



HAL
open science

**Stress oxydant et transition
endothélio-mésenchymateuse : Optimisation d'un modèle
d'étude in vitro et impact de NOX1 & NOX 2 sur la
transition induite au cours du mélanome**

Valentin Platel

► **To cite this version:**

Valentin Platel. Stress oxydant et transition endothélio-mésenchymateuse : Optimisation d'un modèle d'étude in vitro et impact de NOX1 & NOX 2 sur la transition induite au cours du mélanome. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers, 2021. Français. NNT : 2021ANGE0055 . tel-03635148

HAL Id: tel-03635148

<https://theses.hal.science/tel-03635148v1>

Submitted on 8 Apr 2022

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.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE D'ANGERS

ECOLE DOCTORALE N° 605
Biologie Santé
Spécialité : *Pharmacologie*

Par

Valentin PLATEL

Stress oxydant et transition endothélio-mésenchymateuse : Optimisation d'un modèle d'étude *in vitro* et impact de NOX1 & NOX 2 sur la transition induite au cours du mélanome

Thèse présentée et soutenue à Angers, le 24/11/2021
Unité de recherche : U1066 MINT

Rapporteurs avant soutenance :

Céline Demougeot PU Université de franche-compté
Boris Manoury MCF HDR Université Paris-Saclay

Composition du Jury :

Président :	Karine Mahéo	PU Université de Tours (<i>à préciser après la soutenance</i>)
Examineurs :	Ludovic Martin	PU-PH Université d'Angers
	Isabelle Corre	CRCN CNRS Université de Nantes
Dir. de thèse :	Nicolas Clere	MCU-HDR Université d'Angers

L'auteur du présent document vous autorise à le partager, reproduire, distribuer et communiquer selon les conditions suivantes :



- Vous devez le citer en l'attribuant de la manière indiquée par l'auteur (mais pas d'une manière qui suggérerait qu'il approuve votre utilisation de l'œuvre).
- Vous n'avez pas le droit d'utiliser ce document à des fins commerciales.
- Vous n'avez pas le droit de le modifier, de le transformer ou de l'adapter.

Consulter la licence creative commons complète en français :
<http://creativecommons.org/licences/by-nc-nd/2.0/fr/>



REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le **Pr. Patrick Saulnier** pour m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein du laboratoire MINT. Je remercie également la **région Pays de la Loire**, ainsi que **la Ligue Contre le Cancer** pour avoir soutenu ce projet de thèse.

Je remercie chaleureusement **Céline Demougeot** et **Boris Manoury** pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse ainsi que **Isabelle Corre**, **Ludovic Martin** et **Karine Mahéo** pour avoir accepté d'évaluer mon travail.

J'adresse mes plus sincères remerciements à **Nicolas Clere** pour son encadrement au quotidien, mais surtout pour sa patience et pour son optimisme à toute épreuve. Ton approche du rôle de Directeur de Thèse a été très humaine et bienveillante, des qualités inégalables à mes yeux. La recherche mérite plus de personnes comme toi.

Je tiens également à remercier toutes les personnes qui m'ont aidé durant ces trois années **Adélie Mellinger** pour sa formation et l'ensemble de ses conseils avisés à la paillasse. Je lui souhaite tout le courage possible pour sa thèse. Merci également à **Audrey Griveau** pour tous ses conseils et pour le partage de son expérience. Une immense merci à **Catherine Guillet** pour toute son aide en cytométrie, et également pour sa bonne humeur communicative. J'adresse également de chaleureux remerciements à **Lydie Bonneau** pour son soutien, pour sa bonne humeur, et pour son incroyable force mentale qu'elle a su me transmettre.

Je tiens à remercier sincèrement l'ensemble des **membres de MINT** avec lesquels cela fut un plaisir de travailler pendant ses trois ans, ou à défaut, d'échanger le temps d'une pause. Un très grand merci à **Camille Savary** pour l'ensemble de ses conseils en culture cellulaire mais également pour tout son soutien ainsi que son humour (typiquement Caennais). Merci également à **Samuel Legeay** pour l'ensemble de ses conseils et pour son soutien notamment durant les expériences d'angiogénèse.

Je tiens à remercier chaleureusement mes collaborateurs les plus proches, collaboratrice en l'occurrence : Mille mercis à **Diane Lechevalier** pour toute son aide et pour les 6 mois passés au labo qui furent sans doute les 6 mois les plus joyeux de ma thèse, ta bonne humeur faisant passer les journées beaucoup plus vite. Je te souhaite une thèse (et un clinicat) aussi enrichissante et joyeuse que possible. Un très grand merci à **Clara Bourreau** pour tout son travail et son investissement incroyable. Je te souhaite le meilleur pour la suite, et je suis certain que tu deviendras une chercheuse exceptionnelle.

Je n'ai pas de mot assez fort pour remercier l'ensemble des doctorants que j'ai rencontré durant cette thèse. Un immense merci à **Claire** (la grande sœur du bureau) pour toute ta bienveillance (malgré Milad) et tes conseils. Un grand merci à **Kevin**, un exemple de rigueur, mais aussi de volonté ! **Hélène** (et **Gaïa**) pour ces mémorables soirées enfin entre geeks, et ces visionnages de Game of Thrones même si la dernière saison s'est vraiment mal terminée (Abdou ne s'en ai toujours pas remis). **Abdallah** à qui je n'ai qu'une chose à dire :

تفاسمنا نفس القتال جعلنا إخوة

« Au DD ». **Milad** buddy, I sincerely wish you the best for the years to come. I know you'll break a leg for your thesis defense and thank you for all those amazing moments (truth or dare maybe was a bit too much but I regret nothing 😊) Un immense merci également à **Flavien** pour sa bonne humeur presque surnaturelle (sérieux comment tu fais ?!) je te souhaite force et honneur (et bonheur ^^) pour la suite de ta thèse. A **Marie-Anne** également, je te souhaite tout le bonheur et la réussite possible ! Un très grand merci à **Heba** pour avoir été « la maman » du groupe, je te promets de ne pas trop protester la prochaine fois que tu veux me donner des gâteaux. **Norraseth**, where were you !?

Courage également **Pierre** pour la fin de ta thèse...tu verras, c'est pas si terrible.

Je souhaite également remercier l'ensemble des professeurs que j'ai eu tout au long de mes études. D'une façon ou d'une autre, vous m'avez tous légué quelque chose que je porterai toujours avec moi.

Une pensée émue pour ma grand-mère « **mamydine** » pour tout l'amour qu'elle m'a donné et tout le soutien qu'elle m'a transmis tout au long de mes études. Je sais qu'elle aurait souhaité être là pour en voir la fin.

Mes pensées les plus poignantes vont à **mes parents** qui m'ont soutenu plus que jamais dans cette épreuve. Je n'aurais clairement pas réussi sans eux, et ce magnifique « power trio » que nous formons since 1993.

Je remercie également très chaleureusement tous les membres de **ma famille** qui m'ont soutenu de près ou de loin, grâce à eux je ne me suis jamais réellement senti seul pendant ces trois ans.

Enfin, un remerciement spécial à ma famille de cœur qui suffit pour donner des couleurs et du reliefs à chaque jour. Un immense merci à **Castiel** et **Cédric** « la contre-soirée », à **Guillaume**, **Natacha**, **Marion** et **Benoit** pour être qui vous êtes et être exceptionnels au quotidien. Le simple fait de vous savoir à mes côtés a joué bien plus que vous ne pourriez l'imaginer, merci de tout cœur.

Un ultime merci à **Edouard**, mon frère depuis toujours. Tu es le Sam de mon Frodon, la réussite critique de ma campagne.

Sommaire

LISTE DES ABREVIATIONS

INTRODUCTION

1. La cellule endothéliale et l'endothélium

- 1.1. Structure de l'endothélium vasculaire
- 1.2. Fonctions de l'endothélium
 - 1.2.1. L'endothélium comme barrière vasculaire
 - 1.2.2. L'endothélium et le flux sanguin
 - 1.2.3. L'endothélium en réponse au stress mécanique
 - 1.2.4. L'endothélium en réponse au stress mécanique

2. Les cellules endothéliales dans le microenvironnement tumoral

- 2.1. Le microenvironnement tumoral
- 2.2. Le Système vasculaire comme acteur majeur du MET
- 2.3. L'angiogenèse tumorale
 - 2.3.1. L'hypoxie comme initiateur de l'angiogenèse tumorale
 - 2.3.2. Le VEGF comme inducteur de l'angiogenèse tumorale
 - 2.3.3. La germination angiogénique
 - 2.3.4. Le vaisseau tumoral : un vaisseau à l'endothélium anormal
 - a) La cellule endothéliale tumorale
 - b) Un développement hétérogène

3. Le métabolisme cellulaire

- 3.1. Le métabolisme énergétique
- 3.2. Le métabolisme des CE
 - 3.2.1. Métabolisme des NECs
 - a) La glycolyse comme apport énergétique principal
 - b) La glycolyse comme support de l'angiogenèse
 - 3.2.2. Métabolisme des TECs
 - a) Les cellules endothéliales tumorales sont hypoxiques, mais possèdent des mitochondries fonctionnelles
- 3.3. Les espèces réactives de l'oxygène et le stress oxydant
 - 3.3.1. Les mitochondries
- 3.4. Les NOXs
 - 3.4.1. Structure & Fonctions
 - 3.4.2. Les NOXs dans les cancers
 - 3.4.3. Les NOXs dans les CE

4. Les NOXs dans le mélanome

- 4.1. Epidémiologie du mélanome
- 4.2. Le mélanome et le stress oxydant
- 4.3. Implication des NOXs dans le mélanome

5. La transition endothélio-mésenchymateuse

- 5.1. Mécanismes généraux de l'EndMT et cancers
- 5.2. Revue : l'EndMT, son rôle dans la tumorigénèse, l'évasion métastatique et la résistance aux thérapies
- 5.3. EndMT & EMT : Les CAFs comme agents commun dans la tumorigénèse du mélanome

6. Conclusion et Objectifs

RESULTATS

1. Introduction

2. Matériels & Méthodes

- 2.1. Culture cellulaire et traitement
- 2.2. Test de blessure
- 2.3. Test de prolifération
- 2.4. Test de formation de capillaires sur gel
- 2.5. Western blot
- 2.6. Cytométrie en flux

2.7. Analyses statistiques

3. Résultats

3.1. Le traitement au TGF- β 2 active la voie de signalisation canonique Smad2/Smad3 dans un modèle de cellules HUVECs

3.2. La combinaison TGF- β 2+IL-1 induit une altération des caractéristiques endothéliales plus importante que le TGF- β 2 seul

3.3. Le traitement au TGF- β 2+IL-1 induit une plus grande augmentation des marqueurs protéiques mésenchymateux que le traitement au TGF- β 2 seul.

3.4. Article : NOX1 and NOX2 : Two enzymes that promote endothelial-to-mesenchymal transition induced by melanoma conditioned media

DISCUSSION GENERALE

1. Conception d'un modèle *in vitro* de l'EndMT

2. Etude du rôle des ROS produits par les NOX dans l'EndMT

3. Perspectives et conclusions

BIBLIOGRAPHIE

TABLE DES ILLUSTRATIONS

TABLE DES TABLEAUX

Liste des Abréviations

Acétyl-CoA	Acétyl-Coenzyme A
Ang II	Angiotensine II
ATP	Adénosine triphosphate
CCN2	connective tissue growth factor
CE	Cellules Endothéliales
CML	Cellules Musculaires lisses
CTE	chaîne de transport d'électrons
DPI	Diphenyliodonium
DLL4	Delta-Like 4
DUOX	doubles oxydases
ECE	enzymes de conversion de l'endothéline
ET-1	Endothéline-1
F2,6P2	fructose-2,6-bisphosphate
FAD	Flavin Dinucleotide Adenin
FGF	Fibroblast Growth Factor
FOXO1	Forkhead-box O1
H2O2	peroxyde d'hydrogène
HER2/3	Human Epidermal growth factor Receptor 2/3
HIF-1α	Hypoxia-inducible factor 1-alpha
HK2	Hexokinase 2
HMEC	Human Microvascular Vein Endothelial Cell
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
IL-1	Interleukine-1
LPS	lipopolysaccharides
L-NMMA	NG-Méthyl-L-arginine
MEC	Matrice Extracellulaire
MET	Microenvironnement Tumoral
MMP	Matrix Metalloproteinases
NOX	NADPH oxydases
NEC	Normal Endothelial Cells
NF-κB	nuclear factor kappa-B
NICD	Notch Intra Cellular Domain
NO	Monoxyde d'azote
NOS	NO Synthase
O$_2^{\cdot-}$	Anion superoxyde
OH\bullet	hydroxyle
PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PFKFB3	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3
PFK1	phosphofructokinase-1
PIGF	Placental Growth Factor

PGH2	Prostaglandine H2
PGI2	Prostaglandine I2
ROS	Reactive Oxygen Species
SOD	Super Oxyde Dismutase
SRE	Sterol Regulatory Element
SREBP2	Sterol Regulatory Element Binding Protein 2
TEC	Tumor Endothelial Cells
TGF-β	Transforming Growth Factor-Beta
UV	Rayons Ultraviolets
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VEGF	Vascular Epithelial Growth Factor
VEGFR-2	Vascular Epithelial Growth Factor Receptor-2
VHL	von Hippel-Lindau

Introduction

1. La cellule endothéliale et l'endothélium

1.1. Structure de l'endothélium vasculaire

L'endothélium vasculaire correspond à la paroi interne des artères, des capillaires et des veines. Il s'inscrit comme un composant de la paroi vasculaire elle-même composée de trois tuniques disposées de manière concentrique. On distingue depuis la cavité interne endoluminale vers la périphérie de l'artère : l'intima, la media et l'adventice. L'intima est la couche interne de la paroi artérielle. Elle est séparée de la media par la limitante élastique interne, épaisse de 40 à 80 μm , constituée de fibres élastiques. La media, couche moyenne, constitue la couche principale de l'artère. C'est un empilement concentrique d'unités lamellaires formées de cellules musculaires lisses (CML) et d'une matrice conjonctive (élastine, collagène et mucosaccharides). La media est séparée de l'adventice par la limitante élastique externe, constituée d'épaisses lames d'élastine percées de fenestrations, permettant le passage bidirectionnel de substances et de cellules. L'adventice, tunique externe, est constituée d'un tissu conjonctif basal, de fibroblastes, de cellules adipeuses et du *vasa* et *nervi vasorum*. L'importance de ces trois tuniques est variable selon le type de vaisseaux, et conditionne leurs fonctions (**Figure 1**).

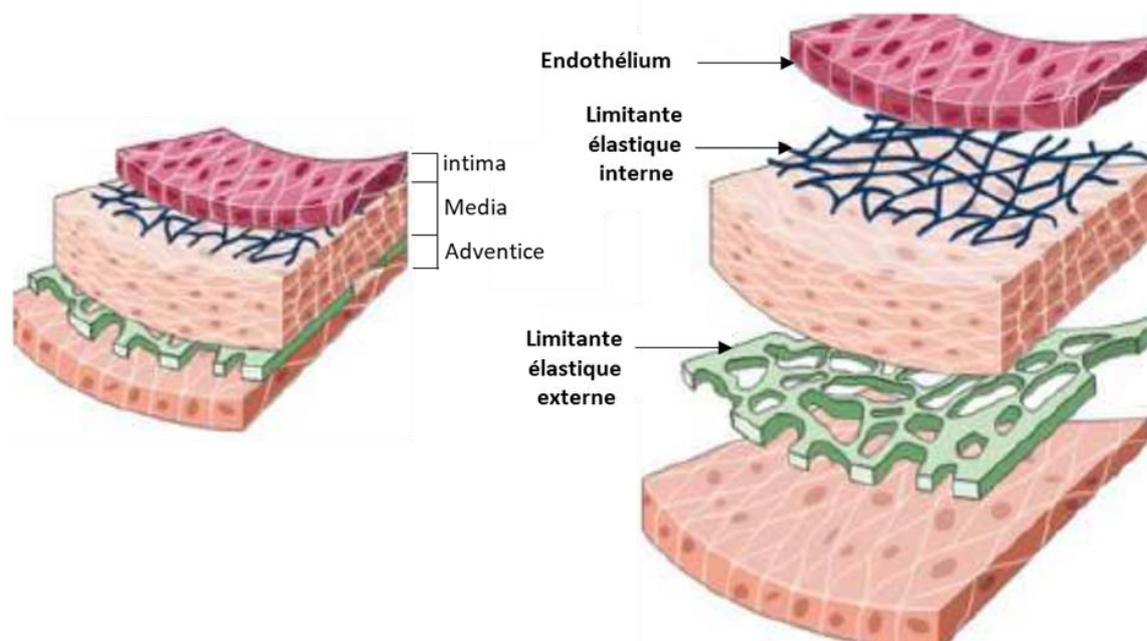


Figure 1: Structure de la paroi vasculaire d'après Mauge 2014

L'endothélium est une paroi constituée d'une monocouche de cellules endothéliales (CE) polarisées. Ces dernières ont été décrites comme étant fixées à une lame basale de 80 nm d'épaisseur. L'association des CE et de la lame basale constitue l'*intima* vasculaire, établissant une surface de contact avec le flux sanguin, estimée à une superficie combinée totale de 3000 à 6000 m^2 chez l'Homme, pour un total de 1 à 6×10^{13} CE (1,2). Lors de sa première description en 1865, cette monocouche était considérée comme une simple barrière inerte séparant les

globules sanguins et les tissus environnants. Depuis les années 1970, on lui reconnaît de nombreuses autres fonctions notamment mécaniques et sécrétrices détaillées dans ce chapitre

Les CE sont des cellules polarisées : leur membrane apicale est directement exposée au flux sanguin et aux cellules circulantes, tandis que la surface basolatérale est séparée des tissus environnants par une membrane basale composée de glycoprotéines et ancrée à la membrane cellulaire par les CE elle-même. La forme des CE varie le long de l'arbre vasculaire, mais elles sont généralement minces et légèrement allongées, elles mesurent entre 30 à 50 μm de longueur et 10 à 30 μm de large pour une épaisseur de 0,1 à 10 μm . En microscopie, elles apparaissent légèrement arrondies sous la forme d'un tapis de « gravillons » décrit comme des « *cobble-stone* ». Au sein du vaisseau sanguin, les CE sont orientées le long de l'axe du vaisseau afin de minimiser les contraintes de cisaillement exercées par le flux sanguin (3). De par le contact avec le compartiment sanguin, les cellules endothéliales sont en effet soumises à plusieurs types de stress mécaniques dont la préhension est intimement liée à leurs fonctions.

1.2. Fonctions de l'endothélium

L'endothélium assure une grande variété de fonctions, et ceci explique en partie le nombre important de pathologies dans lesquelles sont impliquées les CE. L'endothélium présente à la fois des fonctions mécaniques, paracrines (**Figure 2**) et endocrines en plus de son rôle primordial de barrière entre le compartiment sanguin et tissulaire. Il assure le contrôle du tonus vasculaire, de la migration transendothéliale des leucocytes, ce qui participe à la régulation de l'inflammation, de la perméabilité vasculaire et de la coagulation. Il joue également un rôle antioxydant et régule la croissance cellulaire. Ces fonctions sont, bien sûr, grandement influencées par la localisation des CE au sein de l'arbre vasculaire.

1.2.1. L'endothélium comme barrière vasculaire

La fonction de barrière exercée par les cellules de l'endothélium n'est pas uniforme. Les vaisseaux de grand diamètre (artères, veines, artérioles et veinules) conduisent le sang du cœur vers les organes et les tissus et inversement et ce, sans presque aucune perte de liquide sanguin ou de cellules en conditions physiologiques. Malgré une très grande variabilité de pression sanguine le long de l'arbre vasculaire, cette faible perméabilité est maintenue par l'endothélium (3).

Les capillaires, au contraire, sont des vaisseaux destinés à l'échange de fluides, de solutés et de matière condensée entre les compartiments intra- et extravasculaires (4). La perméabilité des vaisseaux de la barrière hémato-encéphalique est extrêmement faible, celle des artères et veines très faible et celle des artérioles et veinules très faible à faible (3-5). Une grande variabilité de perméabilité est également observée dans différentes régions capillaires. La pression exercée contre la paroi vasculaire est également un des paramètres gouvernant les échanges de fluides. Dans la plupart des capillaires, les valeurs de pression varient entre 0 et 25 mmHg. Cependant, dans des cas extrêmes, tels que les capillaires des glomérules des reins, la pression peut atteindre 50 mmHg augmentant ainsi le flux intermembranaire. Il existe également une grande variabilité dans les capacités de transport à travers les différentes couches endothéliales le long de l'arbre vasculaire. Alors que la plupart des capillaires permettent l'exportation et l'importation de plasma sanguin dans des conditions physiologiques normales, il existe un échange accru de fluides, de solutés et de matière condensée dans les capillaires des glomérules rénaux, grâce au processus de nanofiltration spécialisé.

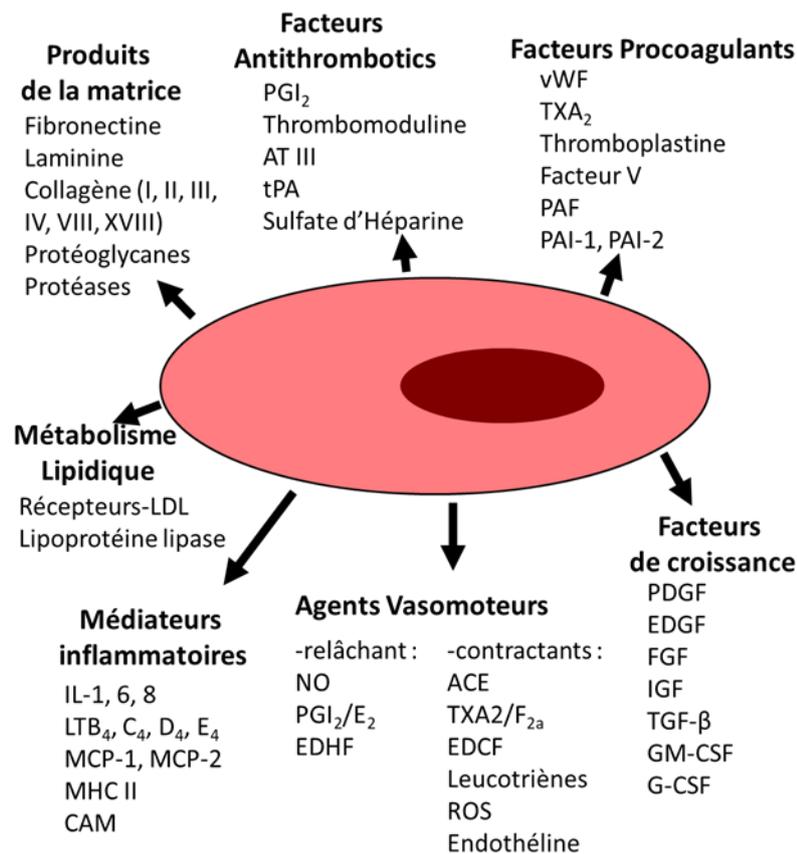


Figure 2 : Représentation schématique de l'activité de sécrétion de la cellule endothéliale agissant sur la physiologie vasculaire. D'après Sumpio *et al.* 2002. **AT III** : Antithrombine III ; **CAM** : Cell Adhesion Molecule ; **EDHF** : Endothelium-derived Hyperpolarizing Factor ; **FGF** : Fibroblast Growth Factor ; **G-CSF** : Granulocyte colony-stimulating factor ; **GM-CSF** : Granulocyte macrophage colony-stimulating factor ; **IGF** : Insulin Growth Factor ; **IL-1;6;8** : Interleukine ; **LT B4; C4; D4; E4** : Leukotriene ; **MCP-1;-2** : Monocyte Chemoattractant Protein ; **MHC II** : Major Histocompatibility Complex ; **NO** : Monoxyde d'azote ; **PAF** : platelet Activating Factor ; **PDGF** : Platelet Derived Growth ; Factor **PAI-1;2** : Plasminogen activator inhibitor ; **ROS** : Reactive Oxygen Species ; **TGF-β** : Transforming Growth Factor-Beta ; **tPA** : tissue plasminogen activator ; **TXA2** : Thromboxane A2

La variabilité du réseau vasculaire est également représentée par la structure générale de l'arbre vasculaire. La ramification vasculaire s'organise hiérarchiquement des artères vers le cœur en passant par les artérioles puis les capillaires. Inversement, depuis le cœur se succèdent les veines puis les artères. Cette hiérarchie peut être modifiée dans des réseaux vasculaires spécialisés. Dans les glomérules rénaux, par exemple, l'organisation vasculaire se complexifie avec une succession artérioles-capillaires-artérioles-capillaires-veinules. Il ne s'agit là que de quelques-uns des nombreux exemples de complexité du système vasculaire qui reflètent la variété des situations et des processus auxquels les CE sont confrontées dans des conditions physiologiques. Dans des conditions physiopathologiques, cette complexité devient exagérée.

1.2.2. L'endothélium et le flux sanguin

Les CE jouent également un rôle primordial dans la gestion du flux sanguin, notamment en exerçant un contrôle sur le tonus vasculaire, et donc, sur le diamètre des vaisseaux. Les CE, en coordination avec les CML, régulent le flux sanguin. Cette régulation se fait *via* l'interaction entre les CE et des agents vasoactifs ainsi que l'implication de l'endothélium dans le catabolisme de ces agents. L'endothélium joue un rôle important dans le contrôle du tonus vasculaire. Il participe à la vasodilatation notamment *via* la sécrétion de monoxyde d'azote (NO). Le NO est plus libéré lors de la stimulation, par exemple par l'angiotensine II, l'acétylcholine, l'histamine, la

bradykinine, l'acide arachidonique, les nucléotides d'adénine, etc., (6), joue également un rôle important dans le maintien d'un tonus basal (**Figure 3**). Cela a été démontré par la perfusion d'un inhibiteur de la NO synthase (NOS), comme l'acétate de NG-Méthyl-L-arginine (L-NMMA) entraînant une augmentation de la pression artérielle au repos (7). Le NO n'est pas le seul vasodilatateur qui dérive de l'endothélium : ce dernier génère également de la PGI₂ (Prostaglandine I₂), un eicosanoïde qui va venir relaxer les cellules musculaires lisses sous-jacentes *via* l'activation de l'adénylate cyclase avec génération ultérieure d'AMPc. Le PGI₂ est libérée de manière constitutive par les CE (8) et semble également être impliquée dans la régulation du tonus vasculaire au repos.

De façon opposée, l'endothélium produit également des facteurs vasoconstricteurs. Ces facteurs comprennent l'angiotensine II (Ang II), le thromboxane A₂, l'endothéline-1 (ET-1), la prostaglandine H₂ (PGH₂) et les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (**Figure 3**) (9–11). Parmi ceux-ci, l'endothéline est un puissant agent vasoconstricteur à effet durable. En 1988, l'endothéline, dérivée de l'endothélium, a été isolée du surnageant de culture cellulaire de CE porcines (12). La famille des endothélines est décrite comme constituée de trois peptides structurellement apparentés, ET-1, ET-2 et ET-3 (13). Dans le système vasculaire, la pro-endothéline est libérée de la surface basale des CE et convertie en endothéline mature de manière extracellulaire par des « enzymes de conversion de l'endothéline (ECE) » liées à la membrane. Apparemment, l'endothéline n'est pas stockée dans la CE, mais elle est synthétisée *de novo* en réponse à divers signaux chimiques (angiotensine II, cytokines thrombine, etc.) ou physiques (stress de cisaillement, hypoxie, etc.) (13,14) (**Figure 3**).

L'endothélium joue également un rôle essentiel dans le contrôle de l'inflammation. Ces fonctions comprennent l'augmentation de la perméabilité, la vasodilatation, l'augmentation de l'extravasation des leucocytes ainsi que le contrôle de la coagulation et de la formation de thrombus. Au repos, l'endothélium intact est principalement antithrombotique, cependant avec l'activation des CE par des facteurs inflammatoires, l'endothélium peut devenir pro-thrombotique. Plusieurs études *in vitro* ont identifié le TNF- α (*Tumor Necrosis Factor α*), l'endotoxine, l'interleukine-1 (IL-1) et la thrombine comme des agents inflammatoires capables d'activer la CE (3) :

1.2.3. L'endothélium en réponse au stress mécanique

En raison de leur emplacement stratégique, les CE sont capables de détecter les changements hémodynamiques et l'ensemble des signaux transmis par le sang et de réagir par la libération de substances vasoactives. Dans des conditions physiologiques, les facteurs de relaxation et de contraction sécrétés par l'endothélium sont à l'équilibre, de sorte que l'homéostasie vasculaire soit maintenue (15).

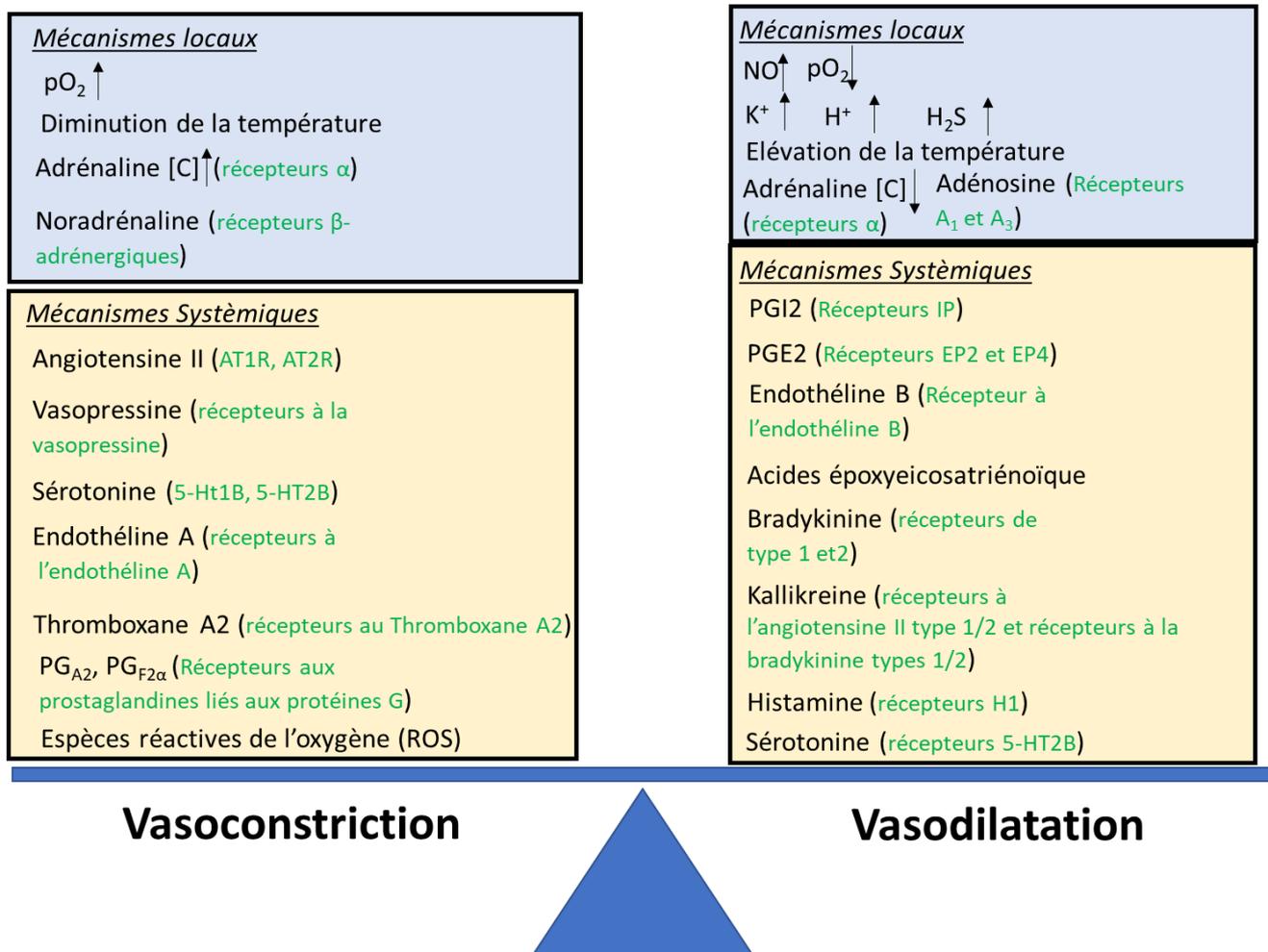


Figure 3: Schéma des facteurs agissant sur l'endothélium pour initier une vasoconstriction/vasodilatation. D'après Krüger-Genge *et al*, 2019

En plus des changements dans la morphologie cellulaire, la CE répond instantanément à des variations du flux sanguin par un changement de son activité électrochimique ainsi que par des changements de son expression génique. On observe ainsi une augmentation de la transcription du PDGF-B (*Platelet-derived Growth Factor B*) ou du TGF-β (*Transforming Growth Factor-beta*) en réponse à un stress mécanique élevé. D'autres gènes comme celui codant pour la protéines d'adhésion VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*) voient leur transcription être réduite par le stress mécanique (16,17).

L'endothélium est soumis à différentes forces mécaniques et hémodynamiques : (i) **les forces radiales** causées par la pression intravasculaire, (ii) **les forces tangentielles** dans la paroi vasculaire causées par l'équilibre entre les contacts cellule-cellule et la motilité vasculaire, et (iii) **les forces de cisaillement** provoquées par le frottement du sang circulant contre la paroi du vaisseau.

Des recherches antérieures ont identifié un complexe mécano-sensoriel localisé au niveau des jonctions cellule-cellule. Ce complexe est composé de PECAM-1 (*Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule*), de la VE-cadhérine, deux molécules d'adhésion impliquées dans les jonctions endothéliales intercellulaires, et du VEGFR-2 (*Vascular Epithelial Growth Factor Receptor-2*) qui est le principal récepteur au VEGF (*Vascular Epithelial Growth Factor*) dont le signal est essentiel à l'activation des CE. La présence de ce complexe est requise pour l'activation d'un certain nombre de voies de signalisation dépendantes du cisaillement (notamment la signalisation NF-κB (*nuclear factor kappa-B*)) médiant à la fois l'alignement cellulaire et l'activation de nombreuses voies favorisant

l'athérosclérose (18). Dans ce complexe, PECAM-1 est le principal mécano-transducteur stimulé par des forces externes pour initier la signalisation. La VE-cadhérine est présumée agir comme un adaptateur, et permet la translocation de VEGFR-2 vers PECAM-1 pour former un dimère, ce qui facilite la transactivation du VEGFR-2. Ce dernier, ainsi activé, recrute la PI3-kinase et médie l'activation de la protéine kinase B (Akt) et de eNOS (18,19). Ces observations ont conduit à la conclusion qu'un cisaillement élevé, typique des segments droits des artères, protège contre les *stimuli* athérogènes. En revanche, un faible débit, un flux oscillatoire ou d'autres modèles de flux qui impliquent des changements de direction et d'amplitude du flux, induisent un état pro-inflammatoire et pro-thrombotique. Il convient cependant de noter que plusieurs études ont fait le lien entre un stress de cisaillement important et l'altération du phénotype des CE. Ces dernières, soumises à un stress de cisaillement important, développent des caractéristiques de cellules musculaires lisses, notamment une expression de l'alpha-actine (α -SMA), contrairement aux cellules non stimulées (20,21).

1.2.4. L'endothélium en réponse au stress mécanique

Les cellules endothéliales physiologiques sont dans un état quiescent, non prolifératif. En cas de traumatisme, comme une blessure, les cellules endothéliales vont passer en état « activé » stimulant les mécanismes de coagulation, mais également de néovascularisation. Ces mécanismes de néovascularisation sont particulièrement importants dans le développement des cancers, les cellules tumorales et environnantes ayant un besoin accru en oxygène et en nutriment. Les CE « cancéreuses » sont soumises à un ensemble de stimulations intenses et ininterrompues provenant à la fois des cellules tumorales et des cellules du microenvironnement tumoral (MET) décrites dans le chapitre qui suit (22,23). Ces *stimuli* favorisent des processus physiopathologiques tels que l'angiogenèse mises en évidence par Judah Folkman au milieu des années 70 (24). Les CE, au-delà de leur activité angiogénique, vont jouer un rôle crucial au sein du MET dans la promotion du développement tumoral.

2. Les cellules endothéliales dans le microenvironnement tumoral

2.1. Le microenvironnement tumoral

Depuis une quinzaine d'année, l'importance du MET au cours de la tumorigénèse a été particulièrement étudiée et mise en avant (25,26). La croissance tumorale est désormais considérée comme un processus complexe qui implique la coopération de plusieurs types cellulaires résidents. L'influence des cellules tumorales, associées aux contraintes environnementales du microenvironnement (hypoxie, augmentation du stress oxydant, baisse du pH...) vont conduire à une altération de ces cellules résidentes et à un détournement de leurs fonction au profit de la tumeur (22,26). La tumeur n'est alors plus considérée comme un amas de cellules autosuffisantes, mais comme un organe composé de multiples types cellulaires interagissant ensemble (cellules endothéliales, fibroblastes, cellules immunitaire, cellules mésenchymateuses...) (26-28). Le développement de la niche tumorale en collaboration avec d'autre types cellulaires augmente le caractère malin de la tumeur en améliorant la survie

des cellules cancéreuses (29), en facilitant la dissémination métastatique (30) et en participant à l'acquisition de résistances aux thérapies antitumorales (31) (**Figure 4**)

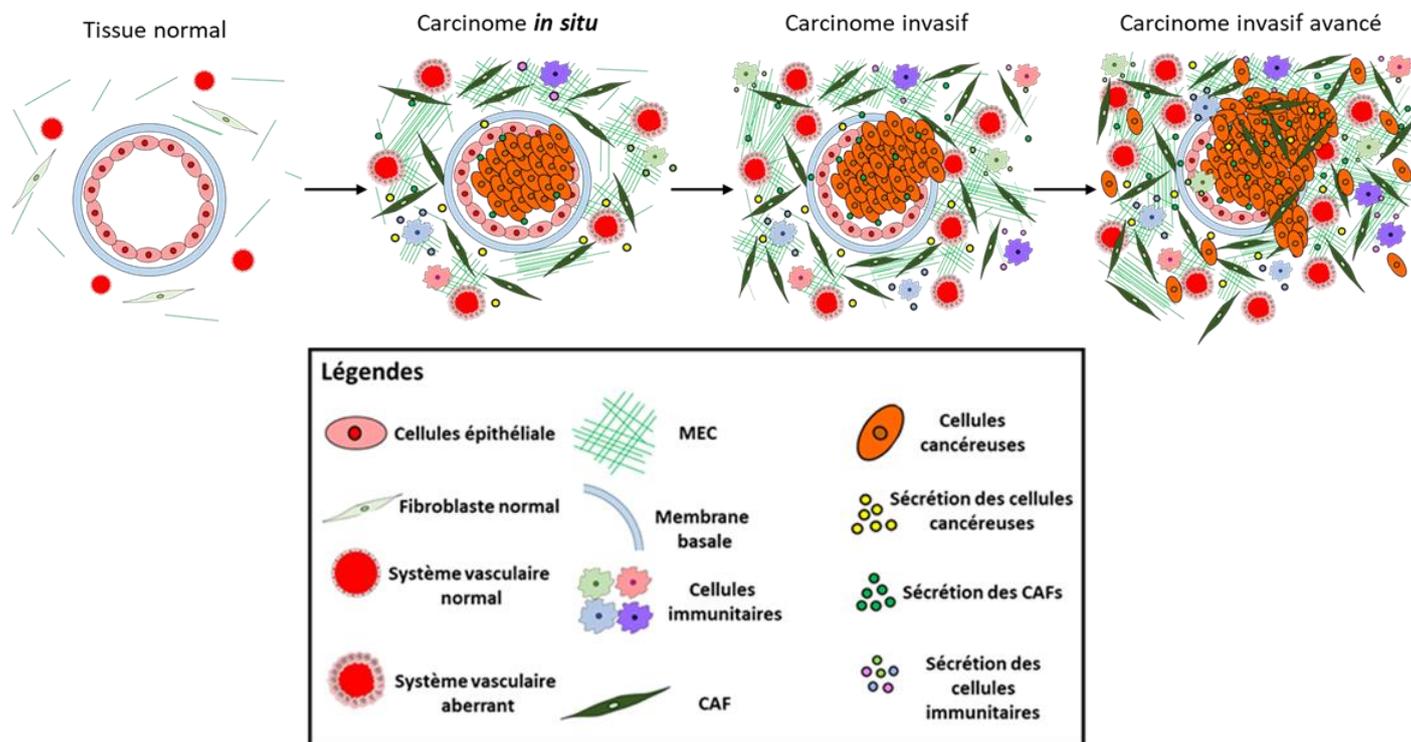


Figure 4 : Schéma de la progression tumorale avec emphase sur les cellules composant le stroma tumoral qui contribuent au développement de la tumeur. D'après Santi *et al.* 2018

2.2. Le Système vasculaire comme acteur majeur du MET

Le système vasculaire est crucial pour le développement de la tumeur, les cellules cancéreuses étant toujours en demande d'oxygène et de nutriments pour maintenir, entre autres, leur rythme de prolifération. Il est apparu, très tôt, que la vascularisation des tumeurs était une étape fondamentale à la poursuite de leur développement. Judah Folkman montre ainsi en 1974 que les tumeurs à croissance rapide sont fortement vascularisées, alors que les tumeurs dormantes ne le sont pas (24). Cette constatation a conduit à un nombre important d'investigation sur les mécanismes régissant la vascularisation cancéreuse et sur le développement de stratégie thérapeutique pour la diminuer et/ou la contrôler. L'angiogenèse (décrite ci-après) fait partie des mécanismes contrôlant la vascularisation tumorale et est régulée par un grand nombre de facteurs pro- et anti-angiogéniques. Lorsque ceux-ci sont en équilibre, le système vasculaire est au repos et les cellules endothéliales ne sont pas proliférantes. L'initiation de la formation de vaisseaux sanguins est induite lorsque la signalisation pro-angiogénique est dominante, un processus qui, dans les tumeurs, est désigné sous le nom de « switch angiogénique » (32).

Le développement de la vascularisation cancéreuse est complexe et peut passer par plusieurs voies aux mécanismes distincts. La pluralité de ces mécanismes souligne une fois de plus l'impressionnante plasticité des CE, caractéristique essentielle au bon maintien de ses fonctions physiologiques mais qui contribue également à complexifier ses implications en pathologie. Parmi, l'ensemble des mécanismes de vascularisation au sein du MET, la voie prédominante, et la mieux connue à ce jour est l'angiogenèse tumorale.

2.3. L'angiogenèse tumorale

2.3.1. L'hypoxie comme initiateur de l'angiogenèse tumorale

La formation physiologique de nouveaux vaisseaux sanguins se produit physiologiquement au cours du développement embryonnaire, du cycle menstruel, mais aussi de la cicatrisation. En temps normal, chez l'adulte les cellules endothéliales sont quiescentes et non proliférantes. Lors de l'initiation tumorale, les premières cellules cancéreuses bénéficient de l'apport en oxygène et en nutriment des vaisseaux sanguin environnants. Au fur et à mesure du développement tumoral, les cellules cancéreuses s'éloignent de plus en plus de la paroi vasculaire et se retrouvent rapidement en situation hypoxique. Cette hypoxie, va conduire les cellules tumorales à générer des médiateurs pro-angiogéniques, notamment le facteur de transcription HIF-1 α (*Hypoxia Induced Factor 1 alpha*) qui va jouer un rôle majeur dans l'initiation de l'angiogenèse tumorale. HIF-1 α est un facteur de transcription de la famille HIF possédant une sous-unité alpha dépendante de l'oxygène. Il est le principal responsable de l'activation de la réponse transcriptionnelle causé par l'hypoxie (33). En condition hypoxique, l'expression de HIF-1 α est stabilisée alors qu'il est normalement adressé vers le protéasome pour y être dégradé par la protéine VHL (*von Hippel-Lindau*) en normoxie. HIF-1 α va ainsi conduire à la transcription de facteur pro-angiogéniques cruciaux tels que VEGF, mais aussi le FGF (*Fibroblast Growth Factor*) et le PDGF (**Figure 5**) (34). Une fois sa transcription favorisée par HIF-1 α , c'est véritablement le VEGF qui va jouer le rôle d'initiateur dans l'angiogenèse.

2.3.2. Le VEGF comme inducteur de l'angiogenèse tumorale

La famille des « *vascular endothelial growth factors* » se compose de cinq protéines sécrétées, les VEGF-A (également appelé VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ainsi que du facteur de croissance placentaire (*Placental Growth Factor* ; PlGF).

Le VEGF est l'un des inducteurs le plus puissant de l'angiogenèse (35). Au cours du cancer, le VEGF est produit et sécrété par les cellules tumorales et le *stroma* environnant. Le VEGF va participer à la progression tumorale, à l'augmentation de la densité des vaisseaux, au caractère invasif de la tumeur, à la formation de métastases et à la récurrence tumorale (36). Pour assurer la formation des vaisseaux sanguins, la VEGF va principalement activer le récepteur VEGFR-2 (mais aussi VEGFR-3), récepteur à activité tyrosine kinase, exprimé, notamment, par les cellules endothéliales (23,37). L'activation de VEGFR-2 initie plusieurs voies de signalisation conduisant à des réponses endothéliales spécifiques telles que la survie cellulaire, la prolifération, la migration, l'invasion, la perméabilité et l'inflammation vasculaire (38).

Une coordination fine de ces processus cellulaires est nécessaire pour l'établissement réussi de nouveaux vaisseaux. Au cours de l'angiogenèse tumorale, le VEGF sécrété par les cellules tumorales induit la prolifération et la survie des cellules endothéliales principalement *via* les voies ERK et PI3K/Akt (39,40). La migration des cellules endothéliales en aval du VEGFR2 est induite par de multiples voies de signalisation, impliquant souvent la stimulation de PI3K et l'activation des Rho GTPases (23). De plus, l'invasion cellulaire médiée par le VEGF est favorisée par l'expression de métalloprotéinases (*Matrix Metalloproteinases* MMP) dont les isoformes MMP-2 et MMP-9 qui dégradent la membrane basale et la matrice extracellulaire permettant ainsi la migration de cellules endothéliales et la formation de nouveaux capillaires (40-42)

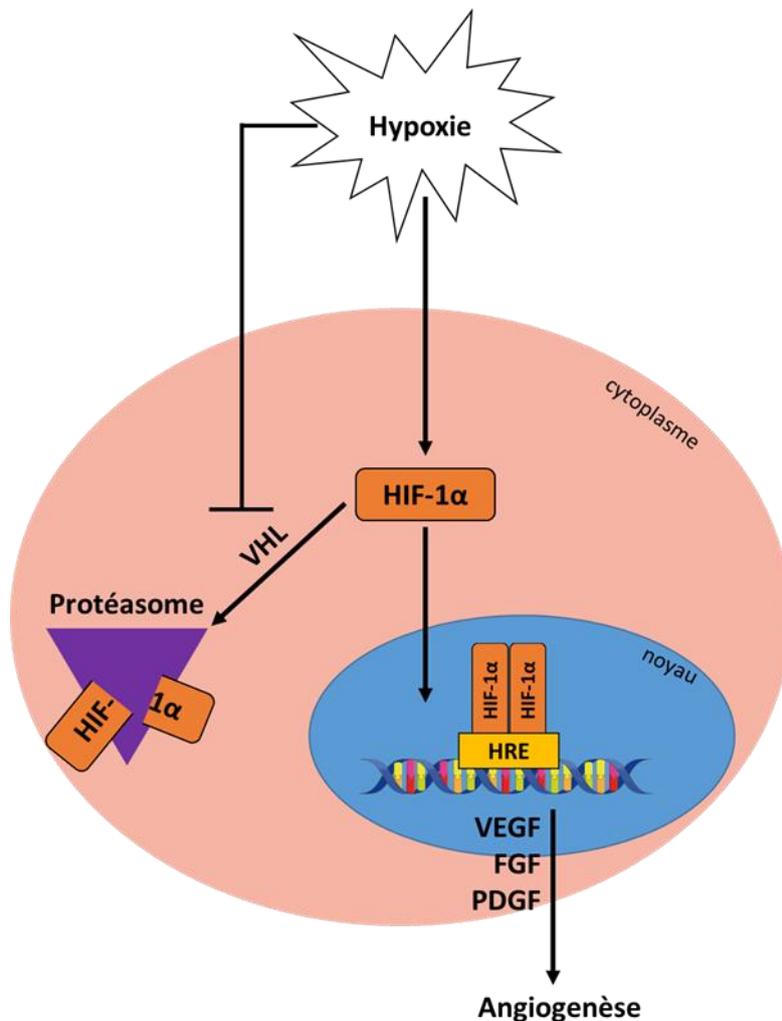


Figure 5 : Schéma du mécanisme de promotion de l'angiogenèse par le facteur HIF-1^α en situation hypoxique.

2.3.3. La germination angiogénique

L'angiogenèse se définit spécifiquement comme la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir du réseau vasculaire préexistant. Ce processus se découpe en trois étapes distinctes : (i) **la sélection de la cellule apicale** (*tip cell*) : une cellule issue du vaisseau parent qui va guider le processus de germination et va empêcher les cellules voisines d'adopter, elles-mêmes, un phénotype de cellule apicale (inhibition latérale), (ii) **l'extension** : la cellule apicale migre selon un gradient chimiotactique suivie par les cellules de soutien qui participent à la germination et, enfin, (iii) **la formation de la lumière endothéliale** lors de la connexion de l'espace luminal du vaisseau nouvellement formé avec celui du vaisseau parent.

En réponse à l'hypoxie, les cellules tumorales synthétisent du VEGF qui va venir stimuler les CE résidentes. Stimulées par le VEGF, les cellules apicales produisent le ligand au DLL4 (*Delta-Like 4*), du PDGF-B, ainsi que les récepteurs 2 et 3 au VEGF : VEGF-2 et VEGFR-3/Flt-4 (43,44). Le VEGF bloque la voie de signalisation Notch empêchant ainsi son action inhibitrice de l'angiogenèse. Notch agit par l'intermédiaire de son domaine intracellulaire NICD (*Notch Intra Cellular Domain*) comme un facteur de transcription qui va inhiber la germination induite par le VEGF (23,45). Le DLL4 sécrété par les cellules apicales, quant à lui, active la voie Notch dans les cellules endothéliales voisines, empêchant la formation de nouvelles cellules apicales. Ces effets sont associés à une inhibition de l'expression des VEGFR-2 et VEGFR-3 et une à induction de l'expression du VEGFR-1 qui se sert

de leurre inactif pour le VEGF (**Figure 6**) (46–48). Les cellules apicales génèrent de nombreux filopodes et acquièrent un phénotype extrêmement mobile et invasif. Elles sécrètent des protéines qui dégradent la matrice et guident la formation de nouveaux vaisseaux sanguins *via* un gradient de VEGF (49). Les cellules de soutien suivent les cellules apicales et se ramifient à partir du vaisseau parent, établissant ainsi la lumière vasculaire et les connexions jonctionnelles avec le germe en formation. Les jonctions peuvent ainsi se faire entre deux germes en formation (anastomoses « *head-to-head* ») ou entre une germination et un vaisseau préexistant (anastomose « *head-to-side* »).

Le VEGF mis à part, il existe une myriade d'autres agents pro-angiogéniques synthétisés par les cellules tumorales, ou par les cellules du MET avoisinant comme les fibroblastes associés aux cancers (CAFs) (22) ou les cellules immunitaires (23). On peut ainsi citer le FGF2 (*Fibroblast Growth Factor-2*), le PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*), les angiopoïétines ainsi que des chimiokines de la famille CXCL.

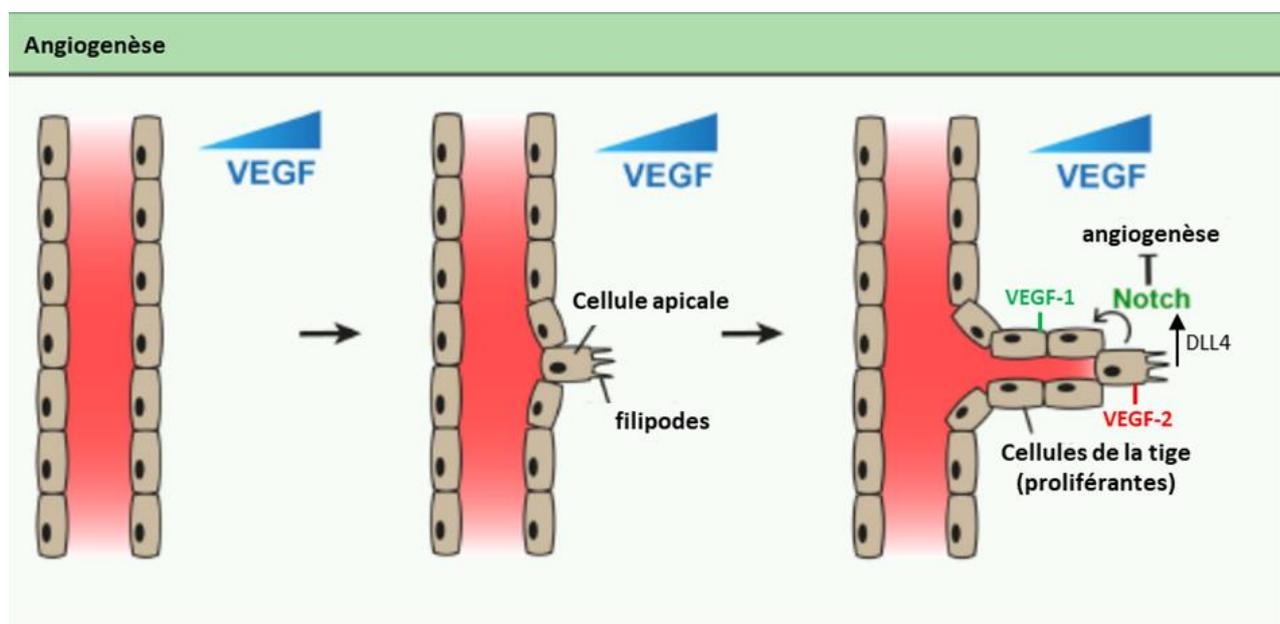


Figure 6 : Représentation schématique de la formation d'une germination angiogénique. D'après Hendriks *et al.* 2020
DLL4 : Delta Like 4 ; **VEGF-1** : Vascular Endothelial Growth Factor 1 ; **VEGF-R1** : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1

2.3.4. Le vaisseau tumoral : un vaisseau à l'endothélium anormal

Contrairement aux vaisseaux sanguins présents dans les tissus sains, les vaisseaux tumoraux, sont désorganisés, en nombre excessif et dysfonctionnels (50). En effet, en raison d'une stimulation pro-angiogénique extrêmement importante et ininterrompue, la vascularisation tumorale ne présente pas la hiérarchie organisée d'un lit vasculaire normal et comprend plutôt un réseau chaotique de vaisseaux structurellement et fonctionnellement défectueux (51). De plus, les vaisseaux tumoraux sont non étanches, tortueux et ont une lumière vasculaire irrégulière. Par conséquent, le flux sanguin est irrégulier et lent. Enfin, la barrière endothéliale fuyante, favorise l'échappement métastatique des cellules cancéreuses (30,52,53) (**Figure 7**).

Cette différence par rapport aux vaisseaux sanguins physiologiques se traduit au niveau endothélial, par la présence de CE présentant de nombreuses altérations par rapport à leurs homologues physiologiques.

a) La cellule endothéliale tumorale

Les CE associées au cancer (*Tumor Endothelial Cells* ; TECs) constituent une population cellulaire particulière du MET et présentent des différences notables par rapport aux cellules endothéliales saines (*Normal Endothelial Cells* ; NECs). Contrairement aux NECs, les TECs ont longtemps fait l'objet d'une caractérisation phénotypique et génotypique assez pauvre, notamment en raison de la grande difficulté à les isoler. Ces limitations ont été récemment levées grâce à l'émergence de technologies comme l'analyse « *single cell* » (scRNAseq) (54,55). Cette technique a permis de déterminer, avec plus de précision, le profil phénotypique des TECs, et de faciliter leur isolement afin de mieux comprendre les rôles qu'ils pouvaient jouer au sein du MET.

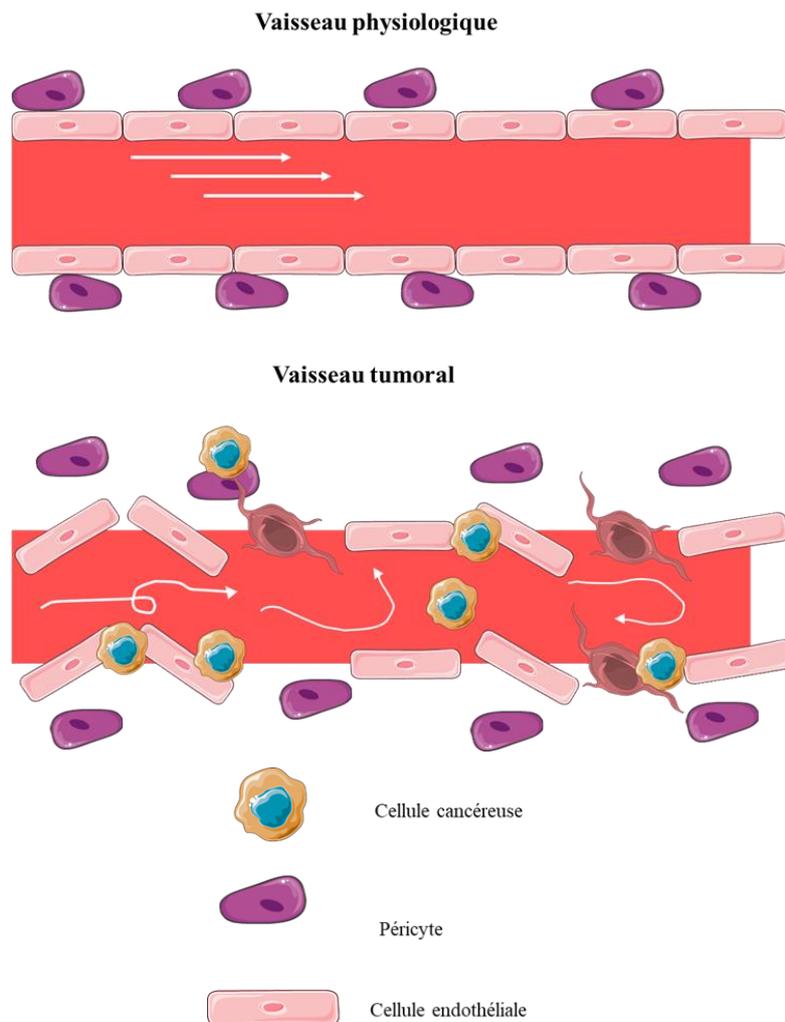


Figure 7: Schéma de la détérioration de la paroi vasculaire en situation tumorale

Les TECs présentent une morphologie altérée, comme une surface irrégulière, ainsi qu'une membrane fenestrée. Les jonctions intercellulaires avec les cellules avoisinantes (péricytes, par exemple) sont détachées ou inexistantes (56). Par ailleurs, les TECs peuvent s'organiser en de multiples couches à la différence de l'endothélium physiologique formé d'une monocouche de NECs (56). Le métabolisme énergétique des TECs est plus dépendant de la glycolyse aérobie productrice de lactate (effet Warburg) par rapport au métabolisme des NECs (57,58). Les TECs présentent également une augmentation de leur activité de transcription et de leur quantité d'ARN par rapport aux NECs (55) ainsi que des altérations géniques, avec notamment des anomalies

chromosomiques comme des aneuploïdies, des délétions, des translocations ou des centrosomes surnuméraires. Ces altérations sont potentiellement des conséquences de l'hypoxie à laquelle les TECs sont exposées ainsi qu'au stress oxydant généré par leur dérégulation métabolique (56).

En accord avec la capacité du MET à promouvoir l'angiogenèse, la croissance tumorale et l'invasion métastatique, les TECs sont également associées à un environnement de sécrétion particulier. Les facteurs les plus présents et les mieux décrits sont les membres de la superfamille des VEGF qui vont grandement participer à la reprogrammation génique des TECs (59,60). D'autres agents comme des cytokines (TGF- β , TNF- α) vont jouer un rôle important dans l'activation des TECs et dans l'initiation du processus métastatique. Maishi et coll ont ainsi récemment mis l'accent sur la relation étroite qui existe entre les TECs et les cellules tumorales dans le développement de métastases (60). Cette relation est multiple et passe par la génération de cytokines comme le FGF-4, mais aussi par des modifications épigénétiques et la protection des cellules tumorales circulantes contre l'anoïkis.

