



**HAL**  
open science

# Etude du mécanisme d'action du propranolol dans les hémangiomes infantiles

Priscilla Kaulanjan-Checkmodine

► **To cite this version:**

Priscilla Kaulanjan-Checkmodine. Etude du mécanisme d'action du propranolol dans les hémangiomes infantiles. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2018. Français. NNT : 2018BORD0274 . tel-03083319

**HAL Id: tel-03083319**

**<https://theses.hal.science/tel-03083319v1>**

Submitted on 19 Dec 2020

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

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

THÈSE PRÉSENTÉE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE  
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ (SVS)  
SPÉCIALITÉ BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOPATHOLOGIE

par Priscilla KAULANJAN-CHECKMODINE

**ÉTUDE DU MÉCANISME D'ACTION DU  
PROPRANOLOL DANS LES HÉMANGIOMES  
INFANTILES**

Sous la direction du Professeur Alain TAIEB

Soutenue le 28 Novembre 2018

Membres du jury :

Pr Pascale DUFOURCQ  
Pr Laurence BOON  
Pr Beat IMHOF  
Dr Christine LEAUTE-LABREZE  
Dr Michel WASSEF  
Pr Alain TAIEB

Université de Bordeaux, France  
Université de Louvain, Bruxelles  
Université de Genève, Suisse  
CHU de Bordeaux, France  
Université Paris Diderot, France  
Université de Bordeaux, Bordeaux

Président du jury  
Rapporteur  
Rapporteur  
Invité  
Invité  
Directeur de thèse



*"It always seems impossible until it's done"*

Nelson Mandela



*A mes parents,*

*A mes grands-parents,*

*Grand-père tu as toujours voulu qu'un de tes petits-enfants soit ingénieur, chose faite,  
maintenant je suis également docteur, j'espère que de là-haut tu es fier de moi,*



## REMERCIEMENTS

À mon directeur de thèse, le **Professeur Alain Taieb**, vous m'avez offert l'opportunité de faire cette thèse, vous vous êtes toujours montré positif dans mes choix. C'était un réel honneur d'avoir travaillé avec vous. Merci.

À Madame la **Professeure Pascale Dufourcq**, vous me faites l'honneur d'être dans le jury de thèse et de juger mon travail. Je vous en suis très reconnaissante. Je tiens également à vous remercier d'avoir pris le temps de partager votre expertise sur l'angiogenèse.

À Madame la **Professeure Laurence Boon** et Monsieur le **Professeur Beat Imhof**, je vous remercie d'être les rapporteurs de ce travail. Soyez assurés de mon profond respect.

À Madame le Docteur **Christine Léauté-Labrèze** et Monsieur le **Docteur Michel Wassef**, vous me faites l'honneur de participer à ma soutenance de thèse en tant qu'invité. Soyez assurés de ma profonde reconnaissance.

À mon coloc de bureau, **François**, ralala on en a raconté des potins dans notre aquarium et surtout qu'est-ce qu'on s'est marré pendant ces trois années. Je tiens à te remercier pour ton aide incommensurable et tes conseils surtout, ils m'ont été d'une aide précieuse dans la réalisation de cette thèse.

Je te remercie **Hamid** de ton aide pendant toute la thèse, toi aussi tu as su me donner des conseils. Tu as su aussi me rassurer quand je n'avais plus confiance en moi, tu as toujours été positif notamment quand je venais te présenter des résultats qui ne me satisfaisaient pas. Tu n'as jamais douté de moi et de mes capacités et surtout tu m'as aidée à me surpasser. Merci encore.

**Mumu**, tu es celle qui m'a donnée mon premier travail après mes études. Tu m'as faite confiance. C'est aussi grâce à toi si aujourd'hui j'ai pu faire cette thèse.



Aujourd'hui j'ai la chance de vivre de ma passion et c'est en partie grâce à toi. Merci énormément.

**Catherine**, the BEST technicienne que je connaisse. Sans toi, beaucoup de choses seraient difficiles à réaliser. Merci pour toutes les petites attentions que tu as eu pour moi notamment lors de tes voyages : le magnet du Sri Lanka que j'ai ajouté à ma collection, la tulipe jaune d'Amsterdam. Mais aussi merci pour ton aide notamment lorsque j'étais absente. Merci pour tout ce que tu as fait, pour tous tes conseils, pour avoir été une oreille bienveillante, un grand merci.

**Pauline**, on a commencé nos thèses ensemble, on les termine ensemble. Pendant ces trois années, tu es devenue très vite une amie. Tu as toujours su trouver les mots dans les mauvais moments comme dans les bons moments « popo tu peux m'aider à rédiger un mail, j'ai un doute dans la syntaxe ». Je suis très contente d'avoir partagé cette aventure avec toi. Un grand merci également pour tes nombreux conseils.

**Sorilla**, tu as toujours pris le temps de répondre à mes nombreuses questions, tu n'as eu de cesse de me proposer ton aide, je tiens vraiment à te remercier pour tout cela.

**Clément**, tu m'as appris à parler à la DIVA pour qu'elle ne tombe pas en panne pendant que je passais mes cellules au cytomètre. Merci de m'avoir formé à la cytométrie.

Je tiens également à vous remercier, **professeur Philippe De Deurwaerdère**, pour votre aide notamment pour l'HPLC et d'avoir partagé avec moi votre grande connaissance des catécholamines.

Je remercie le **Dr Marijana Licina**, qui nous a accordé du temps pour nous former aux tests d'angiogenèse. Sans elle, pas sûr que nous réussissions à réaliser cette technique.

Merci **Maya Loot**, grâce à toi j'ai pu obtenir un grand nombre de prélèvements d'hémangiomes permettant de faire avancer mes travaux de thèse.

Merci à **Sabrina Lacomme, Etienne Gontier et Mélina Petrel** pour leur aide pour la microscopie électronique.

Je remercie également **Fabrice Cordelieres** et **Patrice Mascalchi** pour leur aide et surtout leur patience pour la vidéomicroscopie.

Je remercie **Véro, Alice** et **Quentin** qui m'ont apporté leur aide précieuse pour l'élaboration des lentivirus.

**Mag, Isa M, Isa LG, Jérôme, Denis, Claire, Clément**, les pauses café ont toujours été des moments de pure rigolade. J'en ai eu bien besoin, merci à vous pour ces moments.

À mes collègues qui sont devenues des amies, **Coco** et **Vaness**, merci de votre soutien.

À ceux qui ont relu ce mémoire, **ma mère, Jérôme, Corey the american boy** ; vous ne connaissez ou ne comprenez pas tout ce qui est rédigé dans ce mémoire, mais avez joué le jeu et pour cela je vous remercie énormément pour toutes vos corrections.

À mon meilleur ami **Gaby**, merci pour tes encouragements.

À **mon mari**, merci d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir soutenu pendant les hauts et surtout les bas de la thèse.

À **ma mère**, première actrice de mes études, toujours à me consoler quand je doutais de moi, tu t'es beaucoup privée pour que je puisse faire des études, jamais je ne te remercierai assez pour tout ce que tu as fait. Un GRAND merci.



## **ETUDE DU MECANISME D'ACTION DU PROPRANOLOL DANS LES HEMANGIOMES INFANTILES**

Touchant près de 3 à 10 % des nouveau-nés, les hémangiomes infantiles (HI) sont des tumeurs vasculaires bénignes, les plus fréquentes chez les nourrissons. Les HI sévères sont actuellement traités par un bêtabloqueur, le propranolol, dont l'efficacité a été découverte de manière fortuite. Ainsi, son mécanisme d'action est méconnu. Le propranolol se fixe sur les récepteurs beta-adrénergiques et empêche leur activation par les catécholamines comme la noradrénaline. Nous nous sommes donc interrogés sur la relation entre le propranolol et la noradrénaline dans cette tumeur. Nous avons montré une forte expression de la noradrénaline et des enzymes de synthèse des catécholamines dans les HI, comparés aux hémangiomes congénitaux, qui diminuent lorsque la tumeur involue ou est traitée par le propranolol. Nous avons ensuite réalisé un modèle *in vitro* ressemblant à l'HI à partir de cellules isolées d'HI capables de synthétiser les catécholamines : les cellules endothéliales et les péricytes. Ce modèle nous permettra d'étudier l'impact de la noradrénaline et du propranolol sur ces cellules. Parallèlement, notre équipe a réalisé un modèle *in vivo* qui a permis de mettre en évidence le rôle clé de la protéine aquaporine-1 (AQP1) dans la réponse anti-tumorale du propranolol. Nous avons également étudié l'expression de l'AQP1 dans les HI et les hémangiomes congénitaux et découvert un type cellulaire adventiciel exprimant l'AQP1 dans les HI, le télocyte. Au total, notre travail sur l'HI a mis en évidence d'une part une possibilité de production endogène accrue de noradrénaline, probablement antagonisée avec succès par le propranolol, et la découverte de télocytes AQP1+ qui pourraient avoir un rôle dans la spécificité de la réponse des HI au propranolol.

**Mots clés :** Hémangiome infantile, Angiogenèse, Noradrénaline, Propranolol, Aquaporine-1



## **STUDY OF THE MECHANISM OF ACTION OF PROPRANOLOL IN INFANTILE HEMANGIOMAS**

Affecting nearly 3 to 10 % of newborns, infantile hemangiomas (HI) are the most common benign vascular tumors in infants. Severe HIs are currently treated with a beta-blocker, propranolol, whose efficacy was discovered by serendipity. Propranolol binds to beta-adrenergic receptors and prevents their activation by catecholamines such as noradrenaline. We therefore wondered about the relationship between propranolol and noradrenaline in this tumor. We showed a strong expression of noradrenaline and catecholamine synthesis enzymes in HI, compared to congenital hemangiomas, which decrease when the tumor involutes or is treated with propranolol. We then realize an *in vitro* model resembling HI from cells isolated from HI capable of synthesizing catecholamines: endothelial cells and pericytes. This model will permit to study the impact of noradrenaline and propranolol on these cells. At the same time, our team created an *in vivo* model that highlighted the key role of aquaporin-1 protein (AQP1) in the antitumor response to propranolol. We have also studied the expression of AQP1 in HI and congenital hemangiomas, and discovered an adventitious cell type expressing AQP1 in HI, the telocyte. Altogether, our work on HI has revealed firstly the possibility of increased endogenous production of norepinephrine, probably successfully antagonized by propranolol, and secondly the presence of AQP1 + cells which could have a central role central in the specificity of HI response to propranolol.

**Keywords:** Infantile hemangioma, Angiogenesis, Noradrenaline, Propranolol, Aquaporin-1



# **UNITE DE RECHERCHE**

## **Biothérapie des Maladies Génétiques et des Cancers (BMGIC)**

Université de Bordeaux

INSERM U1035 – Bâtiment TP, Zone Sud, 4<sup>e</sup> étage

146 rue Léo Saignat

33076 BORDEAUX - FRANCE





# TABLE DES MATIERES

|  |           |
|--|-----------|
| <b>INTRODUCTION .....</b>  | <b>31</b> |
| <b>1. L'HEMANGIOME INFANTILE .....</b>   | <b>32</b> |
| 1.1. PRESENTATION DE LA PATHOLOGIE : DIAGNOSTIC ET AXES CLINIQUES<br>ET EPIDEMIOLOGIQUES ..... | 32        |
| 1.1.1. Définition .....  | 32        |
| 1.1.2. Caractéristiques cliniques .....  | 32        |
| 1.1.3. Epidémiologie .....   | 35        |
| 1.1.4. Diagnostic .....  | 35        |
| 1.2. THEORIES ACTUELLES SUR L'ORIGINE DE L'HEMANGIOME INFANTILE .                              | 36        |
| 1.2.1. Origine placentaire .....   | 36        |
| 1.2.2. Origine clonale à partir de cellules pluripotentes .....                                | 36        |
| 1.2.3. Environnement hypoxique .....   | 37        |
| 1.2.4. Origine hormonale .....   | 38        |
| 1.2.5. Origine génétique .....   | 38        |
| 1.3. OPTIONS THERAPEUTIQUES DANS LE TRAITEMENT DES HEMANGIOMES<br>INFANTILES.....              | 38        |
| 1.3.1. Indications thérapeutiques .....  | 39        |
| 1.3.2. Traitements existants.....  | 40        |
| 1.4. HISTOPATHOLOGIE DE LA TUMEUR .....  | 42        |
| 1.4.1. Les cellules endothéliales .....  | 42        |
| 1.4.2. Les péricytes .....   | 44        |
| 1.4.3. Les cellules progénitrices endothéliales .....  | 46        |
| 1.4.4. Les mastocytes.....   | 47        |
| 1.4.5. Les macrophages.....  | 49        |

|   |           |
|---|-----------|
| 1.4.6. Les adipocytes.....  | 50        |
| <b>2. LA MORPHOGENESE VASCULAIRE.....</b>   | <b>50</b> |
| 2.1. LA VASCULOGENESE, FORMATION DE NEO-VAISSEAUX .....   | 51        |
| 2.1.1. Généralités.....   | 51        |
| 2.1.2. Possible implication de la vasculogénèse dans les hémangiomes<br>infantiles .....        | 51        |
| 2.2. L'ANGIOGENESE, FORMATION DE VAISSEAUX A PARTIR DES VAISSEAUX<br>PREEXISTANTS .....         | 52        |
| 2.2.1. Définition .....   | 52        |
| 2.2.2. Mécanismes de l'angiogénèse .....  | 52        |
| 2.2.3. Facteurs de régulation de l'angiogénèse .....  | 54        |
| 2.2.4. Modèles d'études de l'angiogénèse .....  | 58        |
| 2.3. L'ANGIOGENESE DANS L'HEMANGIOME INFANTILE .....  | 62        |
| 2.3.1. Les facteurs angiogéniques impliqués dans l'hémangiome infantile ..                      | 62        |
| 2.3.2. Hypothèses sur le mécanisme d'action du propranolol dans<br>l'hémangiome infantile ..... | 63        |
| <b>3. LES CATECHOLAMINES DANS LE MICROENVIRONNEMENT<br/>VASCULAIRE ET CUTANE.....</b>           | <b>65</b> |
| 3.1. SYNTHESE ET DEVENIR DES CATECHOLAMINES .....   | 65        |
| 3.1.1. Définition des catécholamines.....   | 65        |
| 3.1.2. La synthèse des catécholamines .....   | 65        |
| 3.1.3. La dégradation des catécholamines.....   | 66        |
| 3.2. LES RECEPTEURS BETA-ADRENERGIQUES : CIBLES DES CATECHOLAMINES                              | 67        |
| 3.2.1. Structure des récepteurs beta-adrénergiques.....   | 67        |
| 3.2.2. La voie beta-adrénergique.....   | 68        |

|        |  |            |
|--------|--|------------|
| 3.3.   | ROLES DES CATECHOLAMINES DANS L'ANGIOGENESE ET LA PEAU.....                                      | 68         |
| 3.3.1. | Les catécholamines dans l'angiogenèse .....  | 69         |
| 3.3.2. | Les catécholamines dans la physiologie cutanée .....   | 69         |
| 3.4.   | LES ANTAGONISTES DES CATECHOLAMINES .....  | 71         |
| 3.4.1. | Mode d'action des bêtabloquants .....  | 71         |
| 3.4.2. | Cas d'un bêtabloquant : le propranolol .....   | 72         |
|        | <b>OBJECTIF DES TRAVAUX.....</b>   | <b>75</b>  |
|        | <b>RESULTATS.....</b>  | <b>79</b>  |
|        | PARTIE 1 : LES CATECHOLAMINES ET LEUR ROLE DANS LE DEVELOPPEMENT DE L'HEMANGIOME INFANTILE ..... | 80         |
|        | Résumé.....  | 80         |
|        | Article .....  | 81         |
|        | PARTIE 2 : L'AQUAPORINE-1 JOUE UN ROLE CLE DANS LA REPONSE ANTITUMORALE AU PROPRANOLOL .....     | 112        |
|        | Résumé.....  | 112        |
|        | Article .....  | 113        |
|        | <b>RESULTATS COMPLEMENTAIRES.....</b>  | <b>161</b> |
|        | LE PROPRANOLOL FAVORISE LA STABILISATION D'HIF-1A .....  | 161        |
|        | <b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....</b>   | <b>171</b> |
|        | <b>CONCLUSION .....</b>  | <b>181</b> |
|        | <b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>   | <b>182</b> |
|        | <b>ANNEXES .....</b>   | <b>199</b> |

# TABLE DES FIGURES

|  |    |
|--|----|
| <b>FIGURE 1</b> : TACHE BLANCHE DE VASOCONSTRICTION DE L'HI PRESENTE A LA NAISSANCE .....  | 33 |
| <b>FIGURE 2</b> : PHASES D'EVOLUTION DES HEMANGIOMES INFANTILES.....   | 33 |
| <b>FIGURE 3</b> : ASPECT CLINIQUE D'HEMANGIOME INFANTILE LOCALISE ET SEGMENTAIRE .....   | 34 |
| <b>FIGURE 4</b> : IMMUNOHISTOCHEMIE DU TRANSPORTEUR GLUT1 DANS LES HEMANGIOMES<br>CONGENITAUX ET INFANTILES.....                 | 35 |
| <b>FIGURE 5</b> : REGULATION D'HIF-1A PAR L'OXYGENE .....  | 37 |
| <b>FIGURE 6</b> : HEMANGIOME SEGMENTAIRE CHEZ UN NOURRISSON TRAITE PAR LE PROPRANOLOL ...  | 41 |
| <b>FIGURE 7</b> : CELLULES ENDOTHELIALES DERMiques DE BRAS .....   | 43 |
| <b>FIGURE 8</b> : CELLULES ENDOTHELIALES D'HEMANGIOME INFANTILE .....  | 43 |
| <b>FIGURE 9</b> : IMMUNOHISTOCHEMIE DES MARQUEURS CD31 ET CD34 SUR LES CELLULES<br>ENDOTHELIALES DES HEMANGIOMES INFANTILES..... | 44 |
| <b>FIGURE 10</b> : MICROSCOPIE ELECTRONIQUE D'UN VAISSEAU SANGUIN DANS UN HEMANGIOME<br>INFANTILE .....                          | 45 |
| <b>FIGURE 11</b> : PERICYTES ISOLES D'UN HEMANGIOME INFANTILE .....  | 46 |
| <b>FIGURE 12</b> : CELLULES PROGENITRICES ENDOTHELIALES CD133+ ISOLES D'UN HI.....   | 47 |
| <b>FIGURE 13</b> : IMMUNOMARQUAGE DE LA TRYPTASE, MARQUEUR DES MASTOCYTES .....  | 48 |
| <b>FIGURE 14</b> : ETAPES DE L'ANGIOGENESE PAR BOURGEONNEMENT.....   | 53 |
| <b>FIGURE 15</b> : COMPARAISON DE L'ANGIOGENESE PAR BOURGEONNEMENT ET PAR INTUSSUSCEPTION<br>.....                               | 53 |
| <b>FIGURE 16</b> : ETAPES DE L'ANGIOGENESE PAR INTUSSUSCEPTION. ....   | 54 |
| <b>FIGURE 17</b> : REGULATION DE L'ANGIOGENESE PAR L'HYPOXIE .....   | 55 |
| <b>FIGURE 18</b> : RECEPTEURS VEGFR ET LEURS LIGANDS .....   | 55 |
| <b>FIGURE 19</b> : PROTOCOLE DE MATRIGEL PLUG ASSAY.....   | 58 |
| <b>FIGURE 20</b> : TEST DE MIGRATION CELLULAIRE.....   | 60 |
| <b>FIGURE 21</b> : ANGIOGENESE PAR BOURGEONNEMENT (OU « <i>SPROUTING ASSAY</i> ») IN VITRO .....                                 | 61 |
| <b>FIGURE 22</b> : TEST D'ANGIOGENESE AVEC DES CELLULES ENDOTHELIALES HUMAINES DE CORDON<br>OMBILICAL .....                      | 61 |
| <b>FIGURE 23</b> : SCHEMA RESUMANT LES VOIES AFFECTEES PAR L'HI.....   | 63 |
| <b>FIGURE 24</b> : STRUCTURE DES CATECHOLAMINES .....  | 65 |
| <b>FIGURE 25</b> : VOIE DE BIOSYNTHESE DES CATECHOLAMINES.....   | 66 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>FIGURE 26</b> : METABOLISME DE DEGRADATION DES CATECHOLAMINES .....   | 67  |
| <b>FIGURE 27</b> : STRUCTURE DU RECEPTEUR BETA-2 ADRENERGIQUE .....  | 67  |
| <b>FIGURE 28</b> : VOIE CANONIQUE DE SIGNALISATION DES RECEPTEURS BETA-ADRENERGIQUES .....   | 68  |
| <b>FIGURE 29</b> : STRUCTURE DE LA PEAU.....   | 69  |
| <b>FIGURE 30</b> : MECANISME D'ACTION POSSIBLE DES CATECHOLAMINES DANS LA CICATRISATION<br>EPIDERMIQUE .....   | 71  |
| <b>FIGURE 31</b> : STRUCTURE DU PROPRANOLOL.....   | 72  |
| <b>FIGURE 32</b> : SITE DE FIXATION DES CATECHOLAMINES ET DU PROPRANOLOL SUR LES ADRB.....   | 72  |
| <b>FIGURE 33</b> : MODELE HYPOTHETIQUE DU MECANISME D'ACTION DU PROPRANOLOL DANS<br>L'ANGIOGENESE ANORMALE DES HI.....   | 73  |
| <b>FIGURE 34</b> : EFFET DU PROPRANOLOL EN NORMOXIE ET EN HYPOXIE SUR LES ENZYMES DE<br>SYNTHESE DES CATECHOLAMINES DANS LES PERICYTES D'HEMANGIOMES INFANTILES ET<br>CONGENITAUX ET DE PREPUCE .....              | 163 |
| <b>FIGURE 35</b> : EFFET DU PROPRANOLOL EN NORMOXIE ET EN HYPOXIE SUR LES ENZYMES DE<br>SYNTHESE DES CATECHOLAMINES DANS LES CELLULES ENDOTHELIALES D'HEMANGIOMES<br>INFANTILES ET CONGENITAUX ET DE PREPUCE ..... | 165 |
| <b>FIGURE 36</b> : PLAN EXPERIMENTAL DE L'ETUDE DE L'HYPEROXIE .....   | 167 |
| <b>FIGURE 37</b> : EFFET DE L'HYPEROXIE SUR LES ENZYMES DE SYNTHESE DES CATECHOLAMINES ....  | 167 |
| <b>FIGURE 38</b> : LE PROPRANOLOL AUGMENTE L'EXPRESSION D'HIF-1A DANS LES CELLULES<br>ENDOTHELIALES D'HI .....   | 168 |
| <b>FIGURE 39</b> : EFFET DU PROPRANOLOL SUR LA PROLIFERATION DES CELLULES ENDOTHELIALES ET<br>DES PERICYTES D'HEMANGIOMES INFANTILES.....  | 168 |
| <b>FIGURE 40</b> : MECANISME POSSIBLE DE LA NORADRENALINE SUR HIF-1A DANS L'HEMANGIOME<br>INFANTILE .....  | 172 |
| <b>FIGURE 41</b> : EXEMPLES, NON EXHAUSTIFS, DE VOIES DE BIOSYNTHESE DE LA NORADRENALINE DANS<br>LES CELLULES ENDOTHELIALES ET LES PERICYTES D'HEMANGIOME INFANTILE. ....  | 174 |
| <b>FIGURE 42</b> : PRODUCTION AUTOCRINE-PARACRINE DE LA NORADRENALINE PAR LES CELLULES<br>ENDOTHELIALES ET LES PERICYTES D'HEMANGIOME INFANTILE.....   | 175 |
| <b>FIGURE 43</b> : LE PROPRANOLOL INHIBE LA TUBULOGENESE DES CELLULES D'HI.....  | 176 |
| <b>FIGURE 44</b> : MECANISME HYPOTHETIQUE DE LA REGULATION DE L'AQP1 PAR LA NORADRENALINE<br>DANS LES TELOCYTES D'HI .....   | 178 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>FIGURE 45 :</b> TELOCYTES D'HEMANGIOME INFANTILE EN CULTURE.....  | 179 |
| <b>FIGURE 46 :</b> MECANISME HYPOTHETIQUE DU DIALOGUE INTERCELLULAIRE DANS LES VAISSEaux<br>D'HEMANGIOME INFANTILE ET DU MODE D'ACTION DU PROPRANOLOL DANS CE MECANISME .. | 180 |
| <b>FIGURE 47 :</b> LA NORADRENALINE FAVORISE LA TUBULOGENESE PAR LES CELLULES DE PREPUCES.<br>.....  | 208 |
| <b>FIGURE 48 :</b> LA NORADRENALINE ET LE PROPRANOLOL N'ONT PAS D'EFFET SUR LA TUBULOGENESE<br>DES CELLULES D'HEMANGIOME CONGENITAL. ....                                  | 208 |

## **LISTE DES TABLEAUX**

|  |    |
|--|----|
| <b>TABLEAU 1</b> : CLASSIFICATION DES HEMANGIOMES INFANTILES .....   | 35 |
| <b>TABLEAU 2</b> : AFFINITE DES BETABLOQUANTS POUR LES RECEPTEURS BETA-ADRENERGIQUES,<br>AFFINITE INVERSEMENT PROPORTIONNELLE A LA CONSTANCE $K_D$ ..... | 71 |

## **LISTE DES ANNEXES**

|   |     |
|---|-----|
| <b>ANNEXE 1</b> : PROTOCOLE D'ISOLEMENT DES CELLULES D'HI.....          | 200 |
| <b>ANNEXE 2</b> : RESULTATS PRELIMINAIRES DES TESTS D'ANGIOGENESE ..... | 208 |
| <b>ANNEXE 3</b> : PUBLICATIONS.....                                     | 209 |
| <b>ANNEXE 4</b> : COMMUNICATIONS ORALES .....                           | 209 |
| <b>ANNEXE 5</b> : POSTERS .....   | 210 |





## ABREVIATIONS

| <b>Abréviation</b> | <b>Français</b>                             | <b>Anglais</b>                            |
|--------------------|---|---|
| <b>µM</b>          | Micromoles par litre                        | <i>Micromoles by liter</i>                |
| <b>ADRB</b>        | Récepteur bêta-adrénergique                 | <i>Beta adrenergic receptor</i>           |
| <b>AMM</b>         | Autorisation de mise sur le marché          | <i>Marketing authorization</i>            |
| <b>AMPc</b>        | Adénosine monophosphate cyclique            | <i>Cyclic adenosine monophosphate</i>     |
| <b>ANGPT</b>       | Angiopoïétine                               | <i>Angiopoietin</i>                       |
| <b>ANR</b>         | Agence nationale de la recherche            |   |
| <b>AQP1</b>        | Aquaporine-1                                | <i>Aquaporin-1</i>                        |
| <b>ATP</b>         | Adénosine triphosphate                      | <i>Adenosine triphosphate</i>             |
| <b>bFGF</b>        | Facteur de croissance des fibroblastes      | <i>Basic fibroblast growth factor</i>     |
| <b>CAM</b>         | Membrane chorio-allantoïde de poulet        | <i>Chick chorioallantoic membrane</i>     |
| <b>CD</b>          | Cluster de différenciation                  | <i>Cluster of differentiation</i>         |
| <b>COMT</b>        | Catéchol-o-méthyltransférase                | <i>Catechol-o-methyl transferase</i>      |
| <b>DAB</b>         | 3,3'-diaminobenzidine                       | <i>3,3'-diaminobenzidine</i>              |
| <b>DOPEG</b>       | 3,4-dihydroxyphényléthylène glycol          | <i>3,4-dihydroxyphenylethylene glycol</i> |
| <b>duSP5</b>       | Protéine phosphatase 5 à double spécificité | <i>Dual specificity phosphatase-5</i>     |
| <b>EGF</b>         | Facteur de croissance épidermique           | <i>Epidermal growth factor</i>            |
| <b>ELISA</b>       | Dosage immuno-enzymatique                   | <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>  |
| <b>Flk-1</b>       | Kinase du foie foetal 1                     | <i>Fetal liver kinase 1</i>               |
| <b>GLUT1</b>       | Transporteur de glucose 1                   | <i>Glucose transporter 1</i>              |
| <b>HI</b>          | Hémangiome infantile                        | <i>Infantile hemangioma</i>               |

| <b>Abréviation</b>              | <b>Français</b>   | <b>Anglais</b>   |
|---------------------------------|---|--|
| <b>HIF-1<math>\alpha</math></b> | Facteur induit par l'hypoxie 1 $\alpha$   | <i>Hypoxia-inducible factor 1<math>\alpha</math></i>   |
| <b>HPLC</b>                     | Chromatographie en phase<br>liquide à haute performance   | <i>High pressure liquid<br/>chromatography</i>   |
| <b>HRE</b>                      | Elément répondant à l'hypoxie   | <i>Hypoxia element response</i>  |
| <b>IL-8</b>                     | Interleukine 8  | <i>Interleukin-8</i>   |
| <b>KDR</b>                      | Récepteur kinase  | <i>Kinase insert domain receptor</i>   |
| <b>LUMBAR</b>                   | Hémangiome du bas du corps,<br>anomalies urogénitales,<br>ulcération, myélopathie,<br>déformations osseuses,<br>malformations ano-rectales,<br>anomalies artérielles, anomalie<br>rénales | <i>Lower body hemangioma,<br/>urogenital anomalies,<br/>ulceration, myelopathy, bony<br/>deformities, anorectal<br/>malformations, arterial<br/>anomalies, and renal anomalies</i> |
| <b>MAO</b>                      | Monoamine oxydase   | <i>Monoamine oxidase</i>   |
| <b>miR-382</b>                  | Micro-arn-382   | <i>Micro-rna-382</i>   |
| <b>MMP</b>                      | Métalloprotéinase matricielle   | <i>Matrix metalloproteinase</i>  |
| <b>NG2</b>                      | Neuron-glia 2   | <i>Neuron-glia 2</i>   |
| <b>NICH</b>                     | Hémangiome congénital non<br>involutif  | <i>Non involuting congenital<br/>hemangioma</i>  |
| <b>NO</b>                       | Monoxyde d'azote  | <i>Nitric oxide</i>  |
| <b>Oct-4</b>                    | Facteur de transcription 4 à<br>liaison d'octamère  | <i>Octamer-binding transcription<br/>factor 4</i>  |
| <b>PDGFR<math>\beta</math></b>  | Récepteur beta du facteur de<br>croissance dérivé des plaquettes  | <i>Platelet-derived growth factor<br/>receptor beta</i>  |
| <b>PHD</b>                      | Domaine prolyl hydroxylase  | <i>Prolyl hydroxylase domain</i>   |
| <b>PICH</b>                     | Hémangiome congénital<br>partiellement involutif  | <i>Partially involuting congenital<br/>hemangioma</i>  |
| <b>PKA</b>                      | Protéine kinase a   | <i>Protein kinase a</i>  |

| <b>Abréviation</b>            | <b>Français</b>   | <b>Anglais</b>  |
|-------------------------------|---|---|
| <b>RGS5</b>                   | Régulateur de la signalisation des protéines g 5          | <i>Regulator of g protein signaling 5</i>                             |
| <b>RICH</b>                   | Hémangiome congénital rapidement involutif                | <i>Rapidly involuting congenital hemangioma</i>                       |
| <b>RIO</b>                    | Rétinopathie induite par l'oxygène                        | <i>Oxygen-induced retinopathy</i>                                     |
| <b>SRB</b>                    | Sulforhodamine b  | <i>Sulforhodamine b</i>   |
| <b>TEM-8</b>                  | Marqueur endothélial tumoral 8                            | <i>Tumor endothelial marker-8</i>                                     |
| <b>TGF</b>                    | Facteur de croissance transformant                        | <i>Transforming growth factor</i>                                     |
| <b>Tie2</b>                   | Tyrosine kinase avec immunoglobuline et domaine EGF       | <i>Tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains-2</i> |
| <b>TIMP</b>                   | Inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases              | <i>Tissue inhibitor of metalloproteinase</i>                          |
| <b>TNF<math>\alpha</math></b> | Facteur alpha de nécrose tumorale                         | <i>Tumor necrosis factor alpha</i>                                    |
| <b>VE-cadhérine</b>           | Cadhérine vasculaire endothéliale                         | <i>Vascular endothelial cadherin</i>                                  |
| <b>VEGFR</b>                  | Récepteur de facteur de croissance endothélial vasculaire | <i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>                    |
| <b>vSMC</b>                   | Cellules musculaires lisses vasculaires                   | <i>Vascular smooth muscular cells</i>                                 |
| <b>vWF</b>                    | Facteur vonWillebrand                                     | <i>vonWillebrand factor</i>   |
| <b><math>\alpha</math>SMA</b> | Actine musculaire lisse alpha                             | <i>Alpha-smooth muscle actin</i>                                      |



## AVANT-PROPOS

Les anomalies vasculaires ou angiomes regroupent des affections développées à partir des vaisseaux sanguins ou lymphatiques. La nomenclature a longtemps été confuse. En 1982, Mulliken et Glowacki ont proposé une classification reposant sur les caractéristiques cliniques, radiologiques, histologiques et biologiques connues à l'époque<sup>1</sup>. Cette classification a depuis été mise à jour par la Société Internationale pour l'étude des Anomalies Vasculaires (ISSVA), et distingue deux grands groupes d'anomalies vasculaires : les malformations vasculaires, dues à une altération structurelle des vaisseaux, et les tumeurs vasculaires liées à une prolifération anormale des vaisseaux. Touchant près de 3 à 10 % des nouveau-nés, l'hémangiome infantile (HI) est la tumeur vasculaire la plus commune chez les nourrissons<sup>2</sup>.

Suite à la découverte fortuite en 2008 par le Docteur Christine Léauté-Labrèze, dermatologue au CHU de Bordeaux, de l'inattendue efficacité d'un bêtabloquant, le propranolol, dans le traitement de l'HI<sup>3</sup>, un brevet a été déposé par l'université et le CHU de Bordeaux. Ceci a permis, après signature d'une licence exclusive avec le laboratoire Pierre Fabre Dermatologie, de développer rapidement une forme pédiatrique de propranolol. L'efficacité du médicament a été évaluée par une étude clinique multicentrique randomisée de phase III montrant une guérison complète ou quasi complète des HI pour une large majorité des nourrissons traités, à la différence de l'absence quasi totale d'effet avec le placebo.

C'est en 2014 que les laboratoires Pierre Fabre Dermatologie ont obtenu auprès de la Commission Européenne l'autorisation de mise sur le marché (AMM) pour Hemangiol® (propranolol), le premier et seul médicament approuvé dans l'indication « d'hémangiomes infantiles prolifératifs nécessitant un traitement systémique ». La même année, l'agrément de la *Food and Drug Administration* (FDA) a été obtenu pour Hemangeol™ aux Etats-Unis.

*« 12% des hémangiomes sont des formes sévères qui peuvent entraîner des complications comme une obstruction des voies aériennes, altérer la vue ou entraîner des défigurations irréversibles. Pourtant nous n'avons à notre disposition aucun traitement avec un profil d'efficacité et de tolérance satisfaisant pour cette pathologie. L'AMM apporte un cadre légal d'utilisation sécurisant pour l'enfant, l'entourage et le prescripteur », Dr Christine Léauté-Labrèze<sup>4</sup>.*

L'effet du propranolol dans l'HI a ouvert une nouvelle voie de recherche, par son aspect inattendu. Les projets BETASKIN 1 puis 2 soutenus par l'Agence nationale de la recherche (ANR) et d'autres partenaires ont permis de lancer un programme de recherche au sein de notre laboratoire INSERM U1035. En effet, comprendre le ou les mécanismes à l'origine de l'efficacité du propranolol pourraient permettre de cibler les voies importantes en oncologie pour le traitement d'autres tumeurs.

Les travaux menés antérieurement au laboratoire lors de la thèse du Dr Sorilla Prey avaient pour objectif de déterminer les cellules cibles du propranolol dans la tumeur. Ils ont montré la présence des récepteurs bêta-adrénergiques<sup>5</sup>, cibles du propranolol, dans les cellules endothéliales, les péricytes et les mastocytes d'HI. De plus, d'autres résultats préliminaires ont mis en évidence l'expression des enzymes de synthèse des catécholamines, agonistes de ces récepteurs, dans les tissus d'HI. Nous souhaitons donc étudier à la suite de ce travail, l'implication des catécholamines dans le développement de la tumeur et dans l'efficacité du médicament.

Mon projet de thèse s'est articulé en plusieurs parties. La première consistait en la mise au point d'un protocole d'isolement de cellules d'intérêt (cellules endothéliales, péricytes et cellules souches) à partir de prélèvements d'HI en vue, dans un second temps, d'établir un modèle *in vitro* permettant l'étude de l'effet du propranolol et des catécholamines sur ces cellules. Puis des expérimentations sous hypoxie *in vitro* ont été également réalisées afin d'étudier la relation entre le propranolol, les catécholamines et l'hypoxie dans cette pathologie. En parallèle, le Dr François Moisan a mis au point un modèle *in vivo* répondant au propranolol qui nous a permis d'étayer plusieurs de nos hypothèses.

## INTRODUCTION

---

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| <b>1.</b> | <b>L'HEMANGIOME INFANTILE .....</b>  | <b>32</b> |
| 1.1.      | PRESENTATION DE LA PATHOLOGIE : DIAGNOSTIC ET AXES CLINIQUES ET EPIDEMIOLOGIQUES ..... | 32        |
| 1.2.      | THEORIES ACTUELLES SUR L'ORIGINE DE L'HEMANGIOME INFANTILE .                           | 36        |
| 1.3.      | OPTIONS THERAPEUTIQUES DANS LE TRAITEMENT DES HEMANGIOMES INFANTILES.....              | 38        |
| 1.4.      | HISTOPATHOLOGIE DE LA TUMEUR .....   | 42        |
| <b>2.</b> | <b>LA MORPHOGENESE VASCULAIRE .....</b>  | <b>50</b> |
| 2.1.      | LA VASCULOGENESE, FORMATION DE NEO-VAISSEAUX .....                                     | 51        |
| 2.2.      | L'ANGIOGENESE, FORMATION DE VAISSEAUX A PARTIR DES VAISSEAUX PREEXISTANTS .....        | 52        |
| 2.3.      | L'ANGIOGENESE DANS L'HEMANGIOME INFANTILE .....  | 62        |
| <b>3.</b> | <b>LES CATECHOLAMINES DANS LE MICROENVIRONNEMENT VASCULAIRE ET CUTANE.....</b>         | <b>65</b> |
| 3.1.      | SYNTHESE ET DEVENIR DES CATECHOLAMINES .....   | 65        |
| 3.2.      | LES RECEPTEURS BETA-ADRENERGIQUES : CIBLES DES CATECHOLAMINES .....                    | 67        |
| 3.3.      | ROLES DES CATECHOLAMINES DANS L'ANGIOGENESE ET LA PEAU.....                            | 68        |
| 3.4.      | LES ANTAGONISTES DES CATECHOLAMINES .....  | 71        |

---



# 1. L'HEMANGIOME INFANTILE

## 1.1. PRESENTATION DE LA PATHOLOGIE : DIAGNOSTIC ET AXES CLINIQUES ET EPIDEMIOLOGIQUES

### 1.1.1. Définition

Selon la dernière classification de l'International Society for the Study of Vascular Anomalies (ISSVA), l'HI est une tumeur vasculaire bénigne du nourrisson<sup>6</sup> qui apparaît quelques jours après la naissance et qui régresse spontanément en plusieurs mois. Il existe d'autres tumeurs vasculaires bénignes infantiles regroupées sous le nom d'hémangiomes congénitaux. Ceux-ci sont présents dès la naissance et sont classés selon leur involution en :

- *Rapidly Involuting Congenital Hemangioma* (RICH), qui régressent spontanément au cours de la première année
- *Partially Involuting Congenital Hemangioma* (PICH), qui régressent partiellement
- *Non Involuting Congenital Hemangioma* (NICH), qui ne régressent pas

### 1.1.2. Caractéristiques cliniques

Les HI touchent majoritairement la peau. Ces HI cutanés apparaissent classiquement quelques jours après la naissance, cependant, dans certains cas, une lésion précurseur peut être visible dès la naissance. Cette lésion apparaît sous forme soit d'une macule blanche liée à une vasoconstriction ou « macule anémique » (Figure 1) soit d'une petite macule érythémateuse<sup>7</sup>.



Figure 1 : Tâche blanche de vasoconstriction de l'HI présente à la naissance<sup>8</sup>

L'HI évolue ensuite en trois phases (Figure 2). La phase initiale dite proliférative est caractérisée par une augmentation rapide de la taille de la tumeur. Cette phase peut durer de 3 mois à 1 an. Elle est suivie d'une phase de stabilisation où l'HI ne croît plus pendant plusieurs mois puis d'une phase d'involution où l'HI régresse spontanément pendant plusieurs mois voire plusieurs années. Cette phase se caractérise par une transformation de la tumeur vasculaire en un tissu fibro-adipeux.

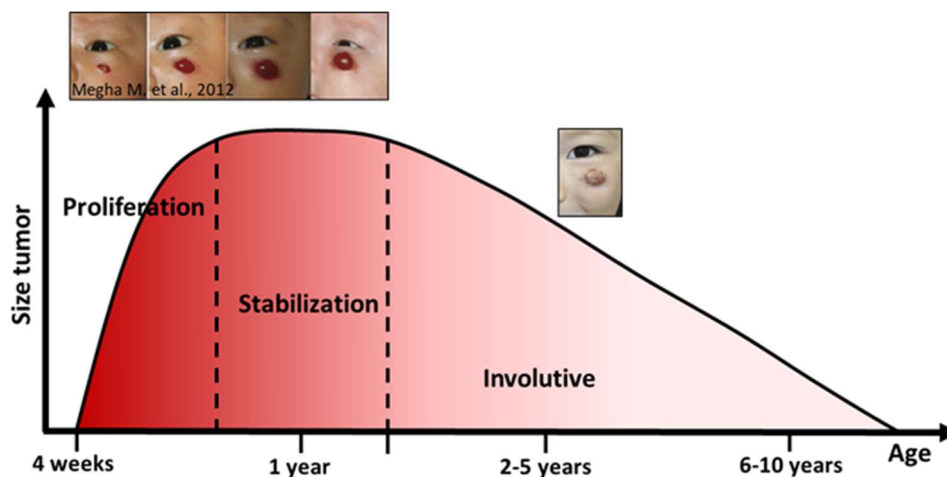


Figure 2 : Phases d'évolution des hémangiomes infantiles (inspiré de Storch et al., et Tollefson et al.,<sup>9,10</sup>)

Il existe plusieurs types d'HI en fonction de leur localisation anatomique au sein de la peau :

- Les HI cutanés superficiels, qui ont une surface rouge vif à bords nets, sont présents au niveau du derme superficiel.
- Les HI profonds, qui sont situés au niveau du derme profond et surtout de l'hypoderme, se caractérisent cliniquement par une tumeur sous-cutanée et une surface cutanée d'apparence normale.
- Les HI dits mixtes ont une composante à la fois superficielle et profonde.

Ils sont également caractérisés par leur morphologie. Les HI localisés, qui sont les formes les plus fréquentes, se présentent sous forme de nodule isolé. Les HI segmentaires sont quant à eux généralement situés sur une zone de développement comme le bras ou un secteur du visage (Figure 3).

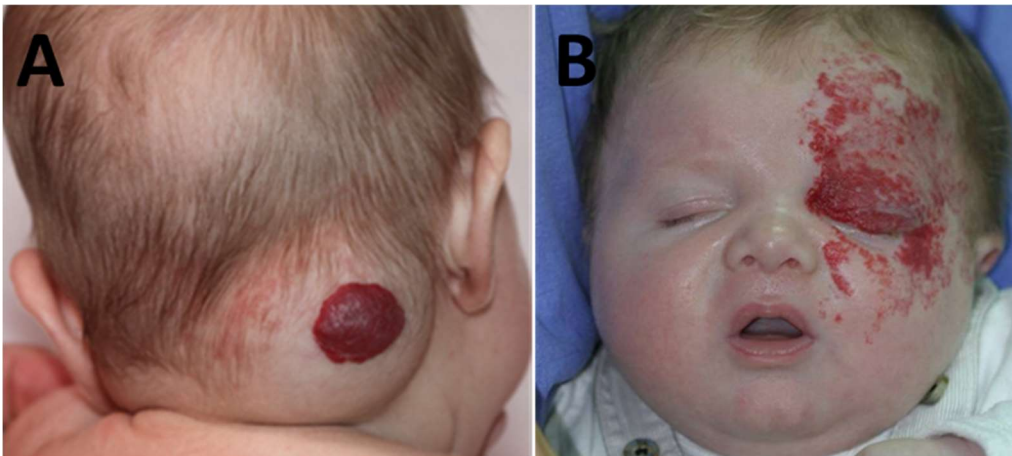


Figure 3 : Aspect clinique d'hémangiome infantile localisé (A) et segmentaire (B)  
(Source : S. Prey)

Les HI sont souvent isolés. Cependant, ils peuvent être associés, notamment en cas d'HI segmentaire, à des syndromes malformatifs tels que le syndrome PHACE ou le syndrome SACRAL<sup>6</sup>(Tableau 1).

Tableau 1 : Classification des hémangiomes infantiles (ISSVA 2018)

| Morphologie des HI               | Types d'HI  |
|----------------------------------|---|
| Localisé                         | Superficiel   |
| Multifocal                       | Profond   |
| Segmentaire                      | Mixte (Profond et superficiel)  |
| HI associés à d'autres lésions   |   |
| Syndrome PHACE(S)                | Malformations de la fosse postérieure, <u>h</u> émangiome, anomalies <u>a</u> rtérielles, anomalies <u>c</u> ardiovasculaires, anomalies oculaires ( <u>e</u> yes), anomalies <u>s</u> ternales   |
| Syndrome LUMBAR (SACRAL, PELVIS) | Hémangiome du bas du corps ( <i>lower body</i> ), anomalies urogénitales, <u>u</u> lcération, <u>m</u> yélopathie, déformations osseuses ( <u>b</u> ones), malformations <u>a</u> no-rectales, anomalies artérielles, anomalies <u>r</u> énales |

### 1.1.3. Epidémiologie

Touchant près de 3 à 10 % des nouveau-nés et jusqu'à 30 % des prématurés de moins d'1,5 kg<sup>11</sup>, l'HI est la tumeur la plus fréquente des nourrissons<sup>2</sup>. Les filles sont principalement touchées avec un sex-ratio de 3 filles pour 1 garçon. Outre la prématurité et le faible poids, d'autres facteurs prédisposant ont été identifiés comme le type caucasien, les antécédents familiaux d'HI, l'âge maternel élevé, les grossesses multipares, l'amniocentèse ou une éclampsie<sup>12</sup>.

### 1.1.4. Diagnostic

Le diagnostic des HI est essentiellement clinique. Cependant, au niveau histologique, la forte expression du transporteur de glucose GLUT1 à la surface endothéliale des vaisseaux permet de les distinguer des autres tumeurs vasculaires cutanées, notamment des hémangiomes congénitaux<sup>13</sup> (Figure 4).

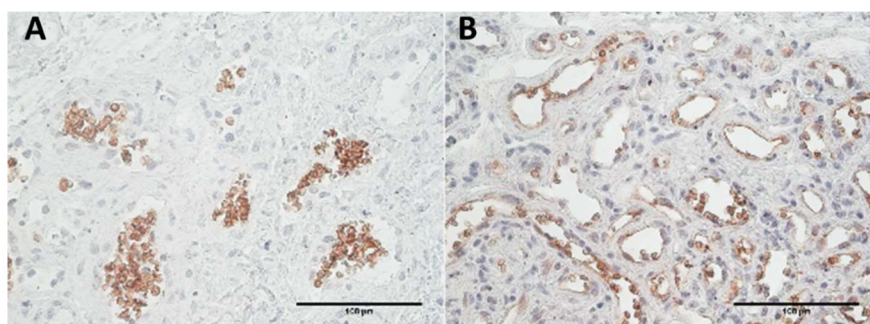


Figure 4 : Immunohistochimie du transporteur GLUT1 dans les hémangiomes congénitaux (A) et infantiles (B) ; GLUT1 marquage en brun avec le chromogène DAB des hématies et des cellules endothéliales entourant les vaisseaux, les noyaux sont contre-colorés en bleu à l'hématoxyline. Echelle 100 µm (Source : P. Kaulanjan-Checkmodine)

## 1.2. THEORIES ACTUELLES SUR L'ORIGINE DE L'HEMANGIOME INFANTILE

Les processus à l'origine de l'apparition des HI ne sont pas parfaitement élucidés à ce jour. Plusieurs hypothèses ont été évoquées :

### 1.2.1. Origine placentaire

Des études ont montré que les nourrissons dont les mères ont subi une amniocentèse présentaient plus d'HI, suggérant que cette procédure pourrait être en cause dans un transfert de cellules placentaires de la mère au fœtus<sup>14</sup>. En effet, les HI et le placenta présentent une expression similaire de marqueurs moléculaires notamment le GLUT1, l'antigène Lewis Y, la mérosine, la laminine, le récepteur Fcγ-IIb et l'enzyme iodothyronine deiodinase de type III. A noter que ces marqueurs sont absents dans les hémangiomes congénitaux, les malformations vasculaires ou la peau normale<sup>15</sup>. Ces éléments ont abouti à l'hypothèse d'une origine placentaire de développement des HI. Les cellules endothéliales du placenta pouvant être d'origine maternelle ou fœtale, deux études concluent que les cellules endothéliales d'HI proviennent de l'enfant lui-même, du fait de l'absence de cellules XX maternelles dans les tissus d'HI de garçons<sup>16,17</sup>.

### 1.2.2. Origine clonale à partir de cellules pluripotentes

Lorsque des cellules souches CD133+ d'HI sont injectées dans des souris, elles peuvent former des vaisseaux qui, de surcroît, expriment le marqueur GLUT1 et se différencient en tissu adipeux. *In vitro*, ces cellules ont des capacités de prolifération importantes et peuvent se différencier en divers types cellulaires tels que les cellules endothéliales, les neurones, les adipocytes, les ostéocytes et les chondrocytes. De ce fait, Khan *et al* ont émis l'hypothèse que ces cellules souches CD133+ étaient à l'origine cellulaire du développement de l'HI<sup>18</sup>. Cette théorie est renforcée par une autre étude montrant que les cellules endothéliales d'HI sont clonales et pourraient donc être issues de cellules souches<sup>19</sup>.

### 1.2.3. Environnement hypoxique

Différentes études suggèrent une relation entre l'hypoxie et la présence d'HI. En effet, une expression localisée du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$ , marqueur de l'hypoxie (Figure 5), a été observée dans les HI prolifératifs<sup>20</sup>; expression qui décroît en phase d'involution<sup>21</sup>.

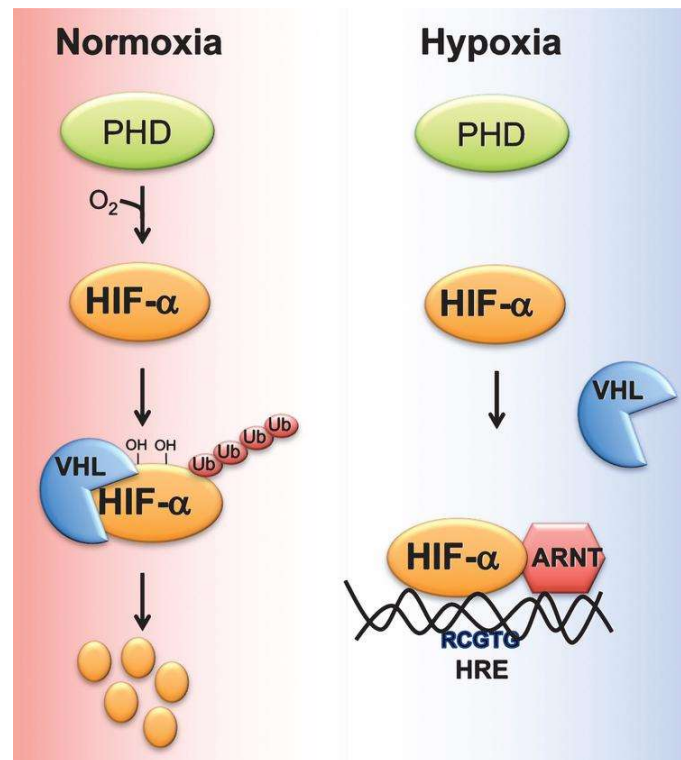


Figure 5 : Régulation d'HIF-1 $\alpha$  par l'oxygène. En condition normoxique, HIF-1 $\alpha$  est hydroxylé par PHD. HIF-1 $\alpha$  hydroxylé se lie ensuite à la protéine suppresseur de tumeur Von Hippel Lindau (VHL) conduisant à son ubiquitination. Puis HIF-1 $\alpha$  est dégradée. En hypoxie, l'absence d'O<sub>2</sub> ne permet pas l'hydroxylation d'HIF-1 $\alpha$  conduisant ainsi à sa stabilisation. Puis HIF-1 $\alpha$  se fixe sur les promoteurs de gènes cibles conduisant ainsi à leur transcription<sup>22</sup>

De plus, à la naissance, une tâche anémique est, parfois, précurseur du développement de l'HI (Figure 1)<sup>23</sup>. Ce phénomène suggère un lien vasoconstriction-ischémie du tissu se traduisant par une diminution de l'apport sanguin et de l'apport en oxygène induisant ainsi une hypoxie. L'hypoxie localisée pourrait être à l'origine du recrutement ou de la prolifération de cellules progénitrices endothéliales et/ou de cellules souches mésenchymateuses pouvant se différencier en cellules constituant l'HI<sup>24</sup>. En effet, le faible apport en oxygène activerait des facteurs pro-angiogéniques tels que le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) via HIF1 $\alpha$  et par conséquent induirait une néovascularisation. Cette ischémie pourrait être l'élément déclencheur de l'HI.

#### 1.2.4. Origine hormonale

La prédominance féminine pourrait être expliquée par la combinaison d'un taux élevé de 17- $\beta$ -estradiol chez les enfants atteints d'HI et la présence d'un nombre important de récepteurs à l'estradiol dans les tissus d'HI<sup>25,26</sup>.

#### 1.2.5. Origine génétique

L'étude de cinq familles présentant plusieurs cas d'HI a suggéré une transmission autosomique dominante des HI<sup>27,28</sup>. Par ailleurs, une mutation du gène de la phosphatase *dup5* (*dual specific phosphatase-5*) localisé sur le chromosome 10 a été retrouvée dans des HI. Cette mutation est une substitution de la thymine en cytosine conduisant à une proline à la place de la sérine, rendant ainsi l'enzyme instable. Cette mutation a été retrouvée dans 76 % des cas de malformations vasculaires suggérant donc son rôle dans le développement vasculaire<sup>29</sup>.

Il a également été identifié une mutation faux-sens dans le gène codant pour le marqueur endothélial tumoral-8 (TEM-8), protéine de surface de type intégrine. Cette mutation est le remplacement de la guanine par de l'adénosine conduisant à la traduction de la thréonine à la place de l'alanine et induisant une diminution de l'expression de VEGFR-1 et une augmentation de l'expression du récepteur proangiogénique VEGFR-2<sup>30</sup>.

D'autre part, certains patients atteints d'HI présentent une mutation faux-sens dans le gène *VEGFR-2* où la cytosine est remplacée par la thymine conduisant à la traduction d'une arginine au lieu d'une cystéine. Cette mutation contribue également à la diminution de l'expression de VEGFR-1<sup>30</sup>, favorisant donc la fixation de VEGF sur VEGFR-2. Une explication plus détaillée sur l'impact de ces mutations est décrite dans la partie 2.3.1 de ce manuscrit.

### 1.3. OPTIONS THERAPEUTIQUES DANS LE TRAITEMENT DES HEMANGIOMES INFANTILES

L'HI est une tumeur bénigne qui involue spontanément. Elle ne nécessite donc, dans la majorité des cas aucun traitement. Toutefois, dans 15 % des cas, une chirurgie ou un

traitements sont pratiqués<sup>31</sup> notamment en cas de risque de préjudice fonctionnel, esthétique, ou vital en fonction de sa localisation et/ou de sa taille.

### 1.3.1. Indications thérapeutiques

#### *1.3.1.1. Risque fonctionnel*

La fonction visuelle peut être altérée (astigmatisme, strabisme voire amblyopie avec perte totale de la vision) si l'HI est situé au niveau de la paupière. De la même manière, les hémangiomes labiaux, qui s'ulcèrent fréquemment, peuvent gêner l'alimentation et altérer le développement des structures maxillo-dentaires. Aussi, les hémangiomes nasaux peuvent obstruer les voies respiratoires. Les hémangiomes auriculaires peuvent obstruer le conduit auditif interne et entraîner une otite.

#### *1.3.1.2. Ulcération*

L'ulcération est la complication la plus fréquente (16% d'ulcération sur une cohorte de 1058 patients)<sup>31</sup>. Elle est plus fréquente dans les HI en croissance rapide. L'ulcération est très douloureuse, à l'air libre comme au contact, ce qui nécessite un traitement médical ou une chirurgie. Le maniement optimal du propranolol dans les hémangiomes ulcérés est un sujet discuté.

#### *1.3.1.3. Risque esthétique*

Les HI volumineux peuvent engendrer un préjudice esthétique en laissant des résidus fibroadipexes, ou en déformant des reliefs anatomiques (exemple des hémangiomes de la pointe du nez) qui ont une répercussion psychologique chez les parents mais également chez l'enfant lorsqu'il est amené à entrer en collectivité. Ces hémangiomes peuvent ainsi faire l'objet d'un traitement médical précoce ou d'une chirurgie des séquelles. Il s'agit principalement d'hémangiomes très visibles, généralement sur le visage. L'objectif est de stopper la croissance et favoriser l'involution rapide des HI.



#### *1.3.1.4. Risque vital*

Dans la plupart des cas, les hémangiomes situés dans des zones à risque (yeux, nez, lèvre et zone ano-génitale) sont traités précocement. Ceux situés au niveau des voies aériennes peuvent provoquer des détresses respiratoires par compression du carrefour oro-pharyngé pendant la phase de croissance. Les HI multiples cutanés associés à des hémangiomes multiples hépatiques peuvent provoquer une insuffisance cardiaque par haut débit.

### 1.3.2. Traitements existants

#### *1.3.2.1. Chirurgie*

Une chirurgie peut être réalisée mais ses indications ont fortement diminué avec le traitement médical par propranolol. Elle s'avère utile en phase précoce pour des lésions ulcérées, pédiculées faciles à retirer, et en phase tardive à titre esthétique pour retirer le résidu fibro-adipeux faisant suite à l'involution de l'HI.

#### *1.3.2.2. Traitement médical*

##### 1.3.2.2.1. Corticothérapie

La corticothérapie a été utilisée dans le traitement des HI à partir des années 60. La posologie variait de 2 à 5 mg/kg/jour sur une durée d'environ 2 mois, puis les doses étaient progressivement diminuées. Son efficacité - régression ou stabilisation de la tumeur - était notée dans 30 à 60 % des cas<sup>32</sup> entre la 2<sup>e</sup> et la 3<sup>e</sup> semaine de traitement. Le mécanisme d'action des corticoïdes dans le traitement des HI est méconnu. Ce traitement stimulerait l'apoptose des cellules en augmentant le cytochrome b, protéine membranaire mitochondriale ayant un rôle dans la chaîne respiratoire. Mais il induirait également la libération de facteurs anti-angiogéniques en augmentant le nombre de mastocytes<sup>33</sup>. Les effets secondaires de la corticothérapie sont nombreux. La plupart sont bénins (insomnie, irritabilité, reflux-gastro-œsophagien, retard de croissance) mais certains sont beaucoup plus alarmants (hypertension artérielle, myocardiopathie, insuffisance surrénalienne)<sup>34</sup>.

#### 1.3.2.2.2. Vincristine

La vincristine est une chimiothérapie anti-angiogénique induisant une apoptose des cellules tumorales *in vitro*. Elle était indiquée dans les formes graves en cas d'échec des autres traitements à la posologie de 0,05 mg/kg en une prise par semaine pendant au moins 15 semaines. L'efficacité est proche de 100 %, avec une régression de l'HI qui débute après 3 semaines de traitement environ. Néanmoins, la vincristine peut provoquer de sévères effets secondaires (cytopénie et atteintes neurologiques).

#### 1.3.2.2.3. Propranolol

Le propranolol est un bêtabloquant non cardio-sélectif. Son efficacité dans le traitement de l'HI a été découverte de manière fortuite au sein de l'unité de dermatologie pédiatrique du CHU de Bordeaux<sup>3</sup>. Un enfant traité par corticoïdes contre un HI sévère a développé une myocardiopathie nécessitant l'introduction systémique de ce bêtabloquant qui, au bout de quelques heures, a induit une forte réduction de la taille de la tumeur (Exemple d'un cas traité : Figure 6).

