



HAL
open science

Découverte d'une sénescence associée à un phénotype sécrétoire déclenchée par les défauts mécaniques de la cellule endothéliale lors de la perte de CCM2 dans un modèle de cavernome cérébral

Daphné Vannier

► **To cite this version:**

Daphné Vannier. Découverte d'une sénescence associée à un phénotype sécrétoire déclenchée par les défauts mécaniques de la cellule endothéliale lors de la perte de CCM2 dans un modèle de cavernome cérébral. Biologie cellulaire. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2020. Français. NNT : 2020GRALV012 . tel-03881710

HAL Id: tel-03881710

<https://theses.hal.science/tel-03881710>

Submitted on 2 Dec 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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Biologie cellulaire**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par **Daphné VANNIER**

Thèse dirigée par **Eva FAUROBERT, CRHC CNRS**,
préparée au sein de l'**Institut pour l'Avancée des Biosciences, IAB Grenoble**
dans l'**École Doctorale Chimie et Science du Vivant (EDCSV)**

Découverte d'une sénescence associée à un phénotype sécrétoire déclenchée par les défauts mécaniques de la cellule endothéliale lors de la perte de CCM2 dans un modèle de cavernome cérébral

Thèse soutenue publiquement le **6 octobre 2020**,
devant le jury composé de :

Dr Julie, GAVARD

Directrice de recherche au Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes Angers (CRCINA), Rapporteur

Dr Bill KEYES

Directeur de recherche à l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Rapporteur

Dr Cédric GAGGIOLI

Directeur de recherche à l'Institut de Recherche sur le Cancer et le Vieillessement de Nice (IRCAN), Membre

Pr Salim SEYFRIED

Professeur à l'Université de Potsdam, Institute of Biochemistry and Biology, Membre

Dr Béatrice EYMIN

Directrice de recherche à l'institut pour l'Avancée des Biosciences (IAB), Présidente

Dr Eva FAUROBERT

Chargée de recherche à l'Institut pour l'Avancée des Biosciences (IAB), Superviseure



Remerciements

Je souhaite adresser mes remerciements à l'ensemble des membres du jury.

*Je remercie le Dr. **Julie Gavard** et le Dr. **Bill Keyes** d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse.*

*Je remercie le Dr. **Béatrice Eymine**, le Dr. **Cédric Gaggioli** et le Pr. **Salim Seyfried**, pour avoir accepté d'être examinateurs lors de ma soutenance.*

*Je tiens à remercier le Dr. **Pierre Hainaut**, Directeur de l'Institut pour l'Avancée des Biosciences, qui m'a permis d'effectuer ma thèse au sein de son établissement.*

*Je remercie également les membres de mon comité de thèse : le Dr. **Julie Caramel**, le Dr. **Odile Fihol-Cochet**, le Dr. **Béatrice Eymine** et le Dr. **Christophe Guilluy**. Leurs conseils m'ont amené à de nombreux points de réflexion particulièrement intéressants pour l'avancement de mon travail de thèse.*

*Je remercie le Dr. **Eva Faurobert**, ma directrice de thèse. Ses conseils précieux, son discernement et sa bienveillance m'ont éclairé tout au long de ma formation. Sa vision scientifique a été d'une grande inspiration pour moi durant ces quatre années partagées. J'ai une profonde admiration pour son dynamisme, sa force et sa passion pour les sciences de la vie. Je te remercie sincèrement pour ton engagement, ton écoute, ton soutien, ta disponibilité, et pour toutes les discussions enrichissantes que j'ai eu la joie de partager avec toi.*

*Je remercie le Dr. **Corinne Albigès-Rizo** de m'avoir accordé sa confiance et de m'avoir permis d'effectuer ma thèse au sein de son équipe. Merci de m'avoir procuré tous les moyens et outils nécessaires à l'élaboration de cette thèse que j'ai pu réaliser dans d'excellentes conditions. Je te remercie pour ton soutien rassurant et pour tous tes conseils qui ont contribué à alimenter ma réflexion.*

*Je remercie **Florent Chuffart** de la plateforme EPIMED, à l'Institut pour l'Avancée des Biosciences, qui a énormément contribué à l'analyse RNA-seq qui est au cœur de ces travaux de thèse.*

*Je remercie également le Pr. **Hans Van Hoosterwick** et son étudiante de thèse **Apeksha Shapeti** qui a contribué à ces travaux de thèse.*

*Je remercie l'ensemble des chercheurs de l'équipe : le Dr. **Emmanuelle Planus**, le Dr. **Olivier Destaing**, le Dr. **Cyril Boyault** et le Dr. **Anne-Pascale Bouin**. Je vous remercie pour votre disponibilité, votre écoute et pour votre soutien. L'ensemble de vos conseils ont contribué à façonner ma vision du monde de la biologie, vous avez été une source d'inspiration pour moi et je vous en suis très reconnaissante.*

*Je remercie **Sandra Manet**, **Christiane Oddou** et **Ingrid Bourrin** qui m'ont formé et qui m'ont transmis leurs techniques au laboratoire. Merci pour votre grande disponibilité, votre gentillesse et toutes les petites attentions que vous portez à l'ensemble de l'équipe quotidiennement.*

*Je remercie mes collègues doctorants, **Amaris Guévara**, **Mathilde Proponnet** et **Paul Rivier** pour leur soutien, leur présence, leur écoute et leurs délicates attentions.*

*Merci à **Jacques Mazzega**, **Mylène Pezet** et **Alexeï Grinchine** pour l'ensemble de vos conseils sur la plateforme de microscopie et de cytométrie en flux.*

*Merci à **Michail Gidopoulos** et **Alexandre Babin** pour votre support, votre disponibilité et votre bienveillance.*

Merci à l'ensemble de mes amis. Merci à ma famille, à mes frères et mes parents qui ont toujours cru en moi.

CCM (Cerebral Cavernous Malformations) lesions are formed by stacks of tortuous, dilated and hemorrhagic capillaries located in the brain. These brain capillaries are devoid of mural cells and are formed of a monolayer of weakly joined endothelial cells (EC). The loss of function mutation in one of the 3 ccm genes (ccm1, ccm2 and ccm3) is sufficient to induce the formation of CCM lesions in humans.

In the different ccm mutant models, the ECs present defective tensional homeostasis characterized by a lack of coordination between the cell-matrix and cell-cell forces. This results in the formation of contractile actomyosin fibers anchored on numerous focal adhesions containing $\beta 1$ integrin and in the loss of VE-cadherin-dependent intercellular junctions. The association of CCM1-3 proteins forms a molecular scaffold that controls downstream of RhoA the activity of ROCK1 and ROCK2 on the organization of the acto-myosin cytoskeleton. The CCM complex recruits ROCK2 at the VE-cadherin dependent junctions to promote a network of cortical actin stabilizing these intercellular junctions while at the same time, it inhibits the activity of ROCK1 to reduce the formation of ventral stress fibers and thus limit the adhesion of the EC to the extracellular matrix. It is known that the microenvironment in the lesion is reshaped in particular by immune cells that infiltrate it to trigger a chronic inflammatory response and promote the expansion of the lesion. It is also known that mutant ECs secrete metalloproteases and cytokines, that they overproduce ROS and that they undergo an endothelio-mesenchymal transition (endoMT). Finally, CCM lesions are mosaics of mutant and wild-type ECs recruited into the lesion over time. However, whether a link exists between all these phenomena conducive to the progression of the CCM lesion is not known and remains to be elucidated.

My work during this PhD allowed me to propose a model that unifies all these cellular behaviors. Indeed, I have highlighted a premature aging of endothelial cells depleted in CCM2. I have shown that this senescence is associated with a secretory behavior SASP (Senescence Associated with a Secretory Phenotype) which gives the EC the ability to actively reshape its environment, in particular by degrading it locally, to invade it and attract by chemo-attraction wild EC and immune cells. The second major contribution of my work has been to show that this SASP is due to the dysregulation of the mechanics of the EC. Indeed, I have shown that the increase in intracellular contractility associated with the loss of balance between the activities of ROCK1 and ROCK2 is responsible for this SASP. Inhibiting myosin II or depleting ROCK1 or ROCK2 restores the expression of half of the genes dysregulated by the loss of CCM2, blocks the appearance of senescence markers as well as the invasive and chemo-attractive capacities of CCM2-depleted ECs. These results open the way to the identification of new therapeutic targets responsible for the appearance and expansion of CCM lesions.

Les lésions CCM (Cerebral Cavernous Malformations) sont formées d'un empilement de vaisseaux capillaires tortueux, dilatés et hémorragiques situés dans le cerveau. Ces capillaires cérébraux sont dépourvus de cellules murales et sont formés d'une monocouche de cellules endothéliales (CE) peu jointives. La mutation perte de fonction de l'un des 3 gènes *ccm* (*ccm1*, *ccm2* et *ccm3*) est suffisante pour induire la formation de lésions CCM chez l'Homme.

Dans les différents modèles mutants *ccm*, les CE présentent une homéostasie tensionnelle défectueuse caractérisée par un défaut de coordination entre les forces d'adhésions cellule-matrice et cellule-cellule. Ceci se traduit par la formation de fibres contractiles d'actomyosine ancrées sur de nombreuses adhérences focales à intégrine $\beta 1$ et par la perte des jonctions intercellulaires dépendantes de VE-cadhérine. L'association des protéines CCM1-3 forme une plateforme moléculaire qui contrôle, en aval de RhoA, l'activité des kinases ROCK1 et ROCK2 sur l'organisation du cytosquelette d'actomyosine. Le complexe CCM recrute ROCK2 aux jonctions dépendantes de VE-cadhérine pour promouvoir un réseau d'actine cortical stabilisateur de ces jonctions intercellulaires alors que dans le même temps, il inhibe l'activité de ROCK1 pour réduire la formation de fibres de stress ventrales et ainsi limiter l'adhésion de la CE à la matrice extracellulaire. Il est connu que le microenvironnement de la lésion est remodelé notamment par des cellules immunitaires qui s'infiltrèrent pour déclencher une réponse inflammatoire chronique et favoriser l'expansion de la lésion. Il est également connu que les CE mutantes sécrètent des métalloprotéases et des cytokines, qu'elles surproduisent des ROS et qu'elles subissent une transition endothélio-mésenchymateuse (endoMT). Enfin, les lésions CCM sont des mosaïques de CE mutantes et sauvages qui sont recrutées au cours du temps dans la lésion. Néanmoins, le lien qui existe entre tous ces phénomènes favorables à la progression de la lésion CCM est encore mal compris et reste à élucider.

Les travaux que j'ai effectués au cours de cette thèse m'ont permis de proposer un modèle qui unifie l'ensemble de ces comportements cellulaires. En effet, j'ai mis en lumière le vieillissement prématuré des cellules endothéliales déplétées en CCM2. J'ai montré que cette sénescence est associée à un comportement sécrétoire SASP (Senescence Associated with a Secretory Phenotype) qui confère à la CE la capacité de remodeler activement son environnement notamment en le dégradant de manière localisée, de l'envahir et d'attirer par chimio-attraction des CE sauvages et des cellules immunitaires. Le second apport majeur de mon travail a été de montrer que cette SASP est due aux dérèglements dans la mécanique de la CE. En effet, j'ai montré que l'augmentation de la contractilité intracellulaire associée à la perte de balance entre les activités de ROCK1 et ROCK2 est responsable de cette SASP. L'inhibition de la myosine II ou la déplétion préférentielle de ROCK1 ou de ROCK2, restaure l'expression de la moitié des gènes dérégulés par la perte de CCM2, bloque l'apparition des marqueurs de sénescence ainsi que les capacités invasives et chimio-attractantes des CE déplétées pour CCM2. Ces résultats ouvrent la voie vers l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques pour bloquer les mécanismes à l'origine de l'apparition et de l'expansion des lésions CCM.

Abréviations

ADAM	A Disintegrin And Metalloproteinase	CPI-17	Protein kinase C-potentiated phosphatase inhibitor of 17 kDa
ADAMTS	A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin motifs	CRIK	Citron Rho Interacting Kinase
ADN	Acide désoxyribonucléique	CSF	Colony Stimulating Factor
ADP	Adénosine diphosphate	CTGF	Connective Tissue Growth Factor
AF	adhésion focale	CXCL	C-X-C motif Chemokine Ligand
AJ	Adherens junction	CYR61	Cystein-rich angiogenic protein 61
ALK1	activin receptor-like kinase 1	DDR	DNA Damage Response
ANG	Angiopoietin	DLL4	Delta-Like Ligand 4
AP-1	Activator-protein 1	DOC1	Delated in Oral Cancer 1
ARN	Acide ribonucléique	EC	Endothelial Cell
Arp2/3	Actin related protein 2/3	EEL	External Elastic Lamina
ATP	Adénosine triphosphate	EHT	Endothelial-to-Hematopoietic Transition
bFGF	basic Fibroblast growth factor	EMT	Epithelial-to-Mesenchymal Transition
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique	EndoMT	Endothelial-to-Mesenchymal Transition
BM	Basal Membrane	eNOS	endothelial NOS
BMP	Bone Morphogenetic Protein	EPAS	Endothelial PAS domain protein
CAF	Cancer-Associated Fibroblast	EPC	Endothelial Progenitor Cell
CCL	C-C motif chemokine Ligand	EPH	Ephrine
CCM	Cerebral Cavernous Malformation	EPLN	Epithelial Protein Lost in Neoplasm
CDC25C	Cell Division Cycle 25C	EPS8	Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8-like protein
CDC42	Cell Division Control protein 42	ERM	Ezrin-Radixin-Moesin
CDK	Cyclin-Dependant Kinase	FAJ	Focal Adherent Junction
CDKI	Cyclin-Dependant Kinase Inhibitor	FAK	Focal Adhesion Kinase
CE	Cellule Endothéliale	FGF	Fibroblast Growth Factor
CEBPB	CCAAT Enhancer Binding Protein Beta	FN	Fibronectine
CHK2	Checkpoint Kinase 2	GAG	Glycosaminoglycanes
CNS	Central Nervous System		

GAP	GTPase-Activating Protein	KLF	Krüppel-Like Factor
GDI	GDP Dissociation Inhibitor	KO	Knock-Out
GDP	Guanine Diphosphate	KRIT-1	Krev interaction Trapped 1 protein
GEF	Guanosine nucleotide Exchange Factor	LAD	Lamine Associated Domain
GJ	Gap Junction	LAJ	Linear Adherent Junction
GM-CSF	Granula-cycle-Macrophage Colony Stimulating Factor	LEF	Lymphoid Enhancer-binding Factor
GRO-A	alias CXCL1	LIMK	LIM domain Kinase
GTP	Guanine Triphosphate	LINC	Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton complex
H2AX	H2A variant histone	LOX	Lysyl Oxydase
HAT	Histone Acétyltransférase	LPS	Lipopolysaccharide
HDGF	Hepato-Derived Growth Factor	MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
HDMEC	Human Dermal Microvascular Endothelial Cell	MCP-1	alias CCL2
Hey	Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif	MDC1	Mediator of DNA Damage Checkpoint 1
HIF	Hypoxia-Inducible Factor	MDCK II	Madin Darby kidney epithelial cells
HMGA	High Mobility Group protein HMGI-C	MDGI	Mammary-Derived Growth Inhibitor
HSC	Hematopoietic Stem Cell	MEC	Matrice Extracellulaire
HSPC	Hematopoietic Stem and Progenitor Cell	MEF2	Myocyte-specific Enhancer Factor 2A
HSPG	Héparane Sulfate Protéoglycane	MLC	Myosin Light Chain
HUVEC	Human Umbilical Vascular Endothelial Cell	MLCP	Myosin Light Chain Phosphatase
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1	MMP	Métalloprotéase
ICAP-1	Integrin beta-1-binding protein 1	mTOR	Mechanistic Target Of Rapamycin Kinase
Id1	Inhibitor of DNA binding 1	NES	Nuclear Export Signal
IEL	Internal Elastic Lamina	NF1	Neurofibromin 1
IL	Interleukine	NK	Natural Killer
ILK	Integrin-Linked Kinase	NLS	Nuclear Localisation Sequence
INM	Inner Nuclear Membrane	NO	Nitric Oxyde
iPs	Induced Pluripotent Stem cells	NOS	Nitric Oxyde Synthase
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique	Nrf2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
JAM	Junctional Adhesion Molecule	NRP	Neuropilin
KD	Knock-Down	NVU	Neurovascular Unit

ONM	Outer Nuclear Membrane	SAPD	Senescence-Associated with Protein Degradation
Pa	Pascal	SASP	Senescence-Associated with Secretory Phenotype
PAI	Plasminogen Activator Inhibitor	Sema	Sémaphorine
PC	Péricyte	SGL	Sulfate Glycolipide
PDCD10	Programmed cell death 10	SHARPIN	SHANK-associated RH domain interacting protein
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor	SMC	Smooth Muscle Cell
PECAM	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule	SMS	Senescence-Messaging Secretome
PG	Protéoglycane	SMURF-1	Smad Ubiquitin Regulatory Factor 1
PH	Plekstrin Homology domain	SPARC	Secreted Protein, Acidic, cysteine-rich
PI3K	Phosphoinositide-3-kinase	STRIPAK	Striatin-interacting Phosphatase And Kinase complex
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate	SUN	Sad/UNC-84
PKC	Protein Kinase C	TAM	Tumor-Associated Macrophage
PKN	Protein Kinase N	TAZ	Transcriptional co-activator with PDZ-binding motif
Plk-1	Polo-Like Kinase 1	TEAD	Transcriptional Enhancer factor TEF
PML	Promyelocytic leukemia protein	TERT	Telomerase Reverse Transcriptase
PTB	Phospho-Tyrosine Binding	TES	Testine
PTEN	Phosphatase And Tensin Homolog	TGF	Transforming Growth Factor
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxic substrate 1	TIMPS	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase
RBD	Rho Binding Domain	TJ	Tight Junction
RCPG	Récepteur Couplé aux Protéines G	TLR4	Toll-Like Receptor 4
RGD	Arg-Gly-Asp containing peptide	TNF	Tumor Necrosis Factor
RhoA	Ras homolog gene family	TRPV	Transient Receptor Potential Channel
RIPOR1	Rho family interacting cell polarization	UNC5B	Unc-5 Netrin Receptor B
ROBO	Roundabout Guidance Receptor	uPA	Urokinase -type plasminogen activator
ROCK	Rho-associated protein kinase	uPAR	Urokinase receptor
ROS	Reactive Oxygen Species	VASP	Vasodilatator-stimulated phosphoprotein
RTK	Récepteur tyrosine kinase	VCAM-1	Vascular Cell Adhesion protein 1
RTKN	Rhotekin	VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
S1P	Sphingosine-1-phosphate		
SA-β-gal	Senescence-Associated β -Galactosidase		
SAHF	Senescence-Associated Heterochromatin Foci		

VEGFR Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

VE-PTP Vascular Endothelial cell-specific
Phosphotyrosine Phosphatase

VHL Von Hippel-Lindau Tumor Suppressor

VSMC Vascular Smooth Muscle Cell

WASP Wiskott-Aldrich Syndrome Protein

WT Wild-Type

YAP Yes-Associated Protein

ZO Zonula Occludens

Table des figures

Figure 1 : Origine et comportements cellulaires au cours de la vasculogénèse.....	20
Figure 2 : L'angiogénèse par intussusception.....	21
Figure 3 : Les principales étapes de l'angiogénèse par bourgeonnement.....	22
Figure 4 : Dialogue des voies VEGF et Delta/Notch pour la sélection de la cellule de front.....	23
Figure 5: Morphologie des vaisseaux tumoraux.....	26
Figure 6 : Anatomie et composition histologique des vaisseaux sanguins.....	27
Figure 7 : Spécifications des endothéliums en fonction des organes irrigués.....	29
Figure 8 : La transition endothelio-hématopoïétique (EHT).....	30
Figure 9 : La transition endothelio-mésenchymateuse.....	30
Figure 10 : Le dialogue entre la cellule et la matrice extracellulaire (MEC).....	32
Figure 11 : Structure et assemblage de la matrice extracellulaire (MEC).....	33
Figure 12 : Rigidité des tissus du corps.....	35
Figure 13 : Le remodelage de la MEC par fibrillogénèse.....	36
Figure 14 : Les différentes protéases impliquées dans le remodelage protéolytique de la MEC.....	38
Figure 15 : Les effets de la MEC sur les comportements cellulaires.....	40
Figure 16 : Les péricytes.....	41
Figure 17 : La barrière hémato-encéphalique (BHE).....	42
Figure 18 : Les forces hémodynamiques.....	43
Figure 19 : Les forces de cisaillement sur la cellule endothéliale.....	44
Figure 20 : Les mécanorécepteurs à la surface cellulaire.....	46
Figure 21 : Les intégrines.....	47
Figure 22 : Les intégrines exprimées et activées à la surface endothéliale.....	49
Figure 23 : Maturation des structures d'adhésions focales.....	50
Figure 24 : Les différentes protéines et complexes jonctionnels endothéliaux.....	51
Figure 25 : Impact des forces intracellulaires sur la formation des jonctions VE-cadhérines.....	53
Figure 26 : Processus de nucléation et assemblage des filaments d'actine.....	56
Figure 27 : Localisation subcellulaire des structures d'actine.....	57

Figure 28 : Assemblage et contraction des fibres de stress d'actomyosine.....	58
Figure 29 : Les différents types de fibres de stress.....	59
Figure 30 : Régulation des petites GTPases.....	60
Figure 31 : Structure et activation des kinases ROCK1 et ROCK2.....	61
Figure 32 : Les effecteurs des kinases ROCKs pour la régulation du cytosquelette d'actine.....	62
Figure 33 : Impact de la contractilité intracellulaire sur la régulation du transport nucléaire.....	64
Figure 34 : Les facteurs de transcription mécanosensibles dans l'homéostasie endothéliale.....	65
Figure 35 : Régulation des facteurs mécanosensibles en fonction du flux.....	67
Figure 36 : Description des lésions CCM.....	68
Figure 37 : Les différents modèles CCM.....	71
Figure 38 : Organisation des domaines des protéines CCM et partenaires associés.....	73
Figure 39 : Le complexe CCM dans l'homéostasie endothéliale.....	75
Figure 40 : Les étapes de maturation de la lésion CCM.....	79
Figure 41 : Régulation du cycle cellulaire par les complexes Cycline/CDK.....	80
Figure 42 : Rôle des CDKI pour la régulation du cycle cellulaire.....	81
Figure 43 : Les foci d'hétérochromatine observés dans les cellules sénescents (SAHFs).....	82
Figure 44 : Rôle de la lamine B sur la formation des SAHFs au cours de la sénescence.....	83
Figure 45 : Les voies de signalisation déclenchées par IOS (Induced oncogenic senescence).....	86
Figure 46 : Les stress inducteurs, les caractéristiques de la cellule sénescence et les facteurs SASP.....	87
Figure 47 : Rôles des cellules sénescents dans le vieillissement tissulaire et les dysfonctions liées à l'âge.....	88
Figure 48 : Rôles du SASP dans la progression tumorale.....	90
Figure 49 : Les étapes pour l'établissement de l'état sénescence.....	92
Figure 50 : Plusieurs cinétiques pour établir les diverses propriétés associées à la sénescence.....	93
Figure 51 : La reprogrammation vers un état progéniteur associée à la sénescence.....	94
Figure 52 : Un SASP mécanosensible associé à de nouvelles fonctions cellulaires lors de la perte de CCM2 dans les CEs.	148
Figure 53 : Prédiction des sites de phosphorylation des protéines KLF2 et KLF4 par les kinases ROCK1 et ROCK2.....	151

Table des matières

<i>Préface</i>	18
I. Introduction	19
Chapitre I Le système vasculaire	20
1. Mise en place du réseau vasculaire	20
1.1. La vasculogénèse	20
1.2. L'angiogénèse	21
1.2.1. L'angiogénèse par intussusception	21
1.2.2. L'angiogénèse par bourgeonnement : un processus multi-étapes	21
1.2.2.1. Comportements cellulaires et voies de signalisation au cours de l'angiogénèse	22
1.2.2.2. Sélection de la cellule de front : La voie Delta/Notch et VEGF	22
1.2.2.3. Extension, guidance et anastomose du bourgeon angiogénique	23
1.2.2.4. Stabilisation et maturation des vaisseaux sanguins	24
1.2.3. L'angiogénèse tumorale	25
1.2.3.1. Le stroma tumoral pro-angiogénique	25
1.2.3.2. Aspect chaotique des vaisseaux tumoraux	25
2. Organisation et spécification du réseau vasculaire	26
2.1. Anatomie et histologie des vaisseaux	26
2.2. Hétérogénéité de l'endothélium	27
2.2.1. Différenciation artérioveineuse de l'endothélium	28
2.2.2. Différenciation des endothéliums en fonction des tissus	28
3. Les transitions identitaires de la cellule endothéliale	29
3.1. La transition endothélio-hématopoïétique (EHT) et les cellules endothéliales progénitrices (EPC)	29
3.2. La transition endothélio-mésenchymateuse (EndoMT)	30
Chapitre II Le microenvironnement de la cellule endothéliale	32
1. La matrice extracellulaire (MEC)	32
1.1. Structures et composantes fibrillaires de la MEC	33
1.2. Composante moléculaire de la MEC	33
1.3. La rigidité de la matrice	34

1.4. Le remodelage de la MEC	35
1.4.1. Le remodelage par fibrillogenèse	35
1.4.2. Le remodelage protéolytique	36
1.5. Impact de la matrice sur les comportements cellulaires	38
1.5.1. Impact des constituants matriciels	38
1.5.2. Impact de la rigidité de la matrice sur l'homéostasie endothéliale	39
2. Composante cellulaire de la niche environnementale.....	40
2.1. Les cellules murales.....	40
2.1.1. Les péricytes	41
2.1.2. Les cellules musculaires lisses vasculaires (VSMCs).....	41
2.2 La Barrière Hémato-encéphalique (BHE) et l'unité neurovasculaire (NVU)	42
3. Les forces hémodynamiques	43
Chapitre III : Rôle de la mécanotransduction sur la fonction endothéliale	46
1. La réception du signal mécanique par la cellule endothéliale	46
1.1. Les intégrines.....	46
1.1.1. Les intégrines dans l'homéostasie endothéliale	48
1.1.2. Rôle des intégrines dans la transduction du signal mécanique : les adhésions focales	49
1.2. Les jonctions inter-endothéliales.....	50
1.2.1. Rôle de la VE-cadhérine dans l'homéostasie endothéliale	51
1.2.2. Rôle de la VE-cadhérine dans la mécanotransduction	52
1.3 Autres mécanorécepteurs	54
1.3.1 Les canaux ioniques	54
1.3.2 Le glycocalyx	54
2. La transmission du signal.....	55
2.1. L'actine	55
2.1.1. Les fibres de stress d'actomyosine	57
2.2. La voie RhoA/ROCK pour la transmission du signal mécanique.....	59
2.2.1. Régulation de l'activité des petites GTPases Rho	59
2.2.2. Les kinases ROCK1 et ROCK2	60
2.2.2.1. Régulation des kinases ROCKs	60
2.2.2.2. Expression tissulaire et localisation subcellulaire des ROCKs.....	61
2.2.2.3. Les Effecteurs des kinases ROCKs	62
3. Les facteurs de transcription mécanosensibles	63

3.1. Régulation mécanique de la dynamique du transport nucléaire	63
3.2. Remaniements chromatinien mécanosensibles.....	64
3.3. Les facteurs de transcription mécanosensibles impliqués dans l'homéostasie endothéliale	64
3.3.1. Les facteurs de transcriptions KLF2 et KLF4	65
3.3.2 Le facteur de transcription Nrf2	65
3.3.3. Le co-facteur de transcription β -caténine.....	66
3.3.4. Les facteurs de transcription YAP/TAZ liés aux pathologies endothéliales	66
Chapitre IV La pathologie CCM (Cerebral Cavernous Malformation).....	68
1. Les angiomes cérébraux	68
1.1. Description, symptômes et traitement.....	68
1.2. Origine sporadique ou héréditaire	69
1.2.1. Origine familiale des lésions CCM.....	69
1.2.2. Hypothèse de Knudson : une mutation bi-allélique pour la genèse des lésions	69
1.3. Les modèles d'étude de la mutation CCM	69
1.3.1. Les modèles murins	70
1.3.2. Le modèle poisson zèbre	70
1.3.3. Modèle in vitro : les HUVECs	71
2. Les complexes CCM : plusieurs complexes pour différentes voies de signalisation	71
2.1. Structure en domaines des protéines CCM	72
2.1.1. La protéine KRIT1.....	72
2.1.2. La protéine CCM2	72
2.1.3. La protéine PDCD10.....	73
2.2 Rôle du complexe CCM dans l'homéostasie fonctionnelle de la cellule endothéliale	73
2.2.1. Stabilisation des jonctions intercellulaires dépendantes de VE-cadhérine.....	74
2.2.2. Régulation des jonctions cellule-matrice.....	74
2.2.3. Régulation de l'homéostasie tensionnelle de la cellule endothéliale	74
2.2.4. Autres voies de signalisation régulées par les protéines CCM et impliquées dans la quiescence endothéliale.....	75
3. Mise en place et mécanismes de maturation des lésions CCM	76
3.1. L'expansion clonale	76
3.2 Le mosaïcisme génotypique : formation de lésions chimères	76
3.3. La transition identitaire et les comportements pro-angiogéniques	77
3.4. Relation des cellules mutantes CCM avec son microenvironnement	77
3.4.1. Le remodelage de la MEC	77

3.4.2. Environnement inflammatoire et recrutement du système immunitaire.....	78
3.4.3. Altération de la sensibilité au flux sanguin	78
Chapitre V La sénescence cellulaire	80
1. Description de la sénescence	80
1.1. Surexpression des inhibiteurs de cyclines pour l'arrêt du cycle cellulaire	80
1.2. Remaniements chromatinien pour la reprogrammation génique.....	81
1.2.1. La formation des SAHFs (Senescence-associated heterochromatin foci).....	82
1.2.2. La diminution de l'expression de la lamine B.....	82
1.3. Activité métabolique des cellules sénescentes.....	83
1.3.1 Augmentation de l'activité β -galactosidase.....	83
1.3.2. Augmentation de la macro-autophagie et SAPD	83
1.3.3. Sénescence associée au phénotype sécrétoire.....	84
2. Rôles de la sénescence	84
2.1. La sénescence pour prévenir les cancers	84
2.1.1. La sénescence répliquative	85
2.1.2. Induction par l'activation d'un oncogène (IOS)	85
2.1.3. Autres inducteurs	86
2.2. Rôles de la sénescence dans le vieillissement cellulaire	87
2.3. Rôles de la sénescence des cellules endothéliales dans les pathologies liées à l'âge	88
2.4. Rôles de la sénescence dans la progression tumorale	89
2.5. Rôles de la sénescence pour la cicatrisation.....	90
2.6. Rôles de la sénescence au cours du développement.....	90
3. La dynamique de la sénescence cellulaire	91
3.1. Sénescence précoce vs. Tardive	91
3.2. Sénescence aigue vs. Chronique.....	92
3.3. Réversibilité de l'arrêt du cycle.....	93
II. Objectifs de thèse.....	95
III. Résultats: Articles.....	97
IV. Discussion & perspectives	143
1. La relation du modèle CCM à la mécanotransduction	144
2. Découverte d'un SASP mécanosensible.....	144
3. Rôle des ROCKs dans l'avènement du SASP.....	146
3.1 Rôle de ROCK2 sur le programme transcriptomique pour l'entrée en sénescence	146
3.2. Rôle de ROCK2 sur la chimio-attraction	146

3.3. Rôle de ROCK1 sur le remodelage protéolytique de la MEC.....	147
3.4. Rôle de ROCK1 sur l'invasion en 3D de la MEC	148
4. Régulation par les ROCKs des voies de signalisation qui déclenchent l'entrée en sénescence lors de la perte de CCM2	149
5. Régulation par les ROCKs des facteurs de transcription mécanosensibles pour l'entrée en sénescence lors de la perte de CCM2	150
V. Références	153
VI. Annexes.....	191

Les cellules endothéliales sont les cellules qui tapissent les vaisseaux sanguins. Elles contrôlent les échanges entre le compartiment sanguin et les tissus. Pour cela, elles forment une monocouche dont la perméabilité est régulée, en fonction des besoins des tissus, par les jonctions interendothéliales, riches en VE-cadhérines. Pour leur survie et pour assurer leur fonctionnement, les cellules endothéliales doivent établir une communication constante avec leur microenvironnement en vue de s'adapter aux contraintes environnementales. D'une part, les cellules sont équipées au niveau basal de nombreux récepteurs qui détectent les signaux provenant de la matrice extracellulaire (MEC) pour l'adaptation à ses propriétés physico-chimiques. D'autre part, les cellules endothéliales sont pourvues au niveau luminal de nombreux récepteurs mécanosensibles pour l'adaptation aux forces générées par le flux sanguin. En réponse à ces forces, un dialogue s'établit entre les jonctions intercellulaires et les jonctions avec la MEC pour assurer l'intégrité de la monocouche.

De nombreuses pathologies cardio-vasculaires sont associées à un défaut d'adaptation des cellules endothéliales à ces signaux environnementaux. Cette thèse a été consacrée à l'étude des mécanismes endothéliaux dérégulés dans une pathologie vasculaire cérébrale, la pathologie CCM (Cerebral Cavernous Malformation). La perte de fonction de trois protéines CCM1-3 est responsable de la forme génétique de cette pathologie. La forme liée à CCM3 est acquise de manière précoce dès l'enfance et les formes liées à CCM1 et 2 plus tardivement en milieu de vie. Cette pathologie est caractérisée par la présence au niveau du système nerveux central de lésions pouvant atteindre quelques centimètres et correspondants à un empilement de capillaires dilatés, malformés et hémorragiques. Ces lésions sont des chimères composées de cellules endothéliales mutantes qui invitent, par chimio-attraction, des cellules endothéliales sauvages à s'incorporer dans les lésions CCM pour promouvoir leur croissance.

Les cellules endothéliales mutées pour les protéines CCM présentent une altération de leur homéostasie tensionnelle consécutive à l'hypercontractilité de leur cytosquelette d'actine. Cette augmentation de la tension intracellulaire conduit à une perte d'étanchéité des jonctions intercellulaires ainsi qu'au remodelage anormal de la MEC. Au-delà de leurs défauts architecturaux, ces cellules perdent leur fonction endothéliale par le biais d'une transition endothélio-mésenchymateuse (endoMT) qui se traduit par l'expression de marqueurs mésenchymateux et par le gain de nombreuses fonctions cellulaires.

A travers ces travaux, j'ai décrit de manière inédite qu'en raison de leurs défauts mécaniques, les cellules déficientes pour la protéine CCM2 entrent dans une sénescence prématurée associée à un phénotype sécrétoire : le SASP (senescence-associated with secretory phenotype). Cette découverte m'a permis de proposer un modèle unifié qui intègre l'ensemble des défauts cellulaires et moléculaires déjà décrits dans la pathologie CCM.

Dans la première partie de ce manuscrit, j'exposerai les processus cellulaires et moléculaires sur lesquels mon travail s'est appuyé, et qui font appel à des connaissances très diverses depuis l'angiogénèse, l'établissement de l'identité endothéliale, en passant par le microenvironnement et la mécanique cellulaire pour finir par le SASP.

I. Introduction

Chapitre I Le système vasculaire

1. Mise en place du réseau vasculaire

Le réseau cardio-vasculaire est le premier organe formé dans l'embryon puisqu'il est nécessaire au transport des cellules sanguines pour l'apport de l'oxygène et des nutriments indispensables pour la survie de l'ensemble des organes. La mécanistique et les comportements cellulaires responsables de la mise en place du réseau vasculaire sont largement décrits dans la littérature.