De façon intéressante, les analyses en *single-cell*, ont révélé que les TECs présentaient une considérable hétérogénéité non seulement inter-tumorale, mais aussi intra-tumorale. En effet, les profils d'expression des ARNs des TECs montrent d'importantes différences entre les patients mais également chez un même patient, il est possible de distinguer des TECs de phénotype différent. Tandis que ces données ont été obtenues sur un faible échantillon de patients, elles ont pu être confirmées sur un modèle murin. Dans ce dernier cas, les auteurs précisent que l'hétérogénéité des TECs est sans doute sous-estimée en raison, notamment, de la faible diversité génétique entre les animaux (54).

Une nouvelle fois, ces données soulignent l'importance capitale de la plasticité des TECs. Cette caractéristique nous rappelle qu'il est capital de la prendre en considération s'il on veut complètement mesurer l'impact de l'endothélium sur le développement tumoral et sur l'apparition de métastases.

b) Un développement hétérogène

L'angiogenèse n'est pas le seul processus assurant à la tumeur le bénéfice de nouveaux vaisseaux. Il existe d'autres processus physiopathologiques à l'origine de cette formation de vaisseaux. La vasculogenèse qui correspond à la génération de vaisseaux *de novo* (23,61,62), et l'intussusception (ou angiogenèse invaginale) qui correspondent à la formation d'un nouveau vaisseau à partir d'un vaisseau préexistant qui se sépare en deux à partir de sa lumière (63–65) (**Figure 8**).

Parmi les autres mécanismes à l'origine de la formation de vaisseaux, le mimétisme vasculaire, rapporté dans différentes tumeurs dont le mélanome, les gliomes ou les glioblastomes, a fait l'objet de nombreuses études ces dernières années. Ce processus se caractérise par la différenciation des cellules tumorales en cellules « *endothelial-like* », dans un environnement enrichi en facteurs de croissance angiogéniques. Ces cellules ainsi différenciées ont la capacité de s'organiser pour former des vaisseaux. Si pour certains auteurs, le mimétisme vasculaire est un processus, nouveau, à part entière de la vascularisation tumorale, il est, pour d'autres, très proche de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) qui sera discutée plus tard dans ce mémoire (66) (**Figure 8**).

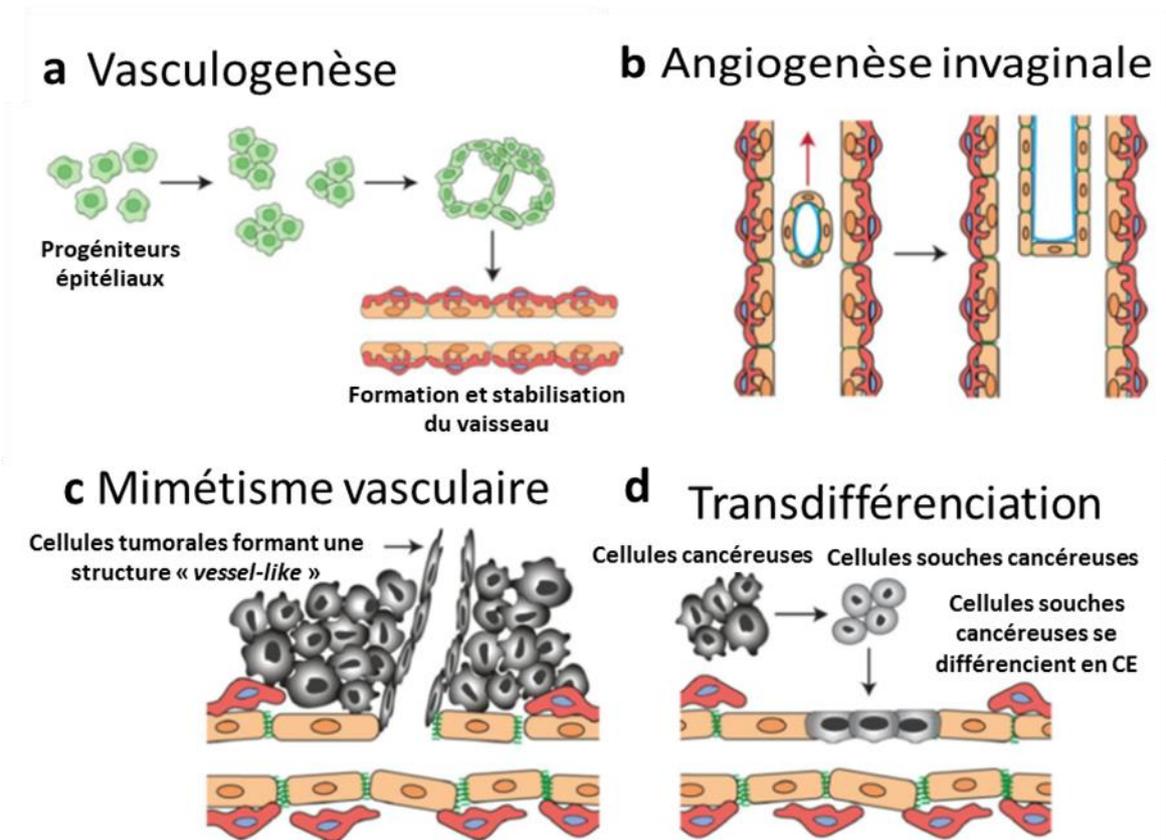


Figure 8 : Schéma des différents processus de synthèse de nouveaux vaisseaux au sein du MET. D'après Lugano *et al.* 2020

Ceci introduit, en plus de la plasticité des TECs, l'hétérogénéité de la composition de l'endothélium vasculaire comme un élément supplémentaire à la complexité de cet organe essentiel du MET (**Figure 9**).

Comme décrit plus haut, la vascularisation tumorale peut être initiée en réponse à l'hypoxie. Par ailleurs, la faible étanchéité de l'endothélium tumoral conduit à une augmentation de la pression interstitielle, ce qui diminue grandement la perfusion vasculaire et cause un flux sanguin intermittent (67). Ces deux processus conduisent à une transition du métabolisme des cellules endothéliales vers la glycolyse productrice de lactate ce qui contribue à l'acidification de l'espace extracellulaire (56,57). Il en résulte une diminution importante du pH qui conduit à une importante augmentation de la génération des ROS de la part des cellules tumorales et endothéliales.

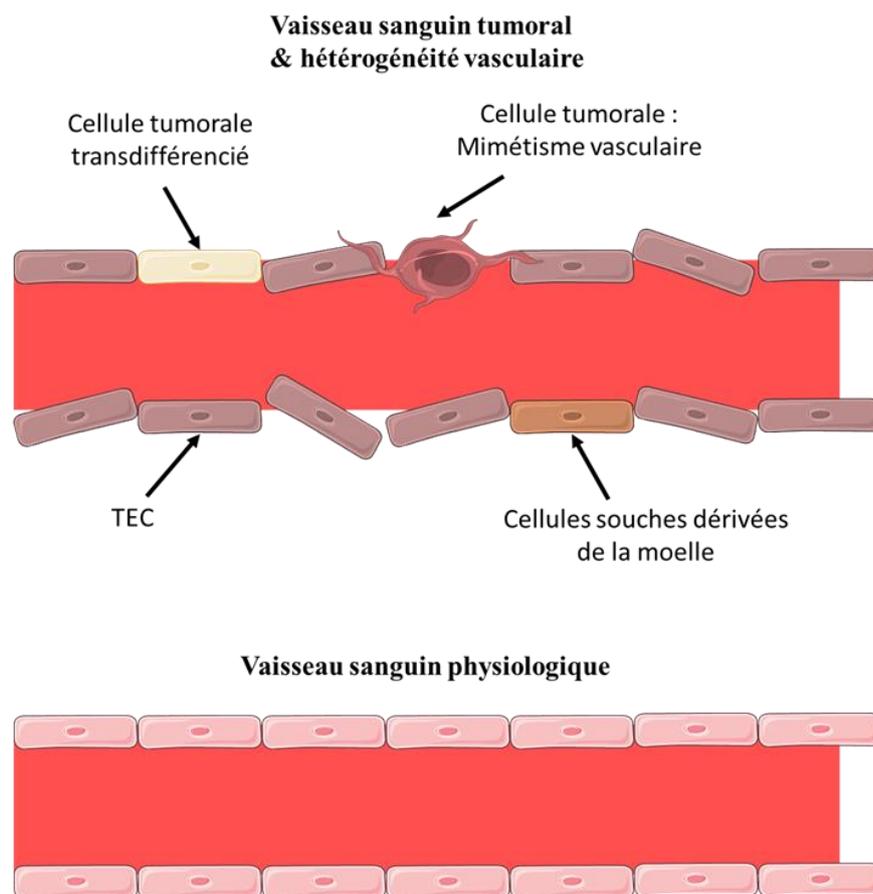


Figure 10 : Représentation schématique de l'hétérogénéité vasculaire dans la composition de l'endothélium en comparaison avec l'endothélium physiologique

3. Le métabolisme cellulaire

3.1. Le métabolisme énergétique

Parmi les caractéristiques (*hallmarks*) des cancers identifiées en 2001 par Hanahan et Weinberg puis actualisées en 2011 (50), on retrouve l'altération du métabolisme énergétique des cellules tumorales. Cette altération s'étend également au métabolisme des cellules du MET. Le rôle du métabolisme physiologique est de maintenir l'homéostasie cellulaire ce qui nécessite de produire de l'énergie principalement sous forme d'adénosine triphosphate (ATP). La molécule centrale du métabolisme énergétique est le glucose, qui est dégradé par le biais de différentes voies métaboliques : la glycolyse dans le cytoplasme, et le transfert dans la mitochondrie sous forme d'acétyl-Coenzyme A (Acétyl-CoA), ainsi que le cycle de Krebs (ou cycle des acides tricarboxyliques, cycle TCA) dans la matrice mitochondriale puis le long de la chaîne de transport des électrons. Cette dernière, couplée à l'ATP synthase, permet la production d'ATP à raison de 36 à 38 molécules d'ATP par molécule de glucose oxydée (**Figure 11.A**). Ceci constitue la voie principale de l'utilisation du glucose et permet d'atteindre un taux optimal de production d'énergie pour assurer l'homéostasie énergétique et entretenir des processus tels que le renouvellement protéique et la réparation de l'ADN. Les cellules cancéreuses, quant à elles, ont des besoins énergétiques et anaboliques très élevés du fait de leur activité de prolifération exacerbée. Pour se multiplier, elles requièrent de l'énergie, des acides aminés pour produire de nouvelles protéines, des nucléotides pour répliquer leur ADN ainsi que des lipides pour constituer leur membrane plasmique et organites cellulaires

Afin de répondre à leurs besoins énergétique et anabolique, la majorité des cellules cancéreuses présentent une augmentation de la prise de glucose, du flux glycolytique et de la production de lactate, et ce même en présence de dioxygène. Ce comportement particulier est indépendant de l'activité de la mitochondrie, et constitue un des dysfonctionnements métaboliques les plus répandus parmi les cellules tumorales. On l'identifie sous le nom de glycolyse aérobie ou effet Warburg (**Figure 11.B**) (68,69).

Bien qu'à première vue, le rendement énergétique de la glycolyse soit moins élevé que celui de la phosphorylation oxydative, la glycolyse aérobie présente un certain nombre d'avantages pour les cellules tumorales : en premier lieu, celle-ci est 10 à 100 fois plus rapide ce qui permet un apport rapidement mobilisable d'énergie et adaptable en fonction de la disponibilité du glucose et de la demande en ATP de la cellule (70). De plus, la prolifération cellulaire importante des cellules tumorales requiert non seulement de l'ATP mais aussi des nucléotides, des acides aminés et des lipides. Les intermédiaires métaboliques de la glycolyse peuvent servir de précurseurs pour générer ces molécules (71). Comme décrit précédemment, la vascularisation tumorale initiée par les cellules endothéliales présentes dans le MET étant altérée, l'effet Warburg permet aux cellules cancéreuses de survivre plus facilement dans un environnement hypoxique ou transitoirement hypoxique. Enfin, la forte production de lactate conduit à une baisse du pH intra-, puis extracellulaire *via* les transporteurs de monocarboxylate. Cette acidification a, à la fois des effets mutagènes et clastogènes en inhibant la réparation de l'ADN et participe ainsi à l'instabilité génétique caractéristique des cellules tumorales et des TECs (56,69).

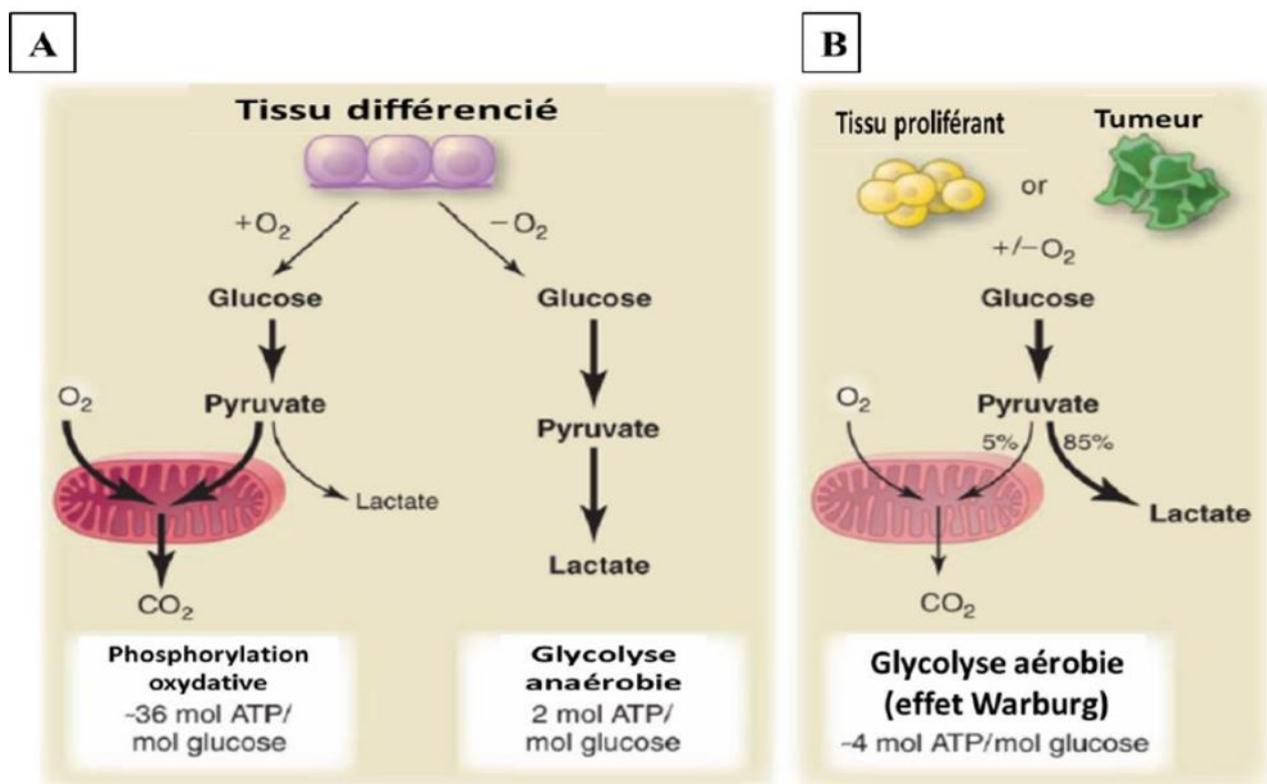


Figure 11 : Schéma du métabolisme énergétique physiologique (A) et de l'Effet Warburg (B). D'après Matthew *et al* 2009.

3.2. Le métabolisme des CE

Le métabolisme des cellules endothéliales est à l'image de ces dernières : éminemment plastique. Si le métabolisme cellulaire a été étudié depuis presque un siècle, celui des cellules endothéliales a reçu une attention

grandissante ces dernières années. Les cellules endothéliales présentent une grande variabilité dans leur orientation métabolique : alors qu'elles peuvent rester quiescentes durant des années, elles ont la capacité de rapidement passer à un état activé extrêmement proliférant et migrant en réponse à la stimulation par des facteurs de croissance comme le VEGF (23,58,72). Bien que l'implication exacte des variations métaboliques sur l'angiogenèse soit longtemps restée en suspens, des études montrent que le métabolisme glycolytique des CE joue un rôle central dans l'angiogenèse. L'activité glycolytique est ainsi, grandement favorisée par des facteurs de croissance initiateurs de l'angiogenèse comme le VEGF et le FGF-2 (57,73).

3.2.1. Métabolisme des NECs

a) La glycolyse comme apport énergétique principal

Le métabolisme glycolytique constitue la principale source d'énergie des cellules endothéliales. On estime que 85% de l'ATP consommé par les cellules endothéliales est le produit de la glycolyse, par la conversion de glucose en lactate. En comparaison à d'autres types cellulaires (comme la majorité des cellules épithéliales), les cellules endothéliales présentent un taux élevé de glycolyse et leur consommation de glucose est du même ordre que celui des cellules cancéreuses (58,73). Plusieurs éléments permettent d'expliquer cette particularité. Les CE disposent d'une source très proche d'oxygène par le flux sanguin. Cette proximité importante avec une réserve intarissable, mais aussi incontrôlable, d'oxygène pourrait conduire les CE à se tourner préférentiellement vers la glycolyse afin de se protéger du stress oxydant (57,74). Également, en s'appuyant sur le métabolisme anaérobie, les CE économisent de l'oxygène, ce qui améliore sa diffusion vers les cellules périvasculaires auxquelles il est destiné (74,75). De plus, lors de la germination angiogénique, les cellules apicales s'étendent dans des tissus éloignés du tissu vasculaire et donc hypoxiques. Dans ces tissus à faible concentration en oxygène, le métabolisme oxydatif ne constitue pas une approche énergétique performante. Enfin, comme mentionné précédemment, la glycolyse produit de l'ATP bien plus rapidement que la phosphorylation oxydative. Cette production rapide d'ATP est nécessaire à la revascularisation des tissus hypoxiques afin de les réoxygéner (73).

b) La glycolyse comme support de l'angiogenèse

L'angiogenèse est intimement dépendante de la glycolyse. Certaines enzymes sont particulièrement limitantes dans le bon déroulement de la glycolyse. Il s'agit notamment, de la 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3 (PFKFB3) qui permet la synthèse de fructose-2,6-bisphosphate (F2,6P2). Cette dernière est un puissant activateur allostérique de la phosphofruktokinase-1 (PFK1) qui constitue la dernière étape limitante de la glycolyse avant la synthèse de lactate (57,73). Enfin, l'hexokinase 2 (HK2), une autre enzyme cruciale de la glycolyse. Cette enzyme permet la conversion du glucose entrant en glucose-6-phosphate qui pourra ensuite être pris en charge par les enzymes de la glycolyse (76)

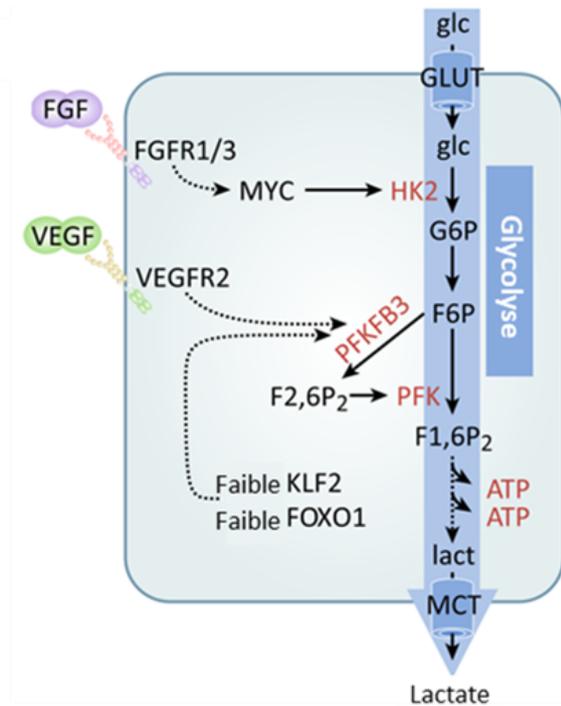
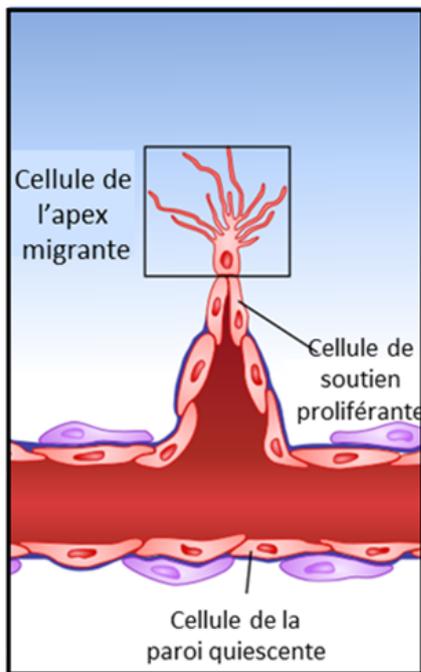


Figure 12 : Schéma du métabolisme glycolytique des CE en germination. D'après Rohlenova *et al* 2018

En l'absence de stimulation par le VEGF ou d'autres facteurs de croissance, le flux sanguin maintient les CE dans un état quiescent. Cela se fait en partie grâce à l'inhibition du métabolisme glycolytique *via* l'implication de différents médiateurs. PFKFB3, HK2 et d'autres gènes glycolytiques sont inhibés par l'activation du facteur de transcription KLF2 dont la production est activée par les contraintes de cisaillement (77). *Forkhead-box* O1 (FOXO1) est un autre facteur de transcription qui réduit indirectement la glycolyse en inhibant le facteur de transcription Myc qui promeut l'expression de l'HK2 (78).

Ainsi, lors de l'angiogenèse, le phénotype des CE est modifié et cela est associé à l'augmentation de leur fonction glycolytique (57,58,73). Les CE engagées dans un processus d'angiogenèse peuvent changer de localisation au sein de la pousse, en fonction de leur aptitude métabolique. Les cellules de soutien peuvent remplacer des cellules apicales lorsqu'elles expriment des niveaux plus élevés de PFKFB3 (et donc une plus grande glycolyse) (57,58). Ces niveaux augmentés de PFKFB3 peuvent s'expliquer par une stimulation par le VEGF. De même, il a été rapporté que l'isoforme 2 du FGF induit une augmentation de l'expression du facteur de transcription Myc qui va favoriser l'expression de l'HK2 et donc la glycolyse. (76) (**Figure 12**).

La réduction de la glycolyse, soit par inhibition pharmacologique, soit par *silencing* génétique de PFKFB3 a été mise en évidence sur des modèles *in vitro*, avec pour conséquence une altération de la prolifération et la migration des CE. *In vivo*, l'extinction de PFKFB3 altère la croissance et la ramification des vaisseaux de la rétine de souris et de poissons zèbres (73). De même, la réduction de la glycolyse par inhibition de HK2 réduit le développement artériel et la ramification dans la peau de souris, ainsi que la prolifération et le nombre de filopodes dans le système vasculaire rétinien (76). L'ensemble de ces données souligne l'importance de la glycolyse dans le contrôle de l'angiogenèse et dans le devenir (cellules apicales/cellules de soutiens) des CE au cours de ce processus.

3.2.2. Métabolisme des TECs

Comme développé précédemment, l'endothélium tumoral est désorganisé et fonctionnellement défectueux (23,45,51,56). Les nombreuses fenestrations et les difficultés de perfusion conduisent à un flux sanguin irrégulier qui favorise l'hypoxie dans les tissus tumoraux. Ce manque d'oxygène associé à une pression mécanique plus importante, conduit les TECs à adapter leur métabolisme par rapport aux NECs.

a) Les cellules endothéliales tumorales sont hypoxiques, mais possèdent des mitochondries fonctionnelles

Les TECs reposent, encore plus que les NECs, sur la glycolyse pour leur production d'ATP et présentent un phénotype hyperglycolytique, mis en évidence par une expression accrue du transporteur de glucose GLUT1 et de l'activateur glycolytique PFKFB3 (79,80). De plus, par rapport aux NECs, les TECs suractivent les voies de biosynthèse des pentoses phosphates et de la sérine, utilisées pour la synthèse des nucléotides et de leur biomasse (79) (**Figure 13**). Plusieurs signaux présents dans le MET comme l'hypoxie et les cytokines pro-inflammatoires (56,79) régulent positivement PFKFB3 (57).

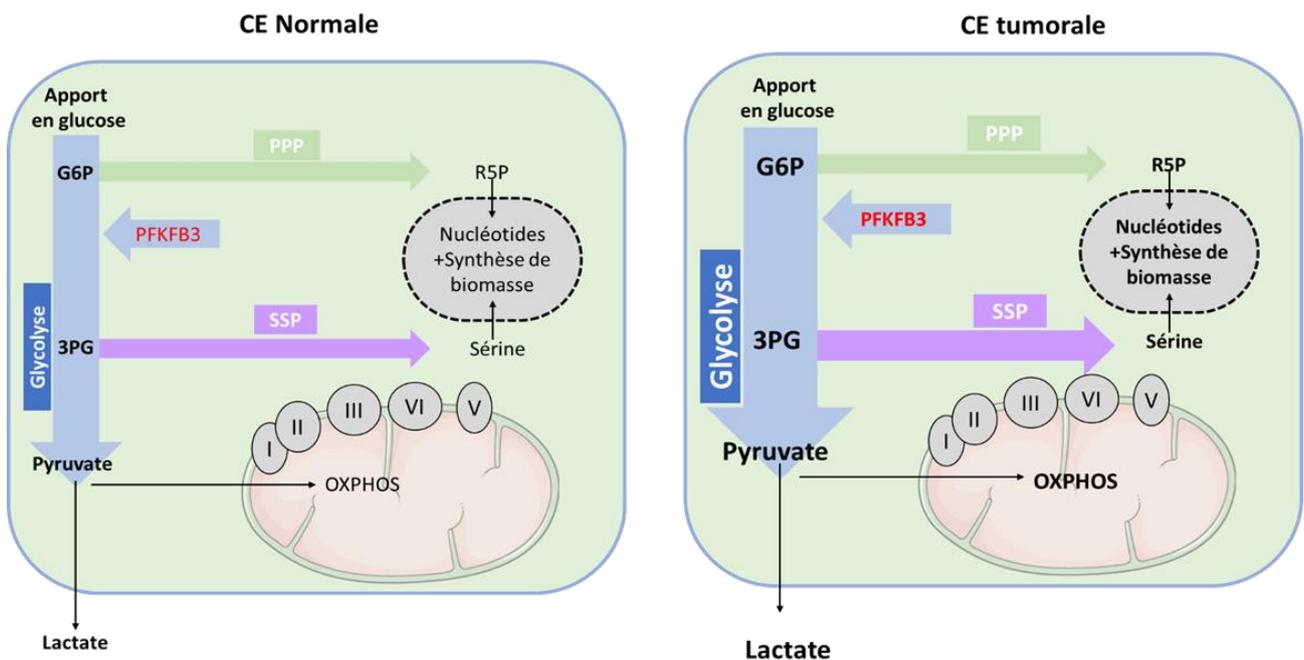


Figure 13 : Schéma de la réorganisation du métabolisme énergétique dans les CE tumorales par rapport aux CE physiologiques. D'après Rohlenova *et al* 2018

Ces observations pourraient avoir des implications pour le traitement des cancers. En effet, diminuer la glycolyse dans les TECs en restreignant la fonction de PFKFB3 permet d'inhiber leur prolifération et de diminuer, également, l'échappement des cellules tumorales et donc le processus métastatique (73,80). Par ailleurs, une inhibition de PFK3B contribue à normaliser la barrière vasculaire et à restaurer la perfusion (79), améliorant ainsi la distribution d'agents cytotoxiques et donc la prise en charge des cancers.

Bien que la glycolyse leur soit cruciale, les TECs conservent des mitochondries fonctionnelles (81). Une phosphorylation oxydative active assure non seulement une plus grande flexibilité aux TECs, leur permettant d'utiliser d'autres substrats pour leur production d'énergie, mais fournit également des métabolites pour la synthèse de biomasse. Ceci contribue à soutenir la prolifération des TECs (57). En conséquence, l'inhibition de la

respiration mitochondriale pourrait ralentir la prolifération des TECs et faciliter leur mortalité de façon bien plus importante que pour les CE quiescentes (82–85). Les mécanismes exacts à l'origine de la mort cellulaire des TECs en réponse à une inhibition complète de leur activité mitochondriale nécessitent des investigations plus poussées. Il est suggéré que ces processus impliquent la génération de ROS, ainsi que le découplage du potentiel membranaire (57).

3.3. Les espèces réactives de l'oxygène et le stress oxydant

Les ROS sont des molécules à courte durée de vie contenant des électrons non appariés, formées par la réduction partielle de l'oxygène moléculaire. Elles sont composées de dérivés radicalaires de l'oxygène hautement instables, comme, l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et l'hydroxyle (OH^{\cdot}) qui peuvent être rapidement convertis en agents non-radicalaires plus stables et capables de diffuser librement comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'acide hypochlorique. (86–88). Physiologiquement, les ROS jouent le rôle de seconds messagers et participent à l'homéostasie cellulaire. Il existe une balance constante entre la génération de ROS et la régulation de ces espèces au sein de la cellule.

Une augmentation des niveaux de ROS intracellulaires présente deux effets potentiellement importants : (i) des dommages de divers composants cellulaires (protéines, chaînes lipidiques, nucléotides) et (ii) l'activation de voies de signalisation spécifiques. Ces deux effets peuvent influencer de nombreux processus cellulaires liés à l'induction et à la progression des cancers (89,90). Pour faire face à ce stress, les cellules contiennent des métabolites antioxydants comme l'acide ascorbique, le glutathion, l'acide lipoïque, l'acide urique, les carotènes, la vitamine E, et le coenzyme Q, ainsi que des enzymes comme la super oxyde dismutase (SOD), la catalase, les peroxyredoxines et les sulfiredoxines, qui travaillent de concert pour prévenir les dommages oxydatifs et la mort cellulaire (91–93).

L'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 sont les deux ROS les plus étudiées dans le contexte du cancer. Par ailleurs, H_2O_2 est la mieux décrite en tant que molécules exerçant une influence sur la signalisation (94–96). Le peroxyde d'hydrogène possède toutes les caractéristiques pour servir de seconds messagers, il est généré de façon quasi ubiquitaire que ce soit par l'activation de systèmes spécifiques ou par conversion enzymatique d'autres précurseurs comme l' $O_2^{\cdot-}$ (**Figure 14**). Il possède également une durée de vie relativement longue comparativement aux autres ROS ce qui lui permet (i) d'atteindre des molécules éloignées de son site de génération et (ii) d'exercer des effets à court-termes ou prolonger dans différentes voies de signalisation des CE (97–99).

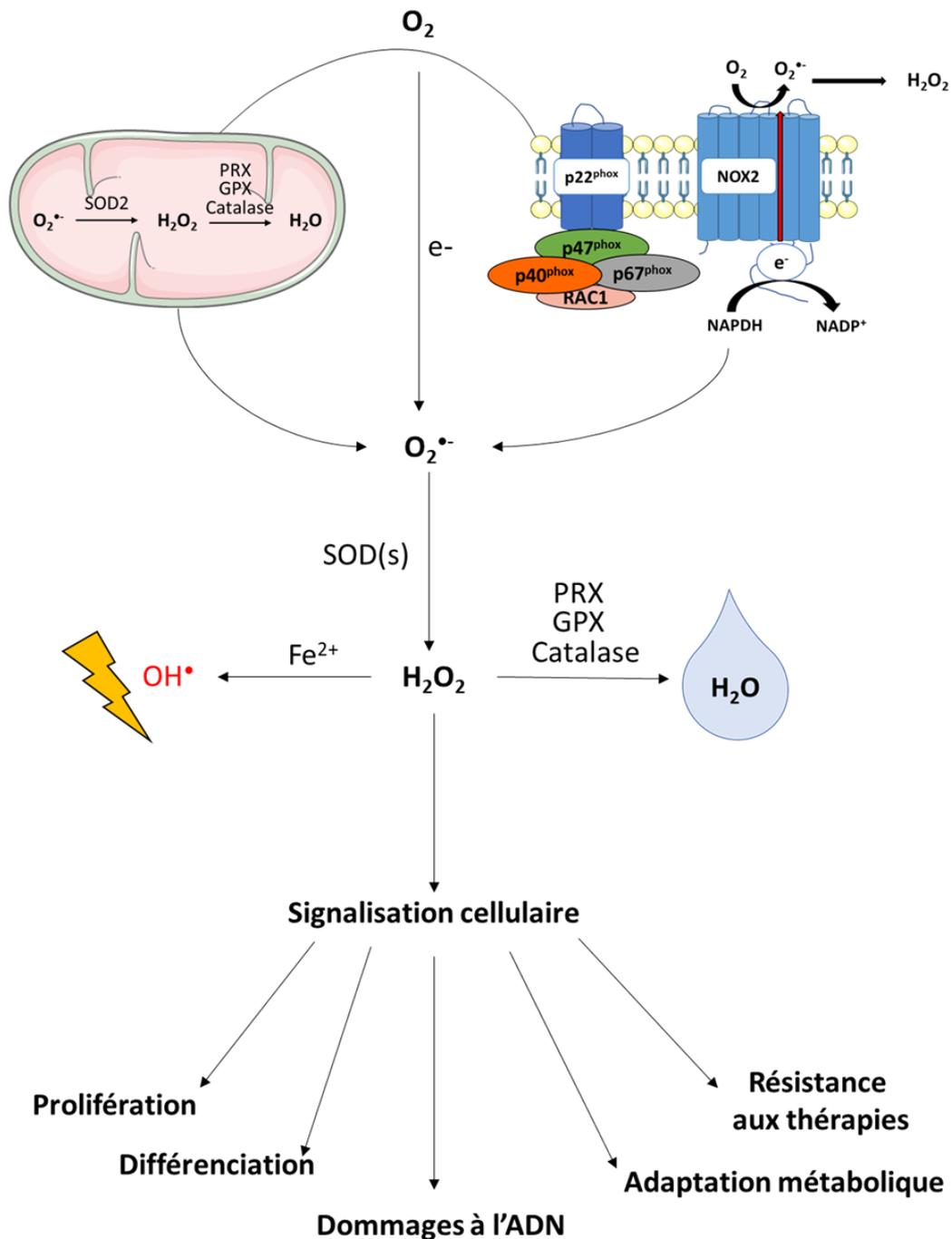


Figure 14 : Schéma de la production et de la régulation des ROS par la mitochondrie et les NADPH oxydase : L'anion superoxyde est formé à partir du dioxygène en acceptant un électron depuis la chaîne de transport des électrons de la mitochondrie ou depuis les NOXs. La superoxyde dismutase (SOD) convertit l' $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 . L' H_2O_2 peut ensuite former du OH^{\bullet} selon la réaction de Fenton avec le Fe^{2+} comme cofacteur. L' OH^{\bullet} est extrêmement réactif et peut causer des dommages aux nucléotides et aux lipides. L' H_2O_2 peut être réduit et converti en H_2O par les peroxyrédoxines (PRX), la glutathion peroxydase (GPX) et la catalase. L' H_2O_2 est une molécule majeure de la signalisation moléculaire impliquée dans le cancer et joue un rôle dans le développement et dans la progression de la maladie. D'après Moloney *et al.* 2018

3.3.1. Les mitochondries

Les mitochondries sont l'un des principaux contributeurs du pool endogène de ROS et il a été estimé que ~1% de l' O_2 consommé par les mitochondries est utilisé pour produire de l' $O_2^{\bullet-}$ dans les CE (100,101). Cet organelle génère également de l'ATP par oxydation des acides aminés, du glucose et des lipides. Le cycle de l'acide tricarboxylique (TCA) est impliqué dans l'élimination d'un électron de ces métabolites et le transfert vers la chaîne de transport

d'électrons (CTE) entraînant une réduction de O_2 en $O_2^{\bullet-}$ (102). Les mitochondries ont jusqu'à dix sites connus capables de générer de $O_2^{\bullet-}$. Cependant, la contribution relative de chacun de ces sites reste largement méconnue (103). Les ROS générées à partir des complexes I et III de la CTE ont été documentés comme jouant un rôle dans la signalisation cellulaire (104). 80% de ces ROS sont libérées dans l'espace intermembranaire et 20% dans la matrice mitochondriale (105,106). Il a également été démontré que le complexe III libère de $O_2^{\bullet-}$ et de H_2O_2 dans l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale et que ces ROS sont nécessaires à de nombreux processus biologiques, notamment la différenciation cellulaire, la détection des cellules à oxygène et l'immunité adaptative (107,108). Durant la phosphorylation oxydative, les électrons migrent à travers la CTE conduisant à la réduction de O_2 en H_2O au niveau du complexe IV. La majorité de $O_2^{\bullet-}$ produit par la mitochondrie est dismuté en H_2O_2 par la manganèse superoxyde dismutase (MnSOD) dans la matrice mitochondriale (**Figure 15**) (104). Les ROS mitochondriaux peuvent jouer un rôle délétère et la dérégulation de leur production peut être à l'origine de divers cancers parmi lesquels la leucémie lymphoïde chronique, (109) la leucémie myéloïde aigue (96) et le cancer du sein (110). Toutefois, les mitochondries ne semblent pas jouer un rôle prédominant dans le métabolisme énergétique des CE. Dans ce contexte, les NADPH oxydases (NOXs) semblent déterminantes dans la production des ROS au niveau des CE. La nature des NOXs ainsi que leurs implications et dans la physiopathologie des CE sont développées ci-après.

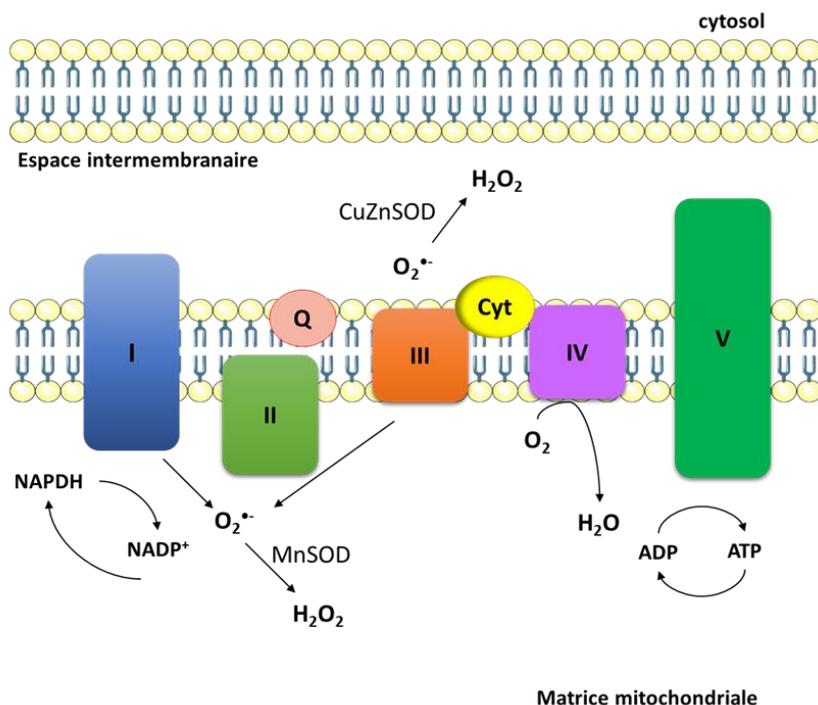


Figure 15 : Schéma de la production de ROS au sein de la chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie. D'après Moloney *et al* 2018.

3.4. Les NOXs

3.4.1. Structure & Fonctions

Les NADPH oxydases (NOX) sont décrites comme étant la première famille d'enzymes dont l'activité principale est la production de ROS (111,112). En dehors de la mitochondrie, ces enzymes constituent la principale source d'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) dans les cellules non phagocytaires (96,111,113,114). La famille des NOXs a été identifiée pour la première fois dans des leucocytes dans lesquels

elles produisent des ROS en réponse à des médiateurs inflammatoires (115). Sept isoformes différentes de NOXs sont décrites : NOX1-5 et les doubles oxydases (DUOX) 1-2, qui possèdent toutes des similitudes en terme de structure et de fonction enzymatique (**Figure 16**). Ces 7 isoformes sont toutes des protéines transmembranaires avec un site de liaison au NADPH, un site de liaison au FAD (*Flavin Dinucleotide Adenin*), 6 domaines transmembranaires et quatre histidines de liaison à l'hème.

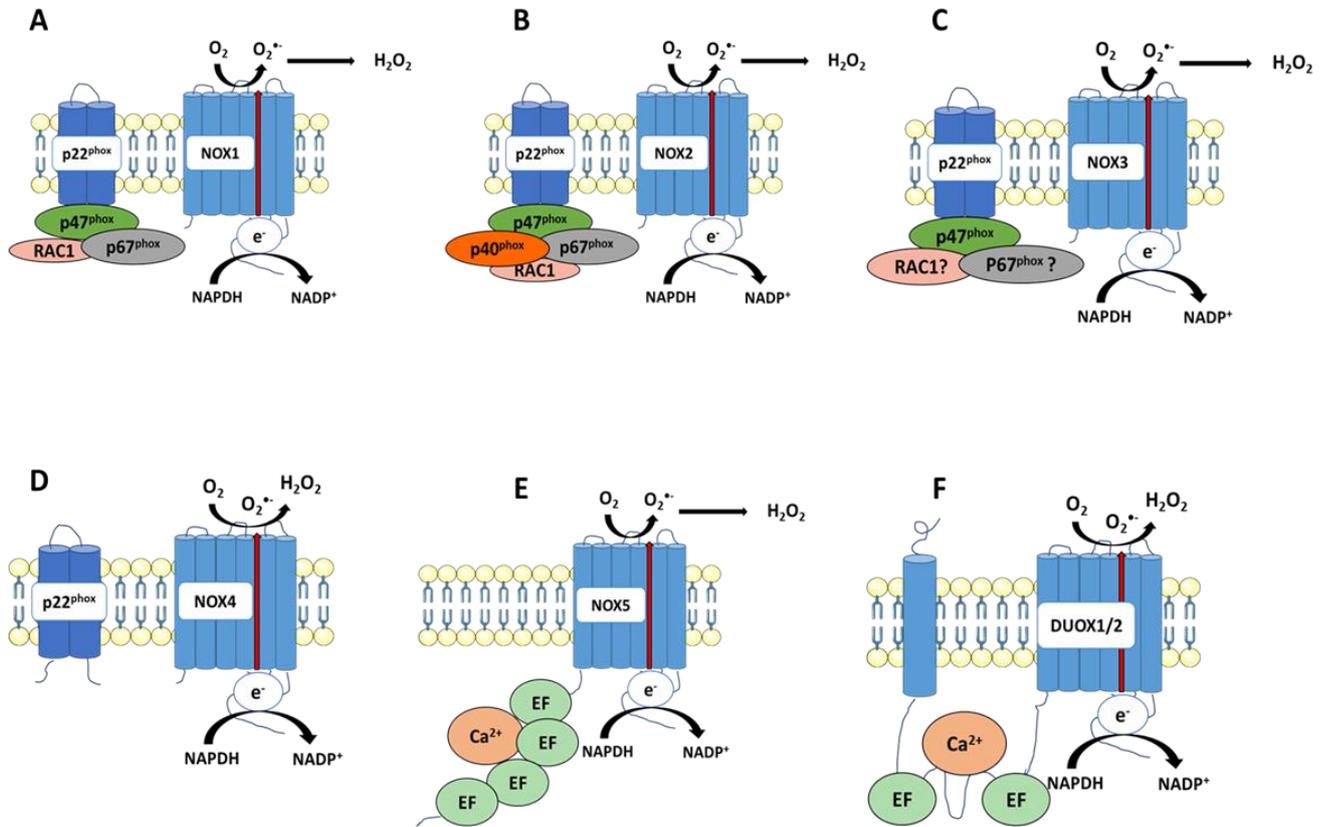


Figure 16 : Représentation de la structure des différentes isoformes des NADPH oxydases ainsi que le mécanisme de production des ROS. D'après Moloney *et al.* 2018

Les NOXs transfèrent des électrons à travers les membranes biologiques pour produire de l' $O_2^{\bullet-}$ (96), qui est rapidement converti en H_2O_2 . Le peroxyde d'hydrogène peut diffuser à travers la membrane *via* des canaux aquaporines et pourra ainsi affecter un grand nombre d'intermédiaires de la signalisation cellulaire comme la voie des MAP-Kinases ou JNK (116,117). Parmi les *stimuli* capables d'activer les NOXs, on distingue la stimulation des récepteurs des cellules B et T (118,119), la présence de médiateurs inflammatoires comme les lipopolysaccharides (LPS), l'activation d'oncoprotéines comme FLT3-ITD et Bcr-Abl (120,121), ainsi que la stimulation de facteurs de croissance, notamment le PDGF et le TNF- α (96,122).

La structure et la distribution cellulaire des différentes isoformes de NOXs sont détaillées ci-après :

NOX1 (A) est le plus fortement exprimée dans l'épithélium colique mais est également exprimée dans d'autres tissus, notamment les cellules endothéliales (123,124) et la prostate (125). Comme pour les isoformes 2, 3 et 4, NOX1 nécessite la sous-unité p22^{phox} pour son activation. NOX1 nécessite également les petites protéines-G RAC1, p47^{phox} et p67^{phox} pour être activée (126).

NOX2 (B), également appelé gp91^{phox}, est le prototype de la famille NOX et a été identifié pour la première fois dans les phagocytes. D'autres études ont révélé que NOX2 est l'isoforme de NOX la plus largement distribuée chez l'Homme (111). L'activation de NOX2 nécessite la translocation d'autres sous-unités cytosoliques (127) : la

p47^{phox} phosphorylée interagit avec la p22^{phox} et contrôle la translocation d'autres sous-unités cytosoliques (111,128). Le complexe enzymatique NOX2, une fois entièrement assemblé et activé permet la génération d'O₂^{•-} par le transfert d'un électron du NADPH dans le cytosol à l'oxygène dans l'espace extracellulaire (129).

NOX3 (C) est principalement exprimée dans l'oreille interne, et est connue pour être moins fortement exprimée dans d'autres tissus (130). La régulation de NOX3 est moins connue, son activation nécessite p22^{phox} et est renforcée par p47^{phox} et p67^{phox} (131).

NOX4 (D) a été identifiée, à l'origine, comme étant fortement exprimée dans le rein (132). Contrairement aux autres isoformes, NOX4 ne nécessite que p22^{phox} pour son fonctionnement et est constitutivement active. De plus, elle est souvent considérée comme une productrice directe de H₂O₂, l'O₂^{•-} qu'elle synthétise étant quasi instantanément métabolisé en H₂O₂. L'IGF-1, la BMP-2, le TGF-β et le TLR4 sont des exemples de facteurs de croissance et de récepteurs dont il a été montré qu'ils activaient NOX4 indépendamment de la mobilisation des sous-unités régulatrices (133–137). Ainsi, à la différence des isoformes 1 à 3, NOX4 peut être activée sans que la sous-unité p22^{phox} ne soit mobilisée. Le rôle spécifique de cette isoforme dans la CE est controversé. Son activité est ainsi décrite comme protectrice dans des pathologies comme l'hypertension ou l'hyperlipidémie (114) tandis que cette isoforme a été décrite comme pro-tumorale en promouvant l'angiogenèse dans le cancer du poumon (137).

NOX5 (E) est exprimée dans une variété de tissus, qui comprend la moelle osseuse, les ganglions lymphatiques, les ovaires, le pancréas, le placenta, la rate, l'estomac, les testicules, l'utérus, les muscles lisses vasculaire et divers tissus fœtaux (132). **DUOX1** et **DUOX2 (F)** sont exprimés principalement dans l'épithélium thyroïdien et respiratoire (138). NOX5, DUOX1 et DUOX2, contrairement aux NOX1-4, ne nécessitent pas la participation de p22^{phox} ou des sous-unités cytosoliques pour leur activation (139,140). Celle-ci dépend des niveaux de calcium intracellulaire. Ce dernier se lie au site de liaison du calcium au niveau du domaine N-terminal, entraînant un changement de conformation et la production subséquente de ROS (139,141).

Cette brève description de la structure des NOXs montre bien que ces enzymes ont des structures similaires, elles sont activées par différents mécanismes communs dépendants de sous-unités régulatrices. Leur activation est initiée par divers *stimuli* incluant notamment des facteurs de croissances. La surproduction de ROS par les NOXs a été décrite dans de nombreuses maladies, parmi lesquelles les pathologies cardiovasculaires comme l'hypertension artérielle (142), la dégénérescence rétinienne (143), la maladie rénale diabétique (144,145), l'asthme (146,147), la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson (148) et bien sûr différents cancers.

3.4.2. Les NOXs dans les cancers

La génération exacerbée de ROS fait partie des caractéristiques du cancer (149). Il a été démontré que suivant le type de cancer, les cellules tumorales produisent des niveaux élevés de ROS par rapport à leurs homologues saines (150). Le stress oxydant induit par un niveau élevé de ROS est un contributeur majeur de l'oncogenèse, en causant des dommages à l'ADN, aux protéines et aux lipides, mais aussi en favorisant l'instabilité génétique (96,106).

Le rôle important des NOXs dans la production des ROS est bien établi et documenté au niveau des cellules cancéreuses. Les ROS produites par les NOX agissent souvent comme seconds messagers en aval de la stimulation par des facteurs de croissance (99,151). La production des ROS par les NOXs dans les cancers a deux rôles majeurs : la stimulation de la survie cellulaire et l'instabilité génomique, qui sont deux caractéristiques qui

influencent la progression tumorale (96). Une forte activité des NOXs est impliquée dans la progression de nombreux cancers, notamment ceux de la vessie, du sein, colorectal, du rein, certaines leucémies, du poumon, du mélanome, de l'œsophage, de l'ovaire, du pancréas, de la prostate, de l'estomac et de la thyroïde (96).

A cet égard, NOX 1 apparaît jouer un rôle particulièrement important dans le développement tumoral. Il est décrit qu'un niveau élevé d'expression de NOX1 est associé à une surproduction de ROS pouvant favoriser les cassures de l'ADN, l'oxydation des nucléotides et l'instabilité génomique en général et ainsi potentialiser la tumorigénèse (96,152). Ces données ont été confirmées par la mise en évidence d'une surexpression de NOX1 dans des tissus de patients atteints de lésions pré-cancéreuses et cancéreuses au niveau colorectal (153–155). Par ailleurs, Juhasz et coll ont établi une corrélation entre l'expression de NOX1 et l'initiation du cancer colorectal en démontrant l'effet pro-prolifératif des ROS associées à NOX1 dans les cellules cancéreuses du côlon (154). Inversement, l'inhibition pharmacologique de NOX1 à l'aide d'un inhibiteur spécifique (GKT771) a permis d'inhiber significativement la croissance tumorale dans un modèle murin xéno greffé par des cellules d'adénocarcinomes du colon LoVo (156).

Concernant NOX2, sa surexpression a notamment été identifiée dans des hémopathies malignes (157–159). Néanmoins, les ROS produites par la NOX2 ont également été rapporté comme jouant un rôle important dans le cancer du côlon, en stimulant la synthèse de MMPs sur un modèle *in vitro* (SW620 & HCT116) (160). Son activité a également été décrite comme jouant un rôle dans l'acquisition de chimiorésistance dans le cancer de l'ovaire en intervenant dans la régulation de la ferroptose (une forme de mort cellulaire programmée) de façon ANGPTL4 (*Angiopoietin-Like 4*) dépendante (161).

NOX4, quant à elle, est reconnue pour avoir un rôle pro-tumoral notamment dans les tumeurs malignes du cerveau (glioblastomes), de la peau (162), des reins (163), des ovaires (164) et de la prostate (165). La NOX4 a, par exemple, été mise en évidence comme facilitant l'invasion métastatique dans un modèle *in vitro* (MCF10A & MDA-MB-231) de cancer du sein de façon dépendante du TGF- β (166). Son expression est positivement régulée par HIF-1 α , et conduit à l'acquisition de mécanisme de résistance aux thérapies ciblées anti HER2 (*Human Epidermal growth factor Receptor 2*) via une augmentation de l'expression de HER3 (*Human Epidermal growth factor Receptor 3*) et de la voie NF- κ B (*nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells*) dans le cancer de l'ovaire (164). L'implication des NOXs dans le mélanome, en tant que modèle de notre étude, sera traitée spécifiquement dans le **chapitre IV**.

L'inhibition spécifique des NOXs est aujourd'hui un enjeu dans le cadre de la recherche, mais aussi dans l'optique de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Sur le plan fondamental, l'une des principales techniques employées aussi bien *in vitro* que *in vivo* est l'inhibition génique, notamment à l'aide d'ARN interférents (siRNA) (167) ou par recombinaison génique. Elles permettent, par exemple, d'inhiber la transcription de certaines sous-unités nécessaires à l'activation d'une isoforme spécifique (comme la sous-unité gp91^{phox} pour NOX2) et donc d'en inhiber la fonction de façon sélective sur des modèles murins par exemple (168). Bien que ces techniques aient permis d'étendre la connaissance que nous avons de ces enzymes, elles ne sont pas transposables à l'Homme et ont donc peu d'intérêt dans la recherche de futures applications thérapeutiques.

L'inhibition pharmacologique spécifique des NOXs est encore à l'étude aujourd'hui. Il existe des pan-inhibiteurs des NOXs comme le diphenyliodonium (DPI), très couramment utilisé sur des modèles *in vitro*, mais dont l'absence de spécificité rend l'utilisation impossible en clinique (169). Des inhibiteurs plus spécifiques ont produit des résultats plus encourageants, comme les GKT136901 et GKT137831, des dérivés du pyrazolopyridine dione

qui présentent une meilleure sélectivité vis-à-vis de NOX1 et NOX4, respectivement (170,171). Il est à noter que le GKT137831 est actuellement en cours d'évaluation dans un essai clinique visant à traiter la fibrose pulmonaire (169).

Les inhibiteurs ML171 et GSK2795039, respectivement inhibiteurs spécifiques de NOX1 et NOX2, ont tous deux montré des résultats encourageants *in vivo* sur des modèles murins d'hépatocarcinome pour ML171 (172), d'agrégation plaquettaire (173) et de traumatisme (174) cérébraux pour le GSK2795039. Néanmoins, des études sont encore nécessaires pour mieux appréhender leur pharmacocinétique, l'excrétion rénale du GSK2795039 étant à l'heure actuelle trop rapide pour permettre une exposition satisfaisante au principe actif (175). Il est également nécessaire de mieux appréhender leur toxicité. (176). L'ensemble des inhibiteurs pharmacologiques des NOXs sont référencés dans le **Tableau I**.

L'ensemble de ces travaux suggèrent un rôle, non négligeable, des NOX dans l'initiation et la promotion tumorale. Ainsi, la prise en considération du MET et du rôle des NOXs dans les cellules qui le compose sont des éléments à prendre en compte pour évaluer le rôle des NOX au cours de la tumorigenèse.

3.4.3. Les NOXs dans les CE

Les NOXs constituent la source principale de ROS dans les CE (114,177,178). Dans les CE, les NOXs sont activées par des facteurs de croissance, l'hypoxie, des agonistes de récepteurs couplés aux protéines G (sérotonine, thromine, bradykinine, endothéline, et l'angiotensine II) ou encore les contraintes de cisaillement (178,179). Parmi les 7 isoformes de NOXs connues, 4 d'entre elles ont été identifiées dans les cellules endothéliales : NOX1, NOX2, NOX4 et NOX5 (114). Il convient toutefois de noter que d'autres cellules présentent dans la périphérie vasculaire, comme les cellules musculaires lisses vasculaires (VSMCs), les fibroblastes de l'adventice ainsi que certains leucocytes peuvent exprimer d'autres isoformes des NOXs. Parmi les 4 isoformes présentes, NOX2 fut la première découverte et est probablement l'isoforme la plus étudiée à ce jour pour son implication dans des pathologies endothéliales (114). Toutefois, parmi l'ensemble des isoformes exprimées dans les CE, c'est l'isoforme NOX4 qui est la plus représentée (114).

Un nombre important d'études recense l'implication des NOXs, en particulier des isoformes 1, 2 et 4 dans l'initiation de l'angiogenèse. Ainsi, il n'est pas surprenant que l'activité de ces isoformes ait souvent été rapportée comme favorisant le développement tumoral, et comme promoteur de l'initiation métastatique. Cette stimulation est multiple : elle passe notamment par une stimulation de la voie de signalisation ERK initiée par le VEGF. L'augmentation de ROS intracellulaire conduit à une inhibition des phosphatases inhibitrices de Raf, et donc à une diminution du signal MAPK. (154). Les ROS produites par les NOXs stimulent également l'angiogenèse *via* l'augmentation d'autres facteurs pro-angiogéniques notamment HIF-1 α (137), TP53 (180), et NF- κ B (181). La promotion métastatique et l'augmentation de l'extravasation des cellules tumorales dans la circulation, induite par les NOXs, est une conséquence indirecte de la promotion de l'angiogenèse tumorale. L'initiation des métastases est également promue par la capacité des NOXs à stimuler la synthèse de MMPs qui, en dégradant la matrice extracellulaire (MEC) facilitent l'échappement des cellules tumorales (136,182).

Tableau I				
Inhibiteur	Cible moléculaire/ mécanisme d'action	Activité en modèle 3D ou murin	IC50	Référence(s) dans la littérature
DPI	inhibiteur des flavoprotéines inhibe toutes les NOXs	Inhibe la croissance de tumeurs colorectales à partir d'un modèle de xénogreffes de cellules HT-29 et LS-174 exprimant NOX1	1µM >	Doroshov <i>et al</i> 2013 Lu <i>et al</i> 2017
analogues du DPI	inhibiteur des flavoprotéines inhibe toutes les NOXs	/	1µM >	Lu <i>et al</i> 2017
Apocynine	Antioxydant + inhibiteur de l'assemblage du complexe	Suppression dose-dépendant de la croissance tumoral et des métastases dans un modèle murin de cancer de la prostate PL10	≈ 10µM (NOX2)	Suzuki <i>et al</i> 2013
AEBSF	Inhibiteur des sérine protéases. Supposé inhibiteur de l'assemblage du complexe	Inhibe la production de ROS dans des sphéroïdes de cancer prostatique DU145	≈ 10µM (NOX2)	Wartenberg <i>et al</i> 2006 Diatchuk <i>et al</i> 1997
Plumbagine	Antioxydant; Activité anti NOX4	Inhibition de la progression de tumeurs gastriques chez des souris xénogreffées avec des tumeurs MKN-45-AR résistantes à l'anoikis	2µM (NOX4)	Du <i>et al</i> 2018
VAS28701 VAS3947	Inhibition de l'assemblage et de l'activation du complexe; inhibition de l'activation dépendante de PDGFR	/	VAS2870 : 2 µM (NOX2) VAS3947 : 1-2 µM (NOX2)	Sancho <i>et al</i> 2011 ten Freyhaus <i>et al</i> 2006 Wind <i>et al</i> 2010
GKT136901 GKT137831	Spécifique de NOX1 et NOX4; Possible ROS Scavenger	GKT136901 diminue significativement la croissance et la vascularisation de carcinomes de Lewis xénogreffés LLC1 GKT137831 ralentit la progression de la maladie dans un modèle murin d'AML	GKT136901 : 160-170 nM (NOX1/NOX4); 450nM (NOX5) GKT137831 : 110 nM (NOX1), 140 nM (NOX4), 410 nM (NOX5)	Laleu <i>et al</i> 2010 Musset <i>et al</i> 2012 Garrido-Urbani <i>et al</i> 2011 Jayavelu <i>et al</i> 2016 Gaggini <i>et al</i> 2010
ML171	Inhibition sélective de NOX1 /Mécanisme inconnu	/	250 nM (NOX1)	Gianni <i>et al</i> 2010 Oh <i>et al</i> 2021
GSK2795039	Compétition avec le NADPH	Protection contre les déficits neurologiques consécutifs aux traumatismes cérébraux sur modèle murins	450 nM (NOX2)	Hirano <i>et al</i> 2015 Padilha <i>et al</i> 2021
NOS31	Inhibiteur sélectif de NOX1	/	2 µM (NOX1)	Yamamoto <i>et al</i> 2018
GLX351322 GLX7013114 GLX481372	Inhibiteurs sélectifs de NOX4 et NOX5		GLX351322 : 5µM (NOX4) GLX7013114 : 0,3 µM (NOX4) GLX481372 : ≈0,6 µM (NOX4/NOX5)	Anvari <i>et al</i> 2015 Wang <i>et al</i> 2018
GKT771	inhibiteur sélectif de NOX1	inhibe la croissance de xénogreffes coliques (LoVo) et de mélanome (B16-F10) dans un modèle murin	K _i = 60 nM (NOX1)	Stalin <i>et al</i> 2019
NOX2ds-tat (péptide)	Peptide inhibiteur de NOX2 Se lie à l'interface entre p47 ^{phox} et p22 ^{phox}	inhibe la production de ROS et les dommages au tissu vasculaire	740 nM (NOX2)	Jacobson <i>et al</i> 2003 Liu <i>et al</i> 2003 Csanyi <i>et al</i> 2011
NOXA1ds (péptide)	Perturbe l'interaction entre NOX1 et NOXA1	/	20 nM (NOX1)	Ranayhossaini <i>et al</i> 2013
NF02x (péptide)	Peptide inhibiteur de NOX1	/	63 µM (NOX1)	Mousslim <i>et al</i> 2017

Tableau I : Inhibiteurs de NOXs

Comme décrit précédemment, le tissu vasculaire tumoral ne permet qu'une assez pauvre perfusion de la tumeur ce qui induit des zones hypoxiques. Cette hypoxie induit la production de ROS qui génère un stress oxydatif. Il existe ainsi un mécanisme de rétro contrôle positif entre les ROS produites par la NOX4 et l'augmentation du VEGF et de HIF-1 α . Ce cercle vicieux est un des principaux promoteur de l'angiogénèse tumorale (137).