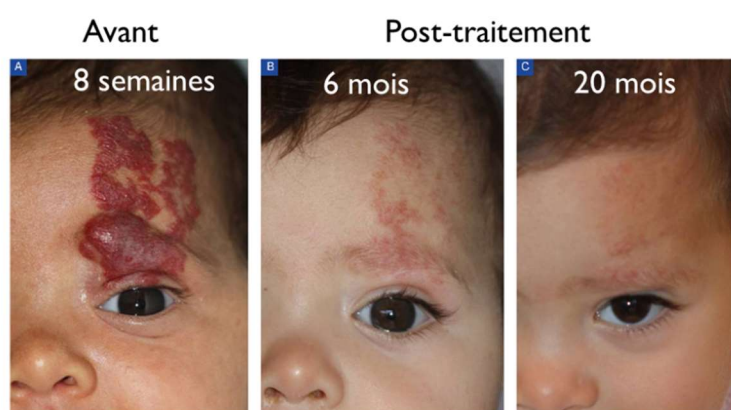


Figure 6 : Hémangiome segmentaire chez un nourrisson de 8 semaines (A), 6 mois (B) et 20 mois (C) traité par le propranolol<sup>35</sup>

L'efficacité de ce traitement a été confirmée par une étude clinique multicentrique randomisée de phase III<sup>36</sup> (clinicaltrials.gov : NCT01056341) qui a également souligné le faible taux d'effets secondaires<sup>37,38</sup> (hypotension, bradycardie, hypoglycémie). Depuis 2008, le propranolol par voie orale à une dose de 2-3 mg/kg/jour est le traitement de première ligne dans le traitement des HI. A noter qu'il est inefficace sur les hémangiomes congénitaux<sup>39</sup>, les botriomycomes (granulomes pyogéniques/pyogenic granulomas)<sup>40</sup> et les malformations vasculaires.

D'autres bêtabloquants ont montré une efficacité dans le traitement de la tumeur. C'est le cas du timolol topique, efficace pour des HI de moins d'1 mm d'épaisseur prescrit pour éviter le passage du propranolol lipophile, donné *per os*, dans le système nerveux central. Cependant, bien que appliqué en topique, la présence de timolol a été retrouvée dans les urines et dans le sang, suggérant qu'il possède également un effet systémique (C. Leauté-Labrèze, *Primer Course ISSVA 2018*)<sup>41,42</sup>.

## 1.4. HISTOPATHOLOGIE DE LA TUMEUR

### 1.4.1. Les cellules endothéliales

Lors du développement embryonnaire, le mésoderme donne naissance à un précurseur commun aux cellules endothéliales et aux cellules hématopoïétiques : l'hémangioblaste. Celui-ci se différencie en progéniteur endothélial nommé angioblaste ou en cellule souche hématopoïétique. Sous contrôle de facteurs épigénétiques et environnementaux, l'angioblaste se différencie en cellules endothéliales<sup>43</sup>. Les cellules endothéliales constituent l'endothélium vasculaire. Ce sont les cellules qui tapissent la paroi interne des vaisseaux lymphatiques et sanguins. Elles sont par conséquent en contact direct avec le flux sanguin.

Par leur localisation dans l'endothélium et leur forte charge négative membranaire, les cellules endothéliales empêchent l'attachement des cellules circulantes (monocytes et granulocytes) à la paroi vasculaire. Cette charge négative empêche l'adhésion plaquettaire, ainsi les cellules endothéliales assurent une fonction anticoagulante. De la même manière, la thrombine va se fixer aux récepteurs endothéliaux PAR1 et stimuler ainsi la synthèse de monoxyde d'azote (NO), facteur important dans la capacité anticoagulante de l'endothélium<sup>44</sup>. Ces cellules sont capables de provoquer soit une vasoconstriction soit une vasodilatation des vaisseaux. Les cellules endothéliales assurent leur rôle vasodilatateur en produisant de la prostaglandine I<sub>2</sub>. *A contrario*, les cellules endothéliales sont également capables de synthétiser de l'endothéline-1 qui, par fixation aux récepteurs ETA (endothelin receptor A) présents sur les péricytes, assure l'activité vasoconstrictrice.

Elles sont caractérisées par l'expression de *clusters* de différenciation (CD) : CD31 (PECAM-1), CD34, CD105, de récepteurs au VEGF (VEGFR-1 et -2), du facteur von Willebrand (vWF) et de la VE-cadhérine<sup>45</sup>.

Les cellules endothéliales isolées d'HI présentent une morphologie différente des cellules endothéliales matures (Figure 7) connues pour avoir une forme épithélioïde avec un large noyau.

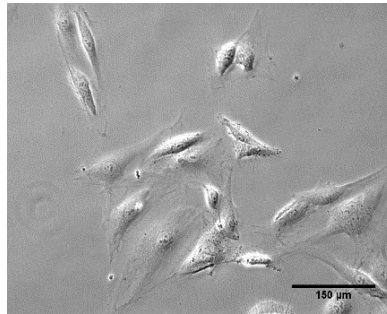


Figure 7 : Cellules endothéliales dermiques de bras  
Echelle 150 µm (Source P. Henrot)

Néanmoins, elles présentent des similarités avec les cellules endothéliales de nouveau-nés et de fœtus. En effet, elles présentent un aspect fusiforme « spindle-shaped » (Figure 8).

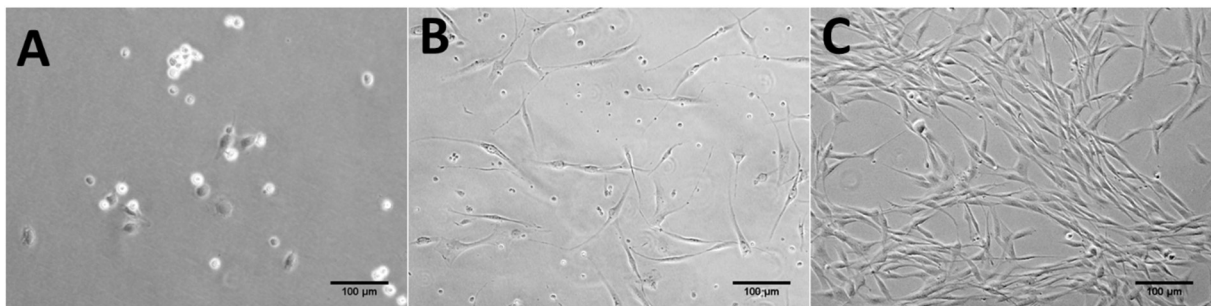


Figure 8 : Cellules endothéliales d'hémangiome infantile à J1 (A), J5 (B) et J12 (C) après mise en culture. Echelle 100 µm. (Source : P. Kaulanjan-Checkmodine)

Elles prolifèrent plus vite que les cellules endothéliales de sujets sains<sup>19</sup>. De plus, elles ont la particularité d'exprimer fortement le transporteur GLUT1<sup>13</sup>. Elles expriment également le récepteur tyrosine kinase Tie2 (*tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains-2*) à un niveau plus élevé que les cellules endothéliales des microvaisseaux du derme<sup>46</sup>. Les récepteurs Notch, récepteurs jouant un rôle dans la formation de vaisseaux à partir d'un réseau vasculaire préexistant, et leur ligand JAGGED-1 sont fortement exprimés dans les cellules endothéliales d'HI en comparaison à celles de la peau saine<sup>47</sup>.

De plus, les cellules endothéliales d'HI expriment fortement le marqueur CD34 (Figure 9), connu pour être un marqueur des cellules souches hématopoïétiques et des cellules progénitrices. Cela suggère que les cellules endothéliales d'HI sont immatures.

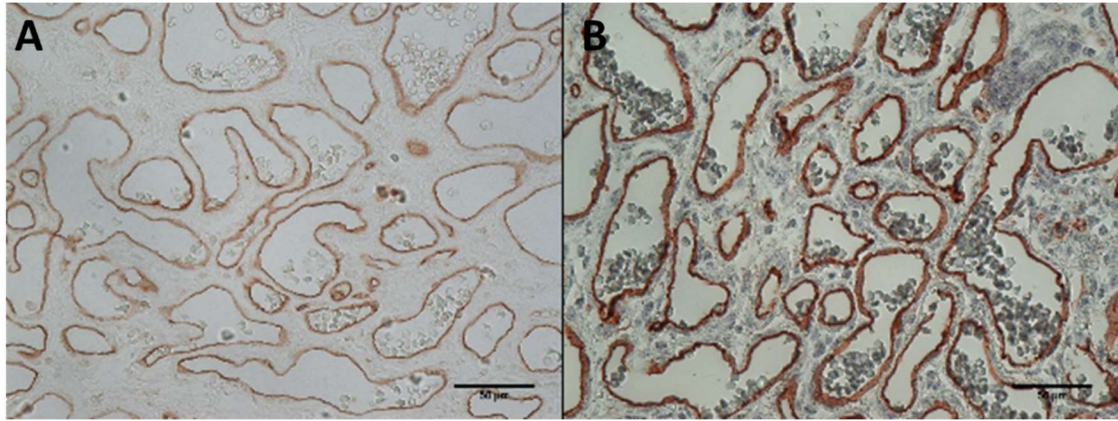


Figure 9 : Immunohistochimie des marqueurs CD31 (A) et CD34 (B) sur les cellules endothéliales des hémangiomes infantiles; marquage en brun avec le chromogène DAB. Les noyaux sont contre-colorés en bleu à l'hématoxyline, échelle 50  $\mu\text{m}$  (Source : S. Prey)

#### 1.4.2. Les péricytes

Les péricytes sont des cellules péri-vasculaires qui entourent les cellules endothéliales. Ils sont également nommés cellules de Rouget - suite à leur découverte par Charles Rouget - ou cellules murales ou encore cellules musculaires lisses vasculaires (vSMC) du fait de leur fibres contractiles. Les péricytes présentent une morphologie type avec un noyau proéminent, un petit cytoplasme et un corps cellulaire avec de longs prolongements entourant les cellules endothéliales (Figure 10). Ces prolongements jouent un rôle dans le contact cellule-cellule mais également dans la signalisation entre les cellules.

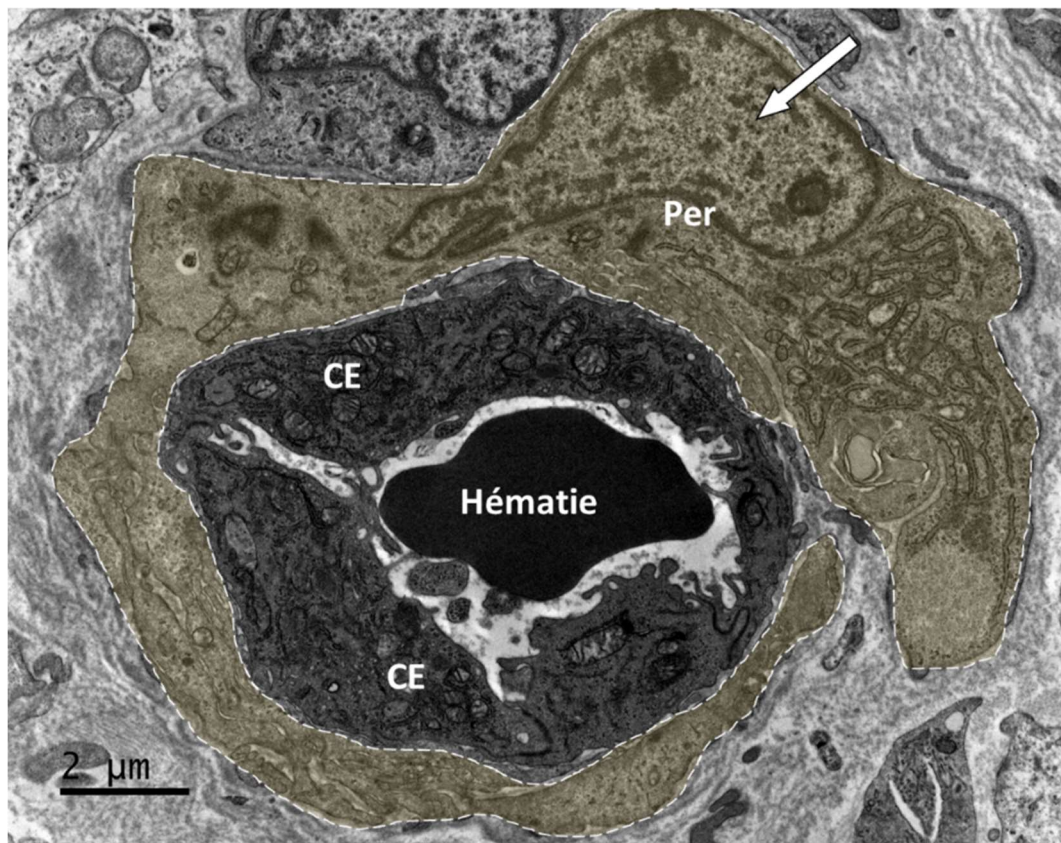


Figure 10 : Microscopie électronique d'un vaisseau sanguin dans un hémangiome infantile . Per : Péricyte, CE : Cellule endothéliale, flèche : noyau proéminent. (Source : P. Kaulanjan-Checkmodine)

Les péricytes sont capables de vasoconstriction et de vasodilatation permettant de réguler le diamètre vasculaire et ainsi le débit sanguin<sup>48</sup>. Leur propriété contractile est assurée à l'aide des protéines  $\alpha$ SMA (*smooth muscle actin*), tropomyosine et myosine. De plus, les péricytes possèdent des récepteurs adrénergiques ( $\alpha_2$  et  $\beta_2$ ). L'activation des récepteurs  $\beta_2$  provoque une relaxation tandis que l'activation des récepteurs  $\alpha_2$  a une action antagoniste et induit ainsi une contraction. L'endothéline-1 et le NO sécrétés par les cellules endothéliales interagissent sur les péricytes provoquant leur contraction ou leur relaxation. Leur contraction est favorisée *in vitro* par l'hyperoxie alors que le niveau élevé de dioxyde de carbone induit leur relaxation. Cela suggère que les vaisseaux se dilatent lors d'un besoin en oxygène et inversement s'il y a un niveau suffisant en oxygène<sup>48</sup>. La formation de vaisseaux stables et matures repose sur la production de matrice extra cellulaire et le recrutement de péricytes. Les péricytes stabilisent les vaisseaux en inhibant la prolifération des cellules endothéliales. Ils contrôlent la quiescence de ces dernières<sup>49</sup>.

Plusieurs marqueurs des péricytes existent, et leur expression varie selon le tissu et le stade de développement ou l'état fonctionnel du vaisseau sanguin. Les protéines desmine, *alpha-smooth muscle actine* ( $\alpha$ SMA), *regulator of G protein signaling 5* (RGS5), *Neuron-glia 2* (NG2) et *platelet-derived growth factor receptor beta* (PDGFR $\beta$ ) sont généralement utilisées pour identifier les péricytes dans des tissus. La desmine est un filament contractile spécifique du muscle, présent dans les cellules squelettiques, cardiaques et musculaires lisses matures. L' $\alpha$ SMA est l'un des isoformes de la protéine cytosquelettique actine. RGS5 est un membre des régulateurs de signalisation de la protéine G. NG2, aussi appelé protéoglycane de mélanome humain, est exprimé à la surface des péricytes lors des processus de vasculogénèse et d'angiogénèse. Le récepteur tyrosine-kinase PDGFR $\beta$  est fortement exprimé à la surface des péricytes. Un knock-out de PDGFR $\beta$  provoque une sévère diminution du nombre de péricytes et une hyperdilatation des vaisseaux induisant des œdèmes et une létalité embryonnaire<sup>48</sup>.

Les péricytes d'HI (Figure 11) présentent une prolifération rapide - prolifération réduite *in vitro* par le propranolol<sup>50</sup> - et ont une forte capacité de sécrétion du facteur pro-angiogénique VEGF-A. Les péricytes d'HI présentent une capacité réduite à rendre les vaisseaux stables et matures<sup>51</sup>. L'équipe de Bischoff a également montré que le propranolol inhibe la relaxation des péricytes d'HI induite par l'adrénaline, agoniste des récepteurs beta adrénergiques<sup>50</sup>.

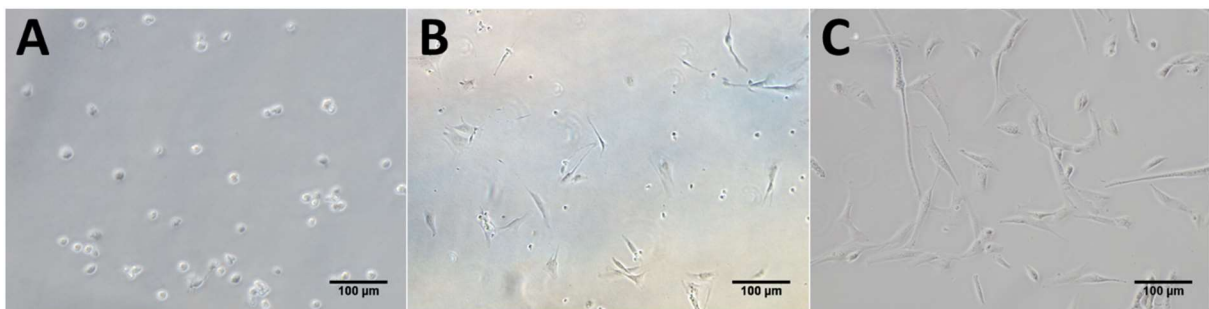


Figure 11 : Péricytes isolés d'un hémangiome infantile à J1 (A), J5 (B) et J17 (C) après mise en culture. Echelle : 100  $\mu$ m (Source : P. Kaulanjan-Checkmodine)

#### 1.4.3. Les cellules progénitrices endothéliales

Les cellules progénitrices endothéliales ont un potentiel de prolifération élevé et des propriétés angiogéniques. En conditions physiologiques, ces cellules sont situées dans

la moelle osseuse tandis qu'en condition pathologique, elles migrent vers le tissu lésé<sup>52</sup>. Elles sont capables de se différencier en cellules endothéliales matures<sup>53</sup> et de sécréter des facteurs angiogéniques afin de contribuer à la néovascularisation d'un site ischémique<sup>52</sup>. De plus, leur capacité à se différencier en d'autres types cellulaires leur confère ainsi un rôle dans l'angiogenèse, la régénération tissulaire et la réparation des tissus ischémiques<sup>54</sup>. Ces cellules font ainsi l'objet d'études dans l'ingénierie tissulaire. Elles expriment les marqueurs de cellules souches tels que Oct-4, le marqueur de surface CD133 (aussi appelé antigène AC133 ou encore prominine-1) et CD90, marqueur de cellules souches mésenchymateuses. Les marqueurs de surface endothéliaux CD34, CD31, le facteur vonWillebrand (vWF) et VEGF sont également exprimés par celles-ci d'où leur dénomination « endothéliale ».

Dans les tissus d'HI, des études ont montré la présence de ces cellules (Figure 12). Elles sont capables de se différencier en différents types cellulaires dont les cellules endothéliales, les péricytes, les cellules neurogliales et les adipocytes<sup>18</sup>. Ainsi il a été émis l'hypothèse que ces cellules sont à l'origine du développement des HI mais contribuent également à l'adipogenèse dans l'involution de la tumeur<sup>55</sup>.

Injectées dans des souris immunodéficientes, ces cellules sont capables de former des vaisseaux et d'exprimer GLUT1<sup>18</sup>.



Figure 12 : Cellules progénitrices endothéliales CD133+ isolées d'un hémangiome infantile à JO (A), J1 (B) et J5 (C) après mise en culture. Échelle : 100 µm. (Source : P. Kaulanjan-Checkmodine)

#### 1.4.4. Les mastocytes

Les mastocytes sont des cellules du tissu conjonctif issues de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques pluripotentes. Ils sont localisés dans de multiples tissus dont la peau, notamment dans le derme à proximité des vaisseaux sanguins, des



cellules nerveuses et des annexes épidermiques (follicules pileux et glandes sudoripares). Ils sont reconnaissables par leur morphologie car ils contiennent de volumineux granules intracytoplasmiques renfermant de nombreux médiateurs comme l'histamine, les prostaglandines et la tryptase. Les médiateurs synthétisés par les mastocytes jouent un rôle dans l'immunité, la réparation tissulaire mais également l'angiogenèse. En effet, les enzymes (chymase, tryptase et métalloprotéinases) et les cytokines produites par les mastocytes dégradent la matrice extracellulaire. En outre, les mastocytes sont une source de facteurs pro-angiogéniques tels que VEGF, bFGF, TGF- $\beta$ , TNF $\alpha$  et IL-8. Ainsi, ces cellules favoriseraient l'angiogenèse. Néanmoins, elles possèdent également un rôle anti-angiogénique du fait de leur capacité à sécréter des facteurs anti-angiogéniques comme les interférons (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ ) et le TGF- $\beta$ <sup>56</sup>.

Les mastocytes expriment le récepteur au « *Stem Cell Factor* » (CD117 ou c-Kit), le récepteur pour les immunoglobulines de type E, la tryptase et la chymase.

Dans les tissus d'HI, les mastocytes (Figure 13) sont très abondants – 30 à 40 fois plus nombreux que dans les tissus normaux. Et ce nombre diminue jusqu'à un niveau normal lorsque l'hémangiome est involué<sup>56</sup>.

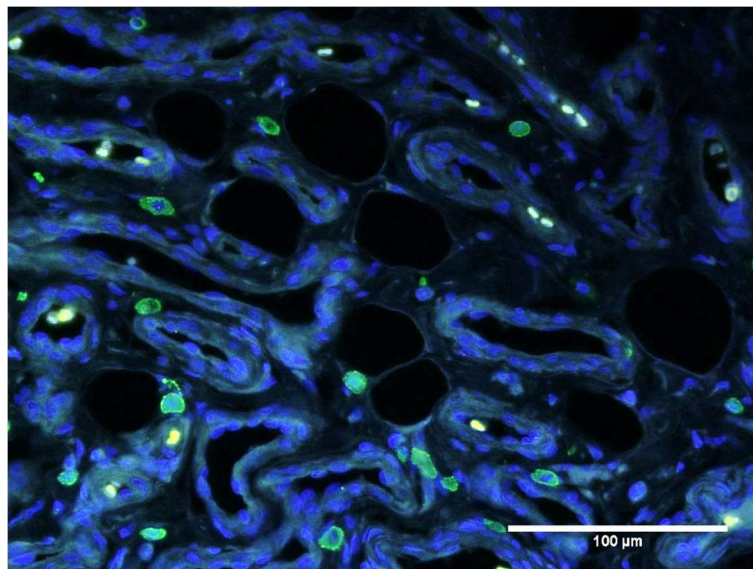


Figure 13 : Immunomarquage de la tryptase, marqueur des mastocytes (vert) à proximité des vaisseaux dans un tissu d'hémangiome infantile. Echelle 100  $\mu$ m (Source : S. Prey)

Notre équipe a montré que ces cellules expriment fortement les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques. Il en a été conclu que les mastocytes pourraient être une cible thérapeutique du propranolol<sup>5</sup>.

#### 1.4.5. Les macrophages

Les macrophages sont des cellules issues de la moelle osseuse et plus particulièrement de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques sous l'influence de facteurs de croissance. On dénombre plusieurs types de macrophages selon leur fonction. Les macrophages dits "résidents" sont localisés dans les tissus lymphoïdes et non lymphoïdes et participent à l'homéostasie des tissus. Les macrophages "recrutés" se déplacent vers le site de l'inflammation, sous l'influence de cytokines, chimiokines ou de débris bactériens. Ils présentent des propriétés de phagocytose leur permettant d'éliminer toute substance étrangère, comme les microorganismes exogènes, cellules cancéreuses et débris cellulaires. Les macrophages M1 sont pro-inflammatoires alors que les M2 sont régulateurs et peuvent être impliqués dans la cicatrisation des tissus. Les macrophages ont donc un rôle dans l'homéostasie tissulaire<sup>57</sup>. En particulier, ils régulent également l'angiogenèse. Ceci a largement été démontré dans les études portant sur le développement de la rétine. Les macrophages sont capables d'induire l'apoptose des cellules endothéliales. En effet, ils synthétisent la protéine WNT7B qui délivre un signal de mort cellulaire aux cellules endothéliales. En l'absence de cette protéine, il y a augmentation de l'angiogenèse<sup>57,58</sup>.

Les macrophages sont définis par l'expression des marqueurs de surface CD68 et CD206. La sous-population des macrophages de type M2 exprime les marqueurs CD163, CD204 et CD301<sup>59</sup> tandis que les macrophages M1 expriment CD86 et CD80<sup>60</sup>.

Les macrophages des HI ont été étudiés spécifiquement en 2008<sup>61</sup>. Il s'agit plus particulièrement de macrophages M2 co-exprimant les marqueurs CD163 et CD68. A proximité des cellules endothéliales, et majoritairement présents dans les hémangiomes prolifératifs, ces macrophages expriment également VEGF et Ki67. Cette étude a montré une corrélation entre VEGF, KI67 et les macrophages CD68/CD163. Il a ainsi été proposé que les macrophages M2 induisent la prolifération de l'hémangiome

via la sécrétion de VEGF<sup>62</sup>. Une seconde étude a montré que le milieu conditionné par des macrophages M2, issus de la différenciation de la lignée THP-1, induit la prolifération des cellules souches CD133 d'HI. De plus, ces mêmes macrophages M2 ont la capacité de favoriser la différenciation des cellules souches en cellules CD31+/VE-cadhérine+ et de contribuer à la formation de tubes par ces cellules<sup>63</sup>.

#### 1.4.6. Les adipocytes

Les adipocytes ou cellules adipeuses constituent les cellules des tissus adipeux. Il en existe deux types : les adipocytes blancs et les bruns. Ils ont pour rôle de stocker les acides gras sous forme de triglycérides. Ces derniers seront hydrolysés pour fournir l'énergie nécessaire aux tissus périphériques. Ces cellules possèdent des fonctions endocrines via la synthèse et la sécrétion de peptides nommés adipokines qui régulent la thermogénèse<sup>64</sup>.

Les adipocytes blancs et bruns se distinguent par leur contenu cytoplasmique. En effet, les adipocytes blancs sont composés d'une gouttelette lipidique unique tandis que les bruns sont constitués de multiples gouttelettes. Les gouttelettes lipidiques qui caractérisent les adipocytes sont marquées à l'aide du colorant *Oil Red O*.

Lors de l'involution spontanée de l'HI, les vaisseaux sont progressivement remplacés par des adipocytes. Ces derniers vont représenter le type cellulaire majoritaire dans l'hémangiome involué. Les cellules souches sont capables de se différencier en adipocytes, et pourraient donc être à l'origine de l'adipogenèse dans l'involution de l'hémangiome<sup>18,55,65</sup>. Le propranolol accélérerait la différenciation des cellules souches d'HI en adipocytes. En effet, les cellules souches traitées au propranolol pendant 4 jours présentent des vacuoles lipidiques<sup>66</sup>.

## 2. LA MORPHOGENESE VASCULAIRE

La physiopathologie de l'HI peut être due à un dysfonctionnement dans la formation des vaisseaux. Ainsi, dans cette partie je présenterai la morphogénèse vasculaire et ses facteurs de régulation.

Le réseau de vaisseaux se forme au travers de deux processus : la vasculogénèse et l'angiogénèse.

## 2.1. LA VASCULOGENESE, FORMATION DE NEO-VAISSEAUX

### 2.1.1. Généralités

La vasculogénèse est la formation de vaisseaux, à partir de précurseurs endothéliaux appelés hémangioblastes, lors de l'embryogénèse. C'est à partir de ces précurseurs endothéliaux que se formeront l'aorte dorsale, les veines cardinales et le système artério-veineux de l'embryon<sup>67,68</sup>. Dans le sac embryonnaire, les hémangioblastes forment des îlots cellulaires qui migrent dans l'organisme puis se différencient. Les cellules internes des îlots se développent en cellules hématopoïétiques tandis que les cellules externes se différencient en angioblastes<sup>69</sup>. Ces derniers, sous l'action de VEGF, prolifèrent et se différencient en cellules endothéliales qui vont former un réseau vasculaire. Le VEGF joue un rôle important dans la vascularisation embryonnaire. En effet, une déficience en son récepteur VEGFR-2 (ou KDR/Flk-1) entraîne l'absence de vasculogénèse et la mort embryonnaire.

La vasculogénèse peut également être observée chez l'adulte. On parle de vasculogénèse post-natale. Elle est réalisée à partir de cellules progénitrices endothéliales, provenant de la moelle osseuse, qui possèdent des caractéristiques similaires aux angioblastes (expression de VEGFR-2, CD34, CD133). Ces cellules circulent dans le sang et migrent dans les tissus afin de réaliser de nouveaux vaisseaux notamment en réponse à un stimulus (blessure, ischémie, croissance tumorale)<sup>70</sup>.

La vasculogénèse conduit essentiellement à la formation d'un réseau endothélial immature et peu fonctionnel.

### 2.1.2. Possible implication de la vasculogénèse dans les hémangiomes infantiles

Dans les HI, des cellules progénitrices, capables de se différencier en cellules endothéliales et de former des vaisseaux, ont été retrouvées. Boscolo et Bischoff<sup>27</sup> suggèrent ainsi que la tumeur est due à une vasculogénèse non contrôlée, et non à une angiogénèse. En effet les cellules endothéliales d'HI possèdent des caractéristiques

similaires à celles de fœtus. Elles ont une morphologie fusiforme et expriment vWF et CD31 de manière intracytoplasmique et non membranaire, suggérant que les cellules endothéliales d'HI ne sont pas complètement différenciées<sup>71</sup>. Boscolo et Bischoff ont également émis l'hypothèse que la prolifération de la tumeur est due à un dysfonctionnement dans la différenciation et la maturation des cellules endothéliales. Ce dérèglement provoquerait ainsi un retard dans la différenciation de ces cellules et par conséquent une prolifération vasculaire inopportune et désordonnée<sup>27</sup>.

Néanmoins, de nombreuses publications orientent vers une angiogenèse non contrôlée à l'origine du développement de la tumeur.

## 2.2. L'ANGIOGENESE, FORMATION DE VAISSEAUX A PARTIR DES VAISSEAUX PREEXISTANTS

### 2.2.1. Définition

L'angiogenèse est le processus de formation de vaisseaux à partir d'un réseau préexistant se produisant uniquement à l'âge adulte<sup>45</sup>. Via l'action de facteurs pro- et anti-angiogéniques, l'angiogenèse consiste en la croissance et le remodelage du réseau primitif en un réseau plus complexe. Elle fait intervenir différents types cellulaires (cellules endothéliales, péricytes, cellules musculaires lisses, fibroblastes, cellules inflammatoires) et des composants de la matrice extracellulaire. Les grandes lignes de l'angiogenèse sont la dégradation protéolytique de la membrane basale puis la migration et la prolifération des cellules endothéliales pour enfin former des vaisseaux. Enfin, les vaisseaux sont stabilisés par leur recouvrement par les péricytes<sup>72</sup>.

### 2.2.2. Mécanismes de l'angiogenèse

Le mécanisme de l'angiogenèse s'effectue par bourgeonnement (ou *sprouting*) ou par intussusception à partir de vaisseaux préexistants.

#### 2.2.2.1. *Angiogenèse par bourgeonnement*

L'angiogenèse par bourgeonnement met en jeu divers mécanismes (Figure 14). Brièvement, sous l'action de divers stimuli (environnement hypoxique, gradient de

VEGF, FGF, etc.) les cellules endothéliales sécrètent des métalloprotéinases qui vont dégrader la matrice extra cellulaire. Les péricytes se détachent et ainsi les cellules endothéliales prolifèrent puis migrent. Par la suite, elles forment progressivement des vaisseaux et les péricytes sont recrutés afin de stabiliser les nouveaux vaisseaux et ainsi les rendre matures.

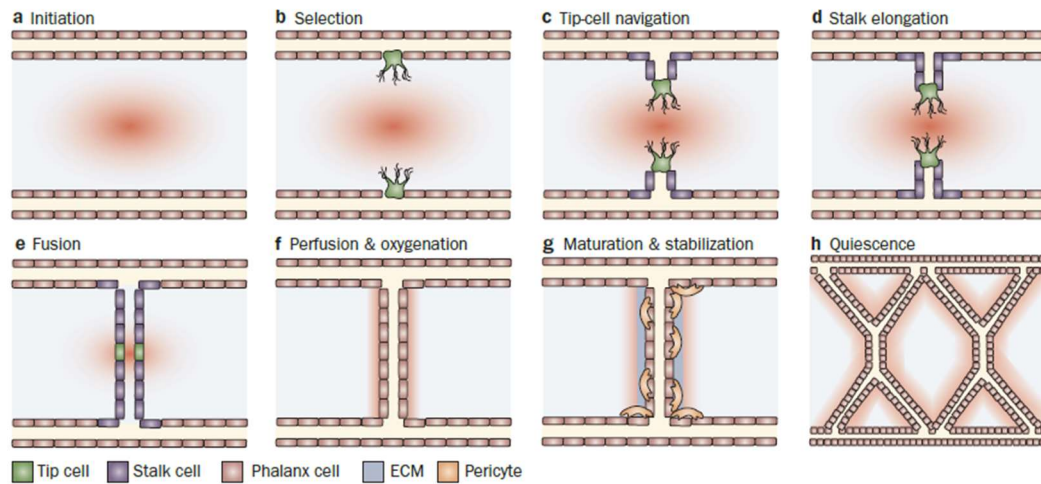


Figure 14 : Etapes de l'angiogenèse par bourgeonnement. **a.** Les cellules environnantes expriment et créent un gradient (tâche rouge diffuse) du facteur proangiogénique VEGF. **b.** Les cellules endothéliales exposées au plus près de VEGF sont sélectionnées et deviennent des *tip cells*. **c.** Les *tip cells* conduisent le bourgeonnement et envahissent les tissus environnants en prolongeant leurs filopodes. **d.** Le bourgeonnement se prolonge grâce à la prolifération des *stalk cells* situés derrière les *tip cells*. **e.** La nouvelle branche se connecte à un autre par la fusion des *tip cells*. **f.** La formation d'une lumière permet la circulation du sang et par conséquent l'oxygénation diminuant ainsi le gradient de VEGF. **g.** Les péricytes sont recrutés et assurent la maturation et la stabilisation du vaisseau néoformé. **h.** Les cellules endothéliales sont dans un état de quiescence et sont appelées *phalanx cells*<sup>73</sup>.

#### 2.2.2.2. Angiogenèse par intussusception

L'angiogenèse par intussusception est une réorganisation des vaisseaux préformés. A la différence de l'angiogenèse par bourgeonnement, il s'agit d'un processus au cours duquel un vaisseau existant peut se scinder en deux (Figure 15).

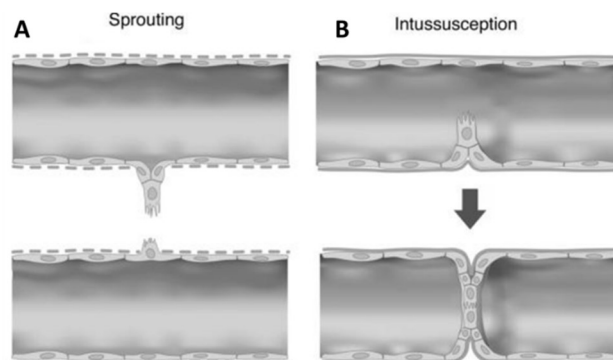


Figure 15 : Comparaison de l'angiogenèse par bourgeonnement (A) et par intussusception (B)<sup>74</sup>.

L'angiogenèse par intussusception est initiée par une invagination de cellules endothéliales de bords opposés, aboutissant à la création d'une zone de contact entre les deux parois opposées du vaisseaux (Figure 16). Ce contact entraîne la formation d'une séparation interstitielle qui est rapidement envahie par des péricytes. Ces derniers vont synthétiser la matrice extracellulaire et assurer la maturation et la stabilisation du nouveau vaisseau. Contrairement à l'angiogenèse par bourgeonnement, ce processus nécessite peu de prolifération des cellules endothéliales.

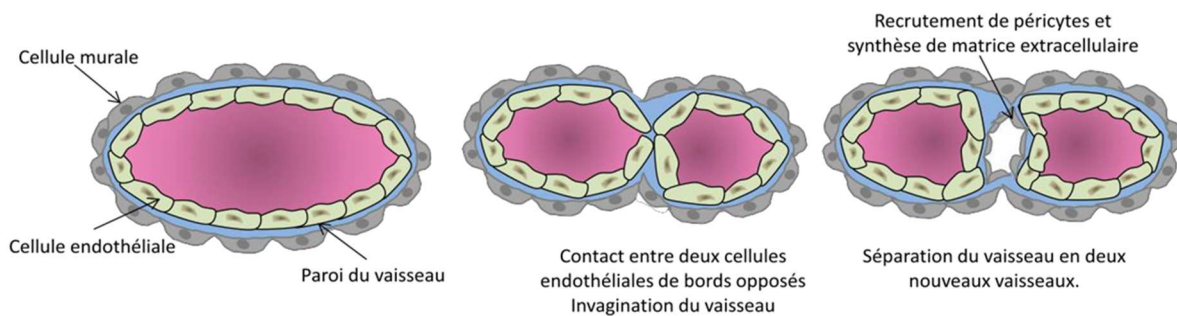


Figure 16 : Etapes de l'angiogenèse par intussusception<sup>75</sup>.

### 2.2.3. Facteurs de régulation de l'angiogenèse

Le contrôle de l'angiogenèse repose sur la balance entre l'action de facteurs pro- ou anti-angiogéniques<sup>76</sup>.

#### 2.2.3.1. Les principaux facteurs pro-angiogéniques

Les tissus ont besoin d'un apport suffisant en nutriments et en oxygène pour pouvoir maintenir leur fonctionnement. Cet apport est assuré par le sang. Or si le réseau vasculaire n'est pas suffisamment développé, les tissus sont insuffisamment oxygénés. Ils sont ainsi en hypoxie, ce qui inhibe la dégradation du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$ . Celui-ci va se lier à l'élément de réponse à l'hypoxie (HRE) présent sur le promoteur codant pour divers gènes dont le gène *VEGF*. L'hypoxie induit ainsi l'expression de VEGF et par conséquent l'angiogenèse<sup>72,77,78</sup>. Or, HIF-1 $\alpha$  régule également d'autres facteurs angiogéniques (Figure 17) qui vont favoriser la prolifération cellulaire, le bourgeonnement, la migration, l'adhésion et la formation de tubes<sup>79</sup>.

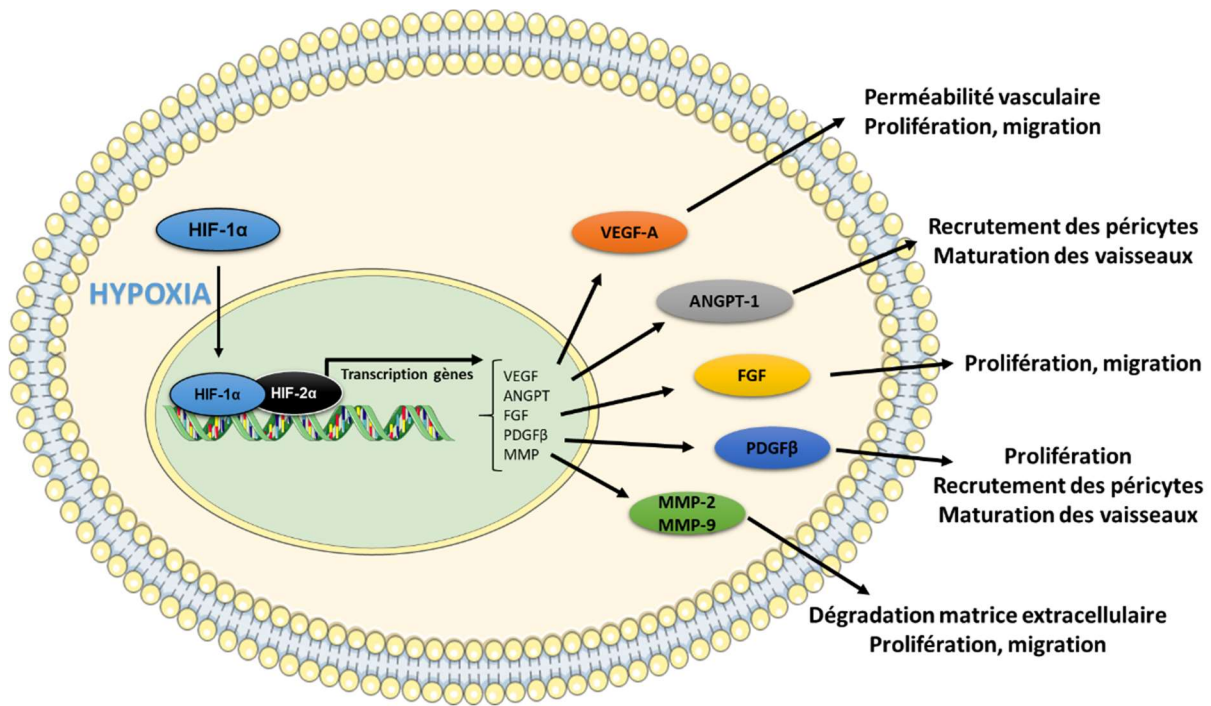


Figure 17 : Régulation de l'angiogenèse par l'hypoxie. (Inspiré de Krock et al.,<sup>79</sup>)

L'hypoxie augmente l'expression d'un deuxième facteur de transcription : HIF-2α qui va se lier au promoteur du gène codant pour l'ANGPT-1 et ainsi induire sa transcription. En d'autres termes, l'hypoxie provoque la sécrétion du facteur proangiogénique ANGPT-1<sup>80</sup>.

Parmi les acteurs de l'angiogenèse, VEGF-A est un élément pivot. Il fait partie de la famille de 5 glycoprotéines structurellement proches : VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D et VEGF-E. Les VEGF se lient spécifiquement sur des récepteurs tyrosine kinase : VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1, KDR ou CD309) et VEGFR-3 (Flt-4) (Figure 18).

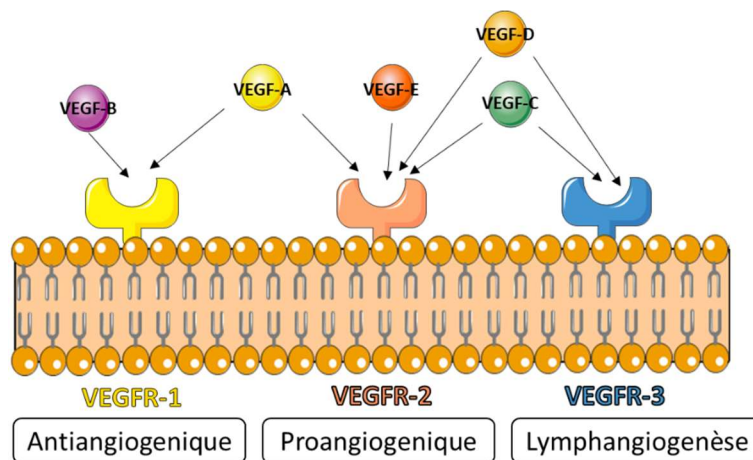


Figure 18 : Récepteurs VEGFR et leurs ligands (Inspiré de Shibuya<sup>81</sup>)



L'activation de VEGFR-2 dans les vaisseaux stimule l'angiogenèse tandis que VEGF-C et VEGF-D stimulent la lymphangiogenèse via leur fixation sur le récepteur VEGFR-3. VEGF-A et VEGF-B ont une forte affinité pour VEGFR-1, réduisant ainsi la disponibilité de VEGF-A pour se fixer sur VEGFR-2<sup>81</sup>. VEGFR-1 est ainsi identifié comme un régulateur négatif de VEGFR-2, en particulier dans sa forme soluble sVEGFR-1<sup>82</sup>. L'expression de VEGF-A est induite par des facteurs de croissance, des cytokines et, comme dit précédemment, l'hypoxie<sup>77</sup>. Lié à son récepteur VEGFR-2 sur les cellules endothéliales, il induit leur prolifération, leur migration ainsi que leur survie<sup>83</sup>. A noter que VEGF-A est élevé dans les sérums d'HI prolifératifs. Ce taux est réduit dans les hémangiomes en involution<sup>84</sup>.

L'angiopoïétine-1 est une glycoprotéine présente dans les cellules endothéliales et les péricytes<sup>51</sup>, faisant partie de la famille des angiopoïétines. Il en existe 4 (ANGPT-1, ANGPT-2, ANGPT-3 et ANGPT-4) dont le récepteur est la tyrosine kinase Tie-2. Le récepteur Tie-1 ne possède pas de ligand néanmoins il est capable de s'hétérodimériser avec Tie-2 et de modifier son activité. Il a été démontré que la délétion de Tie-2 et ANGPT-1 induit un réseau vasculaire désorganisé avec absence de cellules péri-vasculaires conduisant à la mort embryonnaire. Tie-2 et ANGPT-1 jouent ainsi un rôle dans la prolifération, la survie des cellules endothéliales et permettent le recrutement des péricytes et de surcroît la maturation des vaisseaux<sup>76,80</sup>.

Les facteurs de croissance TGF- $\alpha$  (*transforming growth factor alpha*) et EGF (*epidermal growth factor*) se lient au récepteur à l'EGF (EGFR). Ils favorisent la prolifération cellulaire, l'angiogenèse et réduisent l'apoptose<sup>76</sup>.

Il existe de nombreuses formes de facteurs de croissance des fibroblastes (FGF) dont deux sont très impliqués dans l'angiogenèse. FGF-1 (ou *acidific FGF*) et FGF-2 (ou *basic FGF*) stimulent l'angiogenèse en augmentant l'expression de VEGF et favorisent la prolifération et la migration des cellules endothéliales. FGF-2 est produit par les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les cellules myocardiques<sup>77</sup> et les fibroblastes. Il initie le bourgeonnement des nouveaux vaisseaux lors de processus comme la cicatrisation<sup>76,85</sup>.

Les métalloprotéinases (MMP) MMP-2 et MMP-9 sont des enzymes impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire. Elles jouent un rôle dans la prolifération cellulaire, la migration, l'embryogenèse, la cicatrisation et dans les processus de

l'angiogenèse notamment dans la croissance tumorale. MMP-9 est important dans la migration des cellules endothéliales et la tubulogénèse<sup>9</sup>.

La noradrénaline est un neurotransmetteur proangiogénique. Sa description est largement détaillée dans la troisième partie de ce mémoire. Des études ont montré que la noradrénaline favorise notamment l'angiogenèse tumorale en induisant la libération d'autres facteurs proangiogéniques tels que VEGF, MMP-2, MMP-9 et HIF-1 $\alpha$ <sup>86-90</sup>.

### 2.2.3.2. *Les principaux facteurs anti-angiogéniques*

De nombreuses recherches ont permis d'identifier des facteurs qui inhibent ou réduisent l'angiogenèse en réduisant la prolifération et la migration des cellules endothéliales. Parmi eux la thrombospondine, glycoprotéine libérée par les plaquettes en réponse à un stimulus<sup>91,92</sup>, et l'endostatine, issue de la dégradation du collagène XVIII, qui favorise l'apoptose<sup>93</sup>. L'angiostatine est un fragment issu de la digestion de l'enzyme plasminogène impliquée dans la coagulation. En plus d'inhiber la prolifération et la migration cellulaire, l'angiostatine réduit la différenciation et enfin la formation de tubes. A noter que le plasminogène entier n'inhibe pas l'angiogenèse<sup>94,95</sup>.

L'ANGPT-2 est exprimée dans les cellules endothéliales et les péricytes. Possédant 60 % d'acides aminés identiques à l'ANGPT-1, elle se fixe sur les récepteurs Tie-2 avec la même affinité<sup>72</sup>. Par sa fixation sur Tie-2, l'ANGPT-2 bloque l'activation du récepteur par l'ANGPT-1<sup>77</sup>. Il s'agit ainsi d'un antagoniste naturel de l'ANGPT-1. Néanmoins son rôle dans l'angiogenèse reste complexe car *in vivo* l'ANGPT-2 favorise l'angiogenèse tumorale en présence de VEGF, et facilite la régression des vaisseaux tumoraux en absence de VEGF<sup>46</sup>.

Les inhibiteurs des métalloprotéinases de la matrice (TIMPs) empêchent la dégradation de la matrice extracellulaire et inhibent l'angiogenèse<sup>77</sup>. Des études ont montré qu'ils sont exprimés dans la phase d'involution et absents dans la phase proliférative des HI<sup>96</sup>.

Enfin, la dopamine, neurotransmetteur synthétisé à partir de l'acide aminé tyrosine, une fois fixée sur son récepteur D<sub>2</sub>, inhibe la prolifération des cellules et réduit le niveau d'AMPc. De plus, elle inhibe la phosphorylation de VEGFR-2 induite par la fixation de VEGF dans les cellules endothéliales et les cellules endothéliales

progénitrices<sup>87</sup>. La dopamine favorise l'expression de l'ANGTP-1 dans les péricytes ce qui va favoriser la maturation et la stabilisation des vaisseaux et ainsi ralentir l'angiogenèse<sup>87,88</sup>.

#### 2.2.4. Modèles d'études de l'angiogenèse

Diverses techniques ont été mises au point afin de comprendre les mécanismes d'angiogenèse. Voici une liste non exhaustive des divers modèles existants.

##### 2.2.4.1. *Modèles in vivo*

###### « Matrigel plug assay »

Le matrigel est une membrane basale extraite de sarcome de souris EHS (Engelbreth-Holm-Swarm). Il est riche en protéines de la matrice extracellulaire et en facteurs de croissance. Il favorise l'attachement et la différenciation de nombreuses cellules dont les cellules endothéliales. Il est utilisé dans les modèles d'angiogenèse sous forme de gel, permettant ainsi de travailler en 3D ou de créer des modèles. Les cellules d'intérêt (cellules endothéliales ou tumorales) sont suspendues dans le matrigel. Ce dernier est ensuite injectée chez la souris (Figure 19). Les cellules vont proliférer et se différencier pour former des vaisseaux<sup>76</sup>.

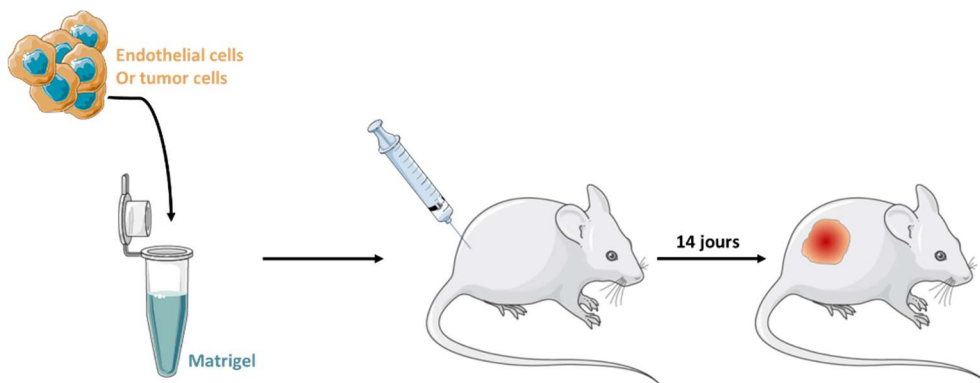


Figure 19 : Protocole de matrigel plug assay (Source : P. Kaulanjan-Checkmodine)

###### *Modèle de la rétinopathie induite par l'oxygène*

Le modèle de la rétinopathie induite par l'oxygène (RIO) chez la souris ou le rat est largement utilisé notamment comme modèle de la rétinopathie du prématuré. La rétinopathie est un processus néo vasculaire anormal de la rétine. Dans le cas des

prématurés, la vascularisation de la rétine est incomplète. En quelques mots, lorsqu'un nouveau-né naît prématurément il est placé en oxygénothérapie, méthode visant à apporter artificiellement de l'oxygène. Cette dernière entraîne une hyperoxie au niveau de la rétine. A l'arrêt du traitement, lors d'un retour du nouveau-né sous une atmosphère normale en oxygène, la rétine est soumise à une forme d'hypoxie se traduisant ainsi par une augmentation importante de facteurs proangiogéniques<sup>97</sup>. Ce passage de l'hyperoxie vers l'hypoxie provoque une accélération de l'angiogénèse donnant un réseau de vaisseaux prolifératifs et désorganisés.

Dans le cas du modèle RIO, les souris sont placées sous atmosphère contrôlée avec un taux d'oxygène généralement à 75 %. Puis elles sont replacées en atmosphère ambiante (environ 21 % O<sub>2</sub>). Ce changement brutal de teneur en oxygène provoque une forte angiogénèse avec une vascularisation anormale mimant la rétinopathie. Les souris sont euthanasiées et les yeux sont prélevés dans le but d'étudier l'histologie de la RIO.

#### « Chick Chorioallantoic Membrane » (CAM) assay

La membrane chorio-allantoïdienne de l'embryon de poulet (CAM) est un tissu richement vascularisé tapissant l'intérieur de la coquille de l'œuf. Dans ce modèle, les cellules d'intérêt sont injectées dans un anneau de polyéthylène préalablement déposé sur la CAM. L'angiogénèse est ensuite suivie<sup>98</sup>.

#### 2.2.4.2. Modèles *in vitro*

L'angiogénèse repose sur plusieurs critères : la prolifération des cellules endothéliales, leur migration puis leur capacité à former des tubes.

#### *Test de prolifération*

La prolifération des cellules impliquées dans l'angiogénèse peut être étudiée par test MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazoliumbromide). Le MTT est un sel de tétrazolium capable de pénétrer à l'intérieur des cellules pour y être réduit en un composé coloré, le formazan. Le test Sulforhodamine B (SRB) permet également de mesurer la prolifération cellulaire. Ce test repose sur la capacité du colorant fluorescent sulforhodamine B, en condition acide, à se lier sur les acides aminés basiques des

protéines des cellules préalablement fixés à l'acide trichloroacétique. Sous des conditions basiques, le SRB peut être extrait des cellules et solubilisé pour être mesuré. Comme pour tout test de prolifération, l'intensité de fluorescence est directement proportionnelle au nombre de cellules.

### *Test de migration*

Pendant les processus d'angiogenèse, les cellules endothéliales migrent en réponse à un gradient de facteurs proangiogéniques. L'étude de leur capacité de migration se fait par un système de *transwell* (Figure 20). Les cellules endothéliales sont déposées sur la chambre supérieure. La chambre inférieure est composée de milieu contenant un ou des facteurs angiogéniques selon l'étude. Les cellules vont migrer et passer dans la chambre inférieure.

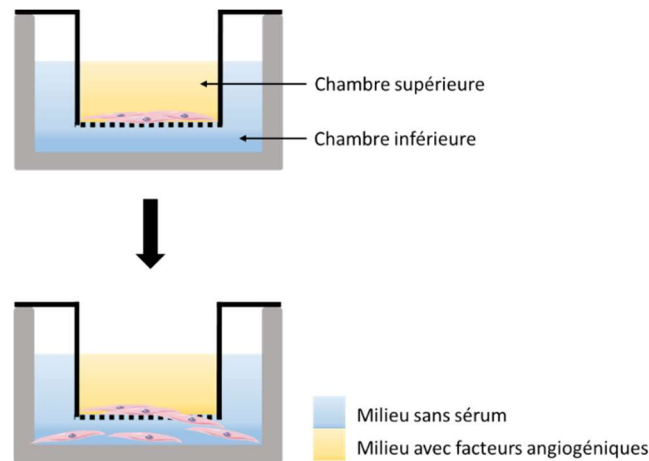


Figure 20 : Test de migration cellulaire (Source : P. Kaulanjan-Checkmodine)

La migration des cellules endothéliales peut également être étudiée par un *scratch assay*. Les cellules sontensemencées à forte confluence puis une rayure « scratch » est réalisée. La migration des cellules au niveau du scratch est alors suivie.

### « *Sprouting Assay* »

Le *sprouting assay* est un test qui mime l'angiogenèse par bourgeonnement. Les cellules endothéliales sont suspendues dans du milieu contenant de la méthyl cellulose puis elles sont mises en culture pendant 24 heures dans des plaques 96 puits à fonds ronds. Dans ces conditions, les cellules en suspension vont former des sphéroïdes dans la cellulose. Ces sphéroïdes sont collectées puis placées dans du milieu contenant du

collagène afin de stabiliser la structure. Puis elles sont déposées sur une couche de matrigel ou de collagène<sup>99,100</sup>. Au bout de 24 heures, la formation de vaisseaux par bourgeonnement peut être observée (Figure 21).

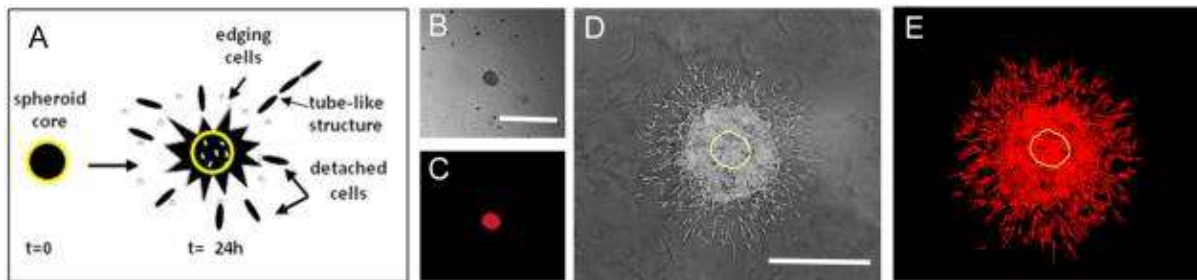


Figure 21 : Angiogenèse par bourgeonnement (ou « *sprouting assay* ») in vitro. A Représentation de l'évolution des sphéroïdes en culture. En jaune figure le sphéroïde initiale. B et C montrent les sphéroïdes avant culture puis au bout de 24 heures (D,E). Les images C et E représentent les images binarisées. Echelle = 500  $\mu$ m. <sup>99</sup>

### Formation de tubes ou tubulogenèse

Dans cette technique, les cellules endothéliales avec ou sans péricytes sont directement déposées sur une couche de matrice. Au bout de quelques heures, les cellules vont former spontanément des tubes (Figure 22). Cette matrice va orienter la formation de tubes et son choix dépend du sujet d'étude. En effet, les collagènes I et III permettent la prolifération cellulaire avec formation occasionnelle de tubes tandis que les collagènes IV et V assurent la formation extensive de tubes avec peu de prolifération. La matrice couramment utilisé est le matrigel. La formation des tubes peut être quantifiée et analysée à partir de divers paramètres : la longueur totale, le nombre de tubes et la surface recouverte par ceux-ci. Dans le cadre de ma thèse, j'ai utilisé cette technique pour les tests de tubulogenèse.

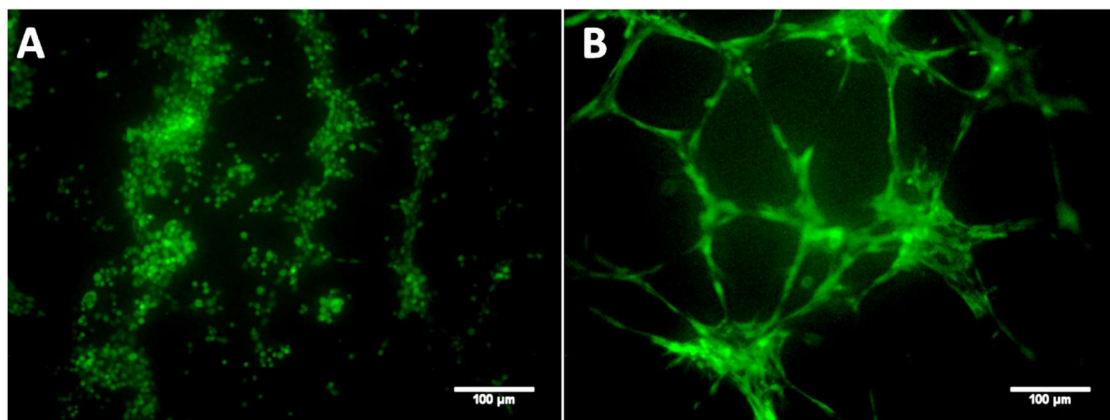


Figure 22 : Test d'angiogenèse avec des cellules endothéliales humaines de cordon ombilical (HUVEC). Observation à 30 minutes (A) et 18 heures (B) (Source : P. Kaulanjan-Checkmodine)

## 2.3. L'ANGIOGENESE DANS L'HEMANGIOME INFANTILE

### 2.3.1. Les facteurs angiogéniques impliqués dans l'hémangiome infantile

L'HI semble présenter un déséquilibre dans la balance des facteurs pro- et anti-angiogéniques. Or les facteurs qui régulent la croissance et l'involution de la tumeur sont encore mal connus. Cependant, un facteur pro-angiogénique majeur semble être impliqué dans la phase de prolifération : VEGF-A<sup>101</sup>. En effet, ce dernier est fortement exprimé dans les HI et son niveau d'expression est directement corrélé à la taille de la tumeur<sup>102</sup>. Jinnin *et al.*, ont montré qu'en conditions physiologiques les cellules endothéliales possèdent un complexe fonctionnel impliquant TEM8, l'intégrine  $\beta 1$  et VEGFR-2. Ce complexe induit la fixation du facteur de transcription NFAT (*nuclear factor in activated T cells*) sur le promoteur de *VEGFR-1* permettant ainsi d'induire son expression. Or une faible expression de VEGFR-1 a été retrouvée dans les cellules endothéliales d'HI<sup>27</sup> sans pour autant que le niveau d'expression de NFAT soit diminué à son tour dans ces mêmes cellules. Ces auteurs ont ainsi montré la présence d'une mutation dans les gènes de *TEM8* et *VEGFR-2* rendant le complexe TEM8/intégrine  $\beta 1$ /VEGFR-2 non fonctionnel et ne permettant donc pas la fixation de NFAT sur le promoteur de *VEGFR-1*. Ces mutations diminuent ainsi le nombre de VEGFR-1 et favorisent de ce fait indirectement la fixation de VEGF-A sur VEGFR-2 (Figure 23) induisant ainsi la migration et la prolifération des cellules endothéliales<sup>30,103</sup>.