1.1. La vasculogénèse

Le développement du système vasculaire commence dès la fin de la gastrulation, en parallèle de la formation des somites chez l'embryon. La vasculogénèse permet la formation d'un plexus vasculaire primitif à partir de cellules progénitrices issues du feuillet mésodermique. Les cellules mésodermiques migrent et se différencient en cellules hémangioblastes. Ces hémangioblastes sont les précurseurs communs des cellules hématopoïétiques (précurseurs des cellules sanguines) et des angioblastes (précurseurs des cellules endothéliales) qui forment les premiers îlots sanguins (Figure 1A et 1B). La fusion de l'ensemble de ces îlots permet de former le réseau vasculaire primaire de l'embryon. La plupart des organes en cours de développement contiennent leur propre réserve d'angioblastes pour permettre la néo-vascularisation de leurs tissus (Coultas L et al., 2005 ; Patel-Hett S & d'Amore PA, 2011).

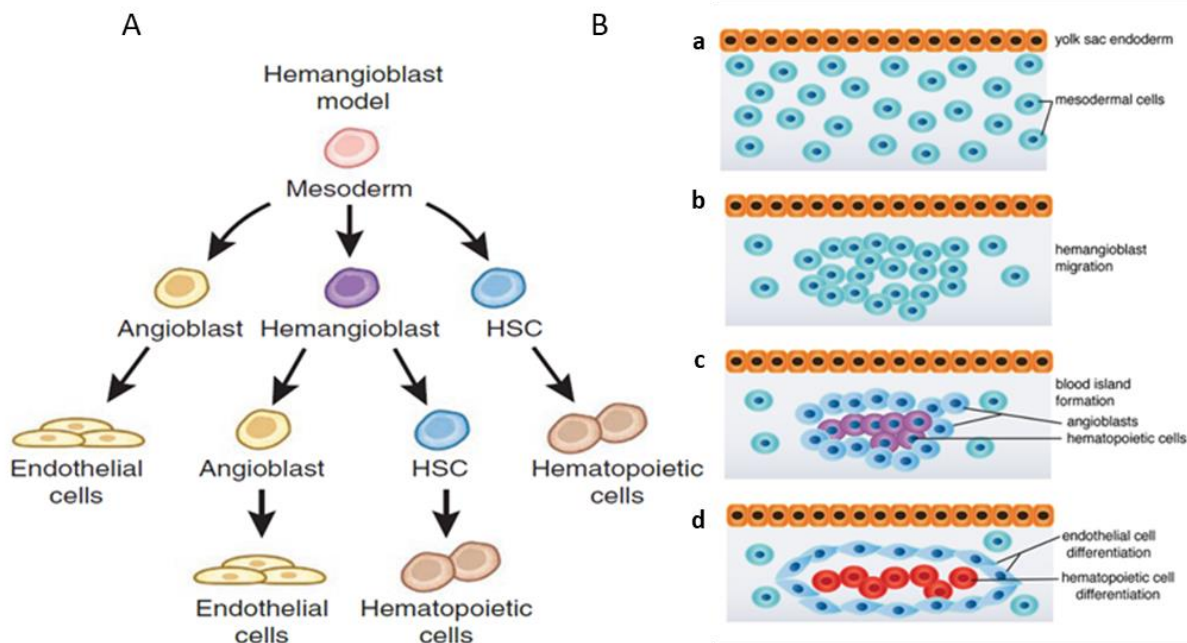


Figure 1 : Origine et comportements cellulaires au cours de la vasculogénèse (A) Origine commune des cellules vasculaires et hématopoïétiques. Les cellules du mésoderme donnent naissance aux angioblastes et aux cellules souches hématopoïétiques (HSC). Les angioblastes sont à l'origine des cellules endothéliales tandis que les cellules souches hématopoïétiques (HSC) sont à l'origine des cellules sanguines. Néanmoins, l'hémangioblaste est défini comme un potentiel précurseur commun aux cellules endothéliales et hématopoïétiques. D'après Bautch VL et al., 2011. (B) La formation des îlots sanguins au cours de la vasculogénèse. Les cellules du mésoderme donnent naissance aux hémangioblastes qui migrent et se rassemblent pour former le futur îlot sanguin (a-b). L'îlot est constitué d'une population de cellules souches

hématopoïétiques entourées par une autre population cellulaire d'angioblastes (c). Les angioblastes se différencient en cellules endothéliales et forment une monocouche endothéliale qui entoure les cellules hématopoïétiques (d). D'après Patel-Hett S et D'Amore PA., 2011.

1.2. L'angiogénèse

Au cours du développement de l'embryon, l'angiogénèse permet d'étendre le plexus vasculaire primaire pour générer un premier réseau vasculaire. Il existe 2 types d'angiogénèse : l'angiogénèse par intussusception et l'angiogénèse par bourgeonnement.

1.2.1. L'angiogénèse par intussusception

L'angiogénèse par intussusception permet d'étendre le réseau vasculaire par la subdivision d'un vaisseau sanguin préexistant. L'invagination des cellules endothéliales dans la lumière permet de former un pilier intraluminal pour une division longitudinale du vaisseau primitif (Figure 2A et 2B).

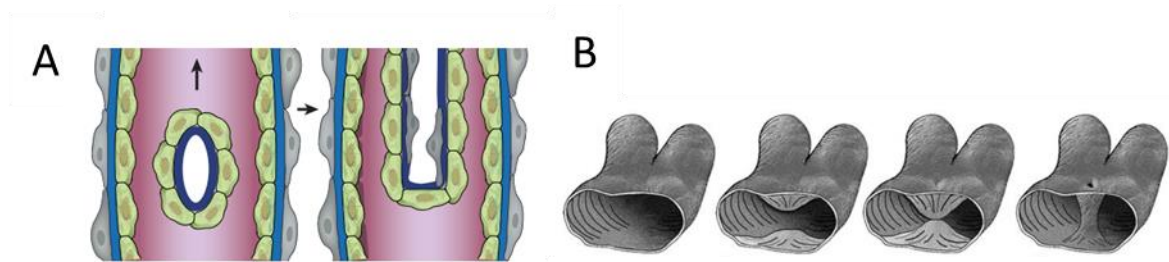


Figure 2 : L'angiogénèse par intussusception. **(A)** Représentation schématique de l'invagination des cellules endothéliales dans la lumière d'un vaisseau sanguin préexistant pour donner naissance à deux vaisseaux. D'après Carmeliet P et Jain RK, 2011. **(B)** Représentation schématique de la formation d'un pilier luminal pendant l'angiogénèse par intussusception D'après Makanya AN et al., 2009.

1.2.2. L'angiogénèse par bourgeonnement : un processus multi-étapes

L'angiogénèse par bourgeonnement est un processus qui se déroule en plusieurs étapes. Dans un premier temps, une forte concentration de facteur de croissance déclenche la formation d'un bourgeon angiogénique à partir d'un vaisseau sanguin préexistant (Figure 3A). La formation de ce bourgeon est initiée par la sélection d'une cellule de front unique (ou cellule leader) qui forme de nombreux filopodes pour "scanner" son environnement et acquérir la capacité de migrer par chimiotactisme (Kurz H et al., 1996 ; Gerhardt H et al., 2003) (Figure 3B). Cette cellule de front garde le contact avec les cellules endothéliales adjacentes qui deviennent les cellules de soutien du bourgeon. Les cellules de soutien sont dotées d'une forte capacité de prolifération. La coordination entre la migration de la cellule de front et la prolifération des cellules de soutien à l'arrière permet l'élongation du bourgeon angiogénique (Figure 3C). La formation et l'expansion du lumen permet de connecter l'espace luminal du bourgeon angiogénique au vaisseau parent préexistant. Enfin, la dernière étape de l'angiogénèse par bourgeonnement est l'anastomose pour connecter le bourgeon à un autre vaisseau et former un réseau (Betz C et al., 2016) (Figure 3D).

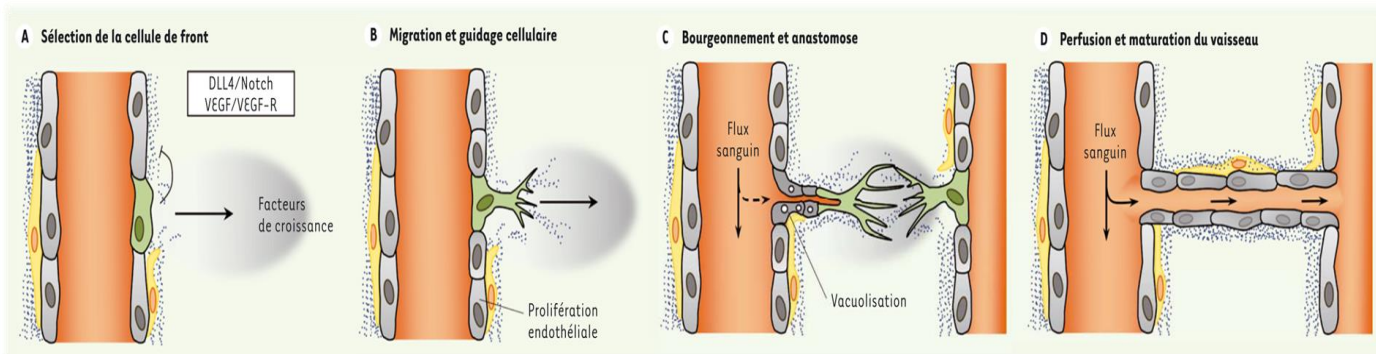


Figure 3 : Les principales étapes de l'angiogenèse par bourgeonnement. Représentation schématique des principales étapes de l'angiogenèse par bourgeonnement : **(A)** Une forte concentration de facteurs pro-angiogéniques permet de sélectionner une cellule de front à l'origine du bourgeon angiogénique ; **(B)** Les cellules de soutien adjacentes à la cellule de front, prolifèrent pour assurer l'élongation du bourgeon angiogénique ; **(C)** La rencontre de deux cellules de front déclenche l'anastomose pour fusionner les deux bourgeons et générer un nouveau vaisseau sanguin **(D)**. D'après Treps L et Gavard J, 2015.

1.2.2.1. Comportements cellulaires et voies de signalisation au cours de l'angiogenèse

L'angiogenèse par bourgeonnement est stimulée par un environnement ischémique qui permet à la cellule endothéliale de surexprimer de nombreux gènes pro-angiogéniques grâce au facteur de transcription HIF (*Hypoxia-Inducible Factor*). Ce facteur est composé de 2 sous-unités HIF- α et HIF- β . Alors qu'en normoxie, la sous unité alpha est dégradée dans la cellule, l'hypoxie favorise son hétéro-dimérisation avec HIF- β (Salceda S et Caro J, 1997 ; Peet D et Linke S, 2006). Le complexe HIF- α /HIF- β lie l'ADN pour stimuler l'expression de facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF (*Vascular endothelial growth factor*), ANG1 (*Angiopoietin-1*), ANG2 et le PDGF (*Platelet-derived growth factor*) (Kelly BD et al., 2003).

L'ensemble de ces facteurs, présents dans le microenvironnement, activent des voies de signalisation dans la cellule endothéliale pour orchestrer et assurer les différentes étapes de l'angiogenèse.

1.2.2.2. Sélection de la cellule de front : La voie Delta/Notch et la voie VEGF

La sélection de la cellule de front nécessite l'activation de la voie de signalisation Delta-Notch et de la voie VEGF (Hellström M et al., 2007). C'est grâce au récepteur VEGFR2 (*Vascular endothelial growth factor Receptor* alias FLK1) qu'une cellule endothéliale est capable de percevoir un gradient de VEGF-A, soluble ou matriciel, assez conséquent pour stimuler la formation d'un bourgeon (Ruhrberg C et al., 2002). Le VEGF-C est un autre facteur clef pour la progression du bourgeon angiogénique qui se lie au récepteur VEGFR3 (Tammela T et al., 2008).

L'activation de la voie VEGF déclenche une surexpression de DLL4 (*Delta-like ligand 4*) dans la cellule de front qui acquiert alors des capacités migratoires et projette de nombreux filopodes. Le ligand DLL4 est sécrété et se lie au récepteur Notch1 des cellules adjacentes. L'activation de la voie Notch, dans les cellules de soutien, diminue l'expression des récepteurs VEGFR2 et VEGFR3, augmente l'expression du récepteur VEGFR1 et désensibilise les cellules au gradient de VEGF-A (Suchting S et al., 2007). En effet, le récepteur VEGFR1 lie le VEGF-A pour le séquestrer et entrer ainsi en compétition avec le récepteur VEGFR2 (Figure 4). Cette inhibition latérale de la cellule de front sur les cellules adjacentes empêche une extension anarchique du bourgeon avec l'émergence de plusieurs cellules leaders. D'autres facteurs moléculaires inclus dans le microenvironnement peuvent favoriser la sélection et la différenciation d'une cellule de front. C'est le cas de la cytokine inflammatoire TNF- α

(*Tumor necrosis factor*) qui inhibe l'expression de DLL4 pour favoriser la détermination d'une cellule de front (Sainson RCA et al., 2008). De la même manière, l'interleukine-8 (IL-8) et la sphingosine-1-phosphate (S1P) déclenche une morphologie de type cellule de front avec la formation de nombreux lamellipodes (Lai Y et al, 2011 ; De Smet F et al., 2009). En plus de leur comportement cellulaire et de leur rôle dans la croissance du bourgeon angiogénique, la cellule de front et la cellule de soutien peuvent se distinguer par un ensemble de gènes et marqueurs exprimés spécifiquement à leur surface (Figure 4).

Néanmoins, la détermination de la cellule de front est réversible au cours de l'angiogénèse, des cellules de soutien peuvent devenir leader et inversement (Jakobsson L et al., 2010). Généralement, les cellules qui sont assez éloignées de la cellule de front sont rendues insensibles à l'inhibition latérale dépendant de l'activation de la voie Notch. Ainsi une cellule de soutien peut prendre la place de la cellule leader (Bentley K et al., 2008). Cette réversion peut être dépendante de la présence de certains facteurs de croissance dans le microenvironnement. Par exemple, le VEGF-C se lie au récepteur VEGFR3 pour activer la voie Notch d'une cellule de front et induire sa conversion en cellule de soutien (Tammela T et al., 2011)

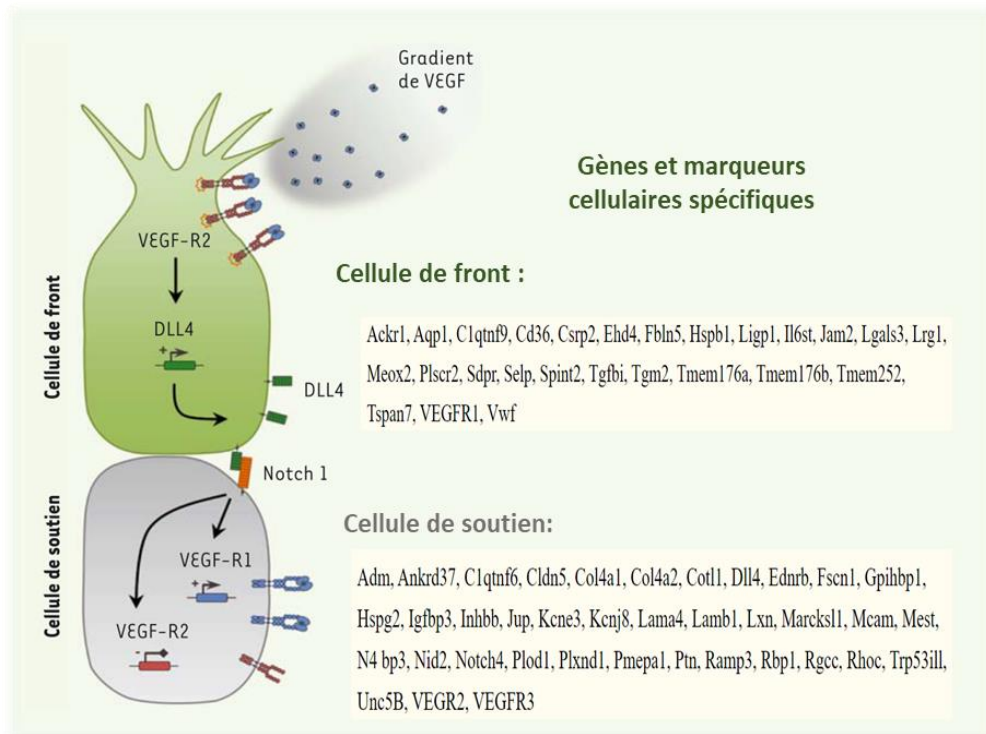


Figure 4 : Dialogue des voies VEGF et Delta/Notch pour la sélection de la cellule de front. Représentation schématique de la boucle de régulation Delta/Notch et VEGF entre la cellule de front et la cellule de soutien au sein du bourgeon angiogénique. Liste de gènes et marqueurs cellulaires exprimés spécifiquement par les cellules de front et les cellules de soutien. Adapté de Treps L et Gavard J, 2015.

1.2.2.3. Extension, guidance et anastomose du bourgeon angiogénique

Dans cet environnement pro-angiogénique, la cellule endothéliale dégrade la lame basale qui l'entoure grâce à la sécrétion de nombreuses protéases (notamment les métalloprotéases : MMP2, MM3, MMP9). Pour favoriser la migration, l'expression de VEGF augmente la perméabilité de la

monocouche endothéliale, ce qui permet à une grande quantité de protéines plasmiqes d'être déversées pour former une matrice de substitution utilisée par la cellule de front (Jain RK, 2003). L'extension des lamellipodes et filopodes par la cellule de front favorise sa migration et le guidage du bourgeon angiogénique (De Smet F et al., 2009). La source de VEGF reçue par la cellule de front induit une internalisation de la VE-cadhérine qui déstabilise les jonctions intercellulaires et favorise la migration de la cellule. A l'inverse, l'activation de la voie Notch dans les cellules de soutien à l'arrière, inhibe la formation des filopodes et augmente l'adhésion cellulaire pour sauvegarder une migration collective (Bentley K et al., 2014).

La cellule de front exprime de nombreux récepteurs qui permettront de guider sa migration. Des récepteurs permettent un guidage par chimio-attraction comme les récepteurs d'éphrines (EPH), le récepteur ROBO4 qui lie le ligand Slit et le récepteur UNC5B qui lie les ligands de type nétrine (Carmeliet P et Jain RK, 2011). La cellule de front exprime aussi le récepteur PLEXIND-1 qui, en association avec ses co-récepteurs neuropiline (NRPs), lie les sémaphorines pour une action anti-angiogénique. En effet, la plupart des sémaphorines induisent la répulsion de la migration de la cellule de front (Sakurai A et al., 2012).

Grâce à la prolifération des cellules de soutien et au guidage de la cellule de front, le bourgeon angiogénique s'étend. Le processus d'anastomose permet de connecter deux cellules de front qui se rencontrent. Ensuite, la formation de jonctions intercellulaires stables, par l'expression de VE-cadhérine et de claudine 5, permet de rétablir la polarisation de la cellule endothéliale et stabiliser la monocouche néoformée (Lenard A et al., 2013).

1.2.2.4. Stabilisation et maturation des vaisseaux sanguins

Le recrutement des cellules murales et la production de MEC, pour rétablir la barrière endothéliale, permet la stabilisation et la maturation des vaisseaux néoformés. Il existe plusieurs voies de signalisation impliquées dans ce processus.

a) En réponse au VEGF, les cellules endothéliales sécrètent du PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*), ce ligand se lie au récepteur PDGFR- β exprimé par les cellules murales. L'activation de cette voie stimule leur prolifération et leur migration pour assurer leur recrutement autour des cellules endothéliales (Hellström M et al., 2001).

b) Le TGF- β est un facteur de croissance qui favorise la production de la MEC autour des vaisseaux sanguins et induit la maturation de cellule mésenchymateuse en cellules murales (Chambers RC et al., 2003). Néanmoins, le TGF- β présente une action contextuelle sur la maturation vasculaire. Ce facteur est capable d'activer la voie pro-angiogénique TGF- β 1-ALK1-Endoglin. L'activation de cette voie induit l'expression de Id1 (*Inhibitor of DNA binding 1*) qui favorise la prolifération et la migration des cellules endothéliales. A l'opposé, l'activation de la voie TGF- β 1-ALK5 induit l'expression de PAI1 (*Plasminogen Activator Inhibitor 1*) qui favorise la maturation des vaisseaux car il empêche la dégradation de la MEC (Pepper MS et al., 1997).

c) L'angiopoïétine 1 (ANG1) est sécrétée par les cellules murales, tandis que l'angiopoïétine 2 (ANG2) provient des cellules endothéliales (Loughna S et al., 2001). Les ligands ANG1 et ANG2 se lient au récepteur TIE2. L'activation de la voie ANG1-TIE2 s'oppose aux actions du VEGF sur l'internalisation de la VE-cadhérine, ce qui renforce les jonctions intercellulaires pour rétablir la barrière endothéliale (Gavard J et al., 2008). L'action pro- ou anti-angiogénique de ANG2 dépend de la présence du VEGF.

En absence de VEGF, le ligand ANG2 agit comme un antagoniste de ANG1 : il déstabilise les vaisseaux et déclenche une régression vasculaire. A l'opposé, en présence de VEGF, le ligand ANG2 facilite le bourgeonnement angiogénique (Yancopoulos GD et al., 2000).

À tout moment, sous l'influence du microenvironnement, le réseau vasculaire est remodelé pour s'adapter à la demande des tissus et optimiser le flux sanguin. Pour ce faire, certains vaisseaux peuvent être éliminés par rétraction ("pruning") ou apoptose (Korn C and Augustin HG, 2015).

1.2.3. L'angiogenèse tumorale

A l'âge adulte, la plupart des cellules endothéliales sont dans un état quiescent. Néanmoins, elles restent sensibles aux stimuli hypoxiques et pro-angiogéniques nécessaires, notamment, à la cicatrisation des tissus. Cette plasticité endothéliale et les mécanismes d'angiogenèse qui en découlent sont exploités dans de nombreuses pathologies, notamment dans la croissance tumorale. La formation d'un réseau vasculaire permet d'apporter les nutriments nécessaires à la croissance de la tumeur et de favoriser la dissémination des métastases. La vascularisation tumorale s'établit grâce à l'angiogenèse par intussusception, l'angiogenèse par bourgeonnement ou bien par néo-vasculogenèse grâce au recrutement de cellules progénitrices (Zuazo-Gaztelu I et Casanovas O, 2018).

1.2.3.1. Le stroma tumoral pro-angiogénique

Plusieurs caractéristiques de l'environnement tumoral représentent des stimuli potentiellement favorables au déclenchement de l'angiogenèse à partir de vaisseaux préexistants. La prolifération exacerbée des cellules tumorales augmente la pression interstitielle, ce qui favorise un environnement hypoxique et stimule l'angiogenèse. De plus, les cellules tumorales sont capables de sécréter de nombreux facteurs de croissance pour attirer différents types cellulaires dans le stroma tumoral : les CAFs (*Cancer-Associated Fibroblasts*) et les TAMs (*Tumor-Associated Macrophages*). Pour recruter les TAMs au sein du stroma, les cellules tumorales sécrètent des facteurs chimio-attractants tel que : le GM-CSF (*Granula-cycle-macrophage colony stimulating factor*) ainsi que les interleukines -3 et -6. Une fois sur place, les TAMs sécrètent des facteurs pro-angiogéniques VEGF-A, bFGF (*basic fibroblast growth factor*) et MMP-9 pour soutenir la progression tumorale. La sécrétion de MMP-9 permet de dégrader la MEC et de libérer le VEGF-A matriciel (Riabov V et al., 2014).

Les fibroblastes sont responsables de la sécrétion des protéines matricielles des tissus. Les CAFs sont des fibroblastes résidants, ou des cellules mésenchymateuses recrutées, dont le comportement est modulé par les cellules tumorales. Ils sont capables de sécréter du VEGF, du TGF- β et du PDGFB pour stimuler l'angiogenèse de vaisseaux voisins mais sont aussi capables de recruter des cellules endothéliales progénitrices (EPCs) pour déclencher une néo-vasculogenèse tumorale. Les CAFs sont capable de remodeler la MEC autour de la tumeur par la sécrétion de nombreuses protéases pour libérer les facteurs pro-angiogéniques séquestrés dans la matrice (Wang FT et al., 2019). De plus, la sécrétion de protéases rend la matrice plus permissive et favorise la migration du bourgeon angiogénique. La présence des CAFs dans le stroma tumoral, favorise la rigidification de la MEC par un dépôt accru de collagène de type I (Ottaviano AJ et al., 2006) organisé en fibres linéaires qui favorisent la migration des cellules tumorales (Goetz JG et al., 2011).

1.2.3.2. Aspect chaotique des vaisseaux tumoraux

L'angiogenèse tumorale est une angiogenèse chaotique qui forme des vaisseaux très perméables, tortueux, dilatés et perfusés d'un flux sanguin inconstant (Carmeliet P et Jain RK, 2000) (Figure 5). Les

vaisseaux tumoraux présentent un défaut de maturation par l'absence de péricytes et de cellules musculaires lisses (VSMC) qui recouvrent, en temps normal, la monocouche endothéliale et assurent l'étanchéité des vaisseaux. De plus, l'altération des jonctions intercellulaires, riches en VE-cadhérine, augmente la fenestration entre les cellules endothéliales et rend les vaisseaux tumoraux hyperperméables. Le démantèlement des jonctions est médié par la sécrétion de nombreux facteurs pro-angiogéniques par les cellules tumorales tels que : le TGF- β , l'interleukine 8 (IL-8), le HDGF (*hepato-derived growth factor*) et la sémaphorine 3A (Sema3A) (Thirant C et al., 2012 ; Le Guelte A et al., 2012 ; Azzi S et Gavard J, 2014).

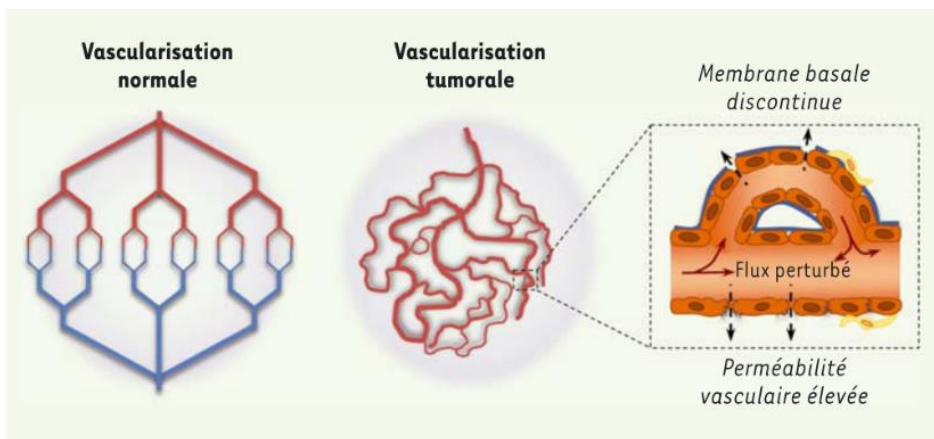


Figure 5 : **Morphologie des vaisseaux tumoraux.** En comparaison à une vascularisation normale, les vaisseaux tumoraux sont tortueux et dilatés. De plus, le flux sanguin y est perturbé. D'après Treps L et Gavard J, 2015.

2. Organisation et spécification du réseau vasculaire

Le système vasculaire est un réseau fermé et hiérarchiquement organisé. Il est composé d'artères, d'artérioles, de capillaires, de veinules et de veines. Les vaisseaux sanguins sont anatomiquement adaptés pour assurer l'équilibre du flux sanguin nécessaire à la distribution de l'oxygène et des nutriments à travers le corps. En fonction de leur positionnement par rapport au cœur, les vaisseaux sanguins sont hiérarchisés et histologiquement différents pour s'adapter à leur environnement.

2.1. Anatomie et histologie des vaisseaux

Les artères partent du cœur et reçoivent le sang avec la pression la plus forte. C'est pour cela qu'elles sont munies de la paroi vasculaire la plus épaisse. Pour résister à cette pression dite pulsatile, les artères sont aussi très élastiques. En coupe transversale, elles sont segmentées en 3 couches (Figure 6A)

- La couche *adventice* est constituée d'un tissu conjonctif riche en fibroblastes suivit d'une lame de fibres élastiques externe (*External Elastic Lamina* : EEL).
- La couche *media* est enrichie en cellules musculaires lisses vasculaire (SMC : *smooth muscle cells* ou VSMC) suivit d'une lame de fibres élastiques interne (*Internal Elastic Lamina* : IEL).
- La couche *intima* contient une monocouche de cellules endothéliales. Elles compartimentent les cellules sanguines du reste du corps. Ces cellules endothéliales reposent sur une lame basale.

Le sang passe ensuite dans les artérioles, d'un calibre inférieur à 100µm. Elles sont constituées d'une couche *adventice* plus fine et même parfois absente. Les artérioles délivrent le sang dans les capillaires : les vaisseaux les plus fins du réseau. Ils sont constitués d'une monocouche de cellules endothéliales entourées par les cellules murales : les péricytes (Figure 6B). Les capillaires font le lien entre les artérioles, contenant un sang riche en oxygène, et les veinules où est déversé le sang riche en CO₂.

Les veinules sont constituées d'une couche *média* plus fine contenant moins de cellules musculaires lisses. Le tonus vasculaire y est plus faible en comparaison des artérioles. Les veinules font remonter le sang jusqu'au cœur par cycles de vasoconstrictions. Pour limiter le reflux sanguin, les veines et veinules sont équipées de valves (Jain RK, 2003 ; Clever O et Douglas AM, 2003).

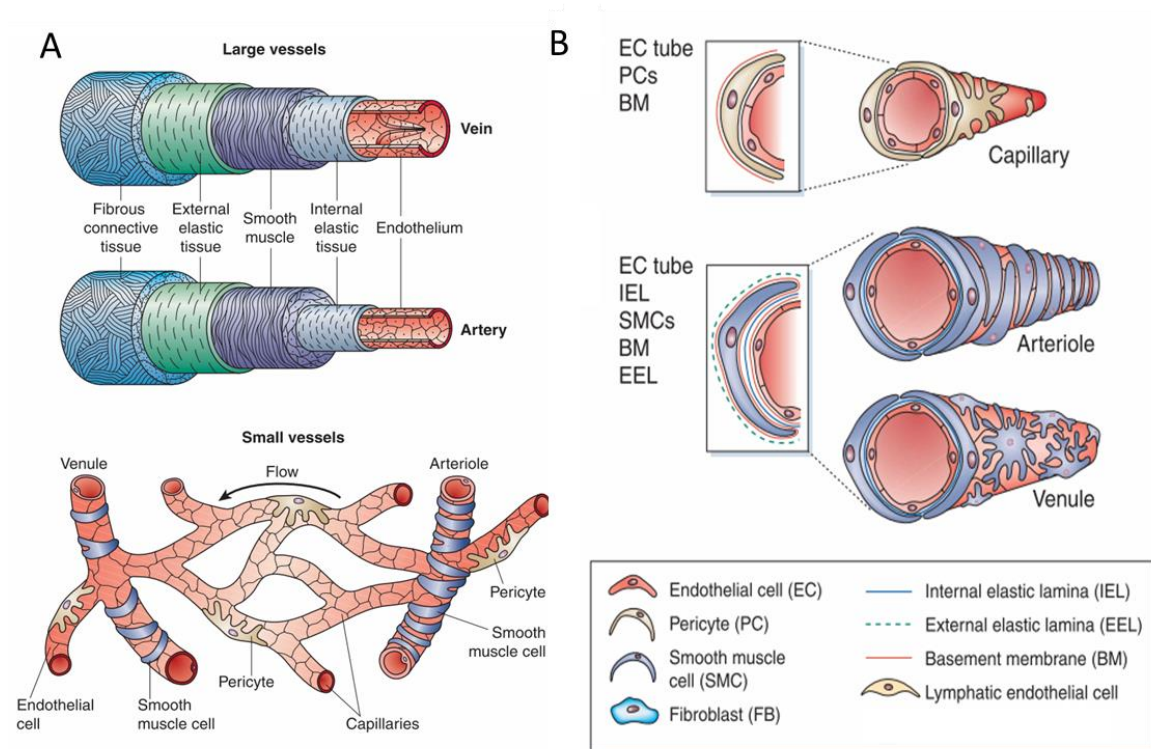


Figure 6 : Anatomie et composition histologique des vaisseaux sanguins. (A) Représentation schématique de la composition histologique des artères et des veines. Représentation des couches adventice, media et intima qui composent les veines et les artères. D'après Clever O & Douglas AM, 2003. (B) Représentation schématique de la composition histologique des artérioles, veinules et capillaires sanguins. D'après Jain RK, 2003.

2.2. Hétérogénéité de l'endothélium

L'endothélium est une monocouche de cellules endothéliales. Il tapisse l'ensemble des vaisseaux sanguins. Sa fonction majeure est d'assurer la perméabilité de la paroi vasculaire. Pour cela, l'endothélium se modifie en fonction du vaisseau sanguin qu'il recouvre : artère, veine ou capillaire. Bien qu'une homogénéité de l'endothélium soit observée dans les premiers vaisseaux sanguins (Drake CJ et al., 2000), des marqueurs artériels et veineux sont exprimés à des temps précoces au cours de l'embryogenèse (Lawson ND et al., 2001). Aussi, une spécification fonctionnelle des endothéliums est assurée pour répondre aux besoins spécifiques des tissus irrigués. En effet,

l'hétérogénéité des lits capillaires est le résultat d'un ensemble de signaux du microenvironnement réceptionnés par les cellules endothéliales (Jain RK et al., 2003).

2.2.1. Différenciation artérioveineuse de l'endothélium

Des distinctions morphologiques sont observées entre les endothéliums artériels et veineux. Les cellules endothéliales s'alignent au flux sanguin artériel et présentent de nombreuses jonctions intercellulaires pour résister à la pression artérielle. A l'inverse, les cellules endothéliales, présentes dans les veines, ont une forme pavimenteuse et ne s'alignent pas au flux (William C. Aird, 2006). Les cellules endothéliales artérielles et veineuses expriment des gènes spécifiques pour assurer leur différenciation (Garlanda C et Dejana E, 1997 ; Corada M et al., 2014). La mise en place d'un programme d'expression génique artériel est dépendante de la voie de signalisation Notch. En effet, l'expression de Hedgehog induit l'expression de VEGF-A qui se lie au récepteur VEGFR2 et son co-récepteur neuropilin-1 (Nrp1) sur la cellule endothéliale. Cette liaison active la voie Notch pour stimuler l'expression de l'Ephrine B2 et inhiber l'ephrine B4 (Lanner F et al., 2007). En effet, les cellules endothéliales artérielles expriment préférentiellement les gènes : ephrine B2, Notch1 et 4, Dll4, Alk1 (*activin-receptor-like kinase 1*), EPAS1 (*endothelial PAS domain protein*), Hey1, Hey2, Nrp1, Depp, Hes, Sox17, CXCR4, Cx40 et Cx37 alors que les cellules endothéliales veineuses expriment préférentiellement les gènes ephrine B4, Nrp2, COUP-TFII, Flt4 et l'endomucine (William C. Aird, 2006 ; Corada M et al., 2014). L'expression de la β -caténine est aussi responsable de l'activation de la voie Notch par l'augmentation de l'expression de DLL4 pour activer l'expression de gènes pro-artériels (Yamamizu K et al., 2010). A l'inverse, l'inhibition de la voie Notch induit une transition d'identité artérioveineuse.

2.2.2. Différenciation des endothéliums en fonction des tissus

En fonction du tissu vascularisé, les cellules endothéliales expriment des antigènes spécifiques à leur surface (Garlanda C et Dejana E, 1997). Elles génèrent différents types d'endothélium en fonction des besoins de l'organe irrigué. Dans les artères et les veines, les cellules endothéliales sont fortement jointives avec de nombreuses jonctions serrées et jonctions adhérentes. L'endothélium est décrit comme "continu" (Figure 7a). Ce type d'endothélium est retrouvé dans les capillaires qui irriguent les poumons, la peau, les muscles squelettiques et le cerveau. Des "fenestrations" plus ou moins importantes peuvent être générées entre les cellules endothéliales pour faciliter les échanges entre le milieu vasculaire et le tissu (Figure 7b). On retrouve un endothélium de type "fenestré" au niveau des capillaires impliqués dans l'irrigation des glandes endocrines et exocrines ainsi que l'intestin et les reins qui ont un plus grand besoin d'échange avec le milieu vasculaire. Enfin, un troisième type d'endothélium "discontinu" est retrouvé au niveau des lits capillaires hépatiques et de la moelle épinière. L'endothélium "discontinu" est caractérisé par de larges fenestrations avec une lame basale discontinue et parfois absente (Williams C. Aird, 2007 ; Cleaver O. et Douglas AM, 2003) (Figure 7c).