Par ailleurs, Garrido-Urbani et coll ont montré en 2011 que des souris déficientes en NOX1 présentaient une angiogénèse altérée. Ces auteurs ont rapporté que l'extinction de NOX1 diminue la migration des cellules endothéliales et la formation de structures tubulaires *via* l'inhibition de PPAR α , un régulateur de la voie de signalisation NF- κ B (181). De même Stalin et coll, ont montré grâce à un modèle de souris xenogreffées avec des cellules de mélanomes (B16-F10) ou de cancer colorectal (LoVo) qu'une inhibition de l'activité de NOX1 conduisait à une importante baisse de la vascularisation tumorale, et donc à une régression des tumeurs (156). La dérégulation des NOXs endothéliales a également été reliée à un certain nombre d'autres pathologies vasculaires. Ainsi, l'inhibition génique de NOX1 et/ou NOX2 a montré une protection contre le développement de pathologies athérogènes parmi lesquelles l'athérosclérose, l'hypertension artérielle ou pulmonaire et les défaillances cardiaques. La surexpression de NOX4 a démontré les mêmes effets dans ces pathologies (114,183). Les ROS produites par les NOXs vont également jouer un rôle crucial dans l'initiation de l'inflammation. En effet, il est depuis longtemps établi que les facteurs de transcription pro-inflammatoires NF- κ B et AP-1, ainsi que des kinases telles que la protéine kinase p38, MAPK, ERK, et JNK sont suractivées en réponse au stress oxydant (114,179,184,185). De plus, il a été démontré que les ROS dérivées des NOXs agissaient comme intermédiaires dans les voies de signalisation induites par des facteurs pro-athérogènes comme les lipides oxydés, l'angiotensine II, les lipopolysaccharides bactériens ou l'hyperglycémie. Ces derniers augmentent l'activité de NF- κ B et des MAPK dans les cellules endothéliales favorisant la transactivation de cytokines pro-inflammatoires (186-188). Xiao et coll ont ainsi montré sur un modèle HUVEC que les contraintes de cisaillement activaient le facteur de transcription SREBP2 (*Sterol Regulatory Element Binding Protein 2*) qui, en se liant à d'éléments du SRE (*Sterol Regulatory Element*), allait promouvoir la transcription de NOX2 (189). Une étude de Meikles et coll définit également l'inflammation induite par l'activité des NOXs comme une des causes à l'origine des pathologies de l'adventice vasculaire comme l'hypertension, les anévrismes aortiques ou l'athérosclérose (190). Le mélanome, notamment métastatique est décrit comme un cancer extrêmement agressif (191), et particulièrement dépendant du stress oxydant (192). La place des NOX dans cette pathologie est donc particulièrement intéressante à discuter.

4. Les NOXs dans le mélanome

4.1. Epidémiologie du mélanome

Le mélanome résulte d'une transformation maligne des mélanocytes, les cellules synthétisant la mélanine, un pigment photoprotecteur, entre autres responsable de la coloration de la peau. Le mélanome peut se développer à partir de cellules issues de l'œil, du tractus gastro-intestinal, des organes génitaux, des sinus et des méninges, mais survient le plus souvent dans les cellules de la peau. Les mélanomes cutanés représentaient en 2018 91,2% de tous les mélanomes diagnostiqués tandis que le mélanome oculaire ne représentaient que 5,2% (193)

Le mélanome est le 5^{ème} cancer le plus courant chez l'adulte (hommes et femmes) et est la forme la plus mortelle de cancer de la peau. En 2019, on comptait environ 96 480 adultes (57 220 hommes et 39 260 femmes)

diagnostiqués aux États-Unis pour 7230 décès (193). En France il s'agissait de 15 500 nouveaux cas en 2018 (7 900 hommes et 7 600 femmes) pour 1 800 décès (INCa 2018). Le mélanome est avant tout un cancer des pays développés et son incidence a fortement augmenté depuis les années 1950 en raison de changements majeurs dans le mode de vie des habitants de ces pays, notamment l'exposition récréative au soleil, ainsi que de l'utilisation de plus en plus importante des cabines à UV (195). L'incidence du mélanome a ainsi augmentée de 270% aux États-Unis au cours des 30 dernières années, mais également dans le monde entier (195,196).

Les mélanomes cutanés se développent au niveau de la couche proximal du derme où sont situés les mélanocytes. Il s'agit principalement d'un cancer de l'adulte. Le mélanome cutané se caractérise par l'apparition de taches pigmentées, semblables à un grain de beauté, mais également par la modification de la forme et de la couleur d'un *naevus* préexistant. Différents facteurs de risques facilitent la survenue du mélanome cutané : une peau claire, un historique familial de mélanome, l'âge et le sexe masculin (facteur endogène) ; mais également l'exposition solaire ou aux rayons ultraviolets (UV) en cabine par exemple (facteurs exogènes). Les dommages causés par les rayonnements UV sont aujourd'hui identifiés comme la cause principale de développement du mélanome (193). Le mélanome est aujourd'hui considéré comme un cancer de bon pronostic lorsqu'il est détecté précocement. Son pronostic varie en fonction du stade : la survie à 5 ans est supérieure à 95% au stade localisé mais est seulement de 15% au stade métastatique (197).

Sous sa forme métastatique, le mélanome reste un cancer particulièrement agressif (191). A ce titre, le MET du mélanome est aujourd'hui identifié comme un acteur crucial dans la promotion de l'invasion tumorale, mais aussi dans l'acquisition de résistances aux thérapies anticancéreuses. (191,198). Parmi les principaux facteurs identifiés comme favorisant la croissance des mélanomes, le stress oxydant semble être décrit comme impliqué dans la physiopathologie de ces tumeurs.

4.2. Le mélanome et le stress oxydant

Les mélanocytes sont des cellules particulièrement exposées au stress oxydant. En premier lieu, l'épiderme, d'où proviennent les mélanocytes, est un tissu relativement hypoxique. De plus, la synthèse de mélanine est un processus qui produit intrinsèquement des ROS. En effet, la mélanine a pour effet de protéger les mélanocytes contre les radiations UV, cependant elle contribue également à augmenter le stress oxydant intracellulaire (192,199). Par ailleurs, il est clairement établi que les radiations causées par les UV peuvent être une source indirecte de ROS à l'origine d'une potentialisation de la tumorigénèse des mélanomes. (192,200).

Si les ROS sont impliquées dans le développement tumoral, ils peuvent également être à l'origine de mécanismes de résistance, notamment aux chimiothérapies anticancéreuses. Ainsi, l'utilisation de thérapies ciblées anti-BRAF et anti-MEK a vu apparaître une résistance acquise basée sur une adaptation du métabolisme énergétique des mélanocytes. Dans leur revue de 2019, Cannavo et coll décrivent une résistance accrue au stress oxydant acquise par les mélanocytes au cours de leur modification phénotypique (201). Par ailleurs, en utilisant un modèle de souris résistant aux inhibiteurs de tyrosine kinase (vemurafenib ; cobimetinib ; trametinib ; dabrafenib), Khamari et coll montrent que les cellules tumorales de mélanomes présentent une augmentation du métabolisme oxydatif. Ceci conduit, à une augmentation de la signalisation Nrf 2 et à une augmentation de synthèse de glutathion permettant à la cellule de mieux gérer le stress oxydant et donc d'éviter la mort (202). Comme nous l'avons décrit pour les cellules endothéliales, une des sources majeures de production de ROS implique les enzymes de

la famille des NOXs. Ces dernières sont impliquées dans la production de ROS par les cellules tumorales, elles-mêmes, ou les cellules du MET.

4.3. Implication des NOXs dans le mélanome

D'après la littérature les isoformes NOX1, NOX4 et NOX5 sont exprimées dans les mélanocytes (192,203). Bien qu'il n'y ait pas de différence dans les niveaux d'expression de NOX1 dans les tissus issus de mélanome primaire et métastatique, NOX4 a été identifiée comme sur-exprimée dans les cellules de mélanome. Cette dernière isoforme contribue à la transformation du phénotype des cellules de mélanome en régulant la progression du cycle cellulaire G2-M (203). S'agissant de NOX1, il a été rapporté que son activité permet aux cellules de mélanome d'acquérir un phénotype invasif *via* l'activation de MMPs assurant un remodelage de la MEC et donc une progression tumorale. L'inhibition de cette isoforme conduit ainsi à une perte de la capacité migratoire de ces cellules cancéreuses (182,204) et donc un ralentissement du développement tumoral.

L'importance de NOX1 dans la physiopathologie du mélanome a été confirmée par Stalin et coll, qui ont montré que le GKT771, un inhibiteur de NOX1, réduit la croissance tumorale sur un modèle murin xénotransplanté par des cellules B16-F10 (156). Cette inhibition de NOX1 est corrélée à une diminution drastique de l'angiogenèse sans impact sur les fonctions des cellules immunitaires. La collaboration du système immunitaire était par ailleurs nécessaire à la survenue d'une inhibition efficace.

De façon similaire Aydin et coll (168) ont montré à l'aide d'un modèle murin *NOX2-KO*, que l'inhibition de cette isoforme dans les myéloïdes du MET conduit à une augmentation de la synthèse de INF- γ par les cellules NK (*Natural Killer*). Cette augmentation de synthèse conduisait à une diminution significative de la formation de métastase pulmonaire. Ceci souligne un contrôle des cellules NK dans le MET du mélanome dépendant de l'activité de NOX2.

Ces études soulignent l'importance majeure des NOXs, et plus spécifiquement de NOX1, dans le développement du mélanome. Si l'impact de ces isoformes est décrit sur les cellules tumorales, ces enzymes semblent jouer un rôle clé dans la physiologie du MET, et notamment au niveau des cellules endothéliales, comme cela a été démontré dans les précédents chapitres.

5. La transition endothélio-mésenchymateuse

5.1. Mécanismes généraux de l'EndMT et cancers

La transition endothélio-mésenchymateuse (EndMT) est un processus physiopathologique qui consiste en la transition phénotypique des cellules endothéliales vers un phénotype fibroblastique. Elle se caractérise notamment par la perte de l'adhésion intercellulaire entre les CE, ainsi que par une perte de l'expression de marqueurs protéiques endothéliaux. Ceci se traduit par une baisse de l'expression de la VE-cadhérine, de CD31 et du facteur Von Willebrand (vWF) au profit de marqueurs mésenchymateux comme l' α -SMA, le SM22a, la N-Cadhérine ou la vimentine. Ce phénomène a d'abord été observé dans les années 70 durant le développement embryonnaire lors de la formation des valves cardiaques. Durant les décennies qui ont suivi, la perte du caractère endothélial des cellules a également été reliée à diverses pathologies, telles que les fibroses rénale (205), cardiaque (206) et pulmonaire (207). Ce n'est que récemment que l'EndMT a suscité un intérêt en cancérologie grâce à la découverte par Zeisberg d'une production de fibroblastes spécifiquement associés au cancer (Cancer

Associated Fibroblasts ; CAFs) (208). Il est admis, aujourd'hui, que l'EndMT est la première source de CAFs, comptant pour environ 40% de leur génération (208,209). En vue de résumer le rôle et les voies de signalisation mobilisées au cours de l'EndMT, ainsi que son implication dans la tumorigénèse et la génération de métastases une revue (Platel et coll., 2019) a été rédigée en collaboration au cours de mon doctorat.

5.2. Revue : l'EndMT, son rôle dans la tumorigénèse, l'évasion métastatique et la résistance aux thérapies

Review Article

Endothelial-to-Mesenchymal Transition (EndoMT): Roles in Tumorigenesis, Metastatic Extravasation and Therapy Resistance

Valentin Platel,¹ Sébastien Faure,¹ Isabelle Corre ,² and Nicolas Clere ¹

¹Micro & Nanomédecines Translationnelles-MINT, Univ Angers, INSERM U1066, CNRS UMR 6021, Angers, France

²Sarcomes Osseux et Remodelage des Tissus Calcifiés Phy-OS, Université de Nantes INSERM UMR U1238, Faculté de Médecine, F-44035 Nantes, France

Correspondence should be addressed to Isabelle Corre; isabelle.corre@univ-nantes.fr and Nicolas Clere; nicolas.clere@univ-angers.fr

Received 4 April 2019; Revised 20 June 2019; Accepted 1 July 2019; Published 1 August 2019

Academic Editor: Daniele Vergara

Copyright © 2019 Valentin Platel et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Cancer cells evolve in a very complex tumor microenvironment, composed of several cell types, among which the endothelial cells are the major actors of the tumor angiogenesis. Today, these cells are also characterized for their plasticity, as endothelial cells have demonstrated their potential to modify their phenotype to differentiate into mesenchymal cells through the endothelial-to-mesenchymal transition (EndoMT). This cellular plasticity is mediated by various *stimuli* including transforming growth factor- β (TGF- β) and is modulated dependently of experimental conditions. Recently, emerging evidences have shown that EndoMT is involved in the development and dissemination of cancer and also in cancer cell to escape from therapeutic treatment. In this review, we summarize current updates on EndoMT and its main induction pathways. In addition, we discuss the role of EndoMT in tumorigenesis, metastasis, and its potential implication in cancer therapy resistance.

1. Introduction

Since 2000, with the publication of *The Hallmarks of Cancer* by Hanahan and Weinberg [1], actualized in 2011 [2], considerable advancements have been done in the understanding of the biology of cancer. Importantly, a great effort has been made in the characterization of the microenvironment where evolve tumor cells. This microenvironment is composed of numerous cell types: immune cells (bone marrow-derived inflammatory cells, monocytes/macrophages, and lymphocytes), vascular cells (endothelial cells and pericytes), and stromal fibroblastic cells, and of an extracellular matrix composed of collagen and proteoglycans [3, 4]. While the importance of the stromal microenvironment in tumorigenesis has been recognized several decades ago [5], all the properties of the mobilized cells have not been described so far [6]. Among the cells identified in the tumor microenvironment, endothelial cells (ECs) are at the crossroad of different pathophysiological processes involved in tumor growth. Thus, since the initial studies

conducted by Folkman [7, 8], numerous works have confirmed and studied the implication of ECs in the process of angiogenesis that is essential for optimal tumor progression [9, 10]. Besides their role in angiogenesis involving proliferation, migration, and adhesion, a new concept of endothelial plasticity has emerged last decade, as ECs have been described as able to modify their phenotype toward a mesenchymal profile. Initially characterized in physiological cardiac development, this plasticity is now described in not only several pathophysiological processes such as cardiac fibrosis [11], atherosclerosis [12], pulmonary hypertension [13], and vascular calcification but also in cancer [14, 15]. Besides this endothelial compartment, cancer-associated fibroblasts (CAFs) are the most abundant stromal cells in the tumor microenvironment and are critically involved in tumor progression. They actively interact with neoplastic cells and form a myofibroblastic microenvironment that promotes cancer growth and survival and supports malignancy. Thus, CAFs affect both the architecture and growth properties of the developing tumor. CAFs participate in the

remodeling of peritumoral stroma, which is a prerequisite of neoplastic cell invasion, expansion, and metastasis. CAFs may originate from different sources (mesenchymal stromal cells (MSC), normal fibroblasts, and epithelial cells [16]) and also from ECs [17] through the process of endothelial-to-mesenchymal transition (EndoMT).

2. Main Features of Endothelial-to-Mesenchymal Transition (EndoMT)

EndoMT is defined as a cellular transition from an endothelial to a mesenchymal phenotype, owing from the plasticity potential of ECs. EndoMT was initially observed in 1975 in the formation of heart valves during embryogenesis in vertebrates from a detailed analysis of endocardial cytodifferentiation by transmission electron microscopy (TEM). In this last study, the authors followed the cardiac development of rat embryos and observed that, at E9.5, part of the endocardial cells from the atrioventricular canal and the efferent tract has a particular phenotype with morphological alterations such as cellular hypertrophy, lateralization of the Golgi apparatus, formation of cellular appendages, and loss of cell polarity [18]. These previous observations were subsequently confirmed in a chicken embryo model where the phenotypic change of cardiac ECs was correlated with new migratory properties and a concomitant expression of α -smooth actin (α -SMA) [19].

EndoMT is a transition process where ECs lose their endothelial characteristic features and acquire mesenchymal properties [20, 21]. In a similar way as in epithelial-mesenchymal transition (EMT), EndoMT is associated with the gain of mesenchymal markers such as N-cadherin, fibroblast-specific protein-1 (FSP-1), α -SMA, and types I/III collagen and with the corresponding loss of endothelial markers such as CD31 or platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM1), Tie-2, and vascular endothelial (VE) cadherin [22] (Table 1).

Aside from the acquisition of an activated profibrogenic phenotype, ECs further lose their apicobasal polarity and mesenchymal cells acquire new migratory properties. Furthermore, cells in transition have a proinflammatory secretory phenotype with increased secretion of cytokines such as IL-4, -13, -6, -8, and TNF- α , correlated with a synthesis of extracellular matrix proteins such as fibronectin and collagens [32]. Mechanistically, EndoMT is thought to be instigated by not only inductive signals like TGF- β [33], Wnt/ β -catenin [27], and Notch [34] but also by hypoxia [13] and oxidative stress [35] (Figure 1).

EndoMT has been characterized in different endothelial human models such as tumor ECs isolated from prostate cancer [36], normal dermal microvascular endothelial cells (HDMECs), immortalized dermal microvascular endothelial HMEC-1 cells [37], human umbilical venous endothelial cells (HUVECs) [38], or human esophageal microvascular endothelial cells (HEMEC) [39] treated by TGF- β 1 or β -2 or simultaneously by IL-1 β and TGF- β 2. Moreover, it has been reported that EndoMT can be induced by epigenetic modifications. Recently, in HUVECs, it has been

demonstrated that combined knockdown of two ETS family transcription factors, *ERG* and *FLI1*, induces EndoMT coupled with dynamic epigenetic changes in ECs [40]. In these conditions, it has been demonstrated that (i) ECs are unable to form capillaries in Matrigel® and that (ii) cells not only lose their endothelial markers and acquire a mesenchymal phenotype but also become more invasive with increased migratory abilities [39]. In addition, analysis of cell proliferation reveals that ECs involved in EndoMT are able to progress through the cell cycle and that the acquisition of mesenchymal markers such as α -SMA is independent of cell cycling [38].

As described above, EndoMT has been confirmed through various studies conducted on different models of cultured endothelial cells treated by TGF- β 1 or - β 2. Some *in vivo* studies confirmed this process in not only various physiological situations (development [18, 41] and wound healing [42]) but also in pathological processes such as fibrotic diseases [43, 44], pulmonary hypertension [13], fibrodysplasia ossificans progressive disease [45], and in particular in cancer [46, 47]. The fact that EndoMT is a progressive, transitional, and complex process makes it difficult to explore *in vivo*, especially in fixed tissues. Nevertheless, EndoMT has been described in human samples of several pathologies. Detection of stromal cells coexpressing endothelial and mesenchymal markers was reported in patients with fibrotic disorders: cardiac fibrosis [48], radiation-induced rectal fibrosis [49], systemic sclerosis [50], and PHA [32]. Up to now, detection of EndoMT in human cancer patients has been reported in human colorectal tissue sections [51]. *In vivo* evidence of EndoMT has been rendered possible through the use of genetic lineage tracing technology, enabling to follow EC lineage conversion *in vivo* [52]. Use of Cre-LoxP-mediated endothelial tracing under the endothelial specific promoter (*Tie-2* or *Cdh5*) has been used to develop animal models suitable for studying endothelial-to-mesenchymal transition. In non-cancerous pathologies, this strategy has been successful to show an EndoMT process in cardiac [53] and kidney [54, 55] fibrosis, in vein graft remodeling [56]. The endothelial origin of 40% of CAF has been demonstrated in a model of subcutaneous melanoma in *Tie-2-Cre* \times *R26TRosa* *Lox-stop-LacZ* crossed mice [17]. Animal studies through endothelial-specific targeting revealed also the role of p53 in radiation-induced EndoMT in a pulmonary adenocarcinoma model [57]. In addition, in the murine pancreatic cancer model *Rip-Tag2*, absence of CD105/endoglin in ECs favored an EndoMT process [58].

3. EndoMT: A Transition Process with Heterogeneous Regulation

In vitro studies have provided a better understanding of phenotypic alterations of ECs during EndoMT and have also shown specificity of response depending on the experimental conditions. Thus, the expression of the mesenchymal proteins depends on (i) the nature of the inducing agent, (ii) the tissue origin of ECs [59], (iii) the signaling pathway(s) mobilized [60], and (iv) the cytokinin

TABLE 1: Comparison of main features during EMT and EndoMT.

	EMT	EndoMT
Cells	Epithelial cells	Endothelial cells
Induction mediators	TGF- β [23], Wnt/ β -catenin [24], Notch [25]	TGF- β [26], Wnt/ β -catenin [27], hypoxia [13], oxidative stress [28], Notch [29]
Epithelial/endothelial markers	E-cadherin, N-cadherin [30, 31]	VE cadherin, CD31/PECAM-1, vWF
Mesenchymal markers		α -SMA, FSP-1, vimentin
Transcription factors		Slug, Snail-1 and -2, Twist

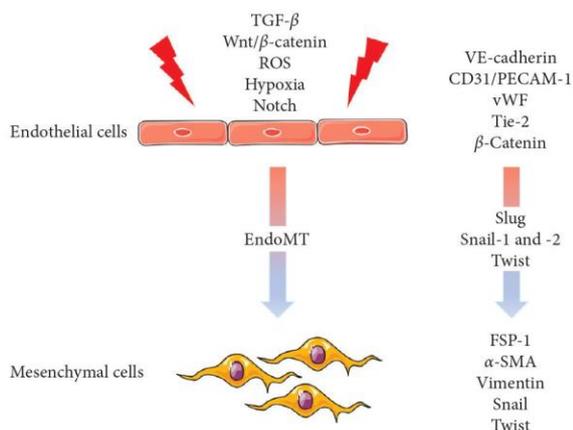


FIGURE 1: Phenotypic modifications during EndoMT. TGF- β (transforming growth factor- β); ROS (reactive oxygen species); VE cadherin (vascular endothelial cadherin); vWF (vonWillebrand factor); FSP-1 (fibroblast-specific protein-1); α -SMA (α -smooth muscle actin).

composition of the microenvironment [61]. Some studies suggested that the stability of the mesenchymal phenotype depends on the duration of EC stimulation by various stimuli (TGF- β 1, IL-1 β , and TNF- α) [62, 63]. In human intestinal microvascular endothelial cells (HIMEC) treated simultaneously by TGF- β , TNF- α , and IL-1 β , EndoMT appeared completed at 6 days and was prolonged up to 10 days, suggesting then the creation of a stable mesenchymal phenotype [64]. The nature of the extracellular matrix also appears as a determining parameter in the induction of EndoMT, as *in vitro* experiments have demonstrated a significant increase in mesenchymal α -SMA expression in ECs cultured on an enriched-fibronectin matrix, but not on the collagen- or gelatin-matrix [43, 65]. These data suggest that the nature of the microenvironment matrix influences the induction of EndoMT and could play a key role in the development of diseases such as fibrosis or cancer [66].

The notion of reversibility/irreversibility has been suggested and evidenced for the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT). EMT is reversed by Twist gene silencing [67]. Furthermore, hypoxia-induced EMT in MDA-MB-231 breast cancer cells may be reversed not only by reoxygenation, providing a model for changes that may occur *in vivo* when cancer cells intravasate into the bloodstream or metastasize to the lungs, but also by silencing μ PA expression that decreased expression

of Vimentin and Snail [68]. Similarly, in Madin–Darby canine epithelial cells, it has been found that Snail overexpression induced EMT, while Snail silencing upregulated epithelial markers and downregulated mesenchymal markers confirming the reversibility of EMT [69]. Taken together, these findings suggest that EndoMT could also be reversible, especially since the mediators mobilized during one and the other of the processes are identical.

Thus, the stability and the reversibility of the mesenchymal phenotype, issued from EndoMT, have been studied *in vitro* by analyzing the evolution of the protein signature after several days of culture in the presence of various stimuli (TGF- β 1, IL-1 β , and TNF- α) [62, 63, 70].

Furthermore, different *in vitro* studies showed that EndoMT is initiated from the first six hours after stimulation and that this process could be reversible for culture times less than 10 days in the presence of proinflammatory cytokines as TGF- β 1. Furthermore, when EC are treated with cytokines for a period of 20 days, the acquisition of the mesenchymal phenotype is stable over time and irreversible [44, 64].

While partial EMT is well described in the literature, partial EndoMT is, to date, little studied although it constitutes an emerging concept in the field of oncology. Welch-Reardon et al. were the first to suggest this concept by comparing angiogenesis to EndoMT and then by identifying several similarities [71]. Among these, the tip cells that lead emerging sprouts lack apical-basal polarity, degrade the extracellular matrix, and, by definition, are migratory. Moreover, angiogenic ECs do not usually separate from their neighbors and express significantly Slug, a Snail family of zinc-finger transcription factor [71], suggesting that angiogenesis may involve a partial EndoMT [46]. These data have been confirmed in an adenomyosis model in which it has been found that its development is associated with a significant angiogenesis induced by estrogen and dependent on the activation of the Slug-VEGF axis [72]. Finally, more recently, it has been reported, in a model of ovarian carcinoma, that the inhibition of Slug expression decreased significantly the growth of tumor and microvessel density [73]. Taken together, these findings suggest that the same mediators or the same signaling pathways that induce EMT or angiogenesis may also drive ECs toward a mesenchymal phenotype that could be also associated with metastasis. Angiogenesis could represent a partial EndoMT, and we therefore believe that anti-angiogenic drugs may have a dual benefit for treating metastatic cancers, as they could

delay metastatic development by inhibiting both angiogenesis and EndoMT.

In summary, EndoMT is characterized by a permanent alteration of the endothelial phenotype evolving toward a mesenchymal phenotype. Specificity of the mesenchymal markers acquired during this transition appears to be dependent not only on the nature of the inducing agents present in the microenvironment but also on the tissue origin of the EC. The reversion of this process may also occur during a short time after its initiation [74], but the acquisition of the mesenchymal phenotype appears stable in a context of chronic induction, as it might be the case in cancer for example.

4. Main Signaling Pathways Involved in EndoMT

The TGF- β family of proteins comprises several pleiotropic growth factors that play crucial roles in numerous physiological processes including embryogenesis, cellular development and differentiation, immunologic system development, inflammatory response functions, and wound repair. The TGF- β superfamily consists of four major subfamilies: the TGF- β subfamily, the bone morphogenetic proteins (BMP), the activin and inhibin subfamilies, and a group encompassing various divergent members [75]. TGF- β 1, - β 2, and - β 3 are three distinct isoforms, which have been extensively found in mammal tissues. TGF- β signals through TGF- β receptors (T β Rs) I and II to activate downstream signaling pathways [76]. In the absence of ligand, T β RI and T β RII exist as monomers, homodimers, or heterodimers on the cell surface. Ligand binding promotes formation of a tetrameric complex between T β RII dimers and two T β RI. TGF- β binds specifically to the constitutively active T β RII, which activates T β RI by phosphorylating the glycine/serine-rich domain. Activated T β RI then phosphorylates downstream effectors to induce signal transduction [77]. Induction of EndoMT through TGF- β seems to involve two distinct signaling pathways: (i) one leading to an increase of Snail-1, one of the main transcription factors that regulate EndoMT together with Slug and Twist, and (ii) one recruiting the Smad pathways [78]. Furthermore, TGF- β signals through both canonical Smad-dependent and non-canonical Smad-independent pathways. Considering the canonical pathway, following ligand binding, the type II receptor phosphorylates the type I receptor, which in turn phosphorylates the receptor-regulated Smads (R-Smads) (Smad-2 and -3). When activated, R-Smads associate with Smad-4, a common-partner Smad (Co-Smad), and translocate to the nucleus to control the transcription of the target gene [79]. Smad-7 acts as a negative feedback and regulates Smad signaling by forming a stable complex with type I receptors, therefore leading to inhibition of R-Smad phosphorylation and the heterocomplex formation between R-Smads and Co-Smad [79]. This heterocomplex translocates into the nucleus, where it regulates the transcription of target genes [80], among which are the differentiation transcription factors Snail, Twist, and Slug.

In addition to this canonical pathway, TGF- β isoforms are also able to activate Smad independent or non-canonical pathways, including mitogen-activated protein kinases and phosphoinositide 3-kinase/AKT (PI3K/AKT) signaling pathways [81]. Indeed, TGF- β signaling also activates numerous serine/threonine kinases that phosphorylate Smad-2 in its linker region. Interestingly, in primary-cultured bovine aortic ECs, it has been reported that TGF- β -mediated phosphorylation of individual serine/threonine sites in the linker region of Smad-2 occurs in a highly specific manner by kinases [82] (Figure 2).

TGF- β is considered the most important regulator of both EMT in cancer [83] and EndoMT in cardiovascular development [84] or disease as well as in cancer [60, 84]. However, it appears that the three isoforms of TGF- β did not have the same efficacy to induce EndoMT, according to the tissue origin of the EC and to the pathophysiological context (heart development, fibrosis, and cancer). TGF- β 1 has been firstly reported to be the main and unique regulator of EndoMT in a mouse atriovascular canal (AVC) model [85], while TGF- β 2 and TGF- β 3 were shown to cooperate to mediate EndoMT in cultured chick AVC explant cells. In this study, it has been also reported that TGF- β 2 mediates initial endothelial cell-cell separation, while TGF- β 3 is required for the cell morphological change that enables the migration of cells into the underlying extracellular matrix [21]. Of the different isoforms of TGF- β , TGF- β 2 appeared to be the one that induced EndoMT. Thus, in different EC models including the mouse pancreatic microvascular endothelial cells (MS-1), it has been noted that activation of Smad signals by TGF- β 2 has dual effects on the activation of Rho signals and myocardin-related transcription factor-A (MRTF-A), leading to the mesenchymal transition of MS-1 endothelial cells [86].

Recent studies have investigated the dose effect of TGF- β 1, TGF- β 2, and TGF- β 3 on the induction of EndoMT in invasive colon cancer and have shown that TGF- β 2, by increasing the expression of mesenchymal markers N-cadherin and α -SMA, is the most potent inducer of EndoMT in this model [87]. These findings have been confirmed in endothelial cells HMEC-1 grown in conditioned media from invasive colon cells. An increased production of TGF- β 1 correlates with a significant EndoMT and is associated with an increase of β 3-tubulin expression and phosphorylation [87]. Furthermore, it has also been highlighted that TGF- β 1- and TGF- β 3-induced EndoMT requires a paracrine loop involving TGF- β 2 [88].

Concerning the non-canonical pathway or Smad-independent pathway, TGF- β 2 has been shown to activate PI3K/Akt/mTOR, ERK 1/2, and P38 MAPK pathways. These signaling pathways appear then necessary to promote the increased expression of transcription factor Snail [78]. This direct regulation of Snail by TGF- β 2 has been highlighted in a study conducted on mouse embryonic stem cell-derived endothelial cells (MESECs), where TGF- β 2-induced EndoMT, characterized by a decrease in the expression of the endothelial marker claudin 5 and an increase in expression of the mesenchymal α -SMA [89].

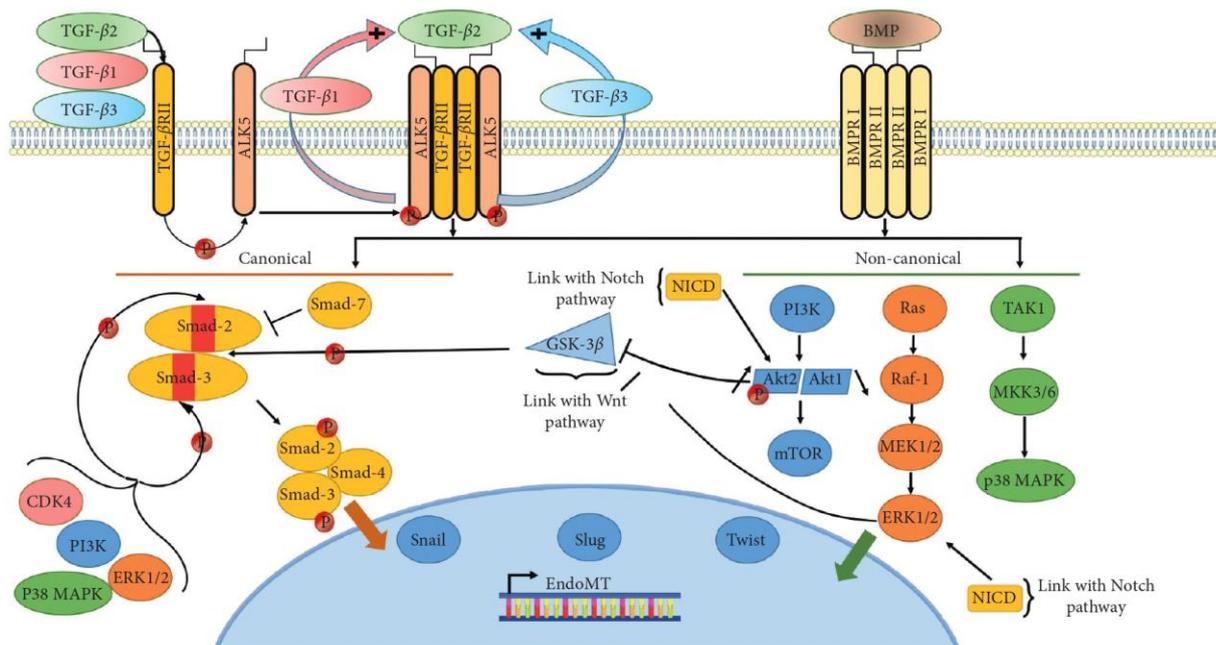


FIGURE 2: Transforming growth factor- β (TGF- β) induced EndoMT. Upon stimulation by TGF- β 1, -2, or -3, type-2 TGF- β receptors phosphorylate ALK5 (type-1 TGF- β receptor) and associate into a heterotetrameric structure which induce Smad-2/3/4 complex formation and translocation to the nucleus. Stimulation by TGF- β 1 or -3 induces a paracrine loop toward a TGF- β 2 stimulation. Smad-7 acts as an inhibitor of Smad association and serves as a negative retro control. TGF- β signaling also induces phosphorylation of ERK 1/2 (extracellular signal-regulated kinases 1/2) and p38 MAPK (p38 mitogen-activated protein kinase). The BMP receptors can also trigger upon stimulation by the BMP ligand canonical Smad pathway and non-canonical ERK pathway. Inside the nucleus, all actors involved stimulate the activity of the transcription factor, mainly Snail, Slug, and Twist, thus initiating EndoMT by promoting transcription of mesenchymal markers and diminishing transcription of endothelial markers. TGF- β signaling crosstalk with several other pathways, including Notch which promotes ERK 1/2 activity and Akt2 isoform activity which will then inhibit GSK-3 β . GSK-3 β , ERK, PI3K, P38, and also CDK4 can phosphorylate Smad-2 and -3 on specific residues in its linker region (in red) promoting Smad signaling in a canonical-independent manner. However, it is worth to note that some studies report the inhibiting effect of linker region phosphorylation, and that the specific effects of this phosphorylation site seem to be cell-type dependent.

Snail is described as one of the major transcription factors involved in cell plasticity, suppressing cell adhesion and promoting EMT [90, 91]. Interestingly, studies have shown that overexpression of Snail in cells is sufficient to induce EMT. If Snail alone is able to induce EMT, additional mechanisms are involved to mediate change in endothelial morphology in the case of EndoMT. One of them relies on the inhibition of GSK-3 β . This protein was identified as a regulator of Snail activity in TGF- β 2-induced-EndoMT [78]. Snail protein stability and nuclear translocation are inhibited through phosphorylation by GSK-3 β [92]. In human cardiac endothelial cells (HCMECs), it has been shown that inhibition of GSK-3 β by TGF- β 2-induced PI3K signaling allows Snail to induce EndoMT by transcriptional modulation. PI3K is also necessary for controlling Snail gene expression, demonstrating a dual role for this pathway in mediating EndoMT [78].

Hypoxia has also been described as a potent inducer of EndoMT. HIF-1, the main effector of the hypoxia pathway, is responsible for driving the expression of VEGF-A to promote angiogenesis. Previous research has identified an active hypoxia response element (HRE) within the

VEGF promoter and implicated that TGF- β can cooperate with hypoxia to enhance VEGF transcription [93], providing some of the first evidence that these two factors can work together to drive angiogenesis. In addition, several studies suggest that hypoxia regulates the expression of TGF- β 1, -2, and -3 [94–96]. Finally, hypoxia also induces the expression of EndoMT-associated transcription factor Snail and Slug [97]. Both of these factors are induced by TGF- β in ECs [98] and were demonstrated to drive EndoMT associated with the sprouting phase of angiogenesis [71].

The Wnt/ β -catenin canonical pathway is another *stimulus* for inducing EndoMT [33, 99]. Wnt signaling is a complex collection of signal transduction pathways mediated by multiple signaling molecules and is critically important for developmental processes, including cell proliferation, differentiation, and tissue patterning [100].

Wnt signaling activates cytoplasmic effectors and regulates the transcription of target genes (Figure 3). β -Catenin is a downstream effector of the Wnt signaling that accumulates in the cytoplasm and eventually translocates into the nucleus to act as a transcriptional coactivator for TCF/LEF transcription factors family members [101]. While the

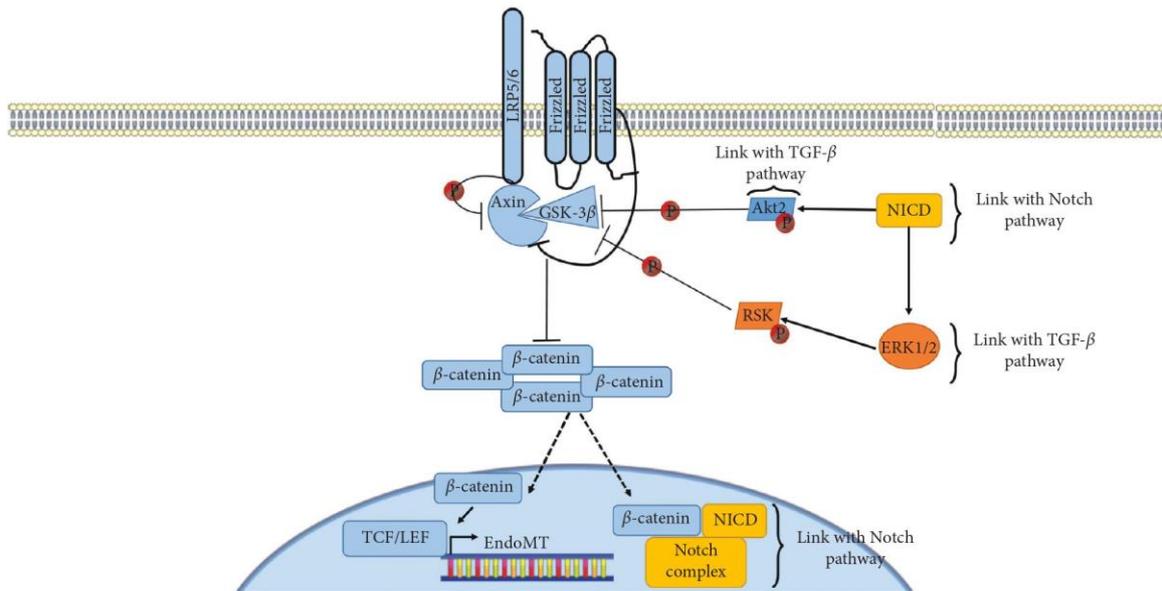


FIGURE 3: Wnt induction of EndoMT. Wnt bound the extracellular part of the Frizzled receptor, while LRP5/6 serves as co-receptors. This causes the complex Axin-GSK-3 β to bind to the cytoplasmic tail of LRP5/6. Therefore, this complex is no longer able to assure the degradation of β -catenin, which accumulates in the cytoplasm and translocates into the nucleus to stimulate the activity of transcription factors of the TCF/LEF families. The Wnt pathway crosstalk with several other pathways: Akt 2 can phosphorylate and thus inhibit GSK-3 β . Moreover, RSK phosphorylation ERK 1/2-dependent RSK phosphorylation leads to inhibition of GSK-3 β .

detailed molecular events and signaling pathways initiating EndoMT have not been clearly elucidated, this canonical β -catenin-dependent Wnt pathway has been found to be involved in EndoMT in both myocardial infarction [99, 102] and in oral squamous cell carcinoma [103].

Reactive oxygen species (ROS) have emerged as an important factor affecting several cancer hallmarks [104]. ROS are involved in the acquisition of self-sufficiency in proliferation signals and in the development of a more aggressive phenotype through matrix metalloproteinase (MMP) secretion and regulation of cellular plasticity. The ROS family includes several molecules, such as hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$), superoxide radical (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), and peroxynitrite (OONO^-), which are produced by normal and pathogenic oxygen metabolism. Several studies have evaluated the role of oxidative stress in the control of EndoMT in endothelial dysfunction [105], atherosclerosis [70], or renal failure secondary to renal ischemia [106]. Treatment with 0.1 to 10 μM H_2O_2 triggered the transformation process in primary EC, as observed by changes in endothelial and mesenchymal markers expression. This effect is mediated by TGF- β 1 secretion and is dependent on Smad-3 activation [105]. Furthermore, it has been reported in HUVEC treated by TGF- β 1 that inhibition of oxidative stress by kallistatin, a plasma protein distributed in blood vessels, is correlated with a significant decrease of EndoMT [35]. In the context of massive oxidative stress such as tissue exposure to ionizing radiation, it has been established that irradiated intestinal endothelial cells undergo endothelial-to-mesenchymal transition. Therefore, radiation-induced EndoMT participates in radiotherapy-induced gut damage such as proctitis [49]. While these findings confirmed a main

role of ROS to induce EndoMT in ECs, little is known about the actual impact of oxidative stress in triggering EndoMT in cancer. However, cancer-associated fibroblasts (CAFs) issued from EndoMT could be important intermediaries through their capacity to significantly produce ROS [107]. Indeed, because ROS are hallmarks of inflammation, known as a common state in tumoral stroma, we can hypothesize a strong link between ROS and EndoMT in the context of cancer.

Taken together, the studies presented in this review clearly illustrate the participation of different signaling pathways in the modulation of EndoMT. However, it is not excluded that other mediators could also be involved. Among these, Notch was identified in EndoMT observed in the cardiovascular pathophysiological context. Notch is defined as a transmembrane receptor and a transcription factor [108]. The Notch signaling is an evolutionary conserved pathway that plays an essential role in both invertebrates and vertebrates, by controlling cellular fate, cell growth, and differentiation. Notch signaling is pleiotropic, influencing embryogenesis, differentiation, and homeostasis in adult tissue, and it contributes to the plasticity and functionality of different cell types. Perturbations in the Notch signaling pathway have been associated with various genetic disorders and cancers [109]. The role of Notch in the control of EndoMT has been mainly shown during heart valves development, arterial-venous differentiation, and remodeling of the primitive vascular plexus [29]. In the embryonic heart, Notch has been identified to promote a TGF- β -mediated EndoMT that leads to development of cardiac valvular. This process is explained by an induction of Snail-1 expression and activity and a downregulation of VE

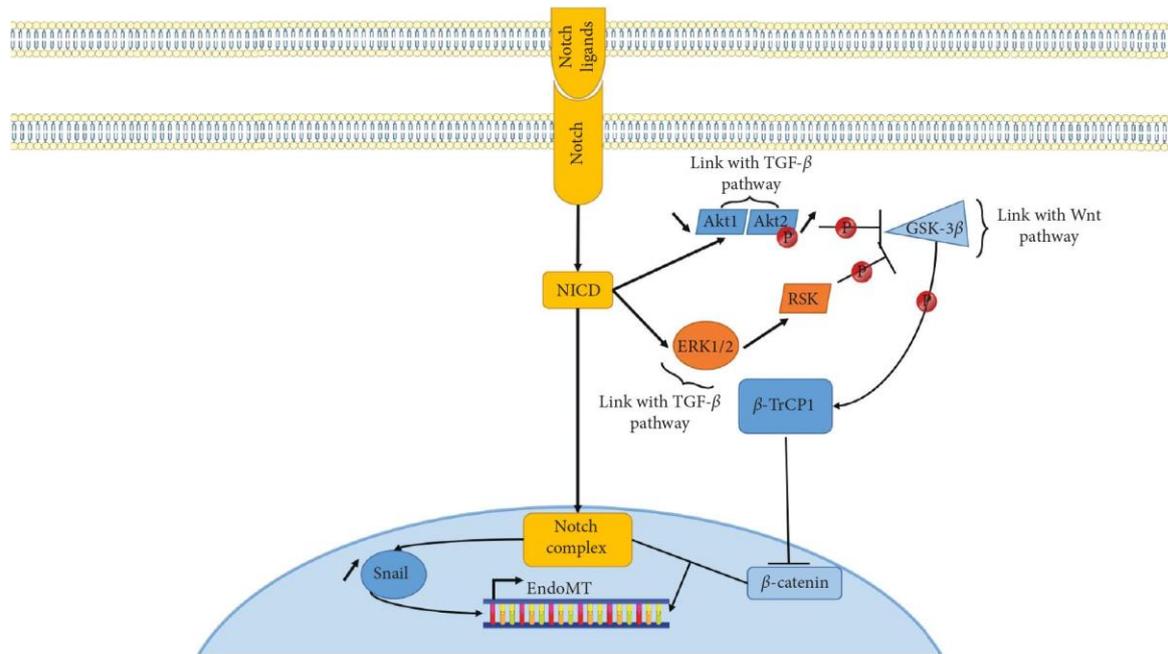


FIGURE 4: Notch induction of EndoMT. Notch receptors' family interacts with diverse ligands via a cell-to-cell contact mechanism. The signal is mediated by the Notch intracellular domain (NICD) through the nucleus to activate a complex of inducers (RBPJ/CBF1/Su(H)) which in turn activates the transcription of genes implicated in EndoMT. This complex also stabilizes the Snail protein. The Notch pathway crosstalks with several other pathways: NICD increases the Akt 2 expression which inhibits GSK-3 β . NICD also activates ERK 1/2, which activates RSK leading to GSK-3 β downregulation. The nuclear Notch complex also interacts with β -catenin, increasing its transcription activity.

cadherin expression [110]. This TGF- β /Notch link has been confirmed in an aortic EC model as active Notch expression promotes EndoMT, resulting in downregulation of VE cadherin and upregulation of mesenchymal genes such as those for fibronectin and Snail-1/2. Furthermore, TGF- β 1 was reported to exacerbate Notch effects by increasing Snail-1 and fibronectin activation [111] (Figure 4). Furthermore, the endothelial overexpression of the transcription factor Hey-2, a well-known Notch effector, has been shown to induce EndoMT in a preclinical model of radiation-induced proctitis [112].

Few studies have assessed the role of Notch in EndoMT during tumorigenesis. Thus, from a xenograft tumor assay of two breast tumor cell lines MDA-MB231 or MCF-7 in NOD/SCID mice, an education of EC by tumors cells through a crosstalk between Notch and TGF- β pathways has been reported. This cooperation generated the formation of a transient mesenchymal/endothelial niche, associated with a significant increase in tumor proliferation, stemness, and invasiveness [113].

5. EndoMT: A Pathophysiological Process Promoting Tumorigenesis

The process of EndoMT initially described in physiological cardiac development has also been identified in the pathological context of cardiac and pulmonary fibrosis [11], atherosclerosis [12], and vascular calcification [114]. Furthermore, increasing evidence implies the process of

EndoMT in the context of cancer as a relevant contributor of the tumor microenvironment plasticity.

5.1. EndoMT and Cancer-Associated Fibroblasts (CAFs). It is clearly established that ECs through the EndoMT process is an important source of CAFs. *In vivo*, use of the gold standard strategy to explore cell lineage conversion, namely, the Cre-LoxP genetic lineage labeling system technology [52], allowed to prove that up to 40% of CAF in pancreas cancer or melanoma model [17] results from EndoMT [46]. These cells are known to facilitate cancer progression [17, 37]. CAFs are now identified as the major contributor to tumor growth and metastatic dissemination [77], mainly through their secretome and release of classical growth factors and chemokines shown to influence different aspects of tumor cell behavior [115]. CAFs issued from EndoMT acquire their activated state and maintain it by various mechanisms including genetic or epigenetic mutations or under the persistent effect of growth factors or specific cytokines produced by tumor microenvironment [79].

During primary cancer progression, CAFs communicate with cancer cells through the secretion of growth factors, chemokines, and cytokines. For instance, CAF-derived TGF- β , epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor (FGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), and matrix metalloproteinase (MMP) have been implicated in epithelial cancer progression [116, 117].

Furthermore, CAFs are able to provide potential oncogenic signals: (i) CAF-derived TGF- β participates in acceleration of cancer cell invasion, and (ii) CAF-derived growth factors and angiogenic factor VEGF can stimulate cancer progression, including angiogenesis [118]. More recently, the role of CAF in tumor angiogenesis has been described in a C8161-HA mouse melanoma model. In this study, the authors established a link between tumor development and inhibition of SERPIN F1 production by activated fibroblasts from tumor microenvironment. This latest inhibition was associated with an increase of angiogenesis and a strong expression of proangiogenic factors [119].

5.2. EndoMT and Extravasation of Tumor Cells. Evidence suggests that ECs are not passive actors during transendothelial migration of cancer cells, as this passage requires profound changes in endothelial junctional protein expression, signaling, permeability, and contractility. EndoMT leads to a deep reorganization of microvessels with a cytoskeletal remodeling, an increase in endothelial barrier permeability linked to loss of adhesion molecules (claudins and VE-cadherin). This active process in the endothelial compartment is compatible with the extravasation of cancer cells, which is the first step of the metastatic process [120]. This hypothesis has been confirmed in a study which evaluated the role of EndoMT induced by TGF- β 1 on various ECs (brain endothelial cells and HUVEC) during melanoma metastatic extravasation. Stimulation of ECs with activated cancer cell line-conditioned medium resulted in TGF- β -dependent decrease of transendothelial electrical resistance (TEER), increase in adhesion between metastatic and ECs, and enhanced transendothelial migration of melanoma cells. These findings suggested that EndoMT may be necessary for an optimal metastatic transendothelial migration and may be one of the potential mechanisms occurring during the complex phenomenon of metastatic extravasation [121].

6. EndoMT and Response to Therapies

As described in this review, EndoMT is found in tumors and is mainly induced by factors issued from the tumor itself or from its educated microenvironment, such as TGF- β . This phenotypic transition is a unique source of CAFs [17] and may also be part of a facilitated extravasation of cancer cells into the blood circulation [121]. Cancer therapies may also be regulating factors of EndoMT. Histone-deacetylase HDAC inhibitor valproic acid, currently under clinical investigation for anticancer therapy, has recently been shown to induce EndoMT *via* a TGF- β 1 signaling pathway [15]. On the contrary, a conjugate of temozolomide and perillyl alcohol, used in a glioblastoma model, inhibits EndoMT and reverts the mesenchymal phenotype of tumor-associated brain EC [122]. Exposure to ionizing radiation also leads to a phenotypic conversion of EC in the colon and lung carcinoma preclinical models [57] but also in normal rectal tissues, leading then to radiation-induced fibrosis [49]. Increasing evidence highlights the importance of EndoMT in

tumor progression, favoring metastasis and being an important source of CAFs. Furthermore, the role of EndoMT in cancer resistance to therapies appears as a novel emerging field with scarce but exciting studies. As mentioned above, radiation induces EndoMT that awakes dormant cancer stem cells from hypoxic regions and polarizes tumor-associated macrophages TAM toward an M2 phenotype, therefore conferring tumor radio-resistance and promoting tumor progression [57]. Resistance to chemotherapies cisplatin and gefitinib in a multicellular lung tumor spheroid model is alleviated when EndoMT in ECs in the spheroid is reversed, implying EndoMT as a resistance factor [123]. In an invasive colon cancer model, EndoMT culminates in the generation of CAF-overexpressing tubulin-3, a known factor of resistance to taxanes-type of chemotherapeutics [87]. The resulting cells of the EndoMT process, namely, the CAF, are well described for their roles in cancer resistance, recently reviewed [16]: they produce soluble factors (IL-6 and IL-8) associated with chemiresistance, and they can control chemotherapy uptake either by reducing expression of drug transporters or by trapping active drugs, limiting their availability to the tumor. CAFs are also known to limit oxidative stress-induced by chemotherapy and therefore to protect the tumor cell from ROS-induced apoptosis. Furthermore, in breast and lung cancers, CAFs have been shown to sustain cancer stemness, by promoting a survival niche for cancer stem cells [124]. Several studies reinforce this notion of a link between EndoMT and stemness. Indeed, radiation-induced EndoMT has been shown to reactivate dormant cancer stem cells CD44v6⁺, driving then tumor regrowth [57]. In a non-tumoral model of pulmonary arterial hypertension (PHA), that share similarities with carcinogenesis (excessive proliferation, apoptotic resistance, and inflammation), expression of the stemness marker CD44v is induced in pulmonary EC undergoing EndoMT and is associated with the increased level of antioxidant GSH molecules [125]. Analogy between PAH and carcinoma suggests that EndoMT could favor survival of either mesenchymal cells (PHA) or tumor cells (carcinoma) in condition of important oxidative stress such as that induced by chemotherapy and radiotherapy. Several works pointed that EndoMT could also induce an abnormal recruitment of pericytes [57] and could give rise to pericyte-like cells within the tumor and abnormally cover the vasculature [58]. These populations of pericytes have been proposed as a signature of tumors refractory to anti-VEGF therapy in at least two different cancer models (pancreas [126] and melanoma [127]), highlighting an implication of EndoMT in tumor stromal resistance. The role of EndoMT needs to be deeply explored and fully understood as this process of cellular plasticity could be envisaged in a close future as the therapeutic strategy.

7. Conclusion

Taken together, the studies presented in this review clearly identify plasticity of ECs as a pillar of tumor development through modification of their phenotype. This plasticity is involved in tumorigenesis and metastatic progression and

appears relevant in resistance therapy. Evidence suggests the existence of a complex signaling network involving TGF- β , Wnt/ β -catenin, and Notch pathways that mediate and control EndoMT. The complexity of these pathways and their potential interconnections suggest that further studies are necessary to better understand their roles in EndoMT in both animal tumor models and in human cancer. Thus, future efforts should be devoted to the exploration of molecular mechanisms involved in this process. These efforts would eventually lead to the development of novel therapeutic approaches, targeting this microenvironmental plasticity to improve tumor treatment and limit metastatic dissemination and resistance to various anti-tumor therapies.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Authors' Contributions

Isabelle Corre and Nicolas Clere contributed equally to this work.

Acknowledgments

The authors thank the Région Pays de la Loire for the financial support of the TRENDOMOS project (Pari Scientifique Grant). The authors are fully indebted to the Comité départemental du Maine et Loire de la Ligue contre le Cancer and the Comité départemental de Loire Atlantique de la Ligue contre le Cancer for their support. VP is the recipient of a scholar PhD fellowship, from the French Research Ministry.

References

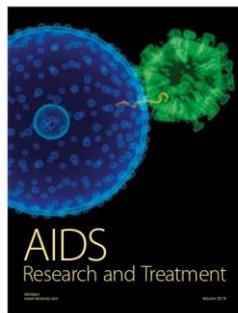
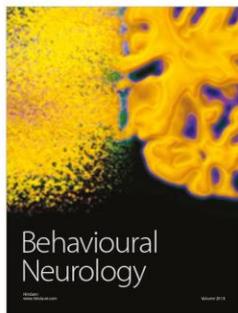
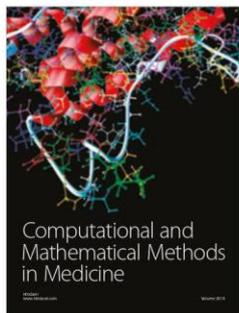
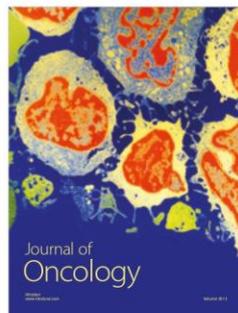
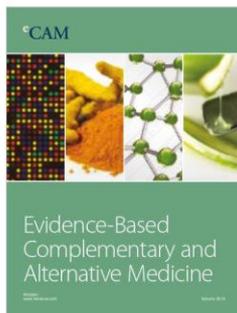
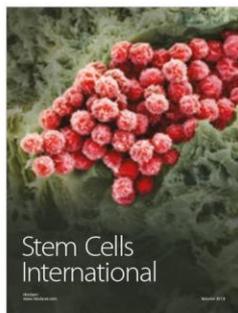
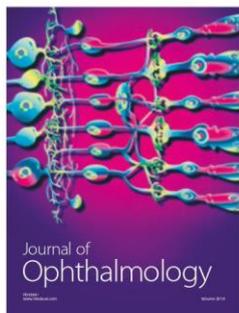
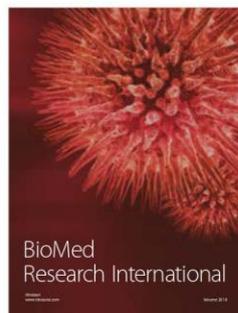
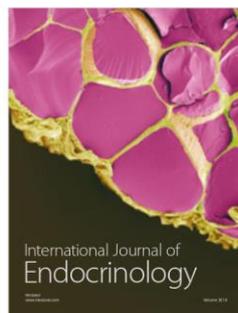
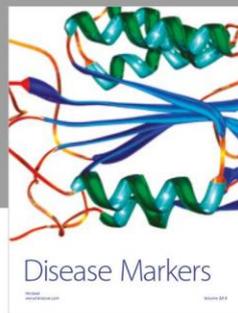
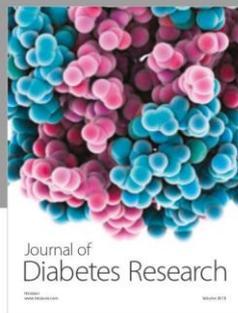
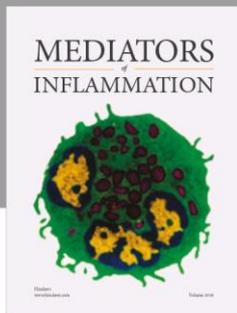
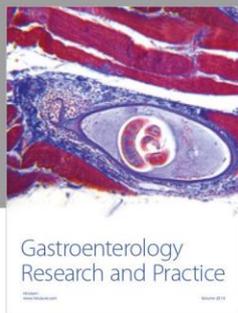
- [1] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "The hallmarks of cancer," *Cell*, vol. 100, no. 1, pp. 57–70, 2000.
- [2] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of cancer: the next generation," *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, 2011.
- [3] D. F. Quail and J. A. Joyce, "Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis," *Nature Medicine*, vol. 19, no. 11, pp. 1423–1437, 2013.
- [4] D. Hanahan and L. M. Coussens, "Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment," *Cancer Cell*, vol. 21, no. 3, pp. 309–322, 2012.
- [5] F. S. Jones and P. Rous, "On the cause of the localization of secondary tumors at points of injury," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 20, no. 4, pp. 404–412, 1914.
- [6] J. A. Joyce and D. T. Fearon, "T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment," *Science*, vol. 348, no. 6230, pp. 74–80, 2015.
- [7] L. M. Sherwood, E. E. Parris, and J. Folkman, "Tumor angiogenesis: therapeutic implications," *New England Journal of Medicine*, vol. 285, no. 21, pp. 1182–1186, 1971.
- [8] J. Folkman, "Tumor angiogenesis," *Advances in Cancer Research*, vol. 19, pp. 331–358, 1974.
- [9] I. Nachmany, Y. Bogoch, G. Friedlander-Malik et al., "The transcriptional profile of circulating myeloid derived suppressor cells correlates with tumor development and progression in mouse," *Genes & Immunity*, vol. 1, no. 5, 2019.
- [10] F. T. Wang, W. Sun, J. T. Zhang, and Y. Z. Fan, "Cancer-associated fibroblast regulation of tumor neo-angiogenesis as a therapeutic target in cancer," *Oncology Letters*, vol. 17, no. 3, pp. 3055–3065, 2019.
- [11] L. Hong, X. Du, W. Li, Y. Mao, L. Sun, and X. Li, "EndMT: a promising and controversial field," *European Journal of Cell Biology*, vol. 97, no. 7, pp. 493–500, 2018.
- [12] G. Krenning, V. G. Barauna, J. E. Krieger, M. C. Harmsen, and J.-R. A. J. Moonen, "Endothelial plasticity: shifting phenotypes through force feedback," *Stem Cells International*, vol. 2016, Article ID 9762959, 15 pages, 2016.
- [13] H. Zhang, Y. Liu, L. Yan et al., "Bone morphogenetic protein-7 inhibits endothelial-mesenchymal transition in pulmonary artery endothelial cell under hypoxia," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 233, no. 5, pp. 4077–4090, 2018.
- [14] Á. Gasparics, G. Kökény, A. Fintha et al., "Alterations in SCAI expression during cell plasticity, fibrosis and cancer," *Pathology & Oncology Research*, vol. 24, no. 3, pp. 641–651, 2018.
- [15] S. Murugavel, A. Bugyei-Twum, P. N. Matkar et al., "Valproic acid induces endothelial-to-mesenchymal transition-like phenotypic switching," *Front Pharmacology*, vol. 9, p. 737, 2018.
- [16] X. Chen and E. Song, "Turning foes to friends: targeting cancer-associated fibroblasts," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 18, no. 2, pp. 99–115, 2019.
- [17] E. M. Zeisberg, S. Potenta, L. Xie, M. Zeisberg, and R. Kalluri, "Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts," *Cancer Research*, vol. 67, no. 21, pp. 10123–10128, 2007.
- [18] R. R. Markwald, T. P. Fitzharris, and W. N. A. Smith, "Structural analysis of endocardial cytodifferentiation," *Developmental Biology*, vol. 42, no. 1, pp. 160–180, 1975.
- [19] Y. Nakajima, V. Mironov, T. Yamagishi, H. Nakamura, and R. R. Markwald, "Expression of smooth muscle alpha-actin in mesenchymal cells during formation of avian endocardial cushion tissue: a role for transforming growth factor β 3," *Developmental Dynamics*, vol. 209, no. 3, pp. 296–309, 1997.
- [20] M. Azhar, R. B. Runyan, C. Gard et al., "Ligand-specific function of transforming growth factor beta in epithelial-mesenchymal transition in heart development," *Developmental Dynamics*, vol. 238, no. 2, pp. 431–442, 2009.
- [21] A. S. Boyer, C. P. Erickson, and R. B. Runyan, "Epithelial-mesenchymal transformation in the embryonic heart is mediated through distinct pertussis toxin-sensitive and TGF β signal transduction mechanisms," *Developmental Dynamics*, vol. 214, no. 1, pp. 81–91, 1999.
- [22] M.-J. Goumans, A. J. van Zonneveld, and P. T. Dijke, "Transforming growth factor β -induced endothelial-to-mesenchymal transition: a switch to cardiac fibrosis?," *Trends in Cardiovascular Medicine*, vol. 18, no. 8, pp. 293–298, 2008.
- [23] Y. Hao, D. Baker, and P. T. Dijke, "TGF- β -mediated epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, no. 11, p. 2767, 2019.
- [24] L. Vermeulen, F. D. S. E. Melo, M. van der Heijden et al., "Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment," *Nature Cell Biology*, vol. 12, no. 5, pp. 468–476, 2010.
- [25] I. Espinoza, R. Pochampally, F. Xing, K. Watabe, and L. Miele, "Notch signaling: targeting cancer stem cells and epithelial-to-mesenchymal transition," *OncoTargets and Therapy*, vol. 6, pp. 1249–1259, 2013.