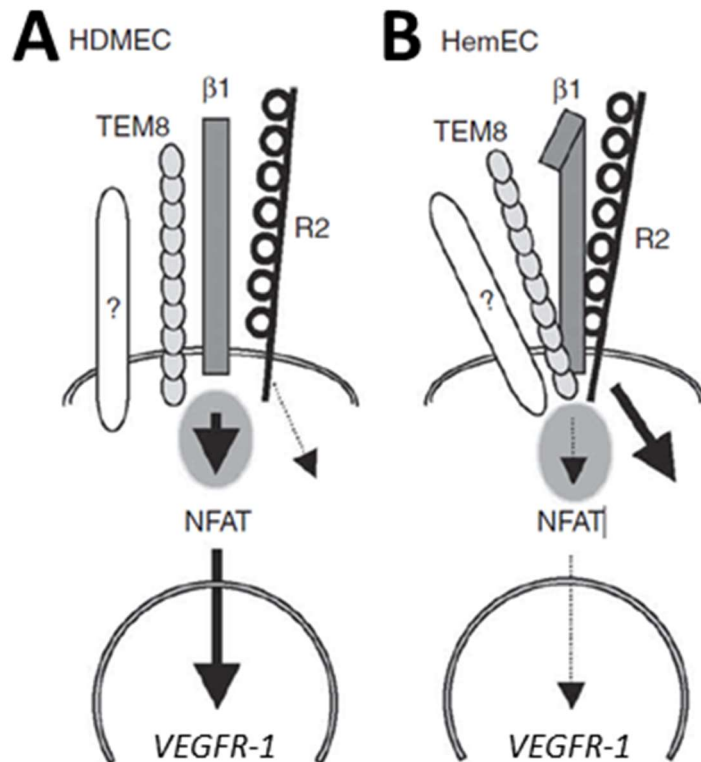


Figure 23 : Schéma résumant les voies affectées par l'HI. Dans les cellules endothéliales des micro vaisseaux humains dermiques (HDMEC, A), des interactions fonctionnelles entre l'intégrine  $\beta 1$ , le domaine extracellulaire de VEGFR2 (R2) et de TEM8 contrôlent l'activation de NFAT. Ce dernier induit l'expression de VEGFR-1. Dans les cellules endothéliales d'HI (HemEC, B), l'activation de NFAT est réprimée et provoque ainsi une faible expression de VEGFR-1. Ceci favorise ainsi l'activation de VEGFR2 par VEGF<sup>30</sup>.

Les métalloprotéinases MMP2 et MMP9 ont aussi été retrouvées dans les tissus d'HI et dans les urines de patients. Leur niveau d'expression est diminué après traitement au propranolol dans les tissus ayant reçu un traitement<sup>9,104,105</sup>.

Pour conclure, l'ensemble des études semblent indiquer un déséquilibre de la balance facteurs pro- et anti-angiogéniques en faveur des facteurs pro-angiogéniques. Ce qui expliquerait la formation accrue de vaisseaux dans l'HI.

### 2.3.2. Hypothèses sur le mécanisme d'action du propranolol dans l'hémangiome infantile

Un rôle anti-angiogénique du propranolol a été proposé du fait de son efficacité dans l'HI et dans des modèles d'études tumoraux. En effet, son efficacité a été démontré dans les modèles d'angiogenèse tumorale *in vivo*, comme dans le cas du carcinome ovarien où son action diminue drastiquement la taille de la tumeur<sup>89</sup>. Trois



mécanismes ont été proposés pour expliquer l'effet du propranolol sur les cellules d'HI. Le premier repose sur un effet vasoconstricteur du propranolol, ce qui expliquerait la rapide diminution du volume de la tumeur et le pâlissement de la peau à la suite du traitement. Ce mécanisme est supporté par le fait que le propranolol ne change pas le nombre de vaisseaux formés par les cellules endothéliales et les péricytes d'HI implantés en matrigel dans des souris mais induit une diminution du volume de la lumière des vaisseaux<sup>50</sup>.

Le second mécanisme suppose que le propranolol bloque l'angiogenèse en inhibant la production de facteurs pro-angiogéniques tels que la production de VEGF induite par l'activation des ADRB par leurs agonistes. En effet, le niveau de VEGF plasmatique diminue chez les enfants ayant un HI après traitement systémique par le propranolol<sup>102</sup>. Par ailleurs, des études *in vitro* ont montré que des doses entre 10 et 120  $\mu\text{M}$  de propranolol inhibent la prolifération des cellules endothéliales<sup>106</sup>, leur migration<sup>107,108</sup> ainsi que la formation de tubes *in vitro*<sup>107,109,110</sup>, mécanismes impliqués dans l'angiogenèse. En effet, ces doses permettent de réduire l'expression de VEGF, MMP-9 et HIF-1 $\alpha$  facteurs majeurs l'angiogenèse<sup>9,88,111</sup>. D'autre part, le micro-ARN-382 (miR-382), un suppresseur tumoral dont l'hypoxie induit l'expression, est régulé positivement dans les cellules endothéliales d'HI dont il favorise la migration et la prolifération. Son niveau d'expression dans les cellules endothéliales d'HI est réduit par l'action du propranolol dès 30  $\mu\text{M}$ <sup>108</sup>.

Dans le dernier mécanisme, le propranolol favoriserait l'apoptose des cellules d'HI et par conséquent serait à l'origine de l'involution de la tumeur<sup>66,112</sup>.

Notons tout de même que la grande majorité des études *in vitro* publiées utilise des concentrations cytotoxiques du propranolol. En effet, notre équipe a observé que dès 30  $\mu\text{M}$ , le propranolol est cytotoxique (cf. partie résultats). Par ailleurs la concentration maximale en propranolol retrouvée dans le plasma chez des enfants traités avec 1-2 mg/kg/jour de propranolol est comprise entre 0,48 et 1,47  $\mu\text{M}$  soit environ 383 ng/ml<sup>113,114</sup>. La majorité des publications utilisent donc des doses de propranolol plus de 30 fois supérieures à la dose thérapeutique retrouvée chez les patients d'HI.

# 3. LES CATECHOLAMINES DANS LE MICROENVIRONNEMENT VASCULAIRE ET CUTANE

## 3.1. SYNTHÈSE ET DEVENIR DES CATECHOLAMINES

### 3.1.1. Définition des catécholamines

Les catécholamines sont des hormones monoaminées et des neurotransmetteurs. Elles sont majoritairement connues pour jouer un rôle dans la transmission de l'information dans le cerveau. En effet, des déséquilibres dans leur concentration peuvent être à l'origine de maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer. Toutefois les catécholamines peuvent assurer d'autres fonctions dans l'angiogenèse ou la physiopathologie cutanée par exemple.

Il existe trois catécholamines : la dopamine, la noradrénaline (norépinéphrine) et l'adrénaline (épinéphrine). Elles sont synthétisées à partir du même acide aminé : la tyrosine. De ce fait, elles possèdent une structure similaire (Figure 24).

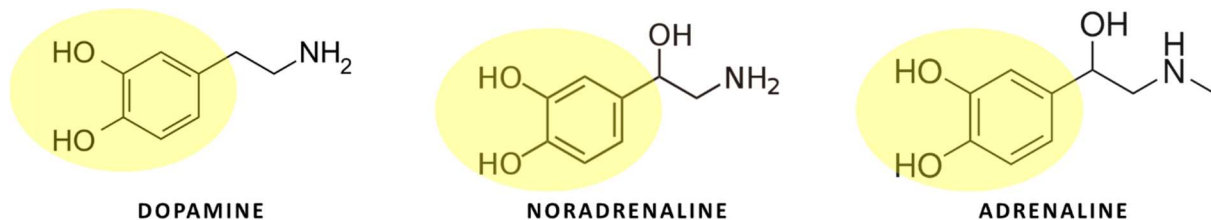


Figure 24 : Structure des catécholamines, la région commune aux trois neurotransmetteurs est colorée en jaune.

La noradrénaline et l'adrénaline sont les agonistes des récepteurs alpha et beta-adrénergiques (ADRB) ; tandis que la dopamine se fixe sur des récepteurs spécifiques D1 et D2.

### 3.1.2. La synthèse des catécholamines

La voie de biosynthèse des catécholamines débute par l'hydroxylation de la L-tyrosine en L-DOPA par la tyrosine hydroxylase. Elle constitue l'étape limitante de la synthèse des catécholamines<sup>115</sup>. La L-DOPA est décarboxylée en dopamine par la L-DOPA décarboxylase. La dopamine est hydroxylée en noradrénaline par la

dopamine- $\beta$ -hydroxylase, qui, à son tour, est méthylée en adrénaline par la phényléthanolamine-N-méthyltransférase (Figure 25). La synthèse des catécholamines est réalisée dans le cytoplasme hormis la conversion de la dopamine en noradrénaline qui a lieu dans des vésicules<sup>116</sup>.

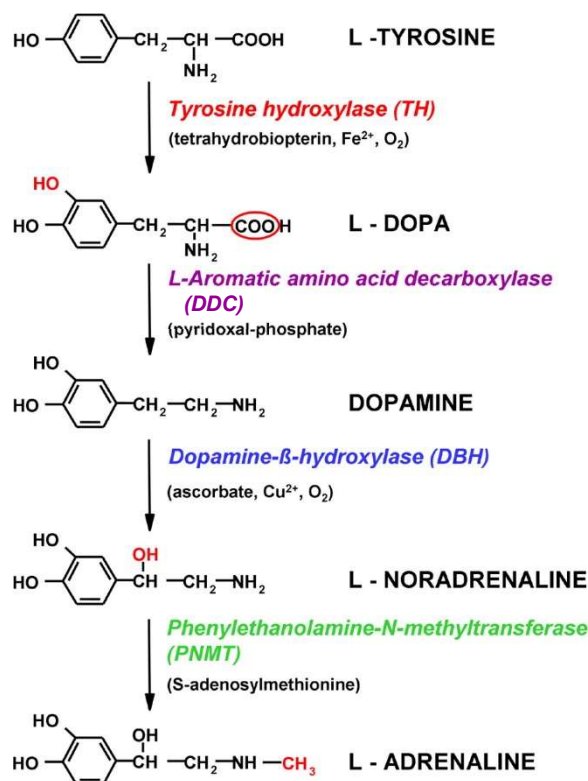


Figure 25 : Voie de biosynthèse des catécholamines<sup>117</sup>

S'il est bien connu que les catécholamines sont produites dans le système nerveux central et dans la glande médullosurrénale (par les cellules chromaffines), elles sont également synthétisées par les cellules intestinales non neuronales, les lymphocytes<sup>87</sup> et les macrophages<sup>118</sup>. Des études récentes ont montré que les cellules endothéliales sont également capables de synthétiser les trois catécholamines<sup>118</sup>. Les cellules de la peau en particulier les kératinocytes et les mélanocytes peuvent eux aussi synthétiser l'adrénaline et la noradrénaline<sup>119-121</sup>.

### 3.1.3. La dégradation des catécholamines

Les catécholamines sont métabolisées par les enzymes catéchol-O-méthyltransférase (COMT) et monoamine oxydase (MAO) pour former des métabolites inactifs. La COMT catalyse la méthylation des catécholamines et la MAO catalyse leur désamination. Selon le substrat, cette réaction donne divers produits (Figure 26).

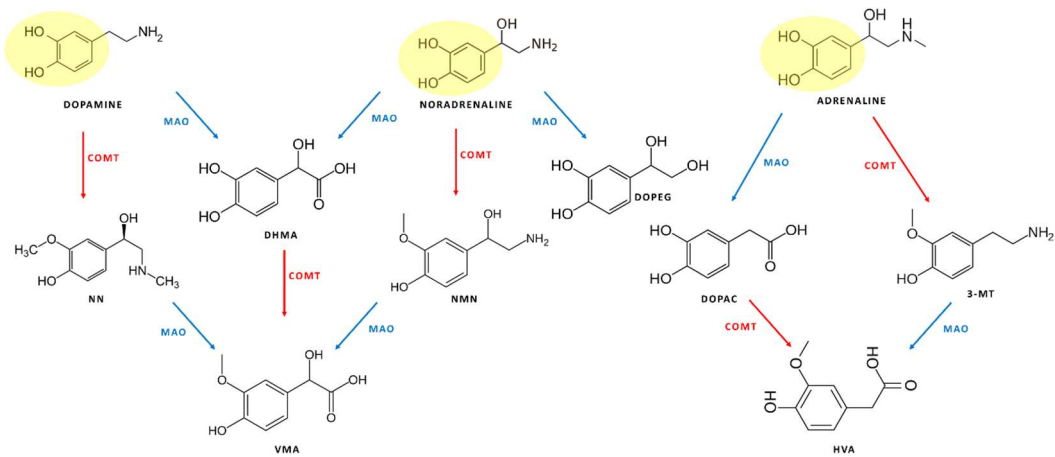


Figure 26 : Métabolisme de dégradation des catécholamines. 3-MT : 3-méthoxytyramine, COMT : catéchol-O-méthyltransférase, DHMA : acide dihydroxymandélique, DOPAC : acide 3,4-dihydroxyphenil-acétique, DOPEG : 3,4-dihydroxyphényléthylénergol, HVA : acide homovanillique MAO : monoamine oxydase, MN : méthanéphrine, NMN : norméthanéphrine, VMA : acide vanillyl-mandélique (Source : P. Kaulanjan-Checkmodine)

## 3.2. LES RECEPTEURS BETA-ADRENERGIQUES : CIBLES DES CATECHOLAMINES

### 3.2.1. Structure des récepteurs beta-adrénergiques

Il existe différents types de récepteurs adrénergiques : les récepteurs alpha-1, alpha-2 et les récepteurs beta-1, beta-2, beta-3 adrénergiques (ADRB). Je détaillerai davantage les ADRB car le propranolol est un de leurs antagonistes.

Les ADRB sont des récepteurs couplés à la protéine G. Ils possèdent sept domaines transmembranaires divisés en 3 boucles. Ils ont une extrémité N-terminale extracellulaire et une extrémité C-terminale intracellulaire (Figure 27)<sup>122</sup>.

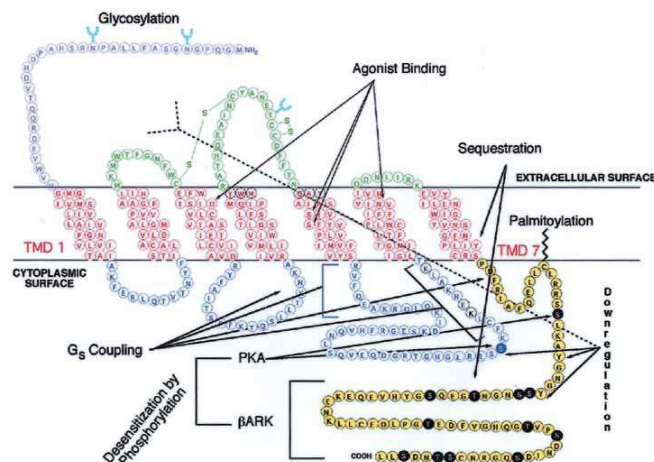


Figure 27 : Structure du récepteur beta-2 adrénergique <sup>122</sup>

Les ADRB sont exprimés dans divers types cellulaires dont les cellules de la peau (fibroblastes<sup>119</sup>, kératinocytes<sup>123,124</sup> et mélanocytes<sup>121,125</sup>), les cellules de l'endothélium (cellules endothéliales et péricytes<sup>9,126</sup>) et les mastocytes<sup>5</sup>. Des études, dont une réalisée au sein de notre équipe, ont également permis de montrer la présence des ADRB dans les cellules souches CD133+, les cellules endothéliales et les péricytes d'HI<sup>5,39,66,112,127,128</sup>.

### 3.2.2. La voie beta-adrénérique

L'activation de ces récepteurs est réalisée après fixation des agonistes. La sous-unité  $\alpha$  de la protéine G active l'adénylate cyclase qui convertit l'adénosine triphosphate (ATP) en AMPc. L'AMPc, à son tour, va activer la protéine kinase A (PKA)<sup>101</sup> (Figure 28). Cette cascade de signalisation est impliquée dans divers mécanismes dont la vasodilatation des vaisseaux<sup>9</sup>, la cicatrisation, etc...

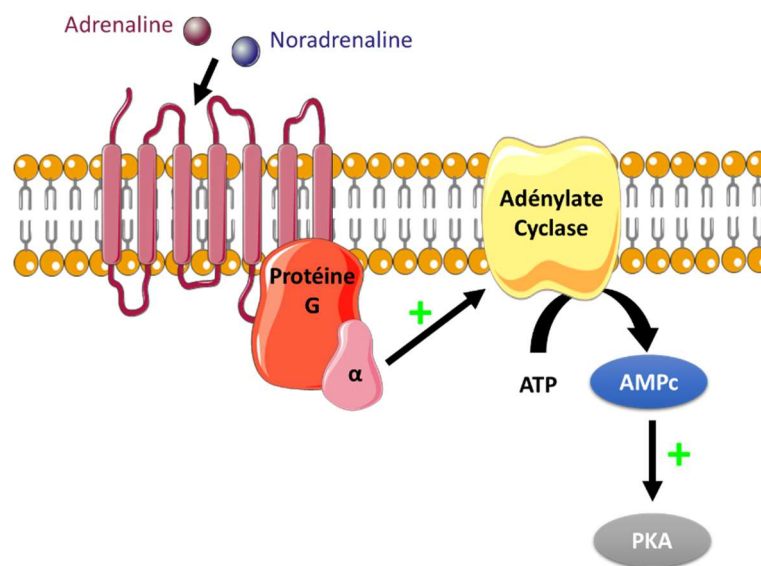


Figure 28 : Voie canonique de signalisation des récepteurs beta-adrénériques

### 3.3. ROLES DES CATECHOLAMINES DANS L'ANGIOGENESE ET LA PEAU

Les catécholamines sont principalement connues pour occuper un rôle dans la physiologie de processus neurologiques, psychiatriques, métaboliques et cardiovasculaires. Je détaillerai ici principalement leur rôle au sein de l'angiogenèse et du microenvironnement cutané.

### 3.3.1. Les catécholamines dans l'angiogenèse

Des études suggèrent que l'activation des ADRB par la noradrénaline induit le recrutement, sur le site, de macrophages produisant ainsi une grande quantité de MMP-2, de MMP-9 et de VEGF<sup>88,90</sup>, favorisant ainsi l'angiogenèse. De plus, la fixation des catécholamines sur les ADRB induit la synthèse et la libération de l'interleukine proangiogénique IL-6 dans les lignées tumorales du cancer de l'ovaire<sup>87</sup>. Chen *et al.* ont montré que la noradrénaline induisent *in vitro* l'expression de JAGGED-1 par les cellules cancéreuses du sein et que l'incubation de cellules endothéliales de cordon ombilical avec le surnageant des cellules cancéreuses du sein activées par la noradrénaline stimule la voie Notch, induisant ainsi une angiogenèse tumorale<sup>86</sup>.

En revanche, la dopamine présente un effet anti-angiogénique. Le traitement de tumeurs par de la dopamine *in vivo* inhibe la croissance tumorale et l'angiogenèse. La dopamine a aussi un rôle dans la vasculogenèse en inhibant la migration des cellules progénitrices endothéliales<sup>129</sup>.

### 3.3.2. Les catécholamines dans la physiologie cutanée

Près de 90 % des HI sont présents dans la peau, suggérant que le microenvironnement cutané est favorable au développement de cette pathologie. La peau est constituée de trois couches superposées qui sont l'hypoderme, le derme et l'épiderme (Figure 29).

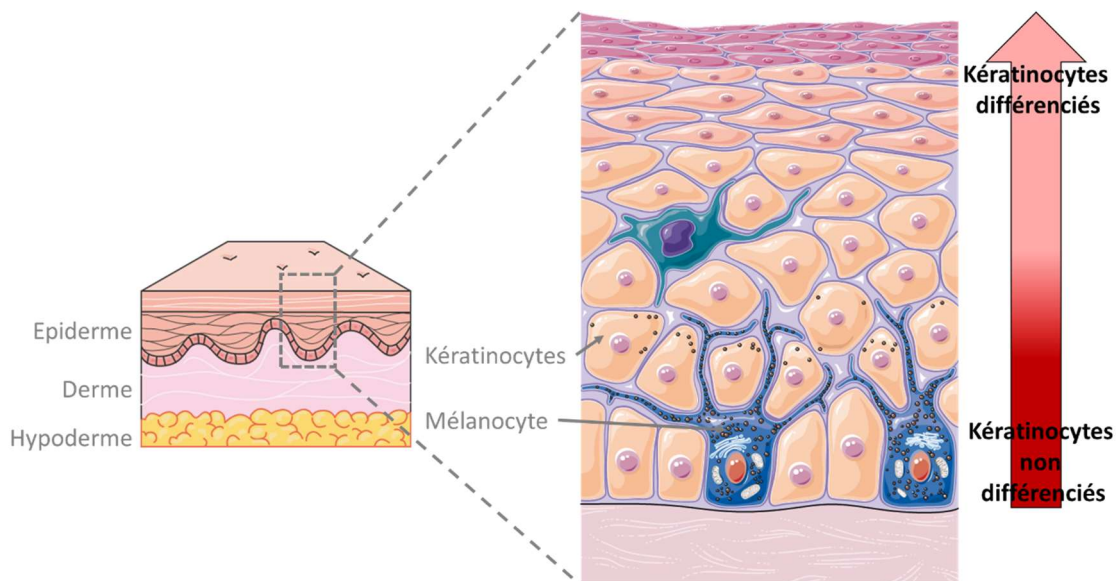


Figure 29 : Structure de la peau (Illustration Servier Medical Art)

L'épiderme est composé principalement de :

- Kératinocytes, cellules assurant la structuration de l'épiderme,
- Cellules de Langerhans, cellules présentatrices d'antigènes capables d'orienter la réponse immunitaire,
- Cellules de Merkel qui sont des acteurs-clés du système neuro-endocrine cutané,
- Mélanocytes, cellules à l'origine de la production de la mélanine.

Le derme est un tissu conjonctif contenant des fibroblastes, des mastocytes, des macrophages, des annexes épidermiques (les follicules pilo-sébacés, les glandes sudoripares, les ongles), des vaisseaux (composés de cellules endothéliales et péricytes) et des nerfs. L'hypoderme est essentiellement constitué de tissus adipeux.

#### *3.3.2.1. Différentiation des kératinocytes épidermiques*

A la différence des kératinocytes différenciés, les kératinocytes indifférenciés expriment un grand nombre de récepteurs ADRB. Ils expriment également davantage les enzymes de synthèse des catécholamines. Il a été ainsi supposé que les catécholamines jouent un rôle dans la différenciation des kératinocytes<sup>121,130</sup>.

#### *3.3.2.2. Implication des catécholamines dans la cicatrisation*

Les ADRB sont impliqués dans le mécanisme de cicatrisation de l'épiderme. En effet, leur activation retarde la ré-épithélisation de la barrière épidermique par les kératinocytes, tandis que leur blocage favorise celle-ci (Figure 30). Des résultats *in vitro* ont montré que le processus de migration impliqué dans la cicatrisation, modélisée par un *scratch assay*, réduit l'expression des ADRB dans les kératinocytes et diminue ainsi leur accessibilité pour les catécholamines. De plus, la cicatrisation favorise la dégradation de la noradrénaline en DOPEG (3,4-dihydroxyphenylglycol). Il a été démontré que l'ajout de noradrénaline dans le milieu de culture des kératinocytes ralentit la migration, tandis que l'ajout de timolol, antagoniste des récepteurs ADRB, accélère ce mécanisme<sup>131,132</sup>.

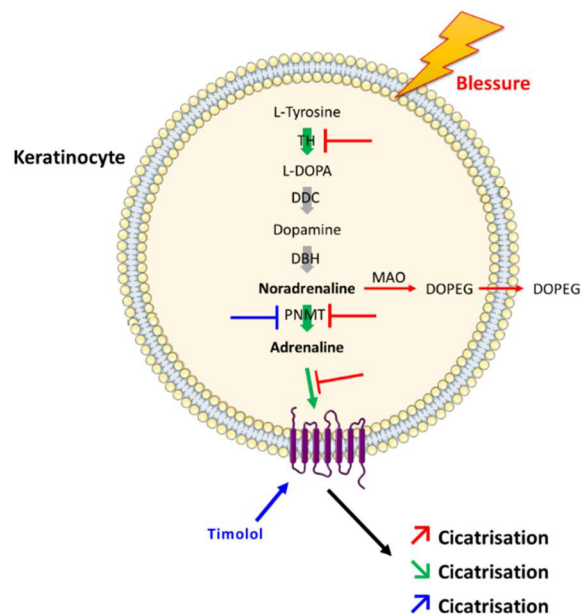


Figure 30 : Mécanisme d'action possible des catécholamines dans la cicatrisation épidermique

### 3.4. LES ANTAGONISTES DES CATECHOLAMINES

#### 3.4.1. Mode d'action des bêtabloquants

Les bêtabloquants sont des antagonistes compétitifs des catécholamines. Du fait de leurs similarités structurales, ils bloquent les récepteurs ADRB et empêchent ainsi l'action des catécholamines. Les bêtabloquants diffèrent les uns des autres par leur affinité pour les récepteurs et selon l'existence ou non d'une action sympathomimétique intrinsèque (effet agoniste partiel)<sup>133</sup>. Selon leur affinité pour les ADRB, les bêtabloquants peuvent être non sélectifs – s'ils bloquent de façon compétitive tous les récepteurs (cas du propranolol, nadolol et timolol) – ou cardiosélectifs, s'ils ont une affinité plus importante pour les récepteurs  $\beta_1$  (cas de l'aténolol) (Tableau 2).

Tableau 2 : Affinité des bêtabloquants pour les récepteurs bêta-adrénergiques, inversement proportionnelle à la constante  $K_D$ <sup>133</sup>

|                    | Constante d'affinité $K_D$ ( $\cdot 10^{-9}$ ) |           |           |
|--------------------|--|-----------|-----------|
|                    | $\beta_1$                                      | $\beta_2$ | $\beta_3$ |
| <b>Aténolol</b>    | 218,78   | 1 023,29  | 234,42    |
| <b>Propranolol</b> | 6,91   | 0,83      | 117,49    |
| <b>Nadolol</b>     | 58,80  | 2,51      | 660,50    |
| <b>Timolol</b>     | 5,37   | 0,21      | 158,49    |



### 3.4.2. Cas d'un bêtabloquant : le propranolol

#### 3.4.2.1. Structure

Le propranolol est un bêtabloquant synthétique non sélectif sans activité sympathomimétique intrinsèque (Figure 31), découvert par Sir James Black en 1965<sup>134</sup> qui a reçu le Prix Nobel en Physiologie et Médecine en 1988 pour ce travail.

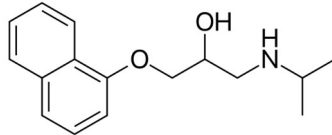


Figure 31 : Structure du propranolol

Les catécholamines et ce bêtabloquant se fixent aux ADRB via leur groupes hydroxyles (-OH) et amine (-NH) (Figure 32)<sup>135</sup>.

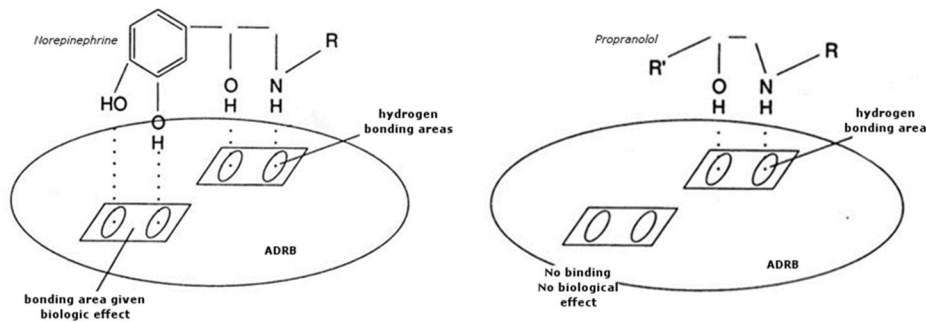


Figure 32 : Site de fixation des catécholamines et du propranolol sur les ADRB (Source: S. Prey)

Le propranolol est habituellement utilisé dans le traitement contre l'hypertension, l'infarctus du myocarde, les migraines et l'anxiété. Néanmoins sa surprenante efficacité et sa faible capacité à provoquer des effets secondaires dans le traitement des HI en ont fait un traitement de première ligne.

#### 3.4.2.2. Effets du propranolol dans la réponse médiée par la noradrénaline dans les hémangiomes infantiles

La noradrénaline par sa fixation sur les ADRB induit la production d'AMPC et l'activation de PKA, provoquant l'activation d'HIF-1 $\alpha$  par la voie PI3K et ainsi la production de VEGF-A et l'angiogenèse. Le propranolol par sa fixation aux récepteurs ADRB est capable d'inhiber HIF-1 $\alpha$  et la production de VEGF-A<sup>101,129,136</sup>. L'isoprénaline, agoniste des ADRB, tout comme la noradrénaline favorise la

prolifération et augmente l'expression de VEGF-A et VEGFR-2 dans les cellules endothéliales d'HI, effets qui sont réduits par incubation avec l'ICI 118551, un bêtabloquant spécifique des récepteurs beta2-adrénériques<sup>128</sup>. Il a été suggéré que le propranolol posséderait un mécanisme similaire, dépendant d'ADRB2, sur les cellules endothéliales d'HI et serait capable de réduire la prolifération des cellules endothéliales et l'expression de VEGF-A et VEGFR-2 induite par la noradrénaline. Pan *et al.* ont montré que, dans les cellules endothéliales d'HI, le propranolol inhibe l'augmentation de deux régulateurs du cycle cellulaire – les cyclines A2 et D2 – induits par l'action de la noradrénaline. De plus, contrairement à la noradrénaline, le propranolol favorise les phases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, phases où les cellules sont quiescentes ou en phase de préparation de la réplication à l'ADN ; et diminue l'entrée des cellules en phases S et G<sub>2</sub>/M<sup>90</sup>. Une nouvelle fois, ces études ont été faites avec des concentrations élevées et cytotoxiques de propranolol (50 µM) ainsi ces résultats sont à interpréter avec beaucoup de précaution.

L'ensemble des éléments rapportés dans la bibliographie sur les processus et facteurs impliqués dans la prolifération anormale des cellules endothéliales d'HI a ainsi suggéré un mécanisme hypothétique d'action du propranolol sur la tumeur (Figure 33).

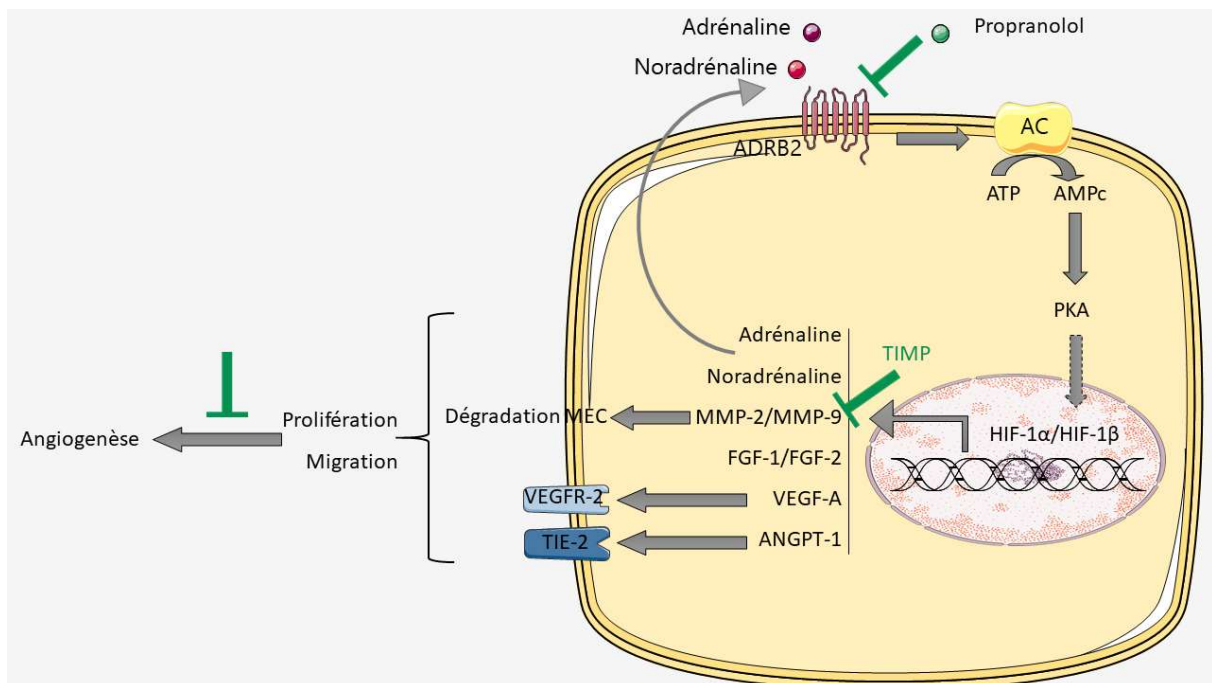


Figure 33 : Modèle hypothétique du mécanisme d'action du propranolol dans l'angiogenèse anormale des HI. AC : adénylate cyclase, ATP : Adénosine triphosphate, AMPc : Adénosine monophosphate cyclique, PKA : Protéine kinase A, TIMP : inhibiteur des MMP



## OBJECTIF DES TRAVAUX

L'efficacité du propranolol dans le traitement des HI et sa faible capacité à donner des effets secondaires ont suscité l'intérêt de la communauté scientifique, et de nombreux travaux pour élucider son mécanisme d'action ont été entrepris. La compréhension de ce mode d'action pourrait permettre un repositionnement dans le traitement d'autres affections ou la mise au point de nouvelles molécules. Les catécholamines, agonistes des ADRB, pouvant réguler l'angiogenèse et les cellules endothéliales étant capables de les synthétiser, la question de la relation entre les catécholamines et le mécanisme d'action du propranolol dans l'HI était clairement posée.

L'objectif de ma thèse a donc été dans un premier temps d'étudier le niveau tissulaire des catécholamines et de leurs enzymes de synthèse, par méthode immuno-enzymatique ELISA d'une part et par marquages immunohistochimiques et immunoblots d'autre part. Ainsi, la production de catécholamines dans l'HI a pu être attribuée à deux types cellulaires : les cellules endothéliales et les péricytes. En se basant sur la technique de Bischoff *et al*<sup>51</sup>, nous avons mis au point une technique d'isolement, à partir d'un même prélèvement d'HI, des cellules endothéliales, des péricytes et des cellules souches CD133+, considérées comme centrales dans le développement de la tumeur<sup>18</sup>. L'amélioration que j'ai apportée à cette technique a été l'ajout de la dispase à la collagénase pour la digestion du tissu. En effet, les cellules endothéliales et les péricytes interagissent entre elles via de la fibronectine<sup>137</sup>. Cette protéine d'adhésion peut être digérée par la dispase contrairement à la collagénase<sup>138</sup>. Ainsi, pour multiplier les chances d'obtenir une quantité suffisante de cellules et favoriser la digestion du tissu, j'ai fait le choix d'utiliser ces deux enzymes dans l'étape de digestion tissulaire.

De plus, l'expression de marqueurs hypoxiques dans l'HI, nous a conduit à étudier dans les cellules isolées d'HI, le taux des catécholamines et l'expression de leurs enzymes de synthèse en réponse à un stress hypoxique ou hyperoxique en présence ou non de

propranolol. Lors de cette étude, nous n'avons pas obtenu les résultats attendus. Ils seront néanmoins présentés dans la partie « résultats complémentaires » de ce mémoire. Ces résultats nous ont fait changer de stratégie en réalisant un modèle *in vitro* en co-culture.

Des tests d'angiogenèse réalisés sur des co-cultures de cellules endothéliales et de péricytes, en présence de noradrénaline ou de propranolol ont permis d'étudier leurs effets sur un modèle simplifié d'HI.

En parallèle de mon projet principal, j'ai eu le plaisir de travailler sur le projet du Dr François Moisan. L'absence de vrais modèles d'étude de l'HI répondant au propranolol a conduit notre équipe à développer un modèle tumoral *in vivo* sensible à une dose de propranolol similaire à la dose thérapeutique donnée aux patients (2 mg/kg/jour). En partant du postulat que le phénotype de barrière des vaisseaux d'HI soit une caractéristique intrinsèque de la tumeur liée à sa sensibilité spécifique aux bêtabloquants, nous avons recherché un modèle tumoral possédant cette fonction de barrière et répondant au propranolol. En effet, l'expression de GLUT-1, uniquement présente dans les cellules endothéliales (CE) d'HI est un marqueur phénotypique d'un certain type de vaisseaux à endothélium continu et jonctions serrées typique des barrières hémato-tissulaire comme observé dans le cerveau, le placenta, le testicule ou la rétine mais qui est tout à fait inhabituel et possiblement pathologiques dans la peau<sup>13</sup>. Il a donc été jugé important d'avoir un modèle proche au niveau vasculaire de l'HI marqué par le transporteur GLUT-1. Les tumeurs présentant un endothélium avec le phénotype de barrière hémato-tissulaire sont rares. Comme le signalent North *et al.*, les gliomes possèdent une expression de GLUT-1 endothéliale persistante malgré une fonction barrière altérée<sup>13</sup>. De plus, il a été démontré que certains glioblastomes sont positifs pour l'expression des ADRB2, cibles potentielles du propranolol<sup>13</sup>. Nous avons ainsi choisi le modèle xéno greffe sous-cutanée chez la souris de la lignée de glioblastome U87-MG. Les cellules U87-MG ont été invalidées pour l'expression de ADRB2 à l'aide d'un shRNA. Ces cellules inhibées pour ADRB2 ou des cellules témoins (sh contrôle) ont été xéno greffées par injection sous-cutanée chez des souris immunodéficientes et l'efficacité du propranolol, donné par voie orale, a été évaluée sur les tumeurs induites. L'analyse protéomique des différents groupes de tumeurs a permis d'identifier l'Aquaporine-1 (AQP1) comme cible du propranolol. Ainsi la

localisation de la protéine a été étudiée *in situ* dans les tissus d'HI afin d'établir une hypothèse sur la cible cellulaire du propranolol dans l'HI.

L'ensemble de ces résultats contribue à une meilleure compréhension du mécanisme d'action du propranolol dans les HI.



## RESULTATS

---

|   |            |
|---|------------|
| <b>PARTIE 1 : LES CATECHOLAMINES ET LEUR ROLE DANS LE DEVELOPPEMENT DE L'HEMANGIOME INFANTILE .....</b> | <b>80</b>  |
| Résumé.....   | 80         |
| Article .....   | 83         |
| <b>PARTIE 2 : L'AQUAPORINE-1 JOUE UN ROLE CLE DANS LA REPONSE ANTITUMORALE AU PROPRANOLOL .....</b>     | <b>112</b> |
| Résumé.....   | 112        |
| Article .....   | 115        |

---



## PARTIE 1 : LES CATECHOLAMINES ET LEUR ROLE DANS LE DEVELOPPEMENT DE L'HEMANGIOME INFANTILE

### Résumé

Les études précédemment menées au laboratoire ont montré l'expression des ADRB dans les tissus d'HI par immunohistochimie<sup>5</sup>. Cependant, leur expression ne varie ni en fonction de la phase de l'HI ni avec le traitement au propranolol. Ce dernier agissant comme antagoniste des ADRB, nous nous sommes interrogés sur l'implication des catécholamines, agonistes de ces récepteurs et acteurs de l'angiogenèse<sup>87</sup>, dans le développement et l'involution de la tumeur.

Dans cette étude, nous montrons la présence de catécholamines, majoritairement de la noradrénaline, dans les tissus d'HI. La noradrénaline est nettement diminuée en phase d'involution ou après traitement au propranolol. Elle est également trouvée dans les tissus d'hémangiomes congénitaux à une quantité moindre. Nous nous sommes ensuite interrogés sur l'origine de la présence des catécholamines : leur synthèse est-elle locale au niveau de la tumeur ou est-elle exogène (d'origine endocrine par exemple) ? Notre étude suggère que la synthèse est locale. En effet, les cellules du système vasculaire des hémangiomes infantiles et congénitaux, les cellules endothéliales et les péricytes, expriment les enzymes de synthèse de catécholamines permettant ainsi la production de la noradrénaline. Nous avons également observé que l'expression de ces enzymes diminue avec l'involution de l'HI ou avec le traitement.

A ce jour, il n'existe pas de modèle *in vitro* permettant d'étudier l'HI ou le mécanisme à l'origine de l'efficacité du propranolol. Nous avons donc fait le choix de créer un modèle proche de l'HI. Pour cela, j'ai mis au point pendant ma première année de thèse un protocole permettant d'isoler trois types cellulaires à partir de prélèvements d'HI. Ce protocole est largement détaillé en Annexe 1 de ce mémoire. A partir des cellules endothéliales et des péricytes d'HI, cellules déterminées comme étant celles qui synthétisent les catécholamines, nous avons réalisé des tests de formation de tubes *in vitro*, tests de tubulogenèse. Ces tests nous ont permis d'observer le phénotype particulier de ces cellules. En effet, contrairement aux péricytes de sujets sains ou d'hémangiomes congénitaux, les péricytes d'HI favorisent l'angiogenèse et stabilisent

les tubes formés conduisant ainsi à un réseau de tubes hautement prolifératifs et désorganisés.

Les résultats sont présentés dans l'article ci-dessous.

Article



## **Endogenous noradrenaline biosynthesis pathway as the main target of propranolol efficacy in infantile hemangioma**

---

Priscilla Kaulanjan-Checkmodine<sup>1\*</sup>, François Moisan<sup>1</sup>, Sorilla Prey<sup>1,2</sup>, Etienne Gontier<sup>3</sup>, Sabrina Lacomme<sup>3</sup>, Maya Loot<sup>4</sup>, Marijana Licina<sup>5</sup>, Christine Léauté-Labrèze<sup>1,2,6</sup>, Alain Taieb<sup>1,2,6</sup>, Hamid Reza Rezvani<sup>1,2,6\*</sup>

1- Univ. Bordeaux, Inserm, BMGIC, UMR 1035, F-33076 Bordeaux, France

2- Service de Dermatologie Adulte et Pédiatrique, CHU de Bordeaux, F-33000 Bordeaux France

3- Bordeaux Imaging Center – Electron Microscopy unit, F-33076 Bordeaux, France

4- CHU de Bordeaux, Service de Chirurgie Pédiatrique, F-33000 Bordeaux, France

5- Faculté de médecine Département de Pathologie et Immunologie, CH-1211 Genève 4, Suisse

6- Centre de Référence pour les Maladies Rares de la Peau, CHU de Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France

### **\* Corresponding Authors and lead contacts**

Postal address: INSERM U1035, Bordeaux, F-33000 France

Email address: [priscilla.kaulanjan-checkmodine@u-bordeaux.fr](mailto:priscilla.kaulanjan-checkmodine@u-bordeaux.fr), [hamid-reza.rezvani@u-bordeaux.fr](mailto:hamid-reza.rezvani@u-bordeaux.fr)

Phone: +33-557-575-683      Fax: +33-557-571-374



## **Abstract**

Infantile hemangioma (IH) is the most common benign vascular tumour of infants with an incidence of 3%–10% in newborns. Although the beta-blocker propranolol is currently used as first-line therapy in IH, its mechanism of action is still largely unknown. In this study, we showed the presence of high quantity of proangiogenic noradrenaline (NA) in IH. NA, which is a natural agonist of beta-adrenergic receptors (ADRBs) was definitely reduced in involuted or propranolol-treated IH. Enzymes of catecholamine synthesis, namely tyrosine hydroxylase (TH), L-DOPA decarboxylase (DDC) and dopamine- $\beta$ -hydroxylase (DBH), are expressed in IH-derived endothelial cells (IH-EC) and pericytes (IH-PER). Using a model of angiogenesis consisting of co-culturing IH-EC and IH-PER on matrigel matrices, we found that IH-PER play a critical role in forming a proliferative and disorganized hemangioma-like network. Our results suggest that targeting catecholamine-synthesizing enzymes could be proposed as a mechanism of action of propranolol.

## **Introduction**

Infantile Hemangioma (IH) is the most common benign vascular tumour of infants<sup>1</sup> affecting 3 to 10 % of newborns<sup>2</sup>. This tumour is characterized by a proliferative phase with rapid and abnormal growth of blood vessels followed by a slow spontaneous involutive phase. Nevertheless 15 % require surgery or a treatment depending on IH location and in case of vital threat or functional risk<sup>3</sup>. Following our fortuitous discovery in 2008, the non-selective beta-adrenergic receptor (ADRB) antagonist propranolol has been progressively used as the first-line therapy for severe/complicated IH<sup>4</sup>. Other infantile capillary tumours such as rapid involuting congenital hemangioma (RICH), non-involuting congenital hemangioma (NICH) as well as pyogenic granulomas do not respond to propranolol<sup>3,5</sup>. Although, several mechanisms such as affecting vasoconstriction, endothelial cell apoptosis, and/or angiogenesis<sup>6,7</sup> are proposed. These precise that the mechanism of action is not still well understood. Identification of this mechanism will enable the development of target-specific drugs, not only for IH but also for malignant vascular tumors and tumor angiogenesis.

In this study, we simply wondered whether a potential competition between propranolol and catecholamines, such as adrenaline and noradrenaline (NA) as natural agonists of ADRB, could be proposed as the principal mechanism of action of propranolol. Of note, mainly known to play a role in the pathophysiology of neurological, psychiatric, metabolic and cardiovascular disorders, catecholamine have been proposed to affect angiogenesis, notably during carcinogenesis<sup>8</sup>. For instance, it has been reported that NA-mediated activation of ADRBs

induces macrophages recruitment which, in their turn, promote angiogenesis through production of a large amount of MMP-2, MMP-9 and VEGF<sup>9,10</sup>. NA binding to the ADRBs has been also shown to induce the synthesis and release of IL-6 proangiogenic interleukin in ovarian tumor cell lines<sup>8</sup>. Chen *et al.* have also reported that the incubation of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) with NA-activated breast cancer cell supernatant stimulates the Notch pathway, thus inducing tumor angiogenesis<sup>11</sup>. Binding of NA on ADRBs can also trigger cAMP production and PKA activation as two downstream effectors resulting in VEGF generation<sup>9,12</sup>. Propranolol supplementation inhibits these signaling pathways through direct binding to the ADRBs<sup>6,12,13</sup>. Isoprenaline, an ADRB agonist, promotes cell proliferation and increases the expression of VEGF-A and VEGFR-2 in infantile hemangioma-derived endothelial cells (IH-EC). These effects are blocked by adding ICI 118551, a selective antagonist of ADRB<sup>14</sup>. Pan *et al.* showed that propranolol inhibits the NA-induced increase in cyclins A2 and D2, thereby affect cell cycle progression and proliferation<sup>9</sup>. Knocked-out ADRB mice have impaired angiogenesis and ADRB inhibition has been shown to reduce the expression of proangiogenic VEGF<sup>15</sup>. Altogether, it is thus reasonable to speculate that competition between propranolol and catecholamines in IH would affect cell proliferation and angiogenesis.

In this study, we show that high level of NA is found in proliferative IH and that propranolol treatment is associated with lower level of NA. Since, there is no optimal animal model nor IH cell lines to study mechanism of action of propranolol, we isolated IH-EC and IH-derived pericytes (IH-PER) to develop an *in vitro* simple model responsive to propranolol. IH-EC and IH-PER have been chosen for the following reasons. EC have been shown to be clonal, have immature morphology, display increased growth and migratory properties compared to normal dermal endothelial cells and express ADRB<sup>16-21</sup>. Moreover, it has been shown that EC are able to synthesize catecholamines<sup>15</sup>. IH-PER, which are arranged around the endothelial cell layer in a proliferating IH tissue section<sup>22,23</sup>, have been also shown that express ADRB<sup>17,24</sup>. Using this model, we show that IH-PER play an important role in promoting angiogenesis in IH.

## **Materials and methods**

### **Infantile hemangioma and foreskin tissues**

This study was performed on consecutive patients undergoing surgery for IH and congenital hemangiomas at Bordeaux Children's Hospital between 2015 and 2018. All samples were obtained after consent from the patients or their family/legal guardians. The clinical diagnosis of IH was confirmed by immunohistochemical detection of GLUT-1, showing a strong characteristic positivity for EC in IH. Children's foreskin tissues were obtained at circumcision after informed consent.

### **Catecholamines ELISA assay**

Catecholamines levels were analyzed by an ELISA kit (3-CAT Research ELISA, Immusmol, France) accordingly to the manufacturer's instructions. The quantitative measurements of adrenaline, noradrenaline and dopamine were performed on infantile (N=47) and congenital (N=3) hemangioma tissues. 10 mg of tissue was digested in 100  $\mu$ l EDTA (1 mM)-sodium metabisulfite (4 mM) and then sonicated. After a 12 000 rpm centrifugation during 15 minutes at 4 °C, the supernatant was used for the ELISA.

### **Immunohistochemistry**

Immunohistochemical stainings were performed on formalin-fixed and paraffin-embedded 3  $\mu$ m sections. Re-hydration and antigen retrieval were done by heating the slides in a pH 6 EDTA buffer (PT Module Buffer®, Thermo Scientific) in a PT-link® instrument (Dako, Agilent, USA) during 20 minutes at 97°C. All the primary antibodies were incubated overnight at 4°C, and Alexa fluor 488- or 555- conjugated secondary antibodies during 1 hour at room temperature. Cell nuclei were visualized by 4', 6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining. Samples were incubated with primary antibodies against GLUT-1, Ki67, CD34,  $\alpha$ -SMA, and catecholamine synthesis enzymes (TH, DDC, DBH and PNMT). References, manufacturer and concentration of primaries antibodies are listed in the supplementary table. All picture acquisitions were done with the NIS-Elements software (Nikon, V3.22.10) associated to a Leica epifluorescent microscope at magnification x 40.



### **Protein extraction and Western blotting**

One mg of infantile (N=37) and congenital (N=3) hemangioma tissues were digested in 100  $\mu$ l RIPA lysis buffer containing 25 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 1 % sodium deoxycholate (SDS), 1mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) and protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). After sonication, homogenates were centrifuged at 12 000 rpm for 15 minutes at 4 °C. The concentration of extracted protein was measured with Pierce BCA protein assay kit (ThermoFisher). Equal amounts of total proteins were boiled in Laemmli buffer for 5 minutes at 90 °C, resolved by 10 % sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PGE) and then electrophoretically transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF, Dutscher) membranes. After blocking with 5 % nonfat dry milk 0.5 % tween 20, membranes were incubated with primary TH, DDC, DBH, PNMT and  $\beta$ -actin antibodies. References, manufacturer and concentration of primaries antibodies are listed in the supplementary table. Then the membranes were incubated with appropriate horseradish peroxidase--conjugated secondary antibody (Vector) at room temperature for 1 hour. Blots were finally developed using chemiluminescence ECL reagent (Clarity™ Western ECL Substrate, Biorad). Images were obtained using a Fujifilm camera (Las3000, Fujifilm). Quantification was performed with ImageLab (Biorad). Data are presented as relative protein level after normalization with  $\beta$ -actin.

### **Cell isolation and culture**

Single cell suspensions were prepared from IH, congenital hemangioma and foreskin tissues by digesting with an enzymatic cocktail composed with collagenase (Sigma-Aldrich) and dispase (Sigma-Aldrich) in sterile PBS. EC and PER were respectively isolated with anti-CD34 and anti-CD146-magnetic beads (Miltenyi). Cells were seeded at a density of 100 000 cells/cm<sup>2</sup> in fibronectin (Promocell)-coated culture plates. EC and PER were grown in endothelial growth medium (EGM2, Promocell) and pericyte growth medium (Promocell), respectively.

### **Flow cytometry analysis**

PE-Cy7-conjugated mouse anti-human CD34 and Alexa Fluor 488-conjugated mouse anti-human CD146 (Biolegend, USA) were used for detection. To establish background staining,

cells were labeled with FITC- or PE-conjugated isotype-matched control antibodies. Flow cytometry was performed on a BD FACS CANTO II. The data were analyzed using FlowJo software (FlowJo, USA).

### **Immunocytofluorescence**

Cells were seeded on fibronectin-coated slide, in 48-well plate. After methanol-ethanol (V/V) fixation, cells membrane were permeabilized with the permeabilization reagent 0.2 % Triton X-100 in PBS. Nonspecific binding sites were blocked with 10 % FBS. Cells were then incubated with primary antibodies against CD31, CD146,  $\alpha$ -SMA, NG2 and PDGFR $\beta$ . Cell nuclei were counterstained with DAPI. References, manufacturer and concentration of primaries antibodies are listed in the supplementary table. All picture acquisitions were done with the NIS-Elements software (Nikon, V3.22.10) associated to a Leica epifluorescent microscope.

### **Electron microscopy**

Electron microscopy studies were conducted at the Bordeaux Imaging Center - Bordeaux University, a core facility of the French network "France Bio Imaging". IH biopsies were fixed with 2.5 % (v/v) glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) during 1h at room temperature (RT). Samples were washed in 0.1 M phosphate buffer and post-fixed in 1% (v/v) osmium tetroxide in phosphate buffer 0,1 M during 2h, in the dark at RT. Then tissues were dehydrated through a series of graded ethanol and embedded in a mixture of pure ethanol and epoxy resin (Epon 812; Delta Microscopy, Toulouse, France) 50/50 (v/v) during 2 hours and then in 100% resin overnight at RT. The polymerization of the resin was carried out over a period between 24-48 hours at 60 ° C. Samples were then sectioned using a diamond knife (Diatome, Biel-Bienne, Switzerland) on an ultramicrotome (EM UC7, Leica Microsystems, Vienna, Austria). Ultrathin sections (65 nm) were picked up on copper grids and then stained with uranyl acetate and lead citrate. Grids were examined with a Transmission Electron Microscope (H7650, Hitachi, Tokyo, Japan) at 80 kV.

## **Drugs and Chemicals**

Clinical formulations of propranolol (Avlocardyl™) and noradrenaline were purchased from the Bordeaux Hospital Pharmacy.

## **Proliferation assay**

Cell proliferation was investigated by the Sulforhodamine B (SRB) assay. IH-cells were seeded in 96-well plates at a density of  $2.5 \times 10^4$  IH-cells/well. The day after seeding, cells were treated with varying concentrations (0, 0.3, 1, 3, 10, 30, 50, 100  $\mu$ M) of propranolol for 6 days. After removing the medium, cells were fixed with 10 % of trichloroacetic acid (TCA) solution during 1 hour at 4 °C. TCA was then removed and cells were washed fifth times with distilled water. Cells were then incubated with 0.4 % SRB for 10 minutes at room temperature. Wells were washed fifth times with 1 % acetic acid. Dye was dissolved in 10 mM Tris base buffer and the absorbance was measured with an iMark™ Microplate Absorbance Reader (BioRad) at a wavelength of 515 nm.

## ***In vitro* angiogenesis assay**

EC and PER were labeled with CMFDA488 green dye and CMRA548 red dye (ThermoFischer), respectively. Matrigel (Dutscher) was thawed at 4 °C and 10  $\mu$ l was added to each well of a  $\mu$ -slide angiogenesis (Ibidi) and allowed to polymerize for 15 min at RT. Once solid, 50  $\mu$ l of EGM2 containing cells (10 000 cells/well or 5 000 EC plus 5 000 PER/well) was added in each well. Noradrenaline and propranolol were added at the indicated concentrations at the same time. The formation of vessel-like structures was observed overtime using Leica epifluorescent microscope (10 x). Vessel-like structures images were analyzed using Wimasis image analysis system (Thistle Scientific Co, Glasgow, UK).

## **Statistical analyses**

Comparisons between two groups were calculated with GraphPad Prism V6 software using unpaired Student's t-test (two tailed) or Mann-Whitney test when the variance was not homogeneous. A p-value < 0.05 (\*) was considered significant. Results are presented as means  $\pm$  standard error of mean (SEM).

## **Results**

### **Propranolol treatment reduces noradrenaline level in IH**

Because propranolol is an antagonist of ADRB, we wondered whether the levels of the natural agonists of ADRB are upregulated in IH. To test this hypothesis, we first measured the level of catecholamines in congenital hemangioma and IH tissues (Table 1). Of note, we verified the diagnosis of hemangioma tissues used for this study by a GLUT-1 staining, which is widely used as a diagnostic marker<sup>25</sup>. Infantile hemangiomas did express GLUT-1 in their EC in contrast to congenital hemangiomas (Fig. 1A) or other vascular anomalies. By quantifying catecholamines, we found mostly NA and a low level of dopamine in IH tissues (Fig. 1B). Adrenaline was found to a level closed to the limit threshold (Fig. 1B).

Next, we classified IH tissues in two groups namely proliferative and involutive. Proliferative IH highly expressed Ki-67<sup>26</sup> whereas involutive IH did not (Fig. 1B). These groups were subdivided into two other groups, namely untreated and treated. In spontaneously involuted IH, NA level was decreased in contrast to untreated proliferative IH. Congenital hemangiomas presented a NA level similar to untreated involutive hemangiomas. Moreover, propranolol treatment significantly decreased NA concentration with a better efficiency when taken during tumor proliferative phase (Fig. 1C). Altogether, our results indicate that propranolol decreases the concentration of NA in IH when started at the proliferative phase, and that spontaneous involution of IH is accompanied by a decrease of tissue NA concentration.

### **IH express catecholamine-synthesizing enzymes and their expressions are reduced by propranolol treatment**

Because of the presence of catecholamines in IH, we looked at the ability of the tumors to synthesize catecholamines. The synthesis of NA is regulated by catecholamine synthesizing enzymes. It begins with conversion of L-tyrosine to L-dopa by tyrosine hydroxylase (TH). Then L-dopa is processed to dopamine by L-DOPA decarboxylase (DDC). Dopamine is hydroxylated by dopamine- $\beta$ -hydroxylase (DBH) to NA. Finally, adrenaline is synthesized by addition of a methyl group to NA by phenylethanolamine-N-methyltransferase (PNMT) (Fig.2A). Immunohistochemistry analyses showed that TH, DDC, DBH but not PNMT are expressed by congenital and infantile hemangiomas (Fig.2B). Furthermore, these analyses

revealed a much lower expression of TH, DDC and DBH in propranolol-treated IH than in untreated IH (Fig.2B).

We then wondered which cells express these enzymes in IH. Since immunohistochemistry of catecholamines enzymes showed a perivascular staining (Fig. 2B), EC and PER were immune-stained respectively with anti-CD34 and anti- $\alpha$ SMA antibodies. Results showed that both EC and PER expressed TH, DDC and DBH in IH (Fig. 3A) and congenital hemangioma (Fig. 3B). Electron microscopy of an IH vessel showed that there is not a direct contact between PER and EC and that the interactions between them are likely occurred via exchange of small vesicles (Fig 4A, B).

Altogether, our data indicate that the synthesis of catecholamines occurs locally in IH and congenital hemangiomas.