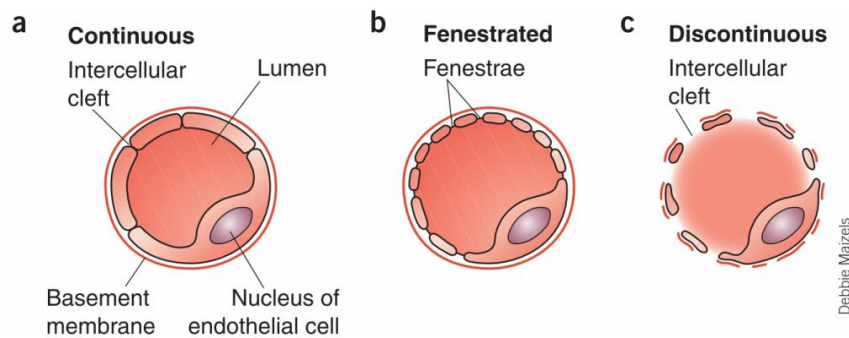


Figure 7 : Spécifications des endothéliums en fonction des organes irrigués. Représentation schématique des différences morphologiques des endothéliums en fonction de la localisation des lits capillaires. **(a)** Les endothéliums "continus" présentent de fortes jonctions intercellulaires pour limiter les échanges avec les tissus. **(b)** Les endothéliums "fenestrés" présentent une altération des jonctions intercellulaires pour générer des espaces entre les cellules endothéliales et augmenter les échanges avec le tissu. La lame basale reste présente. **(c)** Les endothéliums "discontinus" présentent de larges espaces entre les cellules endothéliales avec une discontinuité de la lame basale. D'après Cleaver O. et Melton D., 2003.

3. Les transitions identitaires de la cellule endothéliale

Une fois spécifiées, les cellules endothéliales sont stabilisées pour assurer leurs fonctions dans les vaisseaux. Cependant, les cellules endothéliales sont dotées d'une remarquable plasticité identitaire pour assurer la survie et les besoins des tissus. Des transitions identitaires de cellules endothéliales sont observables dans l'embryon mais aussi dans les tissus adultes physiologiques et pathologiques.

3.1. La transition endothélio-hématopoïétique (EHT) et les cellules endothéliales progénitrices (EPC)

Au cours du développement de l'embryon, une partie des cellules endothéliales se spécifient pour former un endothélium hémogénique. Les cellules qui y résident peuvent subir une transition endothélio-hématopoïétique (EHT). Cette transition permet, à partir de cellules endothéliales, de générer des cellules souche hématopoïétiques (HSPCs : *Hematopoietic stem and progenitor cells*) à l'origine des cellules hématopoïétiques (Bertrand JY et al., 2010). Cette transition nécessite l'expression du facteur RUNX1 (Chen MJ et al., 2009) dont l'expression est inhibée par le facteur HOXA3 dans les cellules endothéliales (Iacovino M et al., 2010 ; Dejana E et al., 2016) (Figure 8).

Après la naissance, une classe de progéniteurs vasculaires perdure dans les tissus adultes : ce sont les EPCs (*Endothelial Progenitor Cells ou bone marrow-derived endothelial cells*). Ces cellules circulent dans le sang et sont impliquées dans la néovascularisation de tissus ischémiques (Asahara et al., 1997). Elles sont capables de sauvegarder l'homéostasie vasculaire et de stimuler la réparation des tissus. Pour ce faire, elles favorisent les capacités migratoires et prolifératives des cellules endothéliales résidentes ou s'incorporent dans le tissu endothélial (Asahara T et al., 1999 ; Tepper OM et al., 2005).

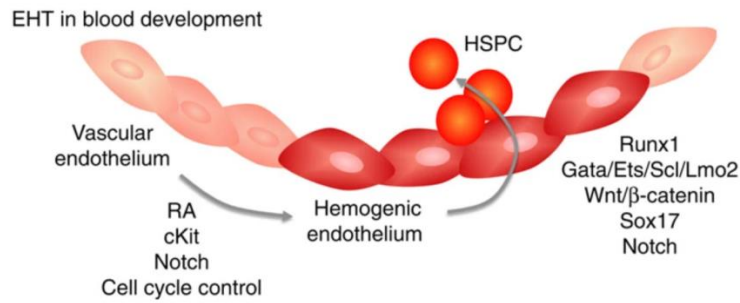


Figure 8 : La transition endothelio-hématopoïétique (EHT). L'endothélium hémogénique est capable de subir une transition endothelio-hématopoïétique (EHT). Cette transition permet de produire des cellules souches hématopoïétiques pour assurer le renouvellement des cellules sanguines. D'après Dejana E et al., 2017.

3.2. La transition endothélio-mésenchymateuse (EndoMT)

Au cours du développement, les cellules endothéliales peuvent subir une transition endothélio-mésenchymateuse (EndoMT). C'est une transition identitaire qui met en place un programme d'expression génique bien défini pour déstabiliser l'identité endothéliale. Les cellules endothéliales acquièrent des caractéristiques mésenchymateuses tels que : une modification des jonctions intercellulaires, une morphologie allongée et une augmentation des capacités migratoires (Figure 9). Cette transition est stimulée par les voies de signalisations TGF- β , BMP (*Bone Morphogenetic Protein*), Notch et Wnt/ β -caténine au cours du développement (Platel V et al., 2019). Elle est nécessaire à la formation des valves cardiaques ainsi que pour la production des fibroblastes cardiaques et des cellules musculaires lisses (Amstrong EJ et Bishoff J, 2004 ; Kovacic JC et al., 2012).

Chez l'adulte, cette transition identitaire est utilisée pour la cicatrisation des tissus lésés (Agarwal S et al., 2016). De plus, cette transition stimule la production de cellules pluripotentes de type cellules souches pour assurer la régénération des tissus (Medici D et al., 2016). Elle peut être déclenchée par des facteurs environnementaux tel que l'hypoxie (Zhang H et al., 2018) ou un stress oxydatif (Thuan D et al., 2018). L'endoMT est très étudiée dans la propagation de pathologies de type fibroses et cancers (Piera-Velazquez S et Jimenez S, 2019). En effet, l'endoMT est reconnue comme une source de CAFs impliqués dans la progression des cancers (Zeisberg EM et al., 2007 ; Potenta S et al., 2008). Cette transition identitaire est aussi responsable de l'extravasation de cellules métastatiques (Krizbai IA et al., 2015 ; Gasparics A et al., 2016).

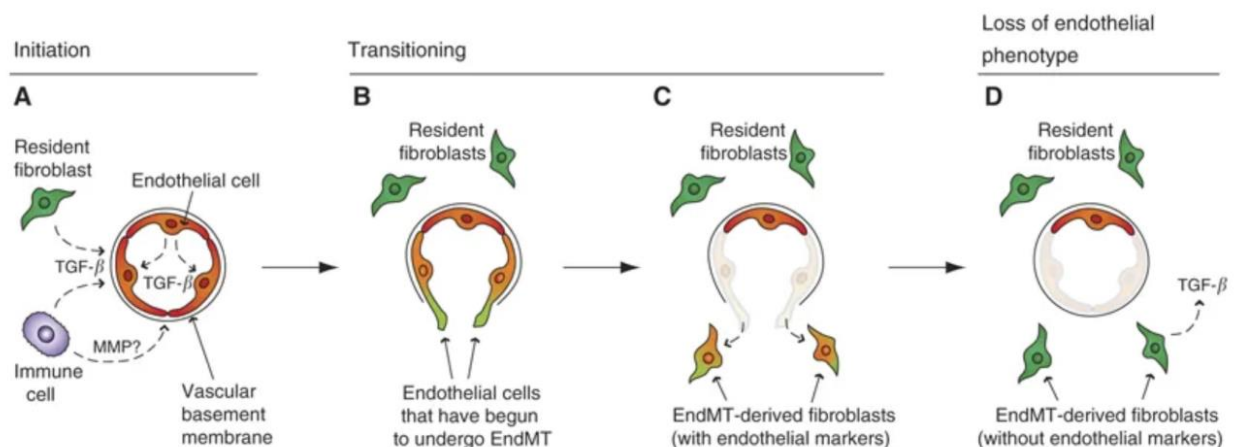


Figure 9 : La transition endothelio-mésenchymateuse. Une transition endothélio-mésenchymateuse permet de produire des fibroblastes ou des CAFs (Cancer-associated fibroblasts) à partir de cellules endothéliales. Différents facteurs environnementaux peuvent induire cette transition. L'initiation de l'endoMT est caractérisée par la déstabilisation des jonctions intercellulaires poursuivie par une délamination des cellules endothéliales et une perte d'identité. D'après Potenta S et al., 2008.

Chapitre II Le microenvironnement de la cellule endothéliale

La cellule endothéliale réside dans une niche environnementale favorable à l'accomplissement de ses fonctions. Elle repose sur une matrice extracellulaire (MEC) riche de signaux biochimiques et mécaniques. Ces signaux sont réceptionnés par le biais de récepteurs spécifiques à sa surface qui induisent les comportements cellulaires adéquats. La niche environnementale abrite différents types cellulaires (cellules murales, astrocytes et cellules nerveuses) qui entretiennent une communication avec le tissu endothélial favorable à son maintien.

1. La matrice extracellulaire (MEC)

La matrice extracellulaire (MEC) est la composante majeure du microenvironnement. Elle est constituée de protéines sécrétées et organisées par les cellules environnantes pour former une structure hydrogel sur laquelle repose les cellules. En plus de son rôle pour le soutien des tissus, elle contrôle des fonctions fondamentales de la cellule endothéliale. En effet, par des signaux mécaniques et biochimiques, elle régule des voies de signalisation impliquées dans la prolifération, la migration, la survie et la stabilisation des cellules dans les vaisseaux sanguins. Les cellules endothéliales reposent sur un type de MEC appelée la lame basale et grâce à différents récepteurs situés à la membrane, les cellules sont en constante communication avec cette MEC. De plus, c'est une structure dynamique, constamment remodelée par les cellules pour répondre aux besoins des tissus (Figure 10).

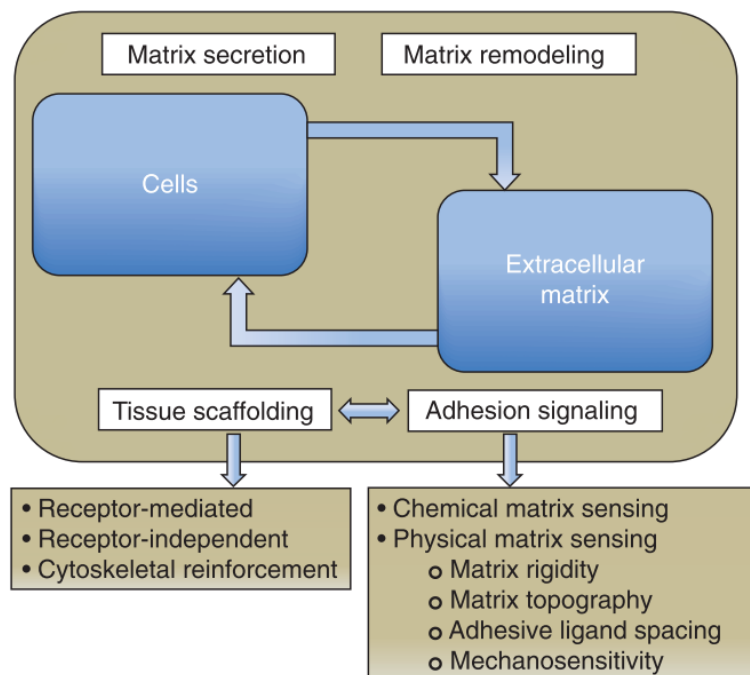


Figure 10 : Le dialogue entre la cellule et la matrice extracellulaire (MEC). Alors que la MEC est nécessaire au soutien des tissus, elle est aussi un réservoir d'informations mécaniques et biochimiques pour guider les comportements cellulaires. Ces informations sont réceptionnées par des récepteurs spécifiques à la surface cellulaire. Cette matrice riche en informations est sécrétée et remodelée par les cellules elles-mêmes. D'après Geiger B et Yamada KM 2011.

1.1. Structures et composantes fibrillaires de la MEC

La MEC est un réseau organisé de macromolécules matricielles dont la nature et l'organisation varie en fonction du tissu. Les composants majeurs de la MEC sont des protéines fibrillaires et des protéoglycanes (PGs) (Järveläinen H et al, 2009) qui s'assemblent pour former une matrice tridimensionnelle organisée. Les protéines fibrillaires sont : le collagène, l'élastine, la fibronectine et les laminines. En s'incorporant au réseau de protéines fibrillaires, les PGs de nature hydrophile, confèrent à la matrice un aspect gélifié de type hydrogel (Frantz C et al., 2010), ils régulent le pH des tissus, l'hydratation, et la résistance aux forces environnementales en accordant une propriété élastique à la matrice. Les PGs sont constitués d'une chaîne de glycosaminoglycanes (GAGs) suivie d'une protéine spécifique, ils sont classifiés en fonction de la nature de ces deux composantes protéiques (Schaefer L et Schaefer M, 2010).

On distingue deux types de MEC qui varient en composition et en structure : la matrice interstitielle qui entoure les organes et joue un rôle de soutien, et la matrice intercellulaire qui est en contact direct avec les cellules. Les cellules endothéliales reposent sur une lame basale qui est une matrice intercellulaire spécialisée des épithéliums dont les principaux constituants sont les laminines, le collagène de type IV et la fibronectine ainsi que les PGs tels que le perlécane (une héparine sulfate protéoglycane : HSPG), l'agrine, le nidogène et le collagène de type XVIII (Yurchenco PD, 2011).

Les laminines et le collagène de type IV constituent le socle de la lame basale, ils s'assemblent parallèlement et s'interconnectent par polymérisation. L'assemblage de la lame basale est initié par la liaison de la laminine aux intégrines et aux glycolipides sulfatés (SGL) présents à la surface cellulaire. Viennent s'incorporer ensuite le collagène de type IV et les PGs (Figure 11) (Yurchenco PD, 2011).

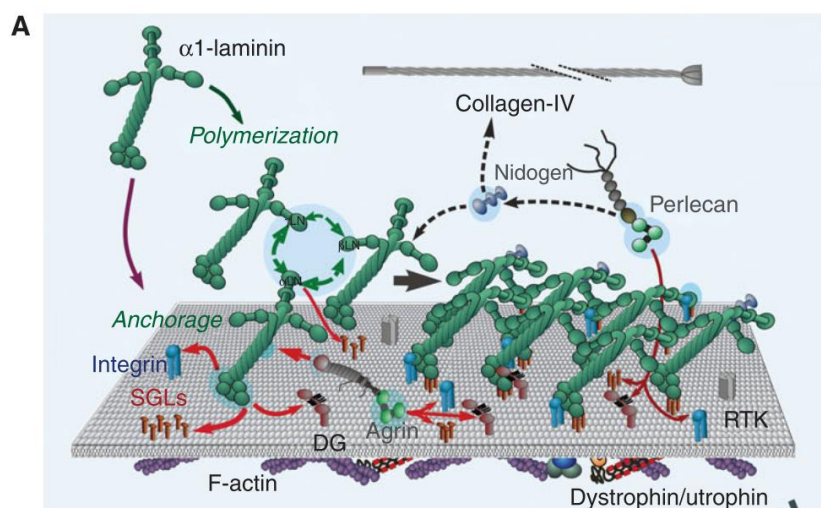


Figure 11 : Structure et assemblage de la matrice extracellulaire (MEC). Représentation schématique des différents constituants de la lame basale. Dans un premier temps, les laminines s'assemblent pour constituer une plateforme où s'incorporent ensuite le collagène de type IV et les protéoglycanes hydrophiles. D'après Yurchenco PD, 2011.

1.2. Composante moléculaire de la MEC

La matrice extracellulaire est une zone de stockage pour de nombreux facteurs de croissance, morphogènes et autres molécules signalétiques. Ces facteurs sont déposés par les cellules environnantes et conservés par la MEC pour une communication régulée dans l'espace et dans le temps. Cette fonction de réservoir est assurée par les PGs et les HSPGs qui lient et séquestrent les facteurs de croissances tels que le VEGF, le PDGF, le TGF- β et le FGF. Ainsi les PGs de la lame basale génèrent des gradients de morphogènes favorables au maintien de l'homéostasie endothéliale et au remodelage vasculaire. Les facteurs sont libérés par le remodelage protéolytique de la MEC, effectué par la cellule, un phénomène détaillé plus tard dans le chapitre. En plus de cette fonction de réservoir, les HSPGs agissent comme des co-récepteurs et assurent la présentation des ligands tels que le TGF- β ou le FGF (Mohammadi M et al., 2005).

Aussi, la lame basale contient des protéines "matricellulaires" tels que la thrombospondine, la tenascine C, CYR61, CTGF et SPARC (Theocharis AD et al, 2015). Ces protéines modulent l'activation de voies de signalisations en se liant à de nombreux récepteurs cellulaires, des cytokines, des protéines fibrillaires, des facteurs de croissance (VEGF, FGF2, TGF- β) et des protéases de type MMP (métalloprotéases) (Theocharis AD et al., 2015).

1.3. La rigidité de la matrice

La rigidité d'une MEC est définie par sa capacité de déformation en réponse à une force appliquée. Chaque tissu est caractérisé par une rigidité qui lui est propre (Figure 12), quantifiée en Pascal (Pa) et mesurée en force par mètres carré (Butcher DT et al., 2009). La rigidité de la matrice est déterminée majoritairement par sa composition, la modification post-traductionnelle de ses composants ainsi que leur organisation spatiale tridimensionnelle. En réponse à cette rigidité, les cellules s'adaptent pour atteindre une homéostasie tensionnelle qui se traduit par un équilibre entre les tensions intra et extracellulaire. Cet équilibre est atteint grâce à l'activité des RhoGTPases et des kinases ROCKs qui contrôlent le remaniement du cytosquelette d'actomyosine nécessaire à la contractilité intracellulaire. Néanmoins, si la cellule n'est pas capable de trouver un équilibre tensionnel, celle-ci va remodeler la matrice en sa faveur. Ainsi, les cellules environnantes sont capables de moduler la rigidité de la MEC par la sécrétion de protéines matricielles, une réorganisation structurale ou une dégradation partielle de la MEC. Par exemple, la sécrétion d'enzymes de type LOX (*lysyl oxydase*) génèrent des liaisons covalentes entre les chaînes de collagène et d'élastine pour moduler la rigidité (Levantal K.R et al., 2009). C'est la notion de "mécanoréciprocité" cellulaire.

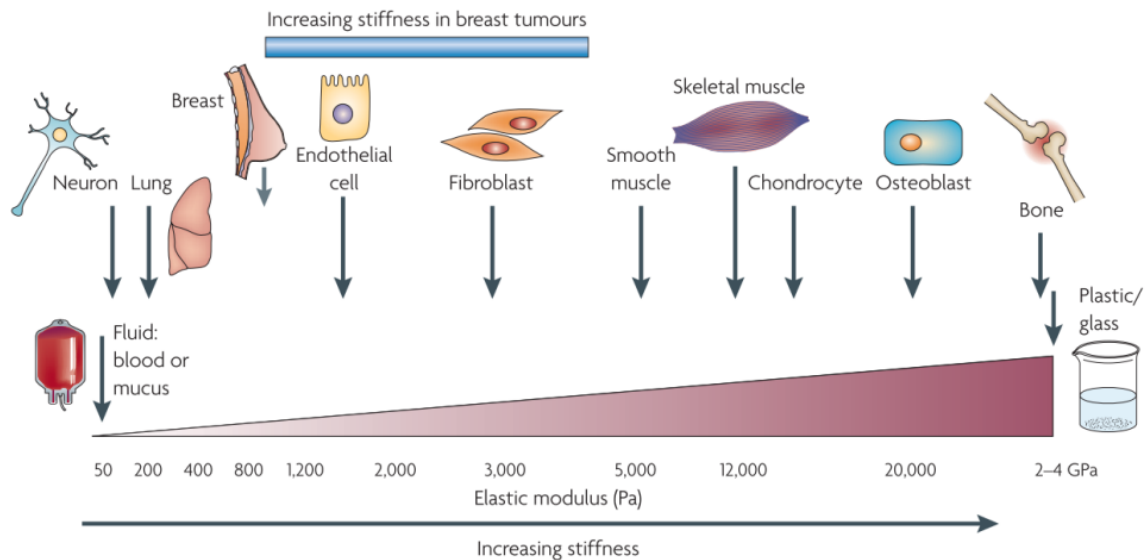


Figure 12 : **Rigidité des tissus du corps.** Représentation de la graduation de la rigidité matricielle en fonction des tissus. D'après Butcher DT et al., 2009.

1.4. Le remodelage de la MEC

La MEC est constamment renouvelée et peut être modifiée par les cellules environnantes en fonction des besoins. Pour cela, la cellule modifie les caractéristiques de la MEC notamment sa rigidité et sa porosité par la réorganisation de sa structure par fibrillogenèse, la dégradation partielle de ses protéines matricielles et la sécrétion de nouvelles protéines. Le dépôt et la dégradation de la MEC sont des processus strictement régulés dont l'altération est responsable de nombreuses pathologies.

1.4.1. Le remodelage par fibrillogenèse

Les cellules sont capables de moduler la fibrillogenèse des protéines matricielles telles que la fibronectine ou le collagène. La fibronectine (FN) est sécrétée sous la forme d'un dimère compact dont l'assemblage fibrillaire est dépendant de récepteurs situés à la surface cellulaire, majoritairement les intégrines. En effet, l'intégrine $\alpha5\beta1$ reconnaît le domaine RGD de la FN pour déclencher des changements de conformation favorables à la polymérisation de la FN (Mao Y et Schwarzbauer JE, 2005). Une fois l'intégrine engagée par sa liaison à la FN, le domaine cytoplasmique de l'intégrine s'associe au réseau du cytosquelette d'actomyosine pour induire sa réorganisation (Figure 13). En contrepartie, la contraction de ces fibres de stress d'actomyosine, qui traduit l'état contractile de la cellule, module l'assemblage fibrillaire de la FN contenue dans la MEC (Wu C et al., 1995 ; Zhong C et al., 1998). Le maintien de cette interaction FN-intégrine-cytosquelette dépend de la présence des adaptateurs et molécules signalétiques tels que la kinase FAK, la vinculine et la paxiline, recrutés au niveau des intégrines $\alpha5\beta1$ (Sechler J et Schwarzbauer JE, 1997).

D'autres récepteurs membranaires contrôlent l'assemblage fibrillaire de la FN :

- Le syndecan-4, un HSPG, se lie à la FN conjointement avec l'intégrine pour activer la RhoGTPase et la kinase FAK et favorise l'assemblage fibrillaire de la FN (Saoncella S et al., 1999).
- L'activation du récepteur uPAR par son ligand uPA stimule l'activation de l'intégrine $\alpha5\beta1$ et favorise la polymérisation de la FN (Monaghan E et al., 2004).

La fibrillogenèse de FN sert de patron à l'organisation du collagène et de nombreuses autres protéines de structure de la MEC. En effet, pour initier sa déposition matricielle, le collagène se lie sur un domaine spécifique de la FN (McDonald JA et al., 1982). De plus, la fibrillogenèse du collagène est dépendante de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ et de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ (Li S et al., 2003) ce qui implique une dépendance réciproque entre la fibrillogenèse de la FN et celle du collagène (Kadler KE et al., 2008)(Figure 13).

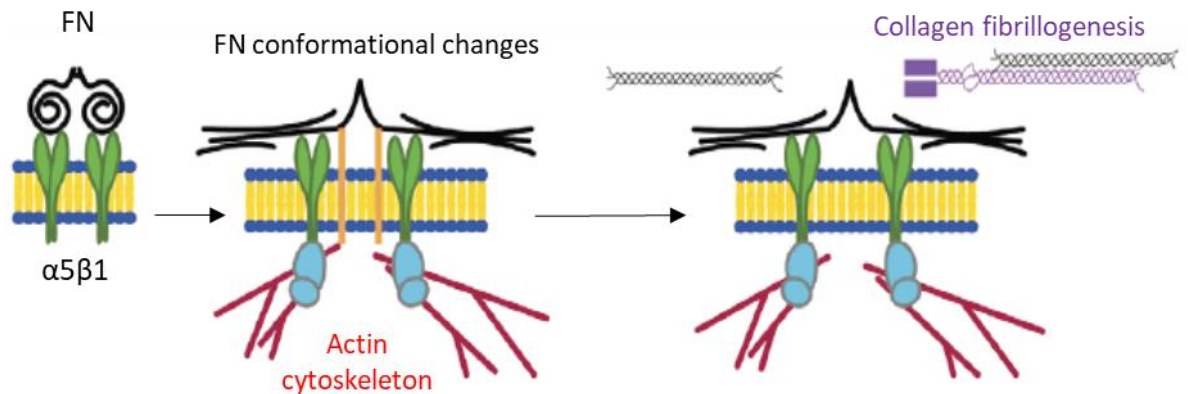


Figure 13 : Le remodelage de la MEC par fibrillogenèse. La fibronectine est reconnue par les récepteurs de type intégrine à la surface de la cellule. En fonction de l'état de contractilité intra-cellulaire, les cellules remodelent par fibrillogenèse la fibronectine pour une copie en miroir à l'état de son cytosquelette d'actomyosine. Inversement, la topographie matricielle et la disposition des fibres induit un remaniement du cytosquelette d'actomyosine. La fibrillogenèse de FN sert de patron à l'organisation des fibres de collagène. D'après Kadler KE et al., 2008.

1.4.2. Le remodelage protéolytique

Le remodelage protéolytique de la MEC par la dégradation partielle des protéines matricielle est orchestré par les protéases. Il existe plusieurs familles de protéases comme les métalloprotéases (MMPs) et ADAMTS (*A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs*) (Mott JD et Werb Z, 2004).

Il existe 23 membres dans la famille des MMPs qui se distinguent, entre autres, par leur mode d'activation et leur substrat matriciel (Figure 14A). Par exemple, MMP-3 et MMP-10 assurent la dégradation du protéoglycane, de la fibronectine et de la laminine. Alors que MMP-8, MMP-13 et MMP-1 ciblent préférentiellement le collagène de type I, II et III respectivement. Par ailleurs, MMP-2 et MMP-9 dégradent la gélatine, la forme dénaturée du collagène.

Les protéases sont sécrétées au niveau des structures cellulaires spécialisées : les invadopodes, les podosomes ou les adhérences focales (Jacob A et Prekeris R, 2015 ; Wang Y et McNiven M, 2012). En fonction de la structure à partir de laquelle la cellule sécrète les MMPs, la taille et l'aspect des dégradation de la MEC va différer, ce qui induit un remodelage topographique différent (Figure14C).

Bien que la plupart des MMPs soient sécrétées, certaines sont dotées d'un domaine transmembranaire comme c'est le cas pour MT1-MMP (alias MMP14), MMP-15, MMP-23 et MMP-24 (Page-McCawA et al., 2007). Leur activité est strictement régulée pour permettre une dégradation de la MEC contrôlée dans le temps et l'espace. Lorsqu'elles sont traduites, les MMPs sont sous une forme inactive appelée pro-MMPs. Leur maturation nécessite le clivage de leur pro-domaine pour dévoiler leur domaine catalytique. Cette activation est médiée par d'autres protéinases (Figure 14B)

(Page-McCawA et al., 2007). Ensuite, l'activité de ces MMPs est équilibrée par des inhibiteurs spécifiques sécrétés appelés les TIMPs (*Tissue inhibitor metalloproteases*) (Cruz-Monoz W et Khokha R, 2008). L'activation des protéases est aussi médiée par le système uPA/uPAR. Les sérines protéases uPA et tPA sont sécrétées et reconnues par le récepteur membranaire uPAR. Ensemble, ils catalysent l'activation du plasminogène en plasmine qui à son tour active les MMPs. Les inhibiteurs de ce système sont les protéines PAI-1 et PAI-2 qui se lient au complexe uPA/uPAR pour induire son internalisation et sa dégradation lysosomale (Dass K et al., 2007).

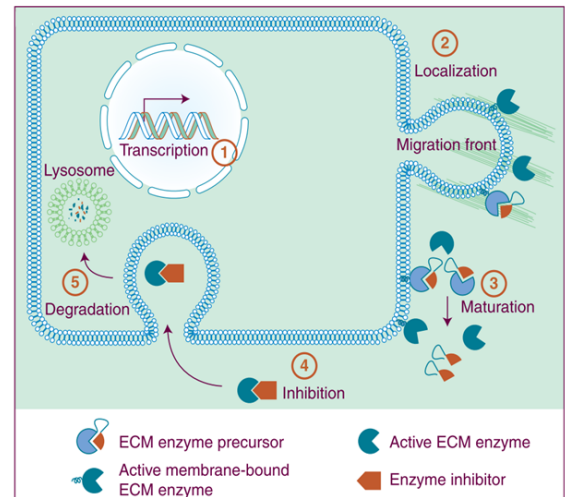
Les MMPs sont associées aux cancers car elles favorisent l'invasion et la propagation des métastases. De manière générale, la sécrétion de MMP est nécessaire à la migration individuelle de cellules endothéliales ou immunitaires (Hynes RO et al., 2009). De plus, elles sont capables de moduler l'activité de facteurs signalétiques tels que les cytokines, pour induire un environnement pro-inflammatoire, ou les facteurs de croissance pour la propagation tumorale. D'ailleurs, les MMPs sont rarement retrouvées dans les tissus sains, une augmentation de leur sécrétion est observée dans les processus de cicatrisation ou bien dans des conditions pathologiques.

Les protéinases de la famille ADAM et ADAMTS sont structurellement très proches car elles partagent plusieurs domaines structuraux, notamment leur domaine disintégrine qui lie l'intégrine pour inhiber leur activité protéinase et limiter les interactions intercellulaires. De manière intéressante, les protéinases ADAM contiennent un domaine transmembranaire qui leur confère un rôle dans maturation des cytokines et pour la sécrétion de facteurs de croissances (Murphy G, 2008).

A

Members	Alias	Activators	ECM targets	Other targets
MMPs (23 members)				
<i>Basic domains (prodomain + catalytic domain + hemopexin-containing ancillary domain)</i>				
MMP-1	Collagenase-1	MMP-3, -10, plasmin, kallikrein, chymase	Collagens I, II, III, VII, and X; gelatins; aggrecan; entactin; tenascin; perlecan	IGFBP-2, -3, -5; pro-IL-1b; CTGF; MMP-2, -9
MMP-3	Stromelysin-1	Plasmin, kallikrein, chymase, tryptase	Aggrecan; decorin; gelatins; fibronectin; laminin; collagens III, IV, IX, and X; tenascin; perlecan	IGFBP-3; pro-IL-1b; HB-EGF; pro-TGF-β; CTGF; E-cadherin; plasminogen; uPA; pro-MMP-1, -7, -8, -9, -13
MMP-8	Collagenase-2	MMP-3, -10, plasmin	Collagens I, II, and III; gelatins; aggrecan	
MMP-10	Stromelysin-2	Plasmin, kallikrein, chymase, tryptase	Aggrecan; fibronectin; laminin; collagens III, IV, and V	Pro-MMP-1, -8, -10
MMP-11	Stromelysin-3	Furin, plasmin	Fibronectin; laminin; aggrecan; gelatins	IGFBP-1
MMP-12	Metalloelastase	n.d.	Elastin; aggrecan; fibronectin; osteonectin; laminin; nidogen	Plasminogen
MMP-13	Collagenase-3	MMP-2, MMP-14, plasmin, kallikrein, chymase, tryptase	Collagens I, II, III, IV, IX, X, and XIV; aggrecan; fibronectin; tenascin; SPARC/osteonectin; laminin; perlecan	CTGF; pro-TGF-β; MCP-3
MMP-21	XMMP	n.d.	n.d.	n.d.
MMP-27		n.d.	n.d.	n.d.
<i>Minimal domains (prodomain + catalytic domain)</i>				
MMP-7	Matrilysin-1	MMP-3, -10, plasmin	Aggrecan; gelatins; fibronectin; laminin; elastin; entactin; collagen IV; tenascin; decorin	β4 integrin; E-cadherin; pro-TNFα; CTGF; HB-EGF; RANKL; IGFBP-3; plasminogen, MMP-1, -2, -9
MMP-26	Matrilysin-2	n.d.	Gelatin; collagen IV; fibronectin; fibrinogen; vitronectin	Pro-MMP-9
<i>MMPs with fibronectin-domain inserts</i>				
MMP-2	Gelatinase A	MMP-1, -7, -13, -14, -15, -16, -24, -25, plasmin	Gelatins; collagens IV, V, VII, X, and XI; fibronectin; laminin; elastin; aggrecan	Pro-TGF-β; FGF receptor I; MCP-3; IGFBP-5; pro-IL-1b; galectin-3; plasminogen
MMP-9	Gelatinase B	MMP-2, -3, -10, -13, plasmin	Gelatins; collagens III, IV, and V; aggrecan; elastin; entactin; vitronectin	Pro-TGF-β; IL-2 receptor α; Kit-L; IGFBP-3; pro-IL-1b; ICAM-1

B



C

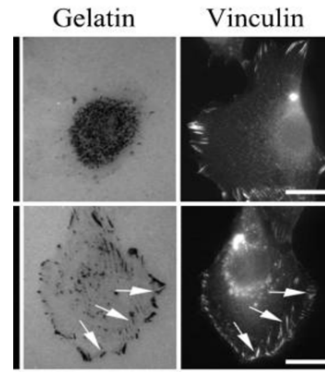


Figure 14 : Les différentes protéases impliquées dans le remodelage protéolytique de la MEC. (A) Fonction et régulation des protéases cellulaires. D'après Lu P et al., 2011. (B) Etapes de maturation des MMPs. Une fois traduites, les pro-MMPs sont adressées à la membrane plasmique ou sécrétées au niveau extracellulaire. Le clivage de leur pro-domaine est une étape de leur maturation pour libérer leur domaine catalytique. Les MMPs sont inhibées par des TIMPs pour être recyclées par la cellule. D'après Lu et al., 2011. (C) Les figures de dégradation de la matrice. Image de dégradation de gélatine fluorescente (Images droite) et immunomarquage de la vinculine pour mettre en évidence les structures d'adhérences cellulaires (Images de gauche). En haut à gauche une figure de dégradation à l'origine de sécrétion de MMP par des structures invadopododes au centre de la cellule. En bas à droite, les figures de dégradation sont superposables avec le marquage vinculine caractéristique des adhésions focales (flèches blanches). D'après Wang Y et McNiven M., 2012.

1.5. Impact de la matrice sur les comportements cellulaires

1.5.1. Impact des constituants matriciels

Les constituants de la matrice extracellulaire ne sont pas inertes. Les protéines fibrillaires contiennent des domaines constituant des signaux capables d'activer des voies de signalisation et d'induire des comportements cellulaires (Figure 15). Pour cela, les cellules endothéliales expriment des récepteurs de type intégrine et des récepteurs tyrosine kinase (à domaine discoïdine) qui peuvent se lier à certains domaines de protéines fibrillaires pour transduire un signal à la cellule.

Par exemple la fibronectine, une glycoprotéine fibrillaire de la lame basale, est sécrétée de manière contextuelle pour transmettre des signaux à la cellule. En effet, une forte concentration de

fibronectine est observée au cours du développement et dans les processus angiogéniques physiologiques ou pathologiques. Notamment, pour favoriser la migration au cours du développement ou pour la propagation des métastases, l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ est activée lorsqu'elle reconnaît le domaine RGD de la fibronectine (Rozario T et DeSimone D.W, 2010).