- [26] S. Piera-Velazquez and S. A. Jimenez, "Endothelial to mesenchymal transition: role in physiology and in the pathogenesis of human diseases," *Physiological Reviews*, vol. 99, no. 2, pp. 1281–1324, 2019.
- [27] A. Zhong, Z. Mirzaei, and C. A. Simmons, "The roles of matrix stiffness and β -catenin signaling in endothelial-to-mesenchymal transition of aortic valve endothelial cells," *Cardiovascular Engineering and Technology*, vol. 9, no. 2, pp. 158–167, 2018.
- [28] S. Guo and X. Chen, "The human Nox4: gene, structure, physiological function and pathological significance," *Journal of Drug Targeting*, vol. 23, no. 10, pp. 888–896, 2015.
- [29] F. Lin, N. Wang, and T.-C. Zhang, "The role of endothelial-mesenchymal transition in development and pathological process," *IUBMB Life*, vol. 64, no. 9, pp. 717–723, 2012.
- [30] A. M. Eastham, H. Spencer, F. Soncin et al., "Epithelial-mesenchymal transition events during human embryonic stem cell differentiation," *Cancer Research*, vol. 67, no. 23, pp. 11254–11262, 2007.
- [31] U. Ullmann, P. In't Veld, C. Gilles et al., "Epithelial-mesenchymal transition process in human embryonic stem cells cultured in feeder-free conditions," *MHR: Basic Science of Reproductive Medicine*, vol. 13, no. 1, pp. 21–32, 2007.
- [32] R. B. Good, A. J. Gilbane, S. L. Trinder et al., "Endothelial to mesenchymal transition contributes to endothelial dysfunction in pulmonary arterial hypertension," *American Journal of Pathology*, vol. 185, no. 7, pp. 1850–1858, 2015.
- [33] S. Piera-Velazquez and S. A. Jimenez, "Molecular mechanisms of endothelial to mesenchymal cell transition (EndoMT) in experimentally induced fibrotic diseases," *Fibrogenesis & Tissue Repair*, vol. 5, no. S1, p. S7, 2012.
- [34] J. Liu, F. Dong, J. Jeong, T. Masuda, and C. G. Lobe, "Constitutively active Notch1 signaling promotes endothelial-mesenchymal transition in a conditional transgenic mouse model," *International Journal of Molecular Medicine*, vol. 34, no. 3, pp. 669–676, 2014.
- [35] Y. Guo, P. Li, G. Bledsoe, Z.-R. Yang, L. Chao, and J. Chao, "Kallistatin inhibits TGF- β -induced endothelial-mesenchymal transition by differential regulation of microRNA-21 and eNOS expression," *Experimental Cell Research*, vol. 337, no. 1, pp. 103–110, 2015.
- [36] A. C. Dudley, Z. A. Khan, S.-C. Shih et al., "Calcification of multipotent prostate tumor endothelium," *Cancer Cell*, vol. 14, no. 3, pp. 201–211, 2008.
- [37] W. M. Ciszewski, K. Sobierajska, M. E. Wawro et al., "The ILK-MMP9-MRTF axis is crucial for EndMT differentiation of endothelial cells in a tumor microenvironment," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Molecular Cell Research*, vol. 1864, no. 12, pp. 2283–2296, 2017.
- [38] G. Paranya, S. Vineberg, E. Dvorin et al., "Aortic valve endothelial cells undergo transforming growth factor- β -mediated and non-transforming growth factor- β -mediated transdifferentiation in vitro," *American Journal of Pathology*, vol. 159, no. 4, pp. 1335–1343, 2001.
- [39] L. Nie, O. Lyros, R. Medda et al., "Endothelial-mesenchymal transition in normal human esophageal endothelial cells cocultured with esophageal adenocarcinoma cells: role of IL-1 β and TGF- β 2," *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, vol. 307, no. 9, pp. C859–C877, 2014.
- [40] N. Nagai, H. Ohguchi, R. Nakaki et al., "Downregulation of ERG and FLI1 expression in endothelial cells triggers endothelial-to-mesenchymal transition," *PLoS Genetics*, vol. 14, no. 11, article e1007826, 2018.
- [41] C.-C. Lu, M.-M. Liu, M. Clinton, G. Culshaw, D. J. Argyle, and B. M. Corcoran, "Developmental pathways and endothelial to mesenchymal transition in canine myxomatous mitral valve disease," *Veterinary Journal*, vol. 206, no. 3, pp. 377–384, 2015.
- [42] J. G. Lee and E. P. Kay, "FGF-2-mediated signal transduction during endothelial mesenchymal transformation in corneal endothelial cells," *Experimental Eye Research*, vol. 83, no. 6, pp. 1309–1316, 2006.
- [43] S. Piera-Velazquez, F. A. Mendoza, and S. A. Jimenez, "Endothelial to mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of human fibrotic diseases," *Journal of Clinical Medicine*, vol. 5, no. 4, p. 45, 2016.
- [44] J. G. Cho, A. Lee, W. Chang, M.-S. Lee, and J. Kim, "Endothelial to mesenchymal transition represents a key link in the interaction between inflammation and endothelial dysfunction," *Frontiers in Immunology*, vol. 9, p. 294, 2018.
- [45] D. Medici, E. M. Shore, V. Y. Lounev, F. S. Kaplan, R. Kalluri, and B. R. Olsen, "Conversion of vascular endothelial cells into multipotent stem-like cells," *Nature Medicine*, vol. 16, no. 12, pp. 1400–1406, 2010.
- [46] S. Potenta, E. Zeisberg, and R. Kalluri, "The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression," *British Journal of Cancer*, vol. 99, no. 9, pp. 1375–1379, 2008.
- [47] A. Herrera, M. Herrera, N. Guerra-Perez et al., "Endothelial cell activation on 3D-matrices derived from PDGF-BB-stimulated fibroblasts is mediated by Snail1," *Oncogenesis*, vol. 7, no. 9, p. 76, 2018.
- [48] D. M. Charytan, R. Padera, A. M. Helfand et al., "Increased concentration of circulating angiogenesis and nitric oxide inhibitors induces endothelial to mesenchymal transition and myocardial fibrosis in patients with chronic kidney disease," *International Journal of Cardiology*, vol. 176, no. 1, pp. 99–109, 2014.
- [49] E. Mintet, E. Rannou, V. Buard et al., "Identification of endothelial-to-mesenchymal transition as a potential participant in radiation proctitis," *American Journal of Pathology*, vol. 185, no. 9, pp. 2550–2562, 2015.
- [50] F. A. Mendoza, S. Piera-Velazquez, J. L. Farber, C. Feghali-Bostwick, and S. A. Jiménez, "Endothelial cells expressing endothelial and mesenchymal cell gene products in lung tissue from patients with systemic sclerosis-associated interstitial lung disease," *Arthritis & Rheumatology*, vol. 68, no. 1, pp. 210–217, 2016.
- [51] C. S. Fan, W.-S. Chen, L.-L. Chen et al., "Osteopontin-integrin engagement induces HIF-1 α -TCF12-mediated endothelial-mesenchymal transition to exacerbate colorectal cancer," *Oncotarget*, vol. 9, no. 4, pp. 4998–5015, 2018.
- [52] Y. Li, K. O. Lui, and B. Zhou, "Reassessing endothelial-to-mesenchymal transition in cardiovascular diseases," *Nature Reviews Cardiology*, vol. 15, no. 8, pp. 445–456, 2018.
- [53] E. M. Zeisberg, O. Tarnavski, M. Zeisberg et al., "Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis," *Nature Medicine*, vol. 13, no. 8, pp. 952–961, 2007.
- [54] E. M. Zeisberg, S. E. Potenta, H. Sugimoto, M. Zeisberg, and R. Kalluri, "Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition," *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 19, no. 12, pp. 2282–2287, 2008.
- [55] S. Xavier, R. Vasko, K. Matsumoto et al., "Curtailling endothelial TGF- β signaling is sufficient to reduce endothelial-mesenchymal transition and fibrosis in CKD," *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 26, no. 4, pp. 817–829, 2015.

- [56] B. C. Cooley, J. Nevado, J. Mellad et al., "TGF- β signaling mediates endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT) during vein graft remodeling," *Science Translational Medicine*, vol. 6, no. 227, article 227ra34, 2014.
- [57] S. H. Choi, A.-R. Kim, J.-K. Nam et al., "Tumour-vasculature development via endothelial-to-mesenchymal transition after radiotherapy controls CD44v6⁺ cancer cell and macrophage polarization," *Nature Communications*, vol. 9, no. 1, p. 5108, 2018.
- [58] C. Anderberg, S. I. Cunha, Z. Zhai et al., "Deficiency for endoglin in tumor vasculature weakens the endothelial barrier to metastatic dissemination," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 210, no. 3, pp. 563–579, 2013.
- [59] F. U. Ferreira, L. E. B. Souza, C. H. Thomé et al., "Endothelial cells tissue-specific origins affects their responsiveness to TGF- β 2 during endothelial-to-mesenchymal transition," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, no. 3, p. 458, 2019.
- [60] S. Song, M. Zhang, Z. Yi et al., "The role of PDGF-B/TGF- β 1/nephrin network in regulating endothelial-to-mesenchymal transition in pulmonary artery remodeling," *Cellular Signalling*, vol. 28, no. 10, pp. 1489–1501, 2016.
- [61] L. Pérez, N. Muñoz-Durango, C. A. Riedel et al., "Endothelial-to-mesenchymal transition: cytokine-mediated pathways that determine endothelial fibrosis under inflammatory conditions," *Cytokine & Growth Factor Reviews*, vol. 33, pp. 41–54, 2017.
- [62] C. D. Trolletti, R. D. Fontijn, E. Gowing et al., "Inflammation-induced endothelial to mesenchymal transition promotes brain endothelial cell dysfunction and occurs during multiple sclerosis pathophysiology," *Cell Death & Disease*, vol. 10, no. 2, p. 45, 2019.
- [63] I. Sniegon, M. Prieß, J. Heger, R. Schulz, and G. Euler, "Endothelial mesenchymal transition in hypoxic microvascular endothelial cells and paracrine induction of cardiomyocyte apoptosis are mediated via TGF β ₁/SMAD signaling," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 18, no. 11, p. 2290, 2017.
- [64] F. Rieder, S. P. Kessler, G. A. West et al., "Inflammation-induced endothelial-to-mesenchymal transition: a novel mechanism of intestinal fibrosis," *American Journal of Pathology*, vol. 179, no. 5, pp. 2660–2673, 2011.
- [65] V. J. Thannickal, C. A. Henke, J. C. Horowitz et al., "Matrix biology of idiopathic pulmonary fibrosis: a workshop report of the national heart, lung, and blood institute," *American Journal of Pathology*, vol. 184, no. 6, pp. 1643–1651, 2014.
- [66] C. Zhou, M. R. Moustafa, L. Cao et al., "Modeling and multiscale characterization of the quantitative imaging based fibrosis index reveals pathophysiological, transcriptome and proteomic correlates of lung fibrosis induced by fractionated irradiation," *International Journal of Cancer*, vol. 144, no. 12, pp. 3160–3173, 2019.
- [67] M.-H. Yang, M.-Z. Wu, S.-H. Chiou et al., "Direct regulation of TWIST by HIF-1 α promotes metastasis," *Nature Cell Biology*, vol. 10, no. 3, pp. 295–305, 2008.
- [68] M. Jo, R. D. Lester, V. Montel, B. Eastman, S. Takimoto, and S. L. Gonias, "Reversibility of epithelial-mesenchymal transition (EMT) induced in breast cancer cells by activation of urokinase receptor-dependent cell signaling," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, no. 34, pp. 22825–22833, 2009.
- [69] M. Ozawa and W. Kobayashi, "Reversibility of the snail-induced epithelial-mesenchymal transition revealed by the Cre-loxP system," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 458, no. 3, pp. 608–613, 2015.
- [70] M. Mahmoud, C. Souilhol, J. Serbanovic-Canic, and P. Evans, "GATA4-twist1 signalling in disturbed flow-induced atherosclerosis," *Cardiovascular Drugs and Therapy*, vol. 33, no. 2, pp. 231–237, 2019.
- [71] K. M. Welch-Reardon, S. M. Ehsan, K. Wang et al., "Angiogenic sprouting is regulated by endothelial cell expression of slug," *Journal of Cell Science*, vol. 127, no. 9, pp. 2017–2028, 2014.
- [72] T.-S. Huang, Y.-J. Chen, T.-Y. Chou et al., "Oestrogen-induced angiogenesis promotes adenomyosis by activating the slug-VEGF axis in endometrial epithelial cells," *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, vol. 18, no. 7, pp. 1358–1371, 2014.
- [73] A. Gu, Y. Jie, Q. Yao, Y. Zhang, and E. Mingyan, "Slug is associated with tumor metastasis and angiogenesis in ovarian cancer," *Reproductive Sciences*, vol. 24, no. 2, pp. 291–299, 2017.
- [74] E. Ubil, J. Duan, I. C. L. Pillai et al., "Mesenchymal-endothelial transition contributes to cardiac neovascularization," *Nature*, vol. 514, no. 7524, pp. 585–590, 2014.
- [75] D. W. Burt, J. M. Boswell, I. R. Paton, and S. C. Butterwith, "Multiple growth factor mRNAs are expressed in chicken adipocyte precursor cells," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 187, no. 3, pp. 1298–1305, 1992.
- [76] A. P. Hinck, "Structural studies of the TGF- β s and their receptors—insights into evolution of the TGF- β superfamily," *FEBS Letters*, vol. 586, no. 14, pp. 1860–1870, 2012.
- [77] P. Xu, J. Liu, and R. Derynck, "Post-translational regulation of TGF- β receptor and Smad signaling," *FEBS Letters*, vol. 586, no. 14, pp. 1871–1884, 2012.
- [78] D. Medici, S. Potenta, and R. Kalluri, "Transforming growth factor- β 2 promotes Snail-mediated endothelial-mesenchymal transition through convergence of Smad-dependent and Smad-independent signalling," *Biochemical Journal*, vol. 437, no. 3, pp. 515–520, 2011.
- [79] Y. Inoue and T. Imamura, "Regulation of TGF- β family signaling by E3 ubiquitin ligases," *Cancer Science*, vol. 99, no. 11, pp. 2107–2112, 2008.
- [80] K. Miyazono, P. T. Dijke, and C.-H. Heldin, "TGF- β signaling by Smad proteins," *Advances in Immunology*, vol. 75, pp. 115–157, 2000.
- [81] Y. E. Zhang, "Mechanistic insight into contextual TGF- β signaling," *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 51, pp. 1–7, 2018.
- [82] D. Kamato, M. A. Rostam, T. J. Piva et al., "Transforming growth factor β -mediated site-specific Smad linker region phosphorylation in vascular endothelial cells," *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 66, no. 12, pp. 1722–1733, 2014.
- [83] H. Ungefroren, "TGF- β signaling in cancer: control by negative regulators and crosstalk with proinflammatory and fibrogenic pathways," *Cancers*, vol. 11, no. 3, p. 384, 2019.
- [84] G. Sánchez-Duffhues, A. García de Vinuesa, and P. T. Dijke, "Endothelial-to-mesenchymal transition in cardiovascular diseases: developmental signaling pathways gone awry," *Developmental Dynamics*, vol. 247, no. 3, pp. 492–508, 2018.
- [85] M. E. Mercado-Pimentel and R. B. Runyan, "Multiple transforming growth factor- β isoforms and receptors function during epithelial-mesenchymal cell transformation in the embryonic heart," *Cells Tissues Organs*, vol. 185, no. 1–3, pp. 146–156, 2007.
- [86] H. Mihira, H. I. Suzuki, Y. Akatsu et al., "TGF- β -induced mesenchymal transition of MS-1 endothelial cells requires

- Smad-dependent cooperative activation of Rho signals and MRTF-A,” *Journal of Biochemistry*, vol. 151, no. 2, pp. 145–156, 2012.
- [87] M. E. Wawro, K. Chojnacka, K. Wieczorek-Szukała, K. Sobierajska, and J. Niewiarowska, “Invasive colon cancer cells induce transdifferentiation of endothelium to cancer-associated fibroblasts through microtubules enriched in tubulin- β 3,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, no. 1, p. 53, 2018.
- [88] H. Sabbineni, A. Verma, and P. R. Somanath, “Isoform-specific effects of transforming growth factor β on endothelial-to-mesenchymal transition,” *Journal of Cellular Physiology*, vol. 233, no. 11, pp. 8418–8428, 2018.
- [89] T. Kokudo, Y. Suzuki, Y. Yoshimatsu, T. Yamazaki, T. Watabe, and K. Miyazono, “Snail is required for TGF β -induced endothelial-mesenchymal transition of embryonic stem cell-derived endothelial cells,” *Journal of Cell Science*, vol. 121, no. 20, pp. 3317–3324, 2008.
- [90] A. Cano, M. A. Pérez-Moreno, I. Rodrigo et al., “The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression,” *Nature Cell Biology*, vol. 2, no. 2, pp. 76–83, 2000.
- [91] G. Vetter, A. Saumet, M. Moes et al., “miR-661 expression in SNAI1-induced epithelial to mesenchymal transition contributes to breast cancer cell invasion by targeting Nectin-1 and StarD10 messengers,” *Oncogene*, vol. 29, no. 31, pp. 4436–4448, 2010.
- [92] B. P. Zhou, J. Deng, W. Xia et al., “Dual regulation of Snail by GSK-3 β -mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition,” *Nature Cell Biology*, vol. 6, no. 10, pp. 931–940, 2004.
- [93] T. Sánchez-Elsner, L. M. Botella, B. Velasco, A. Corbí, L. Attisano, and C. Bernabéu, “Synergistic cooperation between hypoxia and transforming growth factor- β pathways on human vascular endothelial growth factor gene expression,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 42, pp. 38527–38535, 2001.
- [94] I. Caniggia, H. Mostachfi, J. Winter et al., “Hypoxia-inducible factor-1 mediates the biological effects of oxygen on human trophoblast differentiation through TGF β 3,” *Journal of Clinical Investigation*, vol. 105, no. 5, pp. 577–587, 2000.
- [95] S.-P. Hung, M.-H. Yang, K.-F. Tseng, and O. K. Lee, “Hypoxia-induced secretion of TGF- β 1 in mesenchymal stem cell promotes breast cancer cell progression,” *Cell Transplantation*, vol. 22, no. 10, pp. 1869–1882, 2013.
- [96] H. Zhang, H. O. Akman, E. L. P. Smith, J. Zhao, J. E. Murphy-Ullrich, and O. A. Batuman, “Cellular response to hypoxia involves signaling via Smad proteins,” *Blood*, vol. 101, no. 6, pp. 2253–2260, 2003.
- [97] S. M. Ehsan, K. M. Welch-Reardon, M. L. Waterman, C. C. W. Hughes, and S. C. George, “A three-dimensional in vitro model of tumor cell intravasation,” *Integrative Biology*, vol. 6, no. 6, pp. 603–610, 2014.
- [98] H. Zhang, A. von Gise, Q. Liu et al., “Yap1 is required for endothelial to mesenchymal transition of the atrioventricular cushion,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 289, no. 27, pp. 18681–18692, 2014.
- [99] O. Aisagbonhi, M. Rai, S. Ryzhov, N. Atria, I. Feoktistov, and A. K. Hatzopoulos, “Experimental myocardial infarction triggers canonical Wnt signaling and endothelial-to-mesenchymal transition,” *Disease Models & Mechanisms*, vol. 4, no. 4, pp. 469–483, 2011.
- [100] S. Foulquier, E. P. Daskalopoulos, G. Lluri, K. C. M. Hermans, A. Deb, and W. M. Blankesteijn, “Wnt signaling in cardiac and vascular disease,” *Pharmacological Reviews*, vol. 70, no. 1, pp. 68–141, 2018.
- [101] K. N. Schaefer and M. Peifer, “Wnt/Beta-catenin signaling regulation and a role for biomolecular condensates,” *Developmental Cell*, vol. 48, no. 4, pp. 429–444, 2019.
- [102] J.-Y. Hahn, H.-J. Cho, J.-W. Bae et al., “ β -Catenin overexpression reduces myocardial infarct size through differential effects on cardiomyocytes and cardiac fibroblasts,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 41, pp. 30979–30989, 2006.
- [103] S.-H. Wang, J. S. Chang, J.-R. Hsiao et al., “Tumour cell-derived Wnt5B modulates in vitro lymphangiogenesis via induction of partial endothelial-mesenchymal transition of lymphatic endothelial cells,” *Oncogene*, vol. 36, no. 11, pp. 1503–1515, 2017.
- [104] S. Kumari, A. K. Badana, G. M. Mohan, G. Shailender, R. Malla et al., “Reactive oxygen species: a key constituent in cancer survival,” *Biomark Insights*, vol. 13, article 1177271918755391, 2018.
- [105] I. Montorfano, A. Becerra, R. Cerro et al., “Oxidative stress mediates the conversion of endothelial cells into myofibroblasts via a TGF- β 1 and TGF- β 2-dependent pathway,” *Laboratory Investigation*, vol. 94, no. 10, pp. 1068–1082, 2014.
- [106] D. Patschan, K. Schwarze, E. Henze, S. Patschan, and G. A. Müller, “The endothelial-to-mesenchymal transition and endothelial cilia in EPC-mediated postischemic kidney protection,” *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, vol. 310, no. 7, pp. F679–F687, 2016.
- [107] N. Sampson, E. Brunner, A. Weber et al., “Inhibition of Nox4-dependent ROS signaling attenuates prostate fibroblast activation and abrogates stromal-mediated protumorigenic interactions,” *International Journal of Cancer*, vol. 143, no. 2, pp. 383–395, 2018.
- [108] U.-M. Fiuza and A. M. Arias, “Cell and molecular biology of notch,” *Journal of Endocrinology*, vol. 194, no. 3, pp. 459–474, 2007.
- [109] K. G. Guruharsha, M. W. Kankel, and S. Artavanis-Tsakonas, “The notch signalling system: recent insights into the complexity of a conserved pathway,” *Nature Reviews Genetics*, vol. 13, no. 9, pp. 654–666, 2012.
- [110] L. A. Timmerman, J. Grego-Bessa, A. Raya et al., “Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation,” *Genes & Development*, vol. 18, no. 1, pp. 99–115, 2004.
- [111] A. Frías, G. Lambies, R. Viñas-Castells et al., “A switch in Akt isoforms is required for notch-induced Snail1 expression and protection from cell death,” *Molecular and Cellular Biology*, vol. 36, no. 6, pp. 923–940, 2016.
- [112] E. Mintet, J. Lavigne, V. Paget et al., “Endothelial Hey2 deletion reduces endothelial-to-mesenchymal transition and mitigates radiation proctitis in mice,” *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, p. 4933, 2017.
- [113] P. Ghiabi, J. Jiang, J. Pasquier et al., “Breast cancer cells promote a notch-dependent mesenchymal phenotype in endothelial cells participating to a pro-tumoral niche,” *Journal of Translational Medicine*, vol. 13, no. 1, p. 27, 2015.
- [114] X. Cui, Y. W. Lu, V. Lee et al., “Venous endothelial marker COUP-TFII regulates the distinct pathologic potentials of adult arteries and veins,” *Scientific Reports*, vol. 5, no. 1, p. 16193, 2015.
- [115] M. Allen and J. L. Jones, “Jekyll and Hyde: the role of the microenvironment on the progression of cancer,” *Journal of Pathology*, vol. 223, no. 2, pp. 162–176, 2011.

- [116] N. A. Bhowmick, A. Chytil, D. Plieth et al., "TGF-signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia," *Science*, vol. 303, no. 5659, pp. 848–851, 2004.
- [117] R. Kalluri and M. Zeisberg, "Fibroblasts in cancer," *Nature Reviews Cancer*, vol. 6, no. 5, pp. 392–401, 2006.
- [118] K. Ishii, A. Mizokami, T. Tsunoda et al., "Heterogenous induction of carcinoma-associated fibroblast-like differentiation in normal human prostatic fibroblasts by co-culturing with prostate cancer cells," *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 112, no. 12, pp. 3604–3611, 2011.
- [119] N. G. Nwani, M. L. Deguiz, B. Jimenez et al., "Melanoma cells block PEDF production in fibroblasts to induce the tumor-promoting phenotype of cancer-associated fibroblasts," *Cancer Research*, vol. 76, no. 8, pp. 2265–2276, 2016.
- [120] Á. Gasparics, L. Rosivall, I. A. Krizbai, and A. Sebe, "When the endothelium scores an own goal: endothelial cells actively augment metastatic extravasation through endothelial-mesenchymal transition," *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, vol. 310, no. 9, pp. H1055–H1063, 2016.
- [121] I. A. Krizbai, Á. Gasparics, P. Nagyószai et al., "Endothelial-mesenchymal transition of brain endothelial cells: possible role during metastatic extravasation," *PLoS One*, vol. 10, no. 3, Article ID e0119655, 2015.
- [122] N. I. Marín-Ramos, N. Jhaveri, T. Z. Thein, R. A. Fayngor, T. C. Chen, and F. M. Hofman, "NEO212, a conjugate of temozolomide and perillyl alcohol, blocks the endothelial-to-mesenchymal transition in tumor-associated brain endothelial cells in glioblastoma," *Cancer Letters*, vol. 442, pp. 170–180, 2019.
- [123] S.-H. Kim, Y. Song, and H. R. Seo, "GSK-3 β regulates the endothelial-to-mesenchymal transition via reciprocal crosstalk between NSCLC cells and HUVECs in multicellular tumor spheroid models," *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, vol. 38, no. 1, p. 46, 2019.
- [124] S. Su, J. Chen, H. Yao et al., "CD10+GPR77+ cancer-associated fibroblasts promote cancer formation and chemoresistance by sustaining cancer stemness," *Cell*, vol. 172, no. 4, pp. 841–856, 2018.
- [125] S. Isobe, M. Kataoka, J. Endo et al., "Endothelial-mesenchymal transition drives expression of CD44 variant and α CT in pulmonary hypertension," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2019.
- [126] I. Helfrich, I. Scheffrahn, S. Bartling et al., "Resistance to antiangiogenic therapy is directed by vascular phenotype, vessel stabilization, and maturation in malignant melanoma," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 207, no. 3, pp. 491–503, 2010.
- [127] M. Franco, P. Roswall, E. Cortez, D. Hanahan, and K. Pietras, "Pericytes promote endothelial cell survival through induction of autocrine VEGF-A signaling and Bcl-w expression," *Blood*, vol. 118, no. 10, pp. 2906–2917, 2011.



5.3. EndMT & EMT : Les CAFs comme agents commun dans la tumorigénèse du mélanome

Comme mentionné précédemment le mélanome est un cancer particulièrement agressif qui bénéficie grandement de sa capacité à former des métastases (210) et de la coopération de son MET (198). Les phénomènes de transition phénotypiques comme l'EndMT et la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) jouant un rôle majeur dans l'acquisition d'une mobilité invasive, il est particulièrement intéressant d'adresser le rôle de ses deux mécanismes dans le développement du mélanome.

Ainsi, Krizbai et coll, ont démontré que le TGF- β 1 produit par des cellules de mélanomes, et présent dans leur milieu conditionné, induit l'EndMT de cellules endothéliales cérébrales, expliquant les possibles évolutions métastatiques des mélanomes au niveau du cerveau (211). Plus récemment, l'équipe de Yeon, a montré que les exosomes produits par des cellules de mélanomes conduit à l'induction de l'EndMT de cellules HUVECs *via* un relargage de TGF- β contenu dans les exosomes (209). Dans une revue récente, Shelton et coll confirment l'importance des exosomes et des microARN qu'ils contiennent dans la communication entre les cellules tumorales et les CAFs dans le développement du mélanome. Ainsi, les mélanocytes tumoraux sécrètent des exosomes qui contribuent à modifier le phénotype des fibroblastes du MET vers un phénotype de type CAFs. Ces derniers pourront alors produire, eux aussi, des exosomes enrichis en microARN, capables de promouvoir l'invasion et la dissémination des mélanocytes (212).

Les CAFs sont également décrits comme des promoteurs de l'angiogénèse. Hutchenreuther et coll (213), ont rapporté l'importance des CAFs dans la néovascularisation du mélanome en utilisant un modèle de souris xéno greffées par des cellules B16-F10. Ces auteurs ont identifié la protéine CCN2 (*connective tissue growth factor*) comme une protéine exprimée par les CAFs et intervenant dans la régulation des interactions cellules-cellules. Ainsi, une délétion CAF-spécifique de cette protéine a montré une incapacité des tumeurs à former de nouveaux vaisseaux limitant ainsi, la formation de métastase pulmonaire(213). Les CAFs sont, de plus, connus pour posséder une activité de sécrétion importante, dont de facteurs pro-angiogénique comme le VEGF (22).

Ces données posent l'hypothèse d'une boucle de rétrocontrôle positive permettant d'entretenir le processus invasif des mélanomes. Ainsi, l'angiogénèse induite par les CAFs pourrait contribuer à augmenter le pool potentiel de CE disponibles et susceptibles de s'engager dans l'EndMT. Les CAFs, ainsi produits, pourraient influencer l'EndMT *via* leur production de cytokines comme le TGF- β ou l'IL-1. Il convient donc d'évaluer les possibles interactions entre ces deux processus physiopathologiques impliqués dans la progression et l'invasion des mélanomes.

Si les études impliquant l'EndMT dans la physiopathologie du mélanome sont peu nombreuses, plusieurs auteurs se sont intéressés à l'EMT, un processus de transition phénotypique extrêmement proche sur le plan moléculaire.). En effet, l'EMT implique différentes voies de signalisation, communes avec l'EndMT, parmi lesquelles celles impliquant le TGF- β , Wnt, Notch, Hedgehog ou HIF-1a (214,215). De plus, différentes facteurs de transcription spécifiques (Snail, Twist1, SOX4 et ZEB1) sont mobilisés et agissent comme répresseurs de marqueurs épithéliaux (216-218).

De façon intéressante, il est à noter que les CAFs, majoritairement produits par l'EndMT, vont contribuer à promouvoir l'EMT *via* notamment la sécrétion d'un grand nombre de cytokines comme le TGF- β , diverses chimiokines, des interleukines, ainsi que des enzymes de remodelage de la MEC comme des MMPs (22).

L'ensemble des facteurs sécrétés par les CAFs et leurs cibles au sein du MET sont résumés dans la **Figure 17**. A travers cette forte sécrétion, les CAFs participent au développement tumoral depuis les premiers stades du développement jusqu'à l'invasion métastatique (219–221).

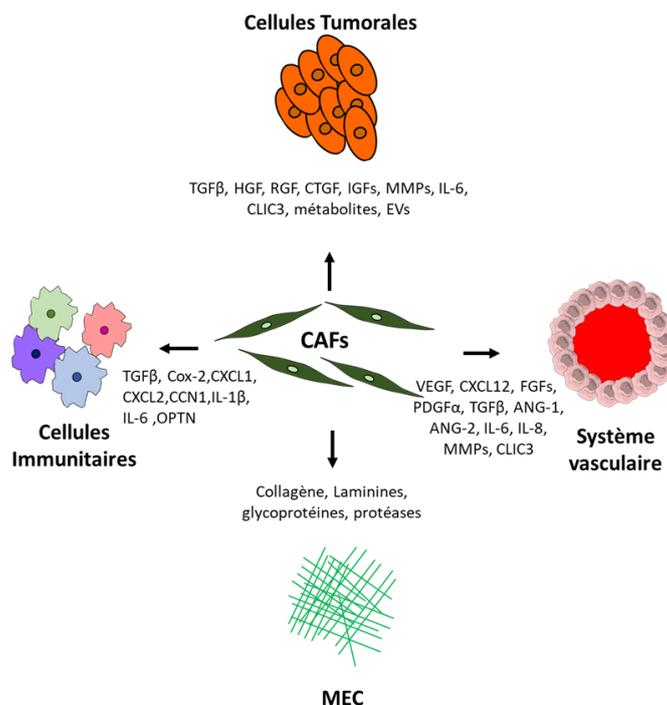


Figure 17 : Schéma de la fonction des CAFs et des molécules impliquées dans leur influence sur les autres cellules du MET. D'après Santi *et al.* 2018 **ANG-1/-2** : Angiotensine-1/-2 ; **CCN1** : Cystein rich protein 1 ; **CLIC3** : Chloride Intracellular Channel 3 ; **COX-2** : Cyclooxygénase2 ; **CTGF** : Connective Tissue Growth Factor ; **CXCL1/2/12** : C-X-C motif chemokine 1/6/12 ; **Evs** : Excellular vésicules ; **FGF** : Fibroblast Growth Factor ; **HGF** : Hepatocyte Growth Factor ; **IL-1β/6/8** : Interleukine 1Beta/6/8 ; **MMPs** : Matrix Mettaloproteinase ; **OPTN** : Optineurin ; **PDGFα** : Platelet derived Growth Factor a ; **RGF** : Retinal Growth Factor ; **TGFβ** : Tumor Growth Factor

6. Conclusion et Objectifs

Au cours de cette introduction, nous avons mis en avant le rôle décisif joué par les CE dans la tumorigénèse, mais également dans l'acquisition d'un phénotype invasif conduisant à la génération de métastases souvent synonyme de cul-de-sac thérapeutique. Il nous apparait important de souligner le rôle joué par le stress oxydant dans un grand nombre de mécanismes permettant la transformation des NECs en TECs, mais également dans la promotion du développement tumoral en général. L'angiogenèse et l'EndMT apparaissent comme deux acteurs d'une boucle d'emballage de la tumorigénèse. L'angiogenèse tumorale conduisant à la formation de vaisseaux anormaux, l'augmentation de la pression interstitielle consécutive à une perméabilité réduite et à des fuites engendre une baisse drastique de la perfusion dans les tissus tumoraux. Cette perfusion réduite conduit à une installation durable de l'hypoxie dans la tumeur et donc à une altération du métabolisme énergétique des cellules cancéreuses mais aussi des TECs. Celles-ci, vont ainsi beaucoup plus se reposer sur la glycolyse aérobie productrice de lactate et donc conduire à une acidification de l'espace intra, puis extracellulaire. La diminution du pH ainsi engendrer va conduire à une augmentation du stress oxydant qui, comme nous l'avons vu, est un vecteur important de la

génération de métastases, mais aussi de l'angiogenèse. Parallèlement, l'EndMT conduit, à partir des TECs, à la formation de CAFs, qui vont, *via* leur activité de sécrétion, conduire à une augmentation de l'angiogenèse, générant ainsi un pool supplémentaire de CE susceptibles de s'engager dans l'EndMT. Enfin la sécrétion de TGF- β , d'interleukines, et de MMPs par les CAFs, va favoriser la migration des cellules tumorales et permettre la génération de métastases (**Figure 18**).

Nous avons ici mis en exergue le rôle des ROS produites par les NOXs dans l'induction de l'angiogenèse, mais également dans le contrôle de l'EndMT dans plusieurs pathologies inflammatoires autre que le cancer. En prenant en compte, la grande dépendance du mélanome à la génération de métastases, ainsi qu'au stress oxydant, nous avons souhaité interroger le rôle spécifique des ROS produites par les NOXs dans l'initiation de l'EndMT dans un modèle de mélanome. Pour ce faire, nous avons dû développer un modèle *in vitro* d'EndMT afin de pouvoir évaluer sa survenue en réponse aux agents inducteurs utilisés. Nous avons ensuite testé les effets d'un milieu conditionné issue de cellules de mélanome sur (i) la survenue de l'EndMT, ainsi que (ii) sur la génération de ROS. Enfin, nous avons étudié l'impact de l'inhibition pharmacologique spécifique de NOX1 et/ou NOX2 sur ces deux aspects.

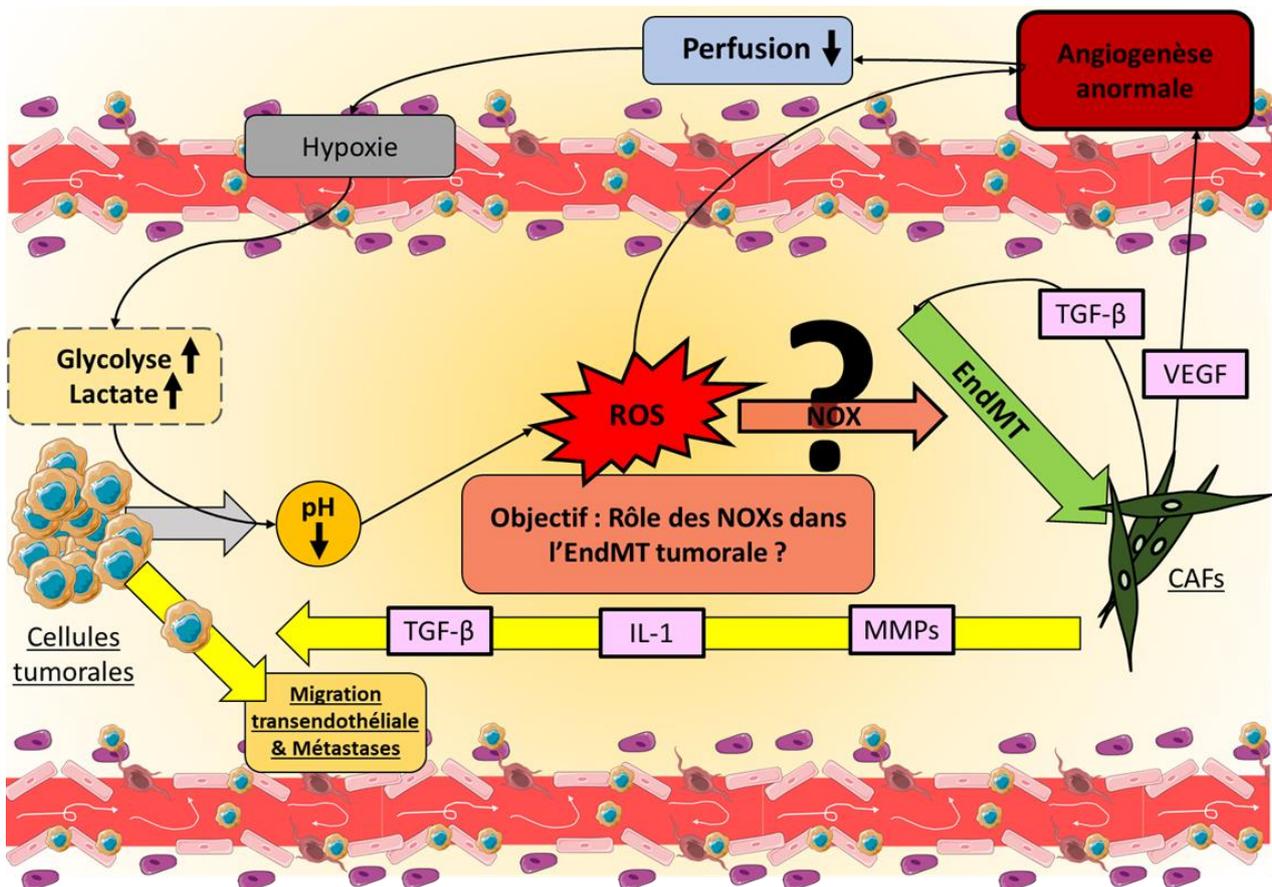


Figure 18 : Schéma détaillant les mécanismes conduisant à une génération de ROS dans l'espace extracellulaire tumoral, et l'implication de ceux-ci dans la génération de métastases et dans l'EndMT. Mise en évidence de la question à l'origine du projet : Quel est l'impact des ROS générées par les NOXs dans l'EndMT tumorale.

Résultats

1. Introduction

La première étape de ce travail de thèse aura été d'élaborer un modèle *in vitro* d'EndMT. Lors de la mise en évidence de l'implication de l'EndMT dans la génération de CAFs par Zeisberg et coll en 2007 (208), les auteurs ont utilisé un modèle *in vitro* composé de cellules primaires MLEC (*Mouse Endothelial Cells*) traitées avec 10 ng/mL de TGF- β 1. Depuis, cette étude pionnière, les modèles *in vitro* d'EndMT se sont succédé, et se distinguent selon trois paramètres principaux qui sont (i) le/les agent(s) inducteurs, (ii) la lignée cellulaire utilisée ainsi que (iii) le/les temps de traitement.

Le TGF- β 1 a été utilisé pendant très longtemps comme agent inducteur de l'EndMT, notamment en raison du rôle majeur qu'il joue dans l'induction de l'EMT et des similitudes qu'il existe entre ces deux processus au niveau moléculaire (222). Un très large corpus d'études, aussi bien anciennes que récentes, atteste de l'efficacité de la stimulation par le TGF- β 1 pour induire l'EndMT sur des modèles *in vitro* (208,223–226). Cette induction implique en grande partie la voie de signalisation Smad2/Smad3 et la stimulation du facteur de transcription *snail*. L'isoforme 2 du TGF- β a déjà montré sa capacité à induire l'EndMT en tant que traitement unique (227). Plus récemment, il est apparu, notamment grâce à l'étude de Sabbineni et coll que le TGF- β 2 était un potentiel inducteur plus efficace que le TGF- β 1 (228) pour induire l'EndMT. L'EndMT peut également être induite par des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1, qui a déjà montré sa capacité à induire l'EndMT *in vitro*, seule ou en combinaison avec du TGF- β 2 (227,229). Nous avons ainsi tenu à comparer le bénéfice de l'utilisation d'un agent inducteur unique (le TGF- β 2) par rapport à une combinaison de deux agents (le TGF- β 2 et l'IL-1) pour induire l'EndMT.

Parmi l'ensemble des lignées endothéliales connues, la lignée HUVECs fait partie des lignées les plus utilisées dans l'étude de l'EndMT (205,227,230–233). L'origine anatomique des différentes lignées a récemment été mise en évidence comme jouant un rôle capital dans la réponse à la stimulation par le TGF- β 2. En effet, toutes les lignées cellulaires ne présentent pas le même niveau de susceptibilité face à l'EndMT et certaines, dont les HUVECs, sont rapportées comme plus promptes à conserver leurs marqueurs endothéliaux même après une stimulation au TGF- β 2 ce qui en fait de bonnes candidates pour étudier le phénotype endothélial (234,235).

Le temps de stimulation des cellules est une variable importante. Beaucoup d'études ont rapporté l'apparition d'une EndMT *in vitro* après une stimulation de 48h ou 72h pour les temps les plus courts (233,236,237). Ces temps conduisent généralement à une EndMT partielle ou réversible. Des stimulations plus longues, à partir de 5 jours ont permis de générer des EndMT complètes et irréversibles (227,238)

L'objectif des résultats exposés ci-après porte sur l'optimisation d'un modèle d'EndMT *in vitro* sur des cellules HUVECs traitées ou non avec du TGF- β 2 (10 ng/mL) en combinaison ou non avec de l'IL-1 (10 ng/mL) sur des temps compris entre 24 et 72h. Cette optimisation nous sera utile pour établir un modèle contrôle fiable de l'EndMT afin d'étudier la transition induite par le milieu conditionné issu de cellules SK-MEL 28.

2. Matériels & Méthodes

2.1. Culture cellulaire et traitement

Les cellules endothéliales HUVECs (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) ont été obtenues par de LONZA® (HUVEC P1063 ; N° 0000663523) puis congelées dans de l'azote liquide. Les cellules ont été cultivées dans du milieu EGM-2 supplémenté avec 2 % de sérum de veau fœtal, d'hydrocortisone (0,20 mL), de hFGF-B (2 mL), de VEGF (0,5 mL), de R3-IGF-1 (0,5 mL), d'acide ascorbique (0,5 mL), hEGF (0,5 mL), GA-1000 (0,5 mL), héparine (0,5 mL) (LONZA® EGMtm BulletKittm CC-3124) dans des flasques de 175 cm². Les cellules se sont développées à 37°C à 5% de CO₂. Les HUVECs ont été utilisées entre le premier et le sixième passage *in vitro*. Un traitement cinétique au TGF-β2 (R&D systems® 302-B2) (10 ng/mL) ± IL-1 (Milteny®) (10ng/mL) a été réalisé pendant 24h, 48h et 72h.

2.2. Test de blessure

Les HUVEC ont été cultivées dans une plaque 6 puits à une concentration de 400k cellules/puits. Une fois la confluence atteinte, une blessure a été réalisée avec un cône de micropipette au milieu du puits. Les cellules ont été traitées pendant 24h, 48h et 72h. Les photos ont été prises à chaque temps avec un microscope EVOS XL et ont ensuite été analysées avec le logiciel ImageJ afin de calculer la surface de la blessure. Le rapport entre la surface de la blessure à chaque temps et la surface de la blessure au temps initial T₀ a ensuite été calculé à chaque fois.

2.3. Test de prolifération

Les HUVEC ont été cultivées dans des plaques à 96 puits à raison de 5k cellules/puits. Après traitement, le milieu a été retiré et remplacé par 50 µL de sonde Cyquant® (Thermo Scientific® C35006) solubilisée dans du tampon HBSS 5X dilué dans de l'eau déminéralisée suivant les recommandations du fabricant. La plaque a ensuite été incubée à 37°C et 5% de CO₂ pendant 45 min. Les plaques ont ensuite été lues avec un spectrophotomètre (SpectroMax M2) à 485 nm pour l'excitation et 530 nm pour l'émission

2.4. Test de formation de capillaires sur gel

Les HUVEC ont été cultivées dans une plaque à 6 puits à 150k cellules/puits. Après traitement, les cellules ont été décrochées avec de la trypsine à 5 % et comptées. 10 000 cellules ont été remises en suspension dans 50 µL d'EGM-2. Par la suite, les cellules ont été ensemencées sur une plaque de test angiogénèse IBIDI à 15 puits (Clinisciences #81506) préalablement recouverte de 10 µL de gel ECM® (Sigma® #E1270). La germination s'est déroulée pendant 24h, avec une analyse à 2h ; 4h ; 6h et 24h. La formation de réseaux de germination a été imagée avec un microscope EVOS XL en utilisant un grossissement de 20x ou 10x et analysée à l'aide du logiciel ImageJ à l'aide du plugin « *Angiogenesis analyzer* » développé par Gilles Carpentier (239).

2.5. Western blot

Les cellules ont été cultivées dans une plaque à 6 puits à 300 k cellules/puits, puis lysées dans du tampon de lyse RIPA froid, complété avec des comprimés d'antiprotéase et d'antiphosphatase (Roche® 11836170001). Les protéines ont ensuite été extraites par grattage et centrifugation à 14 000 tr/min, 15 min à 4°C. Les surnageants ont été collectés et le dosage des protéines a été effectué en utilisant le test BCA (Thermo Scientific® #23225). Le mélange de protéines a été réalisé avec du bleu Laemmli 4X (Bio-rad® #161-0747) et le volume a été ajusté avec du RIPA. Les protéines ont été dénaturées à 95°C avant migration dans un gel de polyacrylamide (4%-15%) (Biorad® #4561094) avec du tampon SDS (Bio-rad® #1610772). Le transfert a été réalisé avec la technologie trans Turbo (Bio-rad®) en utilisant le Kit Trans-Blot Turbo Transfert (Bio-rad® #1704274) sur membranes PVDF. Les membranes ont ensuite été bloquées avec de la BSA 5% pendant 1 heure. Les membranes bloquées ont été incubées avec les anticorps primaires et secondaires appropriés. Les bandes ont été détectées à l'aide d'un anticorps IgG conjugué à la peroxydase et visualisées par chimiluminescence améliorée (Luminol Sc-2048 Santa Cruz® ou femto haute sensibilité #34096 Thermo Scientific®). La GAPDH a été utilisé comme témoin de charge. Les images ont été acquises à l'aide de l'appareil de révélation LAS4000+. Les informations complémentaires sur les anticorps utilisés sont détaillées dans le **Tableau II**.

Tableau II	Anticorps	Concentration	Origine	Fournisseur	Référence
Primaire	α-sma	1/500	Souris	Sigma®	A2547
	vWF	1/1000	Lapin	Cell Signaling®	D8L8G #65707
	P-Smad	1/1000	Lapin	Cell Signaling®	138D4 #3108
	Smad	1/1000	Lapin	Cell Signaling®	86F7 #3122
	Snail	1/1000	Lapin	Cell Signaling®	C15D3 #3879
	GAPDH	1/2000	Souris	Sigma®	G8795
	Réactif	Concentration	Couple	Fournisseur	Référence
Secondaire	IgG peroxydase	1/2000	Souris	Thermo Scientific®	32430
	IgG peroxydase	1/2000	Lapin	Life Technology®	G2123

Tableau II : Anticorps utilisés en western blot

2.6. Cytométrie en flux

Les cellules ont été marquées avec des anticorps anti-vWF conjugués à l'FITC (ab8822 abcam®) et anti-α-SMA conjugués à l'APC (IC1420A ; R&D Systems®). Les cellules ont été cultivées dans des plaques à 6 puits à 300 k

cellules/puits. Après traitement, les cellules ont été décollées et lavées pour la première fois avec 500 μ L de tampon de lavage (1X PBS + 0,1% BSA). La fixation a été réalisée avec une solution de paraformaldéhyde à 2% pendant 15 min. Les cellules ont ensuite été perméabilisées avec une solution de saponine à 0,1% pendant 15 min suivie de l'incubation des anticorps à 10 μ L/million de cellules pendant 15 min. Un contrôle isotypique a été utilisé pour détecter le marquage non spécifique des anticorps. La lecture a été réalisée avec un équipement BD FACS Canto™ II (Biosciences®)

2.7. Analyses statistiques

Les comparaisons entre deux conditions différentes ont été évaluées à l'aide du test de Kruskal-Wallis. Les différences entre les groupes comportant plus de deux conditions ont été testées par une analyse de variance à deux facteurs (ANOVA), suivies d'une correction de Bonferroni. Les données sont exprimées en moyenne \pm SD correspondant à trois expériences indépendantes ou plus. Une valeur $p < 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative. Les analyses ont été effectuées à l'aide de GraphPad Prism v6.0.

3. Résultats

3.1. Le traitement au TGF- β 2 active la voie de signalisation canonique Smad2/Smad3 dans un modèle de cellules HUVECs

L'analyse de l'expression des protéines de la voie de signalisation (p-smad, montre que le TGF- β 2 induit une augmentation du ratio phospho-smad/smاد total après 4h ($p < 0,05$), mais pas après 7h de traitement (**Figure 19A**). Également, on observe une augmentation de l'expression de snail après 4h ($p < 0,01$), ainsi qu'après 7h de traitement sans que cette dernière ne soit significative (**Figure 19B**).

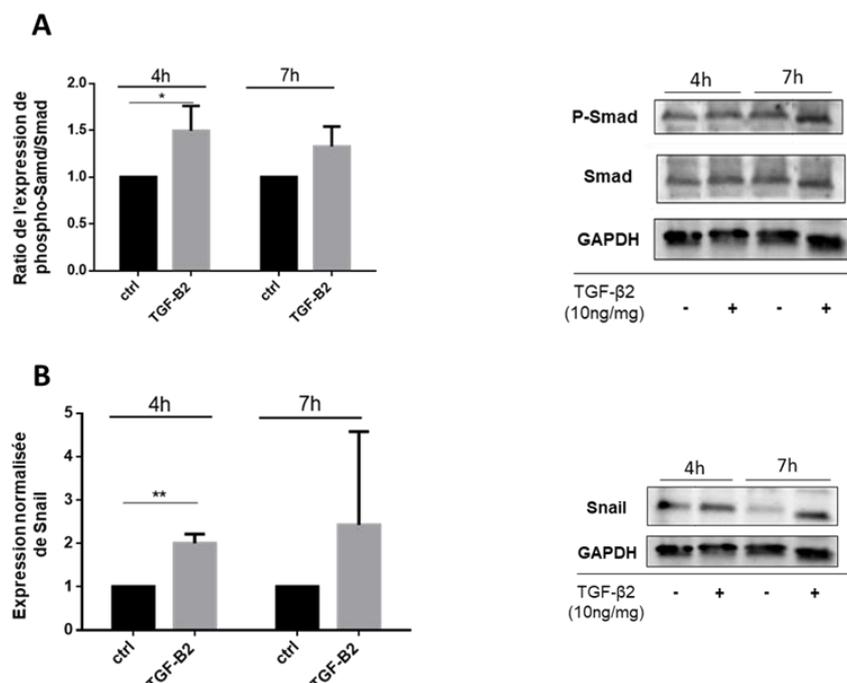


Figure 19 : Le traitement au TGF- β 2 active la voie de signalisation canonique (p)-smad chez les HUVECs. Les HUVECs ont été traitées ou non avec du TGF- β 2 à 10 ng/mL. Les traitements ont été effectués à 4h et 7h. A) Histogramme et image correspondante du ratio de l'expression de phospho-smad/smاد total après traitement avec le TGF- β 2 (N=3). B) Histogramme de l'expression normalisée de la snail et images correspondantes après traitement par le TGF- β 2 (N=3). Les

images ont été analysées grâce au logiciel ImageJ. L'analyse statistique des figures a été réalisée avec Prism6. Un test de Kruskal-Wallis a été réalisé pour toutes les conditions. Toutes les données sont représentées comme des moyennes ou des moyennes \pm SD. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.2. La combinaison TGF- β 2+IL-1 induit une altération des caractéristiques endothéliales plus importante que le TGF- β 2 seul

Nous avons dans un premier temps, également analysé l'évolution de leurs caractéristiques phénotypiques. L'analyse de la prolifération cellulaire montre que les HUVECs non traitées prolifèrent nettement entre 24h et 48h. Cette prolifération est ralentie entre 48h et 72h. Ni le traitement au TGF- β 2 seul, ni la combinaison TGF- β 2+IL-1 ne permettent d'observer de différence par rapport à la condition non traitée à 24h. A 48h, le traitement au TGF- β 2 induit une diminution significative de la prolifération ($p < 0.05$) qui est conservée à 72h ($p < 0.05$). Le traitement combiné induit une diminution significative de la prolifération dès 48h ($p < 0.001$), confirmée à 72h ($p < 0.001$) (**Figure 20A**).

Bien que l'on n'observe pas de différence de la migration des HUVECs à 24h, l'analyse de la fermeture de la blessure révèle une diminution significative de la migration dans la condition traitée avec le TGF- β 2+IL-1 à 48h ($p < 0.05$), confirmée et accentuée à 72h ($p < 0.01$). On ne retrouve pas cette diminution dans la condition traitée avec le TGF- β 2 seul (**Figure 20B**). Ces données sont confirmées par l'analyse microscopique des cellules en migration (**Figure 20C**). Nous avons ensuite analysé la capacité des HUVECs à former des capillaires sur Matrigel®. L'étude de l'air total du réseau de capillaire formé révèle que le traitement au TGF- β 2 seul ne permet pas d'observer de différence avec la condition non traitée ni à 24h

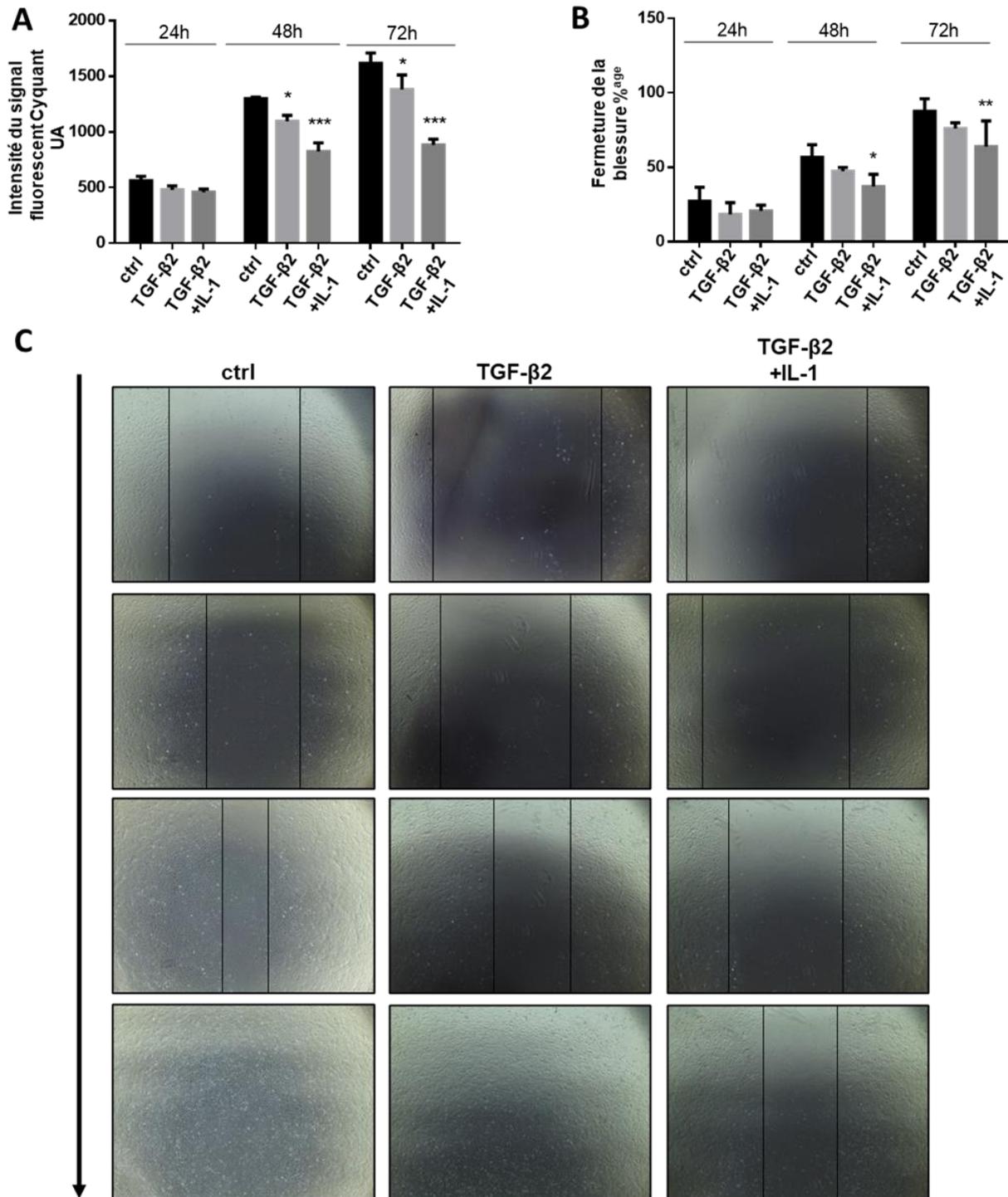


Figure 20 : La combinaison TGF- β 2+IL-1 induit une altération des caractéristiques endothéliales plus importante que le TGF- β 2 seul. Les HUVECs ont été traitées ou non avec du TGF- β 2 à 10 ng/mL en association ou non avec de l'interleukine-1 (IL-1) à 10 ng/mL. Les traitements ont été effectués à 24h, 48h et 72h. A) Histogramme du test de prolifération représentant l'intensité de fluorescence du Cyquant®. La fluorescence a été mesurée par un appareil SpectroMax (ex : 480nm ; em: 520nm) (N=3). B) Histogramme du test de blessure évaluant la mobilité cellulaire, exprimé en pourcentage de fermeture de la blessure initiale (N=3). C) Images correspondantes en microscopie optique (X10). Les images ont été analysées grâce au logiciel ImageJ. L'analyse statistique des figures a été réalisée avec Prism6. Une ANOVA à deux facteurs a été réalisée pour toutes les conditions. Toutes les données sont représentées comme des moyennes \pm SD. Les comparaisons sont faites par rapport à la condition contrôle. *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001.