### **IH-PER promote angiogenesis and produce a disorganized IH-like network**

To further create an *in vitro* model of IH, IH-EC and IH-PER were isolated from IH tissues using anti-CD34 and anti-CD146 magnetic microbeads as described in material and methods section. As control, EC and PER isolated from foreskin (herein after called F-EC and F-PER) were used. Of note, between CD34 and CD31 as endothelial cell surface markers, we have targeted the former because of its higher expression in IH samples (Fig. S1A). The purity (Fig. S1B) and phenotypes (Fig. S1C) of cells were then checked by flow cytometry and immunostaining. Western blotting showed that both CD34<sup>+</sup> and CD146<sup>+</sup> cells still expressed TH, DDC and DBH after culturing in their appropriate media for one week (Fig. S2), suggesting that they are thus able to synthesize catecholamines *in vitro*.

To model IH *in vitro* and thus study the mechanism of action of propranolol, capillary-like tube formation assays on matrigel matrices were made with EC and PER isolated from IH and/or foreskin. When used separately, EC and PER were both able to form tubes *in vitro* (Fig. S3). EC and PER co-culture model were then used to investigate whether there is a difference in capacity of capillary-like tube formation between cells isolated from IH and foreskin (Fig. 5). Results showed that the total tube length and the covered area by tube network were increased when IH-PER were used in co-culture compared with the situation in which F-PER was included in co-culture (Fig 5A-D and Fig S4). Of note, while tube network formed with F-PER converted in cell aggregates at 24 h after co-culturing, the network was still present

in presence of IH-PER (Fig 5D and Fig S4). This effect of IH-PER on tube network was also observed when we used in our co-culture system the HUVEC (Fig. 5A-D).

We then monitored the IH-tubes for a few days to know whether and when they transformed into cellular aggregates. Results indicated that capillary structures found following co-culturing of IH-EC and IH-PER never ended in cellular aggregates up to seven days post-culture. Instead, cells continued to proliferate and formed disorganized tube networks (Fig. 5E).

To investigate whether PER of propranolol non-responsive vascular tumors have the same capacity to promote capillary-like tube formation, PER isolated from congenital hemangioma were tested in a co-culture system. Results showed that the tube network established following co-culturing of these PER with congenital EC or F-EC formed cell aggregates at 48h post-culture (Fig. 6).

Altogether, our results indicate that IH-PER seem to play a critical role in promoting vascular network *in vitro*.

### **Propranolol inhibits angiogenesis**

The high concentration of noradrenaline in IH and its pro-angiogenic properties<sup>8,12,27</sup> prompt us to study its effect on tubes formed by IH-cells *in vitro*. Since the results of this part are still preliminary, we presented and discussed them in discussion part of thesis manuscript.

## Discussion

Evidence derived from various tumor models, such as a mouse model of ovarian carcinoma, indicates that extrinsic stress induced by catecholamines can upregulate via ADRB2 activation the expression of VEGF and induce tumor angiogenesis and aggressive growth<sup>27</sup>. Other angiogenic factors, such as MMP-2, MMP-9 and IL-6, can also be elevated via the ADRB signaling pathway following stimulation by adrenaline or noradrenaline in several types of tumor cells<sup>28</sup>. In such tumor models, ADRB antagonists, including propranolol, have been shown to reduce the expression of these growth factors and to inhibit angiogenesis. Furthermore, the specific knockdown of signal transduction at the ADRB2 level in vascular ECs can directly impair angiogenesis *in vivo* and tubulogenesis *in vitro* (Iaccarino 2005, Ciccarelli 2011). Along this line of reasoning, we showed for the first time in this study the presence of probably intrinsically produced catecholamines in IH because of the presence their synthesizing enzymes in IH tissues, and of the presence of a high local amounts of NA, which were decreased following treatment by the beta-blocker propranolol or during involution phase. Indeed propranolol treatment reduced significantly NA amounts until reaching a basal level as found in untreated involuted IH. Our data suggest that intrinsically produced NA in IH could possibly drives tumor development. In consistent with this hypothesis, it has been shown that the expression of several proangiogenic factors such as VEGF, MMP2, MMP9<sup>29</sup> and HIF-1 $\alpha$ <sup>30</sup>, which are highly upregulated in IH during the proliferative phase, decrease after tumor involution. Low intrinsic levels of NA in congenital hemangiomas may be the principal reason explaining why they do not respond to propranolol.

Propranolol is known to prevent NA fixation on adrenergic receptors thus, two options may explain the origin of the diminution of NA during IH regression. First, the decrease of NA may due to the increase of catechol-O-methyl-transferase (COMT) or monoamine oxidase (MAO), the catecholamine degradation enzymes. Jacob et al., showed that propranolol treatment in rats induced a significant increase in COMT and MAO<sup>31</sup>. Second, propranolol may act on catecholamine synthesizing enzymes by reducing their productions or their activities. We have shown a possible local production of catecholamines with the demonstration of the presence of TH, DDC and DBH in both IH-PER and IH-EC. In agreement, it has been shown that EC are capable to synthesize NA<sup>15</sup>. The expression of catecholamine synthesis enzymes was clearly decreased in IH tissues who treated with propranolol. These results are consistent with the work of Tuross and Patrick who reported *in vivo* and *in vitro* in striatal and hypothalamic synaptosomes that propranolol has a direct inhibitory effect on the activity of TH,

the rate-limiting step in biosynthesis pathways of catecholamines<sup>32</sup>. Srivastava and Kapoor have also reported that propranolol reduces *in vivo* DBH activity and NA level in the rat brain<sup>33</sup>.

There is currently no established *in vitro* model allowing to study the pathophysiology of IH and the mechanism of propranolol efficiency. We proposed for the first time a simplified IH-like model with IH-PER and IH-EC isolated from the same biopsies. IH-PER and IH-EC formed a highly proliferative network with disorganized tubular elements. This phenomenon was not observed with foreskin or congenital hemangioma cells. Indeed, tubes formed with foreskin or congenital hemangioma cells regressed and formed rapidly cellular aggregates in a few hours. Our results underline the specific phenotype of IH cells. The formation of a disorganized vascular network seems to be induced by IH-PER that do not ensure their role in regulating the quiescence of EC. Our data may be explained by the fact that IH-PER promote the proliferation of EC, as already shown by Bischoff's group<sup>34</sup>. Moreover, it seems that IH-PER loss the property to stabilize tube networks.

We have previously shown the expression of beta-adrenergic receptors in IH tissues in EC and PER with a concomitant higher expression in mast cells<sup>17</sup>. Here we identified NA, produced locally by IH-cells, as a proangiogenic factor involved in the regulation of IH-angiogenesis. If mast cells intervene in the regulation of the system, our simplified 2-cell *in vitro* model suggests that IH-EC and IH-PER produce locally NA and activate an autocrine/paracrine beta-adrenergic angiogenic loop via ADRB present on their surface. In conclusion, we have demonstrated for the first time the presence of NA in high quantity in IH tissues, and we suggest that high local production of NA is a specific feature of IH, and the major driver its development, which is thus limited efficiently by propranolol treatment.



## References

1. Dasgupta, R. & Fishman, S. J. ISSVA classification. *Semin. Pediatr. Surg.* **23**, 158–161 (2014).
2. Léauté-Labrèze, C., Harper, J. I. & Hoeger, P. H. Infantile haemangioma. *Lancet* **390**, 85–94 (2017).
3. Haggstrom, A. N. *et al.* Prospective study of infantile hemangiomas: clinical characteristics predicting complications and treatment. *Pediatrics* **118**, 882–887 (2006).
4. Léauté-Labrèze, C. *et al.* A Randomized, Controlled Trial of Oral Propranolol in Infantile Hemangioma. *New England Journal of Medicine* **372**, 735–746 (2015).
5. Truong, M. T., Perkins, J. A., Messner, A. H. & Chang, K. W. Propranolol for the treatment of airway hemangiomas: a case series and treatment algorithm. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* **74**, 1043–1048 (2010).
6. Greenberger, S. & Bischoff, J. Infantile hemangioma-mechanism(s) of drug action on a vascular tumor. *Cold Spring Harb Perspect Med* **1**, a006460 (2011).
7. Storch, C. H. & Hoeger, P. H. Propranolol for infantile haemangiomas: insights into the molecular mechanisms of action. *Br. J. Dermatol.* **163**, 269–274 (2010).
8. Chakroborty, D., Sarkar, C., Basu, B., Dasgupta, P. S. & Basu, S. Catecholamines regulate tumor angiogenesis. *Cancer Res.* **69**, 3727–3730 (2009).
9. Pan, W.-K., Li, P., Guo, Z.-T., Huang, Q. & Gao, Y. Propranolol induces regression of hemangioma cells via the down-regulation of the PI3K/Akt/eNOS/VEGF pathway. *Pediatr Blood Cancer* **62**, 1414–1420 (2015).
10. Shi, M., Liu, D., Yang, Z. & Guo, N. Central and peripheral nervous systems: master controllers in cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* **32**, 603–621 (2013).
11. Chen, H. *et al.* Adrenergic signaling promotes angiogenesis through endothelial cell-tumor cell crosstalk. *Endocr. Relat. Cancer* **21**, 783–795 (2014).
12. Park, S. Y. *et al.* Norepinephrine induces VEGF expression and angiogenesis by a hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  protein-dependent mechanism. *Int. J. Cancer* **128**, 2306–2316 (2011).
13. Sarkar, C., Chakroborty, D. & Basu, S. Neurotransmitters as regulators of tumor angiogenesis and immunity: the role of catecholamines. *J Neuroimmune Pharmacol* **8**, 7–14 (2013).
14. Ji, Y. *et al.* The role of  $\beta$ -adrenergic receptor signaling in the proliferation of hemangioma-derived endothelial cells. *Cell Div* **8**, 1 (2013).
15. Sorriento, D. *et al.* Endothelial cells are able to synthesize and release catecholamines both in vitro and in vivo. *Hypertension* **60**, 129–136 (2012).

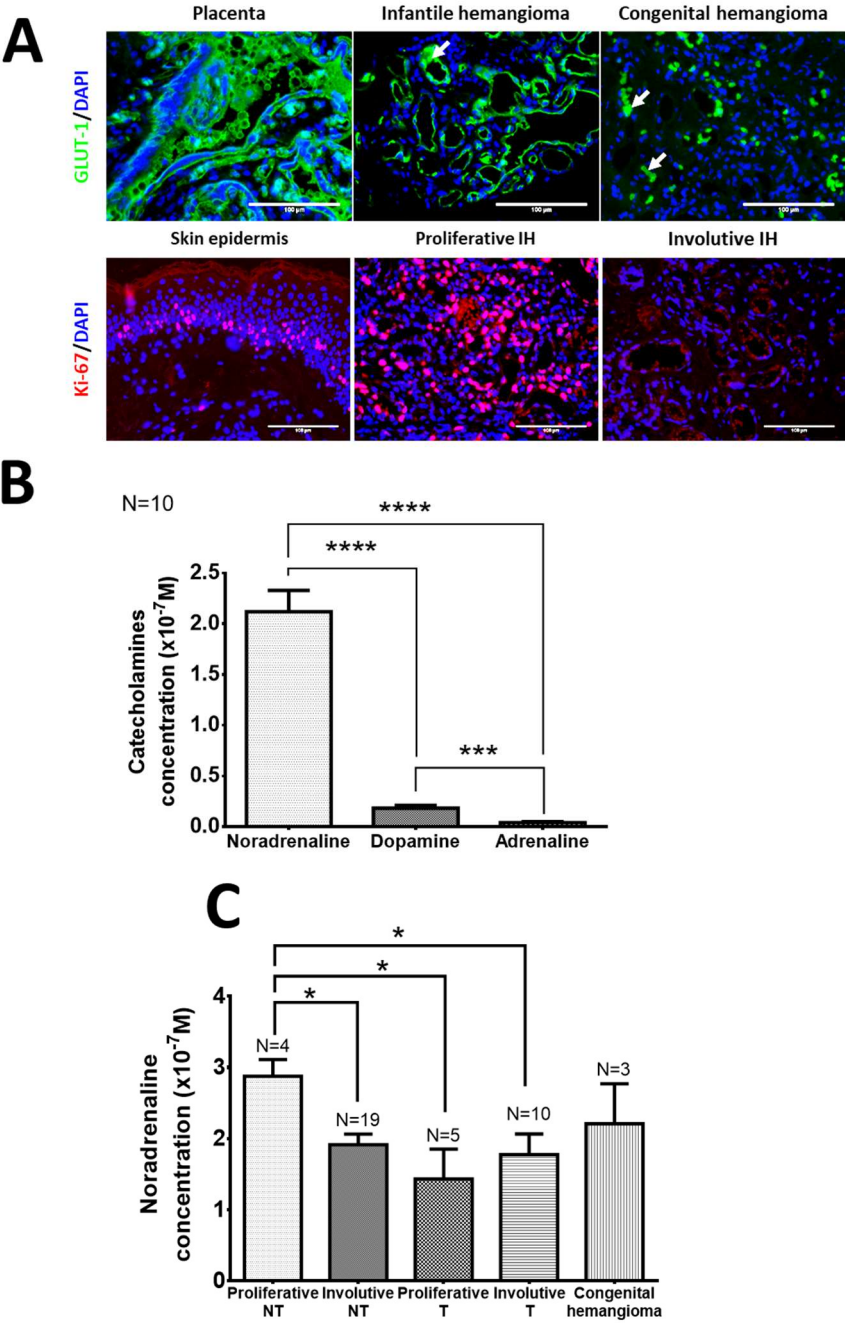
16. Iaccarino, G. *et al.* Beta(2)-adrenergic receptor gene delivery to the endothelium corrects impaired adrenergic vasorelaxation in hypertension. *Circulation* **106**, 349–355 (2002).
17. Prey, S. *et al.* Mast cells as possible targets of propranolol therapy: an immunohistological study of beta-adrenergic receptors in infantile haemangiomas. *Histopathology* **65**, 436–439 (2014).
18. Dosanjh, A. *et al.* In vitro characteristics of neonatal hemangioma endothelial cells: similarities and differences between normal neonatal and fetal endothelial cells. *J. Cutan. Pathol.* **27**, 441–450 (2000).
19. Boye, E. *et al.* Clonality and altered behavior of endothelial cells from hemangiomas. *J. Clin. Invest.* **107**, 745–752 (2001).
20. Yu, Y., Varughese, J., Brown, L. F., Mulliken, J. B. & Bischoff, J. Increased Tie2 expression, enhanced response to angiopoietin-1, and dysregulated angiopoietin-2 expression in hemangioma-derived endothelial cells. *Am. J. Pathol.* **159**, 2271–2280 (2001).
21. Dadras, S. S., North, P. E., Bertoncini, J., Mihm, M. C. & Detmar, M. Infantile hemangiomas are arrested in an early developmental vascular differentiation state. *Mod. Pathol.* **17**, 1068–1079 (2004).
22. Li, Q., Yu, Y., Bischoff, J., Mulliken, J. B. & Olsen, B. R. Differential expression of CD146 in tissues and endothelial cells derived from infantile haemangioma and normal human skin. *J. Pathol.* **201**, 296–302 (2003).
23. Boscolo, E. & Bischoff, J. Vasculogenesis in infantile hemangioma. *Angiogenesis* **12**, 197–207 (2009).
24. Chisholm, K. M. *et al.*  $\beta$ -Adrenergic receptor expression in vascular tumors. *Mod. Pathol.* **25**, 1446–1451 (2012).
25. North, P. E., Waner, M., Mizeracki, A. & Mihm Jr, M. C. GLUT1: A newly discovered immunohistochemical marker for juvenile hemangiomas. *Human Pathology* **31**, 11–22 (2000).
26. Jia, J. *et al.* Expression of allograft inflammatory factor-1 and CD68 in haemangioma: implication in the progression of haemangioma. *Br. J. Dermatol.* **159**, 811–819 (2008).
27. Thaker, P. H. *et al.* Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma. *Nat. Med.* **12**, 939–944 (2006).
28. Ji, Y., Chen, S., Xu, C., Li, L. & Xiang, B. The use of propranolol in the treatment of infantile haemangiomas: an update on potential mechanisms of action. *Br. J. Dermatol.* **172**, 24–32 (2015).
29. Taran, K., Wnęk, A., Kobos, J., Andrzejewska, E. & Przewratil, P. Tissue and serum mRNA profile of MMPs-2/9 as a potential novel biomarker for the most individual approach in infantile hemangiomas and cancer disease. *Immunobiology* **222**, 1035–1042 (2017).
30. Chen, G. *et al.* Hypoxia-induced autophagy in endothelial cells: a double-edged sword in the progression of infantile haemangioma? *Cardiovasc. Res.* **98**, 437–448 (2013).

31. Jacob, R., Gülch, R. & Kissling, G. *Cardiac Adaptation to Hemodynamic Overload, Training and Stress*. (Springer Science & Business Media, 2012).
32. Tuross, N. & Patrick, R. L. Effects of propranolol on catecholamine synthesis and uptake in the central nervous system of the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **237**, 739–745 (1986).
33. Srivastava, M. & Kapoor, N. K. The effect of propranolol on rat brain catecholamine biosynthesis. *J Biosci* **5**, 261–266 (1983).
34. Boscolo, E., Mulliken, J. B. & Bischoff, J. Pericytes from infantile hemangioma display proangiogenic properties and dysregulated angiopoietin-1. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **33**, 501–509 (2013).

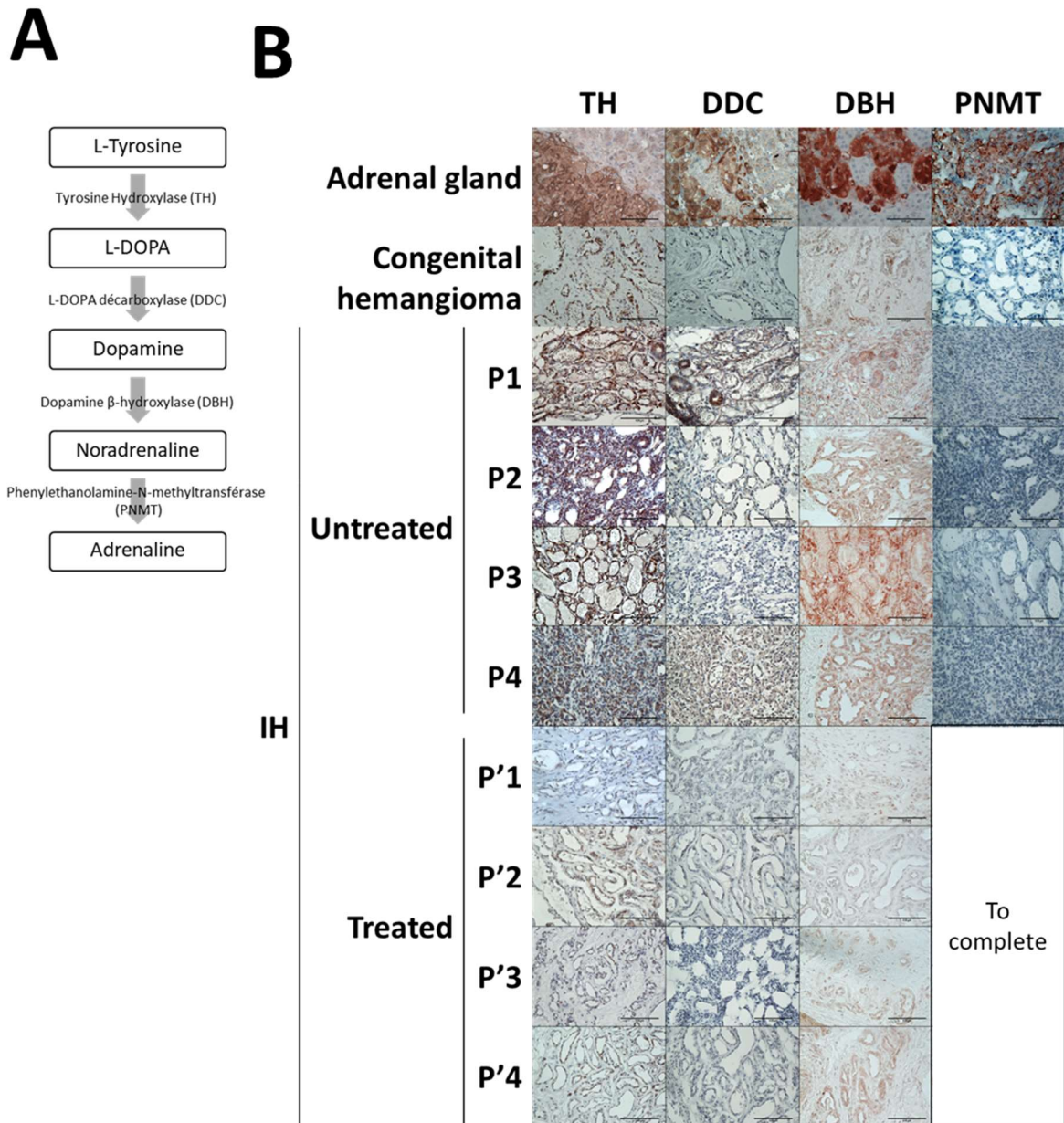
|                              | <b>Age (months)</b> | <b>Gender</b>     | <b>Localization</b>  | <b>Treatment</b> | <b>Experimentation</b> |
|------------------------------|---------------------|-------------------|----------------------|------------------|------------------------|
| <b>Congenital hemangioma</b> | 153                 | M                 | Thorax               | -                | ELISA, WB              |
|                              | 2                   | F                 | Cervical             | -                | ELISA, WB              |
|                              | 72                  | M                 | Postauricular        | -                | ELISA, WB              |
|                              | 32                  | F                 | Arm                  | -                | ELISA, WB              |
|                              | 7                   | F                 | Back                 | -                | ELISA, WB              |
|                              | 57                  | F                 | Thorax               | -                | ELISA, WB              |
|                              | 38                  | F                 | Cheek                | -                | ELISA, WB              |
|                              | 72                  | F                 | Forehead             | -                | ELISA, WB              |
|                              | 13                  | F                 | PELVIS               | -                | ELISA, WB              |
|                              | 55                  | F                 | Hand                 | -                | ELISA, WB              |
|                              | 123                 | F                 | Neck                 | -                | ELISA, WB              |
|                              | 36                  | F                 | Forehead             | -                | ELISA, WB              |
|                              | 57                  | F                 | Thorax               | -                | ELISA, WB              |
|                              | 21                  | F                 | Back                 | -                | ELISA, WB              |
|                              | 38                  | F                 | Cheek                | -                | ELISA, WB              |
|                              | 21                  | F                 | Back                 | -                | ELISA, WB              |
|                              | 7                   | F                 | Back                 | -                | ELISA, WB              |
|                              | 45                  | F                 | Back                 | -                | ELISA, WB              |
|                              | 75                  | F                 | Thorax               | -                | ELISA, WB              |
|                              | 83                  | M                 | Torso                | -                | ELISA, WB              |
| 110                          | F                   | Thorax            | -                    | ELISA, WB        |                        |
| 131                          | F                   | Torso             | -                    | ELISA, WB        |                        |
| 13                           | M                   | Postauricular     | -                    | ELISA, WB        |                        |
| 43                           | M                   | Scalp             | -                    | ELISA, WB        |                        |
| 75                           | F                   | Thorax            | -                    | ELISA            |                        |
| 83                           | M                   | Torso             | -                    | ELISA, WB        |                        |
| <b>Infantile hemangioma</b>  | 19                  | F                 | Tempe and chin       | -                | ELISA                  |
|                              | 28                  | M                 | Forehead             | -                | ELISA, WB              |
|                              | 23                  | M                 | Cheek                | -                | ELISA, WB              |
|                              | 25                  | F                 | Lips                 | -                | ELISA                  |
|                              | 69                  | M                 | Back                 | -                | ELISA, WB              |
|                              | 27                  | M                 | Abdomen and elbow    | -                | ELISA, WB              |
|                              | 13                  | F                 | Scalp                | Other            | ELISA, WB              |
|                              | 20                  | F                 | Back                 | Other            | ELISA, WB              |
|                              | 20                  | F                 | Back                 | Other            | ELISA, WB              |
|                              | 59                  | F                 | Eyebrow              | Propranolol      | ELISA, WB              |
|                              | 72                  | M                 | Nose                 | Propranolol      | ELISA, WB              |
|                              | 33                  | F                 | Periorbital Temporal | Propranolol      | ELISA, WB              |
|                              | 26                  | F                 | Interbrow            | Propranolol      | ELISA, WB              |
|                              | 25                  | F                 | Shoulder             | Propranolol      | ELISA, WB              |
|                              | 9                   | F                 | Lumbar               | Propranolol      | ELISA, WB              |
|                              | 33                  | F                 | Periorbital Temporal | Propranolol      | ELISA, WB              |
|                              | 30                  | F                 | Forearm              | Propranolol      | ELISA, WB              |
|                              | 27                  | F                 | Forehead             | Propranolol      | ELISA, WB              |
|                              | 43                  | M                 | Forehead             | Propranolol      | ELISA, WB              |
|                              | 110                 | F                 | Back                 | Propranolol      | ELISA                  |
| 3                            | F                   | Cervical anterior | Propranolol          | ELISA, WB        |                        |
| 33                           | F                   | Axillary          | Propranolol          | ELISA            |                        |
| 33                           | F                   | Eyebrow           | Propranolol          | ELISA, WB        |                        |
| 33                           | F                   | Eyebrow           | Propranolol          | ELISA, WB        |                        |
| 80                           | M                   | Lips              | Propranolol          | WB               |                        |

**Table 1: Patients included in the study. Other treatment is topical timolol.**

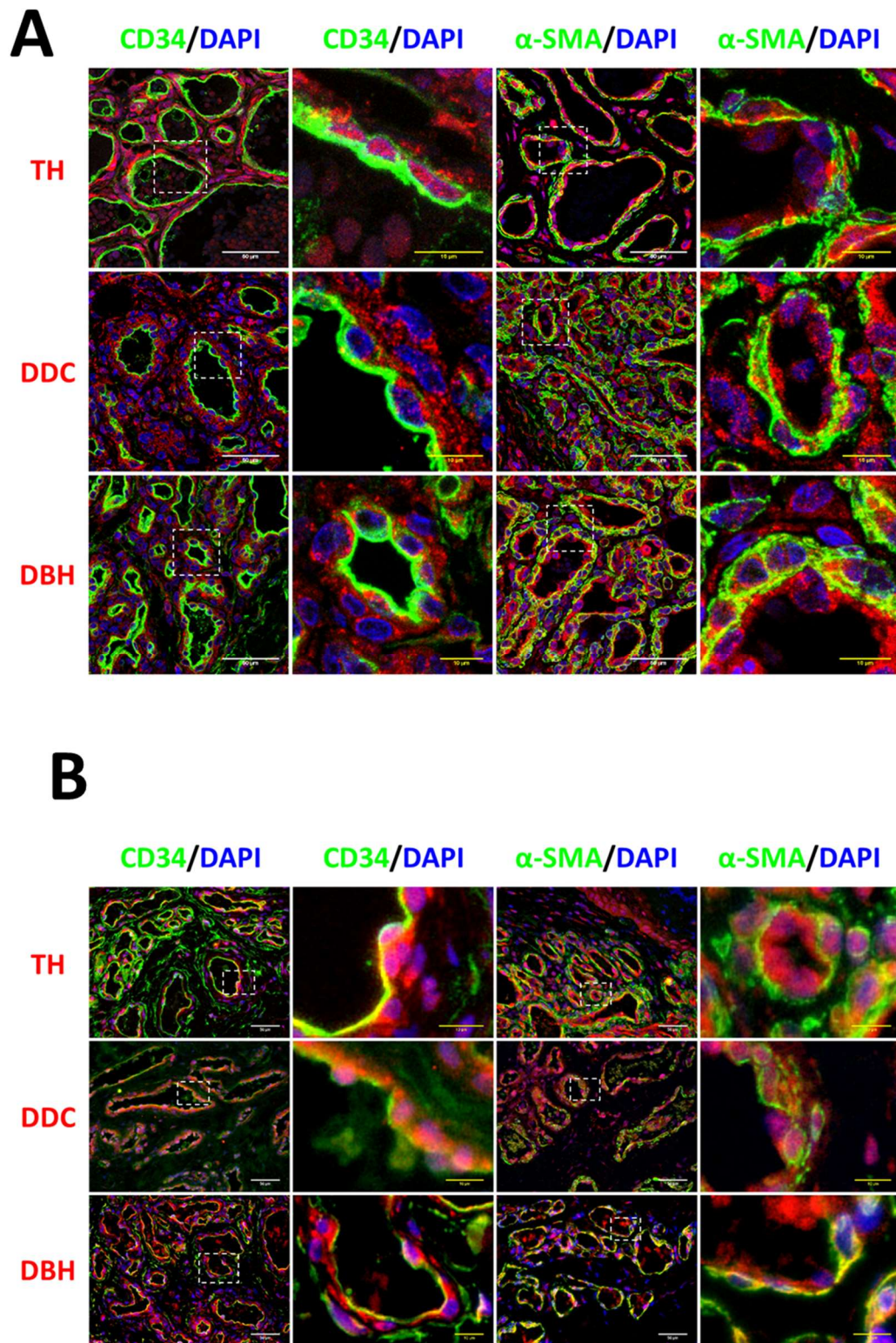
Figures and figures legends



**Figure 1. Effect of propranolol on catecholamines level in IH and infantile vascular tumors (A)** Characterization of proliferative and involutive infantile hemangioma by immunofluorescence. GLUT-1 staining (top). Placental trophoblast cells and red blood cells (white arrows) staining are used as positive control. IH express GLUT-1 whereas congenital hemangioma do not. Ki-67 staining (bottom). Skin epidermis is used as positive control. Versus involutive IH, only proliferative IH show a high expression of Ki-67. Scale bar 100  $\mu$ m. **(B)** Catecholamines level in infantile hemangioma tissues (table 1) determined by ELISA. **(C)** Propranolol treatment reduces noradrenaline level in infantile hemangioma. Catecholamines levels in untreated (NT) and propranolol treated IH (T). Data are presented as mean  $\pm$  SEM. \*  $P < 0,05$ .

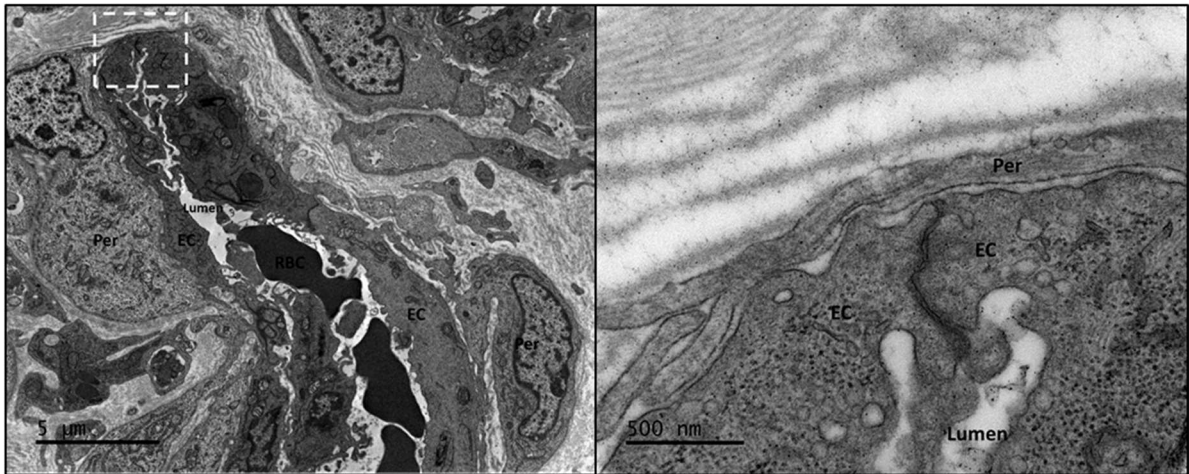


**Figure 2. Infantile hemangioma express catecholamines enzymes and noradrenaline is decreased by propranolol treatment. (A) Pathway of catecholamine biosynthesis. (B) Infantile and congenital hemangioma express all catecholamines enzymes except PNMT. There are able to synthesize dopamine and noradrenaline. Enzymes expression is reduced with propranolol treatment. Adrenal gland is used as positive control. Scale bar size is 100µm.**

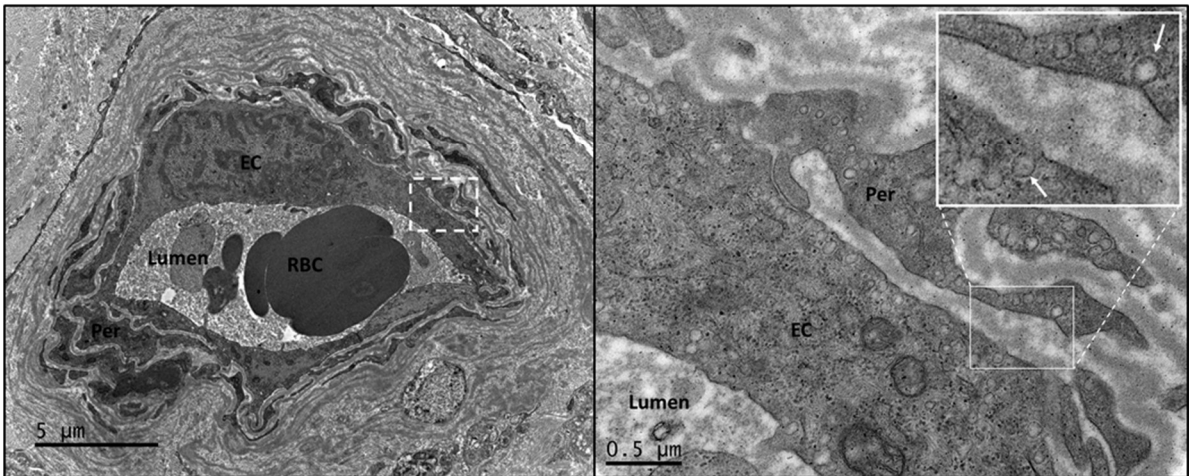


**Figure 3. Endothelial cells and pericytes express catecholamines enzymes.** (A) Immunofluorescence staining of TH, DDC and DBH in infantile and (B) congenital hemangioma. Endothelial cells are characterized by CD34 positive staining and pericytes by  $\alpha$ -SMA antibody. Nucleus are stained with DAPI. White scale bar size is 50  $\mu$ m, and yellow scale bar is 10  $\mu$ m.

**A**

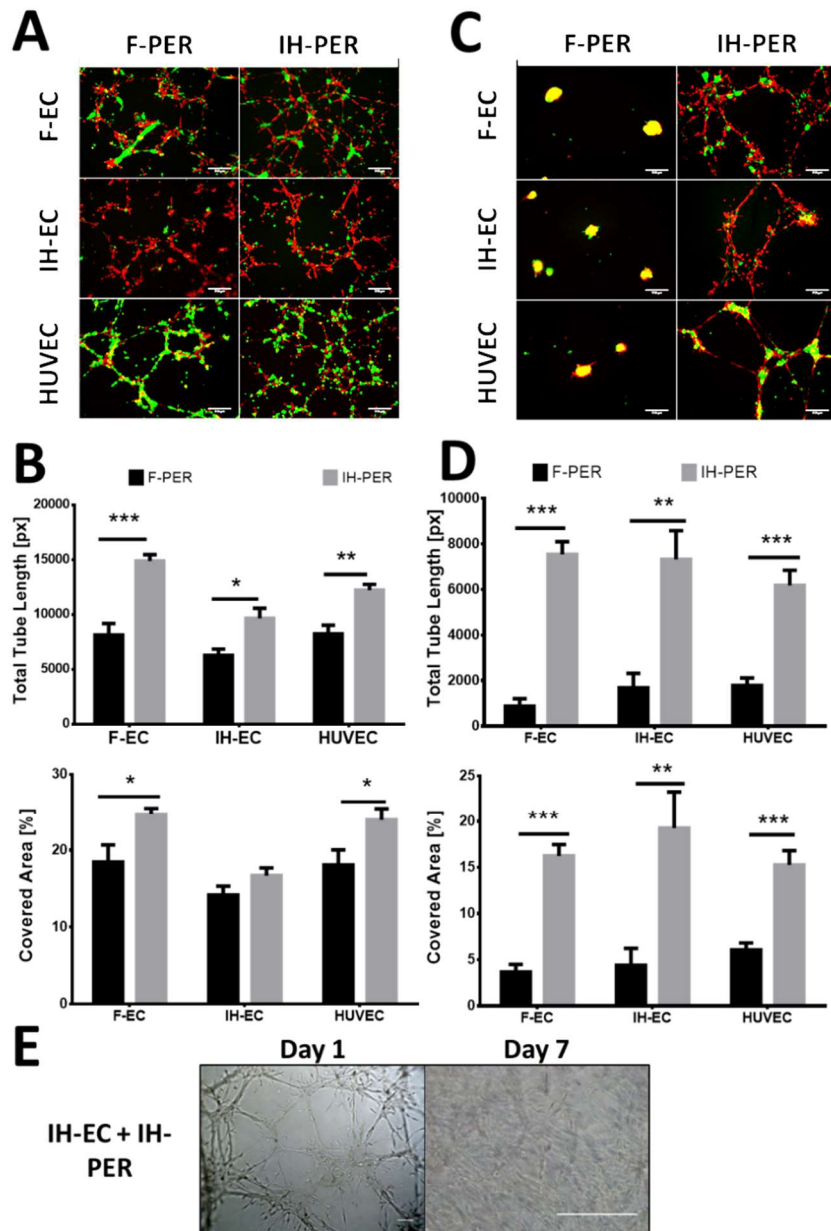


**B**

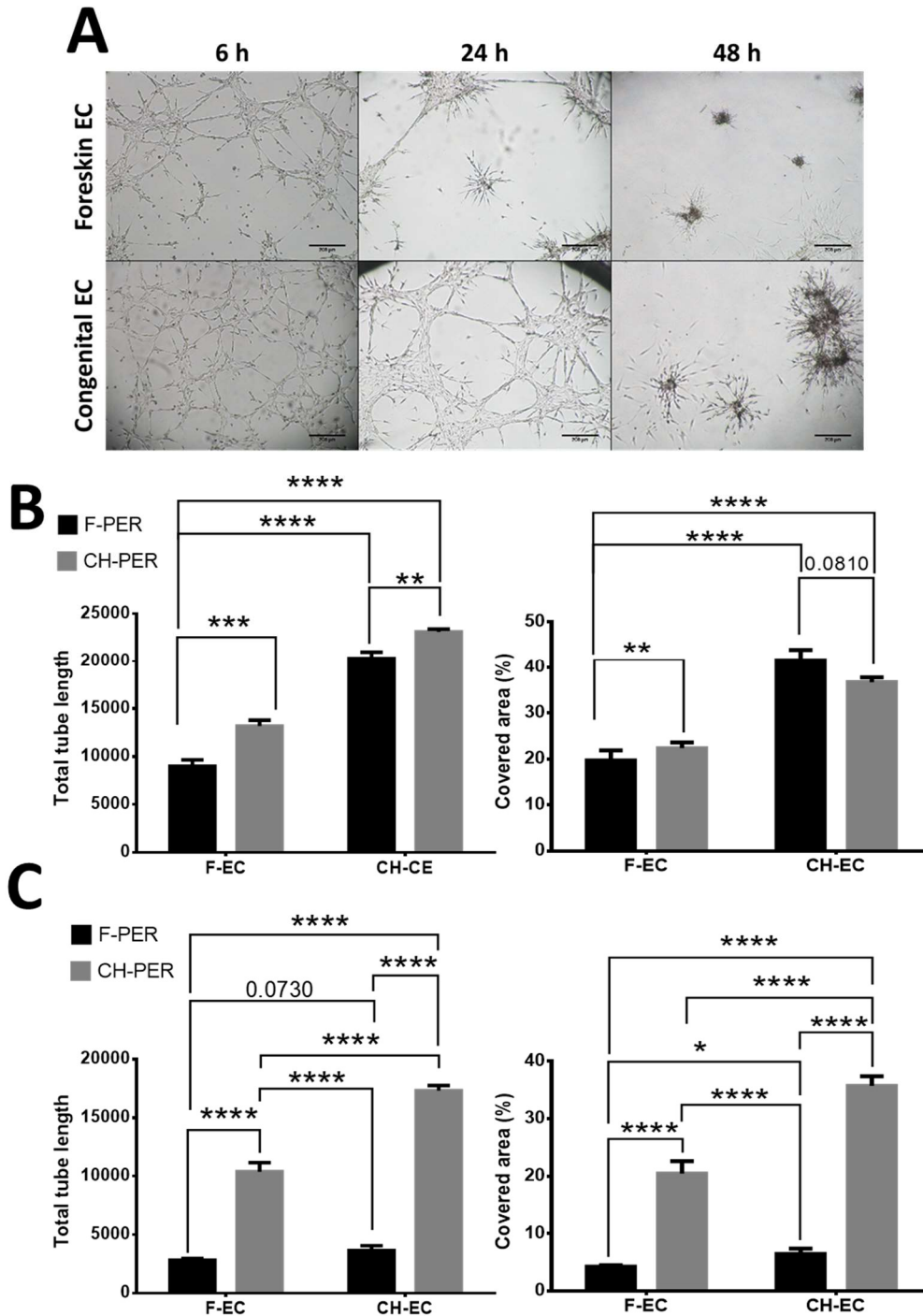


**Figure 4. Endothelial cells and pericytes communicate via membrane vesicle trafficking. (A)** Electron microscopy of a hemangioma vessel showing a tight junction between endothelial cells. Scale bar size is 5 μm and 500 nm. **(B)** Electron microscopy of a hemangioma vessel showing small vesicles on endothelial cell and pericytes membranes. Scale bar size is 5 μm and 0,5 μm.



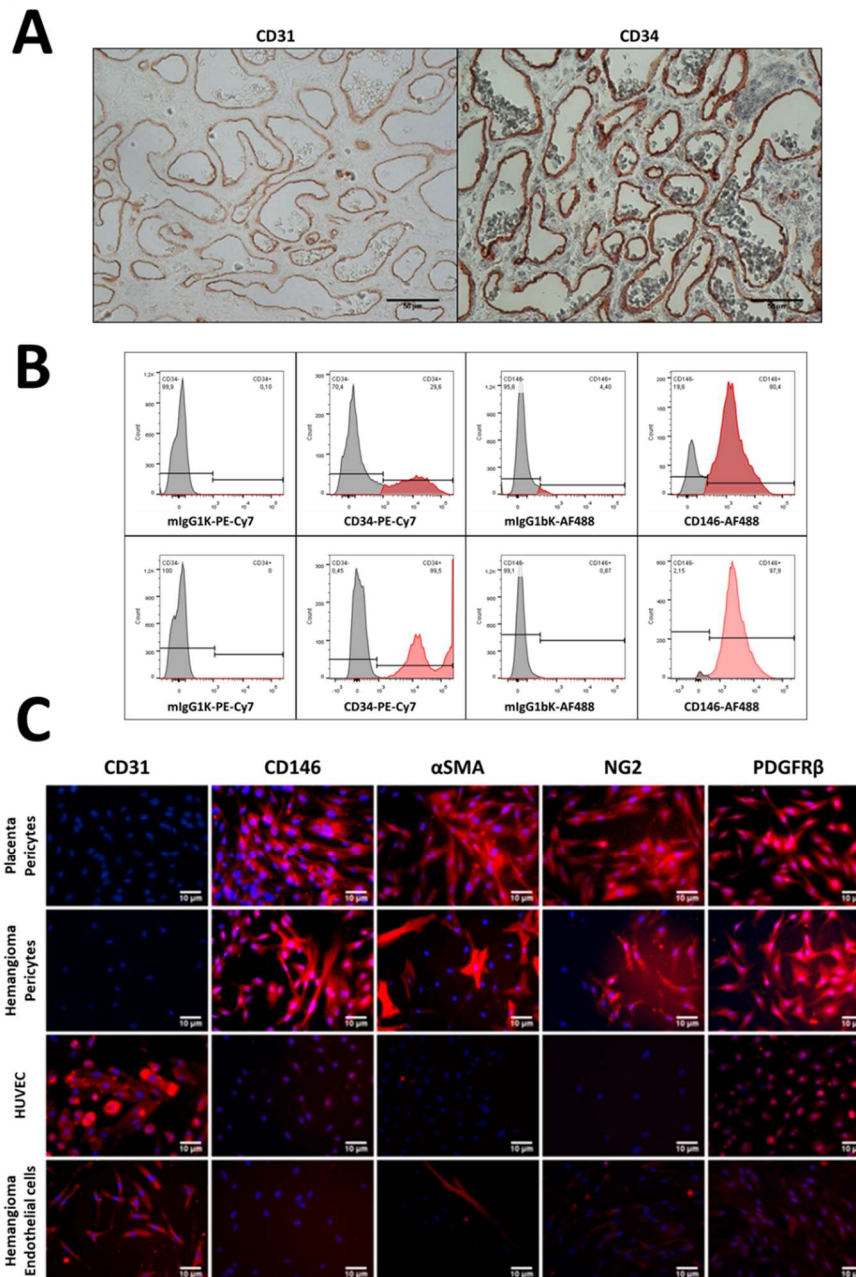


**Figure 5. Tube formation images of endothelial cells and pericytes cocultures on matrigel.** Endothelial cells were labeled with CMFDA488 green dye and pericytes were labeled with CMRA548 red dye. Co-culture (1:1) of indicated cells (1.104) were incubated overnight on Matrigel in endothelial cells growth medium. Scale bar size is 200  $\mu\text{m}$ . **(A)** Endothelial cells and pericytes form tubes in coculture at 6 hours. **(B)** Quantification of total tube length (n=3 experiments, n=3 per group) and covered area showed that hemangioma pericytes significantly promote angiogenesis at 6 hours (right). **(C)** At 24 hours, in presence of foreskin pericytes, cells form aggregates whereas there are still tube networks with hemangioma pericytes. **(D)** Quantification of total tube length and covered area (n=3 experiments, n=3 per group) showed that networks formed in presence of foreskin pericytes are significantly reduced at 24 hours (right). **(E)** The tube network formed by IH-EC and IH-PER was not ended by formation of cell aggregates at 7 days after co-culturing. Scale bar size is 250  $\mu\text{m}$ . (\* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001; all data presented as mean  $\pm$  SEM). Abbreviations: HUVEC, human umbilical cord vein endothelial cells ; EC, endothelial cells; Per, pericytes.

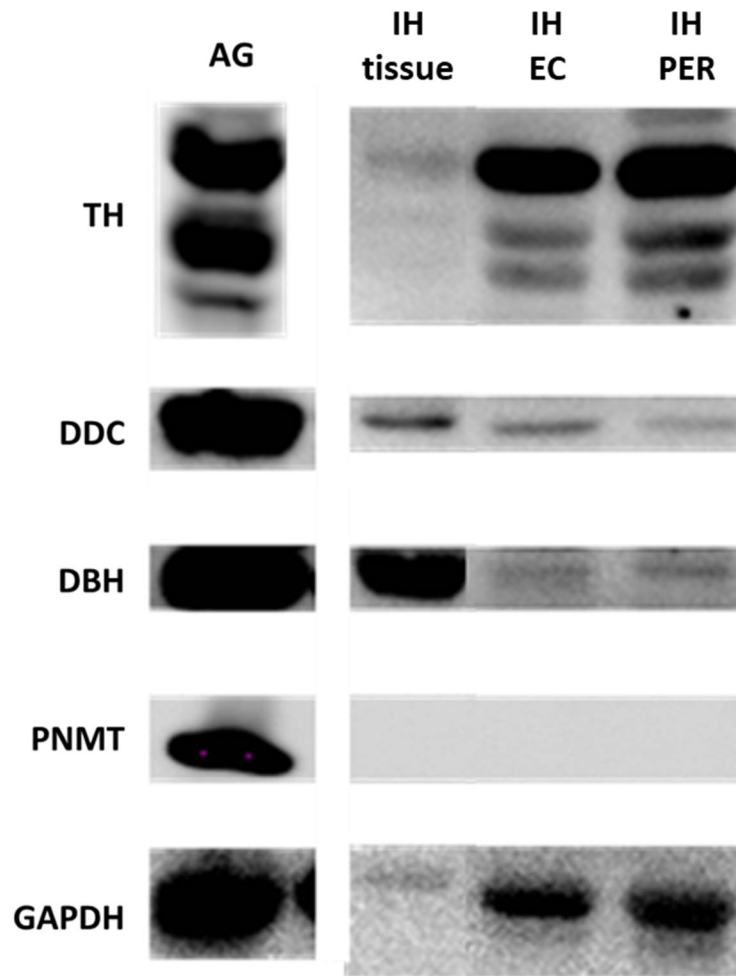


**Figure 6. Congenital cells also form cell aggregate.** (A) Tube formation images of endothelial cells and pericytes from congenital hemangioma (CH) cocultures on matrigel. Mixed culture (1:1) of each cell type (1.104) were incubated overnight on Matrigel in endothelial cells growth medium. Congenital cells are able to form vessels, but form cell aggregates at 48 hours. Scale bar size is 200  $\mu$ m. (B) Quantification of total tube length (left, n=3 per group) and covered area (right) showed that congenital hemangioma cells significantly promote angiogenesis at 6 hours. (C) Quantification of total tube length (n=3 per group) and covered area (right) at 24 hours. (\*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001; \*\*\*\* P< 0,0001; all data presented as mean  $\pm$  SEM). Abbreviations: EC, endothelial cells; Per, pericytes; CH, congenital hemangioma.

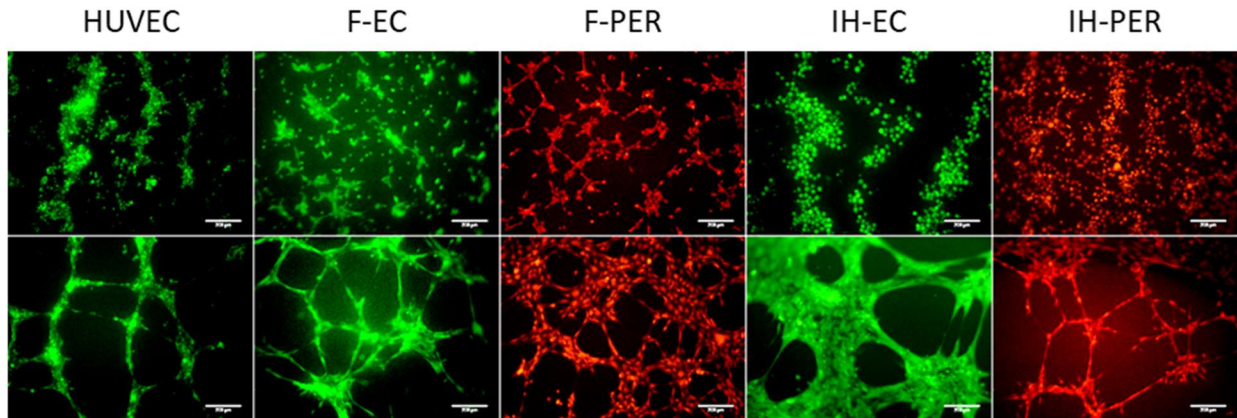
## Supplementary data



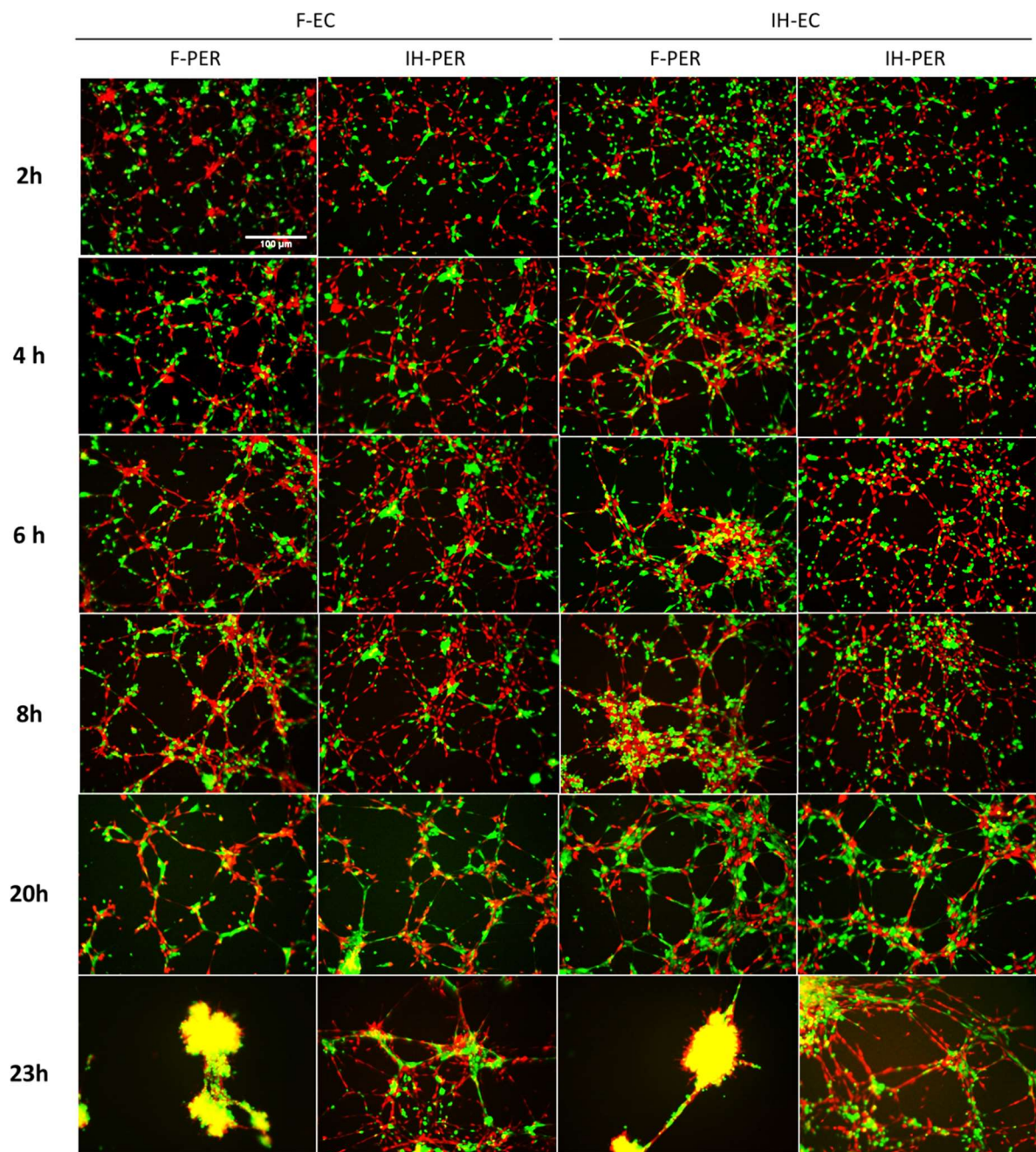
**Figure S1. Hemangioma endothelial cells and pericytes isolation and characterization. (A)** Hemangioma endothelial cells highly express CD34 markers. Immunohistochemistry staining in brown with DAB of CD31 and CD34 markers in infantile hemangioma tissues. Nuclei are counterstained in blue with hematoxylin Scale bar size is 50  $\mu\text{m}$ . **(B)** Endothelial cells and pericytes were isolated from digested infantile hemangioma tissue using respectively anti-CD34 and anti-CD146 magnetic microbeads. Before (top) and after (bottom) sorting, cells were labeled with PE-Cy7- or AF488-conjugated mouse antihuman isotype-matched IgG, or PE-Cy7-conjugated anti-CD34 or Alexa Fluor 488-conjugated anti-CD146. Labelled cells were analyzed by flow cytometry. Percentage of cell population expressing markers are shown in each figure. **(C)** Immunocytofluorescence of endothelial cells and pericytes isolated from infantile hemangioma stained for endothelial marker CD31, pericytes marker CD146,  $\alpha\text{SMA}$ , NG2 and PDGFR $\beta$ . Placenta pericytes and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) are control cells. Nuclei are stained with DAPI. Scale bar size is 10  $\mu\text{m}$



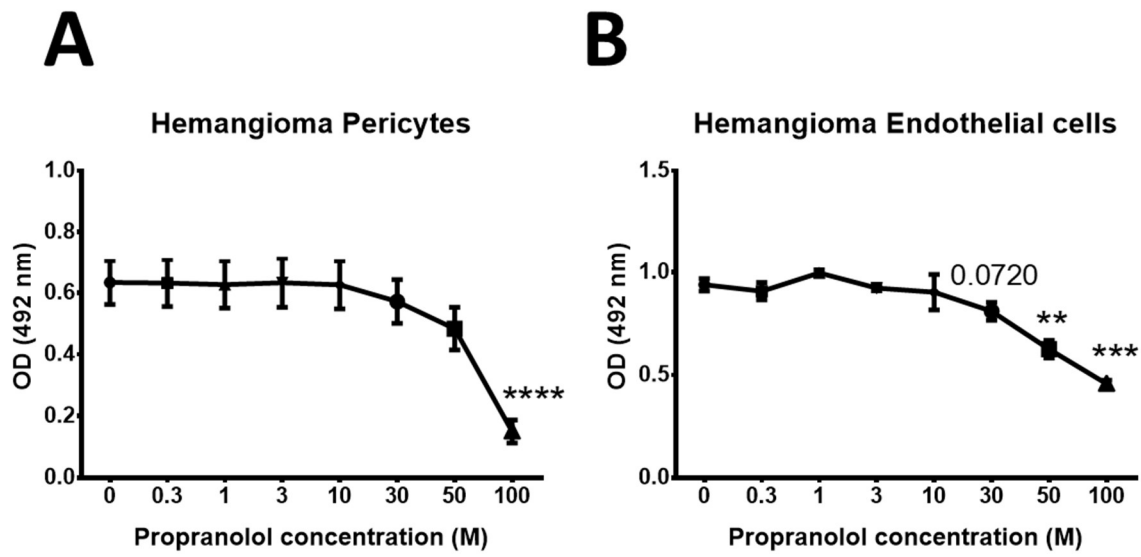
**Figure S2. Endothelial cells and pericytes from hemangioma are able to synthesize noradrenaline.** TH, DDC and DBH levels were evaluated in hemangioma cells by western blot. Adrenal gland (AG) is used as positive control. GAPDH is used as loading control.



**Figure S3.** Tube formation images of endothelial cells and pericytes cocultures on matrigel. HUVEC, endothelial cells (green) and pericytes (red) isolated from foreskin and IH form tubes 30 minutes (top) and 24 hours (bottom) after incubation on Matrigel in endothelial cells growth medium. Scale bar size is 200  $\mu\text{m}$ .



**Figure S4.** Tube formation images of EC and PER cocultures on matrigel. Tubes formation overtime. Scale bar size is 100  $\mu\text{m}$



**Figure S5. Effect of propranolol on hemangioma cells after 6 days treatment. (A)** SRB assay on hemangioma pericytes. **(B)** SRB assay on hemangioma endothelial cells. The optical density (OD) showed that propranolol has a half-maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) at 58  $\mu$ M on pericytes and 93  $\mu$ M on endothelial cells.

**Supplementary table:  
Primary antibodies used for immunohistochemistry and western blot**

| <b>Antibody</b>                 | <b>Reference</b>              | <b>Concentration</b> | <b>Time</b>         | <b>Experimentation</b> |
|---------------------------------|-------------------------------|----------------------|---------------------|------------------------|
| <b>Glut-1</b>                   | PA1-21041<br>(Thermo)         | 1/200                | Overnight           | HIC                    |
| <b>Ki67</b>                     | NCL-L-Ki67-MM1<br>(Leica)     | 1/200                | Overnight           | HIC                    |
| <b>DAPI</b>                     | D9542<br>(Sigma-Aldrich)      | 1/10 000             | 15 minutes          | HIC                    |
| <b>TH</b>                       | SAB4502964<br>(Sigma-Aldrich) | 1/200*-1/1<br>000**  | Overnight           | HIC*, WB**             |
| <b>DDC</b>                      | HPA017742<br>(Sigma-Aldrich)  | 1/200*-1/500*        | Overnight           | HIC*, WB**             |
| <b>DBH</b>                      | PA5-34664<br>(Thermo)         | 1/200*-1/5 000*      | Overnight           | HIC*, WB**             |
| <b>PNMT</b>                     | ab119784<br>(Abcam)           | 1/50*-1/500**        | Overnight           | HIC*, WB**             |
| <b>CD34</b>                     | MA1-10202<br>(Thermo)         | 1/200                | Overnight           | HIC                    |
| <b><math>\alpha</math>-SMA</b>  | ab7817<br>(Abcam)             | 1/500*-1/250****     | Overnight           | HIC*, HCC****          |
| <b><math>\beta</math>-actin</b> | A2228<br>(Sigma-Aldrich)      | 1/10 000             | Overnight           | WB                     |
| <b>CD31</b>                     | M0823<br>(Dako)               | 1/20                 | Overnight           | HCC                    |
| <b>CD146</b>                    | #2505-1<br>(Epitomics)        | 1/250                | Overnight           | HCC                    |
| <b>NG2</b>                      | MAB2585<br>(R&D systems)      | 1/20                 | Overnight           | HCC                    |
| <b>PDGFR<math>\beta</math></b>  | sc-339<br>(Santa Cruz)        | 1/50                 | Overnight           | HCC                    |
| <b>Goat to<br/>rabbit 555</b>   | Abcam<br>(ab150078)           | 1/500                | Room<br>Temperature | HIC                    |
| <b>Goat to<br/>mouse 488</b>    | Abcam<br>(ab150114)           | 1/500                | Room<br>Temperature | HIC                    |



## PARTIE 2 : L'AQUAPORINE-1 JOUE UN ROLE CLE DANS LA REPONSE ANTITUMORALE AU PROPRANOLOL

### Résumé

Le propranolol est utilisé comme traitement de première ligne de l'HI depuis la découverte de son efficacité en 2008 et sa validation clinique en 2015. Néanmoins son mécanisme anti-tumoral est méconnu en raison d'absence de modèle *in vivo* d'HI répondant au propranolol.