L'épissage de la fibronectine induit l'exclusion des 2 domaines nommés EIIA et EIIB. Cependant, un variant d'épissage qui conserve ces domaines est impliqué dans des comportements cellulaires pro-invasifs et pro-angiogéniques. En effet, ce variant est fortement exprimé autour des vaisseaux angiogéniques alors que sa présence est difficilement détectable chez l'adulte. Ce variant est néanmoins présent dans les tissus lésés ou dans des pathologies angiogéniques comme l'athérosclérose, l'infarctus du myocarde, les fibroses et les cancers (Astrof S and Hynes RO, 2009 ; White ES et Muro A, 2011). On sait aussi que certaines protéines matricielles peuvent activer des récepteurs de facteurs de croissance. C'est le cas pour la laminine qui pourrait activer des voies en aval du récepteur EGFR car elle contient un domaine EGF-like (*Epidermal growth factor*) (Panayotou G et al., 1989). De la même manière que les protéines fibrillaires, les protéoglycanes (PGs) de la lame basale sont reconnus par la cellule et peuvent induire des signaux anti- et pro-angiogéniques (Iozzo RV et al., 2009).

La topographie matricielle peut aussi avoir un impact sur les comportements cellulaires. Elle fait référence à diverses propriétés physiques de la MEC. Cette topographie est caractérisée par la géométrie tridimensionnelle de la MEC, la distribution des ligands et la rugosité des surfaces. L'utilisation de micro-patterns de MEC a permis de démontrer que la géométrie de la matrice, contraignant les cellules à acquérir une forme spécifique (ronde ou allongée), pouvant influencer leur différenciation cellulaire (Guilak F et al., 2009). De plus, la structure de la matrice peut moduler l'accessibilité et la distribution des ligands, (facteurs de croissances, morphogènes et protéines matricielles) ce qui aura un impact sur les comportements de la cellule (Geiger B et Yamada KMal., 2011). D'ailleurs, les protéines "matricellulaires" sont peu présentes dans les tissus adultes mais sont fortement exprimées pendant la cicatrisation ou au cours du développement embryonnaire (Alford A et Hankenson KD, 2006). Généralement, elles induisent un défaut d'adhésion de la cellule à la matrice, un état d'adhésion intermédiaire qui facilite la migration cellulaire (Bornstein P, 2009).

1.5.2. Impact de la rigidité de la matrice sur l'homéostasie endothéliale

Les propriétés mécaniques de la MEC peuvent influencer les comportements cellulaires. La modulation de la rigidité de la matrice est un stimulus utilisé au cours du développement pour la différenciation cellulaire et la migration dans le but d'organiser les tissus. Ainsi, les cellules souches mésenchymateuses se différencient en cellules neuronales sur de la MEC souple. A l'inverse, une matrice rigide induit une différenciation en cellules musculaires ou osseuses (Engler AJ et al., 2006).

La rigidité matricielle est impliquée dans la stabilisation endothéliale. Son augmentation peut à elle seule induire des comportements pro-angiogéniques (Lee PF et al., 2013 ; Abdeen AA et al., 2014). Dans les cancers, la rigidité de la MEC favorise une angiogenèse anarchique pour former des vaisseaux tumoraux avec des défauts de perméabilité vasculaire due notamment à une localisation altérée des VE-cadhérines (Bordeleau F et al., 2017) et à une augmentation de l'internalisation du VEGF pro-angiogénique par la cellule endothéliale (Sack KD et al., 2016). Ces phénomènes ont lieu au cours d'une transition identitaire de type endoMT dépendante de la rigidité de la matrice (Wei SC et Yang J, 2016 ; Zhong A et al., 2018). De plus, l'augmentation de la rigidité de la MEC est un mauvais

pronostique dans les cancers. Le collagène déposé de manière linéaire est enrichi dans les stroma cancéreux. Cette disposition rigidifie la MEC et favorise la migration et la dissémination des cellules cancéreuses (Egeblad M et al., 2010).

L'amincissement et la rigidification de la MEC observée au cours du vieillissement, peut être à l'origine des pathologies liées à l'âge. En effet, les fibroblastes et les cellules endothéliales, qui entrent en sénescence, induisent un environnement pro-inflammatoire délétère pour le renouvellement de la MEC (Campisi J et D'Adda di Faggagna F, 2007 ; Erusalimsky JD et Skene C, 2009). Ces cellules sénescents sécrètent des protéases, des facteurs de croissance, des interleukines, des cytokines et des ROS (Untergasser G et al., 2005), dont la combinaison compromet l'intégrité de la MEC (Callaghan TM et Wilhelm K.P, 2008). De plus dans les tissus âgés, les fibres de collagènes arborent un réseautage aberrant qui génère une matrice rigidifiée, moins élastique et fragile (Callaja-Agius J et al., 2007). L'altération des propriétés mécaniques et chimiques de la MEC induit des défauts de l'intégrité des jonctions des épithéliums qui y reposent. En effet, la rigidification de la MEC au cours du vieillissement induit une augmentation de la contractilité cellulaire et une dislocation des jonctions intercellulaires. Ce phénomène augmente la perméabilité endothéliale et favorise la transmigration leucocytaire favorable à l'athérosclérose (Huynh J, et al., 2011). De plus, une augmentation de la rigidité de la MEC augmente la réponse inflammatoire médié par le LPS et favorise l'expression de ICAM-1, VCAM-1 et la production de IL-8 pour faciliter l'adhésion et la transmigration de leucocytes, l'étape initiale de l'inflammation impliqué dans les maladies vasculaires (Meng F et al., 2015).

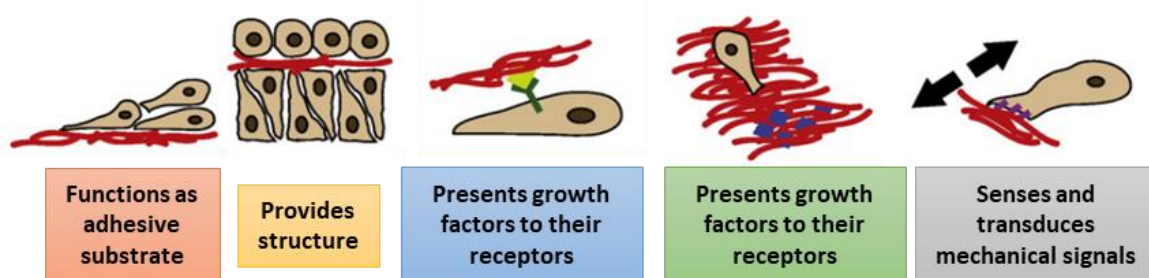


Figure 15 : Les effets de la MEC sur les comportements cellulaires. Adaptation de Rozario T et DeSimone DW al., 2009.

2. Composante cellulaire de la niche environnementale

L'endothélium est entouré de différents types cellulaires qui assurent l'intégrité des vaisseaux par une communication intercellulaire. En fonction de la taille du vaisseau, les cellules du stroma sont plus ou moins présentes. Aussi en fonction du tissu vascularisé, les cellules endothéliales seront assistées par divers types cellulaires.

2.1. Les cellules murales

Les cellules endothéliales sont recouvertes par des cellules murales. On distingue 2 types de cellules murales : les péricytes et les cellules musculaires lisses vasculaires (VSMC). Les artères et les veines sont recouvertes de VSMCs alors que les péricytes arborent les vaisseaux plus petits comme les capillaires et les précapillaires. Au niveau des vaisseaux intermédiaires (artérioles et veinules), les

cellules murales présentent des caractéristiques intermédiaires commune. En effet, les cellules murales seraient à l'origine des cellules mésenchymo-angioblastes (Kumar A et al., 2017).

2.1.1. Les péricytes

Les péricytes (PCs) ont une fonction majeure dans l'intégrité de la paroi vasculaire. Le recouvrement des PCs sur la surface abluminale des cellules endothéliales permet de limiter la perméabilité du vaisseau (Figure16). En effet, ils sont impliqués dans l'assemblage et le remodelage de la lame basale en interaction avec les cellules endothéliales (Winkler EA et al., 2011). C'est pourquoi, ils sont particulièrement présents dans les capillaires du CNS (système nerveux central) où l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique est primordiale.

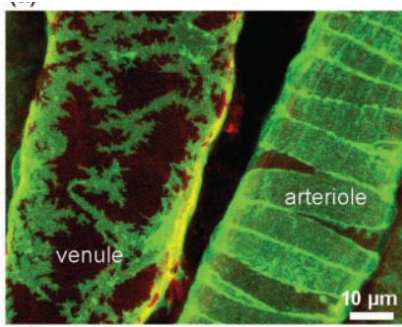


Figure 16 : Les péricytes. Image de péricytes exprimant la GFP sous le promoteur du protéoglycane NG2 sur une artériole ou une veinule. D'après Hill R.A et al., 2015.

La communication entre les PCs et les cellules endothéliales est primordiale pour les processus d'angiogenèse et de stabilisation des vaisseaux sanguins (Gerhardt H et Betsholtz C, 2003). Les péricytes sont capables d'interagir directement avec les cellules endothéliales par le biais de jonctions gap et jonctions adhérentes intercellulaires (Li F et al., 2011, Winkler EA et al., 2011) enrichies en N-cadhérine et β -caténine (Gerhardt H et al., 2000). Une communication moléculaire paracrine s'établit entre les PCs et les cellules endothéliales. L'établissement de ce dialogue est nécessaire tant pour la stabilité et la prolifération des péricytes que pour la quiescence endothéliale (Armulik A et al., 2005). Plusieurs voies de signalisation ont été largement décrites dans ce dialogue tels que le PDGF-B (Betsholtz C et al., 2004), la voie TGF- β , l'angiopoiétine 1-2/Tie2 et la voie Notch.

2.1.2. Les cellules musculaires lisses vasculaires (VSMCs)

Les cellules musculaires lisses vasculaires (VSMCs) sont présentes en multicouches au niveau des artères et des veines dans la couche tunica média. Compte tenu de la physiologie des artères et des veines, les VSMCs sont séparées des cellules endothéliales par la lame basale additionnée de la lame élastique interne (IEL). Le rôle majeur des VSMCs est la régulation du flux sanguin par une activité contractile en régulant le diamètre des vaisseaux. De plus, les VSMCs représentent un support pour la maturation et la stabilité des vaisseaux sanguins. Des expériences de co-cultures cellulaires ont montrées que les VSMCs sont capables d'inhiber l'expression de facteurs pro-angiogéniques et d'altérer la prolifération des cellules endothéliales pour favoriser la stabilisation du vaisseau (Heydarkhan-Hagvall S et al., 2003 ; Orledge A and D'Amore PA, 1987). Au cours du développement, les VSMCs sont impliquées dans la spécification artério-veineuse des cellules endothéliales (Mancini ML et al., 2009).

A l'état quiescent, elles sont dans un état contractile, cependant, en réponse à des stimuli largement définis, elles peuvent passer vers un état dit "synthétique". Cet état est caractérisé par une forte prolifération et la sécrétion de composants de la MEC (Beamish JA et al., 2010).

2.2 La Barrière Hémato-encéphalique (BHE) et l'unité neurovasculaire (NVU)

La barrière hémato-encéphalique (BHE) est une structure multicellulaire aussi appelée unité neurovasculaire (NVU). C'est une barrière sélective constituée de cellules endothéliales spécialisées, de cellules gliales astrocytaires et de cellules neuronales (Figure 17). Les cellules du tissu nerveux comme les cellules microgliales et les astrocytes sont adjacentes à la lame basale des cellules endothéliales, et sécrètent des facteurs vasoactifs qui modulent les jonctions endothéliales et la perméabilité de la paroi vasculaire (Abbott NJ et al., 2002). Ainsi, en contact avec les cellules du tissu neuronal, les cellules endothéliales de la BHE se spécialisent. Elles expriment de nombreuses jonctions serrées pour être particulièrement jointives.

Les astrocytes sont des cellules gliales retrouvées dans le système nerveux central (CNS). De manière générale, ils régulent l'environnement du tissu nerveux (régulation du pH et de l'homéostasie ionique du microenvironnement). Ils font partie intégrante de la NVU. Les pieds astrocytaires se lient à la surface abluminale des vaisseaux sanguins du CNS et stabilisent la BHE en favorisant la formation des jonctions interendothéliales par la stimulation de l'expression de protéines jonctionnelles tels que les occludines, la claudine 5 et la ZO-1 (Willis CL et al., 2004). De plus, ils stimulent les interactions péricytes-cellules endothéliales (Ramsauer M et al., 2002). Le contact avec les astrocytes favorise la polarisation de la cellule endothéliale par l'expression de transporteurs spécifiques au niveau de la membrane abluminale et luminale des ECs (Abbott NJ et al., 2010). De plus, les astrocytes assurent la médiation du signal neuronal vers la paroi vasculaire pour réguler le flux sanguin (McVicar BA et Newman EA, 2015). En effet, les neurones en activité libèrent de l'oxyde nitrique (NO) qui stimule la sécrétion de facteurs vasoactifs par les cellules astrocytaires. La sécrétion de ces facteurs déclenche une décontraction des VSMCs pour dilater des vaisseaux et une diminuer le flux sanguin cérébral (Zonta M et al., 2003 ; Takano T et al., 2006 ; Gordon G. Ret al., 2007).

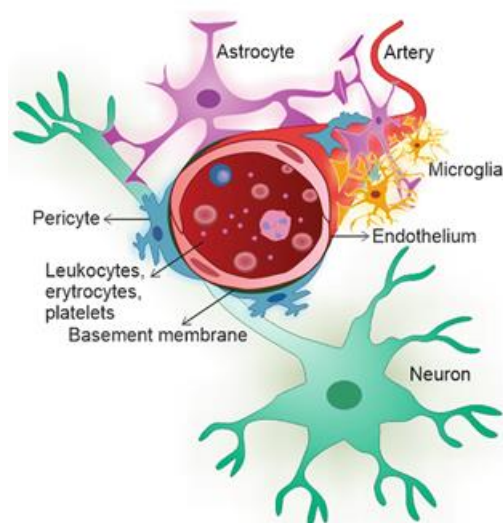


Figure 17 : La barrière hémato-encéphalique (BHE). Représentation des éléments cellulaires de la barrière-hémato-encéphalique. D'après Barichello T et al., 2018.

3. Les forces hémodynamiques

Les cellules endothéliales sont soumises à des forces hémodynamiques générées par un flux sanguin pulsatile issu des battements cardiaques. La pression sanguine génère une force d'étirement cyclique perpendiculaire à l'endothélium alors que le flux sanguin engendre des contraintes de cisaillement parallèles à cet endothélium (Figure 18) (Hahn C et Schwartz M.A, 2009). Au cours du développement, l'adaptation des cellules endothéliales et des VSMCs à ces forces permet la hiérarchisation de l'arbre vasculaire par angio-adaptation (Zakrzewicz A et al., 2002). Ces forces modulent les comportements cellulaires pour remodeler le système vasculaire en activant des voies de signalisation allant jusqu'à modifier le programme d'expression génique de la cellule endothéliale.

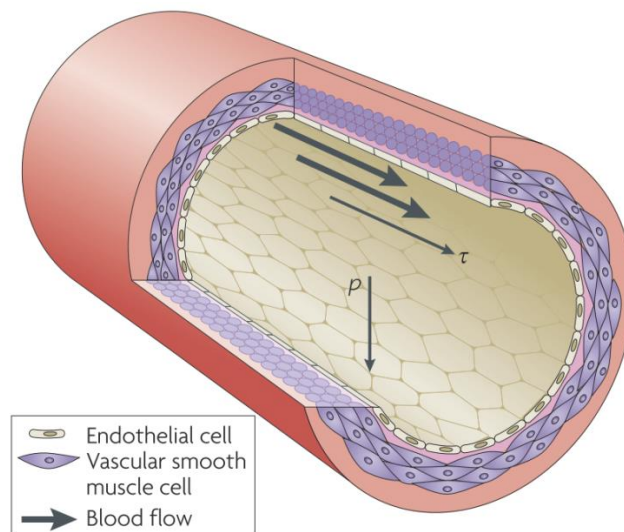


Figure 18 : Les forces hémodynamiques. La *pression pulsatile sanguine* (p) génère un étirement cyclique, une force perpendiculaire à la paroi vasculaire. Les forces de cisaillement induit par la viscosité et la vitesse du flux sanguin, est parallèle à la paroi vasculaire. D'après Hahn C and Schwartz M.A., 2009.

L'intensité des forces de cisaillements appliquées sur les cellules endothéliales, dépend de la viscosité sanguine additionnée de la vitesse et de la continuité du flux sanguins. En effet, les bifurcations vasculaires du réseau perturbent la nature et la continuité du flux (Figure 19). Les régions vasculaires où le flux est faible voir absent, sont des zones prédisposées au phénomène d'artériosclérose (Conway DE et Schwartz MA., 2013). A l'inverse, un flux linéaire et laminaire favorise l'expression de voies de signalisation vasoprotectrices activées entre autres par les facteurs de transcription KLF (Krüppel-like factor) (Ohnesorge N et al., 2010). Les facteurs de transcription de la famille des KLF active des voies de signalisation antioxydantes, induisent la quiescence et la stabilisation de l'identité endothéliale (Fan Y et al., 2017).

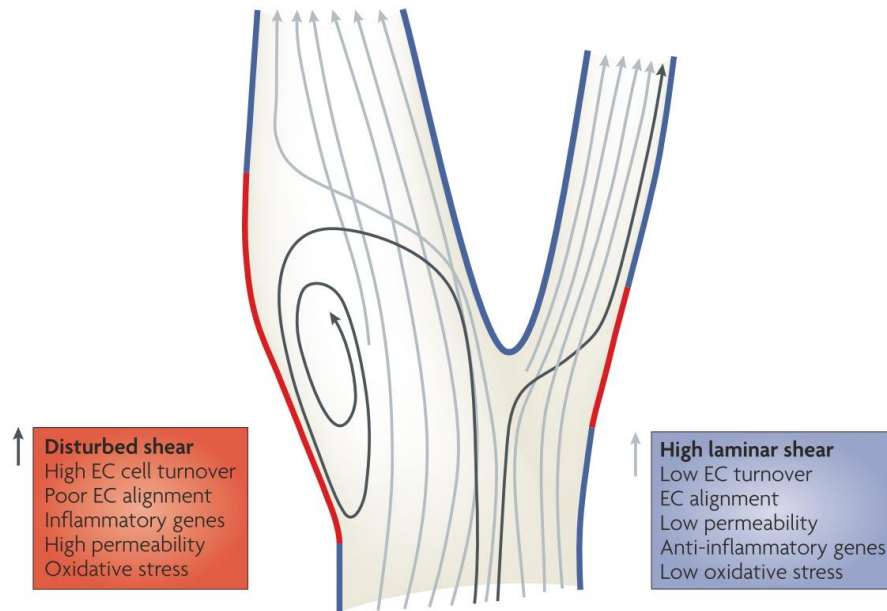


Figure 19 : Les forces de cisaillement sur la cellule endothéliale. L'arborisation du réseau vasculaire génère des flux de différentes natures. Les cellules endothéliales situées dans des zones de ramification sont soumises à un flux perturbé qui induit une altération de l'homéostasie endothéliale. A l'inverse, un flux laminaire est vasoprotecteur sur les cellules endothéliales. D'après Hahn C and Schwartz MA, 2009.

La transformation des signaux mécaniques perçus par la cellule endothéliale en signaux biochimiques est appelée mécanotransduction et fait l'objet d'intenses études depuis une trentaine d'année. Ces études continuent encore aujourd'hui à dévoiler des processus fondamentaux du fonctionnement des cellules en général et des cellules endothéliales en particulier.

Chapitre III : Rôle de la mécanotransduction sur la fonction endothéliale

La cellule endothéliale baigne dans un environnement riche en stimuli mécaniques. Afin de répondre à ces signaux, la cellule exprime un panel de senseurs à sa surface pour scanner et interpréter son environnement. Après réception du signal, la cellule intègre le message et convertit le signal mécanique en signal biochimique pour déclencher une réponse cellulaire appropriée, un processus appelé mécanotransduction. La morphologie de la cellule endothéliale s'adapte à ces forces environnementales pour lui permettre d'assurer sa fonction de barrière. Des défauts de sensibilité ou de réponse aux contraintes mécaniques environnementales sont reconnus dans de nombreuses maladies vasculaires.

1. La réception du signal mécanique par la cellule endothéliale

Les forces mécaniques environnementales sont réceptionnées par la cellule endothéliale grâce à des mécanorécepteurs, des récepteurs sensibles aux forces mécaniques, de différentes natures. Ils sont localisés à la surface basale pour détecter la rigidité matricielle mais aussi à la surface luminale pour détecter les forces induites par le flux sanguin (Figure 20).

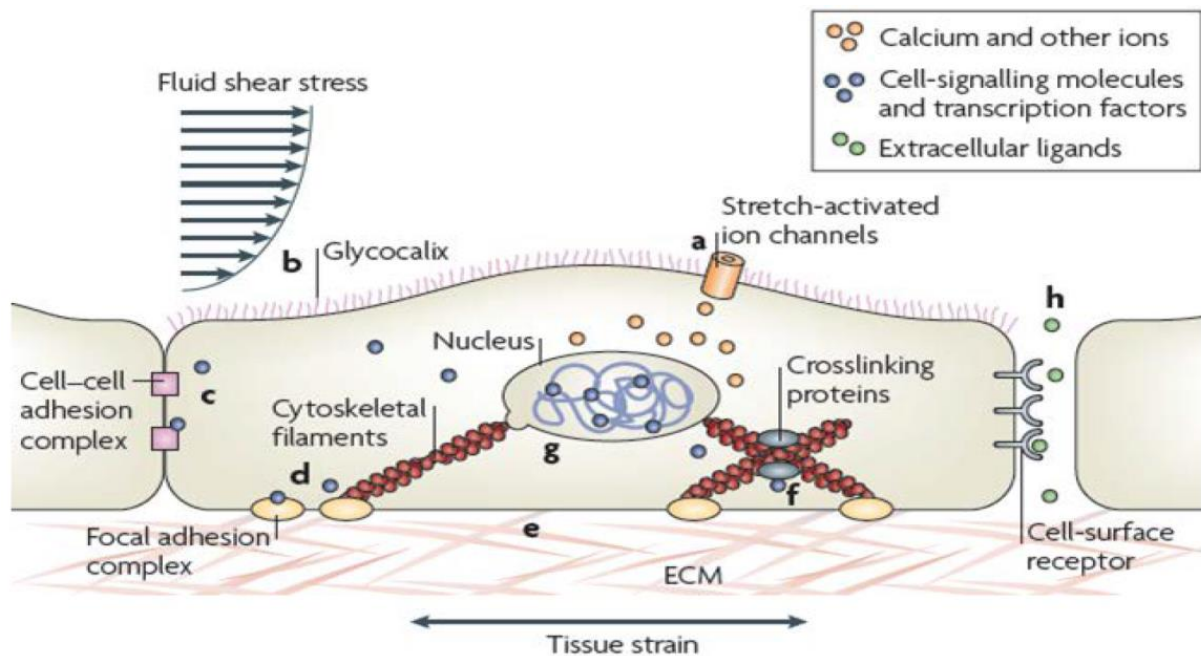


Figure 20 : Les mécanorécepteurs à la surface cellulaire. A l'interphase cellule-matrice, les cellules endothéliales expriment des complexes adhésifs constitués de récepteurs intégrines (les complexes d'adhésion focales). Ces complexes sont reliés au cytosquelette et permettent à la cellule de mesurer la rigidité de la MEC. Aux jonctions intercellulaires, des complexes protéiques permettent de détecter l'étirement inter-endothélial pour sauvegarder l'intégrité de la paroi vasculaire. À la surface luminale, des récepteurs de différentes natures ainsi que le glycocalyx permettent de détecter la force du flux sanguin. D'après Jaalouk DE et Lammerding J, 2009.

1.1. Les intégrines

Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires que l'on retrouve à la surface basale et parfois à la surface luminale de la cellule. Les intégrines sont des hétérodimères composés d'une sous-unité α et d'une sous-unité β . Chez les vertébrés, il existe 18 sous-unités α et 8 sous-unités β pouvant générer 24 hétérodimères différents. Chaque hétérodimère se lie préférentiellement à un type de protéine matricielle (Figure 21A) permettant à la cellule de s'ancrer à la MEC et d'activer des voies de signalisations spécifiques. Ainsi, le collagène et la lamine activent des intégrines favorables à la quiescence cellulaire. A l'inverse, la fibronectine, le fibrinogène et la vitronectine activent des intégrines favorables à la prolifération et la migration cellulaire (Stupack DG et Cheresch DA, 2002).

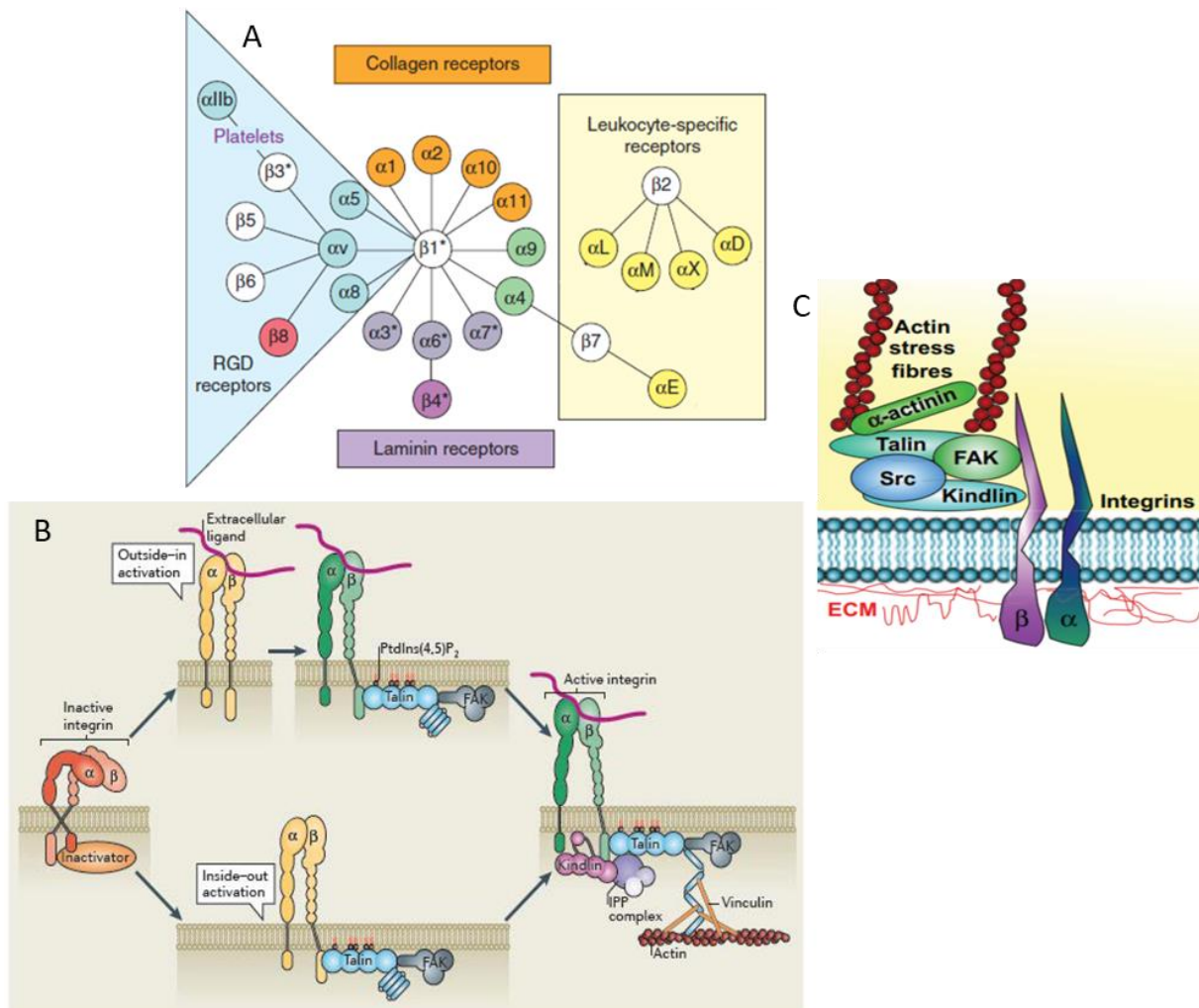


Figure 21 : Les intégrines. (A) Les hétérodimères d'intégrines et leurs spécificités matricielles. D'après Hynes RO and Naba A, 2012. **(B)** Régulation des intégrines. Lorsque la cellule s'attache à la MEC, elle engage la partie extracellulaire de ses intégrines qui se lie aux protéines matricielles. Cette liaison déclenche une ouverture des domaines cytoplasmiques de l'intégrine capables alors de recruter des effecteurs en aval. Ces effecteurs sont structuraux et signalétiques. Ils favorisent l'ancrage de l'actine au récepteur intégrine. D'après Bouvard D et al., 2013. **(C)** Effecteurs structuraux et signalétiques recrutés par les intégrines. Représentation schématique des composants moléculaires de l'adhésome recruté par l'activation des intégrines. Les protéines structurales sont recrutées telles que la kindline, la taline, l' α -actinine, la vinculine et la tensine. Son recrutées aussi les kinases FAK et Src capables d'activer des voies de signalisations multiples. D'après Canel M et al., 2013.

En absence de ligand, l'intégrine est maintenue sous une forme inactive par la liaison de protéines inhibitrices sur son domaine cytoplasmique (Bouvard D et al, 2013). En effet, les protéines inhibitrices SHARPIN et MDGI lient la chaîne α alors que les protéines DOC1 et ICAP-1 lient la chaîne β .

Pour activer l'intégrine, la liaison au ligand extracellulaire conduit, par des changements allostériques, à la rupture du pont salin présent entre les domaines transmembranaires des chaînes α et β . La séparation des domaines cytoplasmiques déclenche une signalisation intracellulaire outside-in (activation de l'extérieur vers l'intérieur) qui stimule le recrutement d'un méga complexe moléculaire sur la queue cytoplasmique de la chaîne α . De la même manière ce déploiement transmembranaire est obtenu lorsque des interacteurs moléculaires intracellulaires se lient au domaine cytoplasmique de l'intégrine (activation inverse inside-out) (Figure 21B) (Zhu J et al., 2007 ; Swartz MA, 2010).

Ainsi, le domaine cytoplasmique de l'intégrine joue un rôle de plateforme qui recrute des complexes protéiques multiples regroupés sous le terme "adhésome" (Zaidel-Bar R et Geiger B, 2010 ; Horton ER et al., 2016). Parmi les partenaires intracellulaires, on distingue des protéines structurales telles que la taline, la kindline, la vinculine, la tensine et l' α -actinine capables de lier et d'organiser la F-actine. D'autres partenaires sont des molécules de signalisation telles que les kinases FAK, Src et ILK qui déclenchent une variété d'événements moléculaires pour réguler les fonctions cellulaires de base telles que la prolifération, la survie ou la migration (Figure 21 C) (Harburger DS et Calderwood DA, 2009).

1.1.1. Les intégrines dans l'homéostasie endothéliale

Lorsqu'elles sont dans un état quiescent, les cellules endothéliales expriment les hétérodimères de type $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ et $\alpha 6\beta 4$ (Short SM et al., 1998). Ces hétérodimères régulent des voies de signalisations bénéfiques pour la stabilité endothéliale. Par exemple, l'activation de l'intégrine stimule les kinases AKT et PKA impliquées dans la phosphorylation pro-activatrice de l'enzyme eNOS pour la production d'oxyde nitrique (NO) nécessaire à l'homéostasie endothéliale (Fleming I et al., 2010). Cependant, lorsqu'un remodelage matriciel s'établit dans certaines pathologies, la reconnaissance de la fibronectine par les cellules endothéliales induit l'activation des hétérodimères $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ et $\alpha v\beta 5$. L'activation de ces intégrines déclenche alors une réponse inflammatoire défavorable à la stabilité endothéliale. Les cellules endothéliales expriment des récepteurs leucocytaires (ICAM1, V-CAM1), des cytokines et des interleukines (IL1- β) (Figure 22). Cet état inflammatoire induit une altération de la perméabilité de l'endothélium responsable de pathologies cardiovasculaires comme l'athérosclérose.

Table 1 Endothelial integrins in atherosclerotic disease			
Phenotype	Matrix	Integrins	Known functions in atherosclerosis models
Quiescent	Collagen IV	$\alpha 2\beta 1, \alpha 10\beta 1$	Enhanced flow-induced PKA signaling Enhanced flow-induced eNOS phosphorylation Reduced $\alpha v\beta 3$ activation
	Laminin-8/10	$\alpha 3\beta 1, \alpha 6\beta 1, \alpha 6\beta 4$	None described
Endothelial activation	Fibronectin	$\alpha 5\beta 1$	Inhibition of PKA signaling Flow-induced NF- κ B activation ICAM-1/VCAM-1 expression Inflammasome Activation oxLDL-induced NF- κ B activation Atherosclerotic angiogenesis
	Fibronectin, Vitronectin, Fibrinogen, Thrombospondin-1	$\alpha v\beta 3$	Flow-induced NF- κ B activation ICAM-1/VCAM-1 expression Flow-induced PAK2 activation; Permeability Atherosclerotic angiogenesis
	Vitronectin	$\alpha v\beta 5$	None described

Figure 22 : Les intégrines exprimées et activées à la surface endothéliale. Les cellules endothéliales expriment un panel d'hétérodimères d'intégrines à leur surface. En fonction de la composition de la MEC, certains hétérodimères d'intégrines vont s'activer en réponse au ligand matriciel reconnu. Cette activation régule l'homéostasie endothéliale mais peut déclencher une activation endothéliale qui altère la stabilité du tissu. D'après Finney AC et al., 2017

1.1.2. Rôle des intégrines dans la transduction du signal mécanique : les adhésions focales

Les intégrines sont capables de détecter la rigidité de la matrice pour activer de nombreuses voies de signalisation. L'application de forces de traction sur l'intégrine renforce sa liaison au ligand matriciel et induit le recrutement de protéines structurales additionnelles telles que la vinculine et la filamine-A. Ce recrutement favorise la production de complexes adhésifs stables et la polymérisation du réseau d'actomyosine (Riveline D et al., 2001; Chen W et al., 2012 ; Grashoff C et al., 2010 ; Ross TD et al., 2013).

En effet, le regroupement des intégrines en réponse à l'environnement forme des structures adhésives connectées à un réseau d'actomyosine polymérisé et tangentiel à la membrane plasmique. Ces structures adhésives existent sous 4 états de maturation plus ou moins dynamiques caractérisées par une localisation cellulaire stéréotypée. Ainsi, le regroupement des intégrines induit d'abord la formation d'une "structure adhésive naissante" dans le lamellipode qui deviendra un "complexe focal". Ce complexe focal se connecte au cytosquelette d'actine pour devenir une "adhésion focale" dans le lamellum. Enfin, l'application d'une traction centripète, vers l'intérieur de la cellule, sur cette adhésion focale stimule sa maturation pour devenir une "adhésion fibrillaire". Cette maturation est dépendante des forces physiques induites par la rigidité de la matrice. Les cellules qui reposent sur une matrice souple vont préférentiellement produire des structures adhésives immatures et des complexes focaux dont le temps de demi-vie est plus court (moins d'une minute). A l'inverse, sur une matrice rigide, on voit apparaître des adhésions focales et des adhésions fibrillaires qui peuvent durer dans le temps (maximum 20 minutes) (Figure 23) (Geiger B et al., 2009).