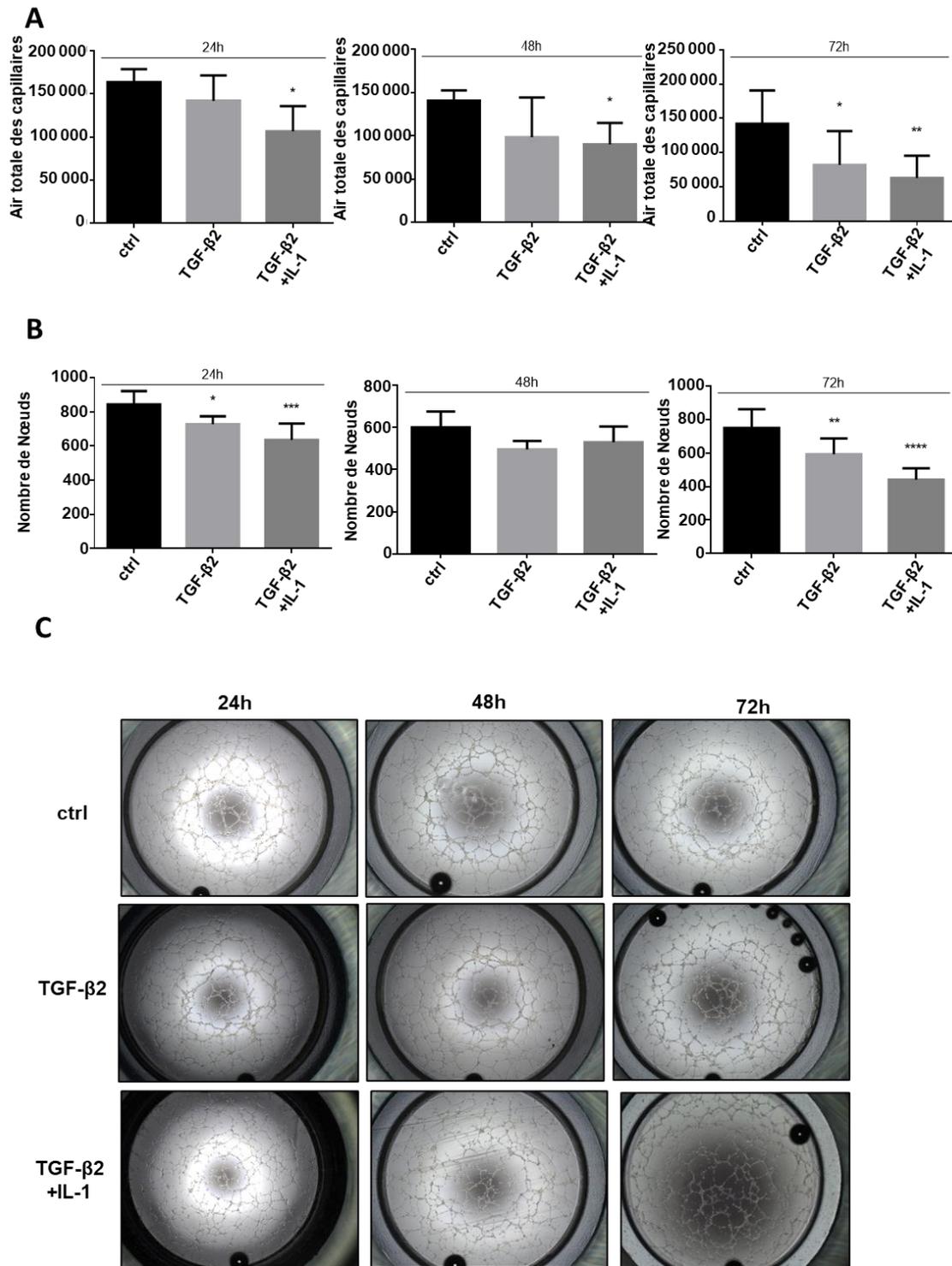


Figure 21 : La combinaison TGF-β2+IL-1 induit une diminution de la capacité des HUVECs à former des capillaires sur gel ECM®. Les HUVECs ont été traitées ou non avec du TGF-β2 à 10 ng/mL en association ou non avec de l'interleukine-1 (IL-1) à 10 ng/mL. Les traitements ont été effectués à 24h, 48h et 72h. A) Histogramme de l'air totale du réseau de capillaire formé sur gel ECM®. B) Histogramme du nombre de nœuds formé au sein du réseau de capillaires formé par les HUVECs sur gel ECM®. C) Images correspondantes en microscopie optique (10X). Les images ont été analysées grâce au logiciel ImageJ et du plugin *Angiogenesis Analyser*. L'analyse statistique des figures a été réalisée avec Prism6. Une ANOVA à deux facteurs a été réalisée pour toutes les conditions. Toutes les données sont représentées comme des moyennes ou des moyennes ± SD. Les comparaisons sont faites par rapport à la condition contrôlée. *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001.

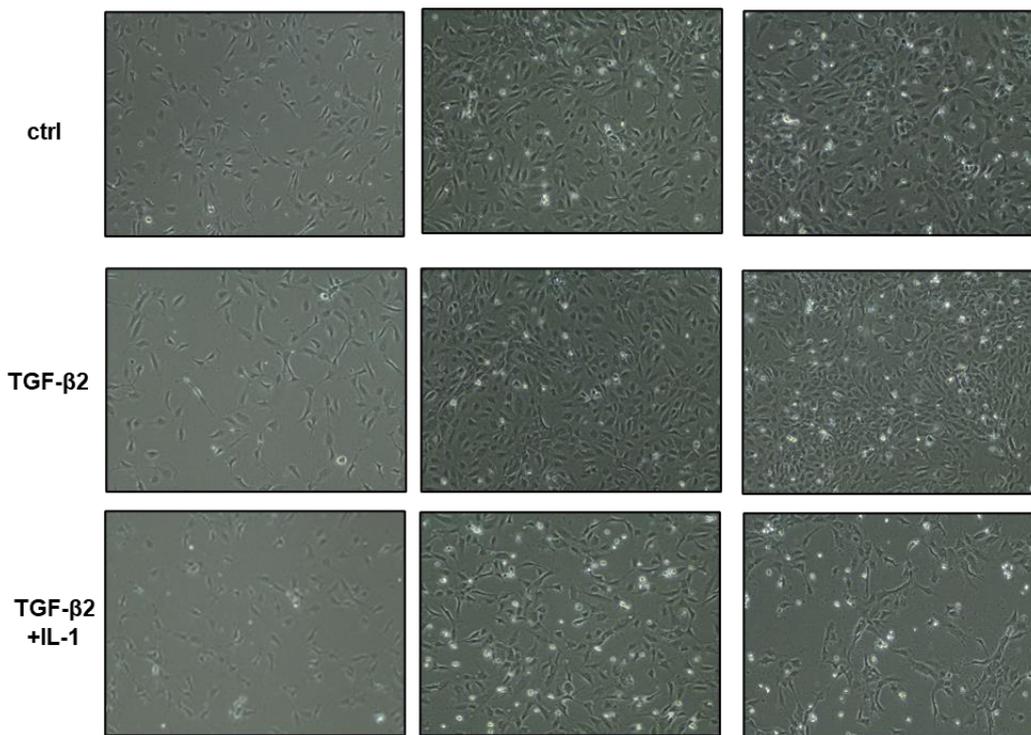


Figure 22 : La combinaison TGF- β 2+IL-1 induit un changement morphologique important des HUVECs visible en microscopie. Les HUVECs ont été traitées ou non avec du TGF- β 2 à 10 ng/mL en association ou non avec de l'interleukine-1 (IL-1) à 10 ng/mL. Les traitements ont été effectués à 24h, 48h et 72h. A) Images des HUVECs en microscopie optique (X20) (N=3).

ni à 48h. En revanche on observe une diminution significative à 72h ($p < 0.05$). Une diminution significative par rapport à la condition contrôle est visible dès 24h dans la condition TGF- β 2+IL-1 ($p < 0.05$) et confirmée à 48h ($p < 0.05$) et 72h ($p < 0.01$) (**Figure 21A**). Également, l'analyse du nombre de nœuds formés au sein du réseau de capillaires montre que le traitement au TGF- β 2 seul induit une diminution significative du nombre de nœuds formés à 24h ($p < 0.05$) et à 72h ($p < 0.01$), mais pas à 48h. Le traitement au TGF- β 2+IL-1 induit une réduction significative du nombre de nœuds aux mêmes temps mais de façon plus prononcée ($p < 0.001$ à 24h et $p < 0.0001$ à 72h). (**Figure 21B**). Enfin, les images de microscopie montrent une altération de la morphologie des HUVECs dans la condition TGF- β 2+IL-1, visible dès 48h, et confirmée à 72h. Les cellules présentent un aspect effilé en épingle, et sont également plus grandes que celles visibles dans la condition non traitée (**Figure 22**).

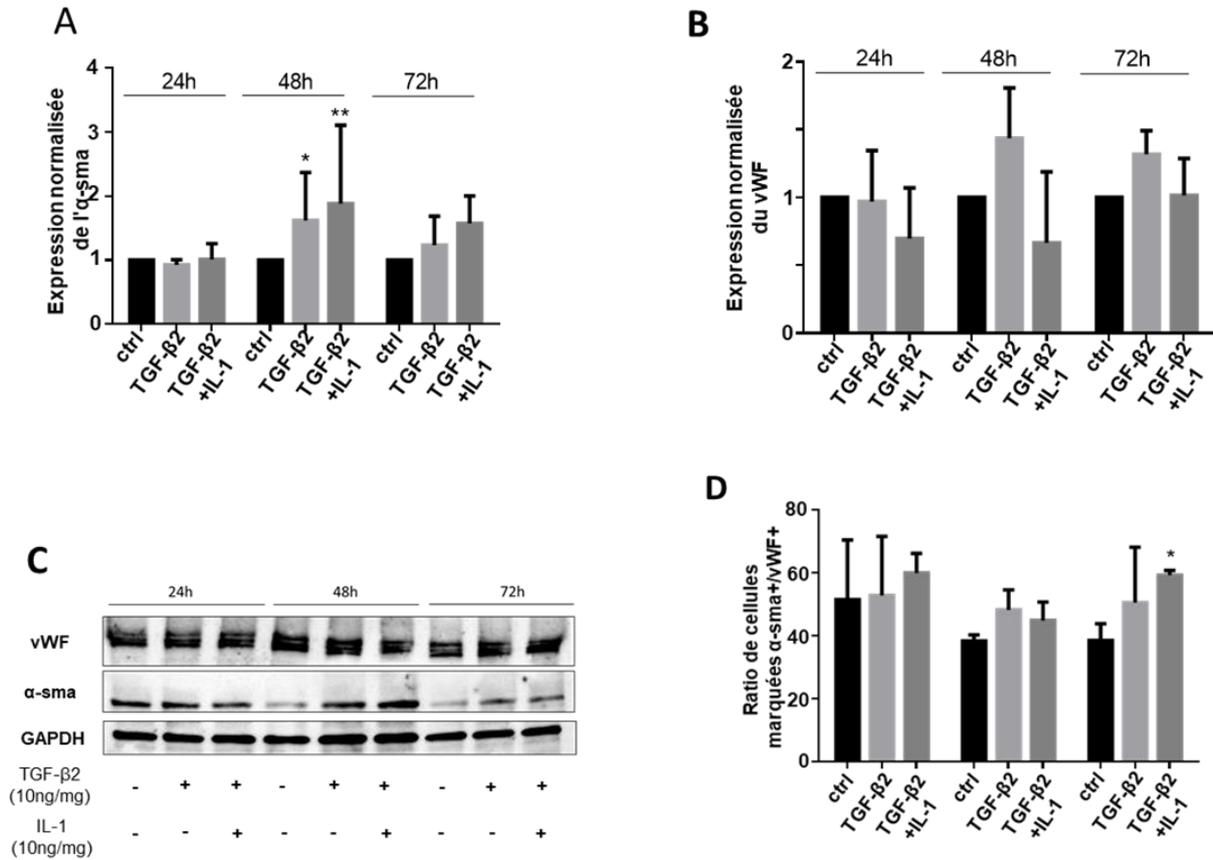
3.3. Le traitement au TGF- β 2+IL-1 induit une plus grande augmentation des marqueurs protéiques mésenchymateux que le traitement au TGF- β 2 seul.

L'analyse de l'expression de l' α -SMA confirme que le traitement au TGF- β 2 n'induit pas d'augmentation significative de son expression ni à 24h ni à 72h. En revanche, une augmentation significative de son expression est observée à 48h ($p < 0.05$). Ce même profil d'expression est retrouvé pour les cellules traitées par l'association TGF- β 2+IL-1 : aucune différence par rapport à la condition non traitée ni à 24h ni à 72h mais une augmentation significative à 48h (**Figure 23A**). Concernant l'expression du vWF, aucun changement significatif dans son expression quel que soit le temps et quelle que soit la condition n'est observé (**Figure 23B**).

Ces données ont été complétées par une analyse en cytométrie en flux. De façon intéressante, on note la présence d'une sous-population doublement marquée, positive à la fois à l' α -SMA et au vWF, dans la condition non traitée,

quel que soit le temps. L'étude de cette sous-population montre que sa proportion reste fixe à 24h et à 48h quel que soit le traitement. Elle est cependant significativement augmentée dans la condition traitée par la combinaison TGF- β 2+IL-1 à 72h ($p < 0.05$) mais pas dans la condition traitée par le TGF- β 2 seule au même temps (**Figure 23D**).

L'ensemble des résultats ci-dessus a permis de conclure que le traitement au TGF- β 2 + IL-1 conduisait à une EndMT satisfaisante dans notre modèle expérimental. Nous l'avons donc utilisé comme modèle contrôle dans les expériences qui ont conduit à la rédaction de l'article présenté ci-après. L'ensemble de ces résultats, ainsi que ceux présents dans l'article sont discutés dans la partie « Discussion Générale ».



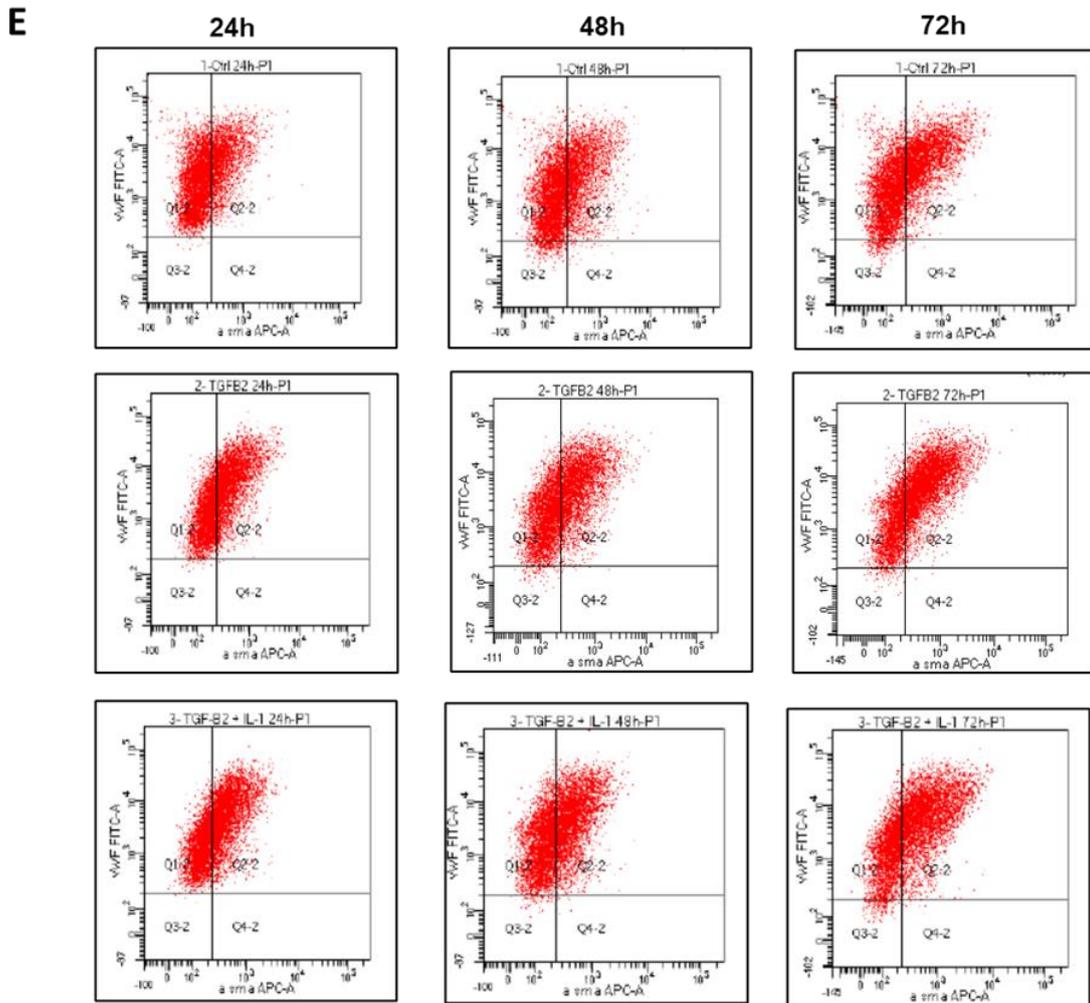


Figure 23 : Le traitement au TGF- β 2+IL-1 induit une plus grande augmentation des marqueurs protéiques mésenchymateux que le traitement au TGF- β 2 seul. Les HUVECs ont été traitées ou non avec du TGF- β 2 à 10 ng/mL en association ou non avec de l'interleukine-1 (IL-1) à 10 ng/mL. Les traitements ont été effectués à 24h, 48h et 72h. A) Histogramme de l'expression normalisée de l' α -SMA (N=3). (N=3). B) Histogramme de l'expression normalisée du vWF (N=3). C) Images correspondantes de l'expression protéiques tels que mesurées par le LAS4000+ (N=3). D) Histogramme des cellules doublement marquées (α -SMA+/vWF+) en cytométrie en flux (N=3). E) Images de cytométrie correspondante. L'expression de vWF est analysée par un marquage FITC (axe Y) et celle de l' α -SMA via APC (axe X). Les images sont divisées en quartier tel que Q1-2 (vWF+/ α -sma-); Q2-2 (vWF+/ α -sma+); Q3-2 (vWF-/ α -sma-); Q4-2 (vWF-/ α -sma+). Les images ont été analysées grâce au logiciel ImageJ. L'analyse statistique des figures a été réalisée avec Prism6. Une ANOVA à deux facteurs a été réalisée pour toutes les conditions. Toutes les données sont représentées comme des moyennes ou des moyennes \pm SD. * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001.

3.4. Article : NOXI and NOX2 : Two enzymes that promote endothelial-to-mesenchymal transition induced by melanoma conditioned media

Soumis pour publication dans « pharmacological Research »

1 **NOX1 and NOX2: two enzymes that promote endothelial-to-mesenchymal transition**
2 **induced by melanoma conditioned media**

3 Valentin Platel¹, Diane Lechevalier^{1,2}, Clara Bourreau¹, Ivana Šoborová^{1,3}, Caroline Jeannière¹,
4 Ludovic Martin², Olivier Hérault⁴, Isabelle Corre⁵, Nicolas Clere¹

5 (1) Univ Angers, Inserm, CNRS, MINT, SFR ICAT, Angers, France

6 (2) Department of Dermatology, Angers University Hospital, Angers, France

7 (3) Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové, Czech Republic

8 (4) CNRS ERL 7001 LNOx and EA, University of Tours, 7501, Tours, France

9 (5) Team SOAP, CRCINA, Inserm, CNRS, Université de Nantes, Université d'Angers,
10 Nantes, France

11

12

13

14

15 **Corresponding author**

16 Nicolas CLERE – Pharm D., Ph D

17 UMR Inserm 1066 – CNRS 6021

18 IBS – IRIS

19 CHU

20 4, rue Larrey

21 F-49933 ANGERS Cedex

22 nicolas.clere@univ-angers.fr

23

24

25 **Abstract**

26 Tumor microenvironment plays an important role in melanoma progression. Recent studies
27 indicate endothelial cells (EC) are involved in endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT).
28 During this phenotypic switch, EC progressively lose their endothelial markers and acquire
29 mesenchymal properties. Depending their concentration, reactive oxygen species (ROS) can
30 control tumor growth. In endothelial cells, ROS are mainly produced by NADPH oxidases
31 (NOX) such as NOX1 and NOX2. The aim of the present study was to determine the role of
32 these enzymes in EndMT induced by conditioned media (CM) from SK-MEL 28 melanoma
33 cells. The capacity of CM to induce EndMT in HUVEC after 24h, 48h or 72h has been evaluated
34 by following HUVEC proliferation, migration and their capacity to form capillary on Matrigel[®].
35 Furthermore, EndMT was confirmed through Western blot and flow cytometry analyzes. To
36 determine the role of NOX in EndMT, specific NOX1 and/or NOX2 inhibitors has been tested.
37 TGF- β 2 +/- IL-1 α were used as controls. ROS production was determined through DCFDA
38 assay. An altered endothelial phenotype was found in CM-treated HUVECs. This phenotypic
39 modification was correlated with a decrease in both capillary formation on Matrigel[®] and cell
40 proliferation and an increase in cell migration. CM enhanced significantly ROS production
41 from 48h treatment; this increase was prevented by the dual pharmacological inhibition of
42 NOX1 and NOX2 that was also able, in the long term, to partially reverse CM-induced EndMT.
43 These data confirmed the role of NOX1 and NOX2 in melanoma-induced EndMT. These two
44 enzymes are potential pharmacological targets to prevent melanoma growth.

45

46

47

48

49 **Introduction**

50 Malignant melanoma is one of the most aggressive cancers with a high risk of metastases at
51 advances states [1]. During the last decade, the implication of the tumor microenvironment
52 (TME) has been recognized as a main actor [2, 3] in melanoma development and in acquisition
53 to therapy resistance [4].

54 TME is characterized by a cellular heterogeneity that includes endothelial cells (EC), immune
55 cells, cancer-associated fibroblasts (CAF) and the extracellular matrix (ECM). For instance, in
56 melanoma, it has been recently reported that CAFs are the cause of resistance to targeted
57 therapies such as BRAF or MAPK inhibitors [4]. They notably act as active ECM shapershifters
58 and they secrete pro-invasive mediators such as TGF- β [5] that favor epithelial-to-mesenchymal
59 transition, metastasis formation and tumor dissemination.

60 EC, another TME cell type, are at the crossroad of different pathophysiological processes
61 involved in tumor growth such as angiogenesis [6-8], or endothelial-to-mesenchymal transition
62 (EndMT). EndMT was first described in embryonic development [9-11], in renal [12], cardiac
63 [13] and pulmonary [14] fibrotic diseases. Recently, its implication has also been described in
64 cancer [15] and tumor development [16, 17].

65 In tumorigenesis, EndMT allows the differentiation of EC to CAFs. It is recognize as the
66 principal source of CAFs (around 40%) [18]. During this cellular process, endothelial cells lose
67 their endothelial markers such as VE-cadherin, CD31 or vanWillebrand factor. Furthermore,
68 they acquire mesenchymal properties with an enhanced migration and proliferation and an
69 higher expression of fibroblast-specific protein-1 (FSP-1), alpha-smooth muscle actin (α -
70 SMA), N-cadherin or fibronectin [19-22]. Moreover, EndMT is characterized by loss of cell-
71 cell adhesion and changes in cell polarity inducing a spindle shaped morphology. As we
72 recently reviewed, several inducers of EndMT are described such as transforming growth
73 factor-beta (TGF- β), hypoxia or Wnt/ β -catenin [23].

74 Reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide (H₂O₂) and superoxide anion (O₂⁻)
75 serve a variety of functions inside the cell, mainly as second messengers. However, an aberrant
76 oxidant environment leads to oxidative stress and has been linked to a wide array of diseases
77 including cancers [24-26].

78 Different sources of intracellular ROS production are described and NADPH oxidases (NOX)
79 belong to a well-known family in this production [27]. Four NOXs isoforms have been
80 identified in human endothelial cells: NOX1, NOX2, NOX4 and NOX5. NOX2 and NOX4 are
81 the most prevalent isoforms in EC while NOX4 being the only one constitutively active. NOXs
82 activity have been reported as an efficient trigger of angiogenesis [27] and invasiveness through
83 ERK-depend upregulation of VEGF, metalloproteinases and the activation of other redox-
84 sensitive transcription factors such as HIF-1 α , TP53, and NF- κ B [28-32]. While NOXs have
85 recently been shown to be involved in EC differentiation [33], no studies have examined the
86 role of these enzymes in the regulation of tumor EndMT. Therefore, the aim of the present study
87 was to determine the properties of two NOX isoforms (NOX1 and NOX2) in EndMT induced
88 by conditioned media from SK-MEL 28 melanoma cells.

89 **Materials and Methods**

90 **Cell culture & treatment**

91 Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were obtained from LONZA[®] (HUVEC
92 P1063; N° 0000663523) and then frozen into liquid nitrogen. Cells were grown in EGM-2
93 medium supplemented with 2% fetal bovine serum, hydrocortisone (0.20 mL), hFGF-B (2 mL),
94 VEGF (0.5 mL), R3-IGF-1 (0.5 mL), ascorbic acid (0.5 mL), hEGF (0.5 mL), GA-1000 (0.5
95 mL), heparin (0.5 mL) (LONZA[®] EGMtm BulletKittm CC-3124). Cells were cultured at 37°C
96 and 5% CO₂. HUVECs were used between the first and sixth passage. SK-MEL 28 cells were
97 obtained from ATCC and were grown in minimal essential medium (MEM) supplemented with
98 10% fetal bovine serum and 1% streptomycin/penicillin.

99 HUVECs were treated by SK-MEL 28 conditioned media for 24, 48 and 72h. Combination of
100 TGF- β 2 (R&D systems[®] 302-B2) (10 ng/mL) and IL-1 β (Milteny[®]) (10ng/ mL) were used as
101 EndMT positive control.

102 Two NOXs specific inhibitors have been used: ML171, an NOX1 inhibitor (Sigma Aldrich[®]
103 #492002) (3 μ M) and an NOX2 inhibitor - GSK-2795039 (Sigma Aldrich[®]#SML2770) (1 μ M).

104 **Wound healing assay**

105 HUVECs were cultured in 6-well plate at 400k cells/well. After HUVECs were at confluence,
106 a wound was performed with a micropipette tip. Cells were treated by conditioned media or
107 TGF- β 2 \pm IL-1 α \pm NOX inhibitors for 24, 48 and 72h. Pictures of the wound were taken with
108 EVOS XL microscope and, then, were analyzed with ImageJ software in order to determine the
109 wound area.

110 **Proliferation assay**

111 HUVECs were cultured in 96-well plate at 5k cells/well. After treatment, 50 μ L of Cyquant[®]
112 probe (Thermo Scientific[®] C35006) solubilized in 5X HBSS buffer were added in each well.
113 The plate was incubated at 37°C and 5% CO₂ for 45 min. The plates were read with a
114 spectrophotometer (SpectroMax M2) at 485 nm excitation and 530 nm emission.

115 **Sprouting assay**

116 HUVECs were cultured in 6-well plate at 150k cells/well. After treatment, 10k cells were
117 seeded in 15-well IBIDI[®] angiogenesis assay plate (Clinisciences #81506) previously coated
118 with 10 μ L of ECMgel[®] (Sigma Aldrich[®] #E1270). The sprouting was allowed to proceed for
119 24 hours, with intermediate observations at 2, 4, 6 and 24h. Formation of sprouting networks
120 was observed with a EVOS XL microscope using 20x and 10x magnification. Pictures were
121 analyzed using ImageJ software with the angiogenesis analyzer plugin developed by Gilles
122 Carpentier [34].

124 **Western blot**

125 Cells were grown in a 6-well plate at 300k cells/well before being lysed by RIPA completed
 126 with antiproteases and antiphosphatases (Roche® 11836170001). Supernatant was
 127 centrifugated at 14, 000 rpm, 4°C. for 15 min. Protein dosage was performed using BCA assay
 128 (Thermo Scientific® #23225) and each sample was read by a spectrophotometer (SpectroMax
 129 M2) at 562 nm. After adding 4X Laemmli buffer (Bio-rad® #161-0747), proteins were
 130 denatured at 95°C. Migration was realized in a polyacrylamide gel (4%-15%) (Biorad® #
 131 4561094) with SDS buffer (Bio-rad® #1610772) at 110V while migration was performed with
 132 trans Turbo technology (Bio-rad®) using the trans-Blot Turbo Transfert Kit (Bio-rad®
 133 #1704274) to PVDF membranes. These last were incubated with the appropriate primary
 134 antibody (overnight, 4°C) before incubation with a secondary antibody (1h, room temperature).
 135 All informations about antibodies are summarized in **Table 1**. Bands were detected using a
 136 peroxidase-conjugated IgG antibody and visualized by enhanced chemiluminescence (Luminol
 137 Sc-2048 Santa Cruz® or femto high sensitivity #34096 Thermo Scientific®). GAPDH was used
 138 as a loading control. Images were acquired using LAS4000+ revelator device.

139 **Table 1:** Antibodies used for Western blot analysis

	Antibody	Concentration	Origin	Company	Reference
Primary	α -SMA	1/500	Mouse	Sigma Aldrich®	A2547
	vWF (D8L8G)	1/1000	Rabbit	Cell Signaling®	#65707
	GAPDH	1/2000	Mouse	Sigma Aldrich®	G8795
	Reagent	Concentration	Coupled	Company	Reference
Secondary	IgG	1/2000	Mouse	ThermoScientific®	32430
	peroxidase				

	IgG peroxidase	1/2000	Rabbit	Life Technology [®]	G2123
--	-------------------	--------	--------	------------------------------	-------

140

141 **Flux cytometry**

142 Cells were grown in 6-well plates at 300k cells/well. After treatment, cells were washed with
 143 500 μ L of washing buffer (1X PBS + 0.1% BSA) and, then, were centrifugated at 1,500 rpm
 144 for 5 min. Cell fixation was performed with a 2% paraformaldehyde solution for 15 min. Cells
 145 were then permeabilized with a 0.1% saponin solution for 15 min. Cells were incubated with
 146 FITC conjugated anti-vWF (ab8822 abcam[®]) and/or APC conjugated anti- α -sma (IC1420A;
 147 R&D Systems[®]) antibodies at 10 μ L/ 10^6 cells for 15 min. An isotype control was used to detect
 148 non-specific labeling of antibodies. Reading was performed with BD FACS CantoTM II
 149 equipement (Biosciences[®]).

150 **ROS production measurement**

151 Cells were grown in a 96-well plate at 4k cells/well. The DCFDA (Invitrogen[®] D399) solution
 152 is diluted in DMSO (stock solution of 2 mM) and in HBSS to a final working solution of 2 μ M.
 153 After treatment, cells were washed three times with HBSS and 100 μ L DCFDA (2 μ M) was
 154 added in each well. Plate was incubated at 37 °C, 5% CO₂ for 40 min. After incubation, the
 155 probe was removed and cells were washed three times with HBSS. The fluorescence was
 156 measured with a microplate reader (CalrioStar) at 485 nm excitation and 520 nm emission.
 157 H₂O₂ (60 μ M) was used as a positive control.

158 **Statistical analysis**

159 Comparisons between two different conditions were assessed using Mann-Whitney test while
 160 differences among groups of more than two were tested using ANOVA, followed by Bonferroni
 161 correction as appropriate. Data are expressed as mean \pm SD of three or more independent
 162 experiments. Statistical significance was confirmed if p was at least less than 0.05.

163 **Results**

164 **SK-MEL 28 conditioned media (CM) promoted EndMT**

165 In order to evaluate the impact of conditioned media on EndMT, different functional and
166 phenotypic parameters were considered. Analysis of HUVECs proliferation showed a decrease
167 in cell treated with CM for 48h ($p<0.01$) and 72h ($p<0.05$) compared to control cell. Moreover,
168 a significant decrease ($p<0.001$) in proliferation of cells treated with TGF- β 2/IL-1 β was found
169 in comparison with untreated cells (**Figure 1A**). While no change in migration was observed in
170 CM-treated cells after 24h or 72h, a significant increase ($p<0.001$) in HUVECs migration was
171 shown after 48h in comparison with untreated cells. Furthermore, treatment with TGF- β 2/IL-
172 1 β decreased significantly the migration of HUVECs in comparison with control cells (**Figure**
173 **1B**). These functional data were complemented by a tubulogenesis study on Matrigel[®]. Thus,
174 in CM-treated cells, a significant decrease of capillary length was observed after 24h ($p<0.05$),
175 48h ($p<0.05$) and 72h ($p<0.001$) treatment (**Figure 1C**). Likewise, a significant decrease of
176 capillary length was found after 48 ($p<0.05$) and 72h ($p<0.01$) treatment with the combination
177 TGF- β 2/IL-1 β . In addition, a significant decrease in the number of nodes formed between
178 capillaries was found in CM-treated cells after 24h ($p<0.001$) and 72h ($p<0.0001$) treatment
179 compared to untreated cells. This significant decrease in the number of nodes was found after
180 72h ($p<0.0001$) treatment with TGF- β 2/IL-1 β (**Figure 1D**).

181 Analysis of α -SMA expression did not reveal any significant difference between CM-treated
182 and control cells after 24, 48 or 72h treatment. While treatment with TGF- β 2/IL-1 β did not
183 modify α -SMA expression after 24 or 72h treatment, a significant increase was found after 48h
184 treatment (**Figure 1E**). Furthermore, for each time point studied, no change in vWF expression
185 was shown in CM-treated cells or in cells treated with TGF- β 2/IL-1 β compared to control cells
186 (**Figure 1F**).

187 Phalloidin staining did not reveal any significant difference in stress fiber expression after 24h
188 treatment with CM or TGF- β 2/IL-1 β , compared to control cells. After 48h and 72h, an increase
189 of stress fibers was observed in CM-treated cells and cells treated with TGF- β 2/IL-1 β in
190 comparison with control cells (**Figure 1G**).

191 These results were complemented by flow cytometry analysis. Interestingly, a sub-population
192 of double-labelled cells, α -SMA⁺/vWF⁺ was observed in control cells for each treatment time.
193 Treatment with CM increased the percentage of double-labelled cells after 72h (p<0.05) in
194 comparison with untreated cells. Likewise, treatment with TGF- β 2/IL-1 β did not modify the
195 percentage of α -SMA⁺/vWF⁺ cells neither after 24h nor after 48h treatment. A significant
196 increase was found after 72h treatment. After 24h and 48h, no difference in the percentage of
197 α -SMA⁻/vWF⁺ cells was found in both CM-treated cells and cells treated with TGF- β 2/IL-1 β
198 compared to untreated cells. Interestingly, a significant decrease of α -SMA⁻/vWF⁺ cells was
199 showed in CM-treated cells and cells treated with TGF- β 2/IL-1 β after 72h. The percentage of
200 α -SMA⁻/vWF⁻ cells was negligible (**Figure 1H**).

201

202 **SK-MEL 28 CM enhanced ROS production**

203 As shown in **Figure 2**, treatment, for 24h, with CM did not modify ROS production compared
204 to the control condition. A significant increase in ROS production was found after 48h (p<0.05)
205 and 72h (p<0.0001) treatment with CM in comparison with untreated cells.

206

207 **Pharmacological inhibition of both NOX1 and NOX 2 prevented CM-induced ROS** 208 **production**

209 For each treatment time, the pharmacological inhibition of NOX1 or NOX 2 with ML171 or
210 GSK-2795039, respectively, did not prevent CM-induced ROS production. While the dual
211 inhibition of NOX1 and NOX2 did not prevent ROS production after 24 or 48h, a significant

212 decrease in ROS production was found after 72h in cells co-treated by both NOX inhibitors
213 compared to untreated cells (**Figure 3**).

214

215 **Dual pharmacological inhibition of NOX1 and NOX2 did not affect CM-treated cell**
216 **proliferation or migration**

217 Addition of ML171 and GSK-2795039, alone or in combination, to CM-treated cells did not
218 alter HUVECs proliferation after 24h, 48h or 72h treatment (**Figure 4A**).

219 Treatment for 24h with ML171 and GSK-2795039, alone or in combination, did not alter the
220 migratory capacities of CM-treated cells in comparison with untreated cells. In addition, while
221 ML171 significantly prevented the CM-induced migration, no change was observed in cells
222 treated for 48h with GSK-2795039 or co-treated with ML171 and GSK-2795039. After 72h
223 treatment, no change in migration of CM-treated HUVECs was observed with ML171 and
224 GSK-2795039, alone or in combination (**Figure 4B**).

225

226 **Dual pharmacological inhibition of NOX1 and NOX2 restored the capacity of CM-treated**
227 **cells to form capillaries on Matrigel®**

228 Treatment for 24h and 48h with ML171 and GSK-2795039, alone or in combination, did not
229 prevent the decrease in capillary length observed in CM-treated cells. The capacity of CM-
230 treated cells to form capillaries was not altered with ML171 or GSK-2795039, used individually
231 for 72h. However, in combination, these two inhibitors restored the capacity of CM-treated
232 HUVECs to form capillaries on Matrigel® (**Figure 5A**). In addition, if a decrease in the number
233 of nodes was observed for all treatment conditions in CM-treated cells, no change in the number
234 nodes was observed in CM-treated cells with ML171 and/or GSK-2795039 in comparison with
235 CM-treated cells (**Figure 5B**).

236

237 **Long term dual inhibition of NOX1 and NOX2 partially reversed EndMT**

238 Flow cytometry analyses showed that neither ML171 nor GSK-2795039 changed the
239 percentage of both α -SMA⁺/vWF⁺ and α -SMA⁻/vWF⁺ cells after 24, 48 or 72h treatment
240 (Figure 6A). However, it should be noted that a significant enhancement ($p < 0.05$) of α -
241 SMA⁺/vWF⁺ cells was observed in cells co-treated with ML171 and GSK-2795039 for 24h in
242 comparison with cells co-treated for 48h. These data were associated with a significant increase
243 ($p < 0.05$) of α -SMA⁻/vWF⁺ in cells co-treated with CM and each inhibitor between 24 and 48h
244 (**Figure 6B**). The percentage of α -SMA⁻/vWF⁻ cells was negligible (**Figure 6C**).

245

246 **Discussion**

247 The present study aimed to investigate the role of NOX in EndMT induced by CM from SK-
248 MEL 28 melanoma cells. Interestingly, a decrease in the endothelial phenotype was found in
249 CM-treated HUVECs. This phenotypic modification was correlated with a decrease in both
250 capillary formation on Matrigel[®] and cell proliferation and an increase in cell migration. In
251 addition, CM enhanced significantly ROS production from 48h treatment; this increase was
252 prevented by the dual pharmacological inhibition of NOX1 and NOX2 that was also able, in
253 the long term, to partially reverse CM-induced EndMT.

254 Increasing evidence supports the importance of endothelial cell plasticity to explain tumor
255 growth or drug resistance. Endothelial cells are at the crossroads of physiopathological
256 processes such as angiogenesis or EndMT. EndMT is a process, initially described, in the
257 physiopathology of cardiac fibrosis or pulmonary hypertension. Recently, our team reviewed
258 its role in tumorigenesis or in cancer drug resistance [17] and it is now established that EndMT
259 generates up to 40% of CAF [18]. Dynamic interactions between cancer cells and TME have
260 been suggested to explain the induction of EndMT. Thus, in a co-culture model of esophageal
261 adenocarcinoma and human intestinal microvascular endothelial cells, it has been described a

262 mechanism of intercellular communication explaining endothelial cell differentiation [35].
263 These data have been completed by a study aimed to evaluate the impact of conditioned media
264 from non-small-cell lung carcinoma on cultured HUVEC. Interestingly, the authors confirmed
265 a crosstalk between tumor and endothelial cells that explains EndMT [36]. In this study, we
266 present evidence that CM from SK-MEL 28 directly triggered induction of EndMT. The fact
267 that EndMT-phenotype was addressed in HUVEC cultured in CM indicates that this endothelial
268 cell differentiation is induced by factors secreted from tumor cells regardless their interaction
269 with HUVEC. Among these factors, TGF- β 2 and IL-1 β have been described as predominantly
270 produced by melanoma cells [37]. The present study confirmed a significant role of these two
271 cytokines in promoting EndMT verifying similar studies conducted on HUVEC [38] or on brain
272 endothelial cells [39].

273

274 For the first time, we associated the tumor-induced EndMT in HUVEC with a ROS
275 overproduction through a change in endothelial and mesenchymal markers. These findings
276 come in agreement with previous study that confirmed the role of oxidative stress in the control
277 of EndMT in various diseases such as endothelial dysfunction [40], atherosclerosis [41] or renal
278 failure secondary to renal ischemia [42]. Of note, ROS dynamically influence the tumor
279 microenvironment. Thus, it has been recently described that ROS production initiates and
280 promotes metastatic melanoma by promoting mutations in melanocytes and by deregulating the
281 main functions of immune cells from tumor microenvironment [43]. Furthermore, the
282 properties of ROS were different according to their concentration [44]: while at high
283 concentrations they can induce cancer cell apoptosis, at low concentrations they potentiate
284 angiogenesis [45], cancer cell survival or EndMT [46]. Therefore, our data suggest a moderate
285 increase in ROS production, induced by SK-MEL 28 melanoma CM, capable of inducing
286 endothelial cell differentiation.

287 At the molecular level, we identified NOX1 and NOX2 as two key enzymes in the regulation
288 of melanoma-induced EndMT. Two major pathways of ROS production are known: the
289 mitochondrial and the non-mitochondrial pathways involving, for instance, NADPH oxidases.
290 In endothelial cells, a relatively small mitochondrial volume is described [47] while ROS derive
291 mainly from NOX, especillay NOX1 and NOX2 [48]. In our study, we confirmed a synergic
292 effect of these two enzymes in the regulation of tumor-induced EndMT. As recently reviewed,
293 NADPH oxidases are involved in the differentiation of endothelial cells from induced
294 pluripotent stem cells or fibroblasts; the combination of the activities of the different NOX
295 seems necessary to induce endothelial cell differentiation [33]. Furthremore, an increase in both
296 endothelial NOX1 and NOX2 expression and the combined activities of these two isoforms
297 have been described in several models of hypertension [49], hypercholesterolemia [50],
298 diabetes [51] or metabolic syndrome [52]. Finally, these two enzymes share common signaling
299 and activation pathways [53] confirming the hypothesis of a synergistic property in melanoma-
300 induced EndMT. Of note, once ROS is produced through NOX activation, other oxidase
301 systems could amplify this initial response. For instance, endothelial cells exposed to
302 pathological shear stress exhibit a NOX-dependent activation of xanthine oxidase [54].
303 Moreover, ROS can also activate NOX enzymes and increase their own production in a positive
304 feedback-loop [55]. These data could explain the lack of total inhibition of ROS production
305 observed with the two specific inhibitors (**Figure 3**).

306 While initial studies on epithelial-to-mesenchymal transition or EndMT considered these
307 processes as irreversibles, in recent years, it has been suggested intermediates stages in which
308 cells express markers of both phenotypes at the same time [56]. For example, Zeisberg *et al.*
309 have shown a co-expression of CD31 endothelial protein and FSP1 mesenchymal marker in
310 EndMT during renal fibrosis [57]. Our results confirmed this partial EndMT because we found
311 a limited and partial EndMT signature. Indeed, the CM-induction of a mesenchymal signature

312 was not evident and was not accompanied by the anticipated drop in endothelial markers as
313 expected in a full-blown EndMT. Several hypotheses can be proposed to explain this partial
314 EndMT. Thus, the cellular model and the experimental conditions did not allow to induce a total
315 and definitive EndMT. Endothelial cells were cultured with SK-MEL 28 CM for a maximum
316 of 72h. This maximum treatment time was chosen because of the lack of details regarding the
317 stability of CM isolated from SK-MEL 28 cells. However, as previously described in other
318 studies, a treatment for at least 7 days can induce a stable and durable EndMT [35]. In addition,
319 the absence of stable EndMT could be explained by a low level of intracellular ROS. For
320 instance, the half-life of ROS is very short and their bioavailability can be significantly
321 decreased over time. Their capacity to initiate a stable and durable phenotype differentiation
322 may be impacted. The main finding of the present study is an identification of the plasticity of
323 EC as a pillar of tumor development through modification of their phenotype. This plasticity is
324 involved in tumorigenesis and metastatic progression and appears relevant in resistance
325 therapy. Evidence suggests the existence of a signaling pathway, involving ROS production
326 through an activation of endothelial NOX1 and NOX2, that mediates and controls EndMT. As
327 it has been recently reviewed [58], redox homeostasis and oxidative stress are involved in
328 melanoma progression and to explain its resistance to BRAF and MEK inhibitors. Future efforts
329 should be devoted to the identification of novel therapeutic approaches aiming to target this
330 microenvironmental plasticity to improve melanoma treatment.

331

332 **Acknowledgments**

333 The authors would like to thank the French Ministry of Higher Education and Research (VP).
334 Authors thank the Région Pays de la Loire (IC – « Pari scientifique ») and the « comité du
335 Maine et Loire » of the « Ligue contre le Cancer » (NC ; OH) for their grants. Authors also

336 thank SFR ICAT, Catherine Guillet from the “Plateforme d’Analyse Cellulaire et Moléculaire”
337 (PACeM, Angers, France) for their expertise in the field of flow cytometry.
338

339 **Bibliography**

- 340 [1] A.H. Shain, B.C. Bastian, From melanocytes to melanomas, *Nat Rev Cancer* 16(6) (2016)
341 345-58.
- 342 [2] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation., *Cell* 144(5) (2011)
343 646-74.
- 344 [3] K.M. Bussard, L. Mutkus, K. Stumpf, C. Gomez-Manzano, F.C. Marini, Tumor-associated
345 stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment, *Breast Cancer Res* 18(1)
346 (2016) 84.
- 347 [4] I. Falcone, F. Conciatori, C. Bazzichetto, G. Ferretti, F. Cognetti, L. Ciuffreda, M. Milella,
348 Tumor Microenvironment: Implications in Melanoma Resistance to Targeted Therapy and
349 Immunotherapy, *Cancers (Basel)* 12(10) (2020).
- 350 [5] A. Calon, D.V. Tauriello, E. Batlle, TGF-beta in CAF-mediated tumor growth and
351 metastasis, *Semin Cancer Biol* 25 (2014) 15-22.
- 352 [6] J. Folkman, Tumor angiogenesis, *Adv Cancer Res* 19(0) (1974) 331-58.
- 353 [7] F.T. Wang, W. Sun, J.T. Zhang, Y.Z. Fan, Cancer-associated fibroblast regulation of tumor
354 neo-angiogenesis as a therapeutic target in cancer, *Oncol Lett* 17(3) (2019) 3055-3065.
- 355 [8] K. Xiao, Z. Ouyang, H.H. Tang, Inhibiting the proliferation and metastasis of hilar
356 cholangiocarcinoma cells by blocking the expression of vascular endothelial growth factor with
357 small interfering RNA, *Oncol Lett* 16(2) (2018) 1841-1848.
- 358 [9] S. Liebner, A. Cattelino, R. Gallini, N. Rudini, M. Iurlaro, S. Piccolo, E. Dejana, Beta-
359 catenin is required for endothelial-mesenchymal transformation during heart cushion
360 development in the mouse, *J Cell Biol* 166(3) (2004) 359-67.
- 361 [10] E. Arciniegas, C.Y. Neves, L.M. Carrillo, E.A. Zambrano, R. Ramírez, Endothelial-
362 mesenchymal transition occurs during embryonic pulmonary artery development, *Endothelium*
363 12(4) (2005) 193-200.

- 364 [11] S.M. Hall, A.A. Hislop, C.M. Pierce, S.G. Haworth, Prenatal origins of human
365 intrapulmonary arteries: formation and smooth muscle maturation, *Am J Respir Cell Mol Biol*
366 23(2) (2000) 194-203.
- 367 [12] Y. Deng, Y. Guo, P. Liu, R. Zeng, Y. Ning, G. Pei, Y. Li, M. Chen, S. Guo, X. Li, M. Han,
368 G. Xu, Blocking protein phosphatase 2A signaling prevents endothelial-to-mesenchymal
369 transition and renal fibrosis: a peptide-based drug therapy, *Sci Rep* 6 (2016) 19821.
- 370 [13] Q. Li, Y. Yao, S. Shi, M. Zhou, Y. Zhou, M. Wang, J.J. Chiu, Z. Huang, W. Zhang, M.
371 Liu, Q. Wang, X. Tu, Inhibition of miR-21 alleviated cardiac perivascular fibrosis via
372 repressing EndMT in T1DM, *J Cell Mol Med* 24(1) (2020) 910-920.
- 373 [14] S. Guan, J. Zhou, CXCR7 attenuates the TGF- β -induced endothelial-to-mesenchymal
374 transition and pulmonary fibrosis, *Mol Biosyst* 13(10) (2017) 2116-2124.
- 375 [15] J.H. Yeon, H.E. Jeong, H. Seo, S. Cho, K. Kim, D. Na, S. Chung, J. Park, N. Choi, J.Y.
376 Kang, Cancer-derived exosomes trigger endothelial to mesenchymal transition followed by the
377 induction of cancer-associated fibroblasts, *Acta Biomater* 76 (2018) 146-153.
- 378 [16] S. Piera-Velazquez, S.A. Jimenez, Endothelial to Mesenchymal Transition: Role in
379 Physiology and in the Pathogenesis of Human Diseases, *Physiol Rev* 99(2) (2019) 1281-1324.
- 380 [17] N. Clere, S. Renault, I. Corre, Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer, *Front*
381 *Cell Dev Biol* 8 (2020) 747.
- 382 [18] S. Potenta, E. Zeisberg, R. Kalluri, The role of endothelial-to-mesenchymal transition in
383 cancer progression, *Br J Cancer* 99(9) (2008) 1375-9.
- 384 [19] A.S. Boyer, C.P. Erickson, R.B. Runyan, Epithelial-mesenchymal transformation in the
385 embryonic heart is mediated through distinct pertussis toxin-sensitive and TGFbeta signal
386 transduction mechanisms, *Dev Dyn* 214(1) (1999) 81-91.

387 [20] M. Azhar, R.B. Runyan, C. Gard, L.P. Sanford, M.L. Miller, A. Andringa, S. Pawlowski,
388 S. Rajan, T. Doetschman, Ligand-specific function of transforming growth factor beta in
389 epithelial-mesenchymal transition in heart development, *Dev Dyn* 238(2) (2009) 431-42.

390 [21] Y. Nakajima, T. Yamagishi, S. Hokari, H. Nakamura, Mechanisms involved in
391 valvuloseptal endocardial cushion formation in early cardiogenesis: roles of transforming
392 growth factor (TGF)-beta and bone morphogenetic protein (BMP), *Anat Rec* 258(2) (2000)
393 119-27.

394 [22] E.J. Armstrong, J. Bischoff, Heart valve development: endothelial cell signaling and
395 differentiation, *Circ Res* 95(5) (2004) 459-70.

396 [23] V. Platel, S. Faure, I. Corre, N. Clere, Endothelial-to-Mesenchymal Transition (EndoMT):
397 Roles in Tumorigenesis, Metastatic Extravasation and Therapy Resistance, *J Oncol* 2019 (2019)
398 8361945.

399 [24] S. Altenhöfer, P.W. Kleikers, K.A. Radermacher, P. Scheurer, J.J. Rob Hermans, P.
400 Schiffers, H. Ho, K. Wingler, H.H. Schmidt, The NOX toolbox: validating the role of NADPH
401 oxidases in physiology and disease, *Cell Mol Life Sci* 69(14) (2012) 2327-43.

402 [25] I.P. Harrison, S. Selemidis, Understanding the biology of reactive oxygen species and their
403 link to cancer: NADPH oxidases as novel pharmacological targets, *Clin Exp Pharmacol Physiol*
404 41(8) (2014) 533-42.

405 [26] M.M. Konaté, S. Antony, J.H. Doroshov, Inhibiting the Activity of NADPH Oxidase in
406 Cancer, *Antioxid Redox Signal* 33(6) (2020) 435-454.

407 [27] T. Fukai, M. Ushio-Fukai, Cross-Talk between NADPH Oxidase and Mitochondria: Role
408 in ROS Signaling and Angiogenesis, *Cells* 9(8) (2020).

409 [28] J.L. Arbiser, J. Petros, R. Klafater, B. Govindajaran, E.R. McLaughlin, L.F. Brown, C.
410 Cohen, M. Moses, S. Kilroy, R.S. Arnold, J.D. Lambeth, Reactive oxygen generated by Nox1
411 triggers the angiogenic switch, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(2) (2002) 715-20.

412 [29] C. Chen, L. Li, H.J. Zhou, W. Min, The Role of NOX4 and TRX2 in Angiogenesis and
413 Their Potential Cross-Talk, *Antioxidants (Basel)* 6(2) (2017).

414 [30] S. Garrido-Urbani, S. Jemelin, C. Deffert, S. Carnesecchi, O. Basset, C. Szyndralewicz, F.
415 Heitz, P. Page, X. Montet, L. Michalik, J. Arbiser, C. Rüegg, K.H. Krause, B.A. Imhof, B.
416 Imhof, Targeting vascular NADPH oxidase 1 blocks tumor angiogenesis through a PPAR α
417 mediated mechanism, *PLoS One* 6(2) (2011) e14665.

418 [31] M. Ushio-Fukai, Y. Nakamura, Reactive oxygen species and angiogenesis: NADPH
419 oxidase as target for cancer therapy, *Cancer Lett* 266(1) (2008) 37-52.

420 [32] C. Xia, Q. Meng, L.Z. Liu, Y. Rojanasakul, X.R. Wang, B.H. Jiang, Reactive oxygen
421 species regulate angiogenesis and tumor growth through vascular endothelial growth factor,
422 *Cancer Res* 67(22) (2007) 10823-30.

423 [33] F. Hahner, F. Moll, K. Schröder, NADPH oxidases in the differentiation of endothelial
424 cells, *Cardiovasc Res* 116(2) (2020) 262-268.

425 [34] G. Carpentier, S. Berndt, S. Ferratge, W. Rasband, M. Cuendet, G. Uzan, P. Albanese,
426 *Angiogenesis Analyzer for ImageJ - A comparative morphometric analysis of "Endothelial*
427 *Tube Formation Assay" and "Fibrin Bead Assay"*, *Sci Rep* 10(1) (2020) 11568.

428 [35] L. Nie, O. Lyros, R. Medda, N. Jovanovic, J.L. Schmidt, M.F. Otterson, C.P. Johnson, B.
429 Behmaram, R. Shaker, P. Rafiee, Endothelial-mesenchymal transition in normal human
430 esophageal endothelial cells cocultured with esophageal adenocarcinoma cells: role of IL-1 β
431 and TGF- β 2, *Am J Physiol Cell Physiol* 307(9) (2014) C859-77.

432 [36] S.H. Kim, Y. Song, H.R. Seo, GSK-3 β regulates the endothelial-to-mesenchymal transition
433 via reciprocal crosstalk between NSCLC cells and HUVECs in multicellular tumor spheroid
434 models, *J Exp Clin Cancer Res* 38(1) (2019) 46.

435 [37] E. Lázár-Molnár, H. Hegyesi, S. Tóth, A. Falus, Autocrine and paracrine regulation by
436 cytokines and growth factors in melanoma, *Cytokine* 12(6) (2000) 547-54.

437 [38] M. Maleszewska, J.R. Moonen, N. Huijkman, B. van de Sluis, G. Krenning, M.C.
438 Harmsen, IL-1 β and TGF β 2 synergistically induce endothelial to mesenchymal transition in an
439 NF κ B-dependent manner, *Immunobiology* 218(4) (2013) 443-54.

440 [39] C. Derada Troletti, R.D. Fontijn, E. Gowing, M. Charabati, B. van Het Hof, I. Didouh,
441 S.M.A. van der Pol, D. Geerts, A. Prat, J. van Horssen, G. Kooij, H.E. de Vries, Inflammation-
442 induced endothelial to mesenchymal transition promotes brain endothelial cell dysfunction and
443 occurs during multiple sclerosis pathophysiology, *Cell Death Dis* 10(2) (2019) 45.

444 [40] I. Montorfano, A. Becerra, R. Cerro, C. Echeverría, E. Sáez, M.G. Morales, R. Fernández,
445 C. Cabello-Verrugio, F. Simon, Oxidative stress mediates the conversion of endothelial cells
446 into myofibroblasts via a TGF- β 1 and TGF- β 2-dependent pathway, *Lab Invest* 94(10) (2014)
447 1068-82.

448 [41] M. Mahmoud, C. Souilhol, J. Serbanovic-Canic, P. Evans, GATA4-Twist1 Signalling in
449 Disturbed Flow-Induced Atherosclerosis, *Cardiovasc Drugs Ther* (2019).

450 [42] D. Patschan, A. Kribben, G.A. Müller, Postischemic microvasculopathy and endothelial
451 progenitor cell-based therapy in ischemic AKI: update and perspectives, *Am J Physiol Renal*
452 *Physiol* 311(2) (2016) F382-94.

453 [43] E. Obrador, F. Liu-Smith, R.W. Dellinger, R. Salvador, F.L. Meyskens, J.M. Estrela,
454 Oxidative stress and antioxidants in the pathophysiology of malignant melanoma, *Biol Chem*
455 400(5) (2019) 589-612.

456 [44] V. Aggarwal, H.S. Tuli, A. Varol, F. Thakral, M.B. Yerer, K. Sak, M. Varol, A. Jain, M.A.
457 Khan, G. Sethi, Role of Reactive Oxygen Species in Cancer Progression: Molecular
458 Mechanisms and Recent Advancements, *Biomolecules* 9(11) (2019).

459 [45] M. Ushio-Fukai, R.W. Alexander, Caveolin-dependent angiotensin II type 1 receptor
460 signaling in vascular smooth muscle, *Hypertension* 48(5) (2006) 797-803.

461 [46] S. Guo, X. Chen, The human Nox4: gene, structure, physiological function and
462 pathological significance, *J Drug Target* 23(10) (2015) 888-96.

463 [47] L.N. Groschner, M. Waldeck-Weiermair, R. Malli, W.F. Graier, Endothelial mitochondria-
464 -less respiration, more integration, *Pflugers Arch* 464(1) (2012) 63-76.

465 [48] G.R. Drummond, C.G. Sobey, Endothelial NADPH oxidases: which NOX to target in
466 vascular disease?, *Trends Endocrinol Metab* 25(9) (2014) 452-63.

467 [49] S. Wind, K. Beuerlein, M.E. Armitage, A. Taye, A.H. Kumar, D. Janowitz, C. Neff, A.M.
468 Shah, K. Wingler, H.H. Schmidt, Oxidative stress and endothelial dysfunction in aortas of aged
469 spontaneously hypertensive rats by NOX1/2 is reversed by NADPH oxidase inhibition,
470 *Hypertension* 56(3) (2010) 490-7.