Dans ce projet, un modèle *in vivo* a été développé à partir de cellules U87 de glioblastomes injectées en sous-cutanée chez des souris immuno-déficientes. Traitées avec bevacizumab, un anti-VEGF qui induit une hypoxie, les souris développent des tumeurs qui répondent à l'action du propranolol. Les analyses protéomiques de ce modèle ont montré, en réponse au traitement avec le propranolol, une diminution significative de la forte expression de la protéine AQP1 induite par le bevacizumab dans ces tumeurs.

D'autre part, lorsque la tumeur induite par des cellules U87 inactivées par un lentivirus shADRB2 est traitée par bevacizumab, le volume tumoral et l'expression d'AQP1 sont moindres. De la même manière, dans les souris traitées par bevacizumab, l'extinction de l'AQP1 par le shAQP1 dans les U87 conduit au développement de tumeurs significativement plus petites que celles ayant reçu le shCT, en outre nous n'observons pas d'effet additif lors de l'ajout du propranolol dans l'eau de boisson.

Ces premiers résultats suggèrent un rôle clé de l'AQP1 dans la réponse anti-tumorale au propranolol. Les marquages immunohistochimiques ont montré un profil unique des HI comparé aux tissus d'hémangiomes congénitaux ou aux tissus normaux : les cellules endothéliales et les péricytes d'HI n'expriment pas AQP1 contrairement aux hémangiomes congénitaux et tissus normaux. Seules les cellules périvasculaires au niveau de l'adventice des capillaires des HI expriment AQP1. Ce qui n'est pas le cas des hémangiomes congénitaux et des tissus normaux. Le double marquage CD34/AQP1 ainsi que des observations par microscopie électronique ont permis d'identifier ces cellules comme étant des télocytes. Par ailleurs, nos résultats montrent au niveau de

ces cellules l'expression de Ki67, marqueur de prolifération, et de VEGF-A suggérant que ces cellules sont prolifératives et capables d'induire l'angiogenèse. Enfin, l'expression d'ADRB2 au niveau des télocytes suggère un rôle possible dans la physiopathologie de l'HI et dans la réponse au propranolol.

Les résultats de cette étude sont présentés dans l'article ci-dessous actuellement en soumission.

Article



## **Aquaporin-1 reveals telocytes of infantile hemangiomas and is essential for the antitumor effect of propranolol in vivo**

---

François Moisan<sup>1,\*</sup>, Priscilla Kaulanjan-Checkmodine<sup>1</sup>, Sorilla Prey<sup>1,2</sup>, Benoît Rousseau<sup>3</sup>, Marc Bonneau<sup>4</sup>, Stéphane Claverol<sup>4</sup>, Etienne Gontier<sup>5</sup>, Sabrina Lacomme<sup>5</sup>, Lea Dousset<sup>1,2</sup>, Thierry Couffinhall<sup>6</sup>, Jerome Toutain<sup>7</sup>, Maya Loot<sup>8</sup>, Muriel Cario-André<sup>1,9</sup>, Christine Léauté-Labrèze<sup>1,2,9</sup>, Alain Taieb<sup>1,2,9</sup>, Hamid Reza Rezvani<sup>1,2,9\*</sup>

1- Univ. Bordeaux, Inserm, BMGIC, UMR 1035, F-33076 Bordeaux, France

2- Service de Dermatologie Adulte et Pédiatrique, CHU Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France

3- Animalerie A2, Univ. Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France.

4- Plateforme de protéomique, Centre de Génomique Fonctionnelle de Bordeaux, Univ. Bordeaux, F-33076 Bordeaux, France

5- Bordeaux Imaging Center – Electron Microscopy Unit, Univ. Bordeaux, F-33076 Bordeaux, France

6- Univ. Bordeaux, Inserm U 1034, 1 Av. Magellan, F-33600 Pessac, France

7- Service de Génétique Médicale, CHU Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France

8- Service de Chirurgie Pédiatrique, CHU Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France

9- Centre de Référence pour les Maladies Rares de la Peau, CHU Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France

### **\* Corresponding authors and lead contacts**

Postal address: INSERM U1035, Bordeaux, F-33000 France

Email address: [francois.moisan@u-bordeaux.fr](mailto:francois.moisan@u-bordeaux.fr), [hamid-reza.rezvani@u-bordeaux.fr](mailto:hamid-reza.rezvani@u-bordeaux.fr)

Phone: +33-557-575-683 Fax: +33-557-571-374

**Competing interests:** A patent has been granted for the use of beta-blockers in infantile capillary hemangiomas with AT and CLL as inventors and Bordeaux University and Bordeaux University Hospital as owner of the patent. None of the authors has any other financial interest related to this work.

**Other notes about the manuscript:** 8420 words, 6 figures and 1 table



## **Abstract**

Propranolol, a non-selective  $\beta$ -adrenergic receptor (ADRB) antagonist, is currently the first-line therapy for severe infantile hemangioma (IH). However, the mechanism for propranolol antitumor effect is still unknown, owing to the absence of an *in vivo* IH model responsive to propranolol. Assuming that the blood tissue barrier phenotype of IH vessels is an IH intrinsic feature linked to its specific response to  $\beta$ -blockers, we looked for a tumor model harboring this barrier function and responsive to propranolol. By engrafting the human glioblastoma U87 cell line into immunodeficient mice, we found that propranolol-mediated downregulation of Aquaporin-1 (AQP1) has a very pronounced effect on tumor growth. Functional protein association networks analysis and knockdown of ADRB2 and AQP1 indicated that AQP1 downregulation and propranolol treatment trigger the same pathway, suggesting that AQP1 is a major driver of beta-blockade antitumor response. In the search for AQP1 expression in IH samples, we found AQP1 exclusively expressed by telocytes and not endothelial cells. Taken together, our results show that AQP1 expression profile highlights the potential role of telocytes in pathomechanism of IH and could be used as a diagnostic and therapeutic biomarker to distinguish between propranolol-responsive and non-responsive hemangiomas.

## Introduction

Infantile hemangioma (IH), the most frequent tumor of infancy affecting 1 to 5 out of 100 newborns, is a non-congenital benign vascular tumor. Although most IH are small, inconsequential and regress spontaneously, medical treatment is needed in approximately 10 percent of cases. The current first-line therapy for severe IH is propranolol, a non-selective  $\beta$ -adrenergic receptor (ADRB) antagonist [1]. Three subtypes of ADRBs (ADRB1, ADRB2 and ADRB3), which are coded by three distinct genes, belong to the superfamily of G-protein-coupled receptors. They are characterized by a pocket containing binding sites for agonists (e.g. adrenaline and noradrenaline) and competitive antagonists (e.g. propranolol and timolol) [2]. Although a role for ADRB in cancer progression was suggested long ago [3], our serendipitous observation of the efficacy of propranolol in treating IH [4] prompted many researchers to explore the anti-cancer properties of  $\beta$ -blockers.

Although the therapeutic effect of propranolol is thought to be due to its ability to affect vasoconstriction, endothelial cell apoptosis, and/or inhibition of angiogenesis by modulating vascular endothelial growth factors [5,6], the precise mechanism of its action is still under debate and largely unknown. Indeed, the absence of an *in vivo* IH model responsive to propranolol as well as difficulties in accessing IH patient samples before and after treatment have jointly hindered the quest to reveal its mechanism of action. Therefore, our first objective was to develop an *in vivo* tumor model responsive to propranolol. Considering the high efficiency of propranolol and consequently difficulties of obtaining fresh non-propranolol-treated IH patient samples, an important question was which cancer cell line should be chosen. Several arguments guided our choice. First, more than 95% of IH express a high level of glucose transporter protein isoform 1 (GLUT1) [7,8]. Indeed GLUT-1 staining, which largely binds the endothelial cells (ECs) in IH, is widely used as a sensitive and specific diagnostic marker to differentiate IH from other vascular anomalies such as congenital hemangiomas which are not

responsive to propranolol [9]. Second,  $\beta$ -blockers have shown clinical or experimental efficacy in tumors harboring GLUT1 positive vessels such as IH, retinal hemangioblastoma in Von Hippel Lindau (VHL) disease [10] and angiosarcoma [11–14]. Third, GLUT1 vessels are usually restricted to blood tissue barriers, notably the blood-brain barriers, the blood-retina barrier and the placenta [15–19]. We reasoned that the blood tissue barrier phenotype with high GLUT1 protein expression in ECs of IH vessels could be considered as an intrinsic feature of IH linked to its specific response to  $\beta$ -blockers.

Tumors featuring an endothelium with the blood tissue barrier phenotype are uncommon. As pointed out by North *et al*, low and intermediate gliomas possess persistent endothelial GLUT1 expression with compromised barrier function [20]. Moreover, it has been shown that some glioblastoma are positive for the expression of ADRB2, the most relevant potential target of propranolol [21,22]. Using the human glioblastoma U87-MG cell line xenografted into immunodeficient mice as a model, we show in this study that downregulation of Aquaporin-1 (AQP1), a transmembrane protein forming a channel for water and small solutes [23–26], has a very pronounced effect on tumor growth when typical hypoxia-related markers described in infantile hemangioma [27–31] are induced in tumors in bevacizumab-treated mice [32–35]. In the search for AQP1 expression in IH, we report herein that telocytes expressing AQP1 form a distinctive and proliferative layer in IH, suggesting that they may play a key role in the exquisite sensitivity of IH to propranolol.



## Results

### Propranolol efficiently reduces the growth of bevacizumab-treated U87 tumors in mice

In the search for an *in vivo* tumor model responsive to propranolol, U87-MG GBM cells, herein after called U87, were subcutaneously engrafted into immunocompromised NOD-SCID gamma (NSG) mice. The effect of propranolol and bevacizumab (a humanized anti-VEGF monoclonal antibody which is used as a first-line treatment in glioblastoma, hereafter abbreviated as Bev) were then evaluated on tumor growth. Treatment, which was started the day after transplantation of U87 cells, consisted of Bev alone (intraperitoneal injections of 10 mg/kg, twice a week), propranolol alone (2, 10 or 50 mg/kg/day in drinking water), or the combination of both drugs. Results showed that all treatments were well tolerated as evidenced by an absence of weight loss or change in animal welfare as compared with placebo-treated mice (data not shown). Periodic measurements of tumor volumes revealed that propranolol treatment as monotherapy had no significant effect on tumor growth (**Figure 1A**), whereas treatment with Bev alone or in combination with propranolol considerably inhibited tumor progression (**Figure 1B**). Indeed, Bev had a very pronounced anti-tumor growth effect during the first month. However, a reacceleration of tumor growth occurred afterwards (**Figure 1B**), perhaps due to the development of resistance to Bev. Interestingly, the addition of propranolol boosted the anti-tumor growth effect of Bev and significantly delayed reacceleration of tumor growth in a dose dependent manner (**Figure 1B, C**). For example, tumors treated with Bev and 2 mg/kg/day of propranolol were 42% smaller than those treated with Bev alone ( $p < 0.0001$ ) (**Figure 1B**). Of note, the high dose of propranolol (50 mg/kg/day) was less efficient than low doses (2 and 10 mg/kg/day) in delaying tumor growth (**Figure 1B, C**). This might be because propranolol has been found to have an inverse agonist activity in addition to its ADRB

antagonist activity in a concentration-dependent manner [36–38]. For the rest of the experiments, we used 2 mg/kg/day of propranolol to minimize this paradoxical effect.

### **Anti-tumor growth effect of propranolol is mediated by AQP1 downregulation**

Having obtained a tumor model responsive to propranolol, we sought to understand the mechanism of action of propranolol. To this end, we used a comparative proteomic analysis approach to characterize the proteins differentially expressed between xenografts treated with Bev alone vs the combined Bev / propranolol regimen. Proteomic differential analysis revealed 9 overexpressed and 8 downregulated proteins in Bev-treated xenografts compared with tumors treated with placebo as seen in the volcano plot (**Figure 2A, Table 1**). When U87 tumors treated with Bev and propranolol were compared to placebo-treated xenografts, differential protein expression profiling revealed 6 upregulated and 10 downregulated proteins (**Figure 2B, Table 1**). The two volcano plots show the common modulated proteins AQP1 and  $\alpha$ -1 type1 collagen (COL1A1). Of note, AQPs are a family of transmembrane proteins with thirteen members [39]. They are different in their tissue distribution, although the majority are located in the epithelium, endothelium and specialized cells such as erythrocytes, astrocytes, adipocytes and skeletal muscles [39]. AQPs have various known physiological roles such as urine concentration in kidney, cell migration required for angiogenesis and wound healing, regulation of brain water homeostasis, neural signal transduction, skin moisturization, and cell proliferation in wound healing [40]. We therefore focused on the role of AQP1 in tumor response to propranolol for the following reasons. First, while AQP1 protein level was upregulated in Bev-treated U87 xenografts, its level was significantly decreased following addition of propranolol to Bev. Second, there was a significant positive correlation between tumor weight and AQP1 protein abundance in the

Bev-treated group ( $R^2 = 0.4279$ ,  $p = 0.0402$ ), i.e. the higher the level of AQP1 protein, the larger the tumors on the day of sacrifice (**Figure 2C**). These results suggest that AQP1, whose overexpression has been recently associated with many types of cancers as a distinctive clinical prognostic factor [25,26,41–46], could be a promising downstream target for propranolol-mediated delayed tumor growth.

To verify this hypothesis, we first confirmed the expression of both ADRB2 and AQP1 in U87 xenografts (**Figure 3A**). We then verified whether downregulation of ADRB2 could affect the tumorigenic properties of U87. To this end, endogenous ADRB2 protein expression in U87 cells was inhibited using lentivirus-mediated expression of shRNA against ADRB2. To rule out “off target” effects of shADRB2, all experiments were performed with two distinct shRNAs against ADRB2, which inhibited the mRNA expression of ADRB2 respectively by 75% and 55% (**Figure 3B**). Both shCT- and shADRB2-transduced U87 were then subcutaneously transplanted into NSG mice. Mice were then subjected to intraperitoneal injections of Bev (10 mg/kg, twice a week). Periodic measurements of tumor volume indicated that downregulation of ADRB2 resulted in significant decreased tumor growth. Indeed, the mean volume of tumors derived from shADRB2a-transduced cells on days 75 after transplantation was  $1221 \text{ mm}^3 \pm 199$  compared to  $2304 \text{ mm}^3 \pm 375$  for tumors derived from shCT-transduced U87 ( $p=0.031$ ) (**Figure 3C & supplemental Figure 1**). The specific tumor growth rates were also significantly lower when ADRB2 was downregulated by 75% with shADRB2a. However, the significance was lost when the more modest downregulation of ADRB2 (~55%) was achieved using shADRB2b (**Figure 3D**).

To decipher whether ADRB2 downregulation and propranolol treatment affect the same network, we used quantitative proteomic analysis. Proteomic differential analysis among groups receiving Bev-treatment revealed that AQP1 protein level was significantly lower in

tumors formed by shADRB2a-transduced cells compared with those formed by shCT-transduced cells ( $p=0.0258$ ) (**Figure 3E**). To establish potential relationships between ADRB2 and AQP1, STRING functional protein association analysis [47] was performed on proteomic data. It showed that ADRB2 could be linked to AQP1 through calmodulin-2, SRC, caveolin-1 and  $\beta$ -catenin (**Figure 3F**). Interestingly, carbonic Anhydrase IX (CA9), MMP10 and collagen 1, three of the nine upregulated proteins in the Bev-treated group (**Figure 2A, Table 1**), were found downstream of this ADRB2/AQP1 signaling network (**Figure 3F**).

To determine whether the observed anti-tumor growth effect of propranolol relies on the ADRB2/AQP1 axis, we tested the effect of AQP1 downregulation on the tumorigenic property of U87. Both shCT- and shAQP1-transduced U87 were transplanted into NSG mice. As in the previous experiments, treatments with placebo, Bev or combined Bev and propranolol were started the day after cell transplantation. Western blotting revealed that lentivirus-mediated expression of shAQP1 stably inhibited by 77% the AQP1 expression in tumors formed by shAQP1-transduced U87 (**Figure 4A**). In accordance with the previous experiments, the mean weight of tumors formed by shCT-transduced U87 was 1.6-fold lower in Bev-treated mice than in placebo-treated mice (**Figure 4B**). The addition of propranolol boosted the anti-tumor growth effect of Bev, reflected by a 3-fold decrease in the weight of tumors treated with the combination of Bev and propranolol compared with placebo-treated tumors (**Figure 4B**). Likewise, AQP1 downregulation sensitized U87 tumors to Bev treatment. Indeed, the mean weight of tumors composed of shAQP1-transduced cells was 3-fold lower in Bev-treated mice than in placebo-treated mice (**Figure 4B**). Of note, while addition of propranolol or downregulation of AQP1 improved the anti-tumor growth effect of Bev ( $p=0.0336$  and  $p=0.0149$  respectively), the combination of propranolol and shAQP1 had no additive effect on tumor growth in Bev-treated mice, with a mean tumor weight similar to that obtained by the

addition of propranolol or shAQP1 (**Figure 4B**). This suggested that AQP1 downregulation and propranolol treatment modulate tumor growth through the same pathway.

### **AQP1, which is exclusively expressed by perivascular telocytes, could be a diagnostic and therapeutic biomarker in IHs**

Following identification of AQP1 as a downstream target of propranolol in our U87 model, we wondered whether AQP1 could be a marker of propranolol response in IH. To this end, the AQP1 expression profile was assessed using immunofluorescence staining on a panel of IHs, non-involuting and rapidly involuting congenital hemangiomas (NICH and RICH which are typically nonresponsive to propranolol treatment), infant normal dermis and placenta (**Figure 5**). Results showed that IH has a unique AQP1 profile compared to congenital hemangiomas or normal tissues. Indeed, while ECs (tunica intima) and smooth muscle cells (SMCs) (tunica media) in IHs were negative for AQP1, perivascular cells (tunica adventitia) stained positively (**Figure 5A, B**). On the contrary, ECs and perivascular cells were respectively positive and negative for AQP1 in NICH (**Figure 5C**), infant normal dermis (**Figure 5D**) and placenta (**Figure 5E**). Thus, the AQP1 profile expression is as a robust differential marker between IHs and NICH, in addition to GLUT1 positivity. Finally, to determine whether these cells could be a potential target of propranolol in IHs, their expression of ADRB2 was analyzed. Immunostaining showed that AQP1-positive perivascular cells also expressed ADRB2 (**Figure 5F, 6A**).

To further characterize these cells, co-immunostaining of AQP1 and CD34 was performed on IHs. Results showed that the innermost layer of the tunica adventitia of IH vessels was double-positive for AQP1 and CD34 (**Figure 6B**). The specific shape of these cells with very long prolongations, a perivascular location and CD34-positive staining suggest that they belong to a

particular cell type known as telocytes (TC). Morphologically, TCs have a small cell body and specific long prolongations (telopodes), with thin segments (podomers) alternating dilations (podoms) [48]. TCs have been described in the interstitium of many organs. In the dermis, TCs are located around the blood vessels, sweat glands and nerves [49] and have been defined in skin as  $CD34^+/PDGFR\alpha^+/vimentin^+$  and  $CD31^-/CD68^-/CD163^-/c-KIT^-/\alpha SMA^-$  cells [50]. Importantly, vesicle-shedding properties have been noted in areas of contact with other interstitial cells such as mononuclear cells and mast cells [51]. So far, only electron microscopy can confirm telocyte cell type. Therefore, their characterization in IH was performed using transmission electron microscopy (TEM). Their very long (tens to hundreds of micrometers) and very thin podomers and telopodes as well as their stromal synapses with mast cells (**Figure 6C, D**) confirmed that  $CD34^+/AQP1^+$  perivascular cells in IH are telocytes. Close contacts between AQP1-positive telocytes and high ADRB2-positive mast cells was also detectable by immunofluorescence of IH tissues (**Figure 6A and supplemental Figure 2**). We finally tested AQP1-positive perivascular cells in IH for markers expressed by dermal TCs. In addition to CD34 and ADRB2 (**Figure 6 A, B**), TCs in IHs were positive for PDGFR $\alpha$ , Vimentin and CAV1 (**Figure 6E**). They were partially positive for VEGF-A and Ki-67, indicating that TCs in IHs are proliferative and proangiogenic (**Figure 6E**). Finally, they were negative for CD31, CD133, CD68, CD163, c-KIT, tryptase and GLUT1 (**Figure 6E**).

## Discussion

This study provides new insights into the anti-tumor effect of propranolol and demonstrates that a BTB phenotype could be a marker of propranolol sensitivity. The AQP1 expression profile could be used to distinguish between propranolol-responsive and non-responsive infantile vascular tumors. Indeed, our results show that IHs, which are sensitive to propranolol, present GLUT1+/AQP1--endothelium and GLUT1-/AQP1+ perivascular cells. On the contrary, congenial hemangiomas such as NICH, which do not respond to propranolol, have AQP1-positive endothelium and AQP1-negative perivascular telocytes.

Tumors featuring an endothelium with a BTB phenotype are uncommon. Positive GLUT1 and negative AQP1 staining of the endothelium is a known feature of glioblastomas [44,52]. In addition, glioblastomas have a specific perivascular staining for AQP1, which is located in perivascular astrocytes [44], suggesting that the BTB phenotype for IH is closer to brain than to placenta, in which vessels are positive for both GLUT1 and AQP1 (Figure 5E) [53–55]. It has been shown that endothelial expression of AQP1, which is downregulated by AQP1/AQP4-positive astrocytes in the BBB [56], is upregulated in some brain tumors, notably glioblastomas [44,57,58]. AQP1 expression in glioblastoma has been found to be induced by growth factors, hypoxia and D-glucose [44]. Consistently, we found that AQP1 is upregulated in Bev-treated U87 xenografts (Figure 2A), where relative hypoxia is induced by the anti-VEGF-A antibody bevacizumab [35]. As evidence of the induction of hypoxia in Bev-treated xenografts, elevated levels of carbonic anhydrase IX (CA9), a marker of hypoxia, as well as of some pro-angiogenic proteins such as VEGF and MMP2/9, were detected by qPCR and/or in our proteomic analysis (Figure 2, Table 1). Those hypoxia-related markers elevated in our Bev-treated model have been associated with the pathophysiology of IH [28,29,59] which might explain why their presence is associated with propranolol tumor response in our model as well. Our results

showed that AQP1 downregulation by propranolol treatment or shAQP1 significantly decreased the exponential growth phase of Bev-treated U87 tumors (Figure 1B, 2B and 4). Of note antiangiogenic effect of AQP1 silencing has been shown to be increased by hypoxia and/or VEGF-neutralizing antibody, in other words AQP1 is required for hypoxia-inducible angiogenesis [60]. We observed a significant anti-tumor effect of propranolol at a dose of 2 and 10 mg/kg/day under this regimen. However, the 50 mg/kg/day dose of propranolol was less efficient. This paradoxical effect has also been described with propranolol in an osteoporosis animal model [61,62] and may be attributed to the interaction of high doses of propranolol with different types of adrenergic receptors and/or the concentration-dependent inverse agonist activity of propranolol on ADRB. This observation is important because the majority of studies to date on the mechanism of action of propranolol used very high doses ranging from 50 to 200  $\mu\text{M}$  in vitro [63–67]. Moreover it has been shown that 100 nM is sufficient to reach a maximum plateau in binding ADRB2 [21]. Given that the plasma concentration of propranolol in IH patients after oral administration of one of the two daily doses of propranolol (3mg/kg) varies between 21.3 ng/mL to 125 ng/mL ( $\sim 0.48 \mu\text{M}$ ) [68], it is not likely that the effect of propranolol in IH can be mimicked and studied with such doses.

Little is known about the relation between  $\beta$ -adrenergic receptors and AQPs. For instance, treatment of frog skin with isoproterenol, a non-selective ADRB agonist, was reported to be associated with water permeability, whereas propranolol had an inhibitory effect [69]. Both events are mediated by AQPs, which are translocated to the apical membrane [69]. In our xenograft model, propranolol treatment was as efficient as ADRB2 downregulation in reducing Bev-treated tumor growth (Figure 3). Moreover, when propranolol treatment combined with ADRB2 downregulation was tested, no additive effect was found (supplemental Figure 3), suggesting that the anti-tumor effect of propranolol is the result of an on-target ADRB2 effect. Our functional protein association networks analysis and AQP1 downregulation further suggest



that AQP1 downregulation and propranolol treatment share the same pathway in our xenograft model (Figure 3, 4). Indeed, although AQP1 has been described as a pro-tumor protein [26], its downregulation alone had no antitumor effect in placebo-treated mice in our model but greatly sensitized U87 tumors to Bev with a magnitude comparable to that of propranolol treatment or ADRB2 downregulation.

Given the importance of AQP1 for propranolol response in our xenograft tumor model, we looked for the cell expressing AQP1 in IH. We found that interstitial perivascular telocytes, which are numerous in IH, are highly positive for AQP1 compared to congenital hemangiomas or normal dermis (Figure 5). The effects of telocytes on skin homeostasis including the neonatal blood skin barrier, skin remodeling, skin regeneration and skin repair could be a part of the pathomechanism of IH leading to its rapid growth and its natural or propranolol-induced involution [49,70,71]. Moreover, IH telocytes make contacts known as stromal synapses with the numerous mast cells present in IH as evidenced by many vesicles observed at the level of the stromal synapses (Figure 6), allowing a paracrine cell-cell dialogue [49,72]. Given that mast cells are also highly positive for ADRB2 [73], the paracrine signaling loop between IH-associated telocytes and mast cells may play a pivotal role in IH homeostasis and its response to propranolol. Analysis of the content of these vesicles might help to decipher the role of the IH microenvironment in the pathophysiology of this tumor, and especially the respective roles of mast cells and telocytes in IH growth and the response to propranolol.

## **Materials and Methods**

### **Drugs and Chemicals.**

Clinical formulations of bevacizumab Avastin (Roche) and Propranolol were purchased from the Bordeaux Hospital Pharmacy. The infantile propranolol formulation Hemangirol and placebo were provided by Pierre Fabre Dermatologie Laboratory.

### **Human samples**

This was an experimental laboratory study performed on human tissue samples. All studies were performed in accordance with the Declaration of Helsinki. Human samples were obtained from patients seen at Bordeaux University Hospital (CHU). All donors provided written informed consent.

### **Cell lines, culture and cytogenetic verification**

The origin and characteristics of the human cancer cell line U87-MG used in the present study are as follows. The U87-MG line was derived from malignant gliomas of a male patient. The cell line is likely a glioblastoma of CNS origin [74] and was obtained from the American Type Culture Collection. Cells were grown in DMEM medium supplemented with 10% fetal calf serum (Gibco BRL Invitrogen, USA) and cultured in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C. U87-MG cell cultures were tested every two weeks for mycoplasma contamination by PCR and always came back negative.

To examine the cytogenetic profile of U-87 MG, cells were cultured in Labtek TM chamber slides (Thermo Fisher Scientific, NY, USA). After 2 days, mitotic divisions were blocked at

the (pro)metaphasic stage by adding a colcemid solution for 3 hours (KaryoMAX® Colcemid™ solution at 0.10µg/ml (Life Technologies Corporation, CA, USA)). Hypotonic shock and fixation of the chromosome preparations were performed with a saline solution (1% sodium citrate) and Carnoy's solution (acetic acid and methanol (1:3 v/v)), respectively.

Conventional karyotyping of U-87 MG cells was performed after Giemsa staining and heat denaturation ('R-bands'). Conventional karyotyping of U-87 MG cells identified structural abnormalities previously described in this cell line, including additional material of unknown origin on chromosomes 1 and 6, partial deletions of chromosomes 9 and 18, and a derivative chromosome from a translocation involving the long arm of chromosome 10 and the short arm of a chromosome 16 (chromosome der(10;16)(q10;q10)): data from PBCF at ATCC (data not shown).

To confirm the origin of this derivative chromosome, a fluorescence in situ hybridization (FISH) was performed on metaphase spreads with probes targeting specific regions of chromosome 10 (whole chromosome painting (wcp) 10 probe) and specific regions of chromosome 16 (wcp16 probe) (LEICA MICROSYSTEMES SA, Nanterre, France), according to the manufacturers' protocols. FISH highlighted the derivative chromosome der(10;16)(q10;q10) (data not shown).

### **Animals and experimental protocol**

NOD/Shi-SCID IL2R $\gamma$ null mice (NSG) were bred in standard conditions compliant with regulations and housed in a pathogen-free animal facility. All mouse experiments were carried out with the approval of Bordeaux University Animal Care and Use Committee. Male mice were used in all experiments. Mice were randomly assigned to each group before the start and experiments were performed blinded with respect to treatment.

Experimental subgroups consisted of 10 mice per group, with each subgroup caged separately.  $5 \times 10^5$  of U87-MG tumor cells combined with Matrigel® Matrix High Concentration (Corning, USA) were subcutaneously (s.c.) injected in the right flank of mice. Treatments was started the day after transplantation of U87 cells and consist of Bev alone (intraperitoneal injections of 10 mg/kg, twice a week), propranolol alone (ranging from 2, 10 or 50 mg/kg/day in drinking water), or the combination of both drugs. Counterpart control groups received intraperitoneal injection of PBS, a vehicle solution in drinking water or both. To assess the tumor volumes and growth rate of tumors, caliper measurements of the tumors were obtained twice a week. Tumor volumes were calculated by the following formula: Volume = (width)<sup>2</sup> x length/2. After two months and a half of treatment, mice were euthanized, and tumors were extracted, weighted and collected for immunohistochemical studies and RNA and protein purification. Blood plasma was collected for ELISA analyses.

### **RNA isolation and real-time reverse transcription PCR**

RNA was isolated from sub-confluent growing cells using the NucleoSpin® RNA kit (MACHEREY-NAGEL, Germany) and 0.5 µg RNA was used for first-strand cDNA synthesis by using PrimeScript™ RT Master Mix (Takara, Japan) according to the manufacturer's protocols. 10x diluted cDNA was prepared and the final 20 µl reaction mixture included 300 nM of each primer and 1x Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix (Agilent, USA). Initial denaturation for all PCR reactions was 3 min at 95 °C, followed by 40 cycles of PCR amplification (95 °C for 5 sec and 60 °C for 5 sec) using the CFX96 Real-Time PCR Detection System instrument (Bio-Rad, USA). The PCR product obtained by specific primers for glucuronidase beta (GUSB) was used as a reference gene to control for loading. Amplification efficiencies were determined by serial dilutions, and all reactions were

performed in triplicate. Melt curves were performed after each run to confirm the primer specificity.

### **Lentivirus generation and establishment of GFP<sup>+</sup> cells**

The lentiviral vectors pGIPZ (TurboGFP and shRNA are part of a bicistronic transcript allowing the visual marking of shRNA-expressing cells) targeting ADRB2 or AQP1 and the non-silencing control were acquired from Thermo Fisher, USA. Lentiviral particles expressing GFP were prepared using 293T cells plated in 175 cm<sup>2</sup> flasks. Twenty-four hours after seeding, near-confluent cells were co-transfected with 45 µg pHR2-GLF lentiviral vector together with pCMVΔR8.74 packaging and VSV-G-expressing vectors (3:2:1 ratio) in the presence of 25 µM chloroquine (Sigma-Aldrich, USA). The medium was changed after 8–12 h and then collected at 24–36 h, filtered through a 0.45 µm polyethersulfone filter, and ultracentrifuged for 2 h at 20,000 rpm at 4 °C. The viral pellet was resuspended in plain IMDM medium (Invitrogen, USA) and frozen at -80 °C. The viral titer was determined by infection of 293T cells with several dilutions of the virus and analysis of GFP<sup>+</sup> cells by flow cytometry 36 h later. U87-MG cells were transduced with lentivirus. After 16–24 h incubation with virus, the medium changed. Transduced cells were selected with 1 µg/mL of puromycin for 5 days. GFP<sup>+</sup> cells were sorted and purified by flow cytometry.

### **Immunohisto-fluorescence and –chemistry.**

Following deparaffinization of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections, antigen was retrieved by using citrate buffer pH6 in a PT Link instrument (Dako, Agilent, USA). The sections were then incubated overnight at 4°C with primary antibodies against AQP1, CD34, ADRB2, GLUT1, CD31, CD133, PDGFR, c-kit, vimentin, CAV-1, Tryptase, VEGF-A (**supplemental Table 1**). After incubation for one hour with Alexa Fluor 488– or 555–

conjugated secondary antibody, the nuclei were counterstained with DAPI. For IHC, HRP-conjugated secondary antibody (Dako, USA) was used and the nuclei were then counterstained with hematoxylin.

### **Proteomic analysis**

Proteomic analysis was performed as previously explained [75,76].

#### **Sample preparation and protein digestion**

Samples were solubilized in Laemmli buffer and were deposited in triplicate onto SDS-PAGE. Separation was stopped once proteins had entered the resolving gel. After colloidal blue staining, bands were cut out from the SDS-PAGE gel and subsequently cut into 1 mm x 1 mm gel pieces. Gel pieces were destained in 25 mM ammonium bicarbonate 50% ACN, rinsed twice in ultrapure water and shrunk in ACN for 10 min. After removal of ACN, gel pieces were dried at room temperature, covered with the trypsin solution (10 ng/ $\mu$ l in 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ), rehydrated at 4 °C for 10 min, and finally incubated overnight at 37 °C. Spots were then incubated for 15 min in 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  at room temperature with rotary shaking. The supernatant was collected, and an  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}/\text{HCOOH}$  (47.5:47.5:5) extraction solution was added onto gel slices for 15 min. The extraction step was repeated twice. Supernatants were pooled, dried in a vacuum centrifuge, and resuspended in 25  $\mu$ l of formic acid (5%, v/v) so as to inject about 500 ng.

#### **nLC-MS/MS analysis**

Peptide mixture was analyzed on a Ultimate 3000 nanoLC system (Dionex, Amsterdam, The Netherlands) coupled to an Electrospray Q-Exactive quadrupole Orbitrap benchtop mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA). Ten microliters of peptide digests were loaded onto a 300- $\mu$ m-inner diameter x 5-mm C18 PepMap<sup>TM</sup> trap column

(LC Packings) at a flow rate of 30  $\mu\text{L}/\text{min}$ . The peptides were eluted from the trap column onto an analytical 75-mm id x 25-cm C18 Pep-Map column (LC Packings) with a 4–40% linear gradient of solvent B in 108 min (solvent A was 0.1% formic acid in 5% ACN, and solvent B was 0.1% formic acid in 80% ACN). The separation flow rate was set at 300 nL/min. The mass spectrometer operated in positive ion mode at a 1.8-kV needle voltage. Data were acquired using Xcalibur 2.2 software in a data-dependent mode. MS scans ( $m/z$  300–2000) were recorded at a resolution of  $R = 70\,000$  (@  $m/z$  200) and an AGC target of  $1 \times 10^6$  ions was collected within 100 ms. Dynamic exclusion was set to 30 s and the top 15 ions were selected from fragmentation in HCD mode. MS/MS scans with a target value of  $1 \times 10^5$  ions were collected with a maximum fill time of 120 ms and a resolution of  $R = 35000$ . Additionally, only +2 and +3 charged ions were selected for fragmentation. Other settings were as follows: no sheath nor auxiliary gas flow, heated capillary temperature, 260  $^{\circ}\text{C}$ ; normalized HCD collision energy of 25% and an isolation width of 3  $m/z$ .

### **Database search and results processing**

Data were searched by SEQUEST through Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Fisher Scientific Inc.) against a subset of the 2018.01 version of the UniProt database restricted to the Homo Sapiens Reference Proteome Set (71,536 entries). Spectra from peptides higher than 5000 Da or lower than 350 Da were rejected. The search parameters were as follows: mass accuracy of the monoisotopic peptide precursor and peptide fragments were set to 10 ppm and 0.02 Da respectively. Only b- and y-ions were considered for mass calculation. Oxidation of methionines (+16 Da) and carbamidomethylation of cysteines (+57 Da) were considered as variable and fixed modifications, respectively. Two missed trypsin cleavages were allowed. Peptide validation was performed using the

Percolator algorithm [77] and only “high confidence” peptides were retained corresponding to a 1% false positive rate at peptide level.

### **Label-Free Quantitative Data Analysis**

Raw LC-MS/MS data were imported in Progenesis QI for Proteomics 2.0 (Nonlinear Dynamics Ltd, Newcastle, U.K). Data processing included the following steps: (i) Features detection, (ii) Features alignment across all samples, (iii) Volume integration for 2-6 charge-state ions, (iv) Normalization on feature median ratio, (v) Import of sequence information, (vi) Calculation of protein abundance (sum of the volume of corresponding peptides), (vii) A statistical test was performed and proteins were filtered based on  $p\text{-value} < 0.05$ . Only non-conflicting features and unique peptides were considered for calculation at protein level. Quantitative data were considered for proteins quantified by a minimum of 2 peptides.

### **Transmission electron microscopy (TEM)**

Human biopsies were fixed with 2.5 % (v/v) glutaraldehyde in 0.1M phosphate buffer (pH 7.4) for 1h at room temperature (RT). Then samples were washed in 0.1M phosphate buffer and post-fixed in 1% (v/v) osmium tetroxide in phosphate buffer 0.1 M for 2h in the dark at RT, then were washed in water and dehydrated through a series of graded ethanol and embedded in a mixture of pure ethanol and epoxy resin (Epon 812; Delta Microscopy, Toulouse, France) 50/50 (v/v) for 2 hours and then in 100% resin overnight at RT. Polymerization of the resin was carried out between 24-48 hours at 60 ° C.

Samples were then sectioned using a diamond knife (Diatome, Biel-Bienne, Switzerland) on an ultramicrotome (EM UC7, Leica Microsystems, Vienna, Austria). Ultrathin sections (65 nm)



were picked up on copper grids and then stained with uranyl acetate and lead citrate. Grids were examined with a transmission electron microscope (H7650, Hitachi, Tokyo, Japan) at 80kV.

### **Statistical analyses**

The standard two-tailed Student's t-test for two data sets or ANOVA, when more than two data sets were used, were performed using Prism V6 (GraphPad Inc.). Data are presented as means  $\pm$  standard error of mean (SEM).

### **Author contributions**

F.M. designed and performed the experiments, analyzed the data and wrote the manuscript; P.K. performed some experiments; M.C.A. and T.C. provided constructive comments; S.P., L.D., C.L.L and M.L. helped for clinical samples and provided constructive comments; B.R. helped for animal experiments; E.G. and S.L. performed electron microscopy; J.T. performed cytogenetic analysis; M.B., and S.C. performed the proteomic procedure; and A.T. and H.R.R. designed the experiments, analyzed the data, and wrote the paper.

**Acknowledgments:** A.T. gratefully acknowledges support from the ANR "BETASKIN2" ANR-12-BSV1-0021-01, Ligue Nationale contre le Cancer, L'Oreal La Roche Posay, Laboratoires Pierre Fabre, "Fondation de l'Avenir" and "Fondation Association pour la Recherche contre le Cancer". Electron microscopy studies were conducted at the Bordeaux Imaging Center - Bordeaux University, a core facility of the national infrastructure "France BioImaging" (ANR-10-INBS-04 FranceBioImaging).

### **Data availability**

The authors declare that the data supporting the findings of this study are available within the paper and its Supplementary Information files. Additional data are available from the corresponding author upon reasonable request.

## References

- 1 Léauté-Labrèze C, Hoeger P, Mazereeuw-Hautier J, *et al.* A Randomized, Controlled Trial of Oral Propranolol in Infantile Hemangioma. *N Engl J Med* 2015; **372**: 735-746
- 2 Rosenbaum DM, Rasmussen SGF, Kobilka BK. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* 2009; **459**: 356-363
- 3 Schuller HM, Cole B. Regulation of cell proliferation by beta-adrenergic receptors in a human lung adenocarcinoma cell line. *Carcinogenesis* 1989; **10**: 1753-1755
- 4 Léauté-Labrèze C, Dumas de la Roque E, Hubiche T, *et al.* Propranolol for severe hemangiomas of infancy. *N Engl J Med* 2008; **358**: 2649-2651
- 5 Greenberger S, Bischoff J. Infantile Hemangioma-Mechanism(s) of Drug Action on a Vascular Tumor. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2011; **1**: a006460
- 6 Storch CH, Hoeger PH. Propranolol for infantile haemangiomas: insights into the molecular mechanisms of action. *Br J Dermatol* 2010; **163**: 269-274
- 7 North PE, Waner M, Mizeracki A, *et al.* GLUT1: a newly discovered immunohistochemical marker for juvenile hemangiomas. *Hum Pathol* 2000; **31**: 11-22
- 8 van Vugt LJ, van der Vleuten CJM, Flucke U, *et al.* The utility of GLUT1 as a diagnostic marker in cutaneous vascular anomalies: A review of literature and recommendations for daily practice. *Pathol - Res Pract* 2017; **213**: 591-597
- 9 Boucek RJ, Kirsh AL, Majesky MW, *et al.* Propranolol Responsiveness in Vascular Tumors Is Not Determined by Qualitative Differences in Adrenergic Receptors. *Otolaryngol Neck Surg* 2013; **149**: 772-776
- 10 Albiñana V, Escribano RMJ, Soler I, *et al.* Repurposing propranolol as a drug for the treatment of retinal haemangioblastomas in von Hippel-Lindau disease. *Orphanet J Rare Dis* 2017; **12**: 122
- 11 Daguzé J, Saint-Jean M, Peuvrel L, *et al.* Visceral metastatic angiosarcoma treated

- effectively with oral cyclophosphamide combined with propranolol. *JAAD case reports* 2016; **2**: 497-499
- 12 Daguzé J, Saint-Jean M, Dréno B. Large nose angiosarcoma treated effectively with oral cyclophosphamide combined with propranolol. *J Eur Acad Dermatology Venereol* 2018; **32**: e52-e54
- 13 Banavali S, Pasquier E, Andre N. Targeted therapy with propranolol and metronomic chemotherapy combination: sustained complete response of a relapsing metastatic angiosarcoma. *Ecancermedicalscience* 2015; **9**: 499
- 14 Pasquier E, André N, Street J, *et al.* Effective Management of Advanced Angiosarcoma by the Synergistic Combination of Propranolol and Vinblastine-based Metronomic Chemotherapy: A Bench to Bedside Study. *EBioMedicine* 2016; **6**: 87-95
- 15 Harik SI, Kalaria RN, Andersson L, *et al.* Immunocytochemical localization of the erythroid glucose transporter: abundance in tissues with barrier functions. *J Neurosci* 1990; **10**: 3862-3872
- 16 Froehner SC, Davies A, Baldwin SA, *et al.* The blood—nerve barrier is rich in glucose transporter. *J Neurocytol* 1988; **17**: 173-178
- 17 Jansson T, Wennergren M, Illsley NP. Glucose transporter protein expression in human placenta throughout gestation and in intrauterine growth retardation. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; **77**: 1554-1562
- 18 SCHLINGEMANN RO, HOFMAN P, KLOOSTER J, *et al.* Ciliary Muscle Capillaries Have Blood–Tissue Barrier Characteristics. *Exp Eye Res* 1998; **66**: 747-754
- 19 Farrell CL, Yang J, Pardridge WM. GLUT-1 glucose transporter is present within apical and basolateral membranes of brain epithelial interfaces and in microvascular endothelia with and without tight junctions. *J Histochem Cytochem* 1992; **40**: 193-199
- 20 North PE, Waner M, Mizeracki A, *et al.* GLUT1: A newly discovered

- immunohistochemical marker for juvenile hemangiomas. *Hum Pathol* 2000; **31**: 11-22
- 21 Alcobia DC, Ziegler AI, Kondrashov A, *et al.* Visualizing Ligand Binding to a GPCR In Vivo Using NanoBRET. *iScience* 2018; **6**: 280-288
- 22 Thaker PH, Han LY, Kamat A a, *et al.* Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma. *Nat Med* 2006; **12**: 939-944
- 23 Monzani E, Bazzotti R, Perego C, *et al.* AQP1 Is Not Only a Water Channel: It Contributes to Cell Migration through Lin7/Beta-Catenin. Hotchin N, ed. *PLoS One* 2009; **4**: e6167
- 24 Wang J, Feng L, Zhu Z, *et al.* Aquaporins as diagnostic and therapeutic targets in cancer: how far we are? *J Transl Med* 2015; **13**: 96
- 25 Hu J, Verkman AS. Increased migration and metastatic potential of tumor cells expressing aquaporin water channels. *FASEB J* 2006; **20**: 1892-1894
- 26 Tomita Y, Dorward H, Yool AJ, *et al.* Role of Aquaporin 1 Signalling in Cancer Development and Progression. *Int J Mol Sci* 2017; **18**: 299
- 27 Ji Y, Chen S, Li K, *et al.* Signaling pathways in the development of infantile hemangioma. *J Hematol Oncol* 2014; **7**: 13
- 28 Chen G, Zhang W, Li Y-P, *et al.* Hypoxia-induced autophagy in endothelial cells: a double-edged sword in the progression of infantile haemangioma? *Cardiovasc Res* 2013; **98**: 437-448
- 29 Kleinman ME, Greives MR, Churgin SS, *et al.* Hypoxia-induced mediators of stem/progenitor cell trafficking are increased in children with hemangioma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; **27**: 2664-2670
- 30 de Jong S, Itinteang T, Withers AHJ, *et al.* Does hypoxia play a role in infantile hemangioma? *Arch Dermatol Res* 2016; **308**: 219-227
- 31 Chang EI, Chang EI, Thangarajah H, *et al.* Hypoxia, hormones, and endothelial

- progenitor cells in hemangioma. *Lymphat Res Biol* 2007; **5**: 237-243
- 32 Miyazaki S, Kikuchi H, Ino I, *et al.* Anti-VEGF antibody therapy induces tumor hypoxia and stanniocalcin 2 expression and potentiates growth of human colon cancer xenografts. *Int J Cancer* 2014; **135**: 295-307
- 33 Rapisarda A, Hollingshead M, Uranchimeg B, *et al.* Increased antitumor activity of bevacizumab in combination with hypoxia inducible factor-1 inhibition. *Mol Cancer Ther* 2009; **8**: 1867-1877
- 34 McIntyre A, Patiar S, Wigfield S, *et al.* Carbonic anhydrase IX promotes tumor growth and necrosis in vivo and inhibition enhances anti-VEGF therapy. *Clin Cancer Res* 2012; **18**: 3100-3111
- 35 Kuang R, Jahangiri A, Mascharak S, *et al.* GLUT3 upregulation promotes metabolic reprogramming associated with antiangiogenic therapy resistance. *JCI insight* 2017; **2**: e88815
- 36 Baker JG, Hall IP, Hill SJ. Agonist and inverse agonist actions of beta-blockers at the human beta 2-adrenoceptor provide evidence for agonist-directed signaling. *Mol Pharmacol* 2003; **64**: 1357-1369
- 37 Chidiac P, Hebert TE, Valiquette M, *et al.* Inverse agonist activity of beta-adrenergic antagonists. *Mol Pharmacol* 1994; **45**: 490-499
- 38 Khilnani G, Khilnani A. Inverse agonism and its therapeutic significance. *Indian J Pharmacol* 2011; **43**: 492
- 39 Day RE, Kitchen P, Owen DS, *et al.* Human aquaporins: Regulators of transcellular water flow. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 2014; **1840**: 1492-1506
- 40 Boury-Jamot M, Daraspe J, Bonté F, *et al.* Skin Aquaporins: Function in Hydration, Wound Healing, and Skin Epidermis Homeostasis. In *Aquaporins*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009; 205-217.

- 41 Wu Z, Li S, Liu J, *et al.* RNAi-mediated silencing of AQP1 expression inhibited the proliferation, invasion and tumorigenesis of osteosarcoma cells. *Cancer Biol Ther* 2015; **16**: 1332-1340
- 42 Huebert RC, Jagavelu K, Hendrickson HI, *et al.* Aquaporin-1 promotes angiogenesis, fibrosis, and portal hypertension through mechanisms dependent on osmotically sensitive microRNAs. *Am J Pathol* 2011; **179**: 1851-1860
- 43 Esteva-Font C, Jin B-J, Verkman AS. Aquaporin-1 gene deletion reduces breast tumor growth and lung metastasis in tumor-producing MMTV-PyVT mice. *FASEB J* 2014; **28**: 1446-1453
- 44 Hayashi Y, Edwards NA, Proescholdt MA, *et al.* Regulation and function of aquaporin-1 in glioma cells. *Neoplasia* 2007; **9**: 777-787
- 45 Martinez FD, Graves PE, Baldini M, *et al.* Association between genetic polymorphisms of the beta2-adrenoceptor and response to albuterol in children with and without a history of wheezing. *J Clin Invest* 1997; **100**: 3184-3188
- 46 Deb P, Pal S, Dutta V, *et al.* Correlation of expression pattern of aquaporin-1 in primary central nervous system tumors with tumor type, grade, proliferation, microvessel density, contrast-enhancement and perilesional edema. *J Cancer Res Ther* 2012; **8**: 571
- 47 Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, *et al.* STRING v10: protein–protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res* 2015; **43**: D447-D452
- 48 Popescu LM, Fausone-Pellegrini M-S. TELOCYTES - a case of serendipity: the winding way from Interstitial Cells of Cajal (ICC), via Interstitial Cajal-Like Cells (ICLC) to TELOCYTES. *J Cell Mol Med* 2010; **14**: 729-740
- 49 Ceafalan L, Gherghiceanu M, Popescu LM, *et al.* Telocytes in human skin--are they

- involved in skin regeneration? *J Cell Mol Med* 2012; **16**: 1405-1420
- 50 Manetti M, Guiducci S, Ruffo M, *et al.* Evidence for progressive reduction and loss of telocytes in the dermal cellular network of systemic sclerosis. *J Cell Mol Med* 2013; **17**: 482-496
- 51 Rusu MC, Mirancea N, Mănoiu VS, *et al.* Skin telocytes. *Ann Anat - Anat Anzeiger* 2012; **194**: 359-367
- 52 Nagamatsu S, Sawa H, Wakizaka A, *et al.* Expression of facilitative glucose transporter isoforms in human brain tumors. *J Neurochem* 1993; **61**: 2048-2053
- 53 Sha X, Xiong Z, Liu H, *et al.* Maternal-fetal fluid balance and aquaporins: from molecule to physiology. *Acta Pharmacol Sin* 2011; **32**: 716-720
- 54 Zhu XQ, Jiang SS, Zhu XJ, *et al.* Expression of Aquaporin 1 and Aquaporin 3 in Fetal Membranes and Placenta in Human Term Pregnancies with Oligohydramnios. *Placenta* 2009; **30**: 670-676
- 55 Beall MH, Wang S, Yang B, *et al.* Placental and Membrane Aquaporin Water Channels: Correlation with Amniotic Fluid Volume and Composition. *Placenta* 2007; **28**: 421-428
- 56 Dolman D, Drndarski S, Abbott NJ, *et al.* Induction of aquaporin 1 but not aquaporin 4 messenger RNA in rat primary brain microvessel endothelial cells in culture. *J Neurochem* 2005; **93**: 825-833
- 57 MARKERT JM, FULLER CM, GILLESPIE GY, *et al.* Differential gene expression profiling in human brain tumors. *Physiol Genomics* 2001; **5**: 21-33
- 58 Oshio K, Binder DK, Liang Y, *et al.* Expression of the aquaporin-1 water channel in human glial tumors. *Neurosurgery* 2005; **56**: 375-81; discussion 375-81
- 59 Kleber CJ, Spiess A, Kleber JB, *et al.* Urinary matrix metalloproteinases-2/9 in healthy infants and haemangioma patients prior to and during propranolol therapy. *Eur J*

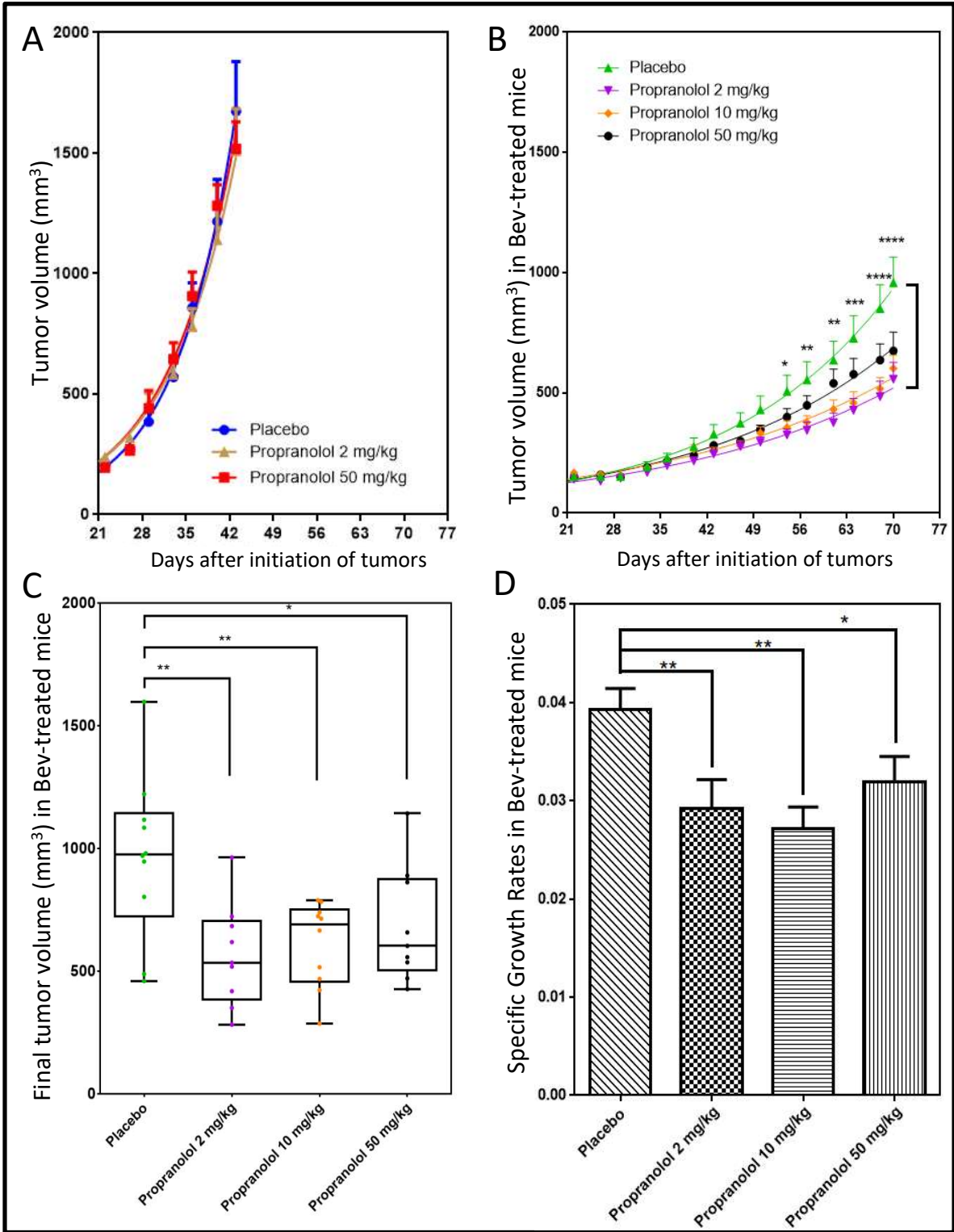
- Pediatr* 2012; **171**: 941-946
- 60 Kaneko K, Yagui K, Tanaka A, *et al.* Aquaporin 1 is required for hypoxia-inducible angiogenesis in human retinal vascular endothelial cells. *Microvasc Res* 2008; **75**: 297-301
- 61 Bonnet N, Laroche N, Vico L, *et al.* Dose effects of propranolol on cancellous and cortical bone in ovariectomized adult rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; **318**: 1118-1127
- 62 Rodrigues W, Madeira M, da Silva T, *et al.* Low dose of propranolol down-modulates bone resorption by inhibiting inflammation and osteoclast differentiation. *Br J Pharmacol* 2012; **165**: 2140-2151
- 63 Chen YZ, Bai N, Bi JH, *et al.* Propranolol inhibits the proliferation, migration and tube formation of hemangioma cells through HIF-1 $\alpha$  dependent mechanisms. *Brazilian J Med Biol Res = Rev Bras Pesqui medicas e Biol* 2017; **50**: e6138
- 64 Liao X, Che X, Zhao W, *et al.* The  $\beta$ -adrenoceptor antagonist, propranolol, induces human gastric cancer cell apoptosis and cell cycle arrest via inhibiting nuclear factor  $\kappa$ B signaling. *Oncol Rep* 2010; **24**: 1669-1676
- 65 Hajighasemi F, Mirshafiey A. In Vitro Sensitivity of Leukemia Cells to Propranolol. *J Clin Med Res* 2009; **1**: 144-149
- 66 Wei W-J, Shen C-T, Song H-J, *et al.* Propranolol sensitizes thyroid cancer cells to cytotoxic effect of vemurafenib. *Oncol Rep* 2016; **36**: 1576-1584
- 67 Munabi NCO, England RW, Edwards AK, *et al.* Propranolol Targets Hemangioma Stem Cells via cAMP and Mitogen-Activated Protein Kinase Regulation. *Stem Cells Transl Med* 2015; **5**: 45-55
- 68 Del Frari L, Léauté-Labrèze C, Guibaud L, *et al.* Propranolol pharmacokinetics in infants treated for Infantile Hemangiomas requiring systemic therapy: Modeling and



- dosing regimen recommendations. *Pharmacol Res Perspect* 2018; **6**: e00399
- 69 Ogushi Y, Kitagawa D, Hasegawa T, *et al.* Correlation between aquaporin and water permeability in response to vasotocin, hydrin and  $\beta$ -adrenergic effectors in the ventral pelvic skin of the tree frog *Hyla japonica*. *J Exp Biol* 2010; **213**: 288-294
- 70 Mirancea N, Moroşanu A-M, Mirancea G-V, *et al.* Infrastructure of the telocytes from tumor stroma in the skin basal and squamous cell carcinomas. *Rom J Morphol Embryol* 2013; **54**: 1025-1037
- 71 Manole CG, Gherghiceanu M, Simionescu O. Telocyte dynamics in psoriasis. *J Cell Mol Med* 2015; **19**: 1504-1519
- 72 Yang J, Li Y, Xue F, *et al.* Exosomes derived from cardiac telocytes exert positive effects on endothelial cells. *Am J Transl Res* 2017; **9**: 5375-5387
- 73 Prey S, Leaute-Labreze C, Pain C, *et al.* Mast cells as possible targets of propranolol therapy: an immunohistological study of beta-adrenergic receptors in infantile hemangiomas. *Histopathology* March 2014
- 74 Allen M, Bjerke M, Edlund H, *et al.* Origin of the U87MG glioma cell line: Good news and bad news. *Sci Transl Med* 2016; **8**: 354re3-354re3
- 75 Hosseini M, Mahfouf W, Serrano-Sanchez M, *et al.* Premature Skin Aging Features Rescued by Inhibition of NADPH Oxidase Activity in XPC-Deficient Mice. *J Invest Dermatol* 2015; **135**: 1108-1118
- 76 Hosseini M, Dousset L, Mahfouf W, *et al.* Energy Metabolism Rewiring Precedes UVB-Induced Primary Skin Tumor Formation. *Cell Rep* 2018; **23**: 3621-3634
- 77 Käll L, Canterbury JD, Weston J, *et al.* Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets. *Nat Methods* 2007; **4**: 923-925

Figures and figure legends

Fig. 1.

