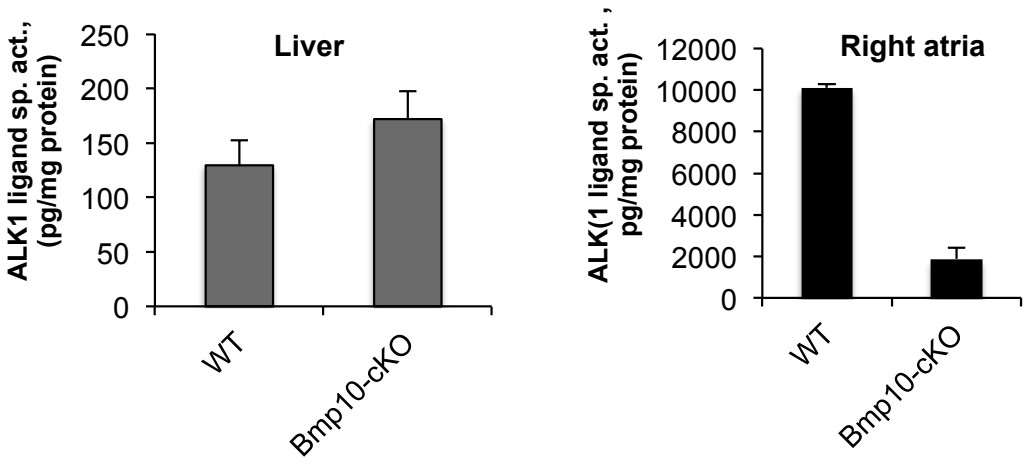
Supplemental figure 2



Supp. Fig.2 : purification of BMP9-10 heterodimer by affinity chromatography

CM from his-BMP9/myc-BMP10 transfected cells was first applied to a histrap column as shown on Fig. 2E. The 200 mmol/L imidazole eluate (Input) was then further purified on a myc antibody column and eluted with glycine pH 3 (first two fractions) followed by glycine pH 2 (next two fractions). Fractions were analyzed by Western blotting with the indicated antibodies. FT : Flow through. Arrow points to the 23 kDa band corresponding to mature BMP. Additional bands in pH 2 eluates, on the right panel (*) panel are likely due to mouse IgG (anti-myc antibodies) released from the column during elution. These IgG are not visible on the left panel (anti-BMP9) because anti-BMP9 antibody is revealed with an anti-human IgG instead of anti-mouse IgG secondary antibody.

Supplemental Fig. 3



Supp. figure 3: Conditional knock-down of *Bmp10* did not affect the BMP activity of the liver but strongly impaired right atria's activity

ALK1-stimulating BMP activity from mouse tissue extracts was measured with a standard BRE assay with respectively 200 µg/mL and 2 µg/mL of total protein for the liver and the atria. Values represent the specific activities expressed as pg of active BMP/mg of protein and are the mean of 3 mice analyzed in duplicates ± SD.

Résumé

ALK1 (Actlivin receptor-Like Kinase 1) est un récepteur exprimé spécifiquement sur les cellules endothéliales. ALK1 possède deux ligands de haute affinité BMP9 (Bone Morphogenic Protein) et BMP10. Cette voie de signalisation joue des rôles cruciaux dans l'angiogenèse et la lymphangiogenèse qui sont des processus critiques dans le développement mais aussi le cancer. Ainsi, l'objectif de cette thèse était de caractériser les fonctions de BMP9 et BMP10 dans le développement vasculaire physiologique et tumoral à l'aide de souris invalidées pour ces deux facteurs.

Nous avons montré que BMP9 et BMP10 sont essentiels à la fermeture du canal artériel. Ce vaisseau permet de dévier le sang hors des poumons fœtaux non fonctionnels et sa fermeture au moment de la naissance est nécessaire à la survie postnatale. L'absence de BMP9 et BMP10 mène à une réouverture du canal artériel chez le souriceau du fait de problèmes de remodelage. Chez l'Homme, une région critique contenant *Bmp10* peut être corrélée à des problèmes de fermeture du canal artériel.

Des essais cliniques ciblant ALK1 dans le traitement du cancer sont en cours du fait de son implication dans l'angiogenèse. Néanmoins, les rôles spécifiques de BMP9, BMP10 et ALK1 dans le cancer sont encore mal connus. Nous avons montré que BMP10 n'est pas impliqué dans la tumorigenèse mammaire au contraire de BMP9 qui agit comme un facteur de quiescence et de maturation dans l'angiogenèse tumorale. Ainsi, il serait plus intéressant de cibler spécifiquement BMP9 plutôt qu'ALK1 afin d'éviter d'altérer les fonctions physiologiques de BMP10.

Abstract

ALK1 (Actlivin receptor-Like Kinase 1) is a receptor specifically expressed at the surface of endothelial cells. BMP9 (Bone Morphogenic Protein) and BMP10 are the high affinity ligands of ALK1. This pathway has been proved to play important roles in angiogenesis and lymphangiogenesis which are critical processes in development as well as in cancer. Thus, the purpose of my PhD was to characterize BMP9 and BMP10 functions in physiological and tumoral vascular development using mice invalidated for those proteins.

We show that BMP9 and BMP10 are essentials to ductus arteriosus closure, a shunt allowing blood to avoid inoperative fetal lungs. Its closure is mandatory to survival after birth. Loss of BMP9 and BMP10 leads to ductus arteriosus reopening in mice pups due to remodeling issues. In human, a critical region including *Bmp10* was correlated to patent ductus arteriosus.

Clinical trials targeting ALK1 in cancer treatment are in progress due to its involvment in angiogenesis. However, little is known about the specific roles of BMP9, BMP10 and ALK1 in carcinogenesis. We show that BMP10 is not involved in mammary cancer development while BMP9 acts as a quiescent and maturation factor in tumoral angiogenesis. Thus, it may be more interesting to target only BMP9 instead of ALK1 to avoid interferences with BMP10 physiological functions.