471 [50] X.L. Niu, N.R. Madamanchi, A.E. Vendrov, I. Tchivilev, M. Rojas, C. Madamanchi, R.P.
472 Brandes, K.H. Krause, J. Humphries, A. Smith, K.G. Burnand, M.S. Runge, Nox activator 1: a
473 potential target for modulation of vascular reactive oxygen species in atherosclerotic arteries,
474 *Circulation* 121(4) (2010) 549-59.

475 [51] M.C. Wendt, A. Daiber, A.L. Kleschyov, A. Mülsch, K. Sydow, E. Schulz, K. Chen, J.F.
476 Keaney, B. Lassègue, U. Walter, K.K. Griendling, T. Münzel, Differential effects of diabetes
477 on the expression of the gp91phox homologues nox1 and nox4, *Free Radic Biol Med* 39(3)
478 (2005) 381-91.

479 [52] C.K. Roberts, R.J. Barnard, R.K. Sindhu, M. Jurczak, A. Ehdaie, N.D. Vaziri, Oxidative
480 stress and dysregulation of NAD(P)H oxidase and antioxidant enzymes in diet-induced
481 metabolic syndrome, *Metabolism* 55(7) (2006) 928-34.

482 [53] A.K. Chowdhury, T. Watkins, N.L. Parinandi, B. Saatian, M.E. Kleinberg, P.V. Usatyuk,
483 V. Natarajan, Src-mediated tyrosine phosphorylation of p47phox in hyperoxia-induced
484 activation of NADPH oxidase and generation of reactive oxygen species in lung endothelial
485 cells, *J Biol Chem* 280(21) (2005) 20700-11.

486 [54] J.S. McNally, M.E. Davis, D.P. Giddens, A. Saha, J. Hwang, S. Dikalov, H. Jo, D.G.
487 Harrison, Role of xanthine oxidoreductase and NAD(P)H oxidase in endothelial superoxide
488 production in response to oscillatory shear stress, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285(6)
489 (2003) H2290-7.

490 [55] B. Lassègue, K.K. Griendling, Reactive oxygen species in hypertension; An update, *Am J*
491 *Hypertens* 17(9) (2004) 852-60.

492 [56] D.Y. Shu, E. Butcher, M. Saint-Geniez, EMT and EndMT: Emerging Roles in Age-Related
493 Macular Degeneration, *Int J Mol Sci* 21(12) (2020).

494 [57] E.M. Zeisberg, S.E. Potenta, H. Sugimoto, M. Zeisberg, R. Kalluri, Fibroblasts in kidney
495 fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition, *J Am Soc Nephrol* 19(12) (2008)
496 2282-7.

497 [58] L.R. Arslanbaeva, M.M. Santoro, Adaptive redox homeostasis in cutaneous melanoma,
498 *Redox Biol* 37 (2020) 101753.

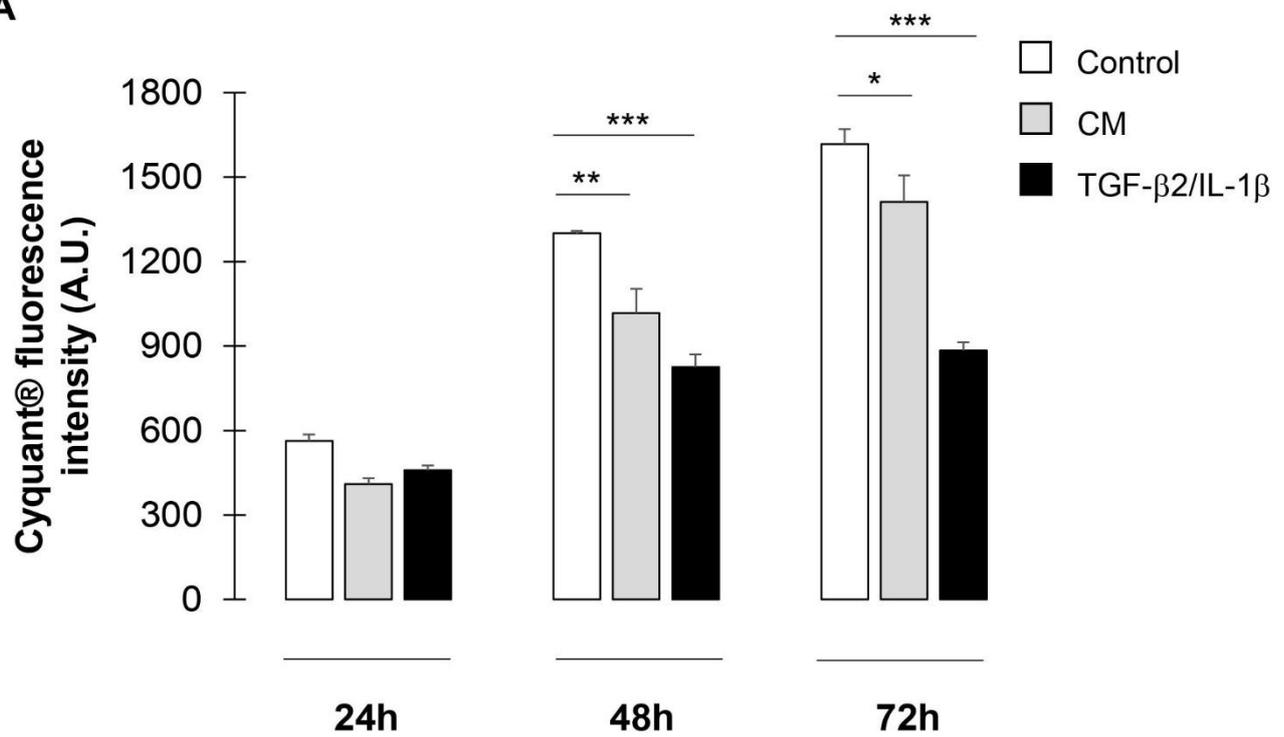
499

500

501

Figure 1

A



B

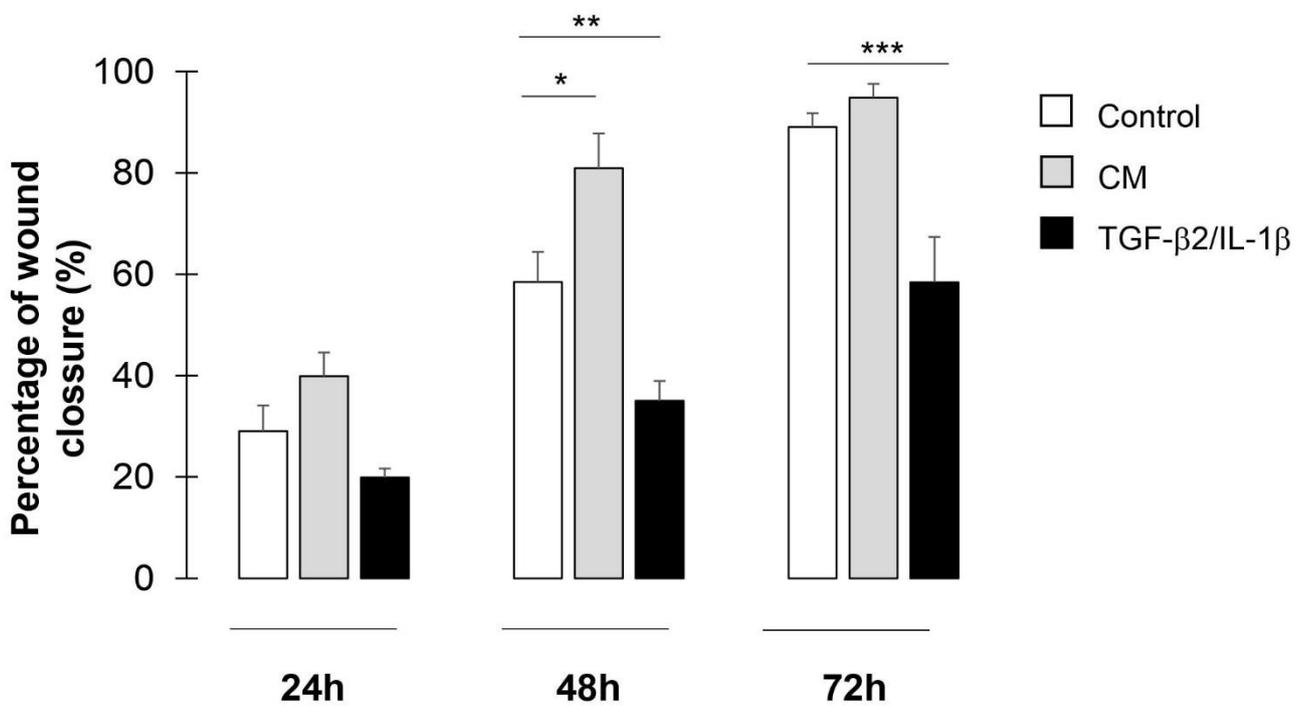


Figure 1

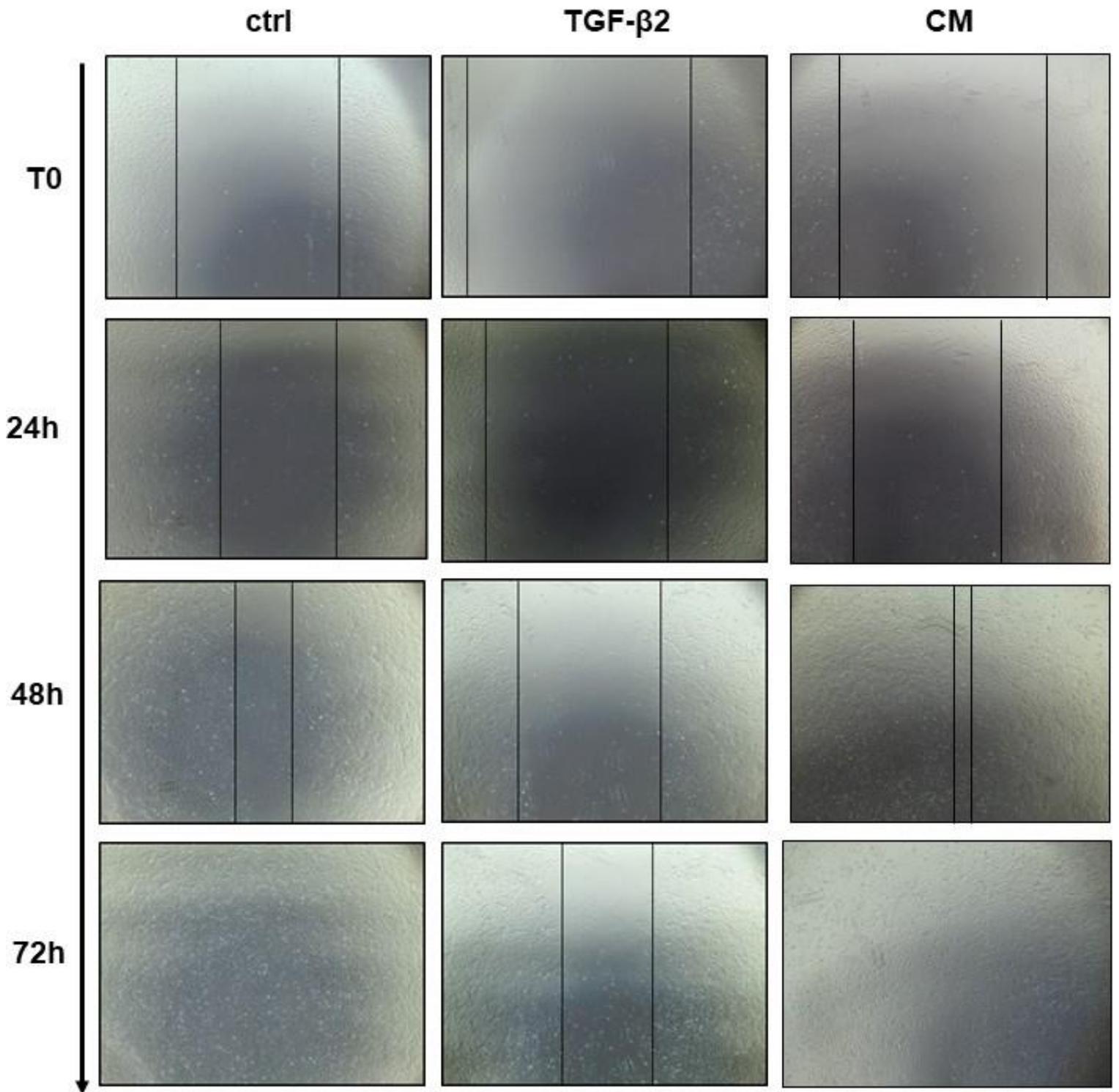


Figure 1

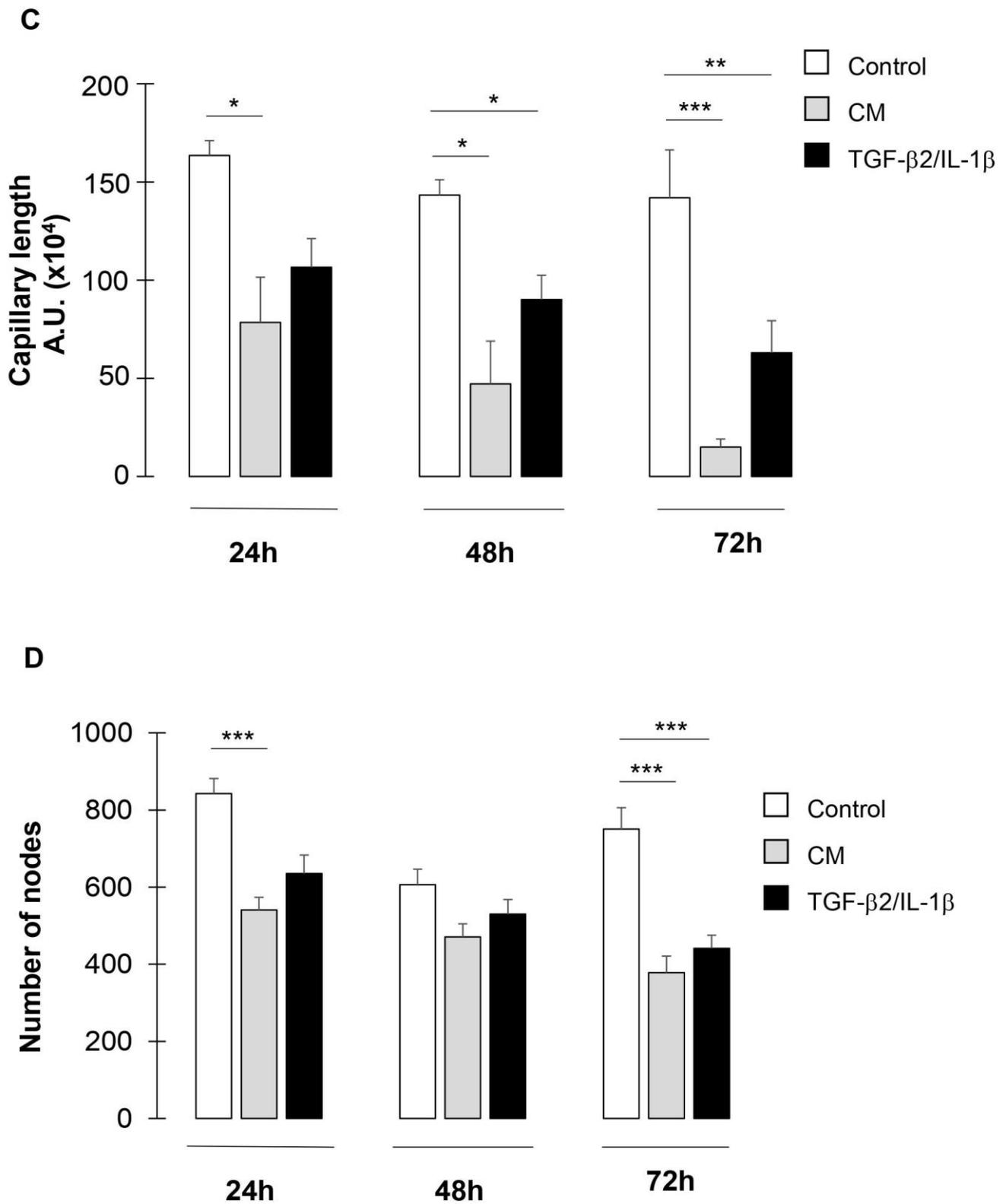


Figure 1

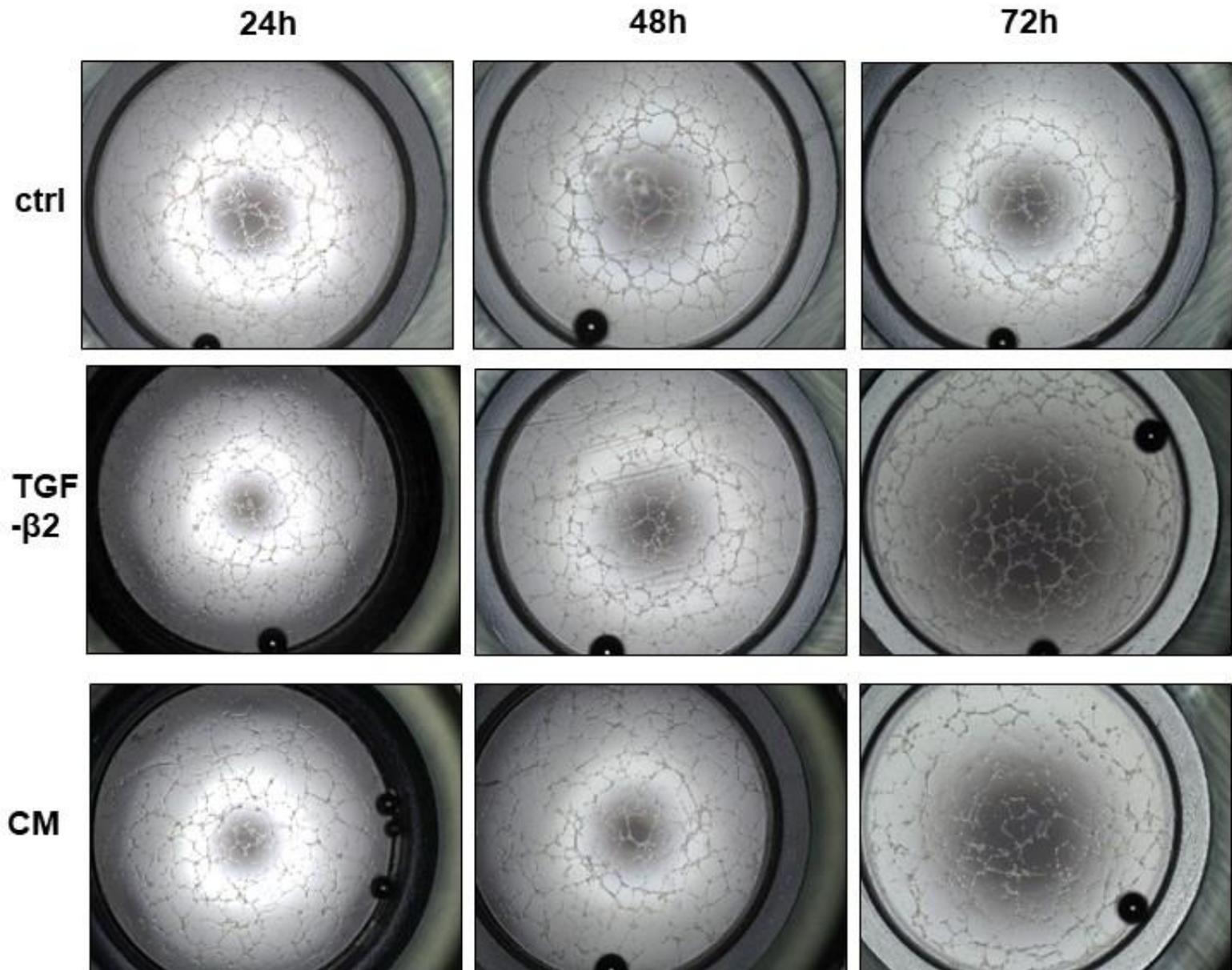


Figure 1

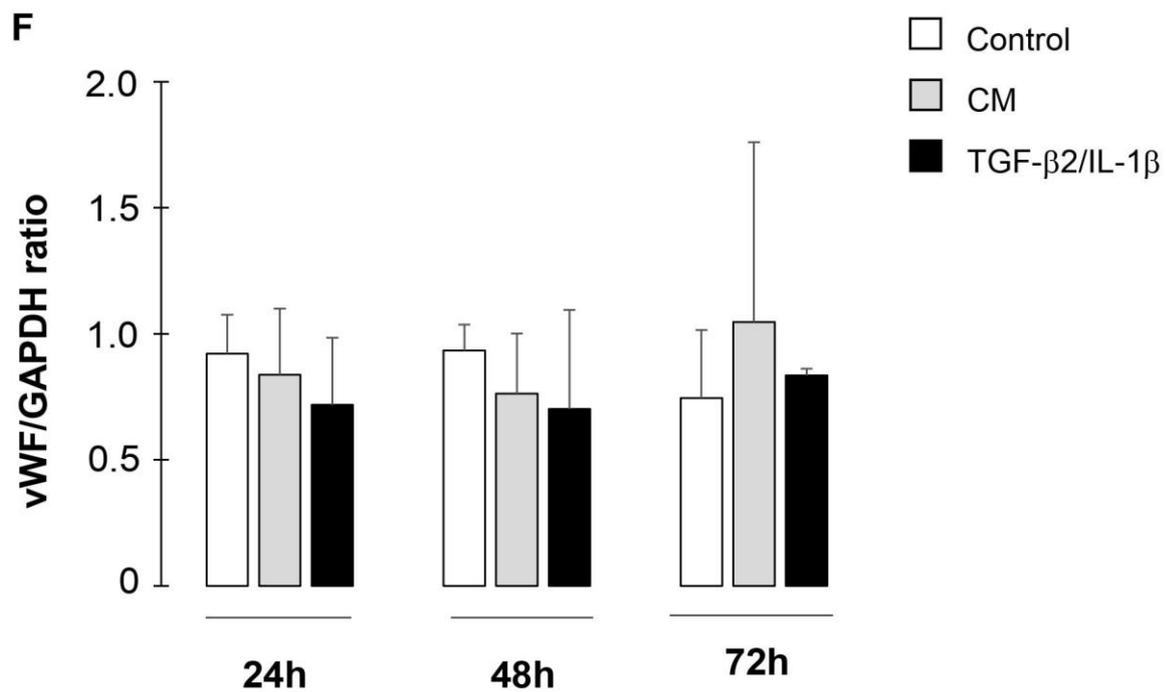
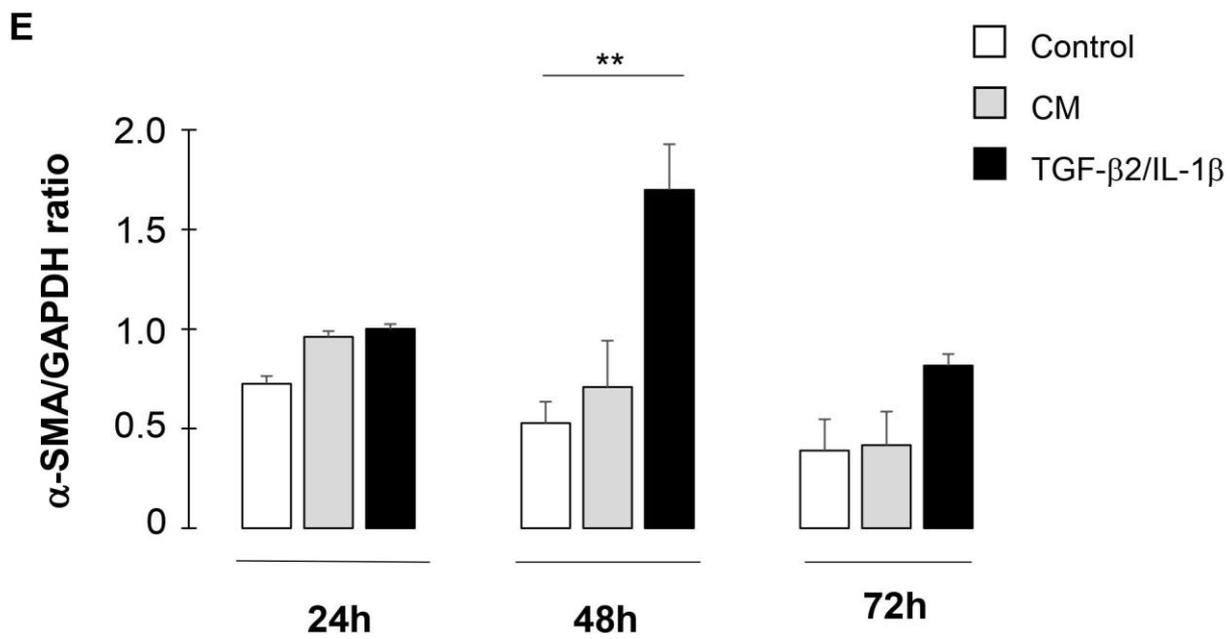


Figure 1

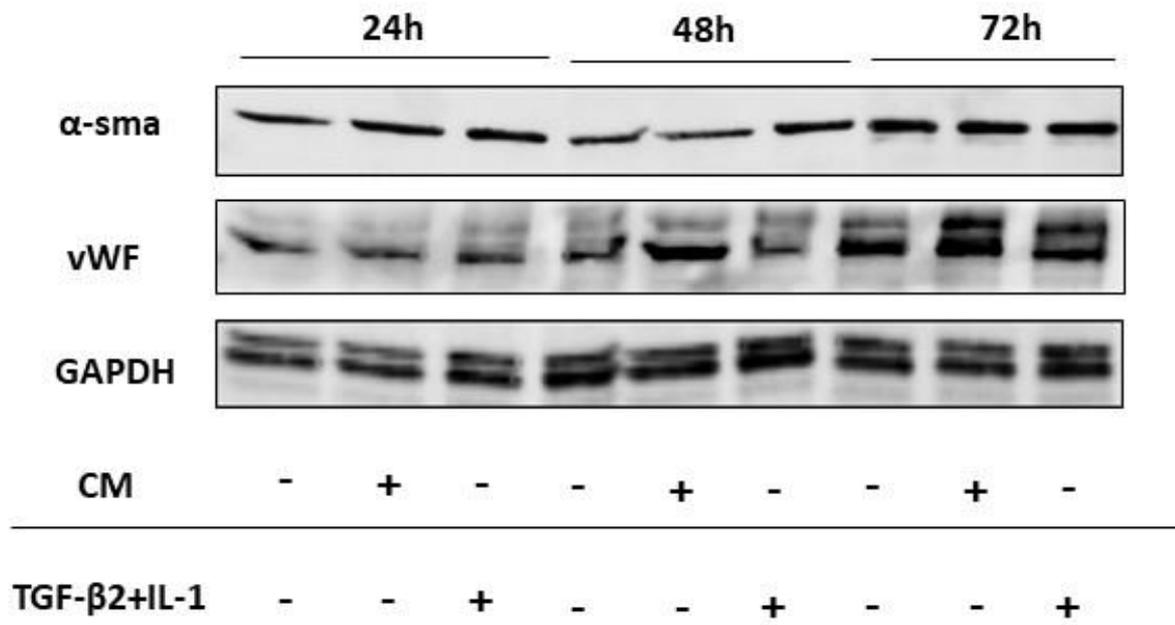


Figure 1

G

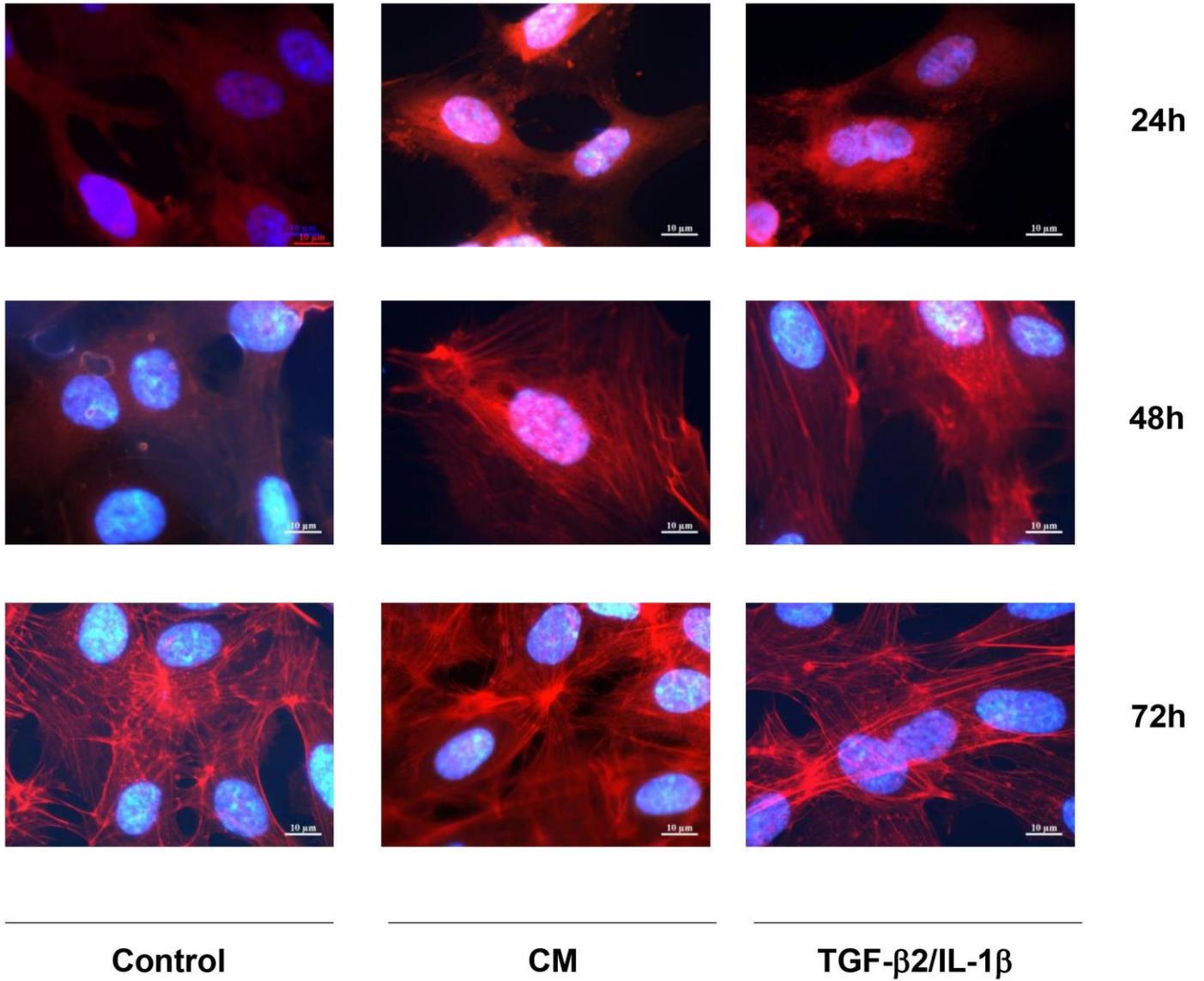


Figure 1

H

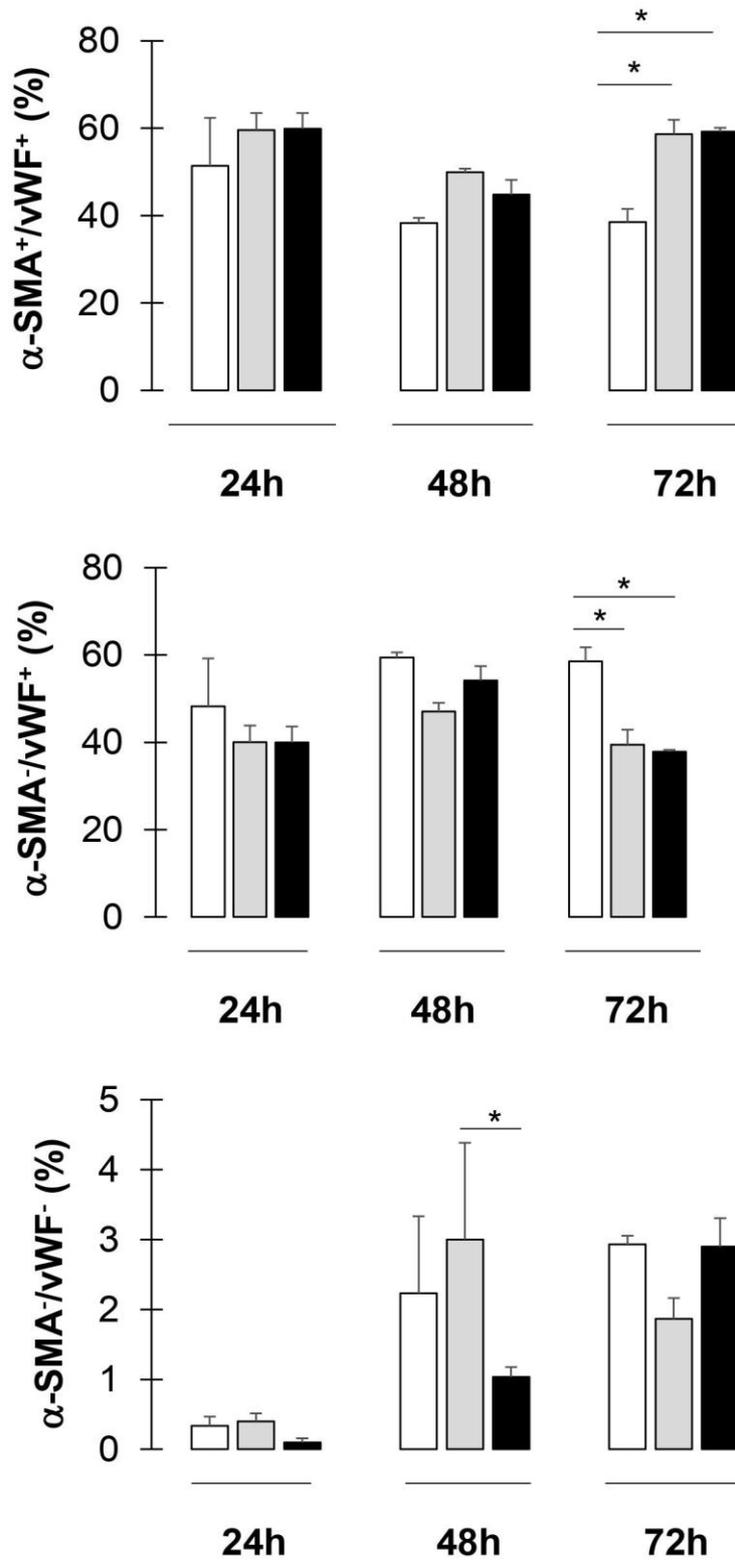
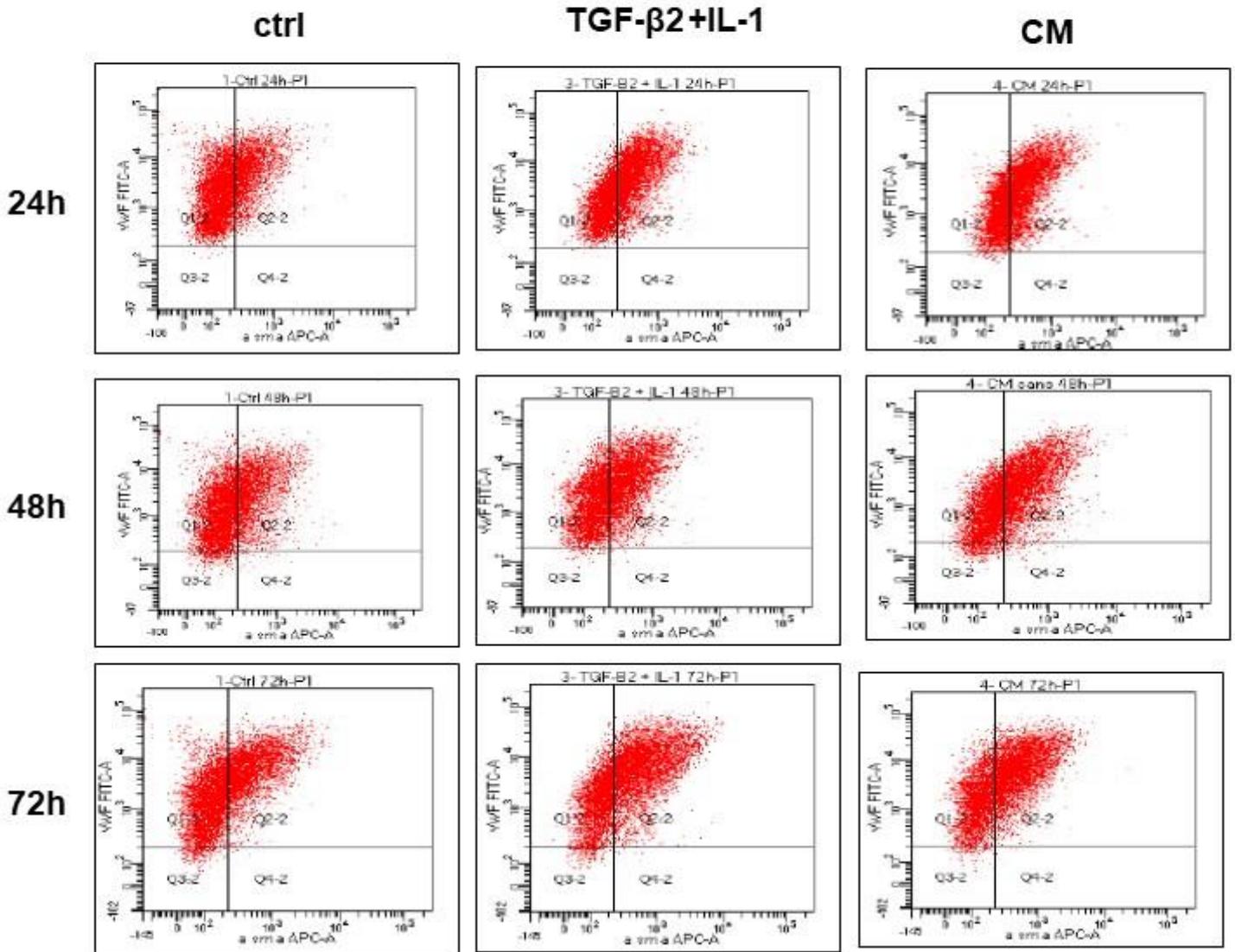


Figure 1



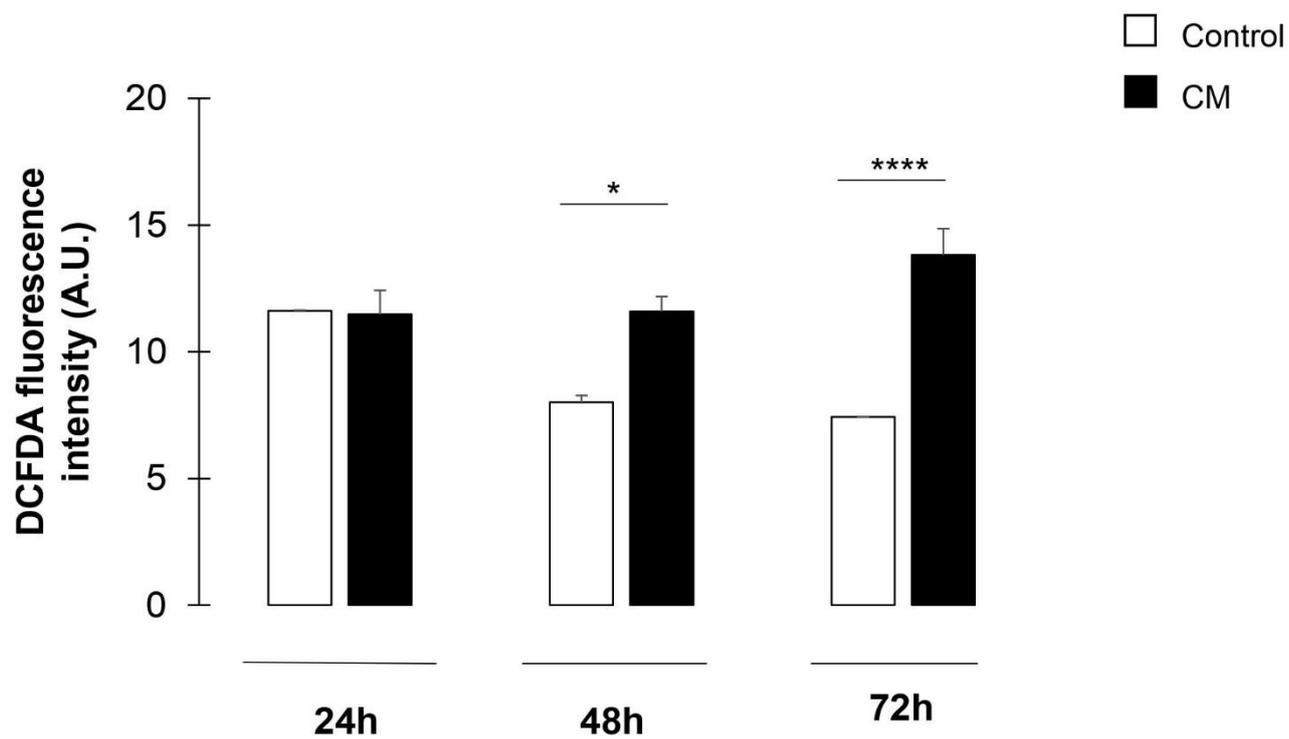
502 **Figure legends**

503 **Figure 1**

504 Analysis of functional properties of HUVECs treated with CM for 24, 48 and 72h. (A)
505 Graphical representation of Cyquant® fluorescence-based proliferation test. Fluorescence
506 intensity was measured with SpectroMax technology (excitation: 480 nm; emission: 520 nm)
507 Graph bars show the mean \pm SEM, * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001 (N=3). (B) Analysis of
508 migratory properties of CM-treated HUVEC. Graphical representation of percentage of wound
509 closure. Graph bars show the mean \pm SEM, * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001 (N=3). (C) Length
510 of capillaries formed by CM-treated cells on Matrigel®. Graphical representation of capillary
511 length (arbitrary units). Graph bars show the mean \pm SEM, * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001
512 (N=3). (D) Number of nodes between capillaries formed from CM-treated HUVEC on
513 Matrigel®. Graphical representation of number of nodes. Graph bars show the mean \pm SEM,
514 * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001 (N=3). (E) Analysis of α -SMA expression by Western blot in
515 CM-treated cells. Graph bars represent the mean ratio between α -SMA and GAPDH \pm SEM,
516 ** p <0.01 (N=3). (F) Analysis of vWF expression by Western blot in CM-treated cells. Graph
517 bars represent the mean ratio between vWF and GAPDH \pm SEM. (N=3) (G) Analysis of actin
518 stress fibers by staining with rhodamine-labelled phalloidin and visualization by confocal
519 microscopy. Images were taken at a magnification of x40. (H) Flow cytometry analysis of the
520 percentage of cells co-labeled with α -SMA and vWF. Graphical representation shows the
521 percentage of α -SMA⁺/vWF⁺, α -SMA⁺/vWF⁻, α -SMA⁻/vWF⁻. Results expressed as percentage
522 on a population of 10,000 cells. Graph bars show the mean \pm SEM, * p <0.05 (N=3).

523

Figure 2

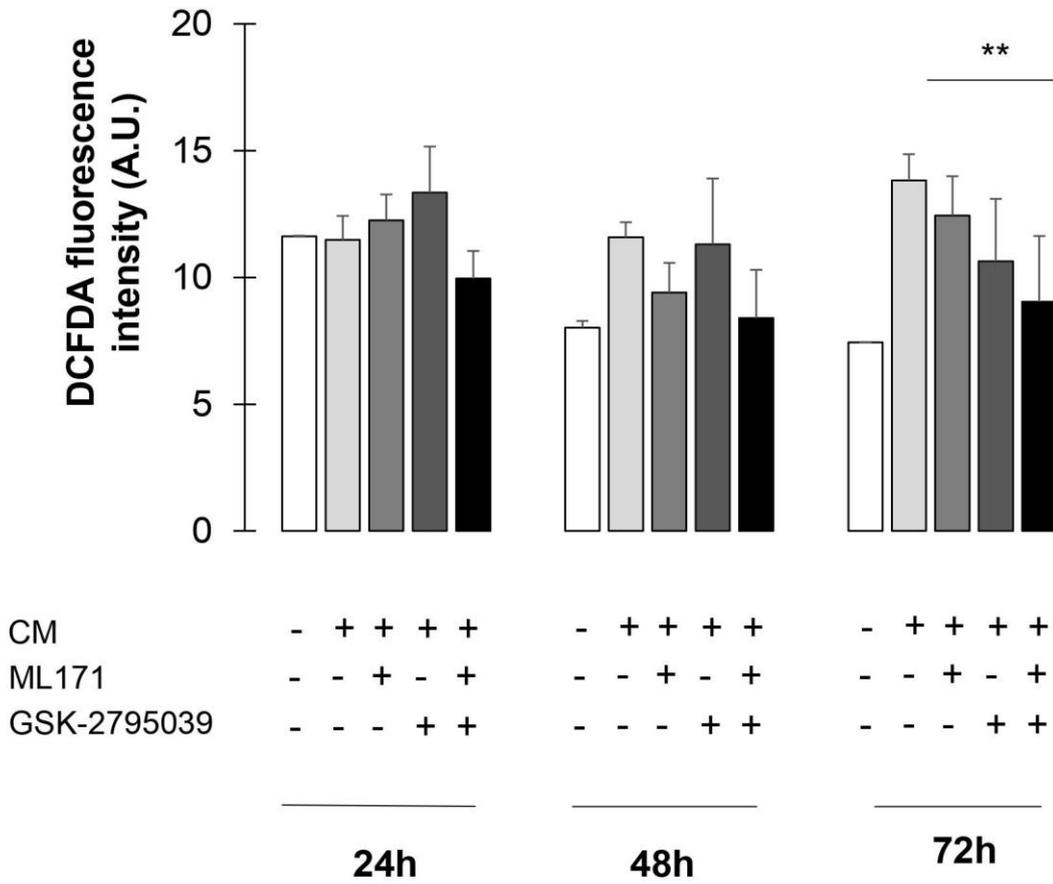


524 **Figure 2**

525 Evaluation of ROS production in CM-treated cells after 24, 48 and 72h. Graphical
526 representation shows the DCFDA fluorescence intensity (arbitrary units). Results are
527 normalized by the concentration of proteins from CM-treated cells. Graph bars show the mean
528 \pm SEM, * $p < 0.05$, **** $p < 10^{-4}$ (N=3).

529

Figure 3



530 **Figure 3**

531 Evaluation of ROS production in cells co-treated with CM and ML171 (3 μ M) and GSK-
532 2795039 (1 μ M), after 24, 48 and 72h. Graphical representation shows the DCFDA fluorescence
533 intensity (arbitrary units). Results are normalized by the concentration of proteins from CM-
534 treated cells. Graph bars show the mean \pm SEM, **p<0.01 (N=3).

535

Figure 4

A

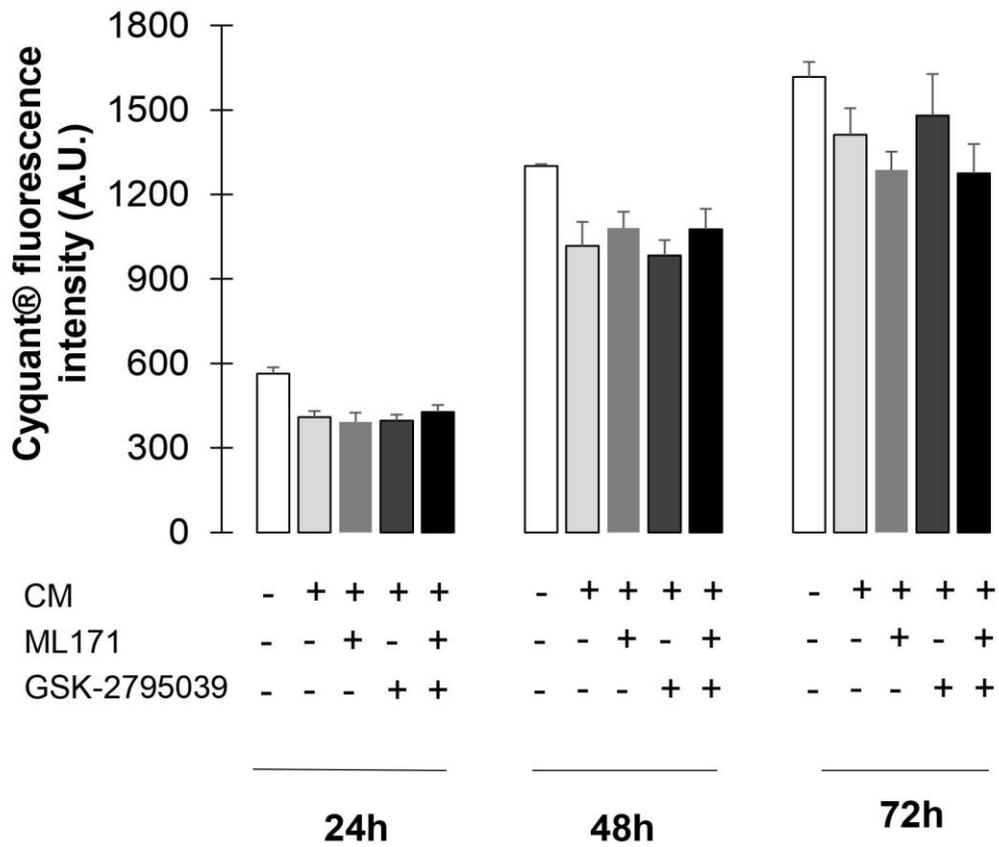


Figure 4

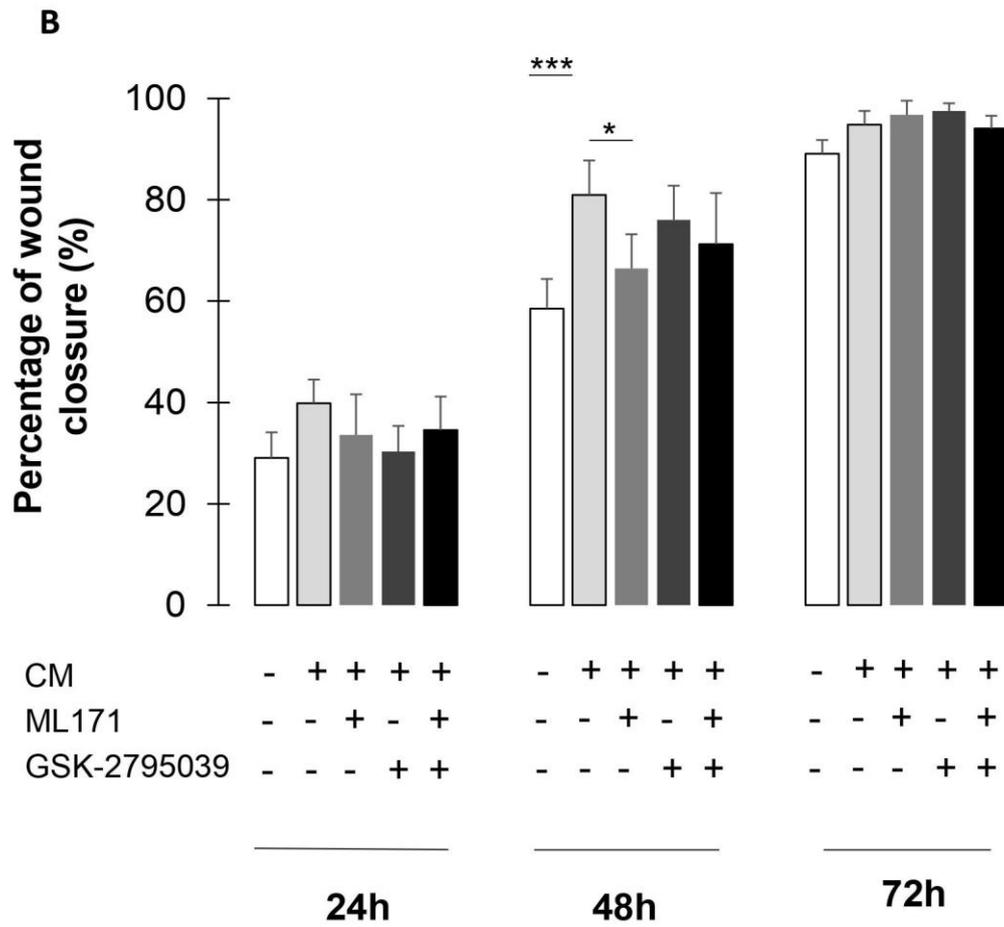
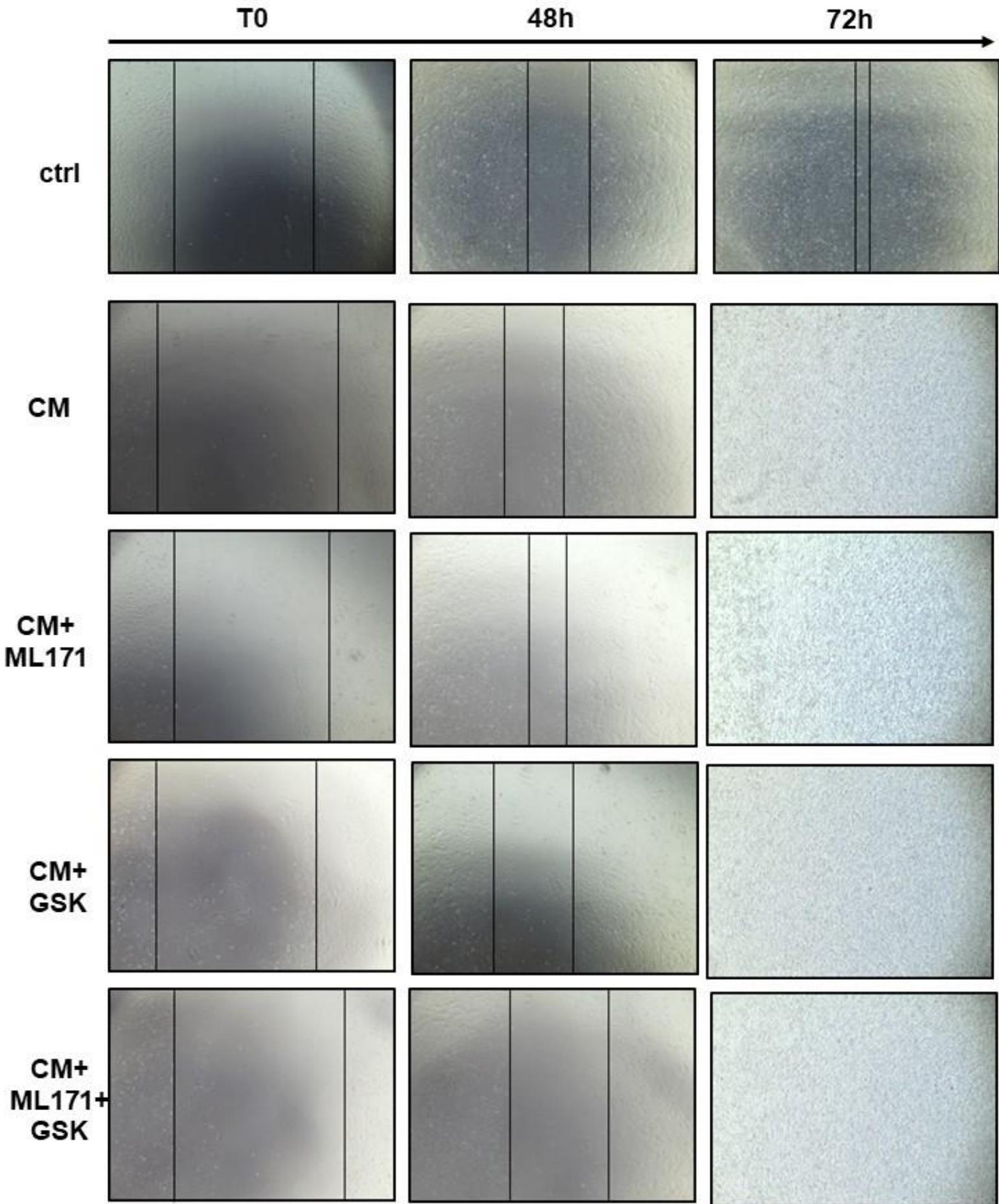


Figure 4



536 **Figure 4**

537 NOX1 and NOX2 inhibitors did not prevent the CM-induced cell proliferation and cell
538 migration. (A) Graphical representation of Cyquant® fluorescence-based proliferation test.
539 Fluorescence intensity was measured with SpectroMax technology (excitation: 480 nm;
540 emission: 520 nm). Cells were co-treated with CM and ML171 (3 μ M) and GSK-2795039 (1
541 μ M). Graph bars show the mean \pm SEM (N=3). (B) Analysis of migratory properties of HUVEC
542 co-treated with CM and ML171 (3 μ M) and GSK-2795039 (1 μ M). Graphical representation
543 of percentage of wound closure. Graph bars show the mean \pm SEM, * p <0.05; *** p <0.001
544 (N=3).