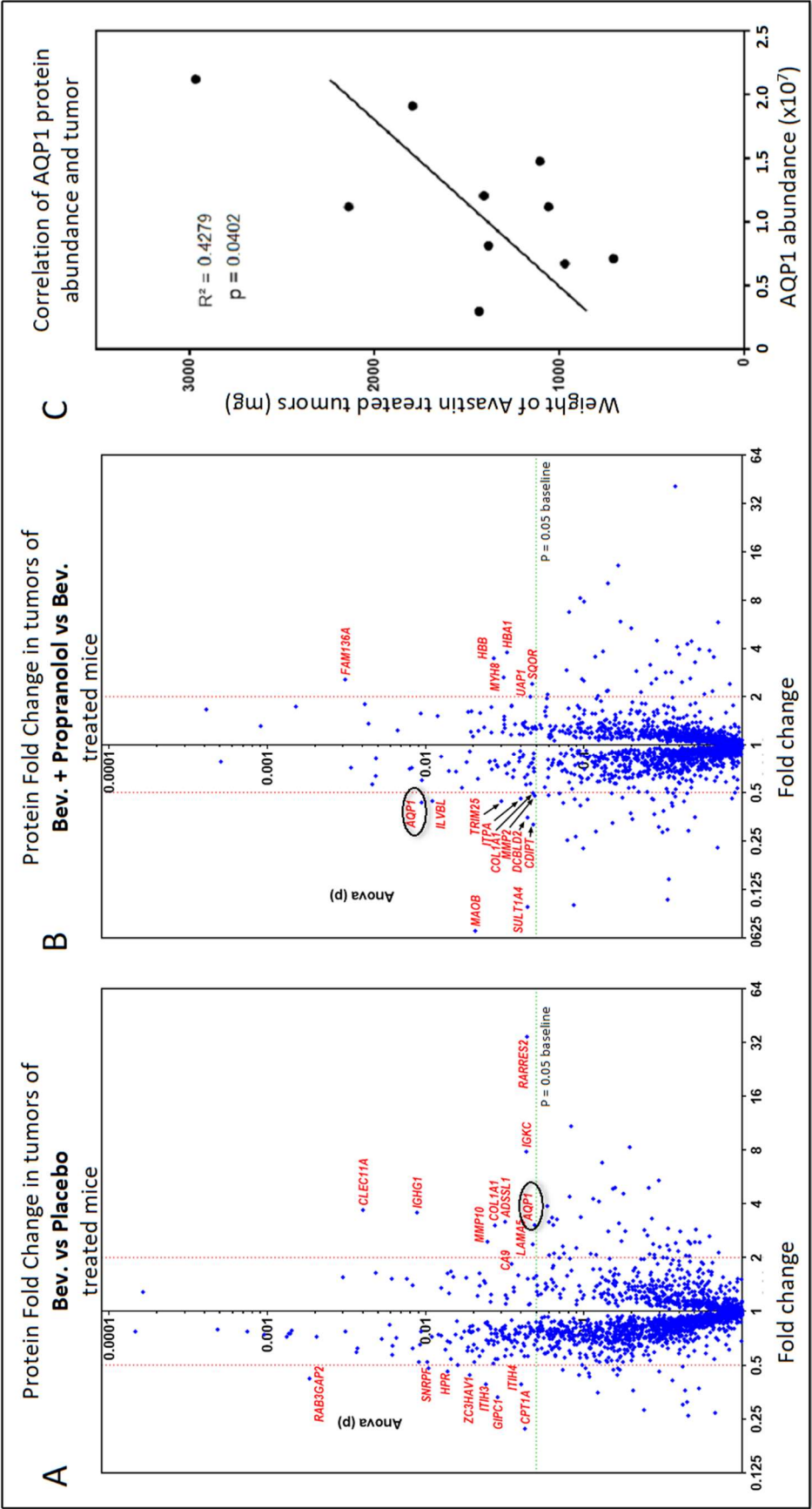


**Figure 1. Addition of propranolol to Bev slows growth of U87 xenografts.**

U87 cells were subcutaneously transplanted into NSG mice. The day after xenografting, mice were treated with either **(A)** propranolol alone (2, 10 or 50 mg/kg/day). **(B)** Bev alone (10 mg/kg, twice a week), or a combination of Bev and propranolol. Tumor volumes were measured (mean  $\pm$  SEM) at indicated times. Statistical analysis (2-way ANOVA with uncorrected Fisher's LSD) compared volume of tumors in Bev-treated mice with volume of tumors in mice treated with Bev plus 2 mg/kg propranolol. **(C)** The distribution of tumor volumes at day 75 after cell transplantation into mice. **(D)** Specific tumor growth rate (SGR) was estimated according to the following equation:  $SGR = \ln 2 / DT$ , in which DT= doubling time.

n=10 mice per group; \* P<0.05 \*\* P<0.005 \*\*\* P<0.0005 \*\*\*\* P<0.00005

Fig.2.

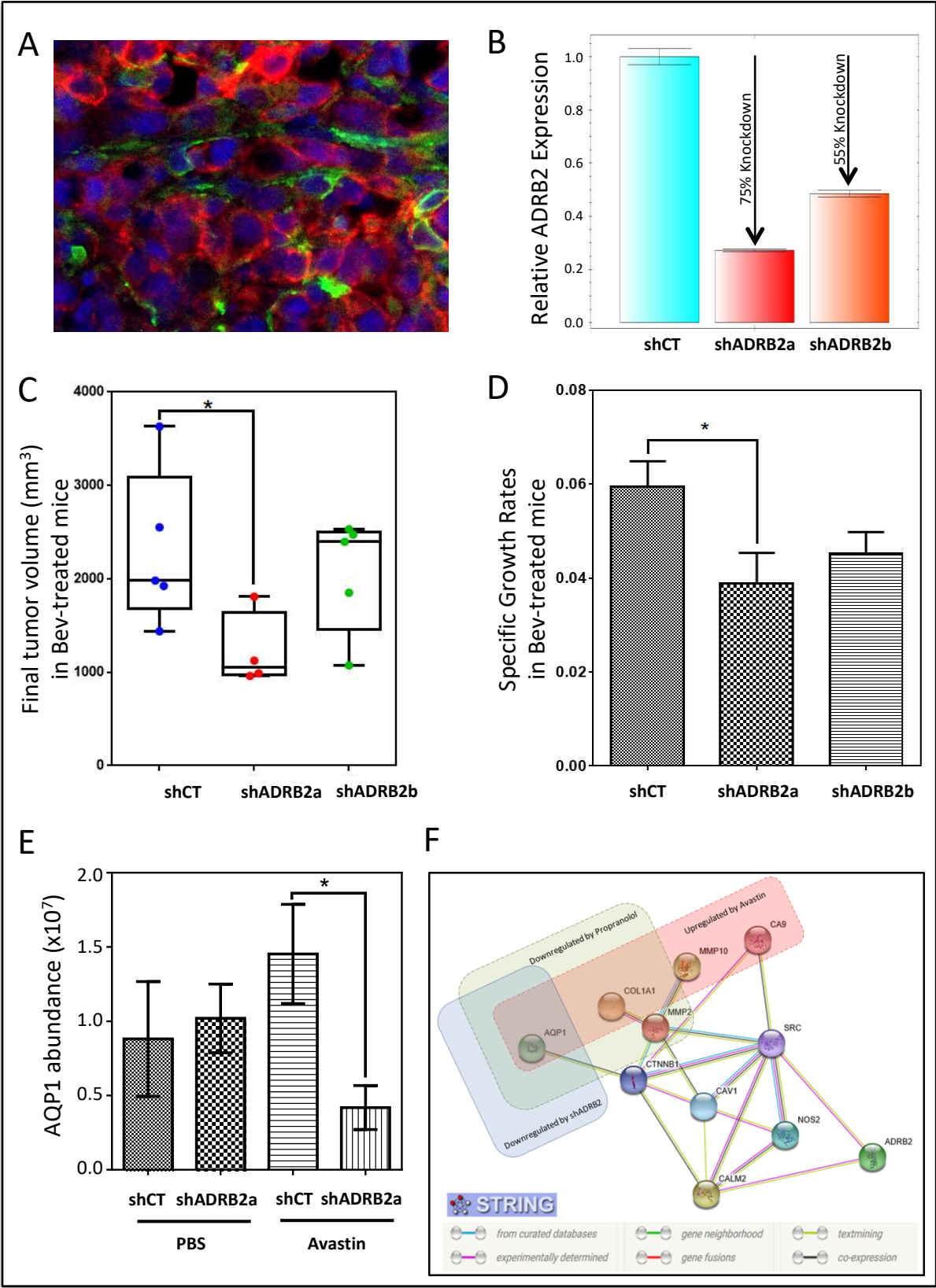


**Figure 2. AQP1 is upregulated in Bev-treated tumors but downregulated when propranolol is added.**

(A-B) U87 tumor xenografts treated with placebo, Bev or combined Bev and propranolol were subjected to proteomic analysis. Volcano plots show comparison of fold change protein expression levels between placebo- and Bev-treated xenografts (A) and placebo- and combined (Bev+propranolol)-treated xenografts (B). Mean protein abundance altered by a factor of 2 or more and  $p > 0.05$  (Anova) have their name in red. The protein with the most statically different mean abundance when propranolol was added was Aquaporin-1 (AQP1).

(C) Pearson correlation analysis showing a significant positive correlation between AQP1 protein abundance and tumor weight (mg) in Bev-treated mice.

Fig. 3.



**Figure 3. ADRB2 downregulation slows growth of Bev-treated tumors.**

(A) immunofluorescence staining of ADRB2 (red) and AQP1 (green) confirms expression of two proteins in U87 tumor xenografts.

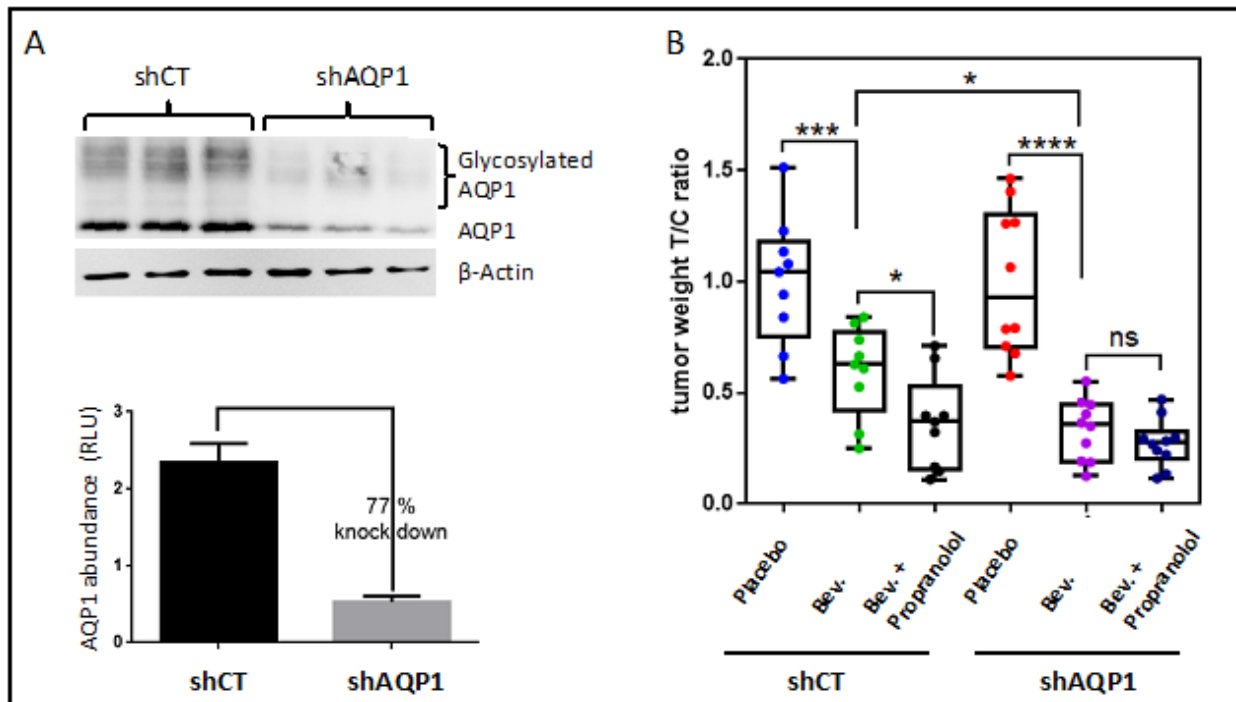
(B) U87 were transduced with either shCT, shADRB2a or shADRB2b. ADRB2 mRNA expression was assessed by quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR).

(C-D) shCT- or shADRB2-transduced cells were transplanted into NSG mice and then treated with either placebo or Bev. Final volume (C) and Specific growth rates (D) of tumors were measured in the groups.

(E) Xenograft tumors were subjected to proteomic analysis. AQP1 expression level was compared among the groups. Data are presented as mean±SEM.

(F) Potential ADRB2-AQP1 interaction network. STRING functional protein association, based on proteome data of U87 tumors treated with placebo, Bev, Bev plus propranolol as well as proteomic data from Bev-treated xenografts formed by shCtrl- and shADRB2-transduced U87. Proteins significantly upregulated in Bev-treated U87 tumors are boxed in red. Proteins significantly downregulated in xenografts treated with combined Bev and propranolol are boxed in green. Proteins significantly downregulated in Bev-treated xenografts formed by transplantation of shADRB2-transduced U87 are boxed in blue. AQP1 = Aquaporin-1; CA9 = Carbonic anhydrase-9; COL1A1 = major collagen of skin; MMP10 = matrix metalloproteinase 10; MMP2 = type IV collagenase (angiogenesis); CTNNB1 =  $\beta$ -catenin; CAV1 = Caveolin-1; CALM2 = Calmodulin-2; NOS2 = Nitric oxide synthase, inducible; ADRB2= B-2-adrenergic receptor. STRING CONSORTIUM database 2017.

Fig. 4.



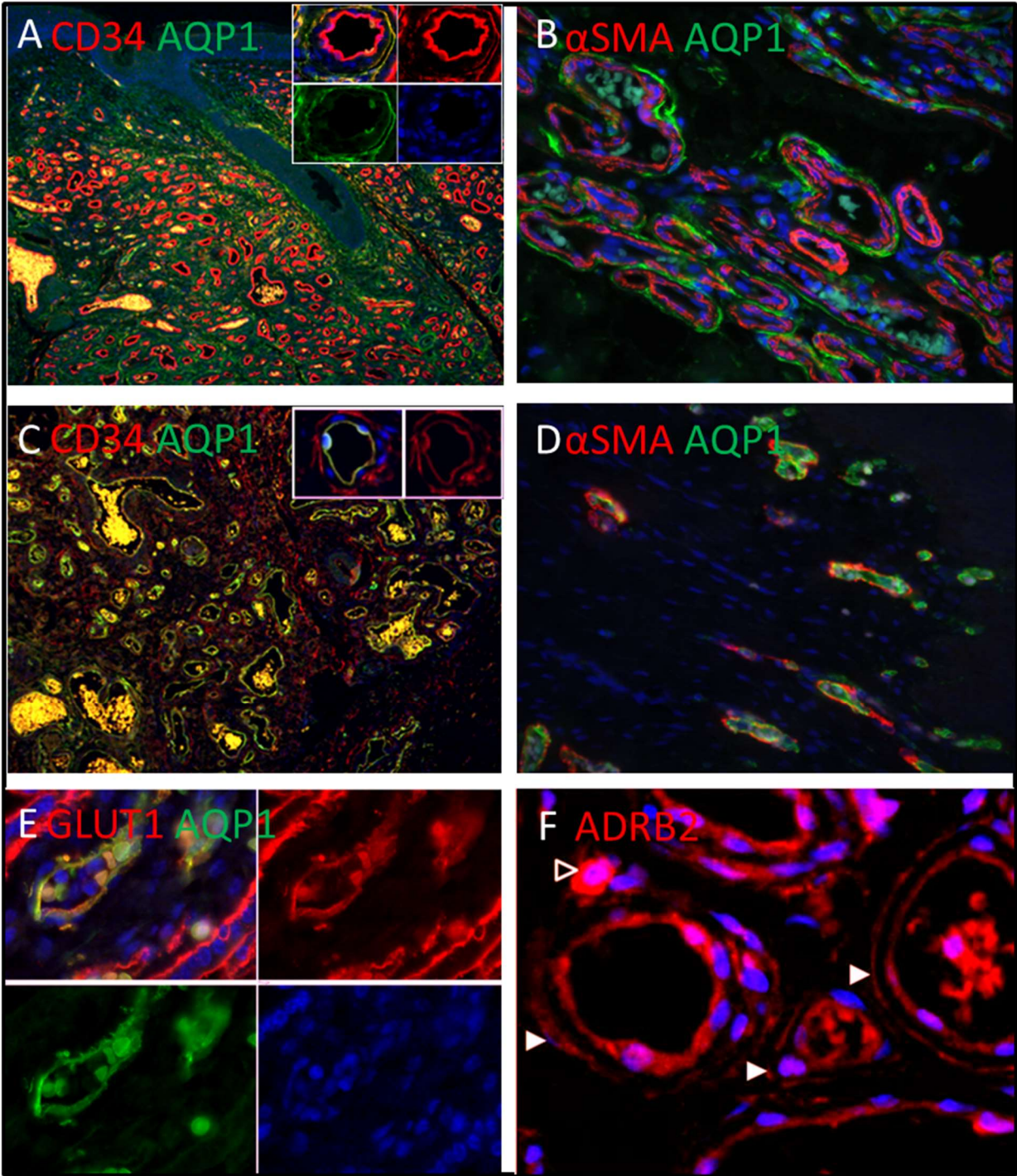
**Figure 4. AQP1 downregulation slows growth of Bev-treated tumors but has not effect on tumors treated with combined Bev and propranolol.**

shCtrl- or shAQP1-transduced U87 were transplanted into NSG mice. Western-blot analysis of AQP1 protein level in tumor xenografts following transplantation into NSG mice.

(A) Western blot analysis of AQP1 protein level in tumor xenografts shows around a 77% decrease in AQP1 expression in tumors formed by shAQP1-transduced U87 compared with control tumors. (B) Anti-tumor growth activity of Bev was evaluated by the T/C ratio, which was calculated according to the following equation:  $T/C \text{ ratio} = \text{tumor weight of treated mouse} / \text{mean tumor weight of counterpart placebo-treated mouse (Control)}$ . Combination of Bev with propranolol or shAQP1 led to a significant decrease in tumor growth ( $p=0.0336$  and  $p=0.0149$  respectively) but there was no additive effect when three treatments were combined.



Fig. 5.



**Figure 5. AQP1 profile expression could be used as a diagnostic biomarker to differentiate IHs from other congenital hemangiomas.**

**(A)** ECs in IH are negative for AQP1 (green staining) but positive for CD34 (red).

Perivascular stromal cells are positive for both CD34 and AQP1 (10X and 40X window).

**(B)** In IHs, smooth muscle cells (SMC), which are expressed  $\alpha$ SMA (red) and surround AQP1-negative ECs, are negative for AQP1. Perivascular cells are positive for AQP1 (40X).

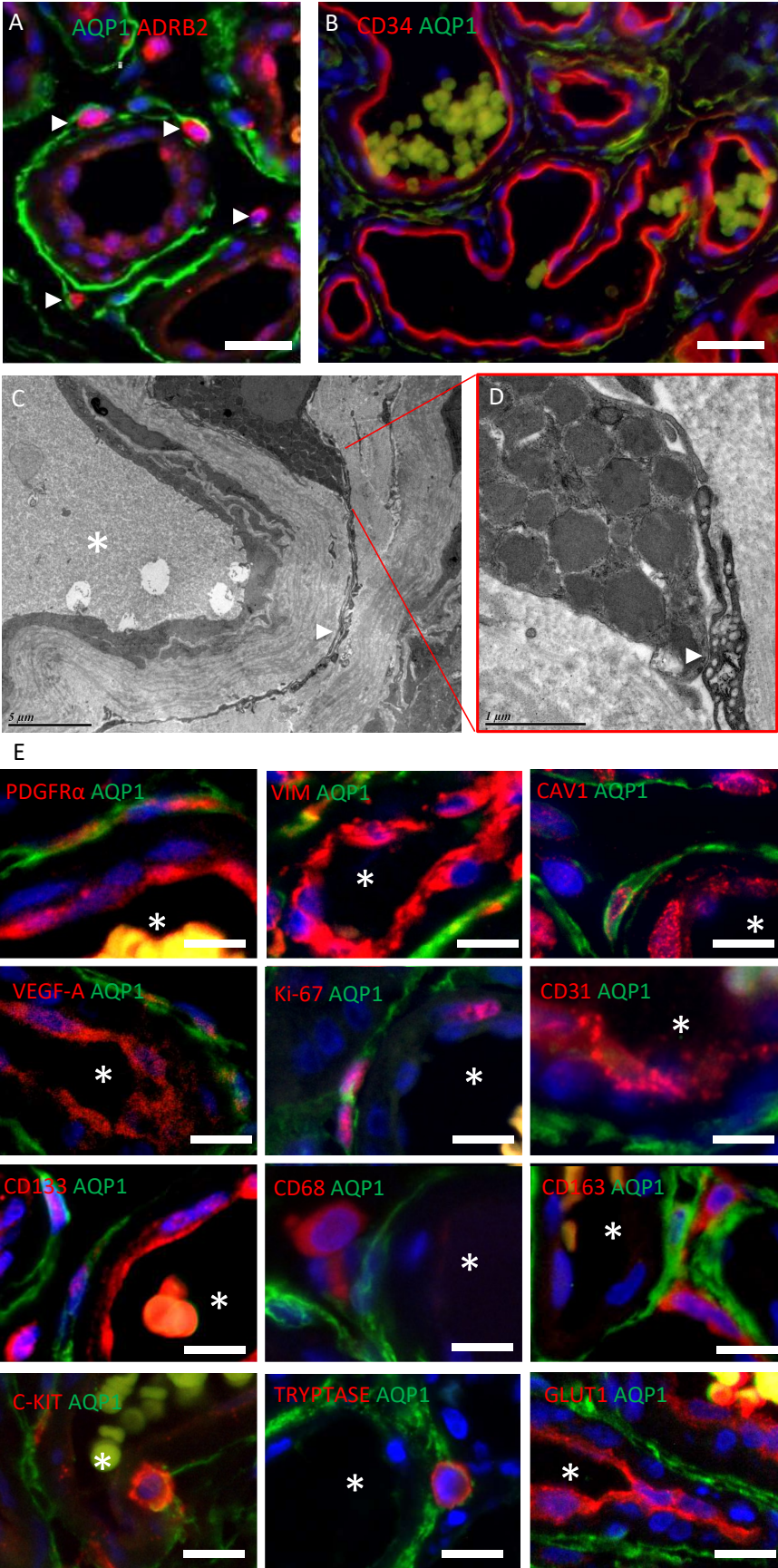
**(C)** ECs in NICH are positive for AQP1 and for CD34 (red) whereas perivascular stromal cells are positive for CD34 but negative for AQP1 (10X and 40X window).

**(D-E)** ECs of normal dermis (D) and placenta (E) are positive for AQP1 surrounded by SMCs stained with  $\alpha$ SMA (red) (40X).

**(F)** In IH ECs and perivascular cells (white arrowhead) are positive for ADRB2 (red) Mast cells are highly stained for ADRB2 (black arrowhead).

Nuclei stained in blue with DAPI.

Fig. 6.



**Figure 6. Perivascular telocytes in IHs connect to mast cells by stromal synapses**

(A) Systematic cell contact is noted between AQP1-positive telocytes and highly expressed ADRB2 mast cells.

(B) Immunofluorescence staining with antibodies against AQP1 (green) and CD34 (red) shows that AQP1-positive cells in IHs are non-endothelial perivascular CD34<sup>+</sup> cells.

(C-D) Transmission electron microscopy (TEM) shows a telocyte with a very long and thin telopodes in IHs (C), which is connected to a mast cell by stromal synapses (D), confirming that these CD34<sup>+</sup>/AQP1<sup>+</sup> cells are telocytes.

(E) TC properties were assessed using immunofluorescence staining of PDGFR $\alpha$ , vimentin, VEGF-A, CD31, CD133, CD68, CD163, GLUT1, c-KIT, tryptase, and CAV1. Proliferation was evaluated by Ki67 immunostaining. Nuclei are marked in blue with DAPI. Vessel lumens (white asterisk).

**Table 1.** Proteins differentially expressed between xenografts treated with Bev vs placebo as well as the combination of Bev and propranolol vs Bev alone

| Protein name  | Bev vs PBS                     |                  |           |             | (Bev+Propranolol) vs (Bev+Placebo) |                  |           |             |
|---|--------------------------------|------------------|-----------|-------------|------------------------------------|------------------|-----------|-------------|
|   | Peptides used for quantitation | Confidence score | Anova (p) | Fold Change | Peptides used for quantitation     | Confidence score | Anova (p) | Fold Change |
| Retinoic acid receptor responder protein 2 (RARRES2)            | 2                              | 6.05             | 4.35E-02  | 34.49       | 2                                  | 6.05             | 8.60E-01  | -2.17       |
| Immunoglobulin kappa constant (IGKC)                            | 7                              | 40.97            | 4.31E-02  | 7.83        | 7                                  | 40.97            | 1.39E-01  | 2.17        |
| Amine oxidase [flavin-containing] B (MAOB)                      | 2                              | 5.93             | 8.10E-02  | 4.38        | 2                                  | 5.93             | 2.05E-02  | -14.29      |
| C-type lectin domain family 11 member A (CLEC11A)               | 4                              | 11.44            | 4.00E-03  | 3.69        | 4                                  | 11.44            | 8.39E-02  | -1.89       |
| Immunoglobulin heavy constant gamma 1 (IGHG1)                   | 6                              | 44.61            | 8.79E-03  | 3.57        | 6                                  | 44.61            | 1.70E-01  | 1.60        |
| Adenylosuccinate synthetase isozyme 1 (ADSSL1)                  | 3                              | 12.29            | 3.17E-02  | 3.17        | 3                                  | 12.29            | 6.24E-01  | -1.27       |
| <b>Aquaporin-1 (AQP1)</b>                                       | 4                              | 20.13            | 4.86E-02  | 3.04        | 4                                  | 20.13            | 9.41E-03  | -2.33       |
| Collagen alpha-1(I) chain (COL1A1)                              | 8                              | 31.85            | 2.73E-02  | 3.02        | 8                                  | 31.85            | 4.76E-02  | -2.04       |
| Stromelysin-2 (MMP10)   | 3                              | 7.39             | 2.45E-02  | 2.45        | 3                                  | 7.39             | 4.04E-01  | -1.12       |
| Laminin subunit alpha-5 (LAMA5)                                 | 9                              | 33.15            | 4.73E-02  | 2.37        | 9                                  | 33.15            | 9.49E-01  | 1.29        |
| 72 kDa type IV collagenase (MMP2)                               | 7                              | 20.39            | 1.10E-01  | 2.10        | 7                                  | 20.39            | 4.88E-02  | -2.08       |
| CDP-diacylglycerol-inositol 3-phosphatidyltransferase (CDIPT)   | 4                              | 18.69            | 2.78E-01  | 2.07        | 4                                  | 18.69            | 4.78E-02  | -3.13       |
| Acetolactate synthase-like protein                              | 2                              | 6.46             | 2.91E-01  | 1.84        | 2                                  | 6.46             | 1.10E-02  | -2.27       |
| Carbonic anhydrase 9 (CA9)                                      | 4                              | 13.61            | 3.48E-02  | 1.84        | 4                                  | 13.61            | 5.92E-01  | -1.12       |
| Sulfotransferase 1A4 (SULT1A4)                                  | 3                              | 9.96             | 9.34E-01  | 1.52        | 3                                  | 9.96             | 4.39E-02  | -10.00      |
| Inosine triphosphate pyrophosphatase (ITPA)                     | 5                              | 15.22            | 3.35E-01  | 1.38        | 5                                  | 15.22            | 3.98E-02  | -2.17       |
| E3 ubiquitin/ISG15 ligase TRIM25 (TRIM25)                       | 2                              | 6.13             | 7.65E-01  | 1.04        | 2                                  | 6.13             | 3.00E-02  | -2.27       |
| Discoidin, CUB and LCCL domain-containing (DCBLD2)              | 2                              | 5.29             | 7.17E-01  | -1.04       | 2                                  | 5.29             | 4.39E-02  | -2.86       |
| UDP-N-acetylhexosamine pyrophosphorylase (UAP1)                 | 2                              | 9.77             | 9.66E-01  | -1.04       | 2                                  | 9.77             | 4.58E-02  | 2.00        |
| Protein FAM136A (FAM136A)                                       | 2                              | 4.32             | 7.17E-01  | -1.25       | 2                                  | 4.32             | 3.10E-03  | 2.56        |
| Myosin-8 (MYH8)   | 4                              | 252.28           | 2.43E-01  | -1.39       | 4                                  | 252.28           | 3.10E-02  | 2.64        |
| Hemoglobin subunit beta (HBB)                                   | 4                              | 25.11            | 1.62E-01  | -1.89       | 4                                  | 25.11            | 2.69E-02  | 3.47        |
| Hemoglobin subunit alpha (HBA1)                                 | 7                              | 24.48            | 1.49E-01  | -1.89       | 7                                  | 24.48            | 3.26E-02  | 3.78        |
| Small nuclear ribonucleoprotein F (SNRPF)                       | 2                              | 7.56             | 1.04E-02  | -2.08       | 2                                  | 7.56             | 1.67E-01  | 1.37        |
| Haptoglobin-related (HPR)                                       | 2                              | 3.77             | 1.37E-02  | -2.17       | 2                                  | 3.77             | 1.49E-01  | -1.54       |
| Zinc finger CCCH-type antiviral protein 1 (ZC3HAV1)             | 4                              | 14.60            | 1.89E-02  | -2.27       | 4                                  | 14.60            | 8.25E-01  | -1.04       |
| Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial (SQOR)            | 3                              | 16.30            | 9.28E-02  | -2.27       | 3                                  | 16.30            | 4.70E-02  | 2.40        |
| Rab3 GTPase-activating protein non-catalytic subunit (RAB3GAP2) | 2                              | 7.04             | 1.84E-03  | -2.38       | 2                                  | 7.04             | 4.12E-03  | 1.80        |
| Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3 (ITIH3)            | 7                              | 26.82            | 4.00E-02  | -2.56       | 7                                  | 26.82            | 9.69E-02  | -1.64       |
| Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 (ITIH4)            | 7                              | 16.98            | 2.39E-02  | -2.56       | 7                                  | 16.98            | 2.33E-01  | 1.25        |
| PDZ domain-containing protein GIPC1 (GIPC1)                     | 2                              | 6.65             | 2.84E-02  | -3.03       | 2                                  | 6.65             | 4.22E-01  | -1.39       |
| Carnitine O-palmitoyltransferase 1 (CPT1A)                      | 4                              | 9.08             | 4.22E-02  | -4.55       | 4                                  | 9.08             | 1.42E-01  | 2.18        |

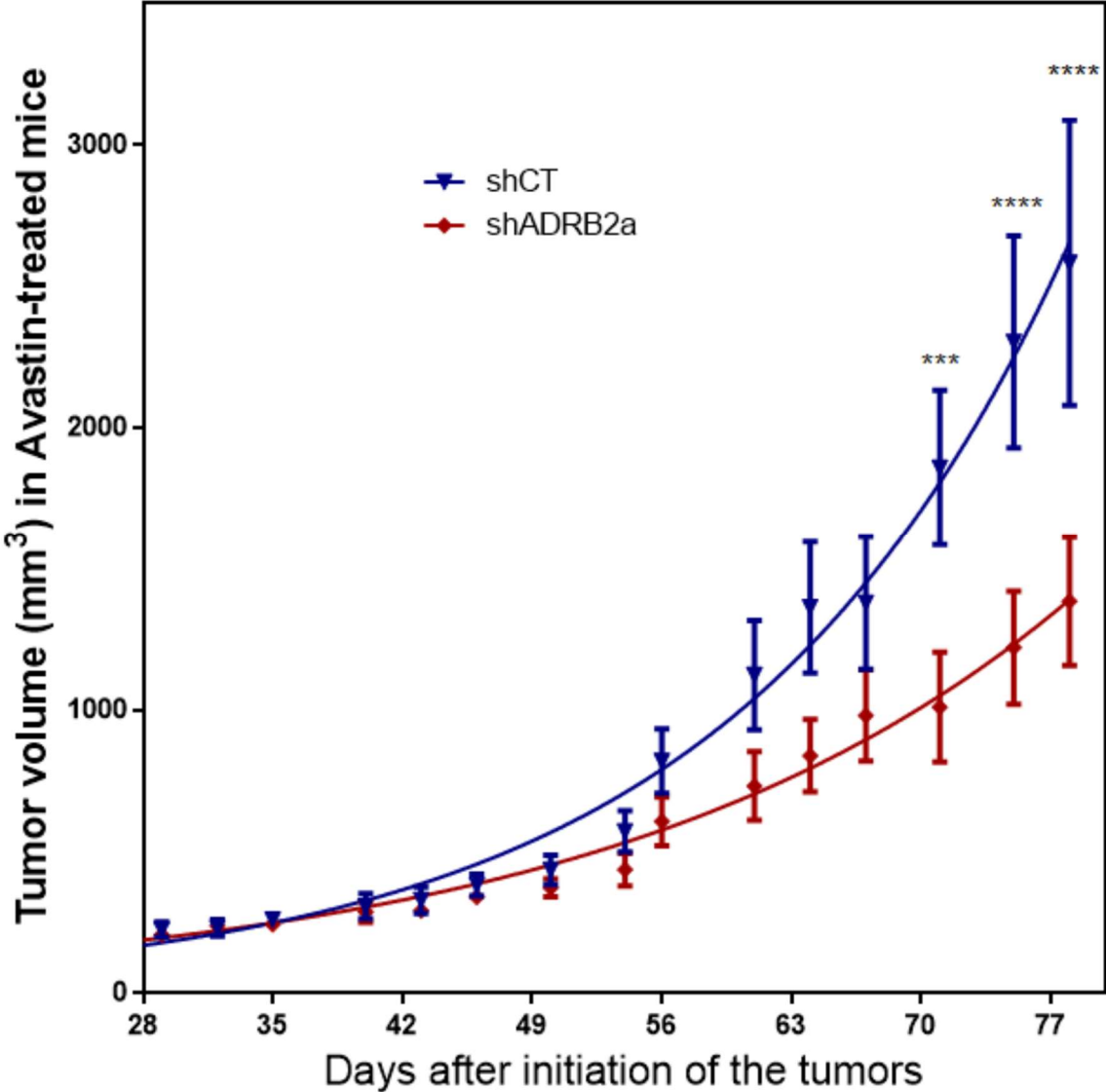
**Supplementary Materials:**

**Table S1. Antibodies used for immunostaining.**

| <b>Antibody</b>               | <b>provider</b>                 | <b>reference</b> | <b>IHF dilution</b> |
|-------------------------------|---------------------------------|------------------|---------------------|
| <b>AQP1</b>                   | <b>Merk</b>                     | <b>AB2219</b>    | <b>1/1000</b>       |
| <b>CD34</b>                   | <b>Thermofisher</b>             | <b>MA1-10202</b> | <b>1/500</b>        |
| <b>PDGFRa</b>                 | <b>Abcam</b>                    | <b>Ab61219</b>   | <b>1/500</b>        |
| <b>c-kit</b>                  | <b>Santa Cruz Biotechnology</b> | <b>sc-393910</b> | <b>1/50</b>         |
| <b>vimentin</b>               | <b>Dako</b>                     | <b>M0725</b>     | <b>1/200</b>        |
| <b><math>\alpha</math>SMA</b> | <b>Abcam</b>                    | <b>ab7817</b>    | <b>1/500</b>        |
| <b>GLUT-1</b>                 | <b>Thermofisher</b>             | <b>pa1-21041</b> | <b>1/100</b>        |
| <b>ADRB2</b>                  | <b>Abcam</b>                    | <b>ab61778</b>   | <b>1/100</b>        |
| <b>ADRB2</b>                  | <b>Santa Cruz Biotechnology</b> | <b>sc-271322</b> | <b>1/50</b>         |
| <b>CAV-1</b>                  | <b>Santa Cruz Biotechnology</b> | <b>sc-53564</b>  | <b>1/50</b>         |
| <b>Tryprase</b>               | <b>Abcam</b>                    | <b>ab81703</b>   | <b>1/2000</b>       |
| <b>CD68</b>                   | <b>Dako</b>                     | <b>M0876</b>     | <b>1/100</b>        |
| <b>CD133</b>                  | <b>Merk</b>                     | <b>MAB4399-I</b> | <b>1/50</b>         |
| <b>CD168</b>                  | <b>Abcam</b>                    | <b>ab224768</b>  | <b>1/100</b>        |
| <b>Ki-67</b>                  | <b>Vectorlabs</b>               | <b>VP-K452</b>   | <b>1/200</b>        |
| <b>VEGF-A</b>                 | <b>Abcam</b>                    | <b>ab1316</b>    | <b>1/100</b>        |
| <b>goat to rabbit 488</b>     | <b>Abcam</b>                    | <b>ab150077</b>  | <b>1/500</b>        |
| <b>goat to rabbit 555</b>     | <b>Abcam</b>                    | <b>ab 150078</b> | <b>1/500</b>        |

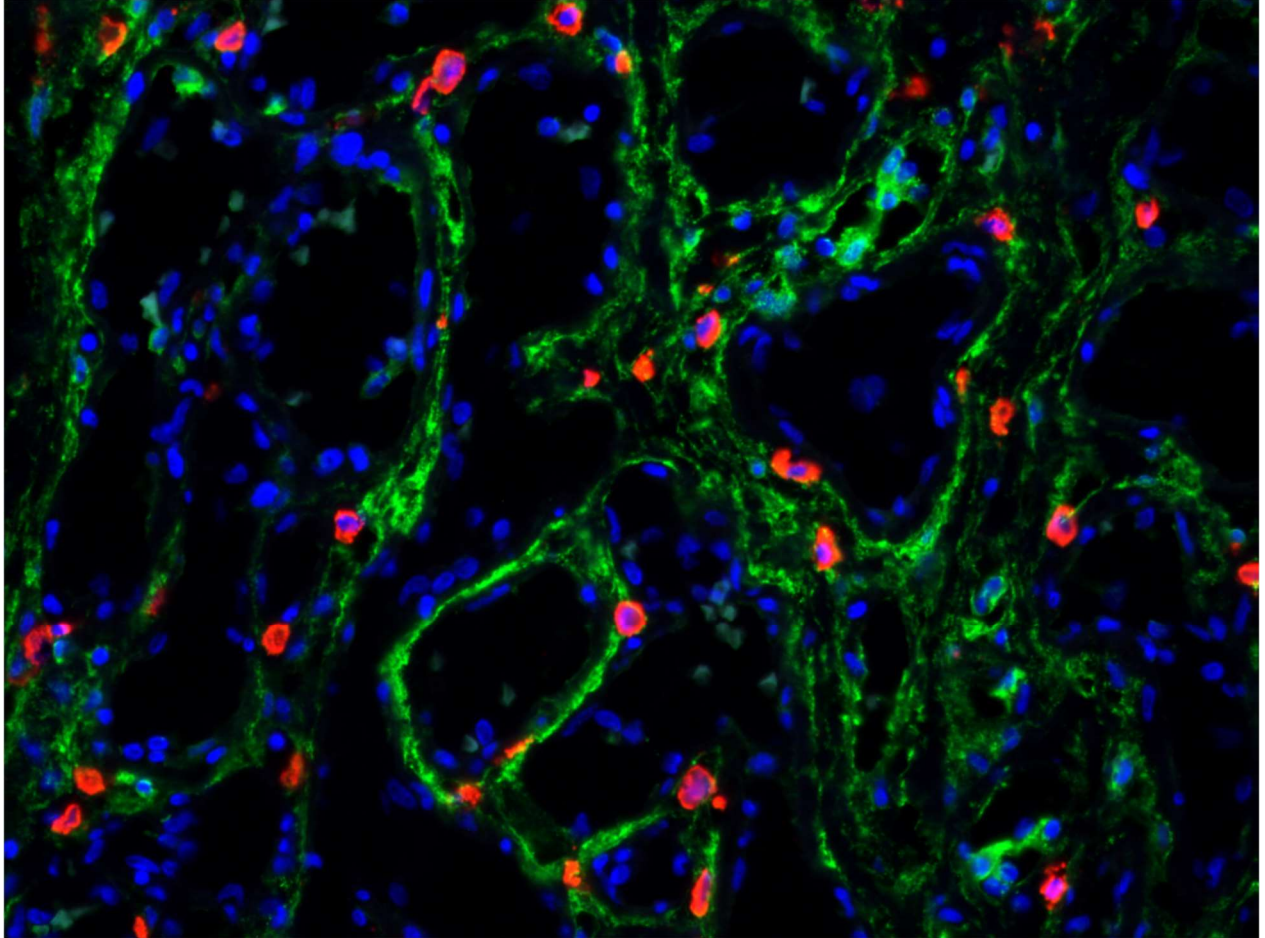
**Figure S1. Downregulation of ADRB2 slows growth of Bev-treated tumors.**

shCT- or shADRB2-transduced cells were transplanted into NSG mice and then treated with Bev. Volume of tumors was measured at indicated time after cell transplantation. n=10 mice per group; \*\*\* P<0.0005 \*\*\*\* P<0.00005



**Figure S2. Mast cells are in close contact with telocytes**

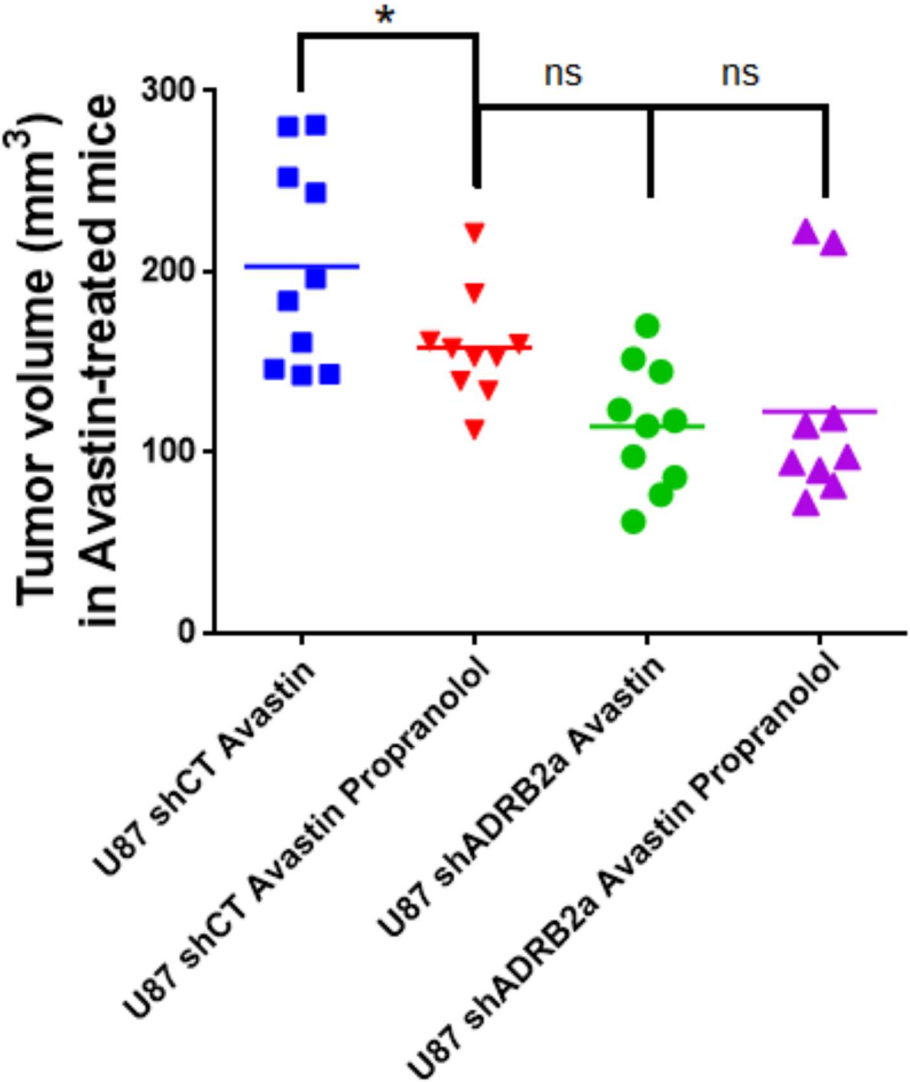
Trypsinase-positive mast cells (in red) are in direct contact with AQP1-positive telocytes (green).





**Figure S3. Addition of propranolol to Bev has no additive effect on growth of shADRB2-transduced U87 xenografts.**

shCT- or shADRB2-transduced cells were transplanted into NSG mice and then treated with Bev ± propranolol. Volume of tumors was measured at different time intervals after cell transplantation. The distribution of tumor volumes in the groups is shown at day 49 after cell transplantation into mice. n=10 mice per group; \* P<0.05



## RESULTATS COMPLEMENTAIRES

### LE PROPRANOLOL FAVORISE LA STABILISATION D'HIF-1A

Du fait de la présence des marqueurs hypoxiques HIF-1 $\alpha$  et GLUT-1 dans les tissus d'HI, une origine hypoxique du développement de l'HI a été proposée. Cette hypothèse est renforcée par la diminution de l'expression du marqueur HIF-1 $\alpha$  à mesure que la tumeur involue ou lorsqu'elle est traitée au propranolol. Par ailleurs, il a été publié que l'expression d'HIF-1 $\alpha$  dans les cellules endothéliales d'HI est diminuée proportionnellement à la concentration en propranolol<sup>111</sup>. Ces résultats évoquant le potentiel rôle de l'hypoxie dans l'HI et d'autre part la présence d'élément répondant à l'hypoxie (HRE) dans les promoteurs des enzymes de synthèse des catécholamines TH et DDC<sup>139-141</sup>, nous ont conduit à tester cette hypothèse sur les cellules endothéliales et les péricytes. Pour cela nous avons mis les cellules d'HI, d'hémangiomes congénitaux et de prépuce (cellules témoin pour l'étude) en hypoxie (1 % O<sub>2</sub>) ou normoxie (20 % O<sub>2</sub>) pendant 48 heures en présence ou non de propranolol. L'objectif était d'étudier l'effet du propranolol (10  $\mu$ M) en hypoxie sur les catécholamines et leur synthèse. Nous avons donc évalué, par western blot, l'expression de la protéine HIF-1 $\alpha$  afin de confirmer l'environnement hypoxique, l'expression des enzymes de synthèse des catécholamines ainsi que le niveau de sécrétion des catécholamines par ELISA.

Nos résultats montrent que, en condition normoxique, le propranolol n'a pas d'effet sur l'expression d'HIF-1 $\alpha$  et les enzymes de synthèse des catécholamines, dans les péricytes d'HI (Figure 34A). En hypoxie, l'expression d'HIF-1 $\alpha$  et de la TH sont augmentées de manière significative. Or étonnamment, le propranolol en condition hypoxique augmente significativement l'expression d'HIF-1 $\alpha$  et n'a pas d'effet sur les enzymes. De plus, malgré l'augmentation en hypoxie de la TH, enzyme limitante dans

la voie de biosynthèse des catécholamines, les catécholamines ne sont pas détectées dans les surnageants de péricytes d'HI et ce, dans toutes les conditions expérimentales (Figure 34A). Les analyses sur les péricytes d'hémangiomes congénitaux et de prépuce montrent également une augmentation d'HIF-1 $\alpha$  en hypoxie avec le propranolol. On observe également une variation de l'expression des enzymes de synthèse dans ces mêmes conditions (Figure 34B et Figure 34C). Néanmoins ces derniers résultats sont à considérer avec précaution car ils n'ont pas encore pu être répétés.

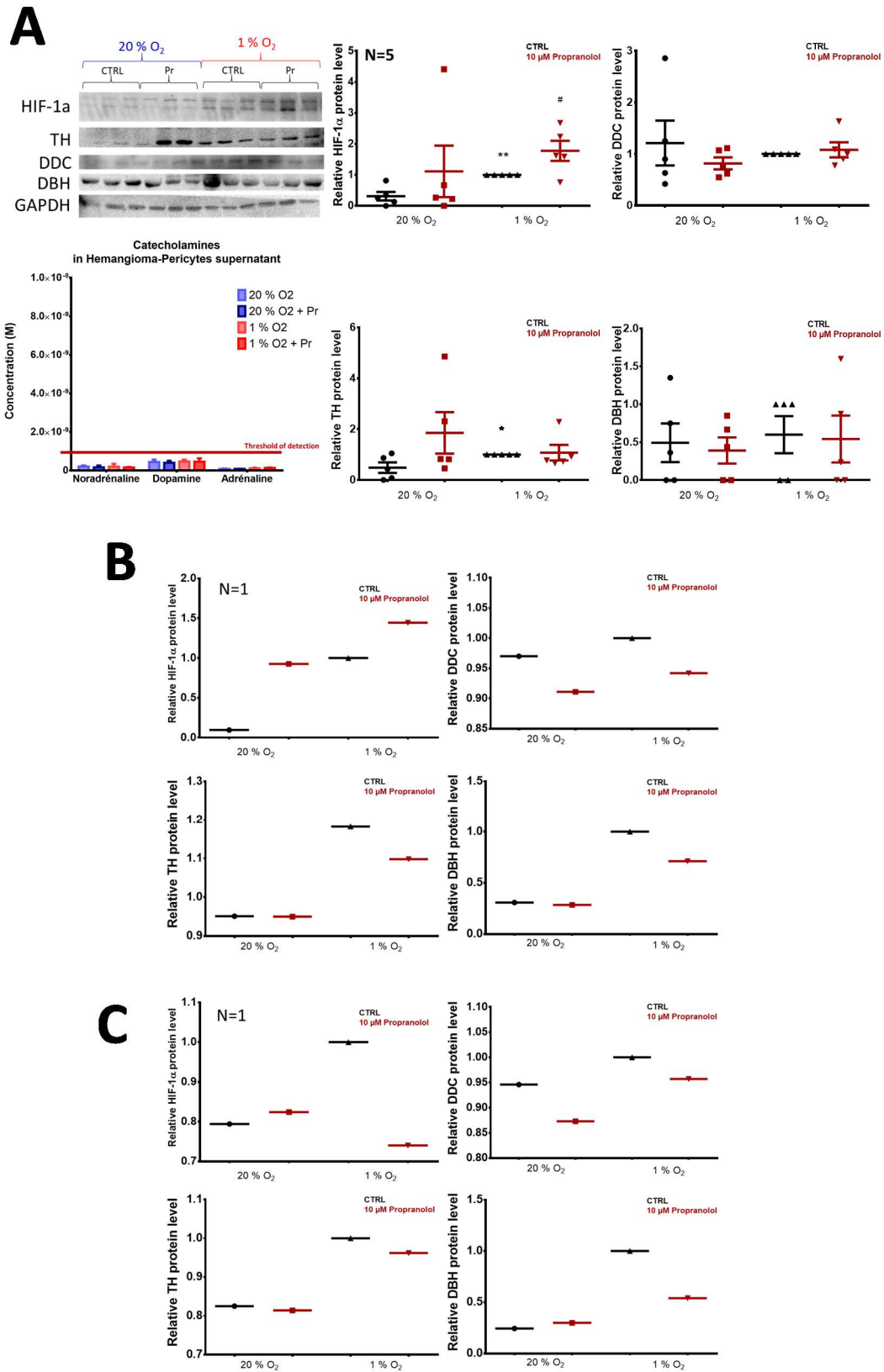


Figure 34 : Effet du propranolol en normoxie (20 %O<sub>2</sub>) et en hypoxie (1 %O<sub>2</sub>) sur les enzymes de synthèse des catécholamines dans les péricytes d'hémangiomes infantiles (A) et congénitaux (B) et de prépuce (C)

L'augmentation d'HIF-1 $\alpha$  en hypoxie est également retrouvée dans les cellules endothéliales d'HI (Figure 35A). Par contre le propranolol n'a pas d'effet significatif sur HIF-1 $\alpha$  et les enzymes. Dans cette expérimentation, la noradrénaline a été, cette fois, quantifiée dans les surnageants et dans les culots cellulaires. En normoxie, la noradrénaline n'est pas détectée dans les culots cellulaires. *A contrario*, elle est retrouvée dans le surnageant et le propranolol augmente sa libération. En hypoxie, la noradrénaline est nettement augmentée dans les culots et dans le surnageant. Le propranolol semble diminuer sa production dans les culots et, dans une moindre mesure, dans les surnageants.

L'expérimentation faite sur des cellules endothéliales d'hémangiome congénital n'ayant été faite qu'une fois, il est difficile d'interpréter les résultats, mais chose étonnante, la DDC n'est pas exprimée alors qu'elle est présente dans les péricytes du même hémangiome congénital (Figure 35B).

Dans les cellules endothéliales de prépuce, seul HIF-1 $\alpha$  est significativement augmenté en hypoxie. Le propranolol semble augmenter également son expression en hypoxie, mais cela n'est pas significatif. Dans toutes les conditions, le propranolol n'a aucun effet sur les enzymes. Cette expérimentation a été faite quatre fois, et dans toutes les analyses, DDC n'est pas exprimée alors que l'enzyme est présente dans les péricytes du même prépuce (Figure 35C).

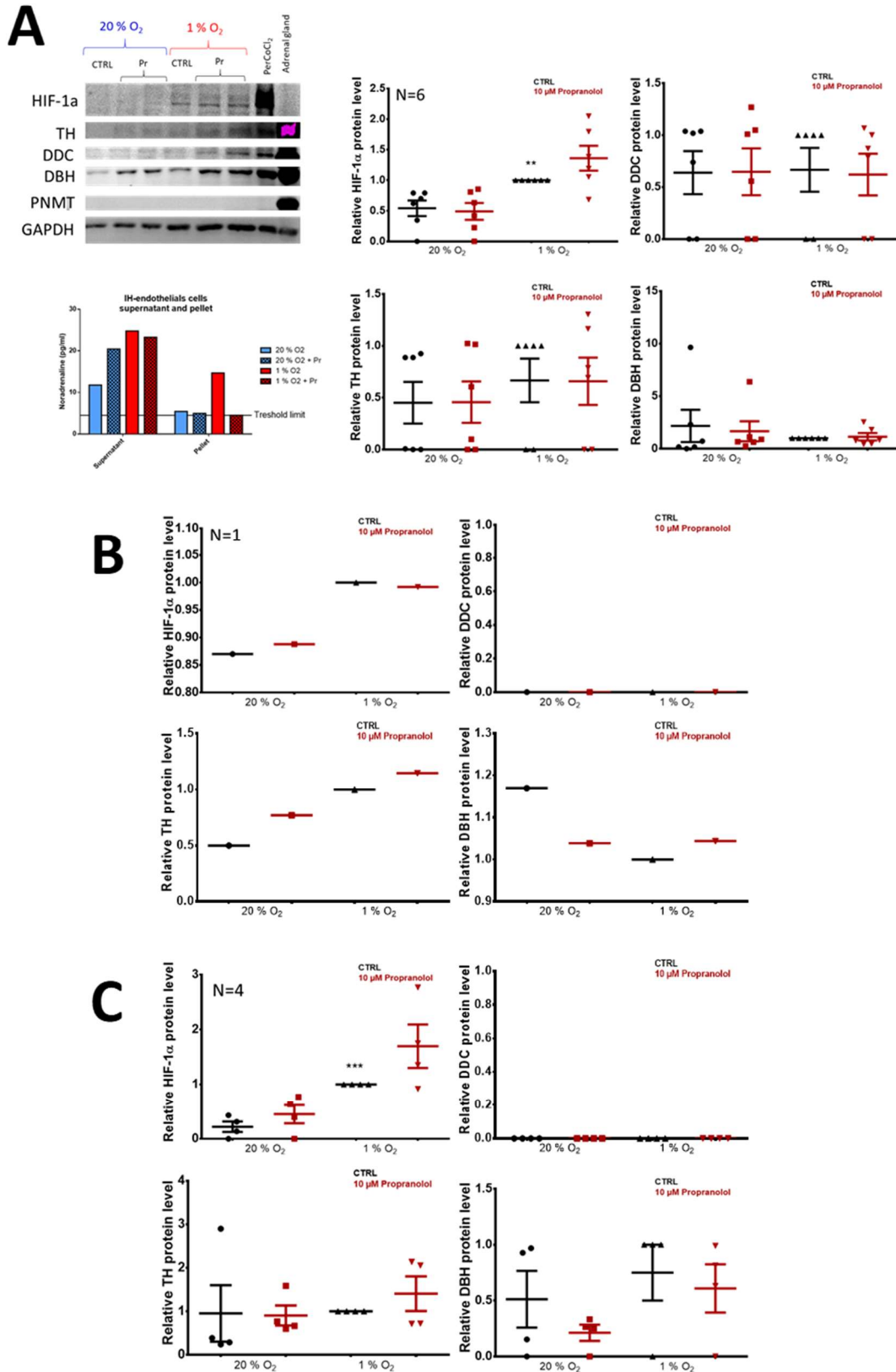


Figure 35 : Effet du propranolol en normoxie (20 %O<sub>2</sub>) et en hypoxie (1 %O<sub>2</sub>) sur les enzymes de synthèse des catécholamines dans les cellules endothéliales d'hémangiomes infantiles (A) et congénitaux (B) et de prépuce (C)

Pour conclure, nous avons été confrontés à des cellules d'HI qui n'exprimaient pas certaines enzymes. En effet, dans les péricytes de certains HI, la DBH n'était pas exprimée alors qu'elle l'était dans les cellules endothéliales isolées du même hémangiome. De la même manière, les cellules endothéliales de certains HI n'exprimaient pas la DDC alors que l'enzyme était présente dans les péricytes du même HI. Il a été démontré en neurosciences que certains neurones expriment uniquement la TH tandis que d'autres neurones voisins expriment la DDC<sup>142</sup>. Et il a été montré que ces neurones sont capables en coopération de produire de la dopamine<sup>143</sup>. Nous pouvons ainsi suggérer que dans l'HI, un processus similaire est réalisé : la voie de biosynthèse démarre dans une cellule puis se termine dans une autre, supposant que le microenvironnement de l'HI ou l'interaction entre les cellules endothéliales et les péricytes d'HI est important pour permettre la synthèse des catécholamines. Cette communication entre les cellules peut également être importante pour obtenir une réponse au propranolol. De plus, dans cette étude, le propranolol n'affecte pas l'expression des enzymes de synthèse des catécholamines des cellules isolées d'hémangiomes congénitaux et de prépuces, que ce soit en normoxie ou en hypoxie. Ceci est encourageant du fait de la spécificité de l'efficacité du propranolol dans les tumeurs d'HI et de la non-réponse des hémangiomes congénitaux à ce traitement. Néanmoins, dans notre étude, le propranolol n'a pas d'effet non plus sur les cellules d'HI. Ce travail montre ainsi les limites d'un modèle unicellulaire pour étudier l'effet du propranolol dans l'HI.

D'un point de vue physiopathologique les HI apparaissant après la naissance, nous pouvons émettre également l'hypothèse d'un stress hyperoxique. En effet, le placenta possède un taux d'oxygène variable en fonction du trimestre de grossesse. Au premier trimestre, le placenta est à 2,6 % d'O<sub>2</sub> et augmente entre 6,6 et 7,9 % d'O<sub>2</sub> au deuxième et troisième trimestre<sup>144-146</sup>. Puis, à la naissance, le nouveau-né est soumis à un environnement normoxique sous 21 % d'O<sub>2</sub> et les HI surviennent quelques jours à semaines après. Nous avons ainsi supposé que cette forte élévation d'oxygène à la naissance crée un stress hyperoxique qui serait à l'origine du développement de la tumeur. Les modèles d'hyperoxie sont réalisés notamment dans l'étude de la rétinopathie du prématuré grâce un modèle *in vivo* de rétinopathie induite par l'oxygène. Dans notre cas, des péricytes d'HI ont été placés sous 1 % d'O<sub>2</sub> pendant 48 heures, puis incubés sous 21 % d'O<sub>2</sub> pendant 20 minutes et 1 heure. Le propranolol a

été introduit 1 heure avant le passage vers l'environnement normoxique, l'hypothèse étant que le propranolol donné de façon préventive inhiberait l'effet de l'hyperoxie sur les enzymes de catécholamines (Figure 36).