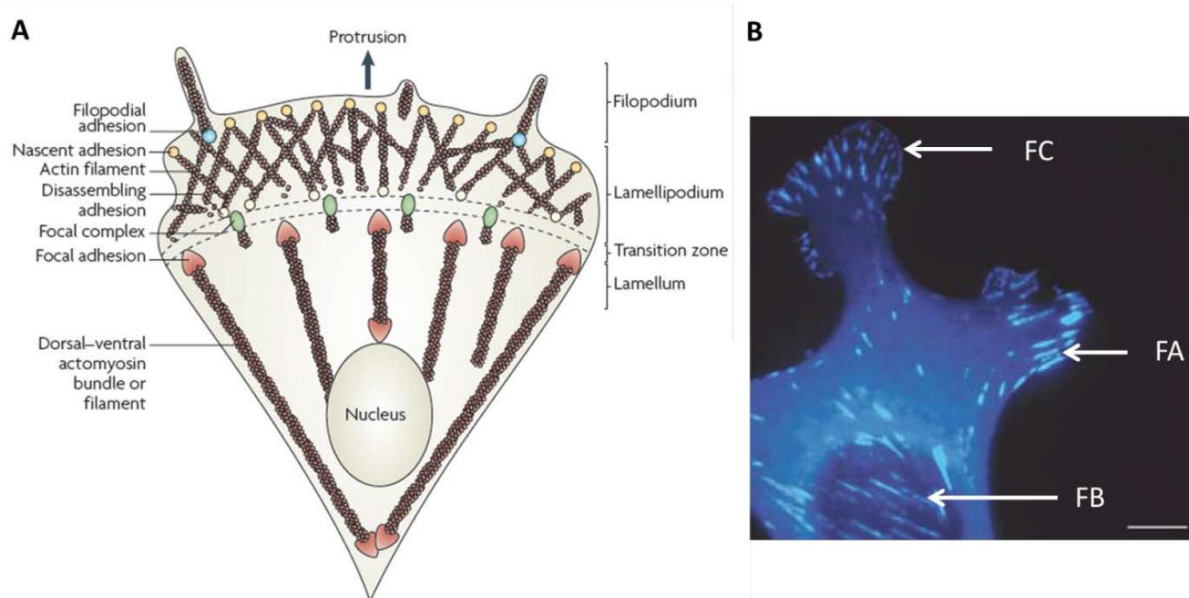


Figure 23 : Maturation des structures d'adhésions focales. (A) Représentation schématique des différents états de maturation des structures adhésives focales présentes dans la cellule. Alors que les adhésions naissantes sont localisées en périphérie, les structures adhésives se déplacent vers le centre de la cellule au fur et à mesure de leur état de maturation. D'après Parson JT et al., 2010. (B) Immunomarquage permettant de mettre en évidence les différentes structures adhésives et leurs localisations intracellulaires. FC : complexe focale ; FA : Adhésion focale ; FB : adhésion fibrillaire.

1.2. Les jonctions inter-endothéliales

Les cellules endothéliales forment une monocouche cohésive relativement perméable où seules les petites protéines (<3nm) sont capables de passer la barrière endothéliale par transport passif (Del Vecchio PJ et al., 1987). Cette semi-perméabilité est garantie par des complexes protéiques situés aux jonctions interendothéliales et permet de contrôler les échanges entre le compartiment sanguin et les tissus. De plus, en réponse aux forces environnementales, les jonctions intercellulaires transmettent l'information d'étirement à la cellule endothéliale pour renforcer les jonctions ou induire un comportement cellulaire adaptatif pour le maintien de la monocouche endothéliale.

Les jonctions interendothéliales contiennent différents complexes jonctionnels : les jonctions adhérentes (AJs : *Adherens junctions*), les jonctions serrées (TJs : *Tight junctions*) et les jonctions communicantes (GJ : *Gap junctions*). Les AJs et les TJs se structurent dans l'espace péricellulaire grâce à plusieurs protéines transmembranaires adhérentes homophiliques, alors que les GJs forment un canal protéique électrique ou chimique nécessaire à la communication intercellulaire (Franke WW et al., 1988). Les TJs sont formées par les Claudines, les Occludines, les JAMs (*Junctional adhesion molecules*) et les Nectines. Les AJs comportent moins de protéines homophiliques, elles sont constituées de Nectines et de VE-cadhérines. Enfin, les GJs sont constituées de Connexines. Il existe d'autres protéines adhérentes hors complexe jonctionnel telles que PECAM ou CD99 (Figure 24A). Les protéines adhésives VE-cadhérine et Claudine-5 sont spécifiquement exprimées dans les cellules endothéliales (Lampugnani MG et al., 1992 ; Morita K et al., 1999). Ces complexes jonctionnels sont reliés au cytosquelette grâce à des intermédiaires protéiques (Figure 30). Au niveau des AJs, la VE-cadhérine se lie aux filaments d'actine et à la vimentine. Cette liaison est assurée par un complexe protéique qui comprend la caténine- α et - β , la plakoglobine (caténine- γ), la caténine p120, la vinculine et l' α -actinine (Bazzoni G et al., 2004)(Figure 24B).

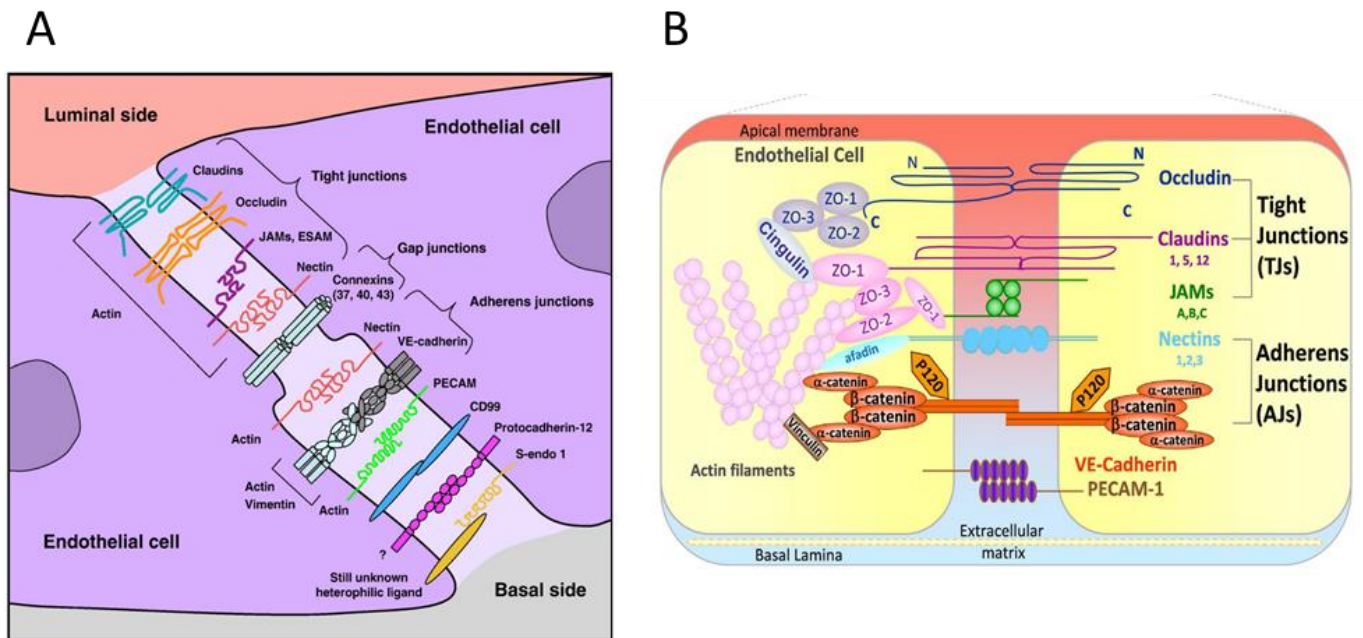


Figure 24 : Les différentes protéines et complexes jonctionnels endothéliaux. (A) Représentation schématique de l'espace intercellulaire endothélial présentant différents complexes jonctionnels. D'après Wallez Y et Huber P, 2008. (B) Structure et organisation des complexes jonctionnels reliés au cytosquelette. D'après Cerutti C et Ridley AJ, 2017.

1.2.1. Rôle de la VE-cadhérine dans l'homéostasie endothéliale

A la surface endothéliale, le complexe formé par le récepteur VEGFR2, la VE-cadhérine et PECAM joue un rôle crucial dans la stabilisation des jonctions interendothéliales (Gomez Perdiguero E et al., 2016). L'ouverture des jonctions est strictement régulée dans le temps et l'espace pour faire varier la perméabilité endothéliale et répondre aux besoins des tissus. La dynamique d'assemblage et de désassemblage des jonctions dépend de l'état de phosphorylation de VE-cadhérine, de sa dynamique, de sa synthèse et de sa dégradation (Orsenigo F et al., 2012). En effet, l'activation du VEGFR2 par le VEGF active la kinase Src qui à son tour phosphoryle la VE-cadhérine et la β -caténine. Cet état de phosphorylation entraîne la dissociation du complexe VEGFR2/VE-cadhérine/ β -caténine et l'internalisation de la VE-cadhérine pour augmenter la perméabilité endothéliale (Esser S et al., 1998, Gavard J et Silvio GJ, 2006). De la même manière, l'activation de la kinase FAK par le VEGF induit une augmentation de la phosphorylation de la VE-cadhérine, pour favoriser son internalisation, et de la β -caténine pour dissocier le complexe VE-cadhérine/ β -caténine (ChenXLet al., 2012). Cette dynamique est régulée par l'action de la phosphatase VE-PTP qui interagit physiquement avec la VE-cadhérine pour neutraliser son état de phosphorylation (Nawroth R et al., 2002).

La phosphorylation de la VE-cadhérine, et donc son internalisation, est favorisée par les facteurs pro-inflammatoires tels que le LPS, la thrombine, les histamines et le TNF- α qui augmentent la perméabilité de l'endothélium et favorisent la migration transendothéliale des cellules immunitaires (Dejana E et Vestweber D, 2013). De plus, les neutrophiles résidents dans les tissus peuvent cliver la VE-cadhérine en sécrétant les protéases MMP-2, -7 et -9 (Carden D et al., 1998). A l'inverse, les facteurs anti-inflammatoires assurent la stabilité des protéines jonctionnelles. En effet, les facteurs tels que le S1P (*sphingosine-1-phosphate*), l'angiopoïétine-1 ou le FGF inhibent l'internalisation de la VE-cadhérine et augmentent la stabilité des jonctions AJs (Gavard J et al., 2008 ; Hatanaka K et al., 2012).

1.2.2. Rôle de la VE-cadhérine dans la mécanotransduction

Les forces hémodynamiques générées par le flux pulsatif de sang dans les vaisseaux ont un rôle crucial pour remodeler des jonctions intercellulaires. En effet, un flux fort et laminaire renforce les jonctions interendothéliales en limitant la phosphorylation de la VE-cadhérine grâce à l'action de la phosphatase VE-PTP qui co-localise avec la VE-cadhérine (Orsenigo F et al., 2012 ; Caolo V et al., 2018). A l'inverse, lorsque le flux est faible, la kinase Src est activée et phosphoryle de la VE-cadhérine pour fragiliser les jonctions.

En réponse aux forces de cisaillement, la cellule endothéliale doit remanier son cytosquelette pour s'adapter aux forces environnementales. Pour cela, un complexe composé de PECAM, la VE-cadhérine, la PLEXIND1 et le récepteur VEGFR se forme et active la PI3K. Le PIP2, produit par la PI3K, active à son tour les intégrines. L'activation des intégrines favorise la production de fibres de stress contractiles transversales qui vont permettre à la cellule de s'allonger et de s'aligner parallèlement au flux sanguin (Tzima E et al., 2005 ; Mehta V et al., 2020) (Figure 25A).

En retour, l'état de contractilité du cytosquelette stabilise les AJs car la VE-cadhérine est reliée au cytosquelette d'actine par l'intermédiaire de la β -caténine. Les forces de traction appliquées perpendiculairement sur les AJs (par l'intermédiaire des fibres de stress), favorisent le recrutement mécano-dépendant de nouvelles protéines structurales comme la vinculine sur la queue cytoplasmique des VE-cadhérines (Huveneers S et al., 2012). Ce recrutement est dépendant de l' α -caténine dont le domaine cryptique de liaison à la vinculine est dévoilé sous tension (Yao M et al., 2014) (Figure 31). La liaison de la vinculine renforce les jonctions et permet de réguler la perméabilité vasculaire (Twiss F et al., 2012). Lorsque la force de traction augmente, de nouvelles protéines régulatrices du cytosquelette d'actine sont recrutées telles que les protéines VASP (*vasodilator-stimulated phosphoprotein*), la zyxine et la testine (TES) (Oldenburg J et al., 2015). De plus, ces tensions déclenchent la phosphorylation de l' α -caténine et de la vinculine qui sont impliquées dans l'activation de voies de signalisations favorables à l'homéostasie endothéliale (Barry AK et al., 2015). D'autres protéines qui se lient à l' α -caténine et qui sont recrutées par l'activation mécanique de la VE-cadhérine, sont des acteurs potentiels dans la mécanotransduction tels que EPLN (*epithelial protein lost in neoplasm*), ZO-1, l'afadine, l' α -actinine et la formine-1 (Huveneers S et al., 2013). De la même manière, les forces de tractions appliquées sur les jonctions PECAM-1 induisent l'activation de nombreuses voies de signalisations (Collins C et al., 2012)(Figure 25A).

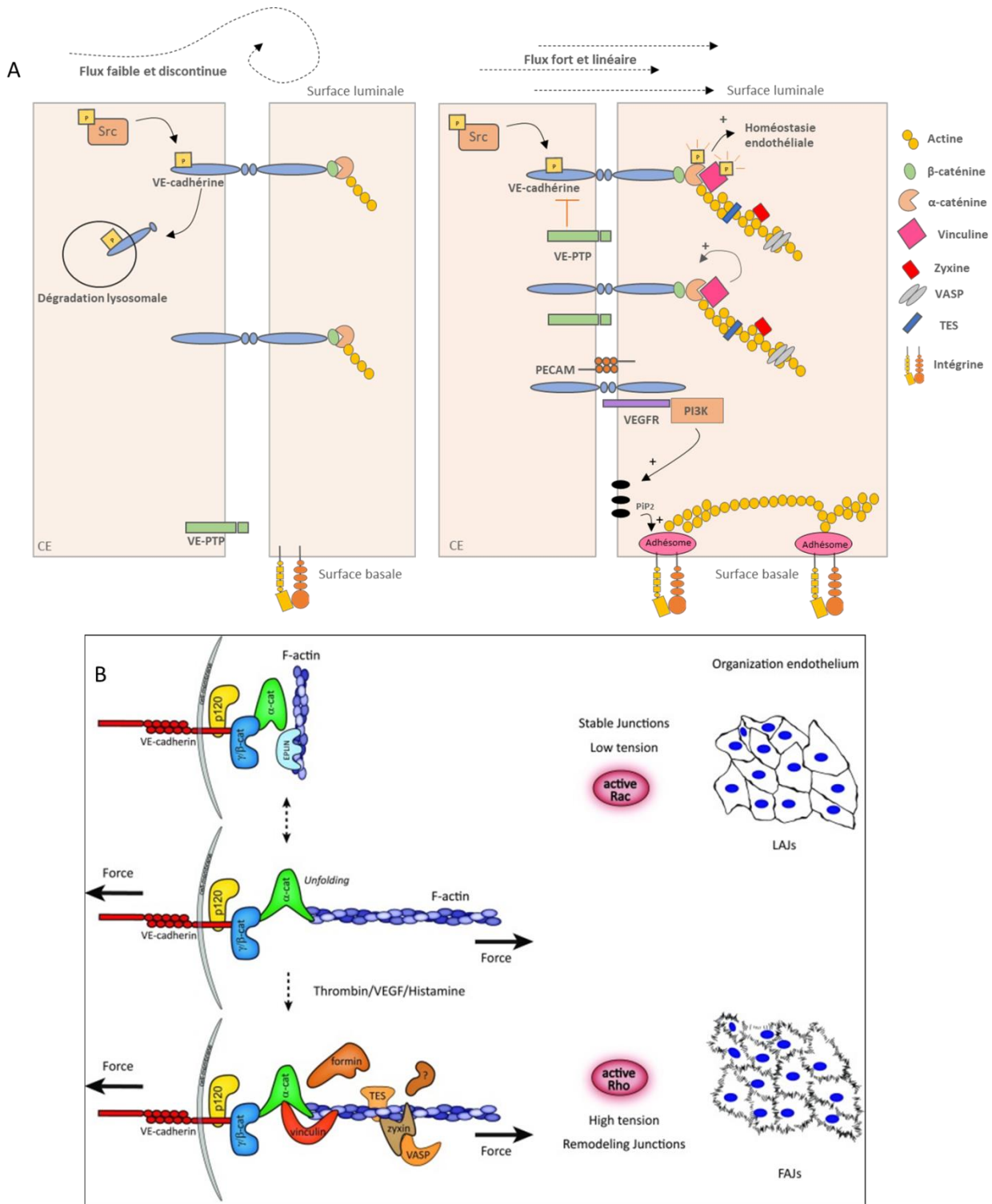


Figure 25 : Impact des forces intracellulaires sur la formation des jonctions VE-cadhérines. (A) Action des forces hémodynamiques sur la stabilité des jonctions VE-cadhérine. Un flux faible et discontinu active la kinase Src qui phosphoryle la VE-cadhérine pour déclencher son internalisation et sa dégradation lysosomale. A l'inverse, un flux linéaire favorise le recrutement de la phosphatase VE-PTP qui limite la phosphorylation de la VE-cadhérine et renforce les AJs. En réponse aux forces appliquées, l' α -caténine dévoile son domaine cryptique et lie la vinculine. Ensembles, ces protéines renforcent les AJs et activent des voies de signalisation favorables à l'homéostasie endothéliale. Lorsque la forces de traction perdurent, de nouvelles protéines régulatrices du cytosquelette d'actine sont recrutées : zyxine, VASP, testine (TES). Pour que la cellule s'aligne au flux sanguin, le complexe formé de PECAM, VE-cadherine et VEGFR active la PI3K qui produit du PIP2. Le PIP2 active l'intégrine qui produit des fibres de stress d'actomyosine transversales . **(B)** La formation et la stabilité des jonctions

VE-cadhérines est dépendante des tensions intracellulaires contrôlées par l'activité des GTPases Rho/Rac. L'activation de la GTPase Rac induit la formation d'actine corticales qui stabilise les VE-cadhérines et induit la formation de jonctions VE-cadhérines linéaires et stables. A l'inverse, l'augmentation des tensions intracellulaires résultant de la formation de fibres de stress dépendant de l'activité de la RhoA GTPases produit une force de traction sur la jonction VE-cadhérine et induit la formation de jonctions larges et discontinues (FAJs). D'après Dorland YL et Huveneers S, 2016.

Morphologiquement, l'augmentation des forces d'étirements du cytosquelette sur les jonctions VE-cadhérine engendre un élargissement et une discontinuité des jonctions intercellulaires avec un effet en fermeture éclair (Liu Z et al., 2012). Ce type de jonctions est appelée FAJ (*Focal adherens junctions*) (Huveneers S et al., 2012) et sont générées en réponse à la forte activité de la GTPase RhoA associée à la production de fibres de stress. A l'inverse, l'augmentation de l'activité de la GTPase Rac diminue la tension intracellulaire et limite la formation de protrusions cellulaires riches en actine corticale. Ce type d'actine supporte la stabilité des jonctions VE-cadhérines et conduit à la formation de jonctions adhérentes linéaires (LAJ) (Daneshjou N et al., 2015) (Figure 25 B).

1.3 Autres mécanorécepteurs

Parmi les autres mécanorécepteurs activés par le flux sanguin, on distingue des récepteurs mécanosensibles couplés à la protéine G (RCPG), les Récepteurs tyrosine kinase (RTK), le glycocalyx et les canaux ioniques à la surface luminale de la cellule endothéliale (Gudi S et al., 1998 ; Xu J et al., 2018 ; Chen KD et al., 1999; Hahn C et Swartz MA, 2009).

1.3.1 Les canaux ioniques

Les canaux ioniques sont capables de transmettre le message mécanique à la cellule indépendamment du cytosquelette. En effet, les forces de cisaillement ou la pression du flux sanguin induisent un étirement de la surface luminal et facilite l'ouverture des canaux. L'activité de ces canaux module la polarisation membranaire de la cellule endothéliale (influx Na⁺ ou K⁺) ou l'influx de Ca²⁺, pour activer de nombreuses voies de signalisation (Fisher AB et al., 2002). Parmi les canaux ioniques mécanosensibles, on distingue le canal potassique TREK-1, OSCA, TRPV et les canaux Piezo1 et Piezo2 (Garry A et al., 2007 ; Murthy SE et al., 2018 ; Christensen AP et al., 2007 ; Douguet D et al., 2019). Les études récentes suggèrent que les canaux TRPV et Piezo coordonnent le dialogue entre la VE-cadhérine et les intégrines pour répondre au flux sanguin. En effet, Piezo1 interagit avec le complexe tripartite VE-cadhérine-PECAM-VEGFR (Chuntharpursat-Bon E et al., 2019) alors que TRPV4 interagit avec l'intégrine β 1 sur la face basale (Baratchi S et al., 2017). Il a récemment été montré qu'un signal d'activation est envoyé par Piezo1 à TRPV4 (Swain SM et al., 2020) suggérant un rôle de ces canaux dans le dialogue entre la VE-cadhérine et les intégrines en réponse au flux sanguin.

1.3.2 Le glycocalyx

Les cellules endothéliales sont recouvertes d'une couche de glycoprotéines, de protéoglycanes et autres macromolécules membranaires qui sont organisées en réseau : le glycocalyx (Pries AR et al., 2000). Les syndecans et glypicans, qui composent le glycocalyx, sont directement reliés au cytosquelette d'actine pour transmettre le signal mécanique à la cellule (Thi MM et al, 2004). L'altération génétique ou pharmacologique du glycocalyx induit une désensibilisation de la cellule au flux sanguin montrant son rôle majeur dans la réponse au flux (Potter DR et al., 2015). On sait aussi que le syndecan et le glypican peuvent s'associer à l'intégrine β 1 pour réguler l'activité de la kinase FAK par l'intermédiaire de la PKC- α . L'activation de FAK stimule ensuite Akt, Rho et eNOS pour le

maintien de la barrière endothéliale et la survie endothéliale (Bass MD et al., 2002 ; Yang B et Rizzo V, 2013).

2. La transmission du signal

Une fois réceptionnées par les mécanorécepteurs, les forces sont transduites pour induire le remodelage du cytosquelette d'actomyosine. Ce remodelage est nécessaire pour équilibrer les forces intra et extracellulaires, un équilibre primordial pour l'homéostasie endothéliale. Pour cela, la voie RhoA-ROCK est sollicitée et favorise les remaniements du cytosquelette d'actine qui permettront à la cellule de modifier sa forme pour s'aligner parallèlement au flux allant même jusqu'à modifier la forme de son noyau.

2.1. L'actine

L'actine est un élément du cytosquelette avec les microtubules et les filaments intermédiaires. Elle est impliquée dans les processus de migration cellulaire, de division cellulaire, de différenciation et de morphogenèse car elle module la forme et la polarité de la cellule. Le pool d'actine cellulaire comprend de la G-actine globulaire monomérique qui se polymérise en filaments double brins d'actine fibrillaire appelée actine F. C'est une structure dynamique qui polymérise et dépolymérise constamment.

L'assemblage filamenteux de la F-actine à partir de G-actine est initié par le processus de nucléation lui-même contrôlé par des complexes de nucléation tels que le complexe Arp 2/3 et les formines (mDia1-3) (Pollard TD., 2007). L'élongation des filaments de F-actine est polarisée. Une extrémité (+) où s'ajoutent les monomères d'actine G pour la polymérisation et une extrémité (-) où l'actine F se dissocie. L'actine suit une dynamique de " tapis roulant " pour maintenir l'équilibre entre le pool d'actine G et d'actine F dans la cellule (Figure 26a). Cette dynamique est orchestrée par des protéines stabilisantes qui se lient aux filaments d'actines néoformés. Le filament peut être stabilisé par des protéines de coiffes spécialisées telles que: CapZ, tropomoduline, gelsoline et Eps8. Leurs interventions ralentissent cette dynamique de " tapis roulant ". A l'inverse, la cofiline est un facteur de dépolymérisation de l'actine (Figure 26b).

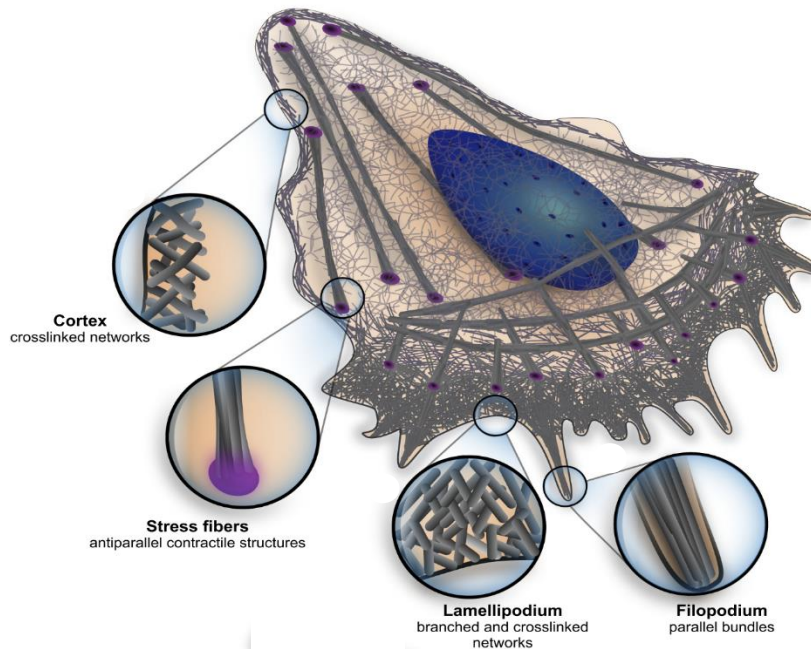


Figure 27 : Localisation subcellulaire des structures d'actine. En fonction de leur localisation dans la cellule, les filaments exercent plusieurs fonctions et acquièrent différentes structures. On distingue l'actine corticale qui forme un réseau d'actine relié ; l'actine dendritique au niveau des protrusions cellulaires de type lamellipodes ; des filaments d'actine disposés parallèlement favorisent la projection des structures filopodes et les fibres de stress qui sont ancrées aux AFs. D'après Blanchoin L et al., 2014.

2.1.1. Les fibres de stress d'actomyosine

Les fibres de stress sont des filaments d'actine où s'incorporent l' α -actinine et la myosine II (Figure 28A). La myosine II est une protéine motrice qui s'incorpore aux fibres d'actine pour leur conférer une fonction de contraction (Pellegrin S et Mellor H, 2007). Pour faire glisser les fibres d'actine et générer une contraction, les têtes de myosine comportent une activité ATPase. L'hydrolyse de l'ATP en ADP-Pi fournit l'énergie suffisante pour modifier la conformation de la tête de myosine et générer un pont "actine-myosine". Ensuite la libération de la molécule d'ADP s'accompagne de l'inclinaison de la tête de myosine qui fait glisser le filament d'actine. La liaison d'une nouvelle molécule d'ATP permet à la tête de myosine de se détacher de l'actine et de rentrer dans un nouveau cycle d'hydrolyse (Figure 28 B).

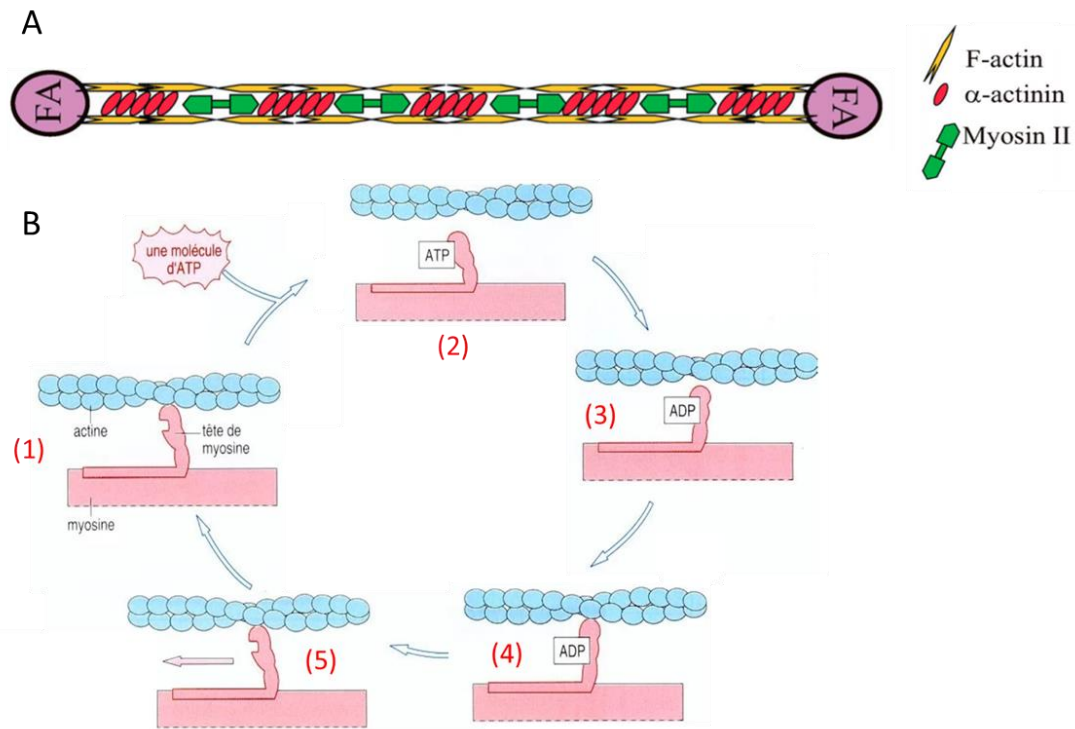


Figure 28 : Assemblage et contraction des fibres de stress d'actomyosine. (A) Représentation schématique des composants moléculaires des fibres de stress d'actomyosine. D'après Hotulainen P et Lappalainen P 2006. **(B)** Représentation schématique du mode de contraction des fibres de stress d'actomyosine. Au début du cycle, la tête de myosine est fixée à l'actine (1), la liaison d'une molécule d'ATP à la tête de myosine stimule sa dissociation au filament d'actine (2). L'hydrolyse de l'ATP et ADP+Pi par la tête de myosine favorise son changement de conformation (3) et lui permet de lier le filament d'actine (4). La libération de l'ADP déclenche de nouveau un changement de conformation de la tête de myosine qui reprend son inclinaison de départ (5).

Il existe différents types de fibres de stress dont l'organisation spatiale varie en fonction de leur localisation dans la cellule. On distingue les fibres de stress ventrales, les fibres dorsales, les fibres transversales arquées et les fibres périnucléaires (Figure 29). Les fibres ventrales sont contractiles et fonctionnent indépendamment des autres structures de fibres de stress, alors que les fibres dorsales, les fibres transversales et périnucléaires sont physiquement connectées et forment un réseau (Maninova M et Vomastek T, 2016). Les fibres de stress dorsales ne sont pas contractiles car incapables d'incorporer la myosine II (Hotulainen P et Lappalainen P, 2006). De plus, des différences entre les fibres de stress s'accroissent par l'incorporation de diverses isoformes de tropomyosine capables de recruter des complexes protéiques spécifiques (Gunning PW et al., 2015).

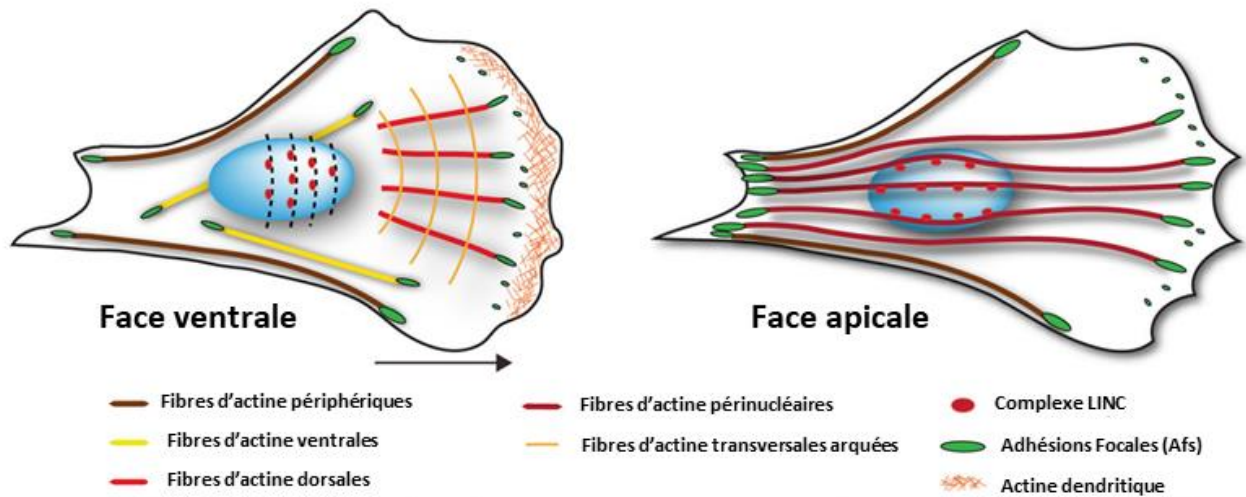


Figure 29 : Les différents types de fibres de stress. Représentation schématique des différents types de fibres de stress et leur localisation subcellulaire. D'après Maninova M et Vomastek et al., 2016.

2.2. La voie RhoA/ROCK pour la transmission du signal mécanique

Le remaniement du cytosquelette d'actine pour la transmission du signal mécanique au sein de la cellule est majoritairement contrôlé par l'activité des petites GTPases de la famille Rho qui comprend Rho, Rac et Cdc42.

2.2.1. Régulation de l'activité des petites GTPases Rho

Les petites GTPases de la famille Rho ont un rôle central dans la mécanotransduction de la cellule endothéliale. Alors que RhoA contrôle la mise en place des fibres de stress d'actines contractiles, les GTPases Rac et Cdc42 régulent la formation des protrusions d'actines, lamellipodes et filopodes respectivement.

La petite GTPase est activée par divers stimuli extracellulaires transmis par des récepteurs à la surface cellulaire tels que les RCPGs, les RTKs, les récepteurs cytokines et les intégrines (Amado-Azevedo J et al., 2014). Lorsque la petite GTPase se lie au GTP, elle est sous une forme active tandis qu'elle s'inactive lorsqu'elle hydrolyse ce GTP en GDP. La petite GTPase cycle ainsi constamment entre un état actif ou inactif. Cette liaison est contrôlée par plusieurs protéines régulatrices. Les GEFs (*guanine nucleotide exchange*) activent la petite GTPase en catalysant l'échange du GDP par un GTP. A l'inverse, les GAPs (*GTPases activating protéines*) inactivent la petite GTPase en stimulant l'hydrolyse du GTP en GDP (Figure 30). Spécifiquement à RhoA, il existe un RhoGDI (*guanine dissociation inhibitor*) qui séquestre l'ancre lipidique membranaire de la GTPase RhoA pour l'empêcher d'être activé par son GEF (Figure 30). Il existe de nombreux GEF et GAP, certains communs à plusieurs RhoGTPases, d'autre spécifiques d'une seule (van Buul JD et Timmerman I., 2016). Parmi eux, les GEFs LARG et GEF-H1 sont spécifiquement localisés dans les AFs et sont impliqués dans le mécanotransduction (Guilluy C et al., 2011).

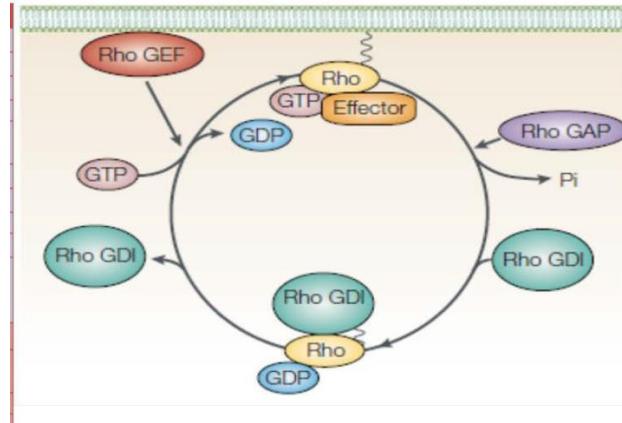


Figure 30 : Régulation des petites GTPases. Représentation schématisée de la boucle de régulation des petites GTPases Rho ainsi que le rôle des régulateurs GEFs, GAP et GDI dans ce processus. D'après Fukata M and Kaibuchi K., 2001.