545

Figure 5

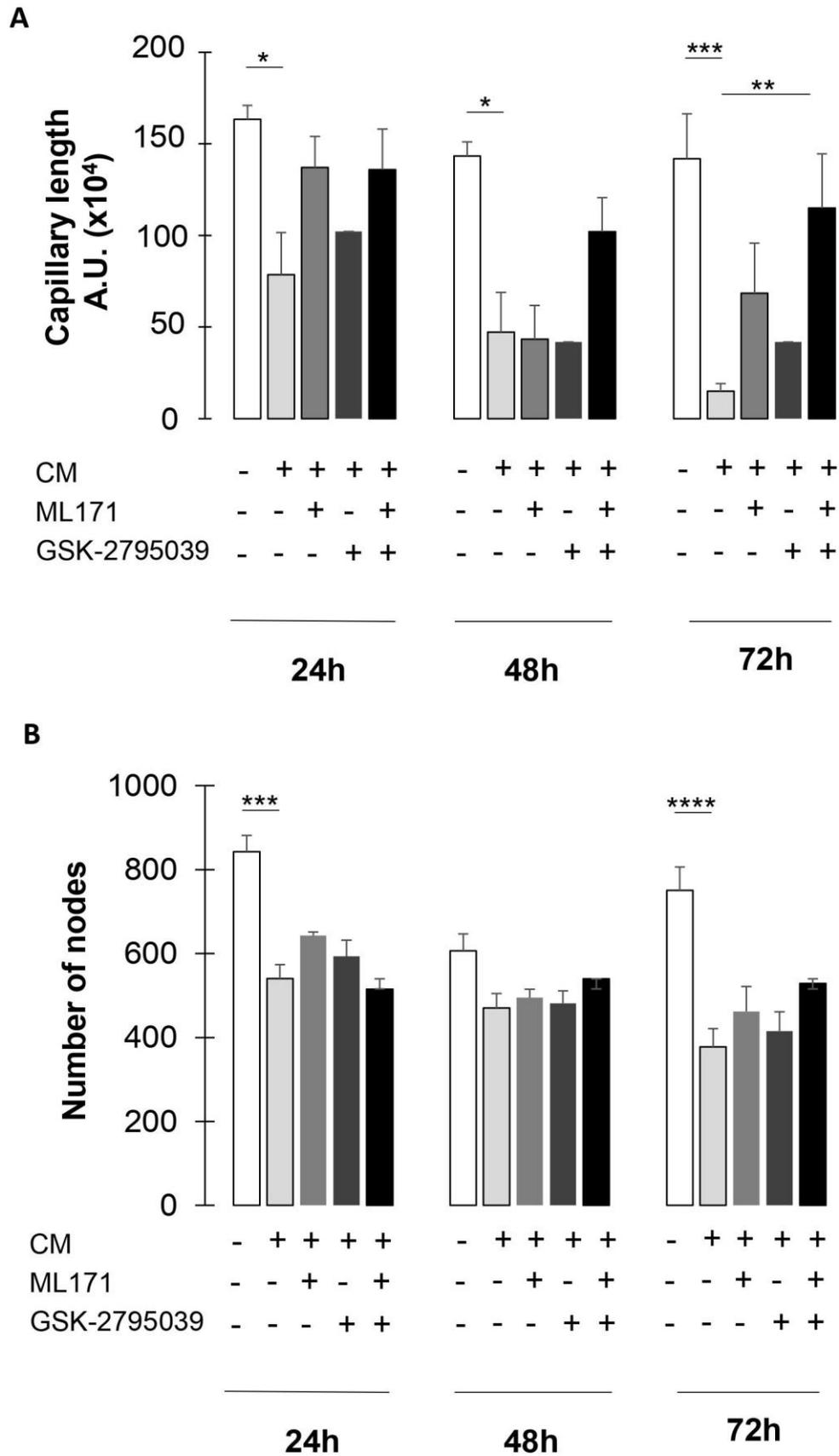
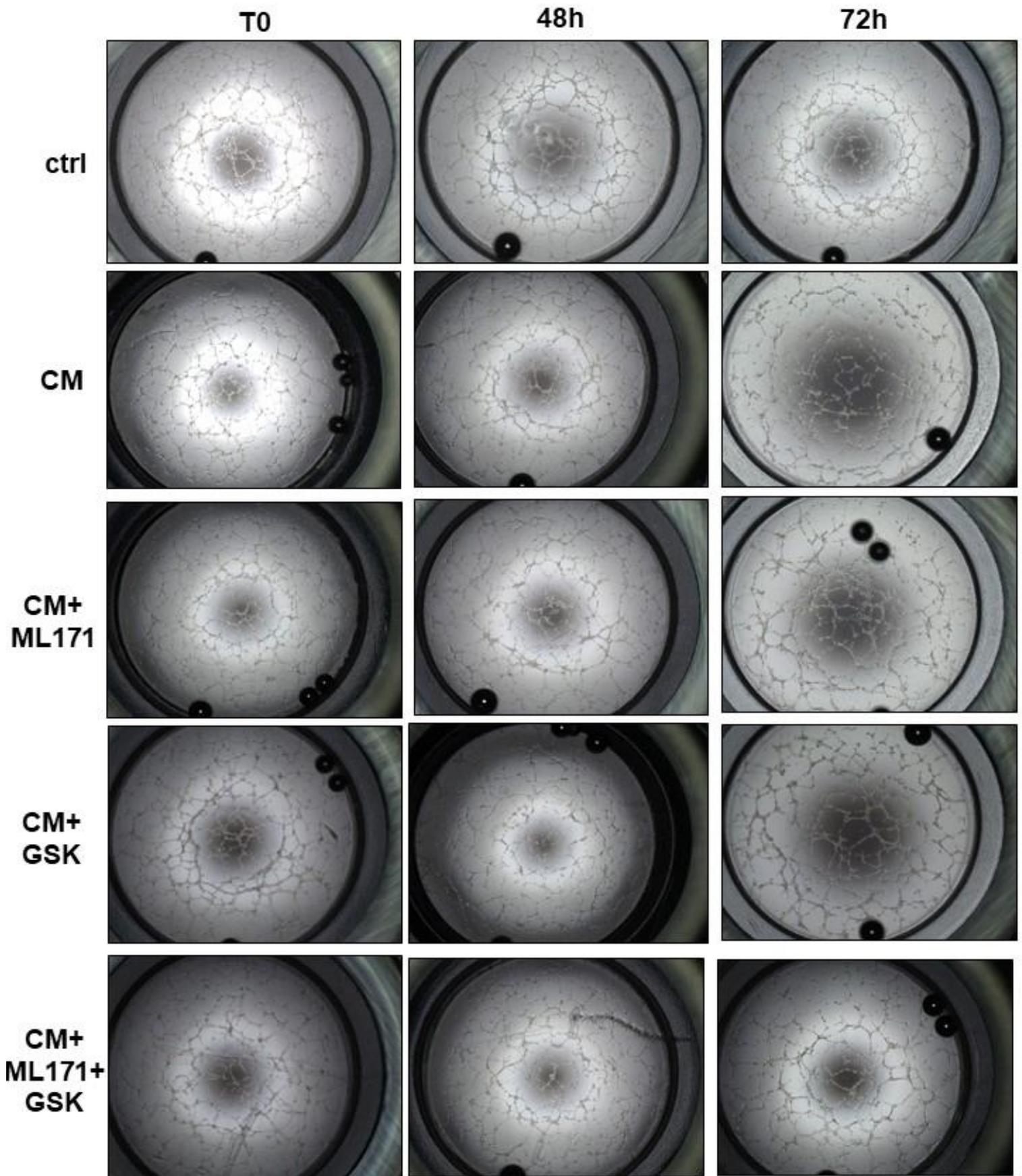


Figure 5



546 **Figure 5**

547 Co-treatment with NOX1 and NOX2 inhibitors prevents CM-induced EndMT. (A) Length of
548 capillaries formed by cells co-treated with CM and ML171 (3 μ M) and GSK-2795039 (1 μ M)
549 on Matrigel[®]. Graphical representation of capillary length (arbitrary units). Graph bars show
550 the mean \pm SEM, * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001 (N=3). (B) Number of nodes between
551 capillaries formed from HUVEC co-treated with CM and ML171 (3 μ M) and GSK-2795039 (1
552 μ M) on Matrigel[®]. Graphical representation of number of nodes. Graph bars show the mean \pm
553 SEM, *** p <0.001, **** p <10⁻⁴ (N=3).
554

Figure 6

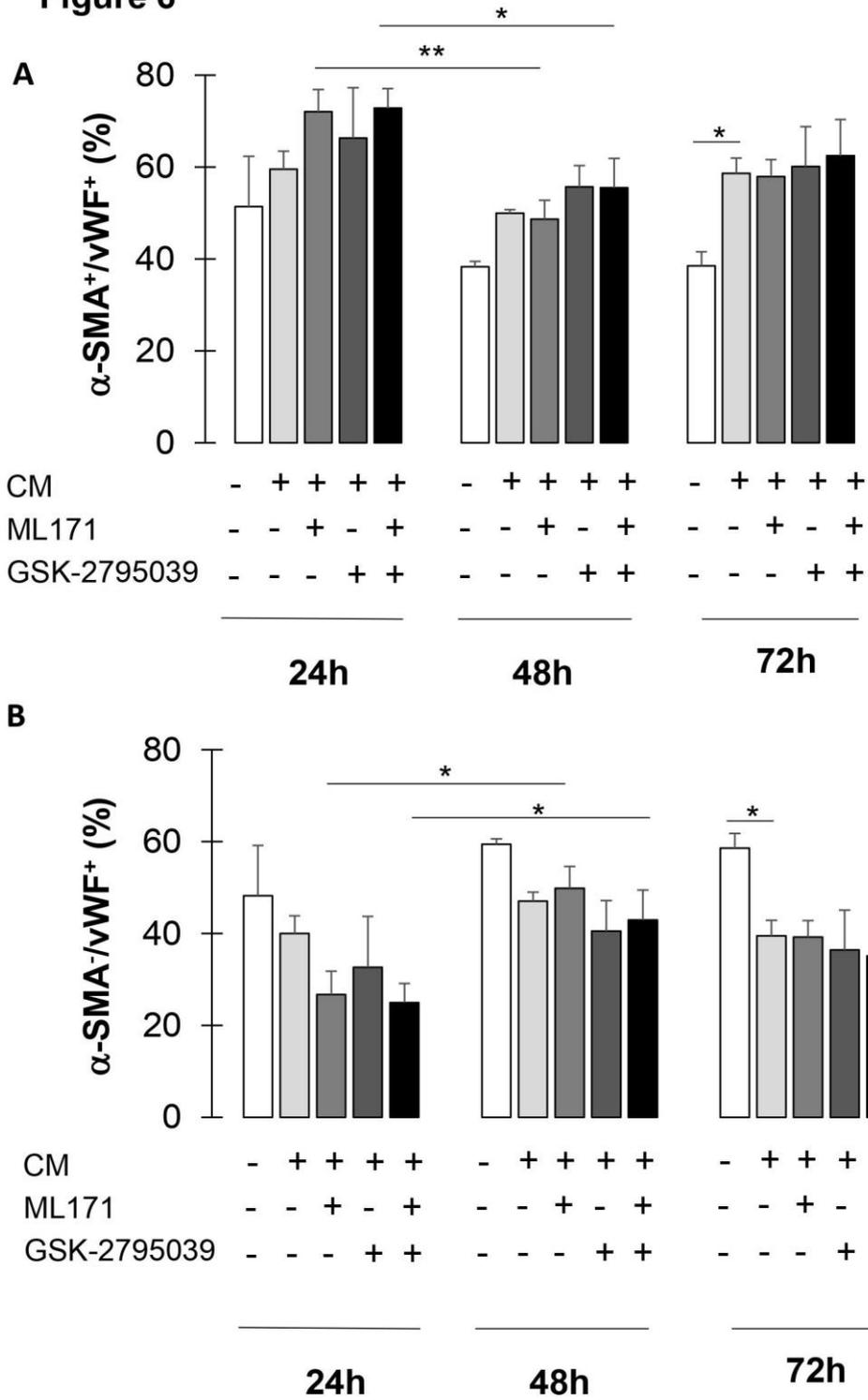


Figure 6

C

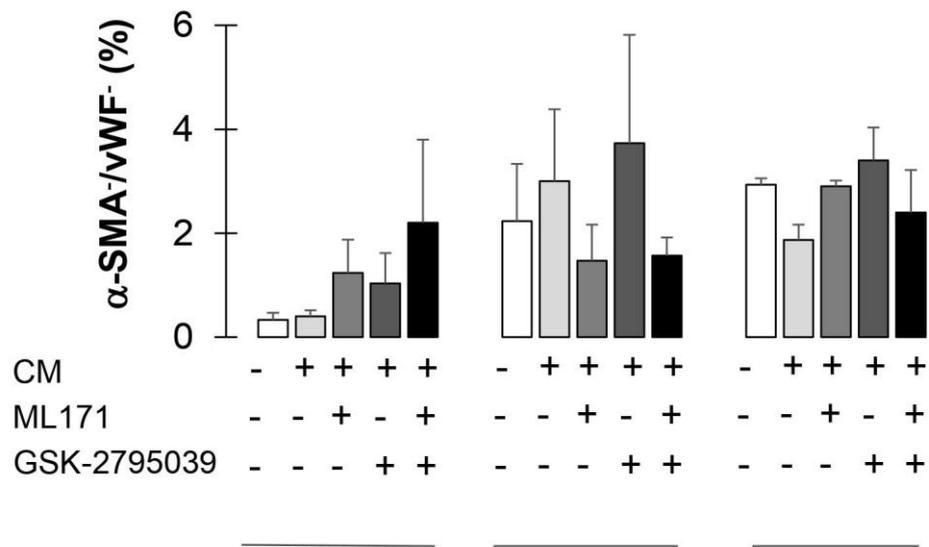
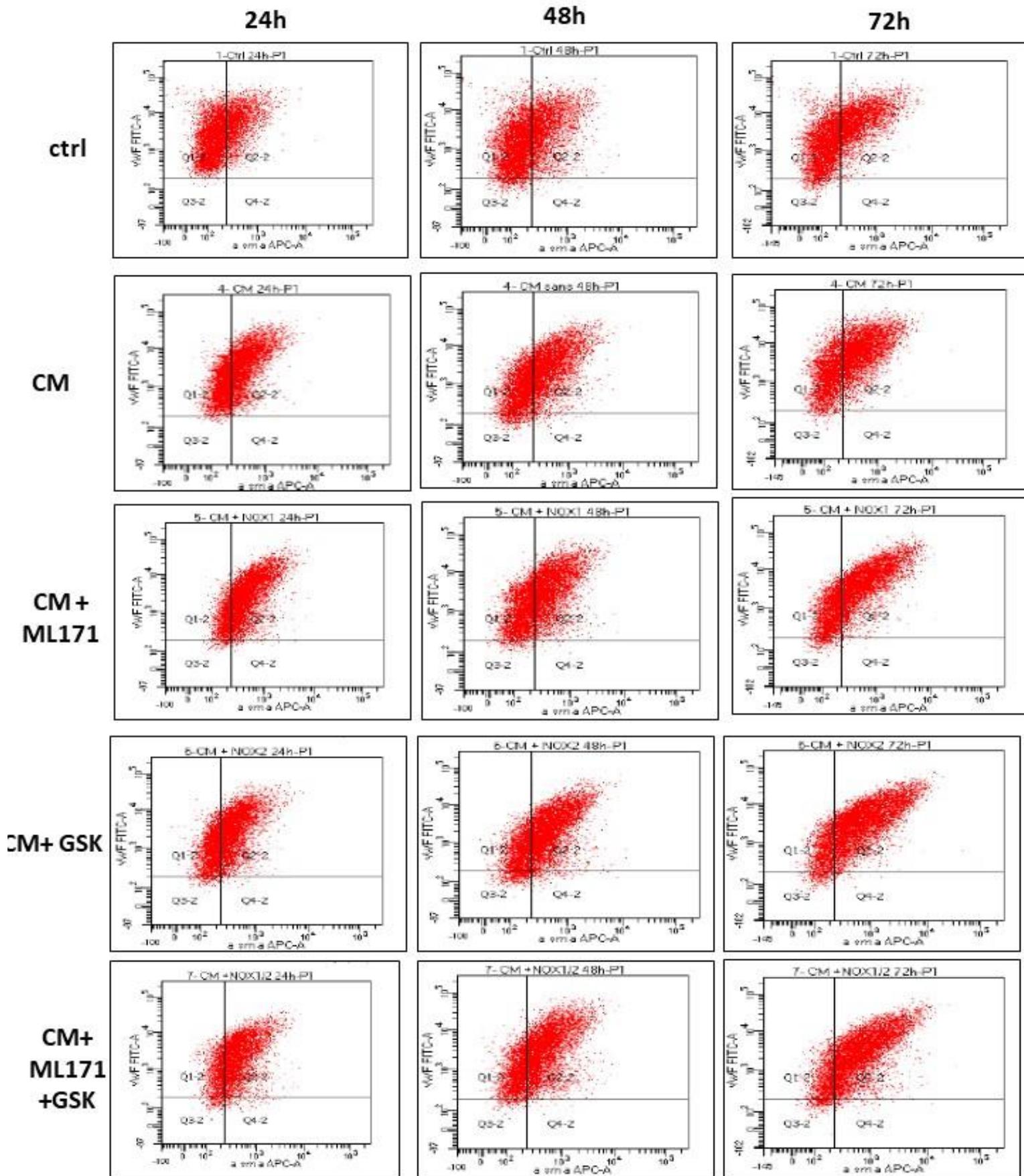


Figure 6



555 **Figure 6**

556 Long term dual inhibition of NOX1 and NOX2 partially reversed EndMT. Flow cytometry
557 analysis of the percentage of cells co-labeled with α -SMA and vWF. Graphical representation
558 shows the percentage of α -SMA⁺/vWF⁺, α -SMA⁺/vWF⁻, α -SMA⁻/vWF⁻. Cells were co-treated
559 with CM and ML171 (3 μ M) and GSK-2795039 (1 μ M) for 24, 48 and 72h. Results expressed
560 as percentage on a population of 10,000 cells. Graph bars show the mean \pm SEM, *p<0.05
561 (N=3).

562

563

564

565

566

567

568

569

570

571

572

Discussion Générale

1. Conception d'un modèle *in vitro* de l'EndMT

L'EndMT est un processus physiopathologique très complexe qui dépend d'un grand nombre de facteurs. Construire un modèle *in vitro* fiable d'EndMT demeure un défi en raison de la diversité importante des (i) modèles cellulaires, (ii) des agents inducteurs possibles, (iii) de la cinétique d'évaluation. Dans notre modèle *in vitro* d'étude de l'EndMT, nous avons choisi d'utiliser des cellules HUVECs comme modèle de cellules endothéliales car elles constituent la lignée cellulaire la plus couramment utilisée pour étudier la physiologie des cellules endothéliales (205,227,230–233). Le très large corpus d'études utilisant cette lignée cellulaire nous permettait d'avoir à disposition une importante base de données pour pouvoir interpréter nos résultats. Les HUVECs sont également décrites comme des cellules supportant très bien la culture cellulaire. L'ensemble de la littérature sur l'EndMT recommande d'utiliser ces cellules entre le 1^{er} et le 5^{ème} passage afin de maximiser la conservation du phénotype endothélial. Toutefois, à notre connaissance, il n'existe pas de données sur l'ensemble des modèles d'études de l'EndMT ayant été utilisés à ce jour et faisant état de leurs avantages et inconvénients, respectifs. Bien que les HUVECs représentent le modèle de CE actuellement le plus utilisé dans l'étude *in vitro* de l'EndMT, il conserve un certain nombre de limites. La principale d'entre elles concerne leur phénotype endothélial, caractéristique des NECs et donc, différent de celui exprimé par les TECs. Ainsi, il a été décrit en 2020 par Nagl et coll. (56) les caractéristiques spécifiques des TECs parmi lesquels on retrouve une morphologie altérée (surface cellulaire irrégulière, fenestration excessive, perte des jonctions intercellulaires) ainsi qu'une activité de transcription plus importante adaptée à un métabolisme énergétique encore plus glycolytique et nécessaire à leur prolifération exacerbée. Les TECs sont également décrites comme présentant une plus grande instabilité génétique que les NECs, qui se traduit à la fois par des altérations de leur caryotype, mais également par une régulation de leur expression génique et épigénétique différentes des NECs (56). Cela se traduit, entre autre, par une plus grande sensibilité aux agents de sécrétion présents dans le MET, les TECs ayant été décrites comme plus sensibles à l'EndMT induite par le TGF- β 2 par rapport aux NECs (225). L'ensemble des altérations décrites ci-dessus sont vraisemblablement des adaptations mises en place afin de répondre aux *stimuli* présents dans le MET, principalement l'hypoxie, l'acidification du milieu extracellulaire ou encore la production d'espèces radicalaires de l'oxygène (56). Plusieurs publications mettent en avant les altérations géniques provoquées par le stress oxydant (favorisé par une baisse du pH extracellulaire) et par l'hypoxie sur les CE (240,241). En cela, les TECs constitueraient donc un meilleur choix pour un modèle cellulaire cherchant à reproduire le comportement des CE dans un contexte tumoral. Néanmoins, la caractérisation des TECs demande encore à être affinée : la difficulté à les isoler a rendu difficile jusqu'à récemment des études sur leur phénotype. Grâce à l'émergence de techniques de screening de type « *singlecell* », le portrait phénotypique des TECs a pu être grandement affiné (54,55). Il est notamment apparu qu'il existait une importante hétérogénéité parmi les TECs, aussi bien inter-tumorale qu'intra tumorale. Le profil de transcription des TECs varie ainsi grandement en fonction de leur origine et du stade d'évolution de la tumeur. Des études complémentaires sont nécessaires pour faire des TECs un modèle *in vitro* stable et reproductif adapté à l'étude de l'EndMT (54,60).

Les études d'optimisation des modèles expérimentaux ont montré une meilleure induction de l'EndMT avec le traitement combinant TGF- β 2 et IL-1 par rapport au TGF- β 2 seul.

Un très large corpus d'études a montré que les cytokines de la superfamille du TGF- β étaient les inducteurs prédominants de l'EndMT (208,223–226). Plus récemment, l'isoforme 2 du TGF- β est apparu comme l'agent inducteur le plus efficace. Sabbineni et coll. ont ainsi montré dans leur étude de 2018 que le TGF- β 2 induisait plus efficacement l'expression des facteurs de transcription mésenchymateux Snail et FoxC2 dans un modèle endothélial HMEC. De plus, après avoir stimulé les HMECs avec du TGF- β 1 ou du TGF- β 3, les auteurs observent un rétrocontrôle autocrine conduisant à la synthèse de TGF- β 2, le véritable initiateur de l'EndMT (228).

De façon intéressante, nous avons, dans un premier temps, étudié l'induction de l'EndMT sur des cellules HMEC-1 et nous avons constaté que les cellules traitées avec du TGF- β 2 à 10 ng/mL pendant 72h présentaient une différenciation (induction de l' α -SMA, diminution du signal VE-cadhérine et diminution de la prolifération et de la formation de capillaires sur Matrigel®) significativement plus importante que celle observée avec des cellules HUVECs. L'importance de l'origine anatomique des CE dans leur réponse au TGF- β 2 et/ou à la surexpression de Snail a été démontrée par Pinto et Ferreira dans leurs études de 2018 (231) et 2019 (235), respectivement. Ils montrent ainsi que le traitement des HUVECs avec du TGF- β 2 comme seul inducteur n'a qu'un effet très modeste sur l'induction des marqueurs mésenchymateux et ne conduit pas à une diminution de l'expression des marqueurs endothéliaux, en cohérence avec nos résultats.

L'interleukine-1 a déjà fait l'objet d'études révélant sa capacité à induire l'EndMT. Ainsi, Chaudhuri et coll montraient déjà en 2007 la capacité de l'IL-1 à induire l'EndMT sur des HDMEC. Dans leur étude, une exposition des HMECs à l'IL-1 conduit à une augmentation de l'expression de l' α -SMA associée à une diminution du vWF. Ces changements étaient réversible après une exposition de 72h mais irréversibles après une exposition de 10 jours (242). Dans leur étude de 2011, Rieder et coll. ont souligné l'importance de l'inflammation dans l'induction de l'EndMT dans sur des cellules HIMEC (*Human Intestinal Microvascular Endothelial Cells*) *in vitro*. Ainsi, ils notent que le traitement à l'IL-1, une des principales cytokines pro-inflammatoires, sur des HIMECs est suffisant pour induire l'EndMT. Ils attribuent cette efficacité à la forte concentration basale en TGF- β dans les cellules intestinales. En effet, leur modèle de l'inflammation correspond à un cocktail TGF- β 1 + IL-1 + TNF- α , et qui permet d'observer une disparition complète des caractéristiques endothéliales (CD31 ; VE-cadhérine) au profit des mésenchymateuses (Vimentine ; N-cadhérine ; α -SMA). Comparé aux traitements avec les autres cytokines séparément, l'IL-1 est celle qui induit la transition la plus efficace (243).

Il reste cependant établi que la combinaison des traitements induit de manière significative et plus efficace l'EndMT. L'intérêt du traitement combiné pourrait s'expliquer par le fait que l'IL-1 agit en synergie en présence de TGF- β 2 pour induire l'EndMT. Ces données ont été suggérées par Maleszewska et ses collaborateurs en 2013. Dans leur étude, les HUVECs traitées simultanément par TGF- β 2 et IL-1 présentent des changements morphologiques caractéristiques d'un phénotype mésenchymateux plus importants et une expression accrue de SM22- α par rapport aux cellules stimulées avec les cytokines utilisées séparément (227). De plus, dans cette même étude, les auteurs montrent que l'EndMT induite par l'IL-1 est dépendante d'une synthèse de TGF- β 2 qui se fait par rétrocontrôle. Ce rétrocontrôle ne conduit cependant pas à la synthèse de TGF- β 1 ou 3 ce qui souligne l'activité complémentaires de ces deux cytokines dans l'induction de l'EndMTI (227).

De façon intéressante, nos résultats de cytométrie en flux montrent que la combinaison TGF- β 2/IL-1 induit une augmentation de la sous-population doublement marquée (α -SMA⁺/vWF⁺), mais ne permet pas d'observer de

cellules au phénotype totalement mésenchymateux (α -SMA⁺/vWF⁻). Ces données mettent en exergue l'importance du temps de traitement choisi. Il apparaît ici que la transition induite par TGF- β 2/IL-1 serait maximale à 48h mais en partie réversible à 72h. D'autres modèles d'EndMT ont montré qu'une stimulation plus longue permettait d'induire une transition complète : Jiao et coll, ont ainsi induit une EndMT à partir d'HUVEC traitées avec du TGF- β 1 (10 ng/mL) après une exposition durant 5 passages. Dans les mêmes conditions après 48h, ils n'observaient que des variations mineures de l'expression des marqueurs protéiques (α -SMA/VE-cadhérine) (238). A ce titre notre modèle expérimental présente vraisemblablement une limite car il ne permet pas d'évaluer l'EndMT sur des temps longs. Nos tentatives d'étendre la cinétique de traitement à 7 jours ont conduit à une augmentation importante de la mort cellulaire. Toutefois cette limite reste à relativiser dans le contexte précis de cette étude. En effet, plusieurs publications font le lien entre le stress oxydant et l'EndMT et montrent que l'impact du stress oxydant intervient majoritairement sur des temps compris entre 24h et 72h (233,236,237). Ainsi, l'équipe de Montorfano montre une induction de l'EndMT de façon TGF- β dépendante après une exposition de 72h des HUVECs à un stress oxydant (H₂O₂) (236). Ceci confirme l'intérêt de notre modèle dont le but était d'étudier l'impact des ROS produites par les NOXs. Les résultats que nous obtenons en DCFDA confirment bien l'importance du point à 72h dans l'étude de l'impact des ROS dans l'EndMT, et l'identifie comme un évènement « précoce » de la transition.

La co-expression de marqueurs endothéliaux et mésenchymateux, comme celle engendrée par notre traitement n'est pas un fait nouvellement observé sur les cellules endothéliales. Ainsi, en 2006 Cevallos et coll montraient que les contraintes de cisaillement conduisait à l'expression de marqueurs typiques des cellules musculaires lisses (α -SMA et SM22- α) dans les cellules endothéliales sans toutefois réduire celles des marqueurs endothéliaux (VEGFR-2 ; vWF) (HUVECs) (21). Cet état de transition partiel est un témoin important de l'extrême plasticité des cellules endothéliales. Dans leur article de 2020, Xu et coll montrent que l'EndMT induite par la doxorubicine conduit à l'expression, par les cellules endothéliales, à la fois des marqueurs endothéliaux (CD31) et mésenchymateux (α -SMA) (244). Enfin, dans les revue de Shu et coll ainsi que de Welch-Reardon et coll insistent sur le fait que l'EndMT partielle est un processus d'importance dans la formation des métastases et sont des sujets de grand intérêt pour la recherche dans ces domaines (245).

De manière surprenante, la présence d'une sous-population doublement marquée α -SMA⁺/vWF⁺ a été mise en évidence dans l'échantillon de cellules non traitées, et ce dès 24h. Seuls les passages cellulaires pourraient expliquer la plasticité des cellules endothéliales, de nouveau mise en évidence ici. Bien que cela puisse paraître contre-intuitif, Lu et coll (246) montraient déjà en 2004 que certaines cellules isolées d'une culture primaire d'HUVECs (marquées CD34⁺) expriment déjà l'ARNm codant pour l' α -SMA simultanément avec l'expression des gènes endothéliaux classiques. De nombreuses études montrent la capacité des cellules endothéliales à se transdifférencier en cellules mésenchymateuses (20,21,247,248). Les études de Wang et coll, Shoajei et coll et Cevallos et coll montrent toutes les trois une induction de l'EndMT en réponse à un stress mécanique. Le dispositif de culture des cellules apparaît donc comme jouant un rôle important dans la conservation de leur phénotype endothélial

Une autre hypothèse pourrait reposer sur le choix de la culture en 2D privilégié pour notre étude. La culture de cellules en 2D ne permet pas de reproduire fidèlement l'organisation cellulaire physiologique suggérant que le phénotype endothélial ne peut pas y être pleinement reproduit/conservé. Aussi, plusieurs auteurs se sont donc intéressés à des protocoles de culture en 3D pour tenter d'optimiser les modèles d'études (249). Concevoir un

modèle de culture original comme l'ont fait Yeon et collaborateurs, semble être le meilleur moyen de générer des résultats de meilleure qualité. Dans leur étude de 2018, ils présentent un modèle microfluidique d'EndMT en utilisant des exosomes dérivées de mélanome comme agents déclencheurs (209). Leur modèle leur permet d'exercer un contrôle extrêmement fin sur la concentration d'exosomes envoyée vers les CE, ainsi que les différences de pression entre les différentes chambres de leur incubateur. Ceci leur permet de reproduire des variations de flux extrêmement proches des contraintes physiologiques, et ainsi de mettre les CE dans des conditions optimales de maintien de leur phénotype.

Plusieurs études ont également fait le choix d'utiliser des modèles 3D pour étudier l'EndMT. Ainsi, Cecoltan et coll (250) montrent l'induction de l'EndMT par un traitement au glucose sur des cellules de valves cardiaques (*Valvular Endothelial cells* ; VEC). Leur modèle 3D implique un gel formé à partir d'une MEC porcine décellularisée et de VECs humaines. Ceci leur a permis d'étudier avec plus de facilité l'évolution des jonctions intercellulaires. Également, Bramsen et coll (249) utilisent, afin de simuler le tissu des valves cardiaque physiologiques et pathologiques un hydrogel composé de collagène 1 supplémenté ou avec des glycosaminoglycanes (GAGs). Les hydrogels contenant des GAGs conduisaient à la survenue de l'EndMT ce qui souligne l'importance cruciale de la matrice de culture des CE pour le maintien de leur phénotype.

Dans l'ensemble nos résultats montrent bien l'intérêt d'une approche multi-facteurs afin d'induire l'EndMT. La plasticité des cellules endothéliales est ici soulignée car elles démontrent la capacité à faire évoluer leur phénotype aussi bien spontanément qu'en réponse à un traitement et ce de façon réversible. La mise en place d'un modèle 3D apparaît comme une perspective engageante pour de futures investigations. L'utilisation de microsphères pourrait ainsi permettre de cultiver les CE sur des temps plus longs, mais également de préserver leur phénotype endothélial en l'absence de traitement. Notre laboratoire disposant de technologies de microfluidique, l'élaboration d'un modèle exploitant cette technique pourrait être une perspective intéressante afin de mieux maîtriser les interactions CE et CM.

2. Etude du rôle des ROS produits par les NOX dans l'EndMT

Comme développé dans l'introduction, le mélanome est un cancer particulièrement agressif et qui présente un fort risque de former des métastases aux stades les plus avancés (191). Son développement bénéficie énormément des interactions avec le MET qui est à la fois le support de son invasivité mais aussi de la résistance à certaines thérapies comme les thérapies ciblées anti-BRAF/anti-MAPK (198,251). Les cellules présentes dans le MET, notamment les CAFs et les CE sont deux types cellulaires particulièrement importants dans la promotion de l'invasion tumorale (60,252,253)

Arozarena et coll insistent particulièrement, dans leur revue de 2019, sur l'importance de la plasticité des cellules tumorales et rapportent que les agents à l'origine de cette plasticité sont produits par les cellules du MET (254). Ainsi, des cytokines comme le TGF- β , et des facteurs de transcription comme ZEB1 sont pointés comme d'importants contributeurs à l'acquisition d'un phénotype invasif. Ils jouent notamment un rôle dans la différenciation cellulaire et promeuvent l'EMT, processus primordial dans l'initiation de l'invasion métastatique. Les TECs sont également soumis à l'environnement de sécrétion particulièrement riche qu'est le MET. Les cytokines et facteurs de transcription qui initient l'EMT sur les cellules tumorales, vont également pouvoir induire l'EndMT sur les TECs, les deux mécanismes étant, de plus, extrêmement proches sur le plan moléculaire. L'EndMT

est par ailleurs reconnue comme l'une des principale source de CAFs (208). Ces CAFs présentent une activité de sécrétion importante qui contribue à accélérer la croissance tumorale, notamment via la synthèse de protéases qui vont participer au remodelage de la MEC (22,255). Ils sécrètent également du VEGF qui participe à stimuler l'angiogenèse tumorale ce qui conduit à une augmentation du pool de CE qui pourront potentiellement subir l'EndMT (22,256). Ceci participe grandement à l'emballement du développement tumoral et à l'acquisition d'un phénotype invasif. Il est donc particulièrement intéressant de freiner un tel phénomène, le pronostic clinique du mélanome s'assombrissant considérablement une fois passé le stade métastatique. Une maîtrise du MET apparait d'autant plus crucial dans le contrôle du mélanome que les thérapies aujourd'hui utilisées, et ayant apporté un vrai regain d'efficacité dans la stratégie thérapeutique des mélanomes avancés, ciblent les cellules du MET (257). L'EndMT joue un rôle important dans la résistance aux traitements et a déjà été mise en cause dans plusieurs cancers comme source d'acquisition de résistance à la radiothérapie ou à la chimiothérapie (258). Il a également été montré que l'EndMT est à l'origine d'un recrutement anormal des péricytes qui vont venir former une couverture importante au-dessus de l'endothélium (259,260). Cette couverture a été montrée comme étant la cause d'une résistance aux thérapies anti-VEGF qui peinent à atteindre les CE (261). Il est cependant plus probable que l'acquisition de résistance aux chimiothérapies due à l'EndMT soit indirecte. En effet, les CAFs générés par l'EndMT sont des acteurs majeurs de la progression tumorale et métastatiques, et jouent également un rôle important dans l'acquisition de résistances aux thérapies anticancéreuses (22,262). Comprendre les mécanismes moléculaires régissant l'initiation de l'EndMT apparait donc tout particulièrement intéressant dans l'optique de construire de nouvelles stratégies thérapeutiques.

La surproduction de ROS et le stress oxydant sont aujourd'hui des caractéristiques reconnues des cancers (149). Il existe par ailleurs plusieurs études faisant le liens entre les ROS produites par les NOXs et la progression tumorale (180,263,264). D'autres études font également le liens entre l'activité des NOXs et l'EndMT (178,224,265). Cependant, il existe encore très peu d'informations sur le lien putatif entre les NOXs et l'EndMT dans le contexte du cancer.

Les résultats que nous présentons ici contribuent à montrer que le sécrétome contenu dans CM issu de cellules de mélanome SK-MEL 28 induit la génération de ROS par les HUVECs, et que les NOXs jouent un rôle déterminant dans cette génération. Le rôle des NOX dans l'EndMT a déjà été étudié par Montorfano et coll en 2014. Dans cette étude, le lien entre stress oxydant et EndMT a été mis en évidence sur des HUVECs traitées avec du peroxyde d'hydrogène pendant 72h (augmentation de l'expression de l' α -SMA et diminution de celle de la VE-Cadhérine). Notre étude intègre cette approche, spécifiquement au cancer (et plus spécifiquement au mélanome) en utilisant le CM comme agent inducteur de l'EndMT. D'autres études sont en accord avec nos résultats, en montrant qu'un blocage du stress oxydant permet de réverser l'EndMT. Ainsi, Guo et coll (233) parviennent à inhiber une EndMT induite par le TGF- β en traitant avec de la kallistatine. L'inhibition du signal TGF- β conduit à l'absence d'activation des NOXs et *in fine* inhibe l'EndMT. Ils n'identifient cependant pas d'isoforme de NOX impliquée en particulier. Plus récemment Zhen et coll (266) montrent que l'utilisation de N-acétylcystéine, connue pour ses propriétés anti-oxydantes, permet, en bloquant la génération de ROS et la signalisation p38, d'inhiber l'EndMT induite par le 27-Hydroxycholestérol. Enfin, Giordo et coll (143) ont montré très récemment, dans un modèle de diabète, que des cellules endothéliales de rétine (HRECs) traitées par une forte concentration en glucose s'engageaient dans un processus d'EndMT pouvant être réversée par le pan-inhibiteur de NOXs DPI.

Les NOXs constituent la source principale de ROS dans les CE. Parmi les 7 isoformes connus les isoformes NOX1 ; NOX2 ; NOX4 et NOX5 sont retrouvés dans les CE (114). La dérégulation de leur activité est documentée comme jouant un rôle important dans le développement de pathologies vasculaires. Dans la revue de 2014, Drummond et coll (114) insistent sur l'importance des NOX1 et 2 dans le développement de pathologies vasculaires comme l'hypertension, la fibrose cardiaque, le diabète, mais également l'inflammation (242). Ils attribuent à NOX4 un rôle plutôt protecteur vis-à-vis du phénotype vasculaire du fait que cette enzyme produit du peroxyde d'hydrogène et non de l'anion superoxyde ce qui diminue sa réactivité délétère avec le NO*. Le H₂O₂ produit par le NOX4 joue également un rôle essentiel de second messenger qui va améliorer la synthèse d'enzymes vasoprotectrices comme l'eNOX (*endothelial Nitric Oxide Synthase*) (267). Toutefois, cette activité protectrice de NOX4 vis-à-vis de la structure vasculaire peut également avoir un revers délétère. L'activité de la NOX4 a ainsi été mise en évidence comme jouant un rôle dans le développement de plusieurs cancers, notamment *via* une promotion de l'angiogenèse tumorale (137). Dans leur revue de 2019 traitant de l'EndMT, Velazquez et coll développent l'importance des NOXs dans son initiation en tant que principale source de ROS dans les CE (224). Ils insistent particulièrement sur la NOX2 dont l'implication dans l'EndMT a déjà été démontrée sur un modèle de souris transgéniques surexprimant la NOX2. Ces souris subissaient une EndMT plus importante, conduisant à une augmentation de la fibrose cardiaque (268). Le rôle de NOX2 a, par ailleurs, été décrit comme essentiel dans l'induction de l'EndMT embryonnaire lors de la formation des valves cardiaques (265). Le rôle de NOX4 dans l'EndMT n'a pas encore été examiné directement. Cependant, le fait que la NOX4 soit positivement régulée par le TGF- β , lui-même un puissant inducteur de l'EndMT, suggère qu'elle puisse avoir un rôle important dans l'EndMT (224). L'implication de NOX4 dans l'EMT est, en revanche, établie (269-271). La proximité moléculaire entre l'EMT et l'EndMT rend d'autant plus probable son implication dans l'EndMT. Enfin, concernant NOX1, il a été récemment rapporté que son inhibition *via* un inhibiteur pharmacologique spécifique (GKT771) conduisait à une réduction du volume tumoral dans un modèle *vivo* murin de cancer colorectal et de mélanome (156). Cette inhibition se fait par un renforcement de l'activité des inhibiteurs de checkpoint sur lesquels sont basées les immunothérapies actuellement employées contre le mélanome (257).

Les résultats que nous avons obtenus dans cette étude contribuent à attester l'importance du rôle des ROS générées par les NOXs dans l'initiation de l'EndMT en montrant que l'inhibition de NOX1&2 conduit à une réduction significative des ROS générées associée à une inhibition de l'EndMT. Bien que nos conditions ne permettent pas un retour à un état 100% endothélial, elles permettent de grandement restaurer les caractéristiques endothéliales des HUVECs, notamment leur capacité à former des capillaires sur Matrigel®. Il nous faut pleinement saisir l'étendue de la plasticité des CE qui, si elle est une caractéristique essentielle au bon maintien de leurs fonctions physiologiques, pour lesquelles elles doivent se montrer fortement adaptables, en font de redoutables atouts dans le maintien du processus cancéreux.

La très récente publication de Yamashiro et coll (272) montre que l'EndMT partielle participe à la réorganisation luminale après une ligature carotidienne. L'augmentation de l'expression de marqueurs mésenchymateux dans les CE était dépendante de l'expression de HIF-1 α , un marqueur essentiel de l'hypoxie. Ceci montre que l'hypoxie joue un rôle important de promoteur de l'EndMT. L'induction de l'EndMT par l'hypoxie a déjà été décrite (273,274) dans d'autres contextes que le cancer, cependant l'hypoxie fait partie des caractéristiques intrinsèques de l'environnement tumoral et sous-tend un grand nombre de mécanismes cruciaux pour le développement tumoral. Elle est la conséquence directe de la perte de l'organisation des vaisseaux sanguins tumoraux et de leur perfusion

de mauvaise qualité. Cette hypoxie conduit les cellules endothéliales, mais aussi les cellules cancéreuses alentours à recourir préférentiellement à la glycolyse comme moyen de production énergétique. Ceci va conduire à une accumulation de lactate et donc à une diminution du pH propice à l'accumulation de ROS qui, comme nous l'avons développé sont des agents majeurs de l'EndMT, et de la plasticité endothéliale en général (56).

L'ensemble de ces données montrent le rôle important joué par les ROS dans l'initiation et le maintien de l'EndMT. Les NOXs constituant la source principale de ROS dans les CE, il apparaît extrêmement intéressant de questionner la place des NOXs dans l'initiation/le maintien de l'EndMT, en particulier dans le contexte tumoral qui favorise la production de ROS. Nos résultats font un pas de plus dans ce sens, en montrant que l'activité de NOX1&2 est déterminante dans la perte des caractéristiques endothéliales des HUVECs caractéristique de l'EndMT. A terme, cela pourrait conduire au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques qui passeraient par l'inhibition des NOXs afin de réduire l'EndMT et, de fait, le développement tumoral et métastatique.

3. Perspectives et conclusions

La littérature des dernières années, ainsi que nos résultats, posent la question du contrôle de la plasticité des CE comme un des défis majeurs dans l'élaboration de stratégies thérapeutiques innovantes. L'impact du stress oxydant dans la promotion de la croissance tumorale nous semble, à ce titre, être un axe pertinent de réflexion. Comme développé précédemment, le stress oxydant, au niveau tumoral, trouve une grande partie de son origine dans l'acidification du milieu extracellulaire, lui-même causé par un détournement du métabolisme énergétique des CE et des cellules cancéreuses en faveur de la glycolyse productrice de lactate. Cette altération métabolique est, elle-même, grandement favorisée par l'hypoxie décrite au sein du MET et largement entretenue par la faible perfusion des vaisseaux sanguins tumoraux (67). La conjonction d'un environnement fortement concentré en ROS et hypoxique, comme c'est le cas dans le MET, est particulièrement délétère pour les CE. D'une part, l'hypoxie va conduire à une suractivation de l'angiogenèse par l'intermédiaire de HIF-1 α . Cette angiogenèse anormale va elle-même contribuer à renforcer l'hypoxie et la génération de ROS. D'autre part, et comme nous avons contribué à le démontrer avec les résultats de cette thèse, les ROS vont provoquer une évolution du phénotype des CE vers un phénotype mésenchymateux activé *via* l'EndMT. Aujourd'hui reconnue comme étant une source majeure de CAFs, l'EndMT contribue à promouvoir le développement cancéreux et métastatique (258). En effet, les enzymes de remodelage moléculaire (MMPs ; TGMs, LOXs) sécrétés par les CAFs vont ainsi favoriser l'invasion des cellules tumorales hors du site initial (22,275). De même, leur sécrétion accrue de cytokines (TGF- β , IL-1, entre autres) (22) sont d'importants promoteurs de l'EndMT, comme nous avons pu le démontrer dans ce travail. Enfin, leur synthèse augmentée de VEGF va contribuer à promouvoir une angiogenèse favorable à la croissance tumorale, et participe à augmenter le pool de CE qui pourront potentiellement s'engager dans l'EndMT (22,276). Ces données confirment donc l'existence d'un mécanisme de rétrocontrôle positif qui complexifie la prise en charge des tumeurs et qui justifie l'intérêt de cibler l'EndMT et ses principaux agents inducteurs.

Le développement de stratégies thérapeutiques visant à cibler les ROS, et a fortiori les ROS produites par les NOXs, nous semble être une piste pertinente pour tenter de compléter la prise en charge des cancers, et en particulier du mélanome.

La famille des NOXs constitue la principale source de ROS au sein des CE (178). Comme nous l'avons développé précédemment, une sur-activation de ces enzymes, et notamment des isoformes 1 et 2, conduit à un stress

oxydant au sein des CE qui a été démontré comme étant à l'origine de plusieurs pathologies vasculaires (114). Une stratégie d'inhibition de ces enzymes pourrait se révéler être intéressante pour tenter de limiter ces pathologies. Cependant, le développement d'inhibiteurs spécifiques de ces enzymes est un défi qui n'est pas complètement résolu. Il existe, en effet, des pan-inhibiteurs des NOXs comme le diphenyliodonium (DPI), particulièrement utilisé dans les études *in vitro* (169). Cependant, son activité d'inhibition des flavoprotéines en fait également un inhibiteur potentiel de la CYP450 reductase (277), de la NO synthase (278) et de la chaîne mitochondriale (279) ce qui exclut son utilisation en thérapeutique. D'autres inhibiteurs ciblent spécifiquement certaines isoformes des NOXs. C'est le cas de molécules comme le GKT136901 et le GKT137831 qui inhibent les NOX1&4. Les données actuelles relatives à ces molécules confirment que leurs propriétés inhibitrices sont mal comprises. En effet, Augsburg et coll (169) discutent leur activité d'inhibiteur de NOX1&4. Dans leur étude, ces deux composés ne montrent pas d'activité inhibitrice des NOXs (absence d'inhibition de la génération d'O₂^{*}). Ils montrent en revanche une activité antioxydante, ce qui pourrait expliquer les résultats obtenus par le GKT137831 dans le traitement des néphropathies diabétiques pour lesquelles il est actuellement en essais clinique de phase deux (280).

Parmi les autres molécules, il existe des inhibiteurs spécifiques qui pourraient représenter des candidats intéressants pour une future utilisation thérapeutique. Il s'agit du GSK2795039, inhibiteur de NOX2 que nous avons utilisé dans cette étude. Il montre une sélectivité importante vis-à-vis de cette isoforme ainsi qu'une efficacité *in vivo* après une administration systémique dans un modèle murin (281). Malheureusement, sa biodisponibilité orale est faible et sa pharmacocinétique, évaluée chez le rongeur demeure assez pauvre avec notamment, une clairance élevée et un demi-vie de 0,2 h chez la souris et 2 h chez le rat (175). Ces données ont été complétées par Padilha et coll (175) qui détaillent le métabolisme hépatique de cette isoforme et décrivent les différents métabolites formés au cours de sa biodégradation. Ils pointent du doigt l'oxydation NADPH-dépendante de sa chaîne alkyle qui pourrait être en partie responsable de sa clairance élevée, et concluent qu'à l'issue d'une optimisation, cette molécule pourrait constituer un excellent candidat en tant qu'inhibiteur de NOX2 utilisable en thérapeutique.

Un autre inhibiteur spécifique est le ML171 que nous avons également utilisé dans notre protocole, et qui présente une très bonne spécificité pour la NOX1 (IC₅₀ 250 nM) (282) et a déjà montré sa capacité à inhiber le stress oxydant dépendant de NOX1. Ainsi, Liang et coll ont confirmé sa capacité à inhiber la croissance de tumeurs hépatiques induites par une injection de carcinogène (non spécifié) sur un modèle murin (172). Cette molécule fait actuellement l'objet d'études pré-cliniques afin de déterminer sa toxicité exacte : sa dose létale (500 mg/kg) et sa dose maximale sans effets secondaires (250 mg/kg) suite à son administration intra-péritonéale n'ont été identifiées que récemment sur un modèle de souris ICR (176). L'ensemble de ces données sont encourageantes et suggèrent que le ML171 puisse être un bon candidat pour inhiber NOX1 mais d'autres études sont encore nécessaires pour pouvoir transposer son usage chez l'Homme.

Au-delà de la difficulté d'identifier des inhibiteurs fiables des NOXs, un autre enjeu demeure : celui de l'adressage d'une drogue capable de cibler spécifiquement les CE engagées dans l'EndMT. En effet, même si l'inhibition d'une ou plusieurs isoformes des NOXs endothéliales pourrait constituer une stratégie intéressante pour lutter contre l'EndMT tumorale, une telle inhibition aurait selon toute vraisemblance des effets délétères sur la physiologie des CE « saines » dans lesquelles les NOXs jouent un rôle crucial (114). Ainsi, cibler spécifiquement les TECs tout en épargnant les NECs constitue un défi de taille. Les TECs présentant une activité angiogénique plus importante

que les NECs, des thérapies anti-VEGF ont montré leur efficacité à les cibler spécifiquement. Cependant, cette stratégie a rapidement dû faire face à l'émergence de résistances (283,284). Par ailleurs, bien que les TECs et les NECs présentent des différences phénotypiques connues, ces deux types cellulaires expriment des marqueurs communs et il est donc compliqué de discriminer les effets d'agents pharmacologiques sur les TECs et les NECs. De plus, les études récentes soulignent la grande hétérogénéité présente au sein des TECs inter et intratumorale (54,56). Il semble ainsi plus pertinent de se focaliser sur des stratégies cherchant à cibler le MET plus globalement, plutôt que les TECs spécifiquement.

C'est dans ce contexte que l'utilisation de méthode de vectorisation originale apparaît comme une piste prometteuse. Parmi les pistes proposées, une encapsulation de drogues anti-EndMT ciblant les NOXs pourrait permettre de garantir une sélectivité satisfaisante vis-à-vis des CE tumorales. Si l'identification de marqueurs de surface spécifiques aux TECs demeure difficile, l'environnement dans lequel ces cellules évoluent au sein de la tumeur présente des caractéristiques intéressantes pour potentialiser l'adressage. Le MET présente un pH significativement plus bas que celui des tissus sains (285). Une stratégie d'encapsulation sensible aux variations de pH pourrait ainsi s'avérer pertinente, comme cela a été récemment démontré par notre équipe à partir d'un modèle *in vitro* de cellules de mélanome. Cette stratégie a consisté en la production de nanocapsules lipidiques modifiées par la présence de groupements vinyl imidazole sur ces chaînes carbonées, permet une protonation en présence d'un pH suffisamment bas (286). Cette approche pourrait donc être prometteuse dans le traitement de cancer comme le mélanome métastatique notamment en vue d'améliorer le ciblage des NOXs avec les inhibiteurs précédemment décrits.

De même, notre projet a montré l'importance de la production de ROS à l'origine de l'EndMT. Ces espèces réactives de l'oxygène sont également produites par les cellules tumorales (149) Une stratégie utilisant des nanocapsules sensibles à la quantité de ROS produites pourraient être envisagées. Cette stratégie a fait l'objet d'une étude (287) en concevant des nanocapsules recouvertes de polymères contenant des groupes d'esters boroniques. Ce recouvrement permet aux nanocapsules de se cliver en présence de ROS et donc de délivrer la drogue qu'elles contiennent. A l'aide de ces vecteurs, les auteurs ont montré l'efficacité du paclitaxel en comparaison avec le paclitaxel seul ou encapsulé dans des nanocapsules non sensibles aux ROS dans un modèle murin xenogreffé avec des cellules HeLa. Également, Wan et coll (288) démontrent que de la doxorubicine associée à un siRNA anti PD-L1 vectorisés dans des nanocapsules recouvertes d'un peptide sensible aux ROS (composition non spécifiée) présente une meilleure efficacité, ainsi qu'une diminution de la toxicité *in vivo* sur un modèle murin xenogreffé avec des cellules 4T1. Ces données soulignent l'importance de la mise au point de nouvelles stratégies d'encapsulation et de vectorisation en vue d'améliorer la distribution et l'efficacité de nouvelles, et d'anciennes, drogues anticancéreuses.

En conclusion, les résultats obtenus durant cette thèse, ainsi que les dernières données de la littérature, décrivent l'EndMT comme un processus de soutien crucial dans le développement tumoral et pointent l'importance des ROS dans l'initiation de ce processus. Cibler des enzymes génératrices de stress oxydant comme les NOXs apparaît ainsi comme une piste prometteuse. Associées aux thérapies déjà existantes, ces inhibiteurs pourraient constituer une nouvelle stratégie thérapeutique adjuvante efficace dans le traitement des mélanomes métastatiques ou dans la prévention d'éventuelles récidives. L'efficacité d'une telle stratégie serait d'autant plus assurée grâce à l'utilisation de vecteurs innovants développés au laboratoire

Bibliographie

1. Wolinsky H. A proposal linking clearance of circulating lipoproteins to tissue metabolic activity as a basis for understanding atherogenesis. *Circ Res.* 1980;47(3):301–11.
2. Sumpio BE, Riley JT, Dardik A. Cells in focus : endothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002;34:1508–12.
3. Krüger-Genge A, Blocki A, Franke RP, Jung F. Vascular endothelial cell biology: An update. *Int J Mol Sci.* 2019;20(18).
4. Michel CC, Curry FE. Microvascular permeability. *Physiol Rev.* 1999;79(3):703–61.
5. Crone C. No Permeability of single capillaries compared with results from whole-organ studies. *Acta Physiol Scand.* 1979;463:75–80.
6. Palmer RM., Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987;327(11):524–6.
7. Ahmad A, Dempsey SK, Daneva Z, Azam M, Li N, Li PL, et al. Role of nitric oxide in the cardiovascular and renal systems. *Int J Mol Sci.* 2018;19(9).
8. Moncada S, Vane JR, Higgs EA. Human arterial and venous tissues generate prostacyclin, a potent inhibitor of platelet aggregation. *Lancet.* 1977;1:18–21.
9. Chien S. Effects of disturbed flow on endothelial cells. *Ann Biomed Eng.* 2008;36(4):554–62.
10. Garland CJ, Dora KA. EDH: endothelium-dependent hyperpolarization and microvascular signalling. *Acta Physiol.* 2017;219(1):152–61.
11. Feletou M, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *Br J Pharmacol.* 1988;93(3):515–24.
12. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature.* 1988;332(6163):411–5.
13. Kedzierski RM, Yanagisawa M. Endothelin system: The double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001;41(3):851–76.
14. Vanhoutte PM, Tang EHC. Endothelium-dependent contractions: When a good guy turns bad! *J Physiol.* 2008;586(22):5295–304.
15. Tesouro M, Cardillo C. Obesity, blood vessels and metabolic syndrome. *Acta Physiol.* 2011;203(1):279–86.
16. Resnick N, Cimbrone MA. Hemodynamic forces are complex regulators of endothelial gene expression. *FASEB J.* 1995;9(10):874–82.
17. Reinhart WH. Shear-dependence of endothelial functions. *Experientia.* 1994;50(2):87–93.
18. Tzima E, Irani-Tehrani M, Kiosses WB, Dejana E, Schultz DA, Engelhardt B, et al. A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature.* 2005;437(7057):426–31.
19. Jin ZG, Ueba H, Tanimoto T, Lungu AO, Frame MD, Berk BC. Ligand-independent activation of vascular endothelial growth factor receptor 2 by fluid shear stress regulates activation of endothelial nitric oxide synthase. *Circ Res.* 2003;93(4):354–63.
20. Wang H, Yan S, Chai H, Riha GM, Li M, Yao Q, et al. Shear stress induces endothelial transdifferentiation from mouse smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;346(3):860–5.

21. Cevallos M, Riha GM, Wang X, Yang H, Yan S, Li M, et al. Cyclic strain induces expression of specific smooth muscle cell markers in human endothelial cells. *Differentiation*. 2006 Dec;74(9-10):552-61.
22. Santi A, Kugeratski FG, Zanivan S. Cancer Associated Fibroblasts: The Architects of Stroma Remodeling. *Proteomics*. 2018;18(5-6):1-15.
23. Lugano R, Ramachandran M, Dimberg A. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cell Mol Life Sci*. 2020;77(9):1745-70.
24. Folkman J. Tumor angiogenesis'. *Adv cancer Res*. 1971;19(1):331-58.
25. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011.
26. Bussard KM, Mutkus L, Stumpf K, Gomez-Manzano C, Marini FC. Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment. *Breast Cancer Res*. 2016;18(1):1-11.
27. Arbeth B. Tumor microenvironment. *Medicina (B Aires)*. 2020;56(15):1-21.
28. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med*. 2013;19(11):1423-37.
29. Castells M, Thibault B, Delord JP, Couderc B. Implication of tumor microenvironment in chemoresistance: Tumor-associated stromal cells protect tumor cells from cell death. *Int J Mol Sci*. 2012;13(8):9545-75.
30. Maishi N, Hida K. Tumor endothelial cells accelerate tumor metastasis. *Cancer Sci*. 2017;108(10):1921-6.
31. Guo S, Deng CX. Effect of stromal cells in tumor microenvironment on metastasis initiation. *Int J Biol Sci*. 2018;14(14):2083-93.
32. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996;86(3):353-64.
33. Lv X, Li J, Zhang C, Hu T, Li S, He S, et al. The role of hypoxia-inducible factors in tumor angiogenesis and cell metabolism. *Genes Dis*. 2017;4(1):19-24.
34. Liao D, Johnson RS. Hypoxia: A key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2007;26(2):281-90.
35. Ferrara N, Gerber H-P, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003;9(6):669-76.
36. Apte RS, Chen DS, Ferrara N. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell*. 2019;176(6):1248-64.
37. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: Basic science and clinical progress. *Endocr Rev*. 2004;25(4):581-611.
38. Claesson-Welsh L, Welsh M. VEGFA and tumour angiogenesis. *J Intern Med*. 2013;273(2):114-27.
39. Jiang BH, Liu LZ. Chapter 2 PI3K/PTEN Signaling in Angiogenesis and Tumorigenesis. *Adv Cancer Res*. 2009;102(09):19-65.
40. Takahashi T, Yamaguchi S, Chida K, Shibuya M. A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC- γ and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *EMBO J*. 2001;20(11):2768-78.
41. Quintero-Fabián S, Arreola R, Becerril-Villanueva E, Torres-Romero JC, Arana-Argáez V, Lara-Riegos J, et al. Role of Matrix Metalloproteinases in Angiogenesis and Cancer. *Front Oncol*. 2019;9(December):1-21.
42. Van Hinsbergh VWM, Koolwijk P. Endothelial sprouting and angiogenesis: Matrix metalloproteinases in the lead. *Cardiovasc Res*. 2008;78(2):203-12.

43. Tammela T, Zarkada G, Wallgard E, Murtomäki A, Suchting S, Wirzenius M, et al. Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation. *Nature*. 2008;454(7204):656–60.
44. Shawber CJ, Funahashi Y, Francisco E, Vorontchikhina M, Kitamura Y, Stowell SA, et al. Notch alters VEGF responsiveness in human and murine endothelial cells by direct regulation of VEGFR-3 expression. *J Clin Invest*. 2007;117(11):3369–82.
45. Jakobsson L, Franco CA, Bentley K, Collins RT, Ponsioen B, Aspalter IM, et al. Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting. *Nat Cell Biol*. 2010;12(10):943–53.
46. Lobov IB, Renard RA, Papadopoulos N, Gale NW, Thurston G, Yancopoulos GD, et al. Delta-like ligand 4 (DII4) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(9):3219–24.
47. Harrington LS, Sainson RCA, Williams CK, Taylor JM, Shi W, Li JL, et al. Regulation of multiple angiogenic pathways by DII4 and Notch in human umbilical vein endothelial cells. *Microvasc Res*. 2008;75(2):144–54.
48. Funahashi Y, Shawber CJ, Vorontchikhina M, Sharma A, Outtz HH, Kitajewski J. Notch regulates the angiogenic response via induction of VEGFR-1. *J Angiogenes Res*. 2010;2(1):22–4.
49. Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol*. 2003;161(6):1163–77.
50. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011;144(5):646–74.
51. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 2011;473(7347):298–307.
52. DeClerck K, Elble RC. The role of hypoxia and acidosis in promoting metastasis and resistance to chemotherapy. *Cancer*. 2010;15:213–25.
53. Jain RK. Antiangiogenesis Strategies Revisited: From Starving Tumors to Alleviating Hypoxia. *Cancer Cell*. 2014;26(5):605–22.
54. Goveia J, Rohlenova K, Taverna F, Treps L, Conradi LC, Pircher A, et al. An Integrated Gene Expression Landscape Profiling Approach to Identify Lung Tumor Endothelial Cell Heterogeneity and Angiogenic Candidates. *Cancer Cell*. 2020;37(1):21–36.e13.
55. Lambrechts D, Wauters E, Boeckx B, Aibar S, Nittner D, Burton O, et al. Phenotype molding of stromal cells in the lung tumor microenvironment. *Nat Med*. 2018;24(8):1277–89.
56. Nagl L, Horvath L, Pircher A, Wolf D. Tumor Endothelial Cells (TECs) as Potential Immune Directors of the Tumor Microenvironment – New Findings and Future Perspectives. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8(August):1–18.
57. Rohlenova K, Veys K, Miranda-Santos I, De Bock K, Carmeliet P. Endothelial Cell Metabolism in Health and Disease. *Trends Cell Biol*. 2018;28(3):224–36.
58. Eelen G, de Zeeuw P, Treps L, Harjes U, Wong BW, Carmeliet P. Endothelial cell metabolism. *Physiol Rev*. 2018;98(1):3–58.
59. Albini A, Bruno A, Noonan DM, Mortara L. Contribution to tumor angiogenesis from innate immune cells within the tumor microenvironment: Implications for immunotherapy. *Front Immunol*. 2018;9(APR).
60. Maishi N, Annan D, Kikuchi H, Hida Y, Hida K. Tumor Endothelial Heterogeneity in Cancer Progression. *Cancers (Basel)*. 2019;11(1511):1–16.

61. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, Van Der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* (80-). 1997;275(5302):964-7.
62. Bussolati B, Grange C, Camussi G. Tumor exploits alternative strategies to achieve vascularization. *FASEB J*. 2011;25(9):2874-82.
63. Hellström M, Kalén M, Lindahl P, Abramsson A, Betsholtz C. Role of PDGF-B and PDGFR- β in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development*. 1999;126(14):3047-55.
64. Crivellato E, Nico B, Vacca A, Djonov V, Presta M, Ribatti D. Recombinant human erythropoietin induces intussusceptive microvascular growth in vivo. *Leukemia*. 2004;18(2):331-6.
65. Wilting J, Birkenhäger R, Eichmann A, Kurz H, Martiny-Baron G, Marmé D, et al. VEGF 121 Induces Proliferation of Vascular Endothelial Cells and Expression of. *Dev Biol*. 1996;176(0116):76-85.
66. Treps L, Faure S, Clere N. Vasculogenic mimicry, a complex and devious process favoring tumorigenesis – Interest in making it a therapeutic target. *Pharmacol Ther*. 2021;223.
67. Klein D. The tumor vascular endothelium as decision maker in cancer therapy. *Front Oncol*. 2018;8(SEP):1-10.
68. Koppenol WH, Bounds PL, Dang C V. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. Vol. 11, *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group; 2011. p. 325-37.
69. Vaupel P, Schmidberger H, Mayer A. The Warburg effect: essential part of metabolic reprogramming and central contributor to cancer progression. *Int J Radiat Biol*. 2019;95(7):912-9.
70. Shestov AA, Liu X, Ser Z, Cluntun AA, Hung YP, Huang L, et al. Quantitative determinants of aerobic glycolysis identify flux through the enzyme GAPDH as a limiting step. *Elife*. 2014;3(July2014):1-18.
71. Lunt SY, Vander Heiden MG. Aerobic Glycolysis: Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2011;27(1):441-64.
72. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*. 2011;146(6):873-87.
73. De Bock K, Georgiadou M, Schoors S, Kuchnio A, Wong BW, Cantelmo AR, et al. Role of PFKFB3-driven glycolysis in vessel sprouting. *Cell*. 2013;154(3):651-63.
74. De Bock K, Georgiadou M, Carmeliet P. Role of endothelial cell metabolism in vessel sprouting. *Cell Metab*. 2013;18(5):634-47.
75. Helmlinger G, Endo M, Ferrara N, Hlatky L, Jain RK. Formation of endothelial cell networks. *Nature*. 2000;405(6783):139-41.
76. Yu P, Wilhelm K, Dubrac A, Tung JK, Alves TC, Fang JS. FGF-Dependent Metabolic Control of Vascular Development. *J Vasc Surg*. 2017;66(3):959.
77. Doddaballapur A, Michalik KM, Manavski Y, Lucas T, Houtkooper RH, You X, et al. Laminar shear stress inhibits endothelial cell metabolism via KLF2-mediated repression of PFKFB3. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35(1):137-45.
78. Betsholtz C. Vascular biology: Transcriptional control of endothelial energy. *Nature*. 2016;529(7585):160-1.
79. Cantelmo AR, Conradi LC, Brajic A, Goveia J, Kalucka J, Pircher A, et al. Inhibition of the Glycolytic Activator PFKFB3 in Endothelium Induces Tumor Vessel Normalization, Impairs Metastasis, and Improves

- Chemotherapy. *Cancer Cell*. 2016;30(6):968–85.
80. Yeh WL, Lin CJ, Fu WM. Enhancement of glucose transporter expression of brain endothelial cells by vascular endothelial growth factor derived from glioma exposed to hypoxia. *Mol Pharmacol*. 2008;73(1):170–7.
 81. Koziel A, Woyda-Ploszczyca A, Kicinska A, Jarmuszkiewicz W. The influence of high glucose on the aerobic metabolism of endothelial EA.hy926 cells. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2012;464(6):657–69.
 82. Blecha J, Novais SM, Rohlenova K, Novotna E, Lettlova S, Schmitt S, et al. Antioxidant defense in quiescent cells determines selectivity of electron transport chain inhibition-induced cell death. *Free Radic Biol Med*. 2017;112(July):253–66.
 83. Coutelle O, Hornig-Do HT, Witt A, Andree M, Schiffmann LM, Piekarek M, et al. Embelin inhibits endothelial mitochondrial respiration and impairs neoangiogenesis during tumor growth and wound healing. *EMBO Mol Med*. 2014;6(5):624–39.
 84. Orecchioni S, Reggiani F, Talarico G, Mancuso P, Calleri A, Gregato G, et al. The biguanides metformin and phenformin inhibit angiogenesis, local and metastatic growth of breast cancer by targeting both neoplastic and microenvironment cells. *Int J Cancer*. 2015;136(6):E534–44.
 85. Rohlena J, Dong LF, Kluckova K, Zobalova R, Goodwin J, Tilly D, et al. Mitochondrially targeted α -tocopheryl succinate is antiangiogenic: Potential benefit against tumor angiogenesis but caution against wound healing. *Antioxidants Redox Signal*. 2011;15(12):2923–35.
 86. Jayavelu AK, Moloney JN, Böhmer FD, Cotter TG. NOX-driven ROS formation in cell transformation of FLT3-ITD-positive AML. *Exp Hematol*. 2016;44(12):1113–22.
 87. Winterbourn CC, Hampton MB. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radic Biol Med*. 2008;45(5):549–61.
 88. Dickinson BC, Chang CJ. Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nat Chem Biol*. 2011;7(8):504–11.
 89. Milkovic L, Siems W, Siems R, Zarkovic N. Oxidative stress and antioxidants in carcinogenesis and integrative therapy of cancer. *Curr pharmaceutical desing*. 2014;20(42):6529–42.
 90. Gill JG, Piskounova E, Morrison SJ. Cancer, oxidative stress, and metastasis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2016;81(1):163–75.
 91. Davies KJA. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life*. 2000;50(4–5):279–89.
 92. Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative stress. *Annu Riview Biochem*. 2017;86(April):25.1–25.34.
 93. Hegedűs C, Kovács K, Polgár Z, Regdon Z, Szabó É, Robaszkievicz A, et al. Redox control of cancer cell destruction. *Redox Biol*. 2018;16(December 2017):59–74.
 94. Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol*. 2011;194(1):7–15.
 95. Reczek CR, Chandel NS. ROS-dependent signal transduction. *Curr Opin Cell Biol*. 2015;33:8–13.
 96. Moloney JN, Cotter TG. ROS signalling in the biology of cancer. *Semin Cell Dev Biol*. 2018;80:50–64.
 97. Veal E, Day A. Hydrogen peroxide as a signaling molecule. *Antioxidants Redox Signal*. 2011;15(1):147–51.
 98. Bae YS, Oh H, Rhee SG, Yoo Y Do. Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling. *Mol Cells*. 2011;32(6):491–509.

99. Li R, Kia Z, Trush MA. Defining ROS in Biology and Medicine. *React Oxyg Species*. 2016;176(1):139–48.
100. Quinlan CL, Treberg JR, Perevoshchikova I V., Orr AL, Brand MD. Native rates of superoxide production from multiple sites in isolated mitochondria measured using endogenous reporters. *Free Radic Biol Med*. 2012;53(9):1807–17.
101. Handy DE, Loscalzo J. Redox regulation of mitochondrial function. *Antioxidants Redox Signal*. 2012;16(11):1323–67.
102. Sabharwal SS, Schumacker PT. Mitochondrial ROS in cancer: Initiators, amplifiers or an Achilles' heel? *Nat Rev Cancer*. 2014;14(11):709–21.
103. Goncalves RLS, Quinlan CL, Perevoshchikova I V., Hey-Mogensen M, Brand MD. Sites of superoxide and hydrogen peroxide production by muscle mitochondria assessed ex vivo under conditions mimicking rest and exercise. *J Biol Chem*. 2015;290(1):209–27.
104. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*. 2009;417(1):1–13.
105. Han D, Williams E, Cadenas E. Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochem J*. 2001;353(2):411–6.
106. Liou GY, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res*. 2010;44(5):479–96.
107. Muller FL, Liu Y, Van Remmen H. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem*. 2004;279(47):49064–73.
108. Sena LA, Chandel NS. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell*. 2012;48(2):158–67.
109. Jitschin R, Hofmann AD, Bruns H, Giebl A, Bricks J, Berger J, et al. Mitochondrial metabolism contributes to oxidative stress and reveals therapeutic targets in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014;123(17):2663–72.
110. Hart PC, Mao M, De Abreu ALP, Ansenberger-Fricano K, Ekoue DN, Ganini D, et al. MnSOD upregulation sustains the Warburg effect via mitochondrial ROS and AMPK-dependent signalling in cancer. *Nat Commun*. 2015;6.
111. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2007;87(1):245–313.
112. Brewer TF, Garcia FJ, Onak CS, Carroll KS, Chang CJ. Chemical approaches to discovery and study of sources and targets of hydrogen peroxide redox signaling through NADPH oxidase proteins. *Annu Rev Biochem*. 2015;84:765–90.
113. Nauseef WM. Biological roles for the NOX family NADPH oxidases. *J Biol Chem*. 2008;283(25):16961–5.
114. Drummond GR, Sobey CG. Endothelial NADPH oxidases: which NOX to target in vascular disease? *Trends Endocrinol Metab*. 2014;25(9):452–63.
115. Holmström KM, Finkel T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(6):411–21.
116. Veal EA, Day AM, Morgan BA. Hydrogen Peroxide Sensing and Signaling. *Mol Cell*. 2007;26(1):1–14.
117. Bienert GP, Chaumont F. Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 2014;1840(5):1596–604.
118. Jackson SH, Devadas S, Kwon J, Pinto LA, Williams MS. T cells express a phagocyte-type NADPH oxidase that is activated after T cell receptor stimulation. *Nat Immunol*. 2004;5(8):818–27.

119. Richards SM, Clark EA. BCR-induced superoxide negatively regulates B-cell proliferation and T-cell-independent type 2 Ab responses. *Eur J Immunol*. 2009;39(12):3395–403.
120. Naughton R, Quiney C, Turner SD, Cotter TG. Bcr-Abl-mediated redox regulation of the PI3K/AKT pathway. *Leukemia*. 2009;23(8):1432–40.
121. Woolley JF, Naughton R, Stanicka J, Gough DR, Bhatt L, Dickinson BC, et al. H₂O₂ production downstream of FLT3 is mediated by p22phox in the endoplasmic reticulum and is required for STAT5 signalling. *PLoS One*. 2012;7(7):1–10.
122. Brown DI, Griendling KK. Nox proteins in signal transduction. *Free Radic Biol Med*. 2009;47(9):1239–53.
123. Kobayashi S, Nojima Y, Shibuya M, Maru Y. Nox1 regulates apoptosis and potentially stimulates branching morphogenesis in sinusoidal endothelial cells. *Exp Cell Res*. 2004;300(2):455–62.
124. Ago T, Kitazono T, Kuroda J, Kumai Y, Kamouchi M, Ooboshi H, et al. NAD(P)H oxidases in rat basilar arterial endothelial cells. *Stroke*. 2005;36(5):1040–6.
125. Banfi B, Maturana A, Jaconi S, Arnaudeau S, Laforge T, Sinha B, et al. A Mammalian H⁺ Channel Generated Through Alternative Splicing of the NADPH Oxidase Homolog NOX-1. *Science* (80-). 2000;287(5450):138–42.
126. Cheng G, Diebold BA, Hughes Y, Lambeth JD. Nox1-dependent reactive oxygen generation is regulated by Rac1. *J Biol Chem*. 2006;281(26):17718–26.
127. Groemping Y, Rittinger K. Activation and assembly of the NADPH oxidase: A structural perspective. *Biochem J*. 2005;386(3):401–16.
128. Groemping Y, Lapouge K, Smerdon SJ, Rittinger K. Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase. *Cell*. 2003;113(3):343–55.
129. Sumimoto H, Hata K, Mizuki K, Ito T, Kage Y, Sakaki Y, et al. Assembly and activation of the phagocyte NADPH oxidase: Specific interaction of the N-terminal Src homology 3 domain of p47(phox) with p22(phox) is required for activation of the NADPH oxidase. *J Biol Chem*. 1996;271(36):22152–8.
130. Bánfi B, Malgrange B, Knisz J, Steger K, Dubois-Dauphin M, Krause KH. NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear. *J Biol Chem*. 2004;279(44):46065–72.
131. Ueno N, Takeya R, Miyano K, Kikuchi H, Sumimoto H. The NADPH oxidase Nox3 constitutively produces superoxide in a p22 phox-dependent manner: Its regulation by oxidase organizers and activators. *J Biol Chem*. 2005;280(24):23328–39.
132. Cheng G, Cao Z, Xu X, Meir EGV, Lambeth JD. Homologs of gp91phox: Cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene*. 2001;269(1–2):131–40.
133. Andersson ER, Sandberg R, Lendahl U. Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. *Development*. 2011;138(17):3593–612.
134. Mandal CC, Ganapathy S, Gorin Y, Mahadev K, Block K, Abboud HE, et al. Reactive oxygen species derived from Nox4 mediate BMP2 gene transcription and osteoblast differentiation. *Biochem J*. 2011;433(2):393–402.
135. Edderkaoui M, Nitsche C, Zheng L, Pandol SJ, Gukovsky I, Gukovskaya AS. NADPH oxidase activation in pancreatic cancer cells is mediated through Akt-dependent up-regulation of p22phox. *J Biol Chem*. 2011;286(10):7779–87.
136. Meitzler JL, Konaté MM, Doroshov JH. Hydrogen peroxide-producing NADPH oxidases and the promotion

of migratory phenotypes in cancer. Arch Biochem Biophys. 2019;675(June):108076.

137. Helfinger V, Henke N, Harenkamp S, Walter M, Epah J, Penski C, et al. The NADPH Oxidase Nox4 mediates tumour angiogenesis. 2016;1:435–46.
138. Donkó Á, Péterfi Z, Sum A, Leto T, Geiszt M. Dual oxidases. Philos Trans R Soc B Biol Sci. 2005;360(1464):2301–8.
139. Bánfi B, Tirone F, Durussel I, Knisz J, Moskwa P, Molnár GZ, et al. Mechanism of Ca²⁺ Activation of the NADPH Oxidase 5 (NOX5). J Biol Chem. 2004;279(18):18583–91.
140. Kawahara T, Ritsick D, Cheng G, Lambeth JD. Point mutations in the proline-rich region of p22phox are dominant inhibitors of Nox1- and Nox2-dependent reactive oxygen generation. J Biol Chem. 2005;280(36):31859–69.
141. Bedard K, Jaquet V, Krause KH. NOX5: From basic biology to signaling and disease. Free Radic Biol Med. 2012;52(4):725–34.
142. Shah AM. Parsing the role of NADPH oxidase enzymes and reactive oxygen species in heart failure. Circulation. 2015;131(7):602–4.
143. Giordo R, Nasrallah GK, Posadino AM, Galimi F, Capobianco G, Eid AH, et al. Resveratrol-elicited pkc inhibition counteracts nox-mediated endothelial to mesenchymal transition in human retinal endothelial cells exposed to high glucose. Antioxidants. 2021;10(2):1–20.
144. Gorin Y, Block K. Nox as a target for diabetic complications. Clin Sci. 2013;125(8):361–82.
145. Jha JC, Banal C, Okabe J, Gray SP, Hettige T, Chow BSM, et al. NADPH oxidase Nox5 accelerates renal injury in diabetic nephropathy. Diabetes. 2017;66(10):2691–703.
146. Van Der Vliet A. Nox enzymes in allergic airway inflammation. Biochim Biophys Acta - Gen Subj. 2011;1810(11):1035–44.
147. Wan WYH, Hollins F, Haste L, Woodman L, Hirst RA, Bolton S, et al. NADPH Oxidase-4 Overexpression Is Associated with Epithelial Ciliary Dysfunction in Neutrophilic Asthma. Chest. 2016;149(6):1445–59.
148. Ganguly U, Kaur U, Chakrabarti SS, Sharma P, Agrawal BK, Saso L, et al. Oxidative Stress, Neuroinflammation, and NADPH Oxidase: Implications in the Pathogenesis and Treatment of Alzheimer's Disease. Oxid Med Cell Longev. 2021;2021.
149. Hirschey MD, DeBerardinis RJ, Diehl AME, Drew JE, Frezza C, Green MF, et al. Dysregulated metabolism contributes to oncogenesis. Semin Cancer Biol. 2015;35:S129–50.
150. Panieri E, Santoro MM. ROS signaling and redox biology in endothelial cells. Cell Mol Life Sci. 2015;72(17):3281–303.
151. Sundaesan M, Yu Z, Ferrans VJ. Requirement for Generation of H₂O₂ for Platelet-Derived Growth Factor Signal Transduction. Science (80-). 1995;270(5234):296–9.
152. Chiera F, Meccia E, Degan P, Aquilina G, Pietraforte D, Minetti M, et al. Overexpression of human NOX1 complex induces genome instability in mammalian cells. Free Radic Biol Med. 2008;44(3):332–42.
153. Aviello G, Knaus UG. NADPH oxidases and ROS signaling in the gastrointestinal tract review-article. Mucosal Immunol. 2018;11(4):1011–23.
154. Juhasz A, Markel S, Gaur S, Liu H, Lu J, Jiang G, et al. NADPH oxidase 1 supports proliferation of colon cancer cells by modulating reactive oxygen species-dependent signal transduction. J Biol Chem. 2017;292(19):7866–87.

155. Liu H, Antony S, Roy K, Juhasz A, Wu Y, Lu J, et al. Interleukin-4 and interleukin-13 increase NADPH oxidase 1-related proliferation of human colon cancer cells. *Oncotarget*. 2017;8(24):38113–35.
156. Stalin J, Garrido-Urbani S, Heitz F, Szyndralewicz C, Jemelin S, Coquoz O, et al. Inhibition of host NOX1 blocks tumor growth and enhances checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *Life Sci Alliance*. 2019;2(4):1–16.
157. Aurelius J, Hallner A, Werlenius O, Riise R, Möllgård L, Brune M, et al. NOX2-dependent immunosuppression in chronic myelomonocytic leukemia. *J Leukoc Biol*. 2017;102(2):459–66.
158. Martner A, Aydin E, Hellstrand K. NOX2 in autoimmunity, tumor growth and metastasis. *J Pathol*. 2019;247(2):151–4.
159. Adane B, Ye H, Khan N, Pei S, Minhajuddin M, Stevens BM, et al. The Hematopoietic Oxidase NOX2 Regulates Self-Renewal of Leukemic Stem Cells. *Cell Rep*. 2019;27(1):238–254.e6.
160. Banskota S, Regmi SC, Kim JA. NOX1 to NOX2 switch deactivates AMPK and induces invasive phenotype in colon cancer cells through overexpression of MMP-7. *Mol Cancer*. 2015;14(1):1–14.
161. Yang WH, Huang Z, Wu J, Ding CKC, Murphy SK, Chi JT. A TAZ-ANGPTL4-NOX2 axis regulates ferroptotic cell death and chemoresistance in epithelial ovarian cancer. *Mol Cancer Res*. 2020;18(1):79–90.
162. Meitzler JL, Makhlof HR, Antony S, Wu Y, Butcher D, Jiang G, et al. Decoding NADPH oxidase 4 expression in human tumors. *Redox Biol*. 2017;13(May):182–95.
163. Yang Q, Wu F rong, Wang J nan, Gao L, Jiang L, Li H Di, et al. Nox4 in renal diseases: An update. *Free Radic Biol Med*. 2018;124(March):466–72.
164. Liu WJ, Huang YX, Wang W, Zhang Y, Liu BJ, Qiu JG, et al. NOX4 Signaling Mediates Cancer Development and Therapeutic Resistance through HER3 in Ovarian Cancer Cells. *Cells*. 2021;10(7):1–13.
165. Wu QQ, Zheng B, Weng G Bin, Yang HM, Ren Y, Weng XJ, et al. Downregulated NOX4 underlies a novel inhibitory role of microRNA-137 in prostate cancer. *J Cell Biochem*. 2019;120(6):10215–27.
166. Boudreau HE, Casterline BW, Rada B, Korzeniowska A, Leto TL. Nox4 involvement in TGF-beta and SMAD3-driven induction of the epithelial-to-mesenchymal transition and migration of breast epithelial cells. *Free Radic Biol Med*. 2012;53(7):1489–99.
167. Liu GS, Peshavariya H, Higuchi M, Brewer AC, Chang CWT, Chan EC, et al. Microphthalmia-associated transcription factor modulates expression of NADPH oxidase type 4: A negative regulator of melanogenesis. *Free Radic Biol Med*. 2012;52(9):1835–43.
168. Aydin E, Johansson J, Nazir FH, Hellstrand K, Martner A. Role of NOX2-derived reactive oxygen species in NK cell-mediated control of murine melanoma metastasis. *Cancer Immunol Res*. 2017;5(9):804–11.
169. Augsburger F, Filippova A, Rasti D, Seredenina T, Lam M, Maghzal G, et al. Pharmacological characterization of the seven human NOX isoforms and their inhibitors. *Redox Biol*. 2019;26(May):101272.
170. Musset B, Clark RA, DeCoursey TE, Petheo GL, Geiszt M, Chen Y, et al. NOX5 in human spermatozoa: Expression, function, and regulation. *J Biol Chem*. 2012;287(12):9376–88.
171. Aoyama T, Paik YH, Watanabe S, Laleu B, Gaggini F, Fioraso-Cartier L, et al. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in experimental liver fibrosis: GKT137831 as a novel potential therapeutic agent. *Hepatology*. 2012;56(6):2316–27.
172. Liang S, Ma HY, Zhong Z, Dhar D, Liu X, Xu J, et al. NADPH Oxidase 1 in Liver Macrophages Promotes

- Inflammation and Tumor Development in Mice. *Gastroenterology*. 2019;156(4):1156-1172.e6.
173. Lu WJ, Li JY, Chen RJ, Huang LT, Lee TY, Lin KH. VAS2870 and VAS3947 attenuate platelet activation and thrombus formation via a NOX-independent pathway downstream of PKC. *Sci Rep*. 2019;9(1):1-13.
 174. Wang M, Luo L. An Effective NADPH Oxidase 2 Inhibitor Provides Neuroprotection and Improves Functional Outcomes in Animal Model of Traumatic Brain Injury. *Neurochem Res*. 2020;45(5):1097-106.
 175. Padilha EC, Shah P, Rai G, Xu X. NOX2 inhibitor GSK2795039 metabolite identification towards drug optimization. *J Pharm Biomed Anal*. 2021;201:114102.
 176. Oh SH, Ahn JS, Oh EJ, Kim YJ, Yook JM, Lim JH, et al. Single-Dose Toxicity Study on ML171, a Selective NOX1 Inhibitor, in Mice. *Biomed Res Int*. 2021;2021.
 177. Babior BM. The NADPH oxidase of endothelial cells. *IUBMB Life*. 2000;50(4-5):267-9.
 178. Burtenshaw D, Hakimjavadi R, Redmond EM, Cahill PA. Nox, reactive oxygen species and regulation of vascular cell fate. *Antioxidants*. 2017;6(4):1-22.
 179. Frey RS, Ushio-Fukai M, Malik AB. NADPH oxidase-dependent signaling in endothelial cells: Role in physiology and pathophysiology. *Antioxidants Redox Signal*. 2009;11(4):791-810.
 180. Konaté MM, Antony S, Doroshov JH. Inhibiting the Activity of NADPH Oxidase in Cancer. *Antioxid Redox Signal*. 2020;1-56.
 181. Garrido-Urbani S, Jemelin S, Deffert C, Carnesecchi S, Basset O, Szyndralewicz C, et al. Targeting vascular NADPH oxidase 1 blocks tumor angiogenesis through a PPAR α mediated mechanism. *PLoS One*. 2011;6(2).
 182. Liu F, Gomez Garcia AM, Meyskens FL. NADPH oxidase 1 overexpression enhances invasion via matrix metalloproteinase-2 and epithelial-mesenchymal transition in melanoma cells. *J Invest Dermatol*. 2012;132(8):2033-41.
 183. Konior A, Schramm A, Czesnikiewicz-Guzik M, Guzik TJ. NADPH oxidases in vascular pathology. *Antioxidants Redox Signal*. 2014;20(17):2794-814.
 184. Oliveira-Marques V, Marinho HS, Cyrne L, Antunes F. Role of hydrogen peroxide in NF- κ B activation: From inducer to modulator. *Antioxidants Redox Signal*. 2009;11(9):2223-43.
 185. Son Y, Kim S, Chung HT, Pae HO. Reactive oxygen species in the activation of MAP kinases. 1st ed. Vol. 528, *Methods in Enzymology*. Elsevier Inc.; 2013. 27-48 p.
 186. Montezano AC, Burger D, Paravicini TM, Chignalia AZ, Yusuf H, Almasri M, et al. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced oxidase 5 (Nox5) regulation by angiotensin II and endothelin-1 is mediated via calcium/calmodulin-dependent, Rac-1-independent pathways in human endothelial cells. *Circ Res*. 2010;106(8):1363-73.
 187. Ning RB, Zhu J, Chai DJ, Xu CS, Xie H, Lin XY, et al. RXR agonists inhibit high glucose-induced upregulation of inflammation by suppressing activation of the NADPH oxidase-nuclear factor- κ B pathway in human endothelial. *Genet Mol Res*. 2013;12(4):6692-707.
 188. Xia F, Wang C, Jin Y, Liu Q, Meng Q, Liu K, et al. Luteolin protects HUVECs from TNF- α -induced oxidative stress and inflammation via its effects on the Nox4/ROS-NF- κ B and MAPK pathways. *J Atheroscler Thromb*. 2014;21(8):768-83.
 189. Xiao H, Lu M, Lin TY, Chen Z, Chen G, Wang WC, et al. Sterol regulatory element binding protein 2 activation of NLRP3 inflammasome in endothelium mediates hemodynamic-induced atherosclerosis

- susceptibility. *Circulation*. 2013;128(6):632–42.
190. Meijles DN, Pagano PJ. Nox and Inflammation in the Vascular Adventitia. *Hypertension*. 2016;67(1):14–9.
 191. Shain AH, Bastian BC. From melanocytes to melanomas. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(6):345–58.
 192. Obrador E, Liu-Smith F, Dellinger RW, Salvador R, Meyskens FL, Estrela JM. Oxidative stress and antioxidants in the pathophysiology of malignant melanoma. *Biol Chem*. 2019;400(5):589–612.
 193. Carr S, Smith C, Wernberg J. Epidemiology and Risk Factors of Melanoma. *Surg Clin North Am*. 2020;100(1):1–12.
 194. *Epidémiologie des cancers cutanés-INCa* [Internet]. 2018. Available from: <https://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Depistage-et-detection-precoce/Detection-precoce-des-cancers-de-la-peau/Epidemiologie>
 195. Schadendorf D, van Akkooi ACJ, Berking C, Griewank KG, Gutzmer R, Hauschild A, et al. Melanoma. *Lancet*. 2018;392(10151):971–84.
 196. Karimkhani C, Green AC, Nijsten T, Weinstock MA, Dellavalle RP, Naghavi M, et al. The global burden of melanoma: results from the Global Burden of Disease Study 2015. *Br J Dermatol*. 2017;177(1):134–40.
 197. Longvert C, Saiag P. Actualités dans le mélanome cutané. *Rev Med Interne*. 2019;40(3):178–83.
 198. Falcone I, Conciatori F, Bazzichetto C, Ferretti G, Cognetti F, Ciuffreda L, et al. Tumor microenvironment: Implications in melanoma resistance to targeted therapy and immunotherapy. *Cancers (Basel)*. 2020;12(10):1–26.
 199. Jenkins NC, Grossman D. Role of melanin in melanocyte dysregulation of reactive oxygen species. *Biomed Res Int*. 2013;2013.
 200. Sander CS, Chang H, Hamm F, Elsner P, Thiele JJ. Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis. *Int J Dermatol*. 2004;43(5):326–35.
 201. Cannavò SP, Tonacci A, Bertino L, Casciaro M, Borgia F, Gangemi S. The role of oxidative stress in the biology of melanoma: A systematic review. *Pathol Res Pract*. 2019;215(1):21–8.
 202. Khamari R, Trinh A, Gabert PE, Corazao-Rozas P, Riveros-Cruz S, Balayssac S, et al. Glucose metabolism and NRF2 coordinate the antioxidant response in melanoma resistant to MAPK inhibitors. *Cell Death Dis*. 2018;9(3).
 203. Yamaura M, Mitsushita J, Furuta S, Kuniwa Y, Ashida A, Goto Y, et al. NADPH oxidase 4 contributes to transformation phenotype of melanoma cells by regulating G2-M cell cycle progression. *Cancer Res*. 2009;69(6):2647–54.
 204. Prasad R, Kappes JC, Katiyar SK. Inhibition of NADPH oxidase 1 activity and blocking the binding of cytosolic and membrane-bound proteins by honokiol inhibit migratory potential of melanoma cells. *Oncotarget*. 2016;7(7):7899–912.
 205. Deng Y, Guo Y, Liu P, Zeng R, Ning Y, Pei G, et al. Blocking protein phosphatase 2A signaling prevents endothelial-to-mesenchymal transition and renal fibrosis: A peptide-based drug therapy. *Sci Rep*. 2016;6(August 2015):1–13.
 206. Li Q, Yao Y, Shi S, Zhou M, Zhou Y, Wang M, et al. Inhibition of miR-21 alleviated cardiac perivascular fibrosis via repressing EndMT in T1DM. *J Cell Mol Med*. 2020;24(1):910–20.
 207. Guan S, Zhou J. CXCR7 attenuates the TGF- β -induced endothelial-to-mesenchymal transition and

- pulmonary fibrosis. *Mol Biosyst.* 2017;13(10):2116–24.
208. Zeisberg EM, Potenta S, Xie L, Zeisberg M, Kalluri R. Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res.* 2007;67(21):10123–8.
 209. Yeon JH, Jeong HE, Seo H, Cho S, Kim K, Na D, et al. Cancer-derived exosomes trigger endothelial to mesenchymal transition followed by the induction of cancer-associated fibroblasts. *Acta Biomater.* 2018;76:146–53.
 210. Shain AH, Yeh I, Kovalyshyn I, Sriharan A, Talevich E, Gagnon A, et al. The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions. *N Engl J Med.* 2015;373(20):1926–36.
 211. Krizbai IA, Nagyórsi P, Bencs R, Gasparics Á, Sebe A, Fazakas C, et al. Endothelial-Mesenchymal Transition of Brain Endothelial Cells: Possible Role during Metastatic Extravasation. *PLoS One.* 2015;10(3):e0119655.
 212. Shelton M, Anene CA, Nsengimana J, Roberts W, Newton-Bishop J, Boyne JR. The role of CAF derived exosomal microRNAs in the tumour microenvironment of melanoma. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer.* 2021;1875(1):188456.
 213. Hutchenreuther J, Vincent K, Norley C, Racanelli M, Gruber SB, Johnson TM, et al. Activation of cancer-associated fibroblasts is required for tumor neovascularization in a murine model of melanoma. *Matrix Biol.* 2018;74(2018):52–61.
 214. Saito A. EMT and EndMT: regulated in similar ways? *J Biochem.* 2013;153(6):493–5.
 215. Platel V, Faure S, Corre I, Clere N. Endothelial-to-Mesenchymal Transition (EndoMT): Roles in Tumorigenesis, Metastatic Extravasation and Therapy Resistance. Vol. 2019, *Journal of Oncology.* 2019.
 216. Gil D, Ciołczyk-Wierzbička D, Dulińska-Litewka J, Laidler P. Integrin-linked kinase regulates cadherin switch in bladder cancer. *Tumor Biol.* 2016;37(11):15185–91.
 217. Leskela S, Pérez-Mies B, Rosa-Rosa JM, Cristobal E, Biscuola M, Palacios-Berraquero ML, et al. Molecular basis of tumor heterogeneity in endometrial carcinosarcoma. *Cancers (Basel).* 2019;11(7):1–21.
 218. Ma Z, Xin Z, Hu W, Jiang S, Yang Z, Yan X, et al. Forkhead box O proteins: Crucial regulators of cancer EMT. *Semin Cancer Biol.* 2018;50(December 2017):21–31.
 219. Marsh T, Pietras K, McAllister SS. Fibroblasts as architects of cancer pathogenesis. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2013;1832(7):1070–8.
 220. Kalluri R. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2016;16(9):582–98.
 221. Cirri P, Chiarugi P. Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin. *Am J Cancer Res.* 2011;1(4):482–97.
 222. Saito A. EMT and EndMT: regulated in similar ways? *J Biochem.* 2013;153(6):493–5.
 223. Arciniegas E, Sutton AB, Allen TD, Schor AM. Transforming growth factor beta 1 promotes the differentiation of endothelial cells into smooth muscle-like cells in vitro. *J Cell Sci.* 1992;103(2):521–9.
 224. Piera-Velazquez S, Jimenez SA. Endothelial to mesenchymal transition: Role in physiology and in the pathogenesis of human diseases. *Physiol Rev.* 2019;99(2):1281–324.
 225. Xiao L, Kim DJ, Davis CL, McCann J V., Dunleavey JM, Vanderlinden AK, et al. Tumor endothelial cells with distinct patterns of TGFβ-driven endothelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Res.* 2015;75(7):1244–54.
 226. Medici D, Potenta S, Kalluri R. Transforming growth factor-β2 promotes Snail-mediated endothelial -

- Mesenchymal transition through convergence of Smad-dependent and Smad-independent signalling. *Biochem J.* 2011;437(3):515–20.
227. Maleszewska M, Moonen JRAJ, Huijkman N, van de Sluis B, Krenning G, Harmsen MC. IL-1 β and TGF β 2 synergistically induce endothelial to mesenchymal transition in an NF κ B-dependent manner. *Immunobiology.* 2013;218(4):443–54.
 228. Sabbineni H, Verma A, Somanath PR. Isoform-specific effects of transforming growth factor β on endothelial-to-mesenchymal transition. *J Cell Physiol.* 2018;233(11):8418–28.
 229. Rieder F, Kessler SP, West GA, Bhilocha S, De La Motte C, Sadler TM, et al. Inflammation-induced endothelial-to-mesenchymal transition: A novel mechanism of intestinal fibrosis. *Am J Pathol.* 2011;179(5):2660–73.
 230. Jiang Y, Zhou X, Hu R, Dai A. TGF- β 1-induced SMAD2/3/4 activation promotes RELM- β transcription to modulate the endothelium-mesenchymal transition in human endothelial cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2018;105(August):52–60.
 231. Pinto M, Melo F, Malta T, Rodrigues E, Plaça J, Silva W, et al. Endothelial Cells from different anatomical origin have distinct responses during Snail/TGF- β 2-mediated Endothelial-Mesenchymal Transition. *Am J Transl Res.* 2018;In press(12):4065–81.
 232. Kim SH, Song Y, Seo HR. GSK-3 β regulates the endothelial-to-mesenchymal transition via reciprocal crosstalk between NSCLC cells and HUVECs in multicellular tumor spheroid models. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019;38(1):1–14.
 233. Guo Y, Li P, Bledsoe G, Yang ZR, Chao L, Chao J. Kallistatin inhibits TGF- β -induced endothelial-mesenchymal transition by differential regulation of microRNA-21 and eNOS expression. *Exp Cell Res.* 2015;337(1):103–10.
 234. Pinto MT, Ursoli F, Melo F, Strazza E, Plaça JR, Araújo W, et al. Endothelial cells from different anatomical origin have distinct responses during SNAIL / TGF- β 2-mediated endothelial-mesenchymal transition. *Am J Transl Res.* 2018;10(12):4065–81.
 235. Ursoli Ferreira F, Tomazini Pinto M, Origassa C, Kashima S, Marcel Faça V, Olsen Câmara N, et al. Endothelial Cells Tissue-Specific Origins Affects Their Responsiveness to TGF- β 2 during Endothelial-to-Mesenchymal Transition. *Int J Mol Sci.* 2019;20(3):458.
 236. Montorfano I, Becerra A, Cerro R, Echeverría C, Sáez E, Morales MG, et al. Oxidative stress mediates the conversion of endothelial cells into myofibroblasts via a TGF-b1 and TGF-b2-dependent pathway. *Lab Investig.* 2014;94(10):1068–82.
 237. Pan J, Zhang H, Lin H, Gao L, Zhang H, Zhang J, et al. Irisin ameliorates doxorubicin-induced cardiac perivascular fibrosis through inhibiting endothelial-to-mesenchymal transition by regulating ROS accumulation and autophagy disorder in endothelial cells. *Redox Biol.* 2021;46:102120.
 238. Jiao K, Zhen J, Wu M, Teng M, Yang K, Zhou Q, et al. 27-Hydroxycholesterol-induced EndMT acts via STAT3 signaling to promote breast cancer cell migration by altering the tumor microenvironment. *Cancer Biol Med.* 2020;17(1):88–100.
 239. Carpentier G, Berndt S, Ferratge S, Rasband W, Cuendet M, Uzan G, et al. Angiogenesis Analyzer for ImageJ — A comparative morphometric analysis of “Endothelial Tube Formation Assay” and “Fibrin Bead Assay.” *Sci Rep.* 2020;10(1):1–13.

240. Kondoh M, Ohga N, Akiyama K, Hida Y, Maishi N, Towfik AM, et al. Hypoxia-induced reactive oxygen species cause chromosomal abnormalities in endothelial cells in the tumor microenvironment. *PLoS One*. 2013;8(11):1-14.
241. Hojo T, Maishi N, Towfik AM, Akiyama K, Ohga N, Shindoh M, et al. ROS enhance angiogenic properties via regulation of NRF2 in tumor endothelial cells. *Oncotarget*. 2017;8(28):45484-95.
242. Chaudhuri V, Zhou L, Karasek M. Inflammatory cytokines induce the transformation of human dermal microvascular endothelial cells into myofibroblasts: A potential role in skin fibrogenesis. *J Cutan Pathol*. 2007;34(2):146-53.
243. Rieder F, Kessler SP, West GA, Bhilocha S, De La Motte C, Sadler TM, et al. Inflammation-induced endothelial-to-mesenchymal transition: A novel mechanism of intestinal fibrosis. *Am J Pathol*. 2011;179(5):2660-73.
244. Xu A, Deng F, Chen Y, Kong Y, Pan L, Liao Q, et al. NF- κ B pathway activation during endothelial-to-mesenchymal transition in a rat model of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Biomed Pharmacother*. 2020;130(July):110525.
245. Shu DY, Butcher E, Saint-Geniez M. EMT and ENDMT: Emerging roles in age-related macular degeneration. *Int J Mol Sci*. 2020;21(12):1-26.
246. Lu X, Dunn J, Dickinson AM, Gillespie JI, Baudouin S V. Smooth Muscle α -Actin Expression in Endothelial Cells Derived from CD34+ Human Cord Blood Cells. *Stem Cells Dev*. 2004;13:521-527.
247. Frid MG, Kale VA, Stenmark KR. Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelial-mesenchymal transdifferentiation: In vitro analysis. *Circ Res*. 2002;90(11):1189-96.
248. Shojajei S, Tafazzoli-Shahdpour M, Shokrgozar MA, Haghhighipour N. Alteration of human umbilical vein endothelial cell gene expression in different biomechanical environments. *Cell Biol Int*. 2014;38(5):577-81.
249. Bramsen JA, Alber B, Murray B, Chen M-H, Huang P, Mahler G. Endothelial to Mesenchymal Transformation-derived Activated Fibroblast Behavior in a 3D Culture Environment. *Struct Hear*. 2021;5(sup1):21-21.
250. Cecoltan S, Ciortan L, Macarie RD, Vadana M, Mihaila AC, Tuceanu M, et al. High Glucose Induced Changes in Human VEC Phenotype in a 3D Hydrogel Derived From Cell-Free Native Aortic Root. *Front Cardiovasc Med*. 2021;8(August):1-13.
251. Almeida F V., Douglass SM, Fane ME, Weeraratna AT. Bad company: Microenvironmentally mediated resistance to targeted therapy in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2019;32(2):237-47.
252. Diazi S, Tartare-Deckert S, Deckert M. Bad neighborhood: Fibrotic stroma as a new player in melanoma resistance to targeted therapies. *Cancers (Basel)*. 2020;12(6).
253. Zhou L, Yang K, Andl T, Randall Wickett R, Zhang Y. Perspective of targeting cancer-associated fibroblasts in melanoma. *J Cancer*. 2015;6(8):717-26.
254. Arozarena I, Wellbrock C. Phenotype plasticity as enabler of melanoma progression and therapy resistance. *Nat Rev Cancer*. 2019;19(7):377-91.
255. Wu X, Tao P, Zhou Q, Li J, Yu Z, Wang X, et al. IL-6 secreted by cancer-associated fibroblasts promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis of gastric cancer via JAK2/STAT3 signaling pathway. *Oncotarget*. 2017;8(13):20741-50.

256. Wang F, Sun W, Zhang J, Fan Y. Cancer-associated fibroblast regulation of tumor neo-angiogenesis as a therapeutic target in cancer (Review). *Oncol Lett.* 2019;3055–65.
257. Dahan M. *Traitements Du Mélanome Avancé Outils Pour La Pratique Rédaction Et Coordination.* 2018;1–16.
258. Clere N, Renault S, Corre I. Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8(August):1–8.
259. Anderberg C, Cunha SI, Zhai Z, Cortez E, Pardali E, Johnson JR, et al. Deficiency for endoglin in tumor vasculature weakens the endothelial barrier to metastatic dissemination. *J Exp Med.* 2013;210(3):563–79.
260. Choi S-H, Nam J-K, Kim J-M, Kim J-Y, Lee Y-J, Lee H-J, et al. Tumour-vasculature development via endothelial-to-mesenchymal transition after radiotherapy controls CD44v6+ cancer cell and macrophage polarization. *Nat Commun.* 2018;9(1):1–18.
261. Franco M, Roswall P, Cortez E, Hanahan D, Pietras K. Pericytes promote endothelial cell survival through induction of autocrine VEGF-A signaling and Bcl-w expression. *Blood.* 2011;118(10):2906–17.
262. Fiori ME, Di Franco S, Villanova L, Bianca P, Stassi G, De Maria R. Cancer-associated fibroblasts as abettors of tumor progression at the crossroads of EMT and therapy resistance. *Mol Cancer.* 2019;18(1):1–16.
263. Block K, Gorin Y. Aiding and abetting roles of NOX oxidases in cellular transformation. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(9):627–37.
264. Harrison IP, Selemidis S. Understanding the biology of reactive oxygen species and their link to cancer: NADPH oxidases as novel pharmacological targets. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2014;41(8):533–42.
265. Moazzen H, Wu Y, Engineer A, Lu X, Aulakh S, Feng Q. NOX2 Is Critical to Endocardial to Mesenchymal Transition and Heart Development. *Oxid Med Cell Longev.* 2020;2020:1–12.
266. Zhen J, Jiao K, Yang K, Wu M, Zhou Q, Yang B, et al. The 14-3-3 η /GSK-3 β / β -catenin complex regulates EndMT induced by 27-hydroxycholesterol in HUVECs and promotes the migration of breast cancer cells. *Cell Biol Toxicol.* 2021;37(4):515–29.
267. Craige SM, Chen K, Pei Y, Li C, Huang X, Chen C, et al. NADPH Oxidase 4 promotes endothelial angiogenesis through endothelial nitric oxide synthase activation. *Circulation.* 2011;124(6):731–40.
268. Murdoch CE, Chaubey S, Zeng L, Yu B, Ivetic A, Walker SJ, et al. Endothelial NADPH oxidase-2 promotes interstitial cardiac fibrosis and diastolic dysfunction through proinflammatory effects and endothelial-mesenchymal transition. *J Am Coll Cardiol.* 2014;63(24):2734–41.
269. Das S, Wikström P, Walum E, Lovicu FJ. A novel NADPH oxidase inhibitor targeting Nox4 in TGF β -induced lens epithelial to mesenchymal transition. *Exp Eye Res.* 2019;185(June):107692.
270. Das SJ, Wishart TFL, Jandeleit-Dahm K, Lovicu FJ. Nox4-mediated ROS production is involved, but not essential for TGF β -induced lens EMT leading to cataract. *Exp Eye Res.* 2020;192:107918.
271. Hiraga R, Kato M, Miyagawa S, Kamata T. Nox4-derived ROS signaling contributes to TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells. *Anticancer Res.* 2013;33(10):4431–8.
272. Yamashiro Y, Ramirez K, Nagayama K, Tomita S, Kubota Y, Yanagisawa H. Partial endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT) contributes to lumen re-organization after carotid artery ligation. *bioRxiv.* 2021;
273. Xu X, Tan X, Tampe B, Sanchez E, Zeisberg M, Zeisberg EM. Snail Is a direct target of hypoxia-inducible

- factor 1 α (HIF1 α) in hypoxia-induced endothelial to mesenchymal transition of human coronary endothelial cells. *J Biol Chem.* 2015;290(27):16553–664.
274. Choi SH, Hong ZY, Nam JK, Lee HJ, Jang J, Yoo RJ, et al. A hypoxia-induced vascular endothelial-to-mesenchymal transition in development of radiation-induced pulmonary fibrosis. *Clin Cancer Res.* 2015;21(16):3716–26.
 275. Erdogan B, Webb DJ. Cancer-associated fibroblasts modulate growth factor signaling and extracellular matrix remodeling to regulate tumor metastasis. *Biochem Soc Trans.* 2017;45(1):229–36.
 276. Shiga K, Hara M, Nagasaki T, Sato T, Takahashi H. Cancer-Associated Fibroblasts : Their Characteristics and Their Roles in Tumor Growth. 2015;2443–58.
 277. Szilagyi JT, Mishin V, Heck DE, Jan YH, Aleksunes LM, Richardson JR, et al. Selective targeting of heme protein in cytochrome P450 and nitric oxide synthase by diphenyleneiodonium. *Toxicol Sci.* 2016;151(1):150–9.
 278. Stuehr DJ, Fasehun OA, Kwon N soo, Gross SS, Gonzalez JA, Levi R, et al. Inhibition of macrophage and endothelial cell nitric oxide synthase by diphenyleneiodonium and its analogs. *FASEB J.* 1991;5:98–103.
 279. Holland P., Sherratt HS. Biochemical Effects of the Hypoglycaemic Compound Diphenyleneiodonium in Rat Liver Mitochondria : inhibition of Adenosine Triphosphate Synthesis. *Biochem Soc.* 1971;108(5):29P-52P.
 280. Reutens AT, Jandeleit-Dahm K, Thomas M, Salim A, De Livera AM, Bach LA, et al. A physician-initiated double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2 study evaluating the efficacy and safety of inhibition of NADPH oxidase with the first-in-class Nox-1/4 inhibitor, GKT137831, in adults with type 1 diabetes and persistently elevated. *Contemp Clin Trials.* 2020;90(November 2018):1551–7144.
 281. Hirano K, Chen WS, Chueng ALW, Dunne AA, Seredenina T, Filippova A, et al. Discovery of GSK2795039, a novel small molecule NADPH oxidase 2 inhibitor. *Antioxidants Redox Signal.* 2015;23(5):358–74.
 282. Gianni D, Taulet N, Zhang H, DerMardirossian C, Kister J, Martinez L, et al. A Novel and Specific NADPH Oxidase-1 (Nox1) Small-Molecule Inhibitor Blocks the Formation of Functional Invadopodia in Human Colon Cancer Cells. *ACS Chem Biol.* 2010;5(10):981–93.
 283. Ribatti D. Tumor refractoriness to anti-VEGF therapy. *Oncotarget.* 2016;7(29):46668–77.
 284. Lu K V., Bergers G. Mechanisms of evasive resistance to anti-VEGF therapy in glioblastoma. *CNS Oncol.* 2013;2(1):49–65.
 285. Yang L V. Tumor microenvironment and metabolism. *Int J Mol Sci.* 2017;18(12):2–7.
 286. Pautu V, Lepeltier E, Mellinger A, Riou J, Debuigne A, Jerome C, et al. PH-responsive lipid nanocapsules: A promising strategy for improved resistant melanoma cell internalization. *Cancers (Basel).* 2021;13(9):1–17.
 287. Pandya AD, Jäger E, Fam SB, Höcherl A, Jäger A, Sincari V, et al. Paclitaxel-loaded biodegradable ROS-sensitive nanoparticles for cancer therapy. *Int J Nanomedicine.* 2019;14:6269–85.
 288. Wan W jun, Qu C xi, Zhou Y juan, Zhang L, Chen M tian, Liu Y, et al. Doxorubicin and siRNA-PD-L1 co-delivery with T7 modified ROS-sensitive nanoparticles for tumor chemioimmunotherapy. *Int J Pharm.* 2019;566(May):731–44.

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS	6
INTRODUCTION	1
1. La cellule endothéliale et l'endothélium	1
1.1. Structure de l'endothélium vasculaire	1
1.2. Fonctions de l'endothélium	2
1.2.1. L'endothélium comme barrière vasculaire.....	2
1.2.2. L'endothélium et le flux sanguin	3
1.2.3. L'endothélium en réponse au stress mécanique	4
1.2.4. L'endothélium en réponse au stress mécanique	6
2. Les cellules endothéliales dans le microenvironnement tumoral	6
2.1. Le microenvironnement tumoral	6
2.2. Le Système vasculaire comme acteur majeur du MET	7
2.3. L'angiogenèse tumorale.....	8
2.3.1. L'hypoxie comme initiateur de l'angiogenèse tumorale	8
2.3.2. Le VEGF comme inducteur de l'angiogenèse tumorale	8
2.3.3. La germination angiogénique	9
2.3.4. Le vaisseau tumoral : un vaisseau à l'endothélium anormal	10
a) La cellule endothéliale tumorale	11
b) Un développement hétérogène	12
3. Le métabolisme cellulaire	14
3.1. Le métabolisme énergétique	14
3.2. Le métabolisme des CE	15
3.2.1. Métabolisme des NECs	16
a) La glycolyse comme apport énergétique principal	16
b) La glycolyse comme support de l'angiogenèse	16
3.2.2. Métabolisme des TECs.....	18
a) Les cellules endothéliales tumorales sont hypoxiques, mais possèdent des mitochondries fonctionnelles.....	18
3.3. Les espèces réactives de l'oxygène et le stress oxydant.....	19
3.3.1. Les mitochondries.....	20
3.4. Les NOXs	21
3.4.1. Structure & Fonctions.....	21
3.4.2. Les NOXs dans les cancers	23
3.4.3. Les NOXs dans les CE.....	25
4. Les NOXs dans le mélanome	27
4.1. Epidémiologie du mélanome	27
4.2. Le mélanome et le stress oxydant	28
4.3. Implication des NOXs dans le mélanome	29
5. La transition endothélio-mésenchymateuse	29
5.1. Mécanismes généraux de l'EndMT et cancers	29
5.2. Revue : l'EndMT, son rôle dans la tumorigénèse, l'évasion métastatique et la résistance aux thérapies	31
5.3. EndMT & EMT : Les CAFs comme agents commun dans la tumorigénèse du mélanome.....	46
6. Conclusion et Objectifs	47
RESULTATS	49
1. Introduction	49
2. Matériels & Méthodes	50
2.1. Culture cellulaire et traitement.....	50
2.2. Test de blessure	50
2.3. Test de prolifération.....	50
2.4. Test de formation de capillaires sur gel	50
2.5. Western blot	51
2.6. Cytométrie en flux	51
2.7. Analyses statistiques.....	52
3. Résultats	52

3.1.	Le traitement au TGF- β 2 active la voie de signalisation canonique Smad2/Smad3 dans un modèle de cellules HUVECs.....	52
3.2.	La combinaison TGF- β 2+IL-1 induit une altération des caractéristiques endothéliales plus importante que le TGF- β 2 seul.....	53
3.3.	Le traitement au TGF- β 2+IL-1 induit une plus grande augmentation des marqueurs protéiques mésenchymateux que le traitement au TGF- β 2 seul.	56
3.4.	Article : NOX1 and NOX2 : Two enzymes that promote endothelial-to-mesenchymal transition induced by melanoma conditioned media	59
DISCUSSION GENERALE		108
1.	Conception d'un modèle <i>in vitro</i> de l'EndMT.....	108
2.	Etude du rôle des ROS produits par les NOX dans l'EndMT	111
3.	Perspectives et conclusions.....	114
BIBLIOGRAPHIE		118
TABLE DES ILLUSTRATIONS		136
TABLE DES TABLEAUX.....		137

Table des illustrations

Figure 1: Structure de la paroi vasculaire	1
Figure 2 : Représentation schématique de l'activité de sécrétion de la cellule endothéliale agissant sur la physiologie vasculaire.	3
Figure 3: Schéma des facteurs agissant sur l'endothélium pour initier une vasoconstriction/vasodilatation.	5
Figure 4 : Schéma de la progression tumorale avec emphase sur les cellules composant le stroma tumoral qui contribuent au développement de la tumeur	7
Figure 5 : Schéma du mécanisme de promotion de l'angiogenèse par le facteur HIF-1 α en situation hypoxique.	9
Figure 6 : Représentation schématique de la formation d'une germination angiogénique.	10
Figure 7: Schéma de la détérioration de la paroi vasculaire en situation tumorale	11
Figure 8 : Schéma des différents processus de synthèse de nouveaux vaisseaux au sein du MET.	13
Figure 10 : Représentation schématique de l'hétérogénéité vasculaire dans la composition de l'endothélium en comparaison avec l'endothélium physiologique	14
Figure 11 : Schéma du métabolisme énergétique physiologique (A) et de l'Effet Warburg (B).	15
Figure 12: Schéma du métabolisme glycolytique des CE en germination.	17
Figure 13 : Schéma de la réorganisation du métabolisme énergétique dans les CE tumorales par rapportes au CE physiologiques.....	18
Figure 14 : Schéma de la production et de la régulation des ROS par la mitochondrie et les NADPH oxydase.	19
Figure 15 : Schéma de la production de ROS au sein de la chaine de transport des électrons dans la mitochondrie	21
Figure 16 : Représentation de la structure des différentes isoformes des NADPH oxydases ainsi que le mécanisme de production des ROS.	22
Figure 17 : Schéma de la fonction des CAFs et des molécules impliquées dans leur influence sur les autres cellules du MET.....	47
Figure 18 : Schéma détaillant les mécanismes conduisant à une génération de ROS dans l'espace extracellulaire tumoral, et l'implication de ceux-ci dans la génération de métastases et dans l'EndMT.....	48
Figure 19 : Le traitement au TGF- β 2 active la voie de signalisation canonique (p)-smad chez les HUVECs.....	52
Figure 20 : La combinaison TGF- β 2+IL-1 induit une diminution de la prolifération des HUVECs, ainsi qu'un ralentissement de leur migration	54
Figure 21 : Le traitement au TGF- β 2+IL-1 induit une diminution de la capacité des HUVECs à former des capilliers sur gel ECM [®]	55
Figure 22 : Le traitement au TGF- β 2+IL-1 induit un changement morphologique important des HUVECs, visible en microscopie.	56
Figure 23 : Le traitement au TGF- β 2+IL-1 induit une plus grande augmentation des marqueurs protéiques mésenchymateux que le traitement au TGF- β 2 seul.	58

Table des tableaux

Tableau I : Inhibiteurs de NOXs 26

Tableau II : Anticorps utilisés en western blot..... 51

RÉSUMÉ

Les cellules endothéliales (CE) sont au carrefour de nombreux phénomènes physiopathologiques. Dans le contexte particulier des cancers elles sont à la fois impliquées dans l'angiogenèse et dans la transition endothélio-mésenchymateuse (EndMT). L'EndMT se définit comme un processus de transition phénotypique depuis un type endothélial vers un type myofibroblastique et dont l'implication dans le développement tumoral a été de plus en plus étudiée cette dernière décennie. Cette transition engendre la production de fibroblastes associés au cancer (CAFs) qui contribuent grandement au développement tumoral et à l'acquisition d'un phénotype invasif notamment en promouvant la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), un autre processus de transition phénotypique. Également, La production excessive d'espèces réactive de l'oxygène (ROS) est un des marqueurs du développement tumoral. Les enzymes de la famille des NADPH oxydase (NOX) sont les plus grands contributeurs à la génération de ROS dans les CE. Les ROS qu'elles génèrent ont déjà été décrit comme jouant un rôle dans l'EndMT dans le cadre d'autres pathologie (comme les fibroses pulmonaire et rénale), mais leur implication dans l'EndMT tumorale est encore mal connue. L'objectif de cette thèse vise à déterminer l'implication du stress oxydant généré par les NOX dans l'EndMT tumoral en développant un modèle *in vitro* sur des CE HUVECs traitées avec un milieu conditionné (CM) par des cellules de mélanome humain (SK-MEL 28). Nos résultats montrent que l'inhibition de NOX1 & NOX2 conduit à une réversion de l'EndMT induite par le CM. Ces résultats confirment le rôle fondamental des NOXs dans l'initiation de l'EndMT tumorale.

Mots-clés : Cellules endothéliales ; Transition endothélio-mésenchymateuse ; Stress oxydant ; NOX ; Mélanome

ABSTRACT

Endothelial cells (EC) are at the crossroads of many physiopathological phenomena. In the specific context of cancers, they are both involved in angiogenesis and in the endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT). EndMT is defined as a process of phenotypic transition from an endothelial phenotype to a myofibroblastic one and whose implication in tumor development has been increasingly studied over the last decade. This transition results in the production of cancer-associated fibroblasts (CAFs) which greatly contribute to tumor development and the acquisition of an invasive phenotype, in particular by promoting the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), another phenotype transition process. Moreover, the excessive production of reactive oxygen species (ROS) is a hallmark of tumor development. Enzymes of the NADPH oxidase (NOX) family are the greatest contributors to ROS generation in EC. The ROS they generate have already been described as playing a role in EndMT in other pathologies (such as pulmonary and renal fibrosis), but their involvement in tumor EndMT is not fully understood. The objective of this thesis aims to determine the involvement of oxidative stress generated by NOXs in tumor EndMT by developing an *in vitro* model with HUVECs EC treated with a conditioned medium harvested from cultured human melanoma cells (SK-MEL 28). Our results show that inhibition of NOX1 & NOX2 leads to CM-induced reversion of EndMT. These results confirm the fundamental role of NOXs in the initiation of tumor EndMT.

Keywords : Endothelial cells ; Endothelial-to-mesenchymal transition ; Oxidative stress ; NOXs ; Melanoma

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné(e) Valentin PLATEL.....
déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une
partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet,
constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.
En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées
pour écrire ce rapport ou mémoire.

Signé par l'étudiant(e) le **03 / 10 / 2021**



**Cet engagement de non plagiat doit être signé et joint
à tous les rapports, dossiers, mémoires.**

Présidence de l'université
40 rue de rennes - BP 73532
49035 Angers cedex

Tél. 02 41 96 23 23 | Fax 02 41 96 23 00



Titre : Stress oxydant et transition endothélio-mésenchymateuse : Optimisation d'un modèle d'étude *in vitro* et impact de NOX1 & NOX 2 sur la transition induite au cours du mélanome.....

Mots clés : Cellules endothéliales ; Transition endothélio-mésenchymateuse ; Stress oxydant ; NOXs ; Mélanome

Résumé : Les cellules endothéliales (CE) sont au carrefour de nombreux phénomènes physiopathologiques. Dans le contexte particulier des cancers elles sont à la fois impliquées dans l'angiogenèse et dans la transition endothélio-mésenchymateuse (EndMT). L'EndMT se définit comme un processus de transition phénotypique depuis un type endothélial vers un type myofibroblastique et dont l'implication dans le développement tumoral a été de plus en plus étudiée cette dernière décennie. Cette transition engendre la production de fibroblastes associés au cancer (CAFs) qui contribuent grandement au développement tumoral et à l'acquisition d'un phénotype invasif notamment en promouvant la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), un autre processus de transition phénotypique. Également, La production excessive d'espèces réactive de l'oxygène (ROS) est un des marqueurs du développement tumoral.

Les enzymes de la famille des NADPH oxydase (NOX) sont les plus grands contributeurs à la génération de ROS dans les CE. Les ROS qu'elles génèrent ont déjà été décrit comme jouant un rôle dans l'EndMT dans le cadre d'autres pathologie (comme les fibroses pulmonaire et rénale), mais leur implication dans l'EndMT tumorale est encore mal connue. L'objectif de cette thèse vise à déterminer l'implication du stress oxydant généré par les NOX dans l'EndMT tumoral en développant un modèle *in vitro* sur des CE HUVECs traitées avec un milieu conditionné (CM) par des cellules de mélanome humain (SK-MEL 28). Nos résultats montrent que l'inhibition de NOX1 & NOX2 conduit à une réversion de l'EndMT induite par le CM. Ces résultats confirment le rôle fondamental des NOXs dans l'initiation de l'EndMT tumorale.

Title : Oxidative stress and endothelial-to-mesenchymal transition : Optimization of an *in vitro* study model and impact of NOX1 & NOX 2 on the transition induced during melanoma.....

Keywords: Endothelial cells; Endothelial-to-mesenchymal transition; Oxidative stress; NOXs; Melanoma

Abstract: Endothelial cells (EC) are at the crossroads of many physiopathological phenomena. In the specific context of cancers, they are both involved in angiogenesis and in the endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT). EndMT is defined as a process of phenotypic transition from an endothelial phenotype to a myofibroblastic one and whose implication in tumor development has been increasingly studied over the last decade. This transition results in the production of cancer-associated fibroblasts (CAFs) which greatly contribute to tumor development and the acquisition of an invasive phenotype, in particular by promoting the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), another phenotypic transition process.

Moreover, the excessive production of reactive oxygen species (ROS) is a hallmark of tumor development. Enzymes of the NADPH oxidase (NOX) family are the greatest contributors to ROS generation in EC. The ROS they generate have already been described as playing a role in EndMT in other pathologies (such as pulmonary and renal fibrosis), but their involvement in tumor EndMT is not fully understood. The objective of this thesis aims to determine the involvement of oxidative stress generated by NOXs in tumor EndMT by developing an *in vitro* model with HUVECs EC treated with a conditioned medium harvested from cultured human melanoma cells (SK-MEL 28). Our results show that inhibition of NOX1 & NOX2 leads to CM-induced reversion of EndMT. These results confirm the fundamental role of NOXs in the initiation of tumor EndMT..