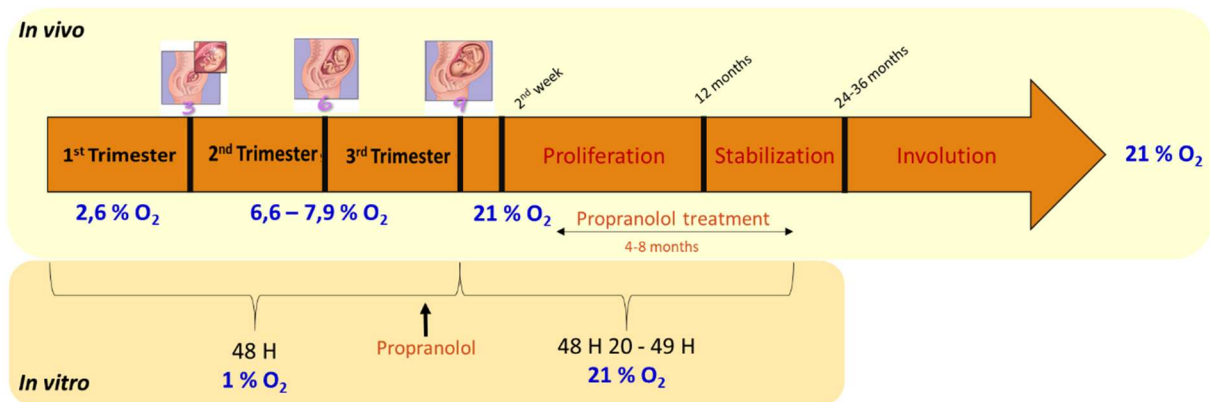


Figure 36 : Plan expérimental de l'étude de l'hyperoxie

L'ensemble de nos résultats sur les péricytes d'HI montre une augmentation de l'expression de la TH et d'HIF-1 $\alpha$  en hypoxie. L'expression d'HIF-1 $\alpha$  est stabilisée avec le propranolol 20 minutes après le passage des cellules de 1 % à 20 % d'O<sub>2</sub>. Néanmoins le propranolol n'a, une nouvelle fois, pas d'effet sur l'expression des enzymes (Figure 37).

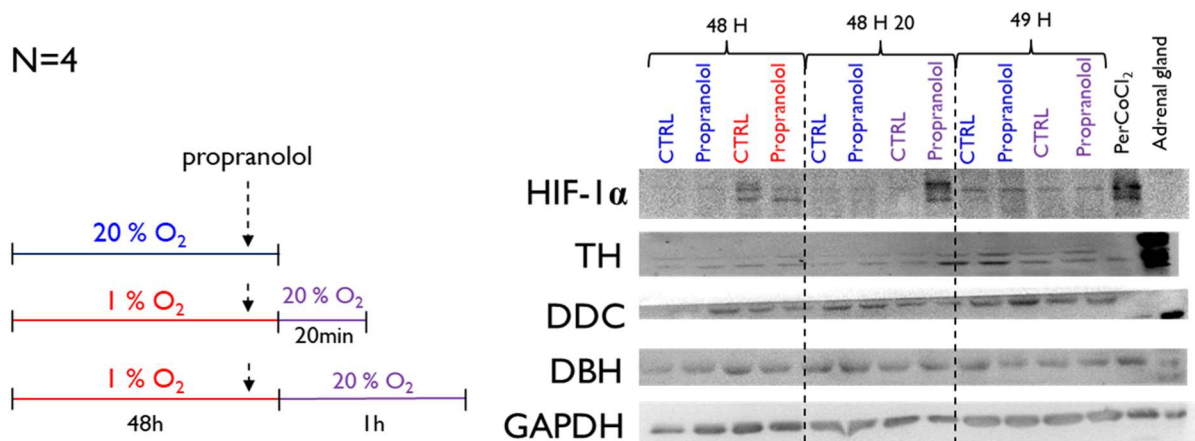


Figure 37 : Effet de l'hyperoxie sur les enzymes de synthèse des catécholamines

L'ensemble de nos expérimentations avec les péricytes ou les cellules endothéliales d'HI montrent un réel effet du propranolol à 10  $\mu$ M sur HIF-1 $\alpha$  en hypoxie et en hyperoxie. En effet, l'expression du facteur de transcription est augmentée.



Ces résultats sont consolidés par une étude que nous avons faite sur les cellules endothéliales d'HI transduites par un lentivirus sur-exprimant HIF-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ m) ou invalidées pour HIF-1 $\alpha$  (sh HIF-1 $\alpha$ ) (Figure 38).

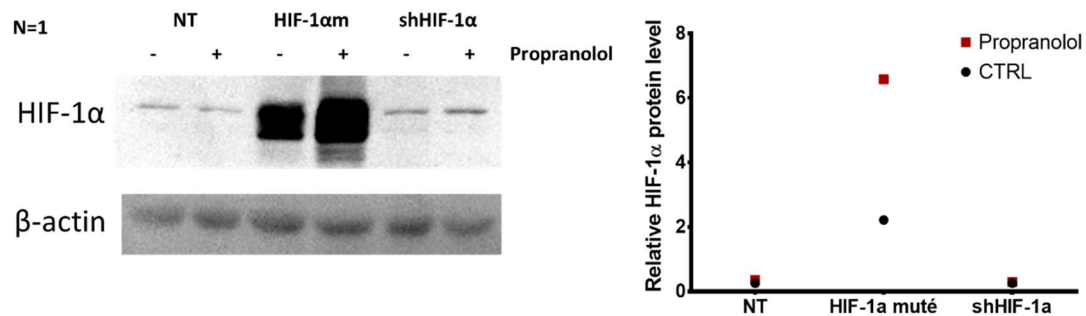


Figure 38 : Le propranolol augmente l'expression d'HIF-1 $\alpha$  dans les cellules endothéliales d'HI. Le propranolol semble stabiliser l'expression d'HIF-1 $\alpha$ . Ceci est en effet surprenant car l'ensemble des publications étudiant HIF-1 $\alpha$  dans les cellules endothéliales d'HI montrent une diminution de son expression. Cette différence de résultat peut s'expliquer par le fait que les études de la bibliographie ont été faites à des concentrations cytotoxiques tandis que nous avons mené notre étude sous 10  $\mu$ M du propranolol, dose non cytotoxique (Figure 39).

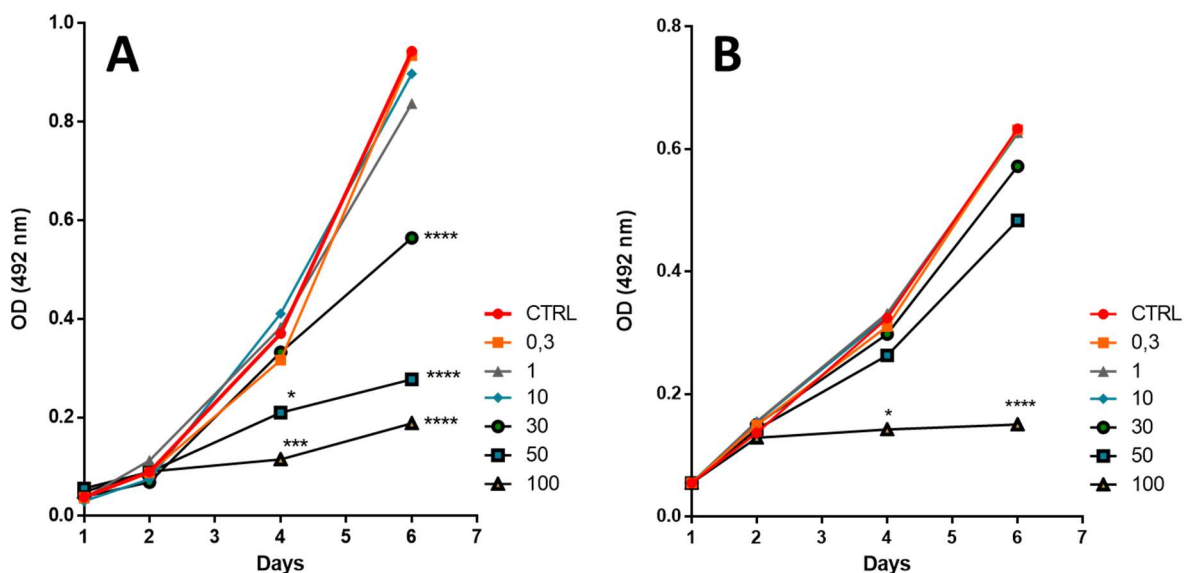


Figure 39 : Effet du propranolol sur la prolifération des cellules endothéliales (A) et des péricytes (B) d'hémangiomes infantiles

Deux publications peuvent expliquer l'effet paradoxal du propranolol sur l'expression d'HIF-1 $\alpha$ . Lamy *et al.* ont montré que 10  $\mu$ M de propranolol augmente le nombre de cellules endothéliales en phase quiescente G0/G1 du cycle cellulaire et diminue le

nombre de cellules en phase S<sup>107</sup>. Par ailleurs, il a été démontré que l'inhibition de la dégradation d'HIF-1 $\alpha$  *in vivo* par injection d'un inhibiteur de l'enzyme PHD (Figure 5) permet la stabilisation du facteur HIF-1 $\alpha$  et augmente la proportion de cellules souches hématopoïétiques en phase G<sub>0</sub><sup>147</sup>. Nous pouvons ainsi suggérer que, dans le cas de nos résultats, le propranolol assure la quiescence des cellules d'HI en inhibant la dégradation d'HIF-1 $\alpha$  néanmoins cela n'explique pas l'effet anti-tumoral du propranolol.

L'ensemble de ces résultats complémentaires nous ont ainsi conduit à mettre au point un modèle *in vitro* en co-culture sous forme de tests de tubulogenèse. Partant de l'hypothèse que les cellules endothéliales et les péricytes d'HI vont, ensemble, permettre la synthèse de la noradrénaline, catécholamine proangiogénique, et que cette synthèse dépendant des deux types cellulaires est régulée par le propranolol (article 1).



## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Nos travaux ont permis d'établir une implication de la noradrénaline et de l'Aquaporine-1 (AQP1) dans le développement de l'hémangiome infantile (HI) et dans le mode d'action du propranolol sur la tumeur.

A l'échelle tissulaire, nous avons pu montrer une forte expression d'une des trois catécholamines, agonistes des récepteurs bêta-2-adrénergiques (ADRB2) : la noradrénaline dans les HI. Son expression est diminuée lorsque la tumeur involue ou lorsqu'elle est traitée par le propranolol. Il en va de même quant à l'expression des trois premières enzymes de synthèse des catécholamines : la tyrosine hydroxylase (TH), la L-DOPA décarboxylase (DDC) et la dopamine  $\beta$  hydroxylase (DBH). De plus, la noradrénaline est connue pour avoir une propriété pro-angiogénique<sup>86-90</sup>. En effet la noradrénaline favorise la prolifération cellulaire et la tubulogénèse *in vitro*<sup>148</sup>. Ces résultats montrent l'implication de la noradrénaline dans le développement et le traitement de l'HI. La forte expression de la noradrénaline dans les HI serait, donc, ainsi à l'origine de la rapide prolifération des cellules endothéliales et la rapide formation des vaisseaux.

Notre étude a montré que les enzymes de synthèse des catécholamines sont présentes, majoritairement au niveau vasculaire, dans les cellules endothéliales et les péricytes, qui expriment, tous deux, les ADRB2<sup>5</sup>. Ainsi, la régulation de la noradrénaline semble être autocrine et/ou paracrine.

La synthèse de la noradrénaline peut être induite en réponse à un stimulus tel que l'hypoxie. D'un point de vue mécanistique, le facteur induit par l'hypoxie HIF-1 $\alpha$  peut se fixer au site HRE (élément de réponse à l'hypoxie) de la TH, l'enzyme limitante de la voie de biosynthèse des catécholamines<sup>139-141</sup>, induisant ainsi la synthèse des

catécholamines dont la noradrénaline. Par ailleurs, de nombreuses études ont suggéré une relation entre l'hypoxie et la physiopathologie de l'HI par la présence d'HIF-1 $\alpha$  dans les tissus d'HI prolifératifs et sa diminution sous propranolol<sup>141</sup>. Nous avons ainsi supposé qu'il existait une relation entre l'hypoxie, le développement de la tumeur et la noradrénaline.

En effet, l'activation de la protéine kinase A (PKA) via la voie de l'AMPc induit l'expression d'HIF-1 $\alpha$ <sup>149,150</sup>. Il peut ainsi être suggéré que, par sa fixation sur les récepteurs ADRB2, la noradrénaline stimule la sous-unité  $\alpha$  de la protéine G induisant l'activation de l'adénylate cyclase. Cette dernière va produire le second messager AMPc qui va activer PKA. Une cascade de réaction va s'en suivre résultant en la production puis la fixation d'HIF-1 $\alpha$  sur le site HRE de gènes, permettant ainsi la transcription des gènes codant pour la TH et DDC. Ceci favoriserait l'activité de la voie de biosynthèse des catécholamines et donc la production de noradrénaline et l'angiogénèse (Figure 40).

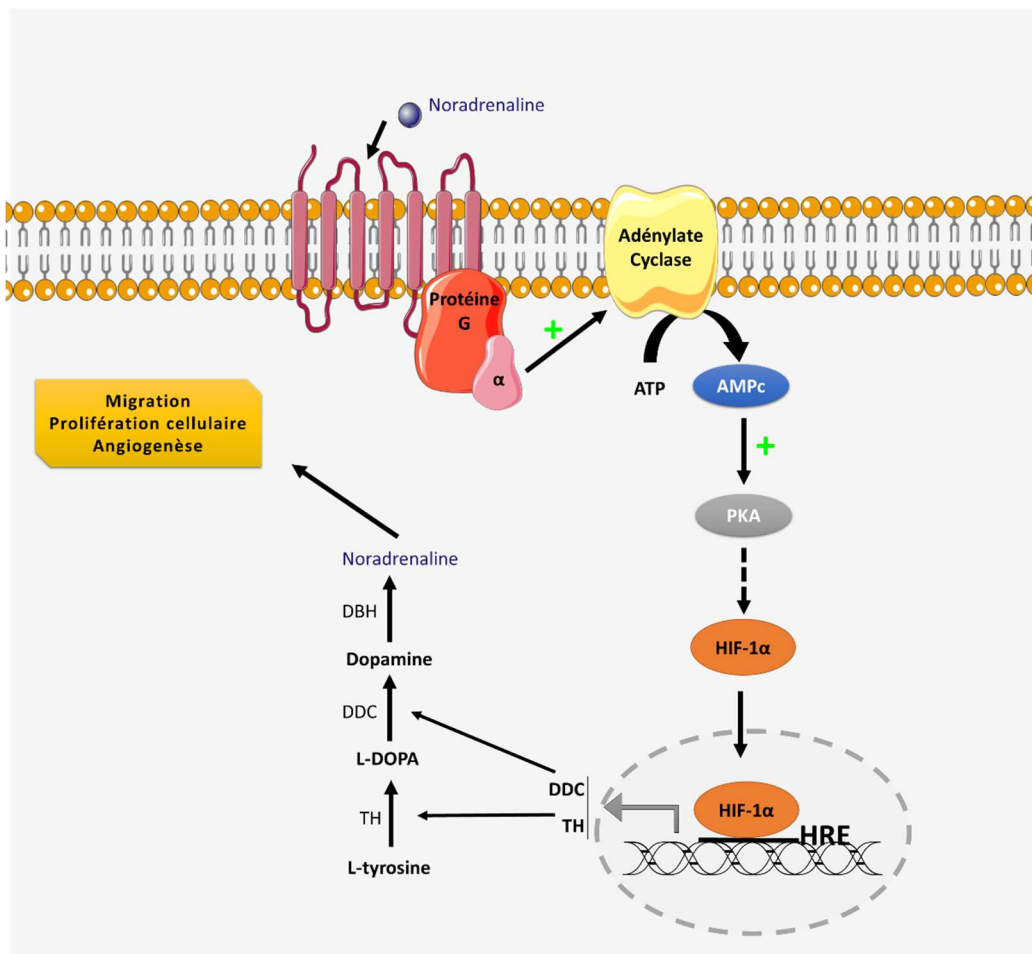


Figure 40 : Mécanisme possible de la noradrénaline sur HIF-1 $\alpha$  dans l'hémangiome infantile

Nos études ont confirmé qu'HIF-1 $\alpha$  est bien augmenté en hypoxie et que paradoxalement à notre hypothèse, l'ajout de propranolol augmente l'expression d'HIF-1 $\alpha$  en hypoxie dans les cellules endothéliales et les péricytes. Il est possible que cette forme stabilisée ne soit pas une forme active d'HIF-1 $\alpha$  ou qu'un autre facteur induit par l'hypoxie (par exemple PHD, anhydrase carbonique 9 CA9, etc.) joue un rôle majeur dans le mode d'action du propranolol.

Or nous avons pu montrer que l'hypoxie augmente l'expression des enzymes de synthèse des catécholamines dans les cellules endothéliales et les péricytes. Néanmoins nous n'avons pas réussi à montrer un effet du propranolol sur leur expression. Sachant que l'hypoxie à des degrés différents – ici nous avons réalisé nos expérimentations à 1 % d'O<sub>2</sub>, nous aurions pu essayer d'autres concentrations en oxygène – peut activer les différentes voies de signalisation, il est possible que notre expérience doit être refaite dans une condition hypoxique plus adaptée. Or, dans notre étude, l'effet de propranolol sur l'expression des enzymes de synthèse de catecholamines semble indépendant de l'hypoxie.

Nous n'avons pas pu trouver d'effet du propranolol sur la synthèse ou la libération de la noradrénaline car, dans la majorité de nos expérimentations, la noradrénaline n'était pas détectée ou était à un seuil proche de la limite de détection de la technique utilisée. Plusieurs facteurs pourraient expliquer ces difficultés. Premièrement, le nombre insuffisant de cellules utilisées ne permettant pas un dosage de noradrénaline à un niveau détectable. En effet l'équipe de Iaccarino a démontré la synthèse *in vitro* de catécholamines par les cellules endothéliales en les cultivant à 200 000 cellules en plaque 6 puits avec 1 ml de milieu<sup>118</sup>. Dans notre cas, nous avons cultivé 150 000 cellules sur une surface beaucoup plus grande : dans des flasques de 25 cm<sup>2</sup> avec 1,5 ml de milieu. Deuxièmement, la forme stabilisée d'HIF-1 $\alpha$  par le propranolol ne serait pas active et ne se fixerait pas sur le site HRE des enzymes de synthèse des catécholamines. Troisièmement, les cellules endothéliales et les péricytes d'HI auraient besoin d'être en interaction pour synthétiser les catécholamines. En effet, nous nous sommes aperçus que dans quelques tissus d'HI, certaines enzymes de synthèse de catécholamines étaient présentes uniquement dans les cellules endothéliales et les autres enzymes dans les péricytes, et inversement suggérant que la synthèse des catécholamines dans les HI est débutée dans une cellule et se termine dans une autre. Ceci suggère la nécessité d'un microenvironnement au moins

bicellulaire avec des cellules endothéliales et des péricytes lésionnels pour obtenir un effet du propranolol (Figure 41).

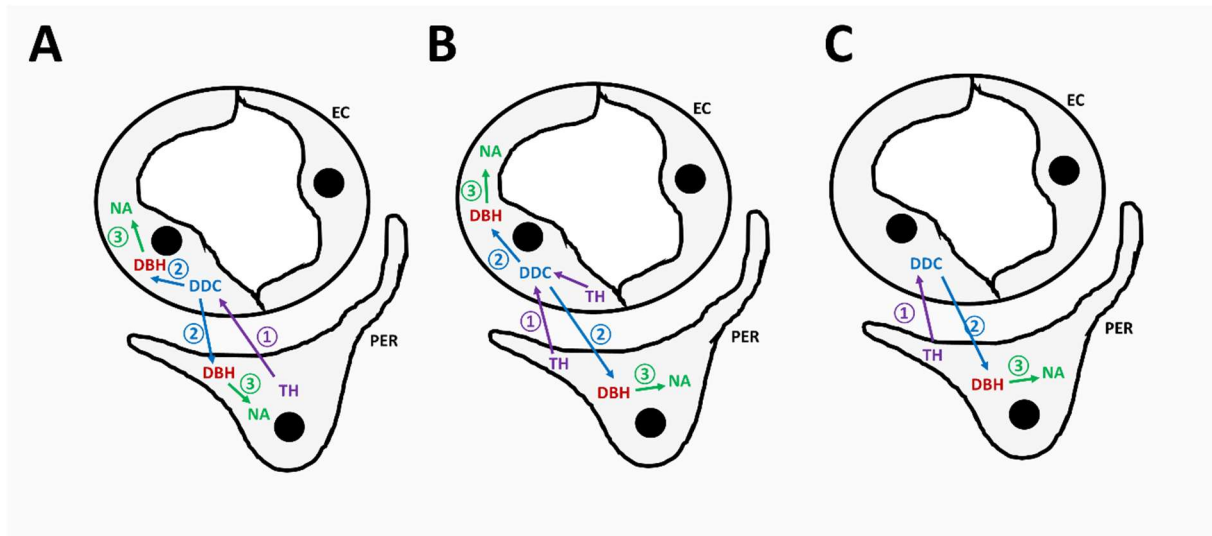


Figure 41 : Exemples, non exhaustifs, de voies de biosynthèse de la noradrénaline (NA) dans les cellules endothéliales et les péricytes d'hémangiome infantile. **A.** La voie de synthèse débute dans les péricytes (PER) puis elle continue dans les cellules endothéliales (EC) et enfin la noradrénaline est synthétisée dans les cellules endothéliales et les péricytes. **B.** La voie de synthèse débute à la fois dans les EC et dans les PER, puis continue dans les EC pour se terminer dans les EC et les PER. **C.** La voie de synthèse débute dans les PER puis continue dans les EC et la synthèse de noradrénaline a lieu dans les PER.

A l'aide d'un modèle d'angiogenèse en co-culture, nous avons pu montrer que les cellules endothéliales et les péricytes d'HI sont capables de former des tubes. Ce modèle a permis de réaliser des réseaux de tubes ressemblant à l'HI. En effet, sept jours après culture, ces tubes sont désorganisés et semblent être hautement prolifératifs. Ce phénomène n'est pas observé avec les tubes formés par les cellules d'hémangiomes congénitaux ou de prépuces, au contraire les tubes formés régressent en agrégats cellulaires. Ceci démontre que les péricytes d'HI favorisent la tubulogenèse et stabilisent les tubes. Grâce à ces données, nous faisons actuellement l'hypothèse que les cellules d'HI ayant l'enzyme DBH, les cellules endothéliales et/ou les péricytes selon l'HI, produisent en grande quantité de la noradrénaline, vont proliférer puis s'auto-stimuler par une boucle autocrine et/ou paracrine cellulaire et induire une angiogenèse pathologique (Figure 42). Sur la base de ce modèle il serait intéressant de faire un co-marquage GLUT-1/Ki-67 afin de valider la modélisation de l'HI et montrer que ces cellules sont très prolifératives.

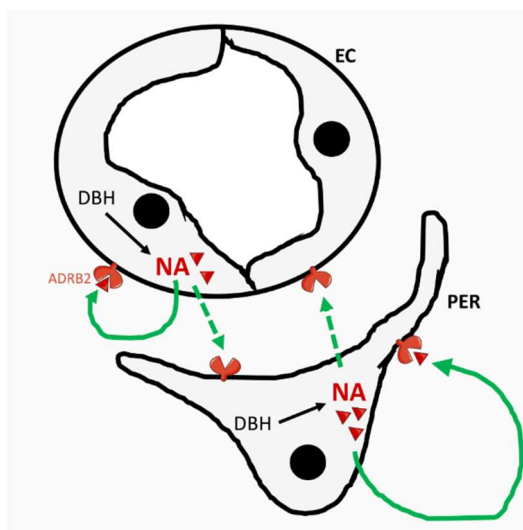


Figure 42 : Production autocrine-paracrine de la noradrénaline par les cellules endothéliales et les péricytes d'hémangiome infantile. Les cellules possédant la DBH vont synthétiser la noradrénaline qui va se fixer de manière autocrine (flèche pleine) ou paracrine (flèche pointillée) sur les récepteurs ADRB. EC : Cellule endothéliale, PER : Péricytes, NA : Noradrénaline.

En raison du faible nombre de cellules ensemencées (10 000 cellules) et de la petite surface utilisée (puits de lames  $\mu$ -Slide Ibidi® d'une surface de 0,125 cm<sup>2</sup>) pour la réalisation de ces tests de tubulogenèse, nous n'avons pas réussi à détecter de noradrénaline ni par test ELISA ni par dosage en chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). Nous envisageons donc de refaire ces tests sur une surface plus importante afin de mesurer la quantité de noradrénaline dans le but de prouver la capacité de ces cellules à synthétiser cette catécholamine *in vitro* dans le modèle bicellulaire. Nous avons néanmoins émis l'hypothèse le propranolol a un effet compétitif sur la noradrénaline produite par les cellules endothéliales et les péricytes d'HI, inhibant ainsi l'angiogenèse.

Pour vérifier cette hypothèse, des tests d'angiogenèse *in vitro* en co-culture (cellules endothéliales et péricytes du même tissu) en présence de noradrénaline ou de propranolol, en concentration non cytotoxique, ajouté toutes les 6 heures au milieu de culture et ce pendant 24 heures ont été effectués. La noradrénaline a augmenté significativement la longueur totale des tubes, la surface couverte par les tubes ainsi que le nombre total de tubes formés par les cellules endothéliales et les péricytes de prépuce à 6 heures (**Annexe 2**, Figure 47) alors qu'elle n'a pas d'effets sur les tubes formés par les cellules d'HI (endothéliales et péricytes) (Figure 43.B). Comme les



cellules d'HI expriment les enzymes des catécholamines et sont capables de produire de la noradrénaline en grande quantité, l'ajout de cette catécholamine dans des conditions d'angiogenèse *in vitro* pourrait saturer les ADRB et jouer un rôle régulateur négatif.

Le propranolol n'a augmenté ni la surface couverte ni le nombre de tubes formés par les cellules de prépuce (**Annexe 2**, Figure 47). Au contraire, l'ajout de propranolol a considérablement impacté la tubulogenèse formée par les cellules d'HI en réduisant significativement la surface couverte par les tubes, la longueur et le nombre de tubes dès 6 heures (Figure 43.B). À 24 heures, le propranolol a diminué de manière significative la surface couverte et la longueur du tube mais n'a pas modifié le nombre de tubes, suggérant que le propranolol n'inhibe pas, mais peut ralentir l'angiogenèse des cellules de HI (Figure 43.C).

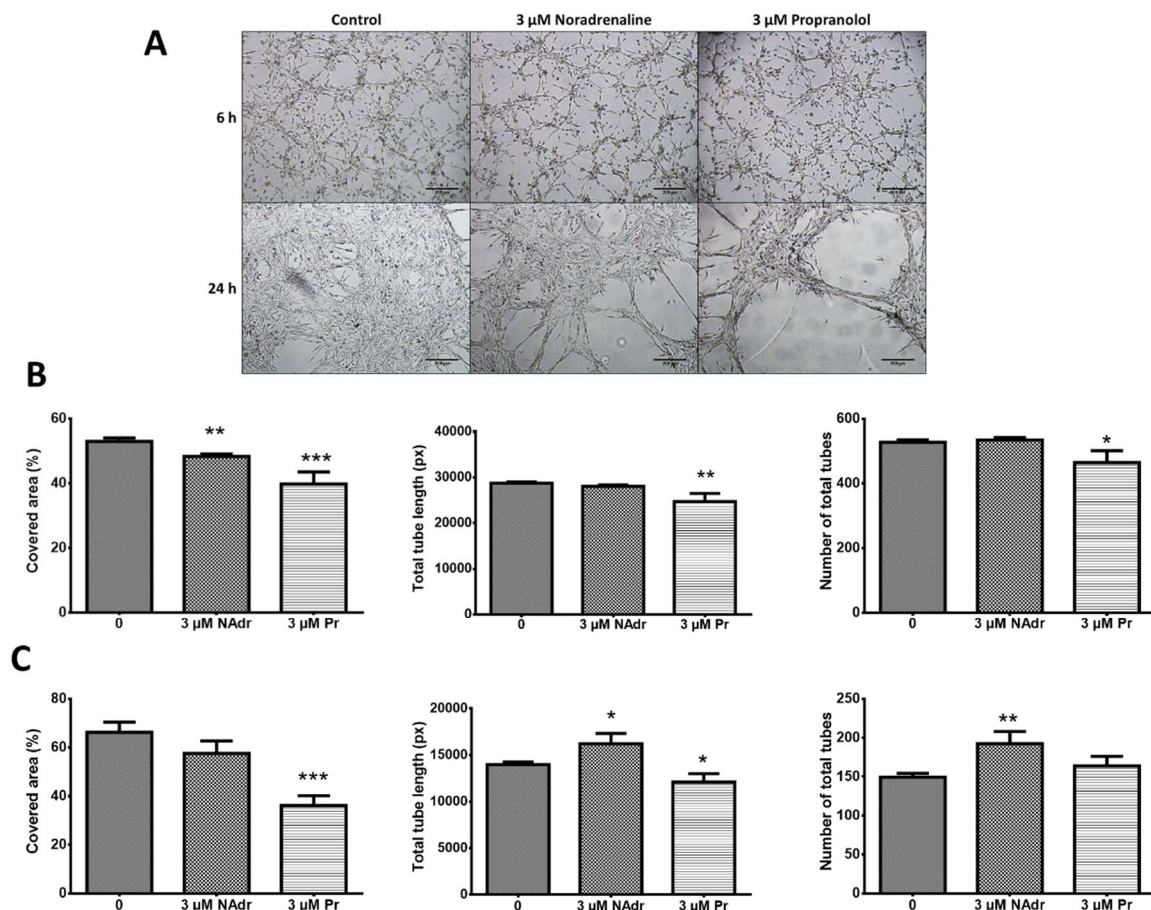


Figure 43 : Le propranolol inhibe la tubulogenèse des cellules d'HI. (A) Images des tubes formés par les cellules endothéliales et des péricytes d'HI dans du milieu EGM2 (control) avec 3 µM de noradrénaline (Nadr) ou 3 µM de propranolol (Pr) pendant 6 et 24 heures. Echelle : 200 µm (B-C) Quantification des paramètres d'angiogenèse (n=3 expérimentations, n=3 par groupe) à 6 (B) et 24 heures (C). (\*\*\*) P < 0,001, \*\* p < 0,01, \* p < 0,05; les données sont représentées par la moyenne ± l'erreur standard de la moyenne).

Nos résultats préliminaires ont également montré que le propranolol et la noradrénaline n'affectent pas de manière significative l'angiogenèse des tubes formés par un hémangiome congénital (**Annexe 2**, Figure 48). Ces résultats à confirmer suggèrent une efficacité spécifique du propranolol sur les cellules d'HI.

Pour confirmer un effet spécifique et anti-angiogénique du propranolol sur les tubes formés par les cellules d'HI nous envisageons de réaliser de nouveau ces tests. Nous suggérons tout de même que la spécificité d'action du propranolol est due à l'importante synthèse de noradrénaline par les cellules endothéliales et les péricytes d'HI et que le propranolol modulerait la synthèse de la noradrénaline. Pour confirmer cette hypothèse, le dosage de la noradrénaline avant et après l'ajout de propranolol est envisagé. De plus, afin de répondre à la question de la compétitivité du propranolol, nous envisageons de réaliser de nouveaux tests de tubulogenèse en mettant dans une première condition de la noradrénaline puis dans une seconde condition expérimentale le propranolol et la noradrénaline en compétition dans le milieu, afin de vérifier si le propranolol diminue la tubulogenèse induite par la noradrénaline.

Basé sur les similarités avec l'HI, le modèle de xénogreffe avec les cellules de la lignée de glioblastome U87 (exprimant le transporteur de glucose GLUT1 et ADRB2) était un modèle intéressant à étudier. Ce modèle nous a permis de mettre en lumière le rôle de l'AQP1 dans l'effet anti-tumoral du propranolol. L'extinction, par un lentivirus, de l'AQP1 a permis d'obtenir la formation de tumeurs de plus petite taille, l'ajout de propranolol n'a pas d'effet additif sur les tumeurs shAQP1, suggérant une voie de signalisation commune. Afin de valider cette hypothèse, il peut ainsi être envisagé de réaliser ces xénogreffes avec des cellules U87 sur-exprimant AQP1 puis de traiter les tumeurs au propranolol. Cette hypothèse sera confortée si le propranolol n'empêche plus la croissance des tumeurs.

Cette étude *in vivo* nous a conduit à analyser l'expression et la localisation de l'AQP1 dans les tissus d'HI. Comme le glioblastome<sup>151</sup>, seules les cellules périvasculaires expriment AQP1-1 dans les HI, cette nouvelle similitude avec l'HI permet de valider davantage le modèle de xénogreffe utilisé et permettre ainsi de rapprocher le mode d'action du propranolol dans ce modèle à l'HI. Les cellules d'HI exprimant l'AQP1 ont

été identifiées comme étant des télocytes. Nous n'avons pas étudié l'évolution de l'expression de la protéine selon les phases de l'HI néanmoins cette question peut alors se poser. Nous avons montré que ces mêmes cellules expriment ADRB2 ce qui suggère que les télocytes sont importants voire critiques dans le développement de la tumeur.

Il a déjà été démontré que l'expression de l'AQP1 peut être modulée par la terbutaline, un agoniste des ADRB2<sup>152</sup>. En effet, l'injection intra-péritonéale de terbutaline dans les poumons de souris C57BL/6 induit une augmentation de l'expression d'AQP1. De plus, dans cette même étude, l'ajout d'AMPc dans le milieu de culture de la lignée cellulaire humaine de monocytes THP-1 augmente également significativement l'expression d'AQP1. La régulation de l'AQP1 a également été étudiée dans des modèles d'ovocytes et de rein. Dans ces modèles, l'expression de l'AQP1 augmente lorsque la voie de phosphorylation de la PKA est activée via l'AMPc<sup>153</sup>. Il peut ainsi être suggéré que la noradrénaline est capable de contrôler le niveau d'AQP1 et ce, dans les télocytes d'HI (Figure 44).

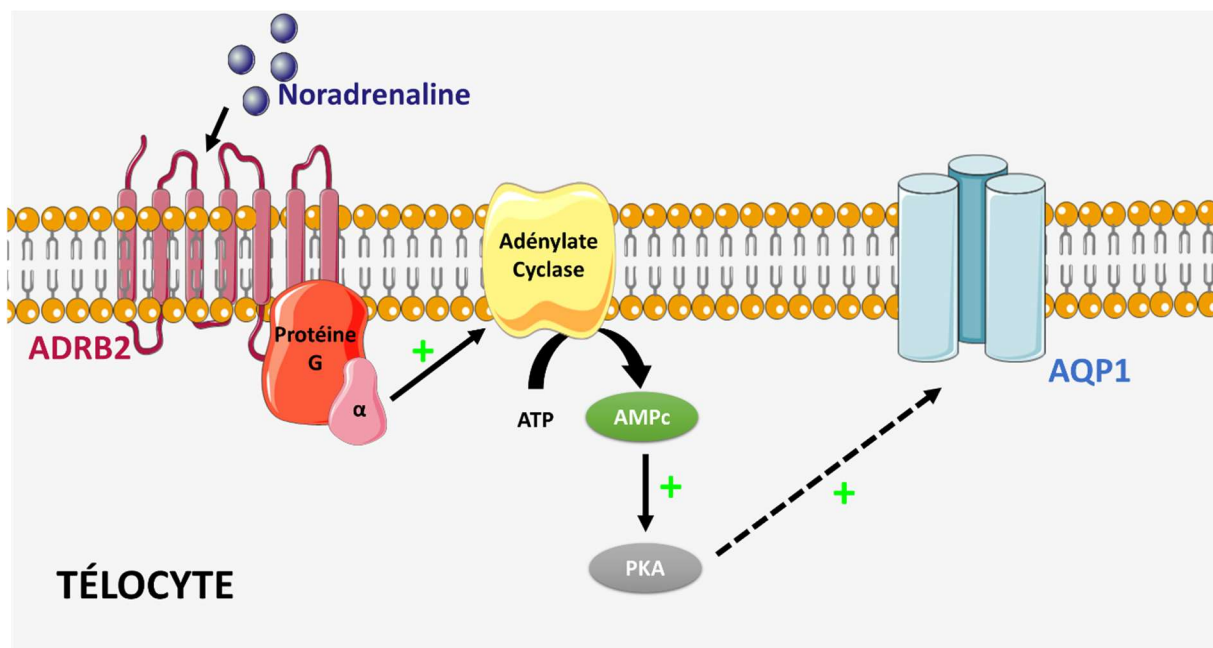


Figure 44 : Mécanisme hypothétique de la régulation de l'AQP1 par la noradrénaline dans les télocytes d'HI

Nous avons réussi à isoler et mettre en culture des télocytes d'HI (Figure 45) par la technique d'isolement mise au point au laboratoire (**Annexe 1**) en réalisant un premier tri CD31 puis sur la fraction négative CD31-, nous avons isolé les télocytes CD34+ avec un anticorps CD34.

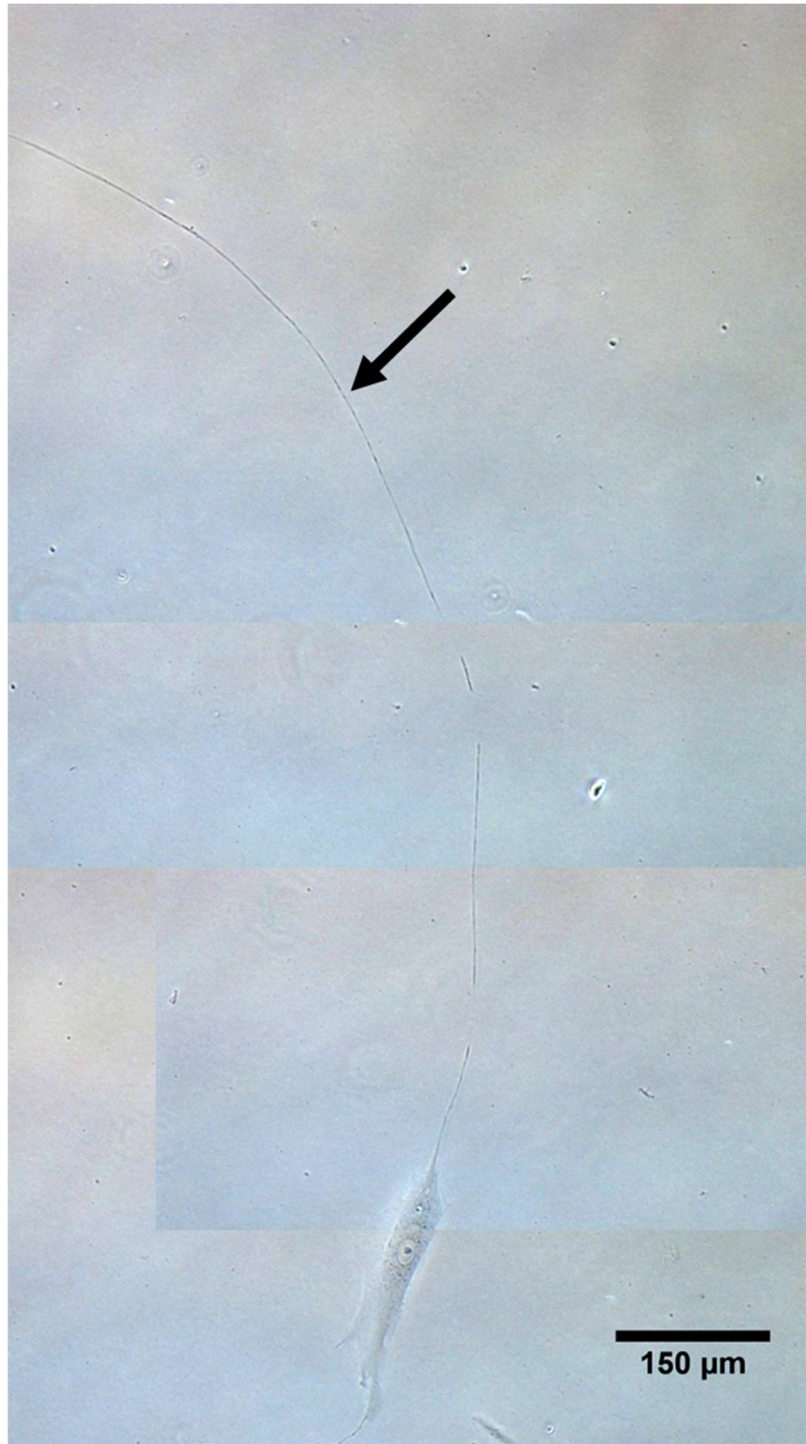


Figure 45 : Télocytes d'hémangiome infantile en culture. Flèche : télopode, Echelle : 150  $\mu\text{m}$   
Il peut ainsi être étudié l'expression de l'AQP1 dans les télocytes en présence de noradrénaline ou de propranolol.

Ces éléments de la littérature ainsi que nos résultats nous permettent de proposer une hypothèse pour le mécanisme d'action du propranolol dans les IH (Figure 46).

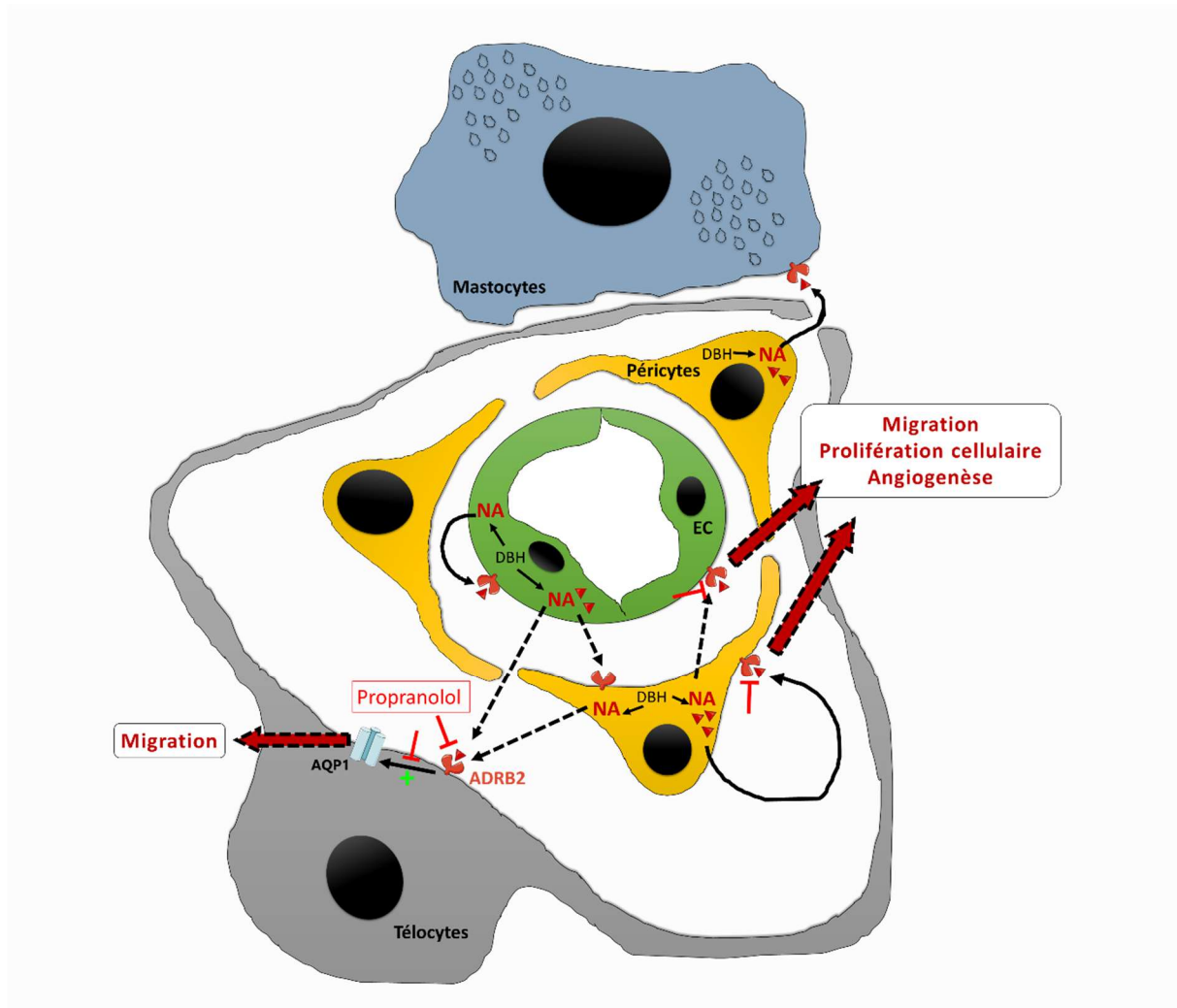


Figure 46 : Mécanisme hypothétique du dialogue intercellulaire dans les vaisseaux d'hémangiome infantile et du mode d'action du propranolol dans ce mécanisme. La noradrénaline produite par les cellules endothéliales et/ou les péricytes d'HI se fixe sur les ADRB2 (une capacité de biosynthèse par l'association des deux types cellulaires est envisagée voir texte). La fixation de la noradrénaline sur les ADRB2 des télocytes produirait de l'AQP1. L'ensemble AQP1-noradrénaline favoriserait de façon additive ou synergique la migration, la prolifération cellulaire et par conséquent l'angiogenèse.

## CONCLUSION

Nos travaux soulignent l'implication de la noradrénaline et de l'AQP1 dans la physiopathologie et le mode d'action anti-angiogénique du propranolol dans les HI. De plus, ils mettent en avant la réalisation d'un modèle ressemblant à l'HI répondant au propranolol, permettant ainsi de mieux comprendre son mécanisme. Des expérimentations restent à effectuer afin de mettre en lumière comment la noradrénaline et l'AQP1 interagissent et comment le propranolol module leur expression.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Mulliken, J. B. & Glowacki, J. Hemangiomas and vascular malformations in infants and children: a classification based on endothelial characteristics. *Plast. Reconstr. Surg.* **69**, 412–422 (1982).
2. Kanada, K. N., Merin, M. R., Munden, A. & Friedlander, S. F. A prospective study of cutaneous findings in newborns in the United States: correlation with race, ethnicity, and gestational status using updated classification and nomenclature. *J. Pediatr.* **161**, 240–245 (2012).
3. Léauté-Labrèze, C. *et al.* Propranolol for severe hemangiomas of infancy. *N. Engl. J. Med.* **358**, 2649–2651 (2008).
4. Dermatologie : Pierre Fabre obtient l’AMM européenne pour Hemangiol®. Available at: <https://www.pierre-fabre.com/fr/actualites/dermatologie-pierre-fabre-obtient-lamm-europeenne-pour-hemangiolr>. (Accessed: 25th September 2018)
5. Prey, S. *et al.* Mast cells as possible targets of propranolol therapy: an immunohistological study of beta-adrenergic receptors in infantile haemangiomas. *Histopathology* **65**, 436–439 (2014).
6. Dasgupta, R. & Fishman, S. J. ISSVA classification. *Semin. Pediatr. Surg.* **23**, 158–161 (2014).
7. Chang, L. C. *et al.* Growth characteristics of infantile hemangiomas: implications for management. *Pediatrics* **122**, 360–367 (2008).
8. PDQ Pediatric Treatment Editorial Board. Childhood Vascular Tumors Treatment (PDQ®): Health Professional Version. in *PDQ Cancer Information Summaries* (National Cancer Institute (US), 2002).

9. Storch, C. H. & Hoeger, P. H. Propranolol for infantile haemangiomas: insights into the molecular mechanisms of action. *Br. J. Dermatol.* **163**, 269–274 (2010).
10. Tollefson, M. M. & Frieden, I. J. Early growth of infantile hemangiomas: what parents' photographs tell us. *Pediatrics* **130**, e314-320 (2012).
11. Dreyfus, I., Maza, A. & Mazereeuw-Hautier, J. [What's new about infantile hemangiomas?]. *Arch Pediatr* **20**, 809–816 (2013).
12. Bauland, C. G., Smit, J. M., Bartelink, L. R., Zondervan, H. A. & Spauwen, P. H. M. Hemangioma in the newborn: increased incidence after chorionic villus sampling. *Prenat. Diagn.* **30**, 913–917 (2010).
13. North, P. E., Waner, M., Mizeracki, A. & Mihm Jr, M. C. GLUT1: A newly discovered immunohistochemical marker for juvenile hemangiomas. *Human Pathology* **31**, 11–22 (2000).
14. Burton, B. K., Schulz, C. J., Angle, B. & Burd, L. I. An increased incidence of haemangiomas in infants born following chorionic villus sampling (CVS). *Prenat. Diagn.* **15**, 209–214 (1995).
15. North, P. E. *et al.* A unique microvascular phenotype shared by juvenile hemangiomas and human placenta. *Arch Dermatol* **137**, 559–570 (2001).
16. Régnier, S. *et al.* Endothelial cells in infantile haemangiomas originate from the child and not from the mother (a fluorescence in situ hybridization-based study). *Br. J. Dermatol.* **157**, 158–160 (2007).
17. Pittman, K. M. *et al.* No evidence for maternal-fetal microchimerism in infantile hemangioma: a molecular genetic investigation. *J. Invest. Dermatol.* **126**, 2533–2538 (2006).
18. Khan, Z. A. *et al.* Multipotential stem cells recapitulate human infantile hemangioma in immunodeficient mice. *J. Clin. Invest.* **118**, 2592–2599 (2008).



19. Boye, E. *et al.* Clonality and altered behavior of endothelial cells from hemangiomas. *J. Clin. Invest.* **107**, 745–752 (2001).
20. Colonna, V., Resta, L., Napoli, A. & Bonifazi, E. Placental hypoxia and neonatal haemangioma: clinical and histological observations. *British Journal of Dermatology* **162**, 208–209 (2010).
21. Chen, G. *et al.* Hypoxia-induced autophagy in endothelial cells: a double-edged sword in the progression of infantile haemangioma? *Cardiovasc. Res.* **98**, 437–448 (2013).
22. Ramakrishnan, S. K. & Shah, Y. M. A central role for hypoxia-inducible factor (HIF)-2 $\alpha$  in hepatic glucose homeostasis. *Nutr Healthy Aging* **4**, 207–216 (2017).
23. Drolet, B. A. & Frieden, I. J. Characteristics of infantile hemangiomas as clues to pathogenesis: does hypoxia connect the dots? *Arch Dermatol* **146**, 1295–1299 (2010).
24. de Jong, S., Itinteang, T., Withers, A. H. J., Davis, P. F. & Tan, S. T. Does hypoxia play a role in infantile hemangioma? *Arch. Dermatol. Res.* **308**, 219–227 (2016).
25. Casanova, D., Norat, F., Bardot, J. & Magalon, G. Cutaneous hemangioma: clinical aspects. *Ann Chir Plast Esthet* 287–92 (2006). doi:10.1016/j.anplas.2006.07.014
26. Sasaki, G. H., Pang, C. Y. & Wittliff, J. L. Pathogenesis and treatment of infant skin strawberry hemangiomas: clinical and in vitro studies of hormonal effects. *Plast. Reconstr. Surg.* **73**, 359–370 (1984).
27. Boscolo, E. & Bischoff, J. Vasculogenesis in infantile hemangioma. *Angiogenesis* **12**, 197–207 (2009).
28. Castrén, E., Salminen, P., Vikkula, M., Pitkäranta, A. & Klockars, T. Inheritance Patterns of Infantile Hemangioma. *Pediatrics* **138**, (2016).

29. Pramanik, K. *et al.* Dusp-5 and Snrk-1 coordinately function during vascular development and disease. *Blood* **113**, 1184–1191 (2009).
30. Jinnin, M. *et al.* Suppressed NFAT-dependent VEGFR1 expression and constitutive VEGFR2 signaling in infantile hemangioma. *Nat Med* **14**, 1236–1246 (2008).
31. Haggstrom, A. N. *et al.* Prospective study of infantile hemangiomas: clinical characteristics predicting complications and treatment. *Pediatrics* **118**, 882–887 (2006).
32. Enjolras, O., Riche, M. C., Merland, J. J. & Escande, J. P. Management of Alarming Hemangiomas in Infancy: A Review of 25 Cases. *Pediatrics* **85**, 491–498 (1990).
33. Hasan, Q., Tan, S. T., Gush, J., Peters, S. G. & Davis, P. F. Steroid therapy of a proliferating hemangioma: histochemical and molecular changes. *Pediatrics* **105**, 117–120 (2000).
34. Léauté-Labrèze, C. & Sans-Martin, V. [Infantile hemangioma]. *Presse Med* **39**, 499–510 (2010).
35. Léauté-Labrèze, C. [Propranolol in infantile hemangiomas]. *Arch Pediatr* **22**, 452–455 (2015).
36. Léauté-Labrèze, C. *et al.* A Randomized, Controlled Trial of Oral Propranolol in Infantile Hemangioma. (2015). doi:10.1056/NEJMoa1404710
37. Prey, S. *et al.* Safety of Propranolol Therapy for Severe Infantile Hemangioma. *JAMA* **315**, 413–415 (2016).
38. Léaute-Labrèze, C. *et al.* Safety of Oral Propranolol for the Treatment of Infantile Hemangioma: A Systematic Review. *Pediatrics* **138**, (2016).

39. Boucek, R. J., Kirsh, A. L., Majesky, M. W. & Perkins, J. A. Propranolol Responsiveness in Vascular Tumors Is Not Determined by Qualitative Differences in Adrenergic Receptors. *Otolaryngol Head Neck Surg* **149**, 772–776 (2013).
40. Truong, M. T., Perkins, J. A., Messner, A. H. & Chang, K. W. Propranolol for the treatment of airway hemangiomas: a case series and treatment algorithm. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* **74**, 1043–1048 (2010).
41. Weibel, L. *et al.* Topical Timolol for Infantile Hemangiomas: Evidence for Efficacy and Degree of Systemic Absorption. *Pediatr Dermatol* **33**, 184–190 (2016).
42. Borok, J., Gangar, P., Admani, S., Proudfoot, J. & Friedlander, S. F. Safety and efficacy of topical timolol treatment of infantile haemangioma: a prospective trial. *Br. J. Dermatol.* **178**, e51–e52 (2018).
43. Sumpio, B. E., Riley, J. T. & Dardik, A. Cells in focus: endothelial cell. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**, 1508–1512 (2002).
44. Hayoz, D. & Silacci, P. Biologie de la cellule endothéliale, apport des modèles expérimentaux. **18**, 7 (2006).
45. Rakocevic, J. *et al.* Endothelial cell markers from clinician’s perspective. *Exp. Mol. Pathol.* **102**, 303–313 (2017).
46. Yu, Y., Varughese, J., Brown, L. F., Mulliken, J. B. & Bischoff, J. Increased Tie2 expression, enhanced response to angiopoietin-1, and dysregulated angiopoietin-2 expression in hemangioma-derived endothelial cells. *Am. J. Pathol.* **159**, 2271–2280 (2001).
47. Wu, J. K. *et al.* A switch in Notch gene expression parallels stem cell to endothelial transition in infantile hemangioma. *Angiogenesis* **13**, 15–23 (2010).
48. Bergers, G. & Song, S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol* **7**, 452–464 (2005).

49. Munde, P. B., Khandekar, S. P., Dive, A. M. & Upadhyaya, N. R. Pericytes in Health and Disease. *International Journal of Oral and Maxillofacial Pathology* **1**, 2–7 (2014).
50. Lee, D. *et al.* Propranolol Targets Contractility of Infantile Hemangioma-derived Pericytes. *Br J Dermatol* **171**, 1129–1137 (2014).
51. Boscolo, E., Mulliken, J. B. & Bischoff, J. Pericytes from infantile hemangioma display proangiogenic properties and dysregulated angiopoietin-1. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **33**, 501–509 (2013).
52. Yu, S. *et al.* Isolation and characterization of endothelial colony-forming cells from mononuclear cells of rat bone marrow. *Exp. Cell Res.* **370**, 116–126 (2018).
53. Rafii, S., Lyden, D., Benezra, R., Hattori, K. & Heissig, B. Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? *Nat. Rev. Cancer* **2**, 826–835 (2002).
54. Levenberg, S., Golub, J. S., Amit, M., Itskovitz-Eldor, J. & Langer, R. Endothelial cells derived from human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 4391–4396 (2002).
55. Yu, Y. *et al.* Mesenchymal stem cells and adipogenesis in hemangioma involution. *Stem Cells* **24**, 1605–1612 (2006).
56. Tan, S. T., Wallis, R. A., He, Y. & Davis, P. F. Mast cells and hemangioma. *Plast. Reconstr. Surg.* **113**, 999–1011 (2004).
57. Wynn, T. A., Chawla, A. & Pollard, J. W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* **496**, 445–455 (2013).
58. Lobov, I. B. *et al.* WNT7b mediates macrophage-induced programmed cell death in patterning of the vasculature. *Nature* **437**, 417–421 (2005).

59. Quatromoni, J. G. & Eruslanov, E. Tumor-associated macrophages: function, phenotype, and link to prognosis in human lung cancer. *Am J Transl Res* **4**, 376–389 (2012).
60. Zarif, J. C. *et al.* A phased strategy to differentiate human CD14<sup>+</sup> monocytes into classically-activated, alternatively activated macrophages and dendritic cells. *Biotechniques* **61**, 33–41 (2016).
61. Jia, J. *et al.* Expression of allograft inflammatory factor-1 and CD68 in haemangioma: implication in the progression of haemangioma. *Br. J. Dermatol.* **159**, 811–819 (2008).
62. Wang, F.-Q. *et al.* M2-polarised macrophages in infantile haemangiomas: correlation with promoted angiogenesis. *J. Clin. Pathol.* **66**, 1058–1064 (2013).
63. Zhang, W. *et al.* Macrophages Contribute to the Progression of Infantile Hemangioma by Regulating the Proliferation and Differentiation of Hemangioma Stem Cells. *J. Invest. Dermatol.* **135**, 3163–3172 (2015).
64. Auffret, J. *Impact des hormones lactogènes sur la cellule  $\beta$  pancréatique et l'adipocyte.* (Thèse, Paris 11, 2012).
65. Yuan, S.-M., Chen, R.-L., Shen, W.-M., Chen, H.-N. & Zhou, X.-J. Mesenchymal stem cells in infantile hemangioma reside in the perivascular region. *Pediatr. Dev. Pathol.* **15**, 5–12 (2012).
66. Wong, A. *et al.* Propranolol Accelerates Adipogenesis in Hemangioma Stem Cells and Causes Apoptosis of Hemangioma Endothelial Cells. *Plast Reconstr Surg* **130**, 1012–1021 (2012).
67. Saillard, M. Traitements anti-angiogéniques dans le cancer du sein : place de l'Avastin®. 307 (2014).

68. Ferreira Tojais, N. *La signalisation wnt/frizzled dans la vasculogénèse et l'angiogénèse : frizzled-7, un nouvel acteur de la formation des vaisseaux.* (Bordeaux 2, 2010).
69. Mills, S. J., Cowin, A. J. & Kaur, P. Pericytes, Mesenchymal Stem Cells and the Wound Healing Process. *Cells* **2**, 621–634 (2013).
70. Luttun, A., Carmeliet, G. & Carmeliet, P. Vascular progenitors: from biology to treatment. *Trends Cardiovasc. Med.* **12**, 88–96 (2002).
71. Dosanjh, A. *et al.* In vitro characteristics of neonatal hemangioma endothelial cells: similarities and differences between normal neonatal and fetal endothelial cells. *J. Cutan. Pathol.* **27**, 441–450 (2000).
72. Park, Y. S., Kim, N. H. & Jo, I. Hypoxia and vascular endothelial growth factor acutely up-regulate angiopoietin-1 and Tie2 mRNA in bovine retinal pericytes. *Microvasc. Res.* **65**, 125–131 (2003).
73. Carmeliet, P., Smet, F. D., Loges, S. & Mazzone, M. Branching morphogenesis and antiangiogenesis candidates: tip cells lead the way. *Nature Reviews Clinical Oncology* **6**, 315–326 (2009).
74. Mentzer, S. J. & Konerding, M. A. Intussusceptive angiogenesis: expansion and remodeling of microvascular networks. *Angiogenesis* **17**, 499–509 (2014).
75. Desroches-Castan, A. Inhibition de l'angiogénèse tumorale : criblage d'une chimiothèque et caractérisation d'un nouveau composé agissant sur la voie de signalisation Ras-ERK. (Université Joseph Fourier, 2014).
76. Tahergorabi, Z. & Khazaei, M. A review on angiogenesis and its assays. *Iran J Basic Med Sci* **15**, 1110–1126 (2012).