2.2.2. Les kinases ROCK1 et ROCK2

De nombreux effecteurs de RhoA sont impliqués dans le remaniement du cytosquelette d'actine. Parmi eux : la kinase ROCK (*Rho-associated coiled-coil forming protein kinase*), la MLCP (*myosin light chain phosphatase*), la PKN (protéine kinase N), mDia, la kinase CRIK (*Citron Rho interacting kinase*) et la RTKN (*Rhotekin*).

Les kinases ROCKs font partie de la famille des kinases AGC sérine/thréonine. Elles comportent 2 isoformes : ROCK1 (alias ROCK α ou p160ROCK) et ROCK2 (alias ROCK β). Ces isoformes partagent 64% d'homologie de séquences en acide-aminés et 83% d'homologie pour leur domaine kinase. Le gène ROCK1 est situé sur le chromosome 18 (18q11.1) et code pour une protéine de 1354 acides aminés. Le gène ROCK2 est situé au niveau du chromosome 2 (2p24) et code pour une protéine composée de 1388 acides aminés. Les deux isoformes comprennent un domaine kinase en N-terminal suivi d'une région superhélice (*coiled-coil*) et d'un domaine RBD (*Rho-binding domain*) où se lie RhoA. En C-terminal, les protéines contiennent un domaine PH (Ishizaki T et al., 1997 ; Hartmann S et al., 2015) (Figure 31A).

2.2.2.1. Régulation des kinases ROCKs

Les kinases ROCKs sont majoritairement activées par les petites GTPase Rho (RhoA, RhoB et RhoC). Ces GTPases se lient au domaine RBD des kinases ROCKs pour leur conférer une forme ouverte et libérer leur domaine catalytique.

L'activation des kinases ROCK peut être médiée par des activateurs distincts. Par exemple, elles peuvent être clivées par des protéases de différentes natures. Ce clivage induit la libération d'une forme ouverte et constitutivement active. Ainsi ROCK1 est clivée par la caspase-3 dans des conditions d'apoptose cellulaire (Sebbagh M et al., 2001) et ROCK2 par la granzyme B et la caspase-2 (Sebbagh M et al., 2005 ; Sapet C et al., 2006) (Figure 31B).

La GTPase RhoE (Rnd3) est un régulateur spécifique de ROCK1. Elle se lie à ROCK1 directement pour inhiber son action ou indirectement par l'activation intermédiaire de la GAP p190Rho (Riento K et al., 2003 ; Riento K et al., 2005). Il existe plusieurs régulateurs spécifiques pour ROCK2 : la kinase Polo-like 1 (Plk1) (Lowery DM et al., 2007) mais aussi le facteur de transcription circadien BMAL, capable de lier le promoteur de ROCK2 pour activer son expression dans un rythme circadien (Xie Z et al., 2015).

De manière autonome, une transphosphorylation des ROCKs par oligomérisation peut favoriser leur activation (Chuang HH et al., 2012 ; Chuang HH et al., 2013). De plus, les domaines PH et RBD sur la partie C-ter de la protéine ROCK permettent une autorégulation inhibitrice du domaine kinase situé en N-ter (Wen W et al., 2008). Cette liaison stabilise une conformation fermée de la kinase (Figure 31C).

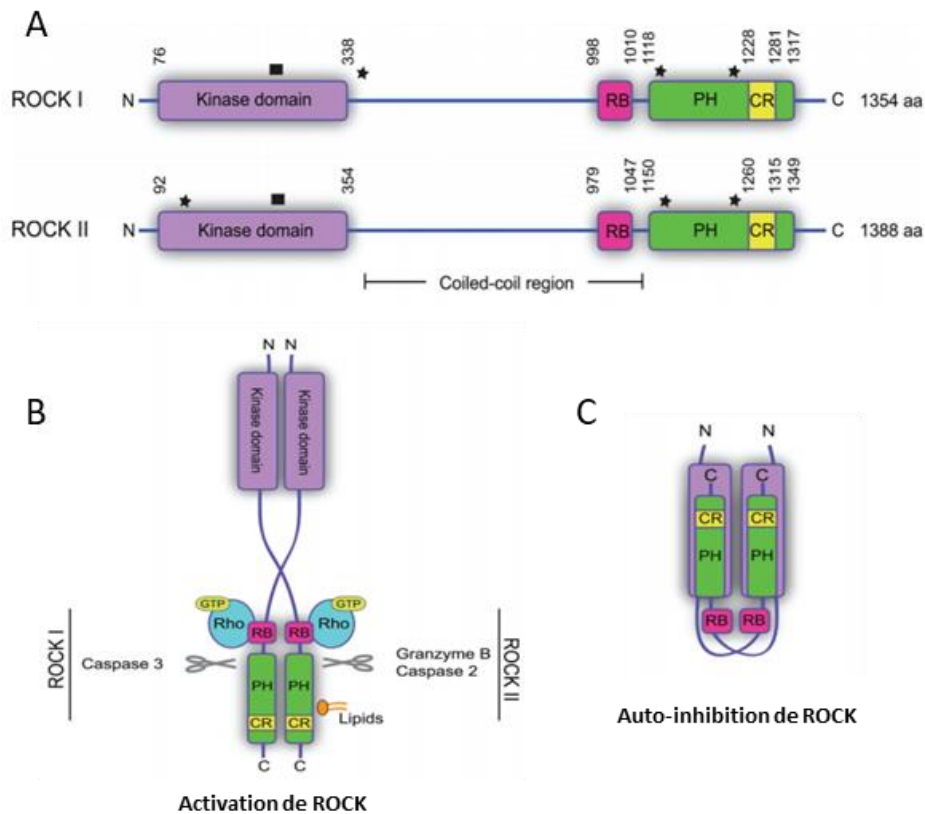


Figure 31 : Structure et activation des kinases ROCK1 et ROCK2. (A) Représentation schématique de la structure protéique des kinases ROCK1 et ROCK2. **(B)** Représentation de la conformation active des kinases ROCKs. Une activation constitutive peut être déclenchée par l'action de protéinases. **(C)** L'activation des kinases ROCKs est régulée par leur conformation qui peut être ouverte (active) ou fermée (inactive). D'après Morgan-Fisher M et al., 2013

2.2.2.2. Expression tissulaire et localisation subcellulaire des ROCKs

Les kinases ROCK1 et ROCK2 sont différemment exprimées en fonction du tissu. En effet, ROCK1 est exprimée de manière ubiquitaire à l'exception du cerveau et des muscles. A l'inverse, ROCK2 est majoritairement exprimée dans le cerveau, les muscles, le cœur, les poumons et le placenta (Nakagawa O et al., 1996 ; Julian L et Olson MF, 2014).

Ces kinases se distinguent aussi par leur localisation subcellulaire. D'abord, l'adressage membranaire des kinases ROCK1 et ROCK2 présentent une dynamique différente. En effet, les domaines PH de ROCK1 et ROCK2 sont caractérisés par des affinités variables pour les lipides membranaires. A l'inverse de ROCK1, ROCK2 a une grande affinité pour PIP3 et PIP2 (Yoneda A et al., 2005). Parmi les localisations subcellulaires distinctes entre les 2 isoformes, on retrouve ROCK1 proche de la membrane plasmique, au niveau des AFs, des fibres de stress d'actomyosine et exclusivement dans le cytosol. A l'opposé ROCK2 co-localise avec la VE-cadhérine, la vimentine et le compartiment nucléaire (Lisowska J et al., 2018 ; Iizuka M et al., 2012).

2.2.2.3. Les Effecteurs des kinases ROCKs

Les kinases ROCKs sont impliquées dans la formation des fibres de stress d'actomyosine pour moduler la contraction intracellulaire en régulant la production de phospho-MLC (*myosin-light chain*) (Amano M et al., 1996). Pour cela, les ROCKs peuvent directement phosphoryler la MLC ou inhiber la phosphatase MLCP (*myosin-light chain phosphatase*) (Kureishi Y et al., 1997). Les ROCKs peuvent aussi activer des inhibiteurs de phosphatases tel que CPI-17 (*C-potentiated phosphatase inhibitor of 17 KDa*) dont la phosphorylation augmente sa capacité inhibitrice de 1000 fois et favorise la contraction intracellulaire (Koyama M et al., 2000). Ainsi, la phosphorylation de la MLC est un marqueur majeur de l'activité de kinases ROCKs (Figure 32).

En régulant la contractilité intracellulaire, les ROCKs sont impliquées dans la formation et la stabilité des adhésions focales (AFs) et des jonctions intercellulaires. Ainsi, elles jouent un rôle majeur dans l'intégrité de la paroi vasculaire. Indépendamment de leur action pour la phosphorylation de la MLC, les ROCKs sont impliquées dans d'autres voies de signalisation pour réguler l'homéostasie tensionnelle de la cellule endothéliale. En effet, elles activent les protéines ERM (Ezrin, Radixin et Moesin), dont la phosphorylation par les ROCKs stimule l'ancrage des filaments d'actine à la membrane (Matsui T et al., 1998). Elles activent aussi les LIM kinases (LIMK1 et LIMK2) qui à leur tour inhibe la cofiline pour induire une augmentation de la production d'actine F (Maekawa M et al., 1999). Longtemps envisagées comme redondantes, de nombreuses données montrent aujourd'hui que ces deux isoformes ont en fait des fonctions complémentaires pour réguler l'homéostasie contractile de la cellule. En effet, la MLC est préférentiellement phosphorylée par ROCK1 pour générer des fibres de stress d'actomyosine contractiles ventrales alors que ROCK2 inhibe préférentiellement la cofiline pour favoriser la polymérisation de l'actine corticale et stabiliser les jonctions VE-cadhérine (Newell-Litwa KA et al., 2015 ; Yoneda A et al., 2005 ; Lisowska J et al., 2018)(Figure 32). De manière intéressante, dans les VSMC KO d'une isoforme ROCK, une compensation s'effectue par la surexpression de l'autre isoforme (Nunes KP et al., 2010). Quelques études ont permis de caractériser des effecteurs spécifiques des ROCKs. Une étude a montré que la forme clivée de ROCK1 dans les cardiomyocytes, induit l'activation du facteur de transcription SRF (*serum-response factor*) pour l'activer la voie TGF- β et favoriser l'état de fibrose (Yang X et al., 2012). Quant à ROCK2, il est décrit dans le compartiment nucléaire pour phosphoryler spécifiquement le remodeleur chromatinien p300 (Tanaka T et al., 2006).

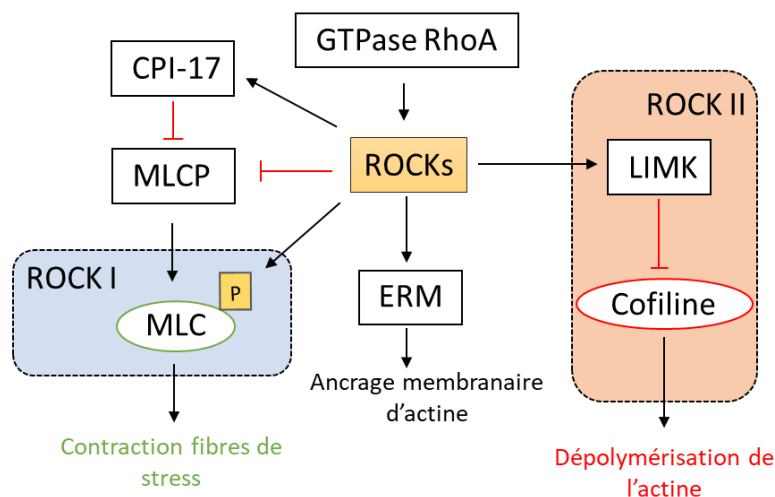


Figure 32 : Les effecteurs des kinases ROCKs pour la régulation du cytosquelette d'actine. Les kinases ROCKs régulent l'état de contractilité de la cellule. Pour cela, elles phosphorylent la MLC (myosin-light chain) pour augmenter la contractilité des fibres de stress d'actomyosine. En parallèle, les kinases ROCKs limitent l'action de la phosphatase MLCP et activent l'inhibiteur de phosphatase CPI-17. De plus, les ROCKs activent la LIM kinase qui limite à son tour l'action de la cofiline. La cofiline qui favorise la dépolymérisation de l'actine. Les isoformes ROCK1 et ROCK2 ont des actions complémentaires sur les remaniements du cytosquelette puisque la MLC est préférentiellement phosphorylée par ROCK1 et l'action de la cofiline est préférentiellement inhibée par ROCK2.

3. Les facteurs de transcription mécanosensibles

Les forces environnementales peuvent déclencher la mise en place d'un nouveau programme d'expression génique dans la cellule. En effet, la mécanique intracellulaire est capable de moduler l'activité de facteurs de transcription contrôlant l'expression de nombreux gènes déterminants pour l'identité endothéliale. L'activité de ces facteurs de transcription est médiée par la régulation de leur transport nucléaire ou bien par le remaniement chromatinien de leurs sites d'action. Des altérations dans ces mécanismes de régulation participent à de nombreuses pathologies endothéliales et à l'angiogenèse tumorale.

3.1. Régulation mécanique de la dynamique du transport nucléaire

L'activité d'un facteur de transcription peut être modulée par la dynamique de son transport nucléaire. Les protéines, ayant pour vocation d'être importées dans le noyau, possèdent une séquence d'import nucléaire appelée NLS (*nuclear localisation signal*) qui est reconnue par des protéines solubles : les importines α et β . Ces adaptateurs interagissent avec les pores nucléaires et favorisent la translocation de la protéine. A l'opposé l'exportation nucléaire nécessite la reconnaissance d'une séquence d'export NES (*Nuclear export signal*) par les protéines solubles de type exportines (Ullman KS et al., 1997).

La mécanique intracellulaire est capable de moduler la dynamique des transports nucléaires par l'augmentation de l'ouverture des pores nucléaires. Cette ouverture est médiée par la contraction des fibres d'actomyosine périnucléaires qui transmettent les forces issues de la MEC directement au noyau. En réponse à un stimulus mécanique tel que la rigidité matricielle, la contraction des fibres périnucléaires induit un aplatissement du noyau qui acquiert une forme elliptique. Ce changement de forme induit un étirement et une ouverture des pores nucléaires. De cette manière, la contractilité intracellulaire facilite les transports des facteurs de transcription entre le cytoplasme et le noyau (Elosegui-Artola A et al, 2017) (Figure 33A)

La formation et la stabilisation des fibres de stress périnucléaires nécessite la présence du complexe protéique LINC (*linker of nucleoskeleton and cytoskeleton complex*). Ce complexe, qui traverse l'enveloppe nucléaire, est composé des protéines SUN (*Sad/UNC-84*) et des nesprines (*nuclear envelope spectrin repeat*). Les protéines SUN sont situées au niveau de la membrane interne du noyau et interagissent avec les lamines nucléaires (Haques F et al., 2006 ; Khatau SB et al., 2009). Du côté de la membrane externe du noyau, la nesprine interagit avec le cytosquelette d'actine notamment les fibres de stress périnucléaires (Taranum S et al., 2012)(Figure 33B).

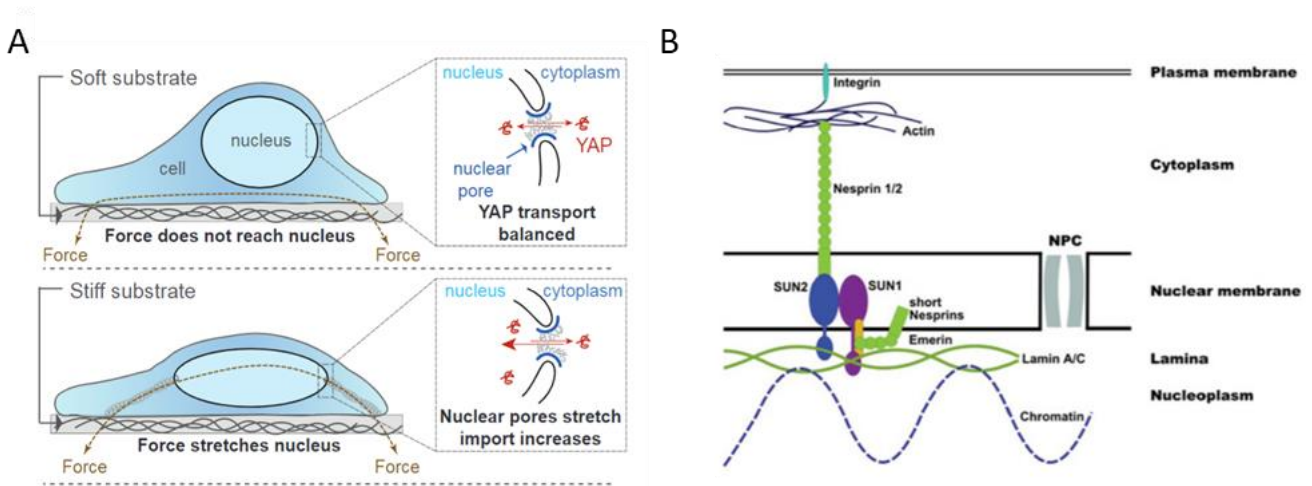


Figure 33 : Impact de la contractilité intracellulaire sur la régulation du transport nucléaire. (A) Impact de la rigidité du milieu et de la contractilité des fibres périnucléaires d'actomyosine sur l'ouverture des pores nucléaires. Exemple du transport nucléaire de YAP dépendant de la rigidité de la MEC. D'après Elosegui-Artola A et al, 2017. (B) Représentation schématique du complexe LINC au niveau de la membrane nucléaire. D'après Meinke P et al., 2011.

3.2. Remaniements chromatiniens mécanosensibles

Une autre manière de réguler l'activité d'un facteur de transcription est de moduler l'accessibilité de ces promoteurs cibles. Cette accessibilité est régulée par des remodeleurs chromatiniens qui génèrent des modifications post-traductionnelles de type méthylation ou acétylation sur les histones. La méthylation de lysines des histones est assurée par des méthyltransférases pour générer des structures chromatiniennes condensées dépourvues d'activité transcriptionnelle appelée : hétérochromatine. A l'opposé, l'euchromatine est une zone décondensée et transcriptionnellement active grâce à l'acétylation des histones, effectuée par les HATs (*Histone Acétyltransférases*). Ces remodeleurs chromatiniens agissent de manière dynamique pour moduler l'accessibilité des promoteurs par la condensation de la chromatine et modifier ainsi l'expression des gènes.

Les stimuli mécaniques extracellulaires déclenchent des remaniements chromatiniens par l'intermédiaire de la contraction des fibres de stress périnucléaires. Les forces générées par le cytosquelette d'actomyosine sont transmises par l'intermédiaire du complexe LINC aux lamines A/C nucléaires elles-mêmes reliées à la chromatine du noyau (Figure 37B).

3.3. Les facteurs de transcription mécanosensibles impliqués dans l'homéostasie endothéliale

De nombreux facteurs de transcription mécanosensibles sont impliqués dans l'homéostasie endothéliale. Ces facteurs sont majoritairement sensibles aux forces hémodynamiques appliquées sur la cellule endothéliale. Leur activation va dépendre de la nature du flux qui peut être linéaire ou perturbé. Ainsi les facteurs de transcription de la famille KLF2, KLF4 et NRF2 vont voir leur activité augmenter dans des cellules endothéliales soumises à un flux unifié. Ce sont des facteurs de transcription dit vaso-protecteurs. A l'inverse, les facteurs comme la β -caténine, YAP/TAZ, AP-1, NF-kappaB et HIF- α sont inhibés par le flux unifié et sont surexprimés dans les zones où le flux est faible et perturbé. Leur activation va induire la mise en place de nombreuses voies de signalisation délétères pour l'homéostasie endothéliale (Niu N et al., 2019)(Figure 34).

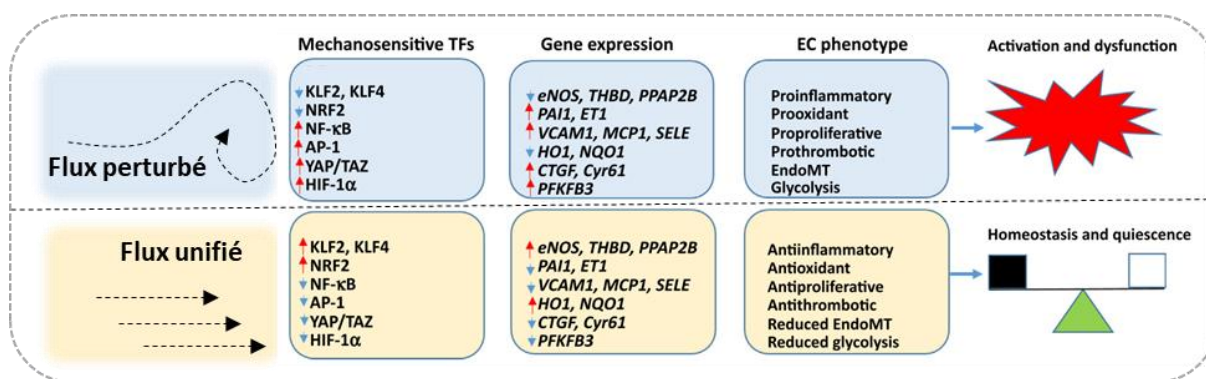


Figure 34 : Les facteurs de transcription mécanosensibles dans l'homéostasie endothéliale. La régulation de l'expression de facteurs de transcription en fonction de la nature du flux sanguins induit la mise de programmes d'expression géniques pour guider les comportements cellulaires en fonction du microenvironnement. D'après Niu N et al., 2019.

3.3.1. Les facteurs de transcriptions KLF2 et KLF4

Les facteurs de la famille KLF (*Krüppel-like factor*) sont des facteurs de transcription à doigt de zinc, des domaines leur permettant de lier l'ADN. Trois membres de cette famille sont décrits pour être impliqués dans la fonction endothéliale : KLF2, KLF4 et KLF6. Les facteurs KLF2 et KLF4 sont dits mécanosensibles car leur expression est induite par un flux sanguin laminaire (Dekker RJ et al., 2002). Environ 15% des gènes régulés par le flux sont dépendants de l'expression de KLF2 (Parmar KM et al., 2006). L'expression de KLF2 est déclenchée par le flux sous le contrôle du facteur de transcription MEF2, lui-même activé en réponse à l'activation de la voie MAP kinase dépendante de ERK5 (Figure 39).

Ces facteurs de transcription partagent une grande homologie structurale et ciblent souvent les mêmes effecteurs (Atkins GB et Jain MK, 2007). Ce sont des facteurs vasoprotecteurs avec des propriétés anti-inflammatoires, anti-coagulantes et anti-oxydantes. En effet, KLF2 et KLF4 favorisent l'expression de eNOs dans les cellules endothéliales et inhibent tous deux le facteur de transcription pro-inflammatoire NF-kappaB (SenBanerjee S et al., 2004 ; Hamik A et al., 2007). Pour cela, KLF2 se lie à l'histone acétyltransférase p300/HAT pour inhiber l'action de NF-kappaB (SenBanerjee S et al., 2004). De plus, le KO KLF2 chez la souris induit un défaut de maturation des vaisseaux avec un défaut dans le recrutement des VSMCs. Il est observé une léthalité passé E14,5, provoquée par la formation de vaisseaux dilatés et hémorragiques (Kuo CT et al., 1997).

De manière générale, KLF2 et KLF4 sont des facteurs de transcription favorables à la stabilisation de l'identité endothéliale. Ils contrôlent l'expression d'une large proportion des gènes de la cellule endothéliale (Sangwung P et al., 2017). De plus, ils favorisent la quiescence endothéliale en inhibant les processus prolifératifs et angiogéniques, dépendant de la voie VEGFα et de la voie TGF-β (Dekker RJ et al., 2006 ; Ghaleb AM et al., 2005 ; Bhattacharya R et al., 2005). En effet, KLF2 inhibe le co-facteur AP-1 ainsi que la phosphorylation de Smad2 (Boon RA et al., 2007). (Figure 35).

3.3.2 Le facteur de transcription Nrf2

L'activité du facteur de transcription Nrf2 est stimulée par les forces de cisaillements qui favorisent sa translocation nucléaire (Hsieh CY et al., 2009). Nrf2 régule l'expression de gènes impliqués dans les processus anti-inflammatoires et dans la réponse au stress oxydatif (Figure 35). Ce facteur est capable de se lier aux promoteurs de gènes codant pour les interleukines pro-inflammatoires IL-6 et IL1-β pour inhiber leur expression (Kobayashi EH et al., 2016). De manière intéressante les facteurs

KLF2 et NRF2 sont régulés par ERK5 (Parmar KM et al., 2006 ; Kim M et al., 2012). De plus, une étude transcriptomique a permis de mettre en évidence que les facteurs KLF2 et NRF2 détiennent 76% de gènes cibles en commun dans les cellules endothéliales (Fledderus JO et al., 2008). Ainsi ces facteurs de transcriptions semblent agir en synergie en réponse aux forces hémodynamiques.

3.3.3. Le co-facteur de transcription β -caténine

Comme expliqué plus haut, l'application d'un flux sanguin discontinu sur les cellules endothéliales déstabilise le complexe VE-cadhérine/ β -caténine. De cette manière, le co-facteur β -caténine est transloqué au noyau pour interagir avec le facteur de transcription LEF/TCF et favoriser des processus de transitions identitaires impliqués au cours du développement ainsi que dans de nombreux cancers. De manière intéressante, la rigidité de la matrice favorise aussi la translocation nucléaire de la β -caténine qui induit l'expression de gènes prolifératifs (Samuel MS et al., 2011, Avvisato CL et al., 2007) (Figure 35).

3.3.4. Les facteurs de transcription YAP/TAZ liés aux pathologies endothéliales

Les co-facteurs YAP (*Yes-associated protein*) et TAZ (*Transcriptional co-activator with PDZ-binding motif*) sont largement décrits dans la voie de signalisation Hippo impliquée dans la mise en place des tissus chez l'embryon. Cette voie régule la taille des organes en contrôlant l'état prolifératif, la survie et l'état de différenciation des cellules au cours du développement (Piccolo S et al., 2014). YAP et TAZ sont des coactivateurs de transcription qui s'associent aux facteurs de transcription TEADs. Les facteurs TEADs activent des gènes pour la prolifération cellulaire. De nombreuses études démontrent que l'activité de ces facteurs est dépendante de la contractilité du cytosquelette et des petites GTPases Rho. Ces facteurs sont sensibles à différents stimuli mécaniques tels que la rigidité de la matrice, la forme de la cellule, l'état de confluence des cellules (contacts intercellulaires) et les forces hémodynamiques (Dupont S, 2016). La translocation nucléaire de YAP et TAZ est proportionnelle à l'augmentation de la rigidité matricielle. Elle met en jeu la voie Rho/ROCK et la production de fibres de stress (Olson EN et Nordheim A, 2010). A l'inverse, une matrice souple induit la séquestration de YAP dans le cytoplasme (Argona M et al., 2013). Dans la cellule endothéliale, YAP peut être recruté aux jonctions VE-cadhérines. Cette interaction est régulée par la protéine EPS8 qui entre en compétition avec YAP pour lier la VE-cadhérine. Ainsi EPS8 régule la localisation cellulaire et le transport nucléaire de YAP (Giampietro C et al., 2015).

L'activation de cette voie YAP/TAZ mécanosensible est favorable à la progression des cancers par ses actions prolifératives et pro-inflammatoires (Zanconato F et al., 2016). L'activation de cette voie est aussi associée à l'athérosclérose. Dans les cellules endothéliales, la translocation nucléaire des facteurs YAP/TAZ est déclenchée lorsque les cellules sont soumises à un flux perturbé (Wang KC et al., 2016) alors que le flux laminaire vasoprotecteur induit la phosphorylation et l'inactivation de ces facteurs. (Figure 35).

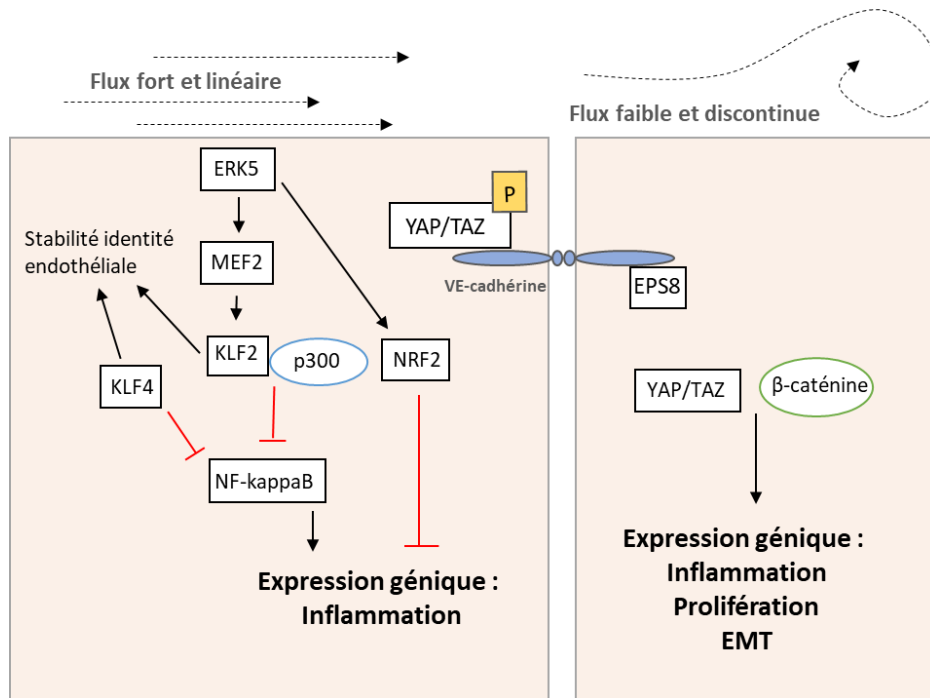


Figure 35 : Régulation des facteurs mécanosensibles en fonction du flux. Sous un flux linéaire, les facteurs KLF2, KLF4 et NRF2 inhibent l'expression de gènes pro-inflammatoire. A l'inverse, un flux perturbé induit la translocation nucléaire et l'activation des facteurs de transcription YAP/TAZ et β -caténine. Ils ciblent de nombreux gènes impliqués dans les voies pro-inflammatoires et prolifératives associées aux pathologies cardio-vasculaires.

Chapitre IV La pathologie CCM (Cerebral Cavernous Malformation)

1. Les angiomes cérébraux

1.1. Description, symptômes et traitement

L'angiome cérébral ou la lésion CCM (*Cerebral cavernous malformation* en anglais) est le résultat d'une malformation des capillaires cérébraux anormalement dilatés qui, par empilement, forment une masse tubéreuse ou framboisée. La taille de l'angiome peut varier de quelques millimètres à quelques centimètres (Figure 36A). On retrouve ces malformations dans les vaisseaux à faible flux au niveau du réseau des capillaires veineux (ou « lits capillaires »). Les capillaires défectueux ont un caractère hémorragique. Ils présentent une lame basale épaissie, segmentée et ils sont dénués des cellules du parenchyme cérébral (péricytes et astrocytes) nécessaire à l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique (BHE).

On estime que 0,5% de la population mondiale présente une ou des lésions CCM. D'après les études 25-50% des personnes présentant un angiome cérébral sont asymptomatiques (Wei S. et al., 2020). Cependant, un angiome cérébral peut affecter le tissu neuronal et générer des symptômes neurologiques comme des crises d'épilepsies, de violents maux de tête et différentes affections neurologiques qui se manifestent en fonction de la taille de l'angiome et de l'aire cérébrale où se situe la lésion (vertiges, diplopie, fourmillement ou engourdissement dans un membre, trouble de l'audition, trouble du langage, paralysie d'un côté du corps) (Morrison L et Akers A 2016). L'état hémorragique de la lésion est rarement responsable d'une perte de conscience ou d'un coma car le flux sanguin est faible dans les angiomes mais l'épanchement sanguin est suffisant pour endommager le tissu cérébral et être à l'origine des affections neurologiques.

Une imagerie par résonance magnétique (IRM) ou un scanner, permettent de détecter et de situer la ou les lésions qui se forment au niveau des hémisphères cérébraux ou au niveau du tronc cérébral (Figure 36B). Une opération chirurgicale permet de retirer l'angiome, mais des lésions situées dans des zones plus profondes et plus critiques, ne peuvent pas être atteintes. Il est donc nécessaire de développer des traitements pharmacologiques pour pallier à ces limitations chirurgicales (Fisher OS et al. 2014).

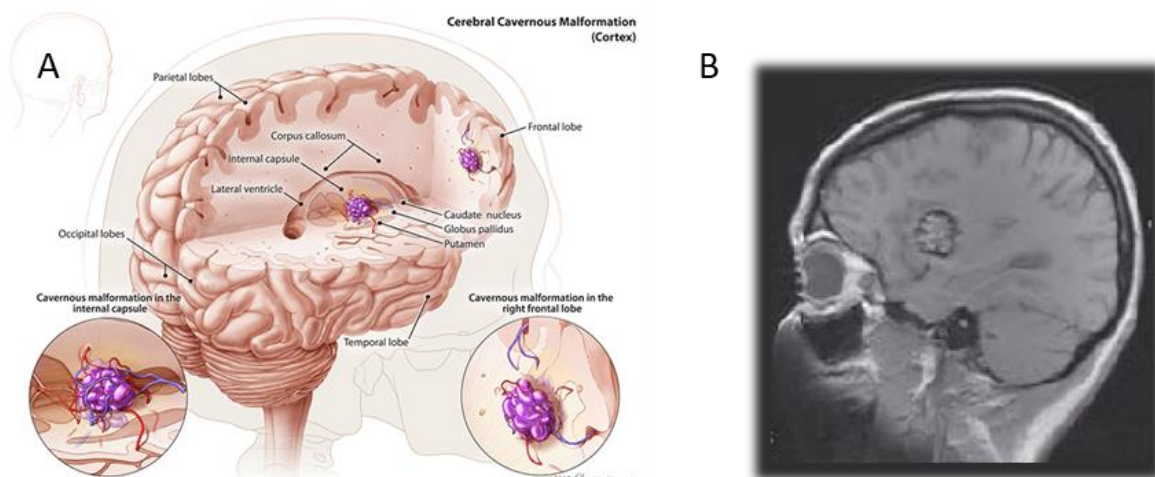


Figure 36 : Description des lésions CCM. (A) Représentation schématique d'une lésion CCM. D'après le site dartmouth-hitchcock.org. **(B)** IRM de patient présentant une lésion CCM. Depuis Public, Orphanet Grand 2008.

1.2. Origine sporadique ou héréditaire

Une lésion CCM peut apparaître de manière sporadique (80% des cas), le patient présente généralement une lésion unique. Les cas plus sévères, avec plusieurs lésions, ont comme origine une mutation génétique héréditaire autosomale dominante (20% des cas), on parle de cas familiaux (Riant F et al. 2010).