77. Couffinhal, T., Dufourcq, P., Daret, D. & Duplaà, C. [The mechanisms of angiogenesis. Medical and therapeutic applications]. *Rev Med Interne* **22**, 1064–1082 (2001).
78. Robinson, C. J. & Stringer, S. E. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J. Cell. Sci.* **114**, 853–865 (2001).
79. Krock, B. L., Skuli, N. & Simon, M. C. Hypoxia-Induced Angiogenesis. *Genes Cancer* **2**, 1117–1133 (2011).
80. Park, Y. S. *et al.* Expression of angiopoietin-1 in hypoxic pericytes: Regulation by hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$  and participation in endothelial cell migration and tube formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **469**, 263–269 (2016).
81. Shibuya, M. Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis. *Angiogenesis* **9**, 225–230; discussion 231 (2006).
82. Kendall, R. L. & Thomas, K. A. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 10705–10709 (1993).
83. Karaman, S., Leppänen, V.-M. & Alitalo, K. Vascular endothelial growth factor signaling in development and disease. *Development* **145**, (2018).
84. Przewratil, P., Sitkiewicz, A. & Andrzejewska, E. Local serum levels of vascular endothelial growth factor in infantile hemangioma: intriguing mechanism of endothelial growth. *Cytokine* **49**, 141–147 (2010).
85. Folkman, J. & Shing, Y. Angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **267**, 10931–10934 (1992).
86. Chen, H. *et al.* Adrenergic signaling promotes angiogenesis through endothelial cell-tumor cell crosstalk. *Endocr. Relat. Cancer* **21**, 783–795 (2014).
87. Chakroborty, D., Sarkar, C., Basu, B., Dasgupta, P. S. & Basu, S. Catecholamines regulate tumor angiogenesis. *Cancer Res.* **69**, 3727–3730 (2009).

88. Shi, M., Liu, D., Yang, Z. & Guo, N. Central and peripheral nervous systems: master controllers in cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* **32**, 603–621 (2013).
89. Thaker, P. H. *et al.* Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma. *Nat. Med.* **12**, 939–944 (2006).
90. Pan, W.-K., Li, P., Guo, Z.-T., Huang, Q. & Gao, Y. Propranolol induces regression of hemangioma cells via the down-regulation of the PI3K/Akt/eNOS/VEGF pathway. *Pediatr Blood Cancer* **62**, 1414–1420 (2015).
91. Lawler, J. W., Slayter, H. S. & Coligan, J. E. Isolation and characterization of a high molecular weight glycoprotein from human blood platelets. *J. Biol. Chem.* **253**, 8609–8616 (1978).
92. Good, D. J. *et al.* A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 6624–6628 (1990).
93. Angelidis, A. *et al.* Disrupted migration and proliferation of neuroblasts after postnatal administration of angiogenesis inhibitor. *Brain Res.* **1698**, 121–129 (2018).
94. Vandenbunder, B. & Poupon, M. Découverte d'un nouvel inhibiteur de l'angiogenèse, l'angiostatine. Implications pour la biologie et la thérapie des métastases. *médecine/sciences* **11**, 284 (1995).
95. Cao, Y. *et al.* Kringle Domains of Human Angiostatin CHARACTERIZATION OF THE ANTI-PROLIFERATIVE ACTIVITY ON ENDOTHELIAL CELLS. *J. Biol. Chem.* **271**, 29461–29467 (1996).
96. Takahashi, K. *et al.* Cellular markers that distinguish the phases of hemangioma during infancy and childhood. *J Clin Invest* **93**, 2357–2364 (1994).



97. Peghaire, C. *Caractérisation du rôle du récepteur Frizzled7 dans l'intégrité vasculaire et l'angiogenèse*. (Bordeaux, 2014).
98. Exertier, P. *Rôle des kinésines mitotiques Eg5 et MKLP-2 dans l'angiogenèse physiologique et pathologique*. (Bordeaux 1, 2012).
99. Blacher, S. *et al.* Cell Invasion in the Spheroid Sprouting Assay: A Spatial Organisation Analysis Adaptable to Cell Behaviour. *PLoS One* **9**, (2014).
100. Heiss, M. *et al.* Endothelial cell spheroids as a versatile tool to study angiogenesis in vitro. *FASEB J.* **29**, 3076–3084 (2015).
101. Greenberger, S. & Bischoff, J. Infantile hemangioma-mechanism(s) of drug action on a vascular tumor. *Cold Spring Harb Perspect Med* **1**, a006460 (2011).
102. Ozeki, M. *et al.* Propranolol for infantile hemangioma: Effect on plasma vascular endothelial growth factor. *Pediatr Int* (2016). doi:10.1111/ped.12981
103. Acevedo, L. M. & Cheresch, D. A. Suppressing NFAT increases VEGF signaling in hemangiomas. *Cancer Cell* **14**, 429–430 (2008).
104. Taran, K., Wnęk, A., Kobos, J., Andrzejewska, E. & Przewratil, P. Tissue and serum mRNA profile of MMPs-2/9 as a potential novel biomarker for the most individual approach in infantile hemangiomas and cancer disease. *Immunobiology* **222**, 1035–1042 (2017).
105. Thaivalappil, S. *et al.* Propranolol-mediated attenuation of MMP-9 excretion in infants with hemangiomas. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* **139**, 1026–1031 (2013).
106. Zhu, Y., Tuerxun, A., Hui, Y. & Abliz, P. Effects of propranolol and isoproterenol on infantile hemangioma endothelial cells in vitro. *Exp Ther Med* **8**, 647–651 (2014).

107. Lamy, S., Lachambre, M.-P., Lord-Dufour, S. & Béliveau, R. Propranolol suppresses angiogenesis in vitro: inhibition of proliferation, migration, and differentiation of endothelial cells. *Vascul. Pharmacol.* **53**, 200–208 (2010).
108. Li, D., Li, P., Guo, Z., Wang, H. & Pan, W. Downregulation of miR-382 by propranolol inhibits the progression of infantile hemangioma via the PTEN-mediated AKT/mTOR pathway. *Int. J. Mol. Med.* (2017). doi:10.3892/ijmm.2017.2863
109. Annabi, B., Lachambre, M.-P., Plouffe, K., Moundjian, R. & Béliveau, R. Propranolol adrenergic blockade inhibits human brain endothelial cells tubulogenesis and matrix metalloproteinase-9 secretion. *Pharmacol. Res.* **60**, 438–445 (2009).
110. Pasquier, E. *et al.* Propranolol potentiates the anti-angiogenic effects and anti-tumor efficacy of chemotherapy agents: implication in breast cancer treatment. *Oncotarget* **2**, 797–809 (2011).
111. Chim, H. *et al.* Propranolol induces regression of hemangioma cells through HIF-1 $\alpha$ -mediated inhibition of VEGF-A. *Ann. Surg.* **256**, 146–156 (2012).
112. Ma, X. *et al.* Propranolol enhanced adipogenesis instead of induction of apoptosis of hemangiomas stem cells. *Int J Clin Exp Pathol* **7**, 3809–3817 (2014).
113. Zhang, L. *et al.* Preliminary study on plasma RPN concentration of patients with infantile hemangioma treated with propranolol. *Int J Clin Exp Med* **6**, 342–345 (2013).
114. Takechi, T. *et al.* Population Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Oral Propranolol in Pediatric Patients With Infantile Hemangioma. *J Clin Pharmacol* **58**, 1361–1370 (2018).

115. Nagatsu, T., Levitt, M. & Udenfriend, S. TYROSINE HYDROXYLASE. THE INITIAL STEP IN NOREPINEPHRINE BIOSYNTHESIS. *J. Biol. Chem.* **239**, 2910–2917 (1964).
116. Kourtesis, I., Kasparov, S., Verkade, P. & Teschemacher, A. G. Ultrastructural Correlates of Enhanced Norepinephrine and Neuropeptide Y Cotransmission in the Spontaneously Hypertensive Rat Brain. *ASN Neuro* **7**, (2015).
117. Kvetnansky, R., Sabban, E. L. & Palkovits, M. Catecholaminergic Systems in Stress: Structural and Molecular Genetic Approaches. *Physiological Reviews* **89**, 535–606 (2009).
118. Sorriento, D. *et al.* Endothelial cells are able to synthesize and release catecholamines both in vitro and in vivo. *Hypertension* **60**, 129–136 (2012).
119. Pullar, C. E. & Isseroff, R. R. Beta 2-adrenergic receptor activation delays dermal fibroblast-mediated contraction of collagen gels via a cAMP-dependent mechanism. *Wound Repair Regen* **13**, 405–411 (2005).
120. Grando, S. A., Pittelkow, M. R. & Schallreuter, K. U. Adrenergic and cholinergic control in the biology of epidermis: physiological and clinical significance. *J. Invest. Dermatol.* **126**, 1948–1965 (2006).
121. Gillbro, J. M., Marles, L. K., Hibberts, N. A. & Schallreuter, K. U. Autocrine catecholamine biosynthesis and the beta-adrenoceptor signal promote pigmentation in human epidermal melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* **123**, 346–353 (2004).
122. Liggett, S. B. Update on current concepts of the molecular basis of beta2-adrenergic receptor signaling. *J. Allergy Clin. Immunol.* **110**, S223-227 (2002).

123. Schallreuter, K. U. Epidermal adrenergic signal transduction as part of the neuronal network in the human epidermis. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* **2**, 37–40 (1997).
124. Sivamani, R. K., Lam, S. T. & Isseroff, R. R. Beta adrenergic receptors in keratinocytes. *Dermatol Clin* **25**, 643–653, x (2007).
125. Schallreuter, K. U., Körner, C., Pittelkow, M. R., Swanson, N. N. & Gardner, M. L. The induction of the alpha-1-adrenoceptor signal transduction system on human melanocytes. *Exp. Dermatol.* **5**, 20–23 (1996).
126. O’Leary, A. P., Fox, J. M. & Pullar, C. E. Beta-Adrenoceptor Activation Reduces Both Dermal Microvascular Endothelial Cell Migration via a cAMP-Dependent Mechanism and Wound Angiogenesis. *J. Cell. Physiol.* **230**, 356–365 (2015).
127. Hadaschik, E., Scheiba, N., Engstner, M. & Flux, K. High levels of  $\beta$ -adrenoceptors are expressed in infantile capillary hemangiomas and may mediate the therapeutic effect of propranolol. *J. Cutan. Pathol.* **39**, 881–883 (2012).
128. Ji, Y. *et al.* The role of  $\beta$ -adrenergic receptor signaling in the proliferation of hemangioma-derived endothelial cells. *Cell Div* **8**, 1 (2013).
129. Sarkar, C., Chakroborty, D. & Basu, S. Neurotransmitters as regulators of tumor angiogenesis and immunity: the role of catecholamines. *J Neuroimmune Pharmacol* **8**, 7–14 (2013).
130. Schallreuter, K. U. *et al.* Catecholamines in human keratinocyte differentiation. *J. Invest. Dermatol.* **104**, 953–957 (1995).
131. Sivamani, R. K. *et al.* Acute wounding alters the beta2-adrenergic signaling and catecholamine synthetic pathways in keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **134**, 2258–2266 (2014).

132. Pullar, C. E., Rizzo, A. & Isseroff, R. R. beta-Adrenergic receptor antagonists accelerate skin wound healing: evidence for a catecholamine synthesis network in the epidermis. *J. Biol. Chem.* **281**, 21225–21235 (2006).
133. Reiter, M. J. Cardiovascular drug class specificity: beta-blockers. *Prog Cardiovasc Dis* **47**, 11–33 (2004).
134. Black, J. W., Crowther, A. F., Shanks, R. G., Smith, L. H. & Dornhorst, A. C. A NEW ADRENERGIC BETARECEPTOR ANTAGONIST. *Lancet* **1**, 1080–1081 (1964).
135. Prey, S. *Propranolol dans les hemangiomes infantiles : tolérance et identification des voies thérapeutiques*. (Bordeaux, 2014).
136. Park, S. Y. *et al.* Norepinephrine induces VEGF expression and angiogenesis by a hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  protein-dependent mechanism. *Int. J. Cancer* **128**, 2306–2316 (2011).
137. Courtoy, P. J. & Boyles, J. Fibronectin in the microvasculature: localization in the pericyte-endothelial interstitium. *J. Ultrastruct. Res.* **83**, 258–273 (1983).
138. Stenn, K. S., Link, R., Moellmann, G., Madri, J. & Kuklinska, E. Dispase, a neutral protease from *Bacillus polymyxa*, is a powerful fibronectinase and type IV collagenase. *J. Invest. Dermatol.* **93**, 287–290 (1989).
139. Czyzyk-Krzeska, M. F., Bayliss, D. A., Lawson, E. E. & Millhorn, D. E. Regulation of tyrosine hydroxylase gene expression in the rat carotid body by hypoxia. *J. Neurochem.* **58**, 1538–1546 (1992).
140. Schnell, P. O. *et al.* Regulation of tyrosine hydroxylase promoter activity by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and hypoxia-inducible transcription factors. *J. Neurochem.* **85**, 483–491 (2003).

141. Czyzyk-Krzeska, M. F., Furnari, B. A., Lawson, E. E. & Millhorn, D. E. Hypoxia increases rate of transcription and stability of tyrosine hydroxylase mRNA in pheochromocytoma (PC12) cells. *J. Biol. Chem.* **269**, 760–764 (1994).
142. Ikemoto, K. *et al.* Tyrosine hydroxylase and aromatic L-amino acid decarboxylase do not coexist in neurons in the human anterior cingulate cortex. *Neurosci. Lett.* **269**, 37–40 (1999).
143. Ugrumov, M. V. Brain neurons partly expressing dopaminergic phenotype: location, development, functional significance, and regulation. *Adv. Pharmacol.* **68**, 37–91 (2013).
144. Huppertz, B. Oxygenation of the placenta and its role in pre-eclampsia. *Pregnancy Hypertens* **4**, 244–245 (2014).
145. Lenclen, R. Oxygénothérapie chez le nouveau-né: aspects pratiques - Oxygénothérapie en période néonatale. (2008).
146. Tuuli, M. G., Longtine, M. S. & Nelson, D. M. Review: Oxygen and trophoblast biology — A source of controversy. *Placenta* **32**, S109–S118 (2011).
147. Forristal, C. E. *et al.* Pharmacologic stabilization of HIF-1 $\alpha$  increases hematopoietic stem cell quiescence in vivo and accelerates blood recovery after severe irradiation. *Blood* **121**, 759–769 (2013).
148. Yang, E. V. *et al.* Norepinephrine up-regulates the expression of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase (MMP)-2, and MMP-9 in nasopharyngeal carcinoma tumor cells. *Cancer Res.* **66**, 10357–10364 (2006).
149. Braadland, P. R., Ramberg, H., Grytli, H. H. & Taskén, K. A.  $\beta$ -Adrenergic Receptor Signaling in Prostate Cancer. *Front Oncol* **4**, 375 (2014).

150. Ramamoorthy, P., Xu, G. & Shi, H. Expression of Hypoxia Inducible Factor 1alpha Is Protein Kinase A-dependent in Primary Cortical Astrocytes Exposed to Severe Hypoxia. *Neurochem. Res.* (2018). doi:10.1007/s11064-018-2516-9
151. Hayashi, Y., Edwards, N. A., Proescholdt, M. A., Oldfield, E. H. & Merrill, M. J. Regulation and Function of Aquaporin-1 in Glioma Cells. *Neoplasia* **9**, 777–787 (2007).
152. Rump, K. *et al.* Aquaporin 1 and 5 expression evoked by the  $\beta$ 2 adrenoreceptor agonist terbutaline and lipopolysaccharide in mice and in the human monocytic cell line THP-1 is differentially regulated. *Shock* **40**, 430–436 (2013).
153. Zelenina, M. Regulation of brain aquaporins. *Neurochem. Int.* **57**, 468–488 (2010).
154. Griffioen, A. W. & Molema, G. Angiogenesis: Potentials for Pharmacologic Intervention in the Treatment of Cancer, Cardiovascular Diseases, and Chronic Inflammation. *Pharmacol Rev* **52**, 237–268 (2000).
155. Balaji, A. B., Jamil, K., Ram, G. M. & Raju, G. S. Pluripotent lineage of CD133 stem cells isolated from human skin samples. *Indian J. Exp. Biol.* **51**, 107–115 (2013).

# ANNEXES

---

|   |     |
|---|-----|
| <b>ANNEXE 1 : PROTOCOLE D'ISOLEMENT DES CELLULES D'HI</b> .....         | 200 |
| <b>ANNEXE 2 : RESULTATS PRELIMINAIRES DES TESTS D'ANGIOGENESE</b> ..... | 208 |
| <b>ANNEXE 3 : PUBLICATIONS</b> .....                                    | 209 |
| <b>ANNEXE 4 : COMMUNICATIONS ORALES</b> .....                           | 209 |
| <b>ANNEXE 5 : POSTERS</b> .....   | 210 |

---



## Annexe 1 : Protocole d'isolement des cellules d'IH

### Isolation and culture of stem cells, pericytes and endothelial cells from infantile hemangioma biopsies

Priscilla Kaulanjan-Checkmodine<sup>1</sup>, Sorilla Prey<sup>1,2</sup>, François Moisan<sup>1</sup>, Maya Loot<sup>3</sup>, Alain Taieb<sup>1,2,4</sup>, Hamid Reza-Rezvani<sup>1,2,4</sup>

---

<sup>1</sup>INSERM U1035, University of Bordeaux, Bordeaux, France. <sup>2</sup>Adult and Pediatric Dermatology Service, Bordeaux hospital, Bordeaux, France. <sup>3</sup>Pediatric Surgery Service, Bordeaux hospital, Bordeaux, France. <sup>4</sup>Reference Center for Rare Skin Diseases, Bordeaux hospital, Bordeaux, France. Correspondence should be addressed to P.K.C. (priscilla.kaulanjan-checkmodine@u-bordeaux.fr) or H.R.R. (hamid.reza-rezvani@u-bordeaux.fr)

#### Abstract

Here, we present a protocol for the isolation of stem cells (SC), pericytes (PER) and endothelial cells (EC) from infantile hemangioma (IH) tissues. Studies showed that SC, PER and EC play a major role in IH progression. To understand the mechanism of the pathology, isolation, characterization and culture of these cell populations are highly desirable, but require the availability of purified cells. Previous approaches for isolation of these cells have predominantly required large amounts of tissue. In addition, the prospective isolation of SC, PER and EC is complicated by the fact that some IH samples are very small. Here, we describe the detailed procedures for isolation of pure populations of SC, PER and EC directly from IH samples using magnetic-activated cell sorting (MACS) with antibodies against CD133 (stem cells), CD34 (endothelial cells) and CD146 (pericytes). For this purpose, tissues are mechanically minced and digested enzymatically with collagenase and dispase. The cell-suspensions then are labeled with antibodies coated beads. This protocol takes ~6 hours, including dissection of the region of interest, enzymatic tissue dissociation and sorting. This protocol is optimized for human tissues but can also be adapted for use with other species. These cells can be viable and suitable for multiple downstream applications including *in vitro* experiments, and transcriptomic, proteomic and single-cell analysis.

#### INTRODUCTION

Infantile Hemangioma is a benign vascular tumor<sup>6</sup> appearing few days after birth. It is the most common tumor in infants (3-10 % of infants)<sup>2</sup>. IH is characterized by a rapid growth of blood vessels (proliferative phase) then a slow, spontaneous regression after 9-12 months of age (involution phase). 10 % require surgery or treatment by propranolol, depending on the IH

location and in case of vital threat or functional risk<sup>31</sup>. The origin and mechanism of IH growth are not understood and there is no satisfactory model to study this tumor. There is a strong need to find a model responding to propranolol treatment. Publications have suggested that SC, PER and EC may play a role in the IH pathophysiology<sup>18,19,51</sup>. Obtaining a pure population of these cells from IH tissues for the characterization of these cells is therefore highly desirable. However, ECs comprise only 1–2% of the total amount of cells in the tissue, and they are embedded in matrix components and tightly surrounded by PER<sup>154</sup>. This why it is important to set up a protocol allowing a good separation of these cells. ECs express a set of surface molecules like CD31 and CD34; PER express CD146, CD13, CD90 and SC express CD133 and CD45. These clusters of differentiation can be used to label and distinguish cells in complex cell populations<sup>51,155</sup>. In this protocol, isolation of cells is performed by making a single-cell suspension of the tissue by mechanical disruption and enzymatic digestion. Then cells are put in the presence of a specific antibody coupled to magnetic beads. Cells with the specific antigen will be bound by the antibody. Then the cell suspension is passed through a magnetic field and cells, which were bound by antibody coupled to bead, will be retained on the column. Finally the cells of interest can be collected.

## **MATERIALS**

### **REAGENTS**

#### **Isolation of cells**

- 70% (vol/vol) Ethanol (TechniSolv, cat. no. 83813.410)
- Sterile PBS (Eurobio, cat. No.CS1PBS01K BP) ▲ **CRITICAL** Store at 4 °C
- EDTA (0.5 M pH8) ▲ **CRITICAL** Store at 4 °C
- Human Serum Album 20 % (Vialebex 200 mg/ml)
- Collagenase (Sigma, cat. no. C9891)
- Dispase (Sigma, cat. no. P3417)
- NH<sub>4</sub>CL (Sigma, cat. cat. A-4514)
- Na<sub>2</sub>EDTA (0.1 M) (PlusOne, cat. no. 17-1324-01)
- KHCO<sub>3</sub> (Sigma,, cat. no. P9144)

#### **Antibodies**

- Anti-CD133 MicroBead Kit, Tumor Tissue, Human (Miltenyi, cat. no. 130-100-857)

- Anti-CD34 MicroBead Kit UltraPure, human (Miltenyi, cat. no. 130-100-453)
- Anti-CD146 MicroBead Kit, human (Miltenyi, cat. no. 130-093-596)

▲ **CRITICAL** Store at 4 °C

### **Culture of purified stem cells, pericytes and endothelial cells**

- Fibronectin human solution (Promocell, cat. no. C-43060) ▲ **CRITICAL** Store at 4 °C for up to several months.
- EGM-2 medium (EGM-2 BulletKit; Lonza, cat. no. CC-3162) ▲ **CRITICAL** Store at 4 °C for up to several months without growth factors.
- Pericytes growth medium (Promocell, cat. no. C-28040) ▲ **CRITICAL** Store at 4 °C for up to several months without growth factors.
- Falcon® Clear Flat Bottom TC-treated Multiwell Cell Culture Plate (24 wells; Dominique Dutscher, cat. No. 353047)

## **EQUIPMENT**

### **Dissection**

- 10-cm Petri dish (Dominique Dutscher, cat. no. 353003)
- Standard Fine forceps
- Scalpel

### **Cell suspension preparation and sorting**

- Refrigerated centrifuge with brake (Jouan, modele GR412) with holders for 50 ml and 15 ml Falcon tubes
- Cell strainer (70-µm, nylon; Falcon, cat. no. 352350)
- LS-Columns, 25 colonnes (Miltenyi, cat. no. 130-042-401)
- P1000 pipette (Gilson)
- P200 pipette (Gilson)
- P20 pipette (Gilson)

## **REAGENT SETUP**

▲ **CRITICAL** All solutions, including stock solutions, should be prepared under sterile conditions in a laminar flow hood to avoid contamination.

▲ **CRITICAL** The total volume of 0.5 M EDTA-20 % HSA in PBS solution should be calculated before the start of the protocol, as they will depend on the volume of the IH sample.

**Collagenase/dispase solution (5 X) for digestion** Prepare a 10 mg/ml collagenase/dispase digestion solution in PBS, make 0.5 ml aliquots, and store at -20 °C.

**PBS-EDTA buffer** Add 46,75 g EDTA in 250 ml H<sub>2</sub>O, adjust the pH to 8, sterilize the solution by autoclaving

**PBS-EDTA-HSA buffer** Add 2.5 ml of 20 % HSA in 100 ml of PBS-EDTA buffer

**Lysis buffer of red blood cells** Dissolve separately 8,3 g NH<sub>4</sub>Cl, 0.037 g Na<sub>2</sub>EDTA and 1 g KHCO<sub>3</sub> in distilled water (between 5 to 10 ml by powder) on ice, mix NH<sub>4</sub>Cl and Na<sub>2</sub>EDTA than add KHCO<sub>3</sub>, filter and complete to 1 L, adjust the pH between 7.3 and 7.5

**Endothelial medium (EGM-2 medium)** Add growth factors provided in the EGM-2 BulletKit per the manufacturer's instructions and add 1% penicillin–streptomycin to the EGM-2 medium. The medium can be stored at 4 °C and used for up to 2 weeks.

**Pericytes medium (Pericytes Growth medium)** Add growth factors provided in the pericytes growth medium per the manufacturer's instructions and add 1% penicillin–streptomycin to the medium. The medium can be stored at 4 °C and used for up to 2 weeks.

**Fibronectin coating of tissue culture plates** If endothelial cells and pericytes will be cultured after sorting, tissue culture plates should be coated with fibronectin just before sorting. Dilute fibronectin 1:100 (vol/vol) in 1× PBS. Cover the bottom surface of wells with diluted fibronectin and incubate the plate 1 hour at room temperature. Then, remove residual fibronectin solution. Fibronectin-coated tissue culture plates should be used within 2 weeks after preparation.

## PROCEDURE

### Reagent preparation

1. Clean all dissection tools with 70 % (vol/vol) ethanol and wipe them dry.
2. Prepare the working solution (PBS-EDTA-HSA buffer) as described in the Reagent Setup.

3. Pour ~10 ml of PBS-EDTA-HSA solution into a 10 cm Petri dish

### **Dissection of infantile hemangioma tissue**

4. Place the IH tissue in the 10 cm Petri dish and rinse it
5. Eliminate epidermis and fat
6. Isolate the region of interest

### **Tissue dissociation**

7. Mince the tissue into small pieces of  $\sim 1 \times 1$  mm in size (Fig. 1)
8. Prepare the collagenase/dispase solution by adding 0.5 ml of collagenase/dispase stock solution (5 X) to 4.5 ml of PBS-EDTA-HSA
9. Use fine forceps to transfer minced pieces in a 50 ml Falcon® tube filled with 5 ml digestion solution
10. Incubate between 30 min to 1h30, depending of the size of the tissue, at 37 °C with constant rotation.
11. After the enzymatic digestion is complete, pellet the tissue by centrifugation at 1000 rpm at 4 °C for 10 min, and discard the supernatant
12. *Optional* Do a lysis of red blood cells if needed, add 5 ml of lysis buffer, incubate 10 min at room temperature, then centrifuge at 1000 rpm at 4 °C for 10 min and discard the supernatant. Wash the pellet 3 times with PBS-EDTA-HSA
13. Resuspend the pellet in 10 ml of PBS-EDTA-HSA solution then triturate (pipette up and down) with a P1000 pipette.
14. Filter the cell suspension through a 70- $\mu$ m cell strainer
15. Determine cell number by enumeration

### **Stem cells sorting**

16. Pellet the cells by centrifugation at 1000 rpm at 4 °C for 10 min.
17. Discard the supernatant and resuspend the pellet in 300 $\mu$ l of PBS-EDTA-HSA solution per  $10^8$  total cells
18. Add 100  $\mu$ l of FcR Blocking Reagent and 100  $\mu$ l of CD133 MicroBeads per  $10^8$  total cells
19. Mix and incubate cells for 15 min at 4 °C without agitation.

20. Wash the cells by adding 2 ml of PBS-EDTA-HSA solution and then centrifuge at 1000 rpm at 4°C for 10 minutes
21. During the centrifugation, place column in the magnetic field of a suitable MACS Separator and prepare column by rinsing with 3 ml of PBS-EDTA-HSA solution
22. After centrifugation, discard the supernatant and resuspend the pellet with 500 µl of PBS-EDTA-HSA solution
23. Apply cell suspension onto the column. Collect flow-through containing unlabeled cells
24. Wash three times the column with 3 ml of PBS-EDTA-HSA solution
25. Remove column from the separator and place it on a suitable collection tube.
26. Pipette 5 ml of PBS-EDTA-HSA solution onto the column. Immediately flush out the magnetically labeled cells by firmly pushing the plunger into the column.

#### **Endothelial cells sorting**

27. On the negative fraction CD133- (unlabeled cells), repeat steps 16 to 27 with anti-CD34 microbeads

#### **Pericytes sorting**

28. On the negative fraction CD34- (unlabeled cells), repeat steps 16 to 27 with anti-CD146 microbeads

#### **Cell culture**

29. Centrifuge the fraction containing labeled cells at 1000 rpm during 10 minutes
30. Resuspend pellet with 500 µl adequate medium (EGM-2 medium for stem cells and endothelial cells, and pericytes growth medium for pericytes) at the desired concentration
31. Culture the cells on fibronectin-coated plate at 37 °C with 5 % CO<sub>2</sub>

#### **ANTICIPATED RESULTS**

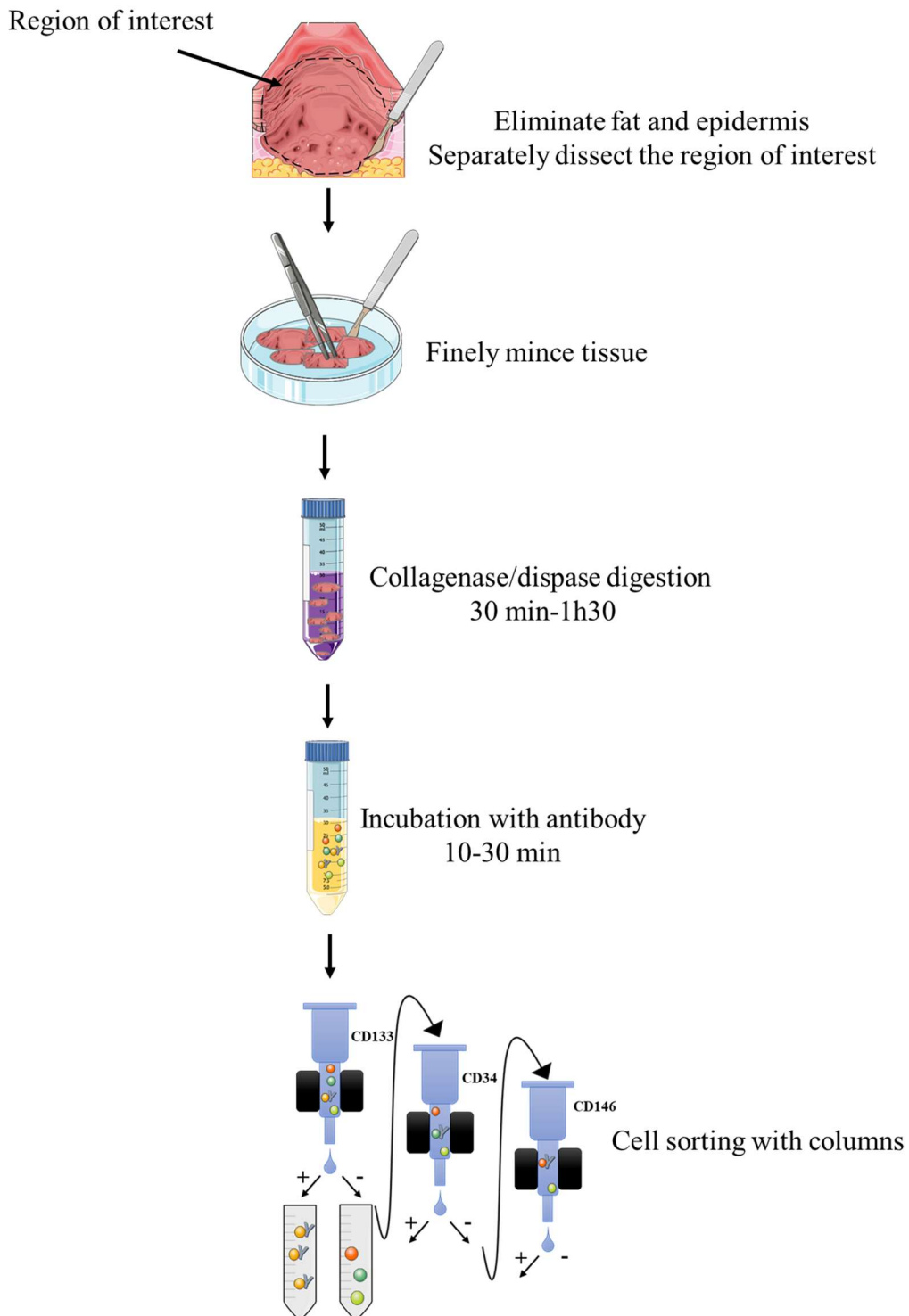
The protocol described here allows the purification of primary stem cells, pericytes and endothelial cells from infantile hemangioma biopsies, which can be used for diverse applications. This protocol allows a sorting with 90 % of purity. An important consideration in

this kind of sorting is that the final cell yield depends on the amount of starting sample. Moreover, FACS event number is often 10–30% higher than the actual cell number obtained. The approximate expected yield obtained, in our lab, from IH tissues is shown below:

| <b>Yield</b>                         | <b>IH stem cells</b> | <b>IH pericytes</b> | <b>IH endothelial cells</b> |
|--------------------------------------|----------------------|---------------------|-----------------------------|
| Mean number of cells                 | 94,373 ± 112,813     | 462,167 ± 349,194   | 375,783 ± 241,906           |
| Percentage (% whole digested tissue) | 0.31 % ± 0.26 %      | 2.72 % ± 1.25 %     | 2.99 % ± 0.94 %             |

## REFERENCES

1. Dasgupta, R. & Fishman, S. J. ISSVA classification. *Semin. Pediatr. Surg.* 23, 158–161 (2014).
2. Kanada, K. N., Merin, M. R., Munden, A. & Friedlander, S. F. A prospective study of cutaneous findings in newborns in the United States: correlation with race, ethnicity, and gestational status using updated classification and nomenclature. *J. Pediatr.* 161, 240–245 (2012).
3. Haggstrom, A. N. et al. Prospective study of infantile hemangiomas: clinical characteristics predicting complications and treatment. *Pediatrics* 118, 882–887 (2006).
4. Boscolo, E., Mulliken, J. B. & Bischoff, J. Pericytes from infantile hemangioma display proangiogenic properties and dysregulated angiopoietin-1. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33, 501–509 (2013).
5. Boye, E. et al. Clonality and altered behavior of endothelial cells from hemangiomas. *J. Clin. Invest.* 107, 745–752 (2001).
6. Khan, Z. A. et al. Multipotential stem cells recapitulate human infantile hemangioma in immunodeficient mice. *J. Clin. Invest.* 118, 2592–2599 (2008).
7. Griffioen, A. W. & Molema, G. Angiogenesis: Potentials for Pharmacologic Intervention in the Treatment of Cancer, Cardiovascular Diseases, and Chronic Inflammation. *Pharmacol Rev* 52, 237–268 (2000).
8. Balaji, A. B., Jamil, K., Ram, G. M. & Raju, G. S. Pluripotent lineage of CD133 stem cells isolated from human skin samples. *Indian J. Exp. Biol.* 51, 107–115 (2013).



**Figure 1:** Overview of protocol for purification of infantile hemangioma (IH) stem cells, pericytes and endothelial cells by magnetic-activated cell sorting. IH tissue is finely minced with a scalpel. The tissue is then digested with collagenase/dispase, and debris are eliminated by centrifugation. Finally, single-cell suspensions are incubated with antibodies coupled to magnetic beads, and pure populations of stem cells, pericytes and endothelial cells are collected.



## Annexe 2 : Résultats préliminaires des tests d'angiogénèse

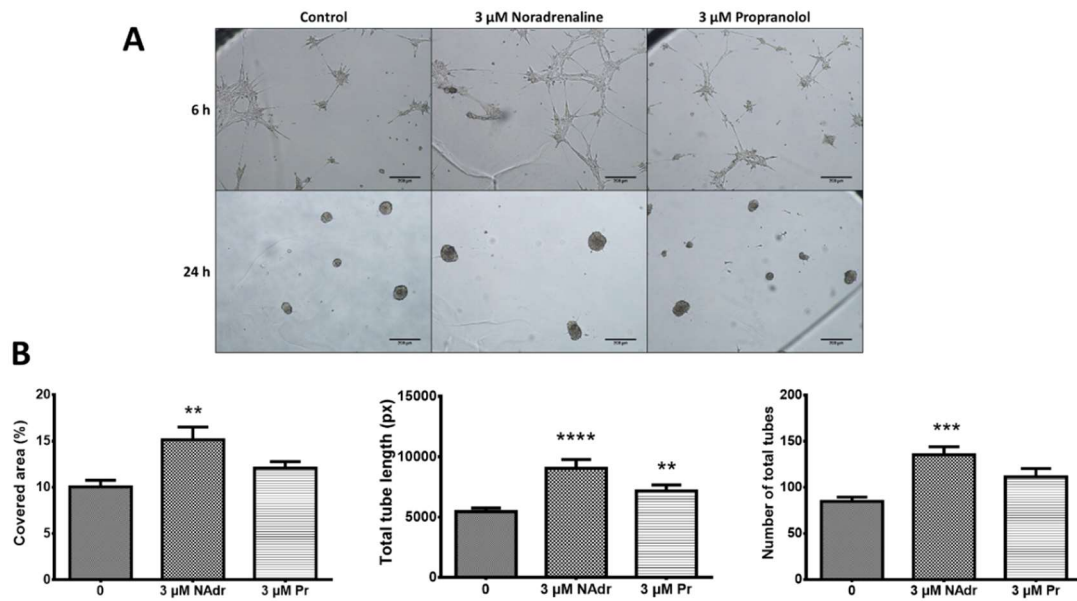


Figure 47 : La noradrénaline favorise la tubulogénèse par les cellules de prépuces. (A) Images des tubes formés par des cellules endothéliales et des péricytes de prépuces dans du milieu EGM2 (control) avec 3  $\mu$ M de noradrénaline (Nadr) ou 3  $\mu$ M de propranolol (Pr) pendant 6 et 24 heures. Echelle : 200  $\mu$ m (B) Quantification des paramètres d'angiogénèse à 6 heures (n=3 expérimentations, n=3 par groupe). (\*\*\*\* P < 0,0001, \*\* p < 0.01; les données sont représentées par la moyenne  $\pm$  l'erreur standard de la moyenne).

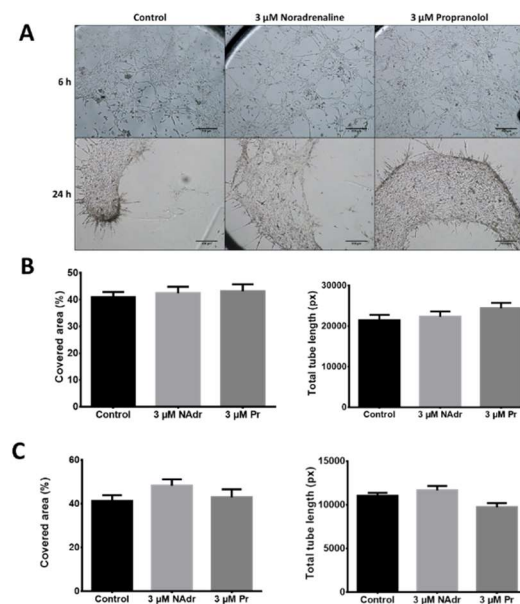


Figure 48 : La noradrénaline et le propranolol n'ont pas d'effet sur la tubulogénèse des cellules d'hémangiome congénital. (A) Images des tubes formés par les cellules endothéliales et des péricytes d'hémangiome congénital dans du milieu EGM2 (control) avec 3  $\mu$ M de noradrénaline (Nadr) ou 3  $\mu$ M de propranolol (Pr) pendant 6 et 24 heures. Echelle : 200  $\mu$ m (B-C) Quantification des paramètres d'angiogénèse (n=3 expérimentations, n=3 par groupe) à 6 (B) et 24 heures (C). (Les données sont représentées par la moyenne  $\pm$  l'erreur standard de la moyenne).

## Annexe 3 : Publications

**Priscilla Kaulanjan-Checkmodine**, François Moisan, Sorilla Prey, Etienne Gontier, Sabrina Lacomme, Maya Loot, Christine Léauté-Labrèze, Marijana Licina, Alain Taieb, Hamid Reza Rezvani. **High noradrenaline production by infantile hemangioma cells as the main target of propranolol efficacy**. Article en préparation.

François Moisan, **Priscilla Kaulanjan-Checkmodine**, Sorilla Prey, Benoît Rousseau, Marc Bonneau, Stéphane Claverol, Etienne Gontier, Sabrina Lacomme, Lea Dousset, Thierry Couffinhal, Jerome Toutain, Maya Loot, Muriel Cario-André, Christine Léauté-Labrèze, Alain Taieb, Hamid Reza Rezvani. **Aquaporin-1 reveals telocytes of infantile hemangiomas and is essential for the antitumor effect of propranolol *in vivo***. Soumis le 18 Septembre 2018.

## Annexe 4 : Communications orales

**Kaulanjan-Checkmodine Priscilla**, Moisan François, Prey Sorilla, Leauté-Labrèze Christine, Loot Maya, Licina Marijana, Imhof Beat, Rezvani Hamid, Taieb Alain. **Les péricytes des Hémangiomes Infantiles régulent la formation des vaisseaux *in vitro***. Congrès annuel de la recherche dermatologique (CARD), Bordeaux, France, 21-22 Juin 2018

François Moisan, **Priscilla Kaulanjan-Checkmodine**, Sorilla Prey, Maya Loot, Christine Léauté-Labrèze, Alain Taieb, Hamid Rezvani. **AQP1 joue un rôle clé dans la réponse au propranolol *in vivo***. Congrès annuel de la recherche dermatologique (CARD), Bordeaux, France, 21-22 Juin 2018

**Kaulanjan-Checkmodine Priscilla**, Moisan François, Prey Sorilla, Leauté-Labrèze Christine, Loot Maya, Licina Marijana, Imhof Beat, Rezvani Hamid, Taieb Alain. **Pericytes from the skin tumor named Infantile Hemangioma regulate**

**vessels formation *in vitro***. Journée des Jeunes Chercheurs, Bordeaux, France, 14 Juin 2018

François Moisan, **Priscilla Kaulanjan-Checkmodine**, Sorilla Prey, Maya Loot, Christine Léauté-Labrèze, Alain Taieb, Hamid Rezvani. **AQP1 plays a key role in propranolol response in vivo**. 22<sup>e</sup> workshop international de l'ISSVA, Amsterdam, Pays-Bas, 29 May-1<sup>er</sup> Juin 2018

**Priscilla Kaulanjan-Checkmodine**, Etude du mécanisme d'action à l'origine de l'efficacité du propranolol dans les hémangiomes infantiles, Concours Ma Thèse en 180 secondes, Talence, France, 2 Mars 2018

Alain Taieb, Sorilla Prey, François Moisan, **Priscilla Kaulanjan-Checkmodine**, Hamid Rezvani, Christine Léauté-Labrèze, 1<sup>er</sup> Symposium de recherche en Inflammation et Cancérologie Dermatologiques en Nouvelle-Aquitaine, Bordeaux, France, 20 Novembre 2018

## Annexe 5 : Posters

Moisan François, Nissen Johan, **Kaulanjan-Checkmodine Priscilla**, Prey Sorilla, Dufourcq Pascale, Couffinhal Thierry, Rezvani Hamid, Taieb Alain. **Mechanism of action of propranolol in Infantile Hemangioma: New insights from a xenograft model**. Congrès annuel de la Société européenne de recherche dermatologique (ESDR), Munich, Allemagne, 7-10 décembre 2016

**Kaulanjan-Checkmodine Priscilla**, Moisan François, Prey Sorilla, Rezvani Hamid, Taieb Alain. **Isolation and Identification of Infantile Hemangioma Cells**. Finaliste au concours de poster à la Journée de l'Ecole Doctorale, Bordeaux, France, 12 Avril 2017.

**Kaulanjan-Checkmodine Priscilla**, Moisan François, Prey Sorilla, Leauté-Labrèze Christine, Loot Maya, Licina Marijana, Imhof Beat, Rezvani Hamid, Taieb Alain.  
**Pericytes from Infantile Hemangioma regulate vessels formation in vitro.**  
1<sup>er</sup> Prix du flash poster à la Journée de la Fédération de Recherche TransBiomed,  
Bordeaux, France, 30 novembre 2017

## Isolation and Identification of Infantile Hemangioma Cells

Kaulanjan-Checkmodine P.<sup>1</sup>, Moisan F.<sup>1</sup>, Prey S.<sup>1,2</sup>, Rezvani H.<sup>1</sup>, Taieb A.<sup>1,2</sup>

1. INSERM U1035, 146 rue Léo Saignat 33076 Bordeaux  
2. CHU Pellegrin, Bordeaux

### INTRODUCTION

Infantile Hemangioma (IH) is a **benign vascular tumour** (4 % of infants) appearing few days after birth. IH is characterized by a rapid growth of blood vessels (proliferative phase) then a slow, spontaneous regression after 9 - 12 months of age (involution phase). 10 % require a surgery or a treatment by **propranolol**, depending on IH location and in case of vital threat or functional risk. The origin and mechanism of IH growth are not understood and there is **no satisfactory model** to study this tumour. There is a strong need to find a model responding to propranolol treatment. For that purpose, we have isolated relevant IH cells to set up an *in vitro* model.



### MATERIALS AND METHODS

This study was performed on patients operated at the Children's University Hospital of Bordeaux.

#### Cell culture

Endothelial progenitor cells (CD133+), endothelial cells (CD34+) and pericytes (CD146+) were isolated from IH as described on the right panel. The cells were cultured in fibronectin-coated culture dishes and maintained in Endothelial Growth Medium or Pericyte Medium at 37 °C with 5 % CO<sub>2</sub>.

#### Flow cytometry analysis

After sorting, a part of IH cell were incubated with fluorescent antibodies (anti-CD133, anti-CD34, anti-CD146) or isotype controls for 20 min at 4 °C in the dark. After washing, samples were analysed with BD Biosciences FACSCanto II flow cytometer and BD FACSDIVA software.

#### Immunocytochemistry

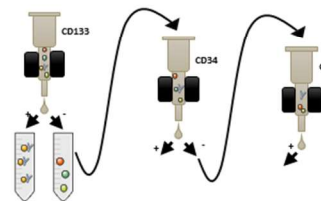
In order to check if isolated cells are the ones of interest, immunocytochemistry was performed with pericytes or endothelial specific markers. Cells were fixed with paraformaldehyde and stained with antibodies listed before. Then they were incubated with Alexa fluor secondary antibody and nuclei counterstained with DAPI. Placenta pericytes has been used as pericytes positive control, and Human Umbilical Vessel Endothelial Cells as endothelial cells positive control.

### Elimination of the skin and fat

#### Enzymatic digestion

#### Cell sorting

Magnetic-activated cell sorting (MACS)



### RESULTS

#### Flow cytometry analysis (Figure 1)

99.6 % of CD34+ and 96.2 % of CD146+ were isolated with this method. There are two CD34+ population. Both express VEGFR2 endothelial marker (data not shown). We hypothesize that these two populations are respectively of hematopoietic and endothelial origin.

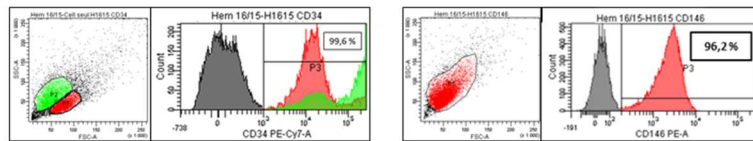


Figure 1 : Representative histograms of flow cytometry analysis of cells isolated from IH after sorting (CD34+ cells on the left, CD146+ cells on the right)

#### Cell culture (Figure 2)

CD133+ endothelial progenitor cells have a spindle form. CD34+ IH-endothelial cells differ from normal endothelial cells by their elongated form. They also have the capacity to form colonies. We termed them **endothelial colony-forming cells**. CD146+ pericytes show **cytoplasmic processes** (white arrow).

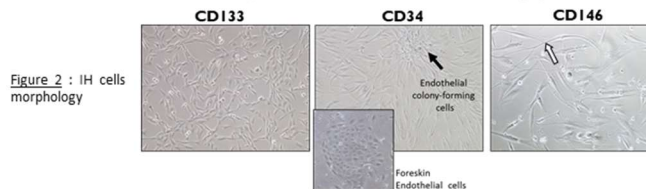


Figure 2 : IH cells morphology

#### Immunocytochemistry (ICC)

Pericytes are known to express CD146, PDGFR $\beta$ ,  $\alpha$ SMA and NG2. So these markers were used as positive controls and CD31 as a negative one. The same protocol was performed for CD133+ and CD34+ cells with other markers (data not shown). Figure 3 shows that IH-CD146+ isolated cells express pericytes markers. We could thus confirm that these cells are IH-Pericytes. Similar phenotypic confirmation was obtained with specific antibodies for IH-CD133+ and IH-CD34 cells. We concluded that cells isolated with this method are progenitor and endothelial cells.

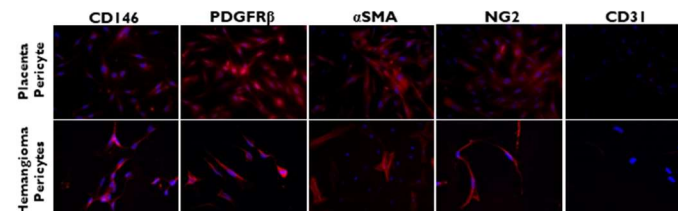


Figure 3 : IH-Pericytes characterization stained with for pericytes (CD146, PDGFR $\beta$ ,  $\alpha$ SMA, NG2) and endothelial markers (CD31)

### CONCLUSION

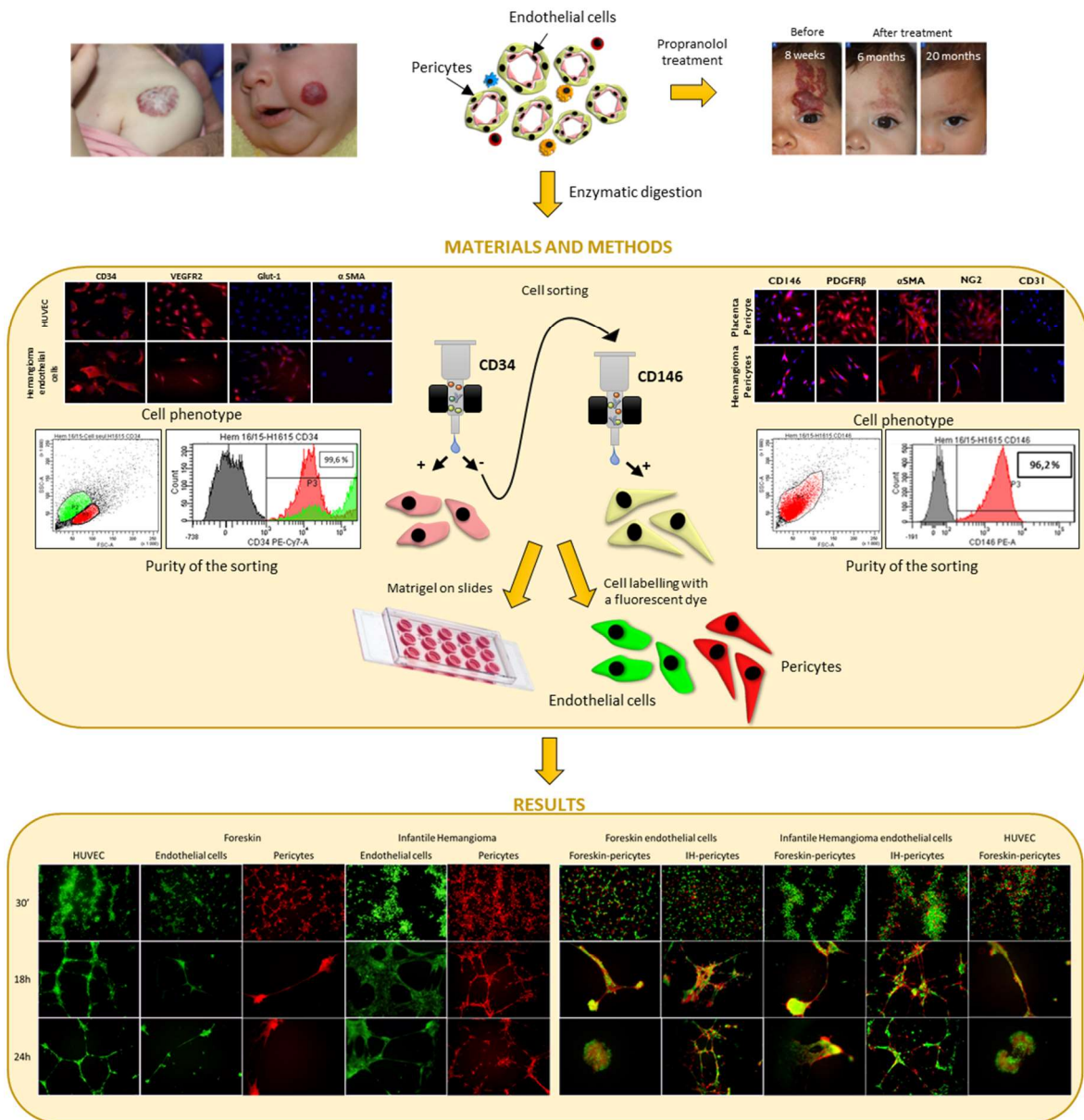
This protocol allows the isolation of three types of IH cells, with a **high rate of purification** (97.9 %). The cell type has been confirmed by ICC. We noted a difference between endothelial cells from IH and endothelial cells from children foreskin. IH endothelial cells form colonies because they have a high proliferative potential and the ability to form new vessels. The difficulty of this protocol is that the cells of interest are a small minority (0.32 %  $\pm$  0.28% for CD133+, 1.65 %  $\pm$  0.94 % for CD34+ and 2.09 %  $\pm$  1.25% for CD146+). So, it takes time to obtain enough cells for experiments. Moreover, there are some pitfalls, such as the expression of CD133 and CD34 by keratinocytes. So it is very important to remove epidermis before cell isolation. Our goal is to obtain an ***in vitro* IH model that will respond to propranolol**. However, culture conditions can change the behavior of cells, in particular response to drugs like propranolol.

Rezaei et al. Pericytes from Infantile Hemangioma Display Proangiogenic, Proapoptotic, and Dysregulated Angiogenesis-1, Anticancer Res, 2015; 35(10): 3686-3694.  
Sikse et al. Pericytes, Mesenchymal Stem Cells, and the Blood Vessels: Structure, Cells (2015)  
Lévesque-Leprieux et al. Propranolol for Severe Hemangiomas of Infancy: The First European Journal of Medicines (2016)  
Taieb et al. A Novel and Simple Method for Culturing Pericytes from Mouse Tissue: Microvascular Research (2015)

## Pericytes from Infantile Hemangioma regulate vessels formation *in vitro*

**Kaulanjan-Checkmodine P.<sup>1</sup>, Moisan F.<sup>1,2</sup>, Prey S.<sup>1,2</sup>, Leauté-Labrèze C.<sup>1,2</sup>, Loot M.<sup>3</sup>, Licina M.<sup>4</sup>, Imhof BA.<sup>4</sup>, Rezvani H.<sup>1,2</sup>, Taieb A.<sup>1,2</sup>**  
 1. INSERM U1035, 146 rue Léo Saignat 33076 Bordeaux, 2. Centre de référence maladies rares de la peau, CHU Pellegrin, Bordeaux, 3. Chirurgie Pédiatrique, CHU de Bordeaux, 4. Faculté de Médecine, Université de Genève, Geneva, Switzerland

Infantile Hemangioma (IH) is a **benign vascular tumour** (4% of infants) appearing a few days after birth. IH is diagnosed thanks to a positive staining of Glut-1 in endothelial cells. Normal endothelial cells do not express this marker. The tumour is characterized by a rapid and abnormal growth of blood vessels (proliferative phase) followed by a slow, spontaneous regression after 9 - 12 months of age (involution phase). 10% require surgery or a treatment by **propranolol**, depending on IH location and in case of vital threat or functional risk. The origin and mechanism of IH growth are not understood and there is no satisfactory model to study this tumour. IH-endothelial cells and IH-pericytes differ from normal cells by their high proliferation capacity. With a Transwell system, Boscolo et al. concluded that IH-pericytes have a role in proliferation and migration of endothelial colony forming cells. In this work, we investigated whether IH-pericytes have a role on tube formation using IH-endothelial cells (IH-EC) *in vitro*.



This protocol allowed the efficient isolation of endothelial cells and pericytes from IH tissues, with a **high rate of purification** (97.9%). The cell phenotype was confirmed by immunocytochemistry and flow cytometry. The difficulty of this protocol is that the cells of interest are a small minority (0.32% ± 0.28% for CD133+, 1.65% ± 0.94% for CD34+ and 2.09% ± 1.25% for CD146+). At confluency, we performed an angiogenesis assay. Our study demonstrated that **hemangioma cells (IH-Pericytes or IH-EC) are able to form vessels either alone or in co-culture with normal cells (respectively foreskin EC, foreskin pericytes)**. We also found that **pericytes from hemangioma seem to regulate tube formation in maintaining the vessel network**. In a next step, we will study with the angiogenesis assay the effect of propranolol on vessels formed by a mixture of hemangioma cells (pericytes and endothelial cells) *in vitro*.

Leauté-Labrèze et al., Propranolol for Severe Hemangiomas of Infancy. The New England Journal of Medicine (2008)  
 Leauté-Labrèze et al., Propranolol treatment of infantile hemangiomas: in vivo inhibition of proliferation, migration and differentiation of endothelial cells. British Journal of Dermatology (2008)  
 Taieb et al., Pericytes from Infantile Hemangioma Display Proangiogenic Properties and Cytoprotective Apoptosis-1, Annexin-A5, Thrombospondin, and Molecular Weight (2013)

Poster présenté à la Journée de la Fédération de Recherche TransBiomed, Bordeaux, France, 30 novembre 2017

## **ETUDE DU MECANISME D'ACTION DU PROPRANOLOL DANS LES HEMANGIOMES INFANTILES**

**Résumé :** Touchant près de 3 à 10 % des nouveau-nés, les hémangiomes infantiles (HI) sont des tumeurs vasculaires bénignes, les plus fréquentes chez les nourrissons. Les HI sévères sont actuellement traités par un bêtabloqueur, le propranolol, dont l'efficacité a été découverte de manière fortuite. Ainsi, son mécanisme d'action est méconnu. Le propranolol se fixe sur les récepteurs beta-adrénergiques et empêche leur activation par les catécholamines comme la noradrénaline. Nous nous sommes donc interrogés sur la relation entre le propranolol et la noradrénaline dans cette tumeur. Nous avons montré une forte expression de la noradrénaline et des enzymes de synthèse des catécholamines dans les HI, comparés aux hémangiomes congénitaux, qui diminuent lorsque la tumeur involue ou est traitée par le propranolol. Nous avons ensuite réalisé un modèle in vitro ressemblant à l'HI à partir de cellules isolées d'HI capables de synthétiser les catécholamines : les cellules endothéliales et les péricytes. Ce modèle nous permettra d'étudier l'impact de la noradrénaline et du propranolol sur ces cellules. Parallèlement, notre équipe a réalisé un modèle in vivo qui a permis de mettre en évidence le rôle clé de la protéine aquaporine-1 (AQP1) dans la réponse anti-tumorale du propranolol. Nous avons également étudié l'expression de l'AQP1 dans les HI et les hémangiomes congénitaux et découvert un type cellulaire adventitial exprimant l'AQP1 dans les HI, le télocyte. Au total, notre travail sur l'HI a mis en évidence d'une part une possibilité de production endogène accrue de noradrénaline, probablement antagonisée avec succès par le propranolol, et la découverte de télocytes AQP1+ qui pourraient avoir un rôle dans la spécificité de la réponse des HI au propranolol.

**Mots clés :** Hémangiome infantile, Angiogenèse, Noradrénaline, Propranolol, Aquaporine-1

---

## **STUDY OF THE MECHANISM OF ACTION OF PROPRANOLOL IN INFANTILE HEMANGIOMAS**

**Abstract:** Affecting nearly 3 to 10 % of newborns, infantile hemangiomas (HI) are the most common benign vascular tumors in infants. Severe HIs are currently treated with a beta-blocker, propranolol, whose efficacy was discovered by serendipity. Propranolol binds to beta-adrenergic receptors and prevents their activation by catecholamines such as noradrenaline. We therefore wondered about the relationship between propranolol and noradrenaline in this tumor. We showed a strong expression of noradrenaline and catecholamine synthesis enzymes in HI, compared to congenital hemangiomas, which decrease when the tumor involutes or is treated with propranolol. We then realize an in vitro model resembling HI from cells isolated from HI capable of synthesizing catecholamines: endothelial cells and pericytes. This model will permit to study the impact of noradrenaline and propranolol on these cells. At the same time, our team created an in vivo model that highlighted the key role of aquaporin-1 protein (AQP1) in the antitumor response to propranolol. We have also studied the expression of AQP1 in HI and congenital hemangiomas, and discovered an adventitious cell type expressing AQP1 in HI, the telocyte. Altogether, our work on HI has revealed firstly the possibility of increased endogenous production of norepinephrine, probably successfully antagonized by propranolol, and secondly the presence of AQP1 + cells which could have a central role central in the specificity of HI response to propranolol.

**Keywords :** Infantile hemangioma, Angiogenesis, Noradrenaline, Propranolol, Aquaporin-1

---