1.2.1. Origine familiale des lésions CCM

On connaît 3 gènes responsables pour la formation des lésions CCM : *CCM1/KRIT1*, *CCM2/OSM* et *CCM3/PDCD10*. La mutation perte de fonction d'un seul de ces 3 gènes est suffisante pour induire des lésions CCM (Cavalcanti D et al., 2012). Parmi les formes familiales de la maladie, 80% présentent une mutation germinale hétérozygote. On connaît aujourd'hui 150 mutations germinales sur ces 3 gènes responsables de la formation des lésions CCM. Toutes ces mutations sont dites perte de fonction car elles génèrent un codon stop prématuré dans la séquence du gène. Généralement les formes familiales présentent un diagnostic plus sévère avec l'apparition de nombreuses lésions, cependant, des cas sporadiques à multiples lésions sont observés, ils sont à l'origine d'une mutation « *de novo* » dans 45% à 67% des cas. On observe aussi des cas sporadiques à multiples lésions sans mutations des gènes CCM dont l'origine n'est toujours pas expliquée (Riant F et al. 2010). Les symptômes apparaissent chez les patients CCM1 et 2 autour de 30 à 40 ans et plus. La mutation du gène *CCM3* est à l'origine d'une maladie plus sévère et plus précoce avec de nombreuses lésions qui apparaissent parfois chez les enfants de moins de 10 ans (Denier C et al. 2006).

1.2.2. Hypothèse de Knudson : une mutation bi-allélique pour la genèse des lésions

L'étude de la génétique de la maladie CCM a confirmé que la formation des lésions CCM suit l'hypothèse de Knudson, ce qui permet d'expliquer la prédisposition des cas familiaux à la formation de nombreuses lésions CCM. D'après Pagenstecher A et al, la formation des lésions CCM est due à la perte des 2 allèles du gène *CCM* (Two-hit mutation) (Pagenstecher A et al., 2009). Une première mutation d'origine germinale responsable de la perte du premier allèle est suivie d'une mutation somatique responsable de la perte du deuxième allèle. La présence de mutations somatiques additionnelles est confirmée dans les lésions de patients hétérozygotes pour les gènes *CCM1*, *CCM2* et *CCM3*. Les auteurs expliquent que ces mutations somatiques sont retrouvées uniquement dans les cellules endothéliales. En suivant un mécanisme de mutation bi-allélique, l'étude montre que les gènes *CCM* fonctionnent de la même manière que les gènes suppresseurs de tumeurs (Akers A et al 2009 ; Pagenstecher A et al., 2009). Cette hypothèse a été testée et validée dans des modèles de souris *ccm* hétérozygotes croisées avec des souris KO pour p53. Des lésions caractéristiques se forment au bout de plusieurs mois. En effet, le croisement avec des souris p53 KO permet d'augmenter l'instabilité génétique et la probabilité d'obtenir des mutations somatiques (Plummer N et al., 2004).

1.3. Les modèles d'étude de la mutation CCM

Plusieurs modèles d'études *in vivo* et *in vitro* ont été développés pour mieux comprendre les mécanismes cellulaires à l'origine de la formation des lésions lors de la perte du complexe CCM. Des

mutants murins et des mutants chez le poisson zèbre ont été créés pour étudier l'impact de la perte de CCM sur la stabilité des vaisseaux sanguins.

1.3.1. Les modèles murins

Alors que les modèles murins hétérozygotes des gènes *Ccm1*, *Ccm2* et *Ccm3* ne présentent pas de lésions rétinienne ou cérébrales, les K.O constitutifs sont léthaux et engendrent des défauts du développement cardiaque.

A. Pour pallier à cette létalité précoce, des modèles inductibles ont été développés basés sur l'activation de la Cre-recombinase induite par injection de tamoxifène. Des souris *Ccm^{fl/fl}* sont croisées avec des souris exprimant la Cre-recombinase sous le promoteur VE-cadhérine (CDH5) pour générer des souris *Cdh5^{-creERT2} Ccm^{fl/fl}*. Ce modèle dit "acute" permet de générer des souris néonatales homozygotes, sous injection de tamoxifène, 1 à 3 jours après la naissance. Le modèle "acute" présente de nombreuses lésions dans le cerveau, principalement dans le cervelet, mais aussi dans la rétine (Figure 37). La sévérité des lésions générées est telle que les souris ne survivent pas jusqu'à l'âge adulte (Boulday G et al., 2011).

B. Pour limiter la sévérité des lésions et se rapprocher de la fréquence des lésions observées chez l'Homme, il a été développé un modèle mutant inductible exprimé uniquement dans les cellules endothéliales cérébrales (Cardoso C et al., 2020). Pour cela, la Cre-recombinase est exprimée sous le promoteur du gène *Slco1c1*, un canal anion spécifiquement exprimé dans les cellules endothéliales de vaisseaux cérébraux. Dans ce modèle, les lésions sont réparties sur l'ensemble du cerveau et suivies jusqu'à 5 mois.

C. Le modèle "chronique" est basé sur le croisement de souris hétérozygotes pour un des gènes *Ccm* avec des souris ayant des prédispositions pour générer des mutations somatiques (souris *p53^{-/-}* ou *Msh2^{-/-}*). Ce modèle permet d'observer un développement stochastique des lésions et d'obtenir des lésions matures dont les caractéristiques sont semblables à celles retrouvées chez l'Homme (Zeineddine H et al., 2019).

D. Enfin, le modèle des souris Confetti est basé sur l'expression d'un rapporteur multicolore appelé Brainbow 2.1 dépendant de l'action de la Cre recombinase elle-même sous l'expression du promoteur de la VE-cadhérine (CDH5). Le croisement de ces mutants avec des souris *CCM3^{fl/fl}* permet d'associer un marquage fluorescent aux cellules endothéliales homozygotes mutantes après induction au tamoxifène (Malinverno M et al., 2019) et permet de suivre le devenir des cellules issues d'un même clone (Detter MR et al., 2018).

1.3.2. Le modèle poisson zèbre

La mutation des protéines CCM chez le poisson zèbre (mutants *CCM2 hi296*, *KRIT1 ty219c* ou *PDCD10*) engendre un défaut de valvogénèse et génère un phénotype de cœur hypertrophié (Hogan BM et al., 2008) (Figure 37). Cette hypertrophie rend la fonction cardiaque défectueuse et s'associe à une absence du flux sanguin. Parce que les mutants sont capables de survivre pendant 7 jours en absence de fonction cardiaque, ce modèle permet d'étudier l'impact du flux sanguin sur la formation des lésions CCM. Pour restaurer ce flux, dans les mutants *KRIT1^{ty219c}*, la fonction cardiaque est restaurée par l'expression additionnelle d'une protéine EGFP-KRIT1 sous le contrôle du promoteur *Gal4 TgBAC(nfatc1:GAL4FF)_{mu286}* exprimé uniquement dans les cellules endothéliales cardiaques

(Rödel CJ et al., 2019). Ce modèle a permis de mettre en évidence le rôle du flux pour prévenir l'apparition des lésions CCM *in vivo*.

L'utilisation additionnelle de morpholinos dans les mutants *ccm* a permis d'identifier des acteurs moléculaires impliqués dans la formation des lésions CCM tels que l'intégrine $\beta 1$, KLF2, KLF4 et ROCK1 (Renz M et al., 2015, Lisowska J et al., 2018).

De plus, la perte des protéines CCM chez le poisson-zèbre induit la formation de lésions vasculaires le long de l'aorte dorsale. Ainsi, grâce à ce modèle, il est possible d'étudier la fonction endothéliale *in vivo*.

1.3.3. Modèle *in vitro* : les HUVECs

L'utilisation de lignée cellulaires endothéliales primaires permet d'étudier le rôle du complexe protéique CCM dans la fonction endothéliale. Une technique de Knock-Down (K.D) par transfection de siRNA ou par infection de shRNA dirigés contre les protéines CCM est appliquée sur des lignée cellulaires primaires endothéliales humaines. Il existe plusieurs lignées comme les HUVECs issus de la veine du cordon ombilical ou les HDMECs qui sont des cellules endothéliales du derme.

Les cellules K.D pour les protéines CCM présentent une morphologie élargie et allongée. Les jonctions intercellulaires VE-cadhérine sont défectueuses et la monocouche endothéliale est altérée. Les cellules endothéliales révèlent une hypercontractilité associée à la présence de nombreuses fibres de stress d'actomyosine ainsi qu'une diminution de l'actine corticale (Figure 37).

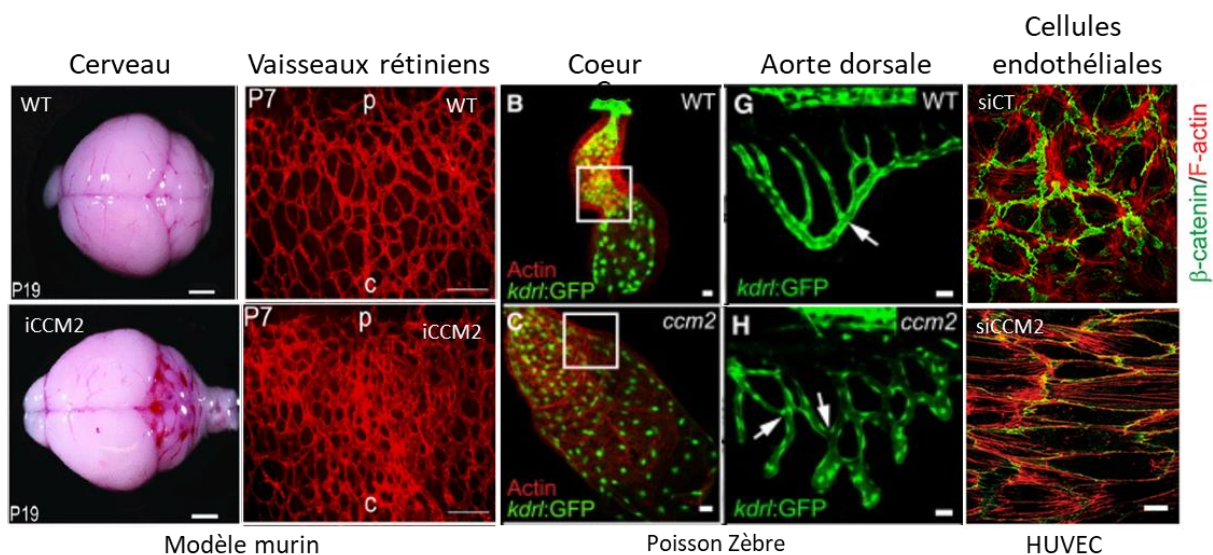


Figure 37 : Les différents modèles CCM. L'étude de la mutation des protéines CCM peut s'effectuer à travers différents modèles *in vivo*. Chez la souris, la mutation des protéines CCM est à l'origine de lésions vasculaires cérébrales et au niveau de la rétine. Chez le poisson-zèbre, la mutation des protéines CCM génère un cœur hypertrophié ainsi que des lésions vasculaires le long de l'aorte dorsale. *In vitro*, les cellules HUVECs mutées pour les protéines CCM présentent une morphologie élargie et allongée avec une altération des jonctions intercellulaires et une augmentation de la formation de fibres de stress d'actomyosine. D'après Boulday G et al., 2011 ; Renz M et al., 2015 ; Lisowska J et al., 2018.

2. Les complexes CCM : plusieurs complexes pour différentes voies de signalisation

Les protéines KRIT1, CCM2 et PDCD10 forment un complexe protéique hétérotrimérique. La formation de ce complexe est requise pour activer des voies de signalisation nécessaires au bon fonctionnement de la cellule endothéliale. Cependant, les protéines CCM contiennent des domaines

protéiques distincts leur permettant de se lier à des partenaires protéiques différents et d'intervenir ainsi dans plusieurs voies de signalisation (Draheim KM et al. 2015).

2.1. Structure en domaines des protéines CCM

2.1.1. La protéine KRIT1

Le gène *CCM1* est localisé sur le chromosome 7q, il contient 16 exons codant pour la protéine appelée K-Rev interaction trapped 1 (KRIT1). KRIT1, la plus grande des protéines CCM, est composée de 736 acides aminés pour une masse moléculaire de 84 kDa. Elle ne présente pas d'activité catalytique et elle est exprimée de manière ubiquitaire.

La mutation du gène *CCM1* est à l'origine de 50% des formes familiales de la pathologie CCM. KRIT1 est un parfait exemple de protéine d'échafaudage. Elle est constituée de plusieurs domaines d'interaction qui lui permettent d'interagir avec des récepteurs transmembranaires, des adaptateurs cytoplasmiques ou bien encore les microtubules.

En N-terminal, la protéine KRIT1 est composée d'un domaine Nudix suivi de 3 motifs NPxY/F et un domaine FERM en C-terminal. L'affinité du domaine FERM-NPxY/F permet à KRIT1 de se replier sur elle-même dans une conformation fermée (Béraud-Dufour S et al., 2007). Elle est retrouvée dans le cytoplasme, au niveau des jonctions intercellulaires, et dans le noyau. En effet, elle contient 2 domaines NLS (*Nuclear localisation signal*) en N-terminal et en C-terminal et un domaine NES (*Nuclear export signal*). Grâce à son domaine FERM, la protéine KRIT1 est capable d'interagir avec des partenaires contenant un motif NPxY/F comme la protéine transmembranaire HEG1 et la petite GTPase Rap1-GTP. Le motif NPxY/F de KRIT1 permet d'interagir avec le domaine PTB (phosphotyrosine binding) de son partenaire ICAP-1, un régulateur négatif de l'intégrine β 1, et la protéine CCM2. Le domaine Nudix de la protéine KRIT1, lui permet une interaction avec les microtubules (Draheim KM et al., 2015 ; Béraud-Dufour S et al., 2007 ; Padarti A et Zhang J, 2018) (Figure 38).

2.1.2. La protéine CCM2

Le gène *CCM2* est localisé sur le chromosome 7p, il contient 10 exons codant pour la protéine MGC4607 ou malcarvenin composée de 444 acides aminés pour une masse moléculaire de 34 kDa. Elle est exprimée de manière ubiquitaire et la mutation de son gène est à l'origine de 20% des formes familiales de la maladie CCM. La protéine CCM2 ne présente pas d'activité catalytique. Elle est capable de lier les protéines KRIT1 et PDCD10, lui conférant le rôle de plateforme du complexe protéique CCM.

En N-terminal, la protéine CCM2 contient un domaine PTB (Phospho-tyrosine binding) suivi d'un domaine HHD en C-terminal. Elle est retrouvée dans le cytoplasme, au niveau des jonctions intercellulaires, et dans le noyau malgré l'absence de séquences NLS. La translocation nucléaire de CCM2 dépend de sa liaison à la protéine KRIT1 par son domaine PTB. Les domaines PTB sont connus pour lier les phospholipides de la membrane plasmique, mais le rôle de ce domaine protéique sur le contrôle de la localisation membranaire de CCM2 est controversé. (Draheim KM et al., 2015, Faurobert E et Albigès-Rizo C, 2010 ; Padarti A et Zhang J, 2019). La formation du complexe KRIT1-CCM2 contrôle la localisation et la stabilisation de KRIT1 (Zawistowski JS et al., 2005) ainsi que la localisation de son interacteur ICAP-1 (Faurobert E et al., 2013). Indépendamment de KRIT1, la protéine CCM2 est une plateforme pour la petite GTPase Rac1 ainsi que pour les kinases MEKK3 et MKK3 (Uhlik MT et al., 2003) (Figure 38).

La protéine CCM2L (CCM2-like) partage une forte homologie de séquence avec la protéine CCM2. Dans le modèle du poisson zèbre, la perte de CCM2L phénocopie le défaut de développement cardiaque observé dans le mutant CCM2 (Rosen JN et al., 2013). La protéine CCM2L peut lier KRIT1 et entrer en compétition avec la protéine CCM2 (Zheng X et al., 2012). Mais son implication dans la formation des lésions CCM est encore mal définie.

2.1.3. La protéine PDCD10

Le gène *CCM3* est localisé sur le chromosome 3q, il contient 7 exons codant pour la protéine Programmed cell death 10 (PDCD10). Elle est composée de 212 acides aminés pour une masse moléculaire de 25 KDa. C'est la plus petite des protéines CCM. La mutation du gène *ccm3* est à l'origine de 10% des formes familiales de la maladie CCM. Elle est exprimée de manière ubiquitaire et présente la particularité de pouvoir se dimériser grâce au domaine de dimérisation (dimer) en N-terminal. Elle est structurée d'un domaine FAT-H en C-terminal lui permettant de lier des partenaires protéiques y compris la protéine CCM2 (Draheim KM et al., 2015 ; Faurobert E et Albigès-Rizo C, 2010 ; Padarti A et Zhang J, 2019). Indépendamment du complexe KRIT1/CCM2, la protéine PDCD10 se lie au complexe protéique STRIPAK (*Striatin interacting phosphatase and kinase*). Ce complexe comprend la protéine striatin, les kinases GCKII dont MST4/MASK, MST3/ST24 et ST25/YSK1/SOK1 et les protéines STRIP1/FAM40A et STRIP2/FAM40B. Ainsi PDCD10 détient de nombreux partenaires protéiques comme : la petite GTPase Rac1, Cdc42, RIPOR1/FAM65A : une protéine associée à la GTPase RhoA, la paxiline, la protéine RIPOR1 (*Rho family interacting cell polarization*) et UNC13D impliquée dans l'exocytose (Wei S et al., 2020) (Figure 38).

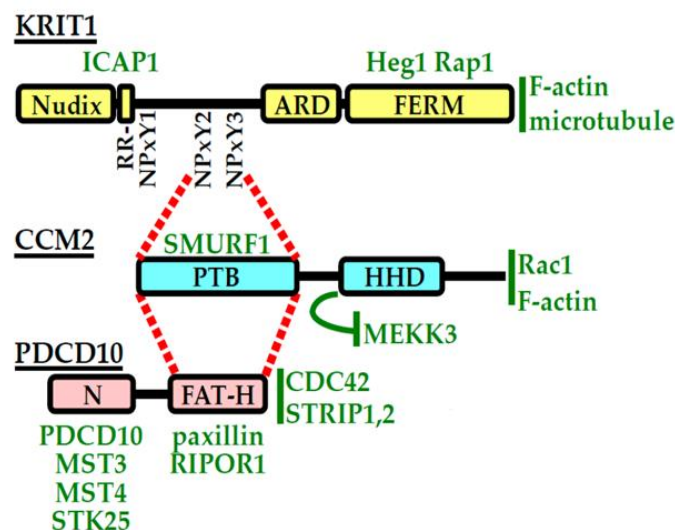


Figure 38 : Organisation des domaines des protéines CCM et partenaires associés. Les partenaires associés aux protéines CCM sont indiqués en vert. D'après Wei S et al., 2020

2.2 Rôle du complexe CCM dans l'homéostasie fonctionnelle de la cellule endothéliale

Le caractère hémorragique des lésions CCM démontre une altération de l'intégrité du tissu endothélial. Les études *in vitro* de cellules endothéliales déplétées pour les protéines KRIT1, CCM2 ou PDCD10 ont permis de mettre en évidence la dérégulation de nombreuses fonctions biologiques de

la cellule endothéliale. Lors de la perte des protéines CCM, le phénotype majeur observé est une altération de l'architecture et de l'homéostasie tensionnelle des cellules endothéliales. La perte des protéines CCM engendre une augmentation de la formation des fibres de stress d'actomyosine, une déstabilisation des jonctions intercellulaires et une altération des jonctions cellules-matrice extracellulaire (MEC).

2.2.1. Stabilisation des jonctions intercellulaires dépendantes de VE-cadhérine

Le complexe protéique CCM est connu pour stabiliser les jonctions intercellulaires de la cellule endothéliale. D'ailleurs, la protéine KRIT1 est effectrice de la petite GTPase Rap1 (Béraud-Dufour S et al., 2007), dont le rôle dans l'angiogenèse et la stabilité vasculaire a bien été démontré notamment pour la stabilisation des jonctions intercellulaires (Carmona G et al., 2009). Le complexe KRIT1-Rap-1 forme une plateforme qui favorise la liaison de nombreuses protéines jonctionnelles avec la VE-cadhérine telles que la β -caténine, la caténine p120, AF-6 et ROCK2 (Glading A et al., 2007 ; Liu JJ et al., 2011 ; Lisowska J et al., 2018). La protéine KRIT1 joue un rôle essentiel pour localiser le complexe protéique tripartite CCM aux AJs et cette localisation semble essentielle pour l'intégrité du tissu endothélial (Figure 39).

2.2.2. Régulation des jonctions cellule-matrice

L'étude *in vitro* de cellules endothéliales a permis de mettre en évidence une augmentation de la formation des adhésions focales riches en intégrines β 1 dans les cellules endothéliales mutées pour les gènes CCM (Faurobert E et al., 2013) ce qui engendre une augmentation de l'adhésion des cellules endothéliales à leur MEC. Comme indiqué précédemment, KRIT1 interagit avec la protéine ICAP1 qui est un inhibiteur de l'intégrine β 1 (Bouvard D et al., 2003). L'interaction de KRIT1 avec ICAP-1 stabilise sa conformation. Lorsque KRIT1 est perdue, ICAP-1 est dégradée par le protéasome ce qui relève l'inhibition de l'intégrine β 1 et provoque la formation de nombreuses adhésions focales à la MEC (Faurobert E et al., 2013). De même, lorsque CCM2 est perdue, KRIT1 et ICAP1 sont dégradées ce qui induit aussi une augmentation de l'activation de l'intégrine β 1 dans les cellules endothéliales (Faurobert E et al., 2013) (Figure 39). Il est possible que la protéine PDCD10 régule aussi l'adhésion à la MEC car elle lie la paxiline par son domaine FAT-H (Draheim KM et al. 2015) mais ceci n'a pas été étudié de manière approfondie.

2.2.3. Régulation de l'homéostasie tensionnelle de la cellule endothéliale

La perte des protéines CCM altère l'architecture et l'homéostasie tensionnelle de la cellule endothéliale, ce qui se traduit par la formation de fibres de stress d'actomyosine ainsi qu'une diminution de l'actine corticale. Les protéines CCM sont connues pour inhiber l'activité de la GTPase RhoA et de ses effecteurs, les kinases ROCKs, impliquées dans le remaniement du cytosquelette d'actine (Whitehead KJ et al., 2009 ; Stockton RA et al., 2010 ; Borikova AL et al., 2010).

Pour inhiber la GTPase RhoA, la protéine CCM2 se lie à la protéine SMURF1 (*Smad ubiquitin regulatory factor 1*) et forment un complexe qui favorise l'adressage de RhoA au protéasome (Croze LE et al., 2009). La protéine PDCD10 interagit avec le complexe STRIPAK, qui comprend MST4, STK24, and STK25, et qui favorise l'activation de la moésine, un inhibiteur de la GTPase RhoA (Figure 39).

En aval de RhoA, KRIT1 et CCM2 forment une plateforme qui localise et régule l'activité des kinases ROCK1 et ROCK2 dans la cellule endothéliale. Le complexe KRIT1-CCM2 inhibe l'activité de la kinase ROCK1 et favorise l'adressage de ROCK2 aux jonctions intercellulaires. Ainsi, lorsque le complexe KRIT1-CCM2 est perdu, la kinase ROCK1 est suractivée et ROCK2 est délocalisée des jonctions

intercellulaires (Lisowska J et al., 2018). Des mesures de microscopie à traction de force (TFM) montrent le caractère hypercontractile de la cellule endothéliale déplétée pour les protéines KRIT1 et CCM2 (Faurobert E et al., 2013). Cette hypercontractilité provient de l'augmentation de la phosphorylation de la MLC par ROCK1 (Figure 39). Cette augmentation de la contractilité intracellulaire est observée chez l'homme sur les coupes de lésions ainsi que dans tous les modèles animaux de ccm et les cellules endothéliales *in vitro* (Whitehead KJ et al., 2009 ; Stockton RA et al., 2010 ; Lant B et al., 2015).

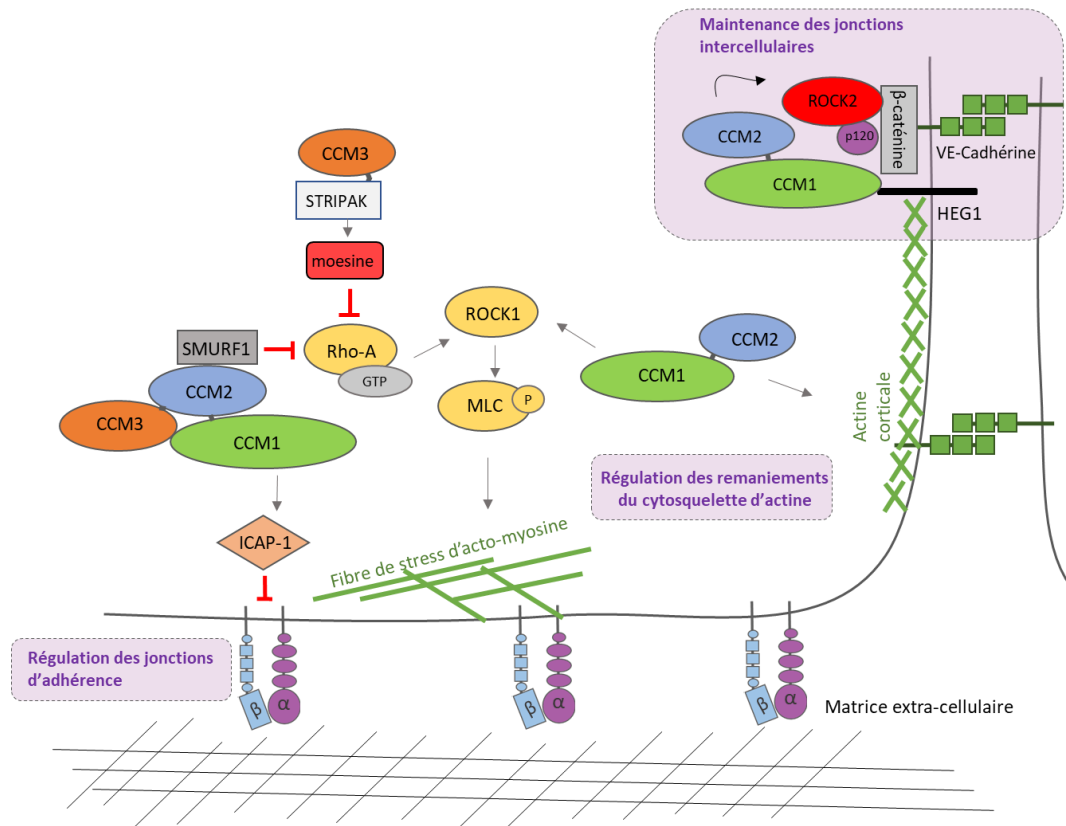


Figure 39 : Le complexe CCM dans l'homéostasie endothéliale. En fonction de ses partenaires protéiques, le complexe CCM est impliqué dans la régulation des jonctions cellule-matrice, dans les remaniements du cytosquelette d'actine et favorise le maintien des jonctions interendothéliales.

2.2.4. Autres voies de signalisation régulées par les protéines CCM et impliquées dans la quiescence endothéliale

De nombreuses études mettent en évidence des comportements cellulaires angiogéniques grâce à des mesures de tubulogenèse et de sprouting cellulaire, acquis par des cellules endothéliales déplétées pour les protéines KRIT1, CCM2 et PDCD10 (Wüstehube J et al., 2010, Zhu Y et al., 2011, You et al., 2013). Plusieurs voies de signalisation semblent impliquées mais certaines ne font pas l'unanimité notamment la voie NOTCH-DELTA et la voie VEGF dont l'activation ou l'inhibition varie dans les différents mutants CCM.

A. La voie Delta-Notch est inhibée lors de la perte de KRIT1 ou de PDCD10. Cette inhibition est caractérisée par une diminution de l'expression de DLL4 et des récepteurs Notch1, Notch3 et Notch4 (Wüstehube J et al., 2010, Zhu Y et al., 2011, You C et al., 2013, Schulz GB et al., 2015). Bien que CCM2 soit nécessaire au bon déroulement de l'angiogenèse embryonnaire, son rôle sur cette voie Delta-Notch n'est pas clairement défini (Boulday G et al., 2009).

B. Décrite par plusieurs études, la voie de signalisation VEGF est augmentée chez de nombreux patients atteints de la maladie CCM (Jung KH et al., 2003 ; Abe T et al., 2009). La perte de KRIT1, favorise l'activation du récepteur VEGFR2, un point clef dans l'initiation de la réponse au VEGF par les cellules. De plus, cette même activation favorise la phosphorylation de la β -caténine et stimule son transport nucléaire (Disteffano PV et al., 2014). A l'opposé, la voie VEGF est inhibée lors de la perte de la protéine PDCD10 car elle est nécessaire à la stabilisation du récepteur VEGFR2 (He Y et al., 2010).

C. La voie de signalisation Wnt/ β -caténine est activée lors de la perte des protéines KRIT1 et PDCD10. C'est la dislocation des jonctions VE-cadhérines qui favorise la libération de la β -caténine pour qu'elle soit transloquée plus facilement dans le noyau. Cependant la perte de CCM2 ne montre pas d'effet sur l'expression des gènes dépendants de β -caténine dans le modèle murin (Glading A et al., 2009 ; Boulday G et al., 2011 ; Distefano PV et al., 2014).

D. Enfin, la voie TGF- β /SMAD/BMP6 ainsi que la voie des MAP kinases, dépendante de MEKK3-MEK5-ERK5, sont activées lors de la perte des protéines KRIT1 et PDCD10 (Uhlik MT et al., 2003 ; Zawistowski JS et al., 2005). En effet, la voie MEKK3-MEK5-ERK5 favorise la production de BMP6 et la phosphorylation de SMAD1 et SMAD3 (Cutano R et al., 2016 ; Malinverno M et al., 2019). Ces voies de signalisation stimulent l'expression des facteurs de transcription KLF2 et KLF4 dont la surexpression est responsable de la formation des lésions CCM chez la souris et le poisson-zèbre. De plus, la surexpression de ces facteurs est observée dans les lésions de patients sporadiques et familiaux (Zhou Z et al., 2015 ; Zhou Z et al., 2016).

3. Mise en place et mécanismes de maturation des lésions CCM

La genèse des lésions CCM, leur croissance ainsi que leur maturation semblent dépendre d'un enchaînement de comportements cellulaires qui diffèrent entre les mutants *ccm1*, 2 et 3. De nombreuses études cherchent à détailler les différentes étapes nécessaires à la mise en place des malformations CCM.

3.1. L'expansion clonale

Le modèle de souris confetti a permis de mettre en évidence une expansion clonale des cellules mutantes CCM3^{-/-} (Detter MR et al., 2018 ; Malinverno M et al., 2019). Cette expansion clonale serait responsable de la genèse des lésions mais ce point est actuellement discuté et pourrait différer selon les 3 mutants. En effet, l'approche des souris confetti n'a pas encore été utilisée pour les modèles *ccm1* et *ccm2* mais des différences dans la capacité de ces cellules à proliférer suggèrent que ces modèles pourraient être différents de *ccm3*. Il reste encore beaucoup d'incertitudes quant aux capacités prolifératives des cellules endothéliales déficientes pour KRIT1 et CCM2, des résultats contradictoires ont été publiés *in vitro* (Zhu Y et al., 2011) et *in vivo* (Boulday G et al., 2009 ; Hogan BM et al., 2008).

3.2 Le mosaïcisme génotypique : formation de lésions chimères

Un mosaïcisme génotypique cellulaire des lésions CCM est observé chez des patients hétérozygotes CCM1, CCM2 et CCM3. Les lésions sont composées de cellules mutantes CCM^{-/-} et de cellules non-mutantes CCM^{-/+} (Pagenstecher A et al., 2008 ; Rath M et al., 2019). Le modèle de souris confetti a

permis de confirmer le caractère chimérique des lésions CCM (Detter MR et al., 2018 ; Malinverno M et al., 2019). Pour favoriser la croissance et la maturation de la lésion, les cellules mutantes CCM^{-/-} sont capables de recruter les cellules CCM^{-/+} voisines pour qu'elles s'incorporent dans la lésion néoformée. Ce modèle de croissance est conforté par des expériences de chimio-attraction *in vitro* et *in vivo* de cellules sauvages par des cellules mutantes CCM^{-/-} (Malinverno M et al., 2019).

3.3. La transition identitaire et les comportements pro-angiogéniques

L'altération des jonctions cellule-cellule est un évènement en faveur de l'initiation de l'angiogenèse. La dislocation des jonctions VE-cadhérine favorise l'adressage de la β -caténine au noyau pour activer la transcription de gènes pro-angiogéniques qui déclenche une transition endothélio-mésenchymateuse partielle des cellules endothéliales. Maddaluno L et al démontrent une augmentation de l'expression de marqueurs mésenchymateux dans le modèle murin CCM1 KO ainsi que dans les lésions humaines sporadiques et héréditaires (Maddaluno L et al., 2013 ; Bravi L et al., 2016). Plus récemment, cette équipe a démontré la mise en place d'une endoMT dans les cellules sauvage CCM^{+/+} avoisinant les cellules mutantes CCM^{-/-} qui expriment alors de nombreux marqueurs mésenchymateux. Cette transition serait induite de manière paracrine par les cellules mutantes (Malinverno M et al., 2019).

On sait aujourd'hui le rôle clef des protéines CCM pour la vasculogenèse et l'angiogenèse chez l'embryon humain et chez la souris (Tanriover G et al., 2009 ; Boulday G et al., 2009). La voie de signalisation CCM est nécessaire dans les cellules endothéliales pour un développement normal de l'endocarde et pour empêcher des malformations vasculaires postnatales. Comme indiqué précédemment, il semble que les lésions CCM soient la conséquence d'une angiogenèse anormale (Sure U et al., 2001). Dans le modèle murin, un nombre plus important de lésions est observé lorsque la mutation CCM2 est induite à un stade embryonnaire où la plasticité des vaisseaux et les processus angiogéniques dominant (Boulday G et al., 2011). Ce constat semble contradictoire aux comportements des lésions observées chez l'Homme. Chez les patients hétérozygotes, l'apparition des lésions semble corrélée avec l'âge des patients. Cependant, l'apparition des lésions CCM dans les tissus adultes pourrait être initiée par un stimulus pro-angiogénique tel que l'état hypoxique des tissus acquis avec le temps.

3.4. Relation des cellules mutantes CCM avec le microenvironnement

3.4.1. Le remodelage de la MEC

L'observation histologique et ultrastructurale des lésions humaines a mis en évidence des défauts dans l'environnement matriciel autour des lésions. La lame basale apposée aux cellules endothéliales présente par endroit un aspect multi-lamellé anormal (Clatterbuck RE et al., 2001). De plus, les lésions sont entourées par une matrice de collagène dense comme dans les fibroses.

Une organisation aberrant de la fibronectine et du collagène III est également observée autour des lésions des modèles murins KRIT1 KO et CCM2 KO (Faurobert E et al., 2013). Lors de la perte de KRIT1 ou de CCM2, les nombreuses adhérences $\alpha 5\beta 1$ sous tension génèrent des fibres de fibronectine linéaires et parallèles aux fibres de stress intracellulaires à la différence des cellules sauvages qui tissent un réseau maillé (Faurobert E et al., 2013). Comme observée autour des tumeurs, ces fibres linéaires et parallèles de fibronectine conduisent au remodelage d'une MEC vraisemblablement plus rigide que la MEC normale (Attieh Y et al., 2017). Cette matrice anormale est suffisante pour

conférer un phénotype mutant à des cellules endothéliales sauvages cultivées dessus (Faurobert E et al., 2013). Ceci suggère que le remodelage anormal de la MEC pourrait participer à l'expansion des lésions CCM par un effet de propagation de proche en proche.

Il a également été détecté, dans les lésions CCM issues de patients, la présence de métalloprotéases (MMPs). Ces médiateurs sont sécrétés par la cellule endothéliale pour remodeler la matrice extracellulaire (Choquet H et al., 2016). Dans le modèle de poisson zèbre, la perte de KRIT1 et de CCM2 favorise la sécrétion de la protéinase ADAMTS4 par les cellules endothéliales *in vitro*, ce qui conduit à un remodelage anormal de la MEC et participe à l'absence de formation du canal atrio-ventriculaire cardiaque (Zhou Z et al., 2016).

3.4.2. Environnement inflammatoire et recrutement du système immunitaire

Le stress oxydatif dû à la surproduction d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) engendre des dommages protéiques, membranaires et nucléiques dans la cellule. Ces dommages favorisent l'état inflammatoire des tissus en induisant une réponse immunitaire. Or, une augmentation de la production des ROS a été détectée dans les 3 mutants CCM (Gibson C.C et al., 2015 ; Fidalgo M et al., 2012). Les protéines CCM contrôlent des voies anti- et pro-oxydatives pour assurer un équilibre d'oxydo-réduction dans la cellule endothéliale. On sait aujourd'hui que les protéines CCM contrôlent l'autophagie mitochondriale pour limiter la production de ROS délétère pour le tissu endothélial (Marchi S et al., 2015). L'action du système immunitaire dans la propagation des lésions a été suspectée par la découverte de 13 gènes d'immunoglobuline sur-exprimés dans les lésions CCM issues de patients (Shenkar R et al., 2003). Cette hypothèse a été confortée par la détection de cellules immunitaires (Lymphocytes B, lymphocytes T, monocytes et macrophages) et notamment l'expansion clonale des lymphocytes B observée autour des lésions CCM (Shi C et al., 2007) qui aurait un impact majeur sur la croissance et la maturation des lésions. Ainsi, la suppression des lymphocytes B grâce à l'utilisation d'un anti-BR3 souris, est suffisante pour diminuer la taille des lésions et leur caractère hémorragique chez la souris KO pour CCM. Cependant, la modulation des lymphocytes B n'a pas d'impact sur la genèse des lésions (Shi C et al., 2016).

3.4.3. Altération de la sensibilité au flux sanguin

De manière intrigante, la formation des lésions s'effectue uniquement dans les capillaires sanguins soumis à un flux sanguin faible. La raison exacte n'est pas encore connue mais quelques études récentes ont donné un début d'explication. Les forces de cisaillement générées par le flux sanguin module la forme des cellules, leur force d'adhésion à la MEC, la stabilité de leurs jonctions intercellulaires et *in fine* leur profil d'expression génique. En l'absence de flux, les cellules déplétées en CCM ont un phénotype semblable à celui qu'adoptent des cellules normales soumises à un fort flux. Elles sont allongées et présentent des fibres de stress transversales ancrées à de nombreuses adhérences focales riches en intégrine $\beta 1$. A l'inverse, les cellules endothéliales qui surexpriment le complexe CCM présentent une désensibilisation au flux sanguin. Elles ne s'alignent pas et ne changent pas de morphologie quel que soit la force du flux (Macek Jilkova Z et al., 2014). D'après les auteurs, le complexe CCM permet à la cellule endothéliale de s'adapter au flux en régulant leur force d'adhésion à la MEC.

En complément dans le modèle du poisson zèbre, Rödel CJ et al, confirment que seuls les vaisseaux à faible flux présentent des lésions dans les mutants pour *ccm1*. Ils concluent que le flux sanguin protège de l'apparition des lésions (Rödel CJ et al., 2019). *In vitro*, des cellules endothéliales déplétées en CCM ont une morphologie normale lorsqu'elles sont cultivées sous flux alors qu'elles présentent les défauts caractéristiques de CCM en absence de flux (Li J et al., 2019). Dans cette

étude, les auteurs expliquent que l'augmentation du flux est suffisante pour restaurer un programme d'expression génique endothélial normal.

En conclusion, les cellules endothéliales déplétées pour les protéines CCM semblent générer un environnement inflammatoire et augmenter la rigidification de la MEC ce qui conduirait à la propagation des lésions CCM. L'initiation des lésions est peut-être la conséquence de la perte de l'équilibre entre la force du flux sanguin et la rigidité de la MEC. Cependant, les mécanismes moléculaires complexes déclenchés par ces dérégulations mécaniques restent encore inconnus à ce jour.

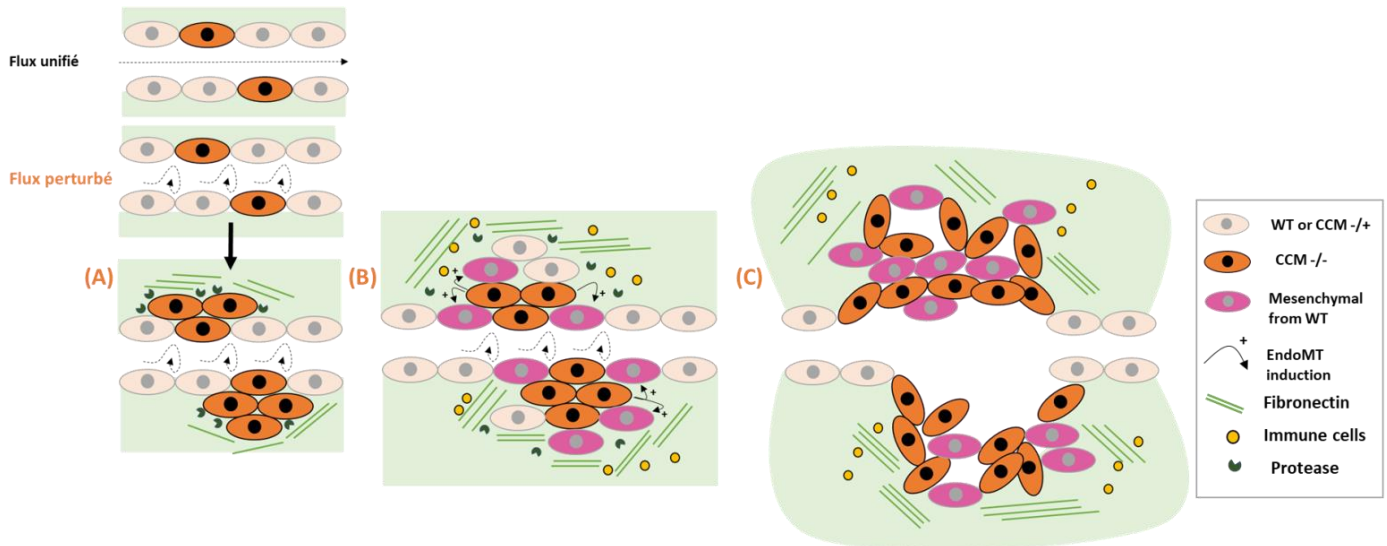


Figure 40 : Les étapes de maturation de la lésion CCM. Lorsque des cellules mutantes CCM sont soumises à un flux perturbé, la formation de la lésion CCM est initiée par une prolifération clonale des cellules mutantes (CCM-/-) (A). Elles sont capables de remodeler la MEC par la sécrétion de protéases et en altérant la fibrillogénèse de la fibronectine. De plus, les cellules mutantes subissent une endoMT, recrute des cellules naïves et induisent leur transition mésenchymale (cellules roses). Des cellules immunitaires viennent incorporer le tissu et induire un environnement inflammatoire (B). L'ensemble de ces comportements sont favorables à la formation de lésions CCM mosaïques composées de cellules mutantes (cellules oranges) et cellules naïves ayant subi une endoMT (cellules roses) (C).

Chapitre V La sénescence cellulaire

1. Description de la sénescence

Les cellules primaires en culture *in vitro* ne se divisent pas indéfiniment, cela a permis de proposer la notion de "sénescence cellulaire". Cet état est caractérisé par un arrêt du cycle cellulaire tout en gardant une forte activité métabolique (Hayflick L., 1965). Elle présente plusieurs caractéristiques moléculaires et phénotypiques qu'il est nécessaire de mettre en évidence pour identifier avec certitude une sénescence. Elle est identifiable par un arrêt du cycle en phase G1 accompagné d'une activité lysosomale β -galactosidase accrue, d'une morphologie aberrante, d'un remaniement chromatinien et d'une activité sécrétoire accrue (Salama R. et al., 2014).

1.1. Surexpression des inhibiteurs de cyclines pour l'arrêt du cycle cellulaire

Une cellule sénescence est caractérisée par un arrêt du cycle cellulaire ou un défaut de prolifération. Cependant, cette unique caractéristique n'est pas suffisante pour décrire la sénescence. *In vivo*, la plupart des cellules sont en phase quiescente, hors du cycle cellulaire (la phase G0). Néanmoins, certaines populations cellulaires sont capables de rentrer dans le cycle cellulaire qui se segmente en 4 phases successives : la phase G1, la phase S (phase de réplication de l'ADN), la phase G2 et la mitose (phase de division cellulaire) (Figure 41). La succession de ces phases est contrôlée par des complexes protéiques constitués de cyclines associées à des kinases spécifiques, les CDKs (*cyclin-dependent kinases*).

Chaque cycline est responsable de l'activation d'une ou plusieurs CDKs. Chaque complexe cycline/CDK est spécifique à la régulation d'une phase du cycle cellulaire (Figure 41). Pour cela, ils contrôlent des processus cellulaires tels que la fragmentation nucléaire, la compaction de l'ADN ou sa réplication.

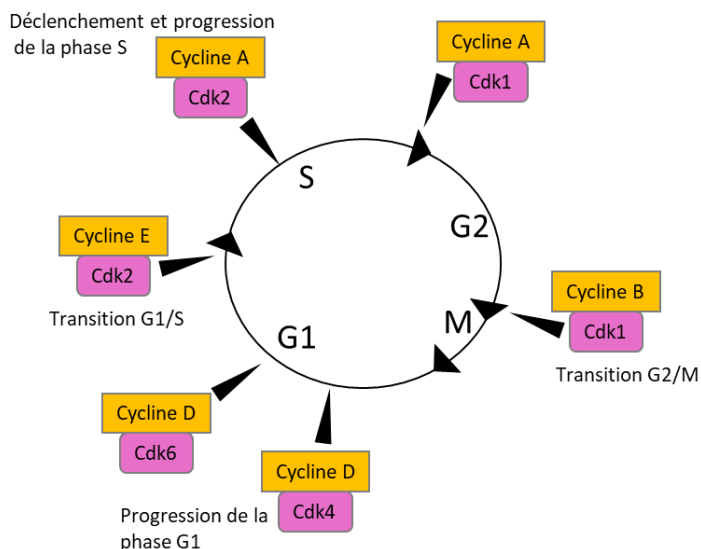


Figure 41 : Régulation du cycle cellulaire par les complexes Cycline/CDK.

La régulation de ces complexes est assurée par des protéines inhibitrices de kinases : les CDKI (*cycline-dependant kinase inhibitor*). Il existe 2 familles de CDKI : les INK4 (p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p18^{INK4C} et p14^{ARF}) et les CIP/KIP (p21^{CIP1}, p27^{KIP1} et p57^{KIP2}). Les cellules sénescents sont caractérisées par la surexpression des CDKI p21^{CIP1}, p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p14^{ARF} (et p19^{ARF} chez la souris) (Sharpless N.E et DePinho R.A, 1999 ; Lowe SW et al., 2004). Ces CDKI sont impliqués dans deux voies canoniques aboutissant à un arrêt du cycle en phase G1. Cependant, les cellules sénescents peuvent aussi voir leur cycle stoppé en phase G2 ou en phase S (Erickson S et al., 1998).

La voie p16^{INK4A}/ CyclineD/CDK4-6/Rb :

Au cours de la prolifération, le facteur de transcription E2F régule des gènes impliqués dans la phase S du cycle cellulaire. Son régulateur principal est la protéine Rb (la protéine du rétinoblastome) qui assure une liaison inhibitrice avec le facteur de transcription E2F. Pour assurer la progression de la phase G1 et la transition vers la phase S, le complexe cycline D/CDK4-6 phosphoryle la protéine Rb pour l'empêcher de se lier à E2F, capable alors d'activer les gènes nécessaires à la progression vers la phase S (He S et al., 2000).

Dans les cellules sénescents, l'expression de la protéine p16^{INK4A} inhibe l'action du complexe cycline D/CDK4-6. De cette manière, la voie p16^{INK4A}-Rb déclenche un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Hara E et al., 1996 ; Chicas A et al., 2010 ; Stein GH et al., 1990) (Figure 42).

La voie p14^{ARF}/MDM2-MDMX/TP53/p21^{CIP1} :

La protéine p53 est un suppresseur de tumeur très étudié. La mutation perte de fonction de ce gène, ou une dégradation anormale de la protéine, est responsable de nombreux cancers. La stabilité de la protéine p53 est régulée par les protéines MDM2 et MDMX qui favorisent l'adressage de p53 au protéasome (Shi D. et Gu W., 2012 ; Shadfan M et al., 2012). Dans les cellules sénescents, la protéine p14^{ARF} lie MDM2 et MDMX et inhibe leur activité ubiquitine-ligase (E3) stabilisant ainsi la protéine p53. La stabilisation de p53 induit l'expression de p21^{CIP1} qui inhibe l'action des complexes CyclineA/CDK1/CDK2 et CyclineB/CDK1 (Zhang Y et al., 1998).

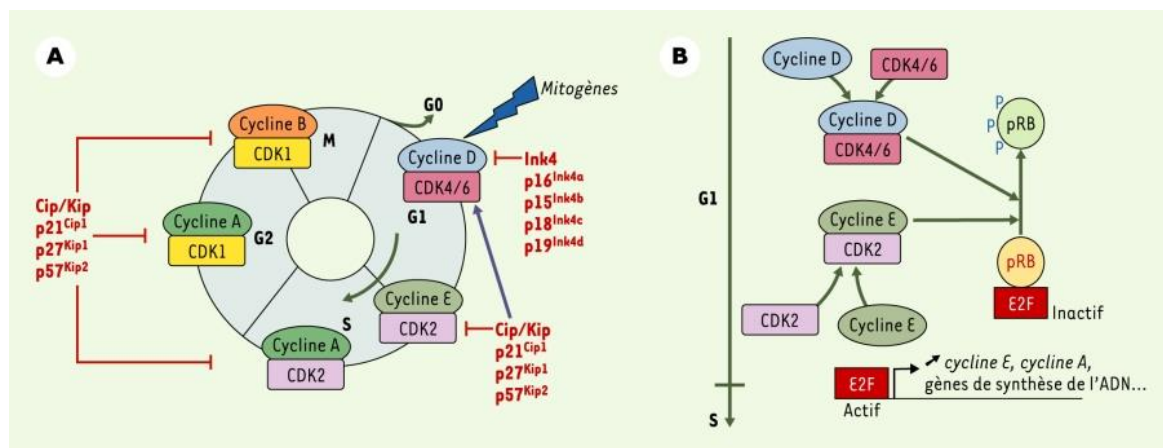


Figure 42 : Rôle des CDKI pour la régulation du cycle cellulaire. (A) Action des différentes CDKI sur les complexes cycline/CDK. (B) Régulation de l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription E2F par la protéine Rb pour la progression du cycle cellulaire. D'après Lobjois V, 2005.

1.2. Remaniements chromatinien pour la reprogrammation génique

La sénescence cellulaire est caractérisée par une reprogrammation du profil d'expression génique. De nombreuses voies de signalisation sont inhibées notamment celles nécessaires à la prolifération cellulaire. Cette répression transcriptionnelle massive est le résultat de remaniements chromatinien.

1.2.1. La formation des SAHFs (Senescence-associated heterochromatin foci)

Les cellules sénescents sont caractérisées par l'apparition de foci nucléaires visibles par marquage DAPI. Ces foci sont appelés les SAHFs (*Senescence-associated heterochromatin foci*). Ils sont caractérisés par une accumulation de marques épigénétiques répressives (H1P1, macroH2A, H3K9me3) et un enrichissement de la protéine structurale chromatinienne HMGA (Narita M et al., 2003) (Figure 43). De manière intéressante, les foci SAHFs sont incompatibles avec la quiescence cellulaire, leur formation étant régulée par la voie de signalisation impliquant la protéine Rb, active uniquement pendant la phase G1 (Narita M et al., 2003). C'est pourquoi la présence de SAHFs est une caractéristique spécifique des cellules en sénescence. La formation des SAHFs est le résultat d'un réarrangement spatial de structures d'hétérochromatine préexistantes qui favorise une répression massive d'un ensemble de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire (Chandra T et al., 2012). Cette formation est initiée par la translocation de la protéine chaperonne d'histone HIRA au niveau des corps nucléaires PML (Zhang R et al., 2007).

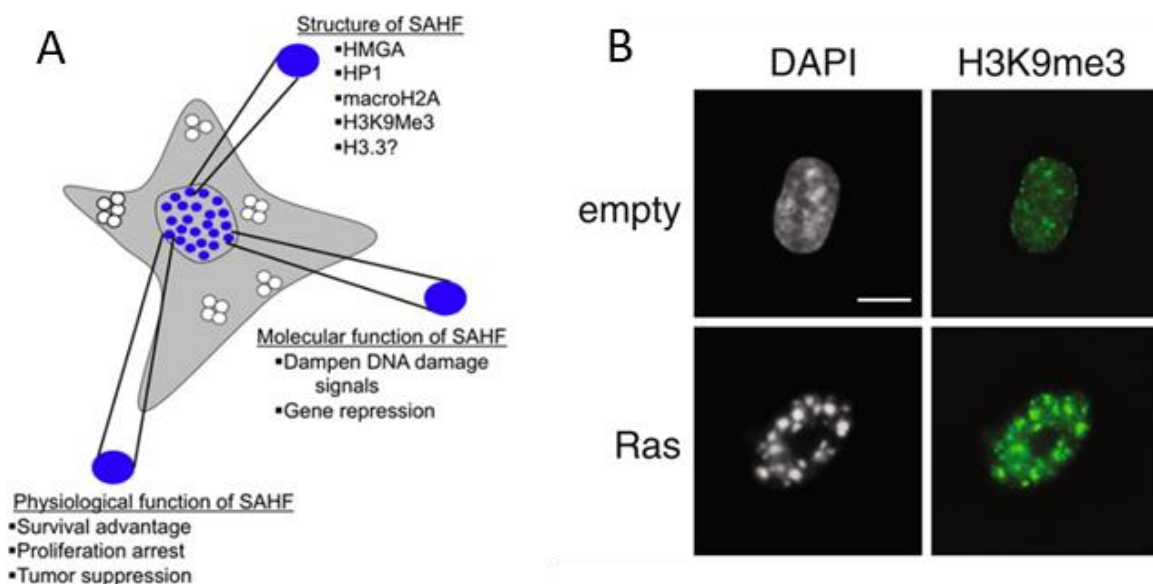


Figure 43 : Les foci d'hétérochromatine observés dans les cellules sénescents (SAHFs). (A) Rôles et composante protéique des SAHFs. D'après Rai TS et Adams PD, 2011. (B) Image DAPI de cellules sénescents surexprimant la protéine oncogène Ras et immunomarquage pour la marque répressive H3K9me3. D'après Chandra T et al., 2012.

1.2.2. La diminution de l'expression de la lamine B

Les lamines sont des protéines filamenteuses accolées à la membrane interne du noyau (Dechat T et al., 2010). Leur remaniement conduit à une interaction plus ou moins forte avec la chromatine pour moduler les profils d'expression génique. De manière intéressante, les cellules qui entrent en sénescence présentent une diminution de l'expression de la lamine B associée à une redistribution de ses points d'enrichissement dans le noyau (Freund A et al., 2012). Dans les cellules sénescents, la réduction de lamine B favorise la formation de SAHFs (Sadaie M et al., 2013) (Figure 44).

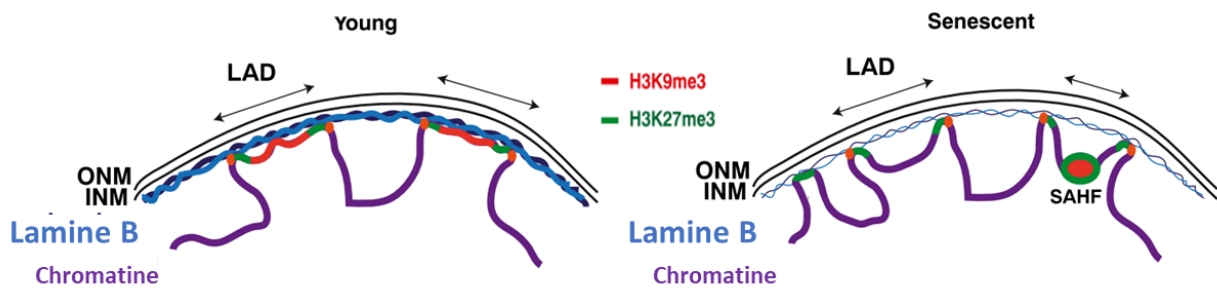


Figure 44 : Rôle de la lamine B sur la formation des SAHFs au cours de la sénescence. La diminution de Lamine B dans les cellules en sénescence favorise la formation des structures SAHFs enrichies par les marques épigénétiques H3K9me3 ou H3K27me3. (LAD : Domaines d'association à la lamine ; ONM : membrane nucléaire externe ; INM : Membrane nucléaire interne). D'après Corpet A et Stucki M, 2014.

1.3. Activité métabolique des cellules sénescences

Les cellules sénescences sont caractérisées par une morphologie large et aplatie, un compartiment cytoplasmique étendu et elles sont parfois multi-nuclées. Cette morphologie est commune à l'ensemble des cellules sénescences quel que soit le signal inducteur. Cette hypertrophie cellulaire semble être le résultat d'une activité autophagique et métabolique altérée.

1.3.1 Augmentation de l'activité β -galactosidase

Le marqueur de sénescence le plus connu est l'activité β -galactosidase lysosomale (SA- β -galactosidase) détectée à pH acide (pH=6) *in vitro* et *in vivo* (Dimri G.P et al., 1995 ; Lee B.Y et al., 2006). Cette enzyme catalyse l'hydrolyse des β -galactosides en monosaccharides. Cette activité est accrue dans les cellules sénescences et peut ainsi facilement être observée grâce une réaction chromogénique du X-gal qui produit un précipité bleu lorsqu'il est clivé. Cependant, cette activité n'est pas nécessaire à l'entrée en sénescence et s'est révélée ne pas être non plus spécifique de la sénescence. Elle peut être observée en réponse à des facteurs de croissance, tels que le TGF- β , sans induction de sénescence cellulaire (Untergasser G et al., 2003).

1.3.2. Augmentation de la macro-autophagie et SAPD

La macro-autophagie élimine les mitochondries défectueuses pour limiter la production de ROS et favoriser la survie cellulaire. Ce phénomène joue un rôle antitumoral puisqu'il déclenche la mort cellulaire autophagique ou la sénescence (Elgendy M et al., 2011 ; Young AR et al., 2009). Un autre phénomène favorable à l'entrée en sénescence est appelé SAPD (*Senescence-associated protein degradation*). Ce phénomène est caractérisé par l'activation de la voie de signalisation UPP (*ubiquitine proteasome pathway*) qui déclenche une dégradation massive des protéines impliquées dans la fonction mitochondriale, la réponse aux dommages à l'ADN et le cycle cellulaire (Dechènes-Simard X et al., 2014)

L'augmentation du métabolisme oxydatif fournit l'énergie nécessaire au phénomène sécrétoire SASP (décrit ci-dessous) observé dans les cellules sénescences (Kaplon J et al., 2013). De plus, la macro-autophagie et le SAPD limitent le stress protéotoxique induit par ce comportement sécrétoire massif (Dörr JR et al., 2013).

1.3.3. Sénescence associée au phénotype sécrétoire

Les cellules sénescents sont métaboliquement actives et subissent un changement d'expression génique qui permet la sécrétion d'un panel de facteurs signalétiques. Elles expriment un sécrétome enrichi de divers facteurs tels que des chimiokines, des cytokines, des facteurs de croissance, des protéines matricielles et des protéases (Coppé JP et al., 2010). La production de ces protéines est assurée par une activité transcriptionnelle intense sous le contrôle des facteurs de transcription GATA4, NF-kappaB et CEBP- β (Chien Y et al., 2011 ; Kang C et al., 2015).

Ce comportement sécrétoire appelé SASP (*Senescence-associated with secretory phenotype*) est spécifique des cellules sénescents. Il n'est retrouvé dans aucun autre état cellulaire associé à un arrêt du cycle tels que la quiescence ou l'état différencié. Certaines protéines sécrétées sont utilisées comme marqueurs de sénescence cellulaire. C'est le cas pour PAI-1 alias SERPINE1 (*plasminogen activator inhibitor type-1*) (Kortlever RM et al., 2006). La composition du sécrétome SASP varie en fonction du type cellulaire et de la nature de l'induction de la sénescence (Coppé JP et al., 2008). Ces facteurs modulent l'inflammation des tissus et le remodelage de la matrice. En effet, les cellules sénescents sécrètent de nombreuses protéases favorables au remodelage de la matrice comme les métalloprotéases de la famille des MMPs mais aussi des protéases qui activent des facteurs solubles tels que MCP-1, MCP-2, MCP-4 et IL-8 clivés par les MMP-1 et MMP-3 (McQuibban G et al., 2002). Le comportement SASP est aussi caractérisé par une altération de la sécrétion des protéines matricielles telles que la fibronectine, le collagène ou la laminine (Coppé JP et al., 2010).

La sécrétion de cytokines permet de recruter le système immunitaire qui assure l'élimination des cellules sénescents (Hoenicke L et Zender L, 2012). En modifiant le microenvironnement, le SASP favorise la prolifération, l'inflammation, l'angiogenèse, et induit une transition identitaire (EMT) des cellules voisines (Laberge RM et al., 2012 ; Campisi J, 2013). Cependant, certains facteurs sécrétés ont également une action autocrine pour la préservation de l'état sénescents. La sécrétion de IL1- α maintient le comportement SASP (Orjalo AV et al., 2009) et la sécrétion IL-6, IL-8, WNT16B et GRO α maintient l'arrêt du cycle cellulaire (Binet R et al, 2009 ; Yang, G. et al., 2006) (Figure 46).

2. Rôles de la sénescence

La sénescence cellulaire est associée au concept de pléiotropie antagoniste car elle est à la fois décrite dans le vieillissement, dans la progression de pathologies liées à l'âge mais elle est également nécessaire au bon fonctionnement de l'organisme tout au long de la vie (Austad SN et al., 2018). En effet, pendant le développement embryonnaire, elle participe à l'organogenèse et plus tard, elle est impliquée dans la réparation des tissus et limite la formation des tumeurs.

2.1. La sénescence pour prévenir les cancers

L'entrée en sénescence est déclenchée lorsque la cellule cumule de nombreux dommages et défaillances. De nombreux stress cellulaires peuvent provoquer l'activation des voies canoniques, décrites plus haut, favorables à la sénescence cellulaire (Figure 46). Ces stress sont soit endogènes comme le raccourcissement des télomères, l'accumulation des dommages à l'ADN suite à un stress oxydatif, l'activation d'un oncogène ou la perte d'un suppresseur de tumeur soit exogènes tels que des drogues ou des radiations.

2.1.1. La sénescence répllicative

Au cours de la division cellulaire, l'ADN polymérase assure la réplication de l'ADN pendant la phase S. Cependant, à chaque division, l'ADN polymérase manque à dupliquer l'extrémité des chromosomes. Ainsi, chaque réplication implique la perte des derniers nucléotides à l'extrémité des chromosomes (Watson JD, 1971). Les télomères sont des séquences répétées qui protègent les séquences codantes de ce défaut de fin de réplication. Cependant, à chaque division, les séquences télomériques raccourcissent jusqu'à atteindre une taille limite (Harley CB et al., 1990). Lorsque cette limite est perçue par la cellule, un arrêt du cycle cellulaire s'établit pour préserver les séquences codantes.

Des systèmes de sauvegarde du génome sont sollicités tels que la réponse aux dommages à l'ADN : la voie de signalisation DDR (*DNA Damage Response*). L'activation de cette voie induit la formation de foci nucléaires composés de variants d'histone H2AX phosphorylés ainsi que la présence de protéines DDR : 53BP1, NBS1 et MDC1 (D'Adda di Fagnana F et al., 2003). La voie DDR est associée à l'action des kinases ATM et ATR activatrices de nombreux effecteurs impliqués dans la régulation du cycle cellulaire tels que CDC25, p53 et p21^{CIP1}. Un arrêt du cycle transitoire s'effectue lorsque la voie DDR est activée en réponse à une cassure de l'ADN. Cet arrêt du cycle permet à la cellule de recruter les systèmes de réparation de l'ADN avant de lever l'inhibition du cycle. Cependant, en réponse à un raccourcissement des télomères ou des dommages trop importants de l'ADN, l'arrêt du cycle est irréversible et la cellule entre dans un état sénescence ou apoptotique (D'Adda di Fagnana F et al., 2003).

A l'opposé des cellules somatiques, les cellules souches ne présentent pas de raccourcissements télomériques et ceci grâce à l'expression exclusive de la télomérase (hTERT). Son activité est dédiée à l'allongement des télomères de la cellule et s'oppose à l'activité déficiente de l'ADN polymérase. (Wright WE et al., 1996).

2.1.2. Induction par l'activation d'un oncogène (IOS)

Un stress génotoxique et l'activation de la voie DDR peuvent être observés en réponse à l'expression d'oncogènes. Il est décrit une cinquantaine d'oncogènes favorables à la sénescence (Gorgoulis VG et Halazonetis TD, 2010). Les plus connus sont les oncogènes Ras et Raf dont la surexpression favorise la prolifération cellulaire (Serrano M et al., 1997). L'induction oncogénique induit une augmentation du nombre d'origines de réplication et engendre des défauts de réplication de l'ADN. Ces défauts sont détectés par la cellule qui, en retour, active les kinases de la voie DDR (ATM, ATR, CHK2 et CHK1) (Bartkova J et al., 2006). L'activation de Ras stimule une cascade de signalisation qui comporte Raf/MEK/MAPK permettant l'activation de p53, p16^{INK4A}, p19^{ARF} et de la voie Rb (Lin AW et al., 1998 ; Palmero I et al., 1998). En effet, l'activation oncogénique de la voie Ras/Raf/MEK induit l'expression des facteurs de transcription Ets1 et Ets2 qui lient le promoteur du gène INK4 pour déclencher la sénescence cellulaire (Zhu J et al., 1998 ; Ohtani N et al., 2001). L'activation oncogénique peut aussi favoriser la sénescence par l'activation de la MAPK p38 mais aussi la PI3K qui induit la production de ROS (Figure 45).

L'activation de Ras favorise également une surexpression de p16 qui déclenche une sénescence prématurée (Pearson M et al., 2000). Cette protéine est associée à la formation des corps nucléaires PML et régule l'activité de p53 et p16^{INK4A} pour la mise en place de l'état sénescence (Bischof O et al., 2002). De même, le complexe Rb-E2F est recruté au niveau des corps PML, de cette manière la

surexpression de PML induit l'inhibition de l'expression des gènes cibles de E2F (Vernier M et al., 2011)

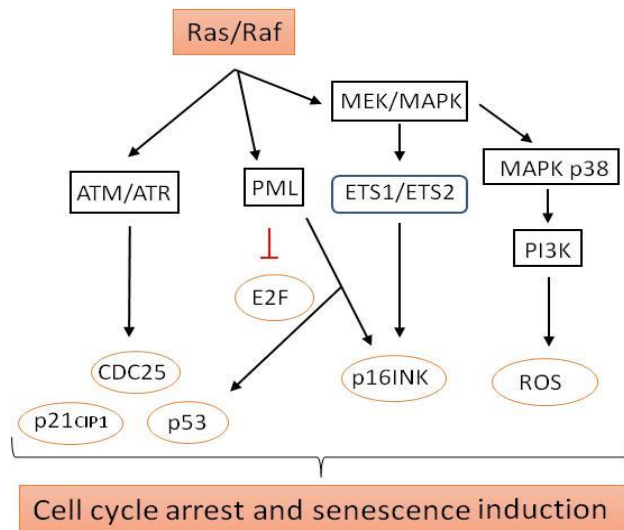


Figure 45 : Les voies de signalisation déclenchées par IOS (Induced Oncogenic Senescence). L'activation oncogénique des facteurs Ras et Raf stimule l'expression de la protéine PML, active les kinases de la voie DDR : ATM et ATR et la voie des MAPK. L'activation de l'ensemble de ces voies stimule l'expression des inhibiteurs de cyclines, des ROS et inhibe l'activité du facteur de transcription E2F. L'ensemble de ces acteurs moléculaires permettent de limiter la progression tumorale par l'induction de la sénescence cellulaire.

2.1.3. Autres inducteurs

De la même manière que la surexpression des oncogènes, l'altération de la fonction de certains suppresseurs de tumeur va favoriser l'entrée en sénescence. C'est le cas de la protéine p53, PTEN, NF1 et VHL (Jung SH et al., 2018 ; Young, AP et al., 2008). Les traitements thérapeutiques contre le cancer comme le traitement aux UV, la chimiothérapie ou les rayons X induisent également l'arrêt du cycle et une entrée en sénescence (Ewald JA et al., 2010). Le traitement par des anti-oxydants limite l'entrée en sénescence, ce qui montre l'importance de la production des ROS en tant qu'inducteur de sénescence (Macip S. et al., 2002). De manière générale, la production de ROS est observée en réponse à divers types de stress inducteurs de sénescence. Comme décrit plus haut, l'activation de la voie Ras favorise la production de ROS qui active la MAPK p38 et stimule à son tour la voie p53-p21^{CIP1} (Figure 45) (Debacq-Chainiaux F et al., 2010). Paradoxalement, plusieurs études montrent que la diminution de Lamine B est associée à une diminution de la production de ROS (Shimi T et al., 2011). Il est à noter que les ROS peuvent, dans certaines conditions, stimuler la prolifération cellulaire (Sena LA et Chandel NS, 2012).

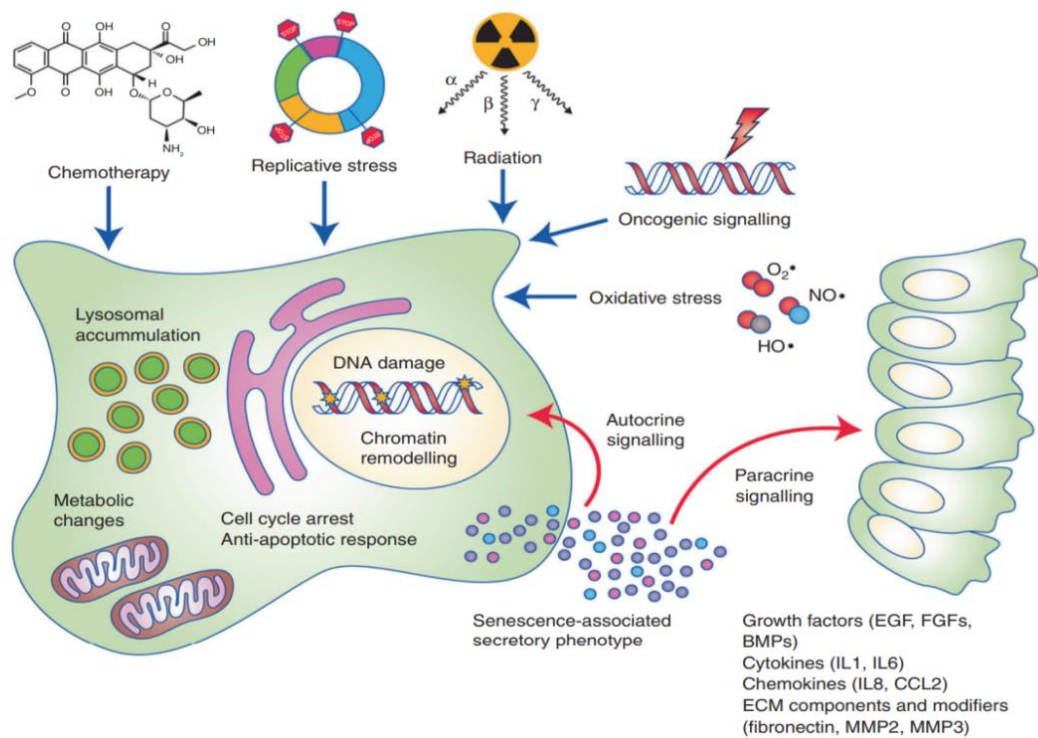


Figure 46 : Les stress inducteurs, les caractéristiques de la cellule sénescence et les facteurs SASP. De nombreux stress endogènes et exogènes peuvent déclencher une sénescence. L'entrée en sénescence est caractérisée par un panel de phénotypes cellulaires tels qu'un arrêt du cycle cellulaire, un remodelage chromatinien et une activité métabolique altérée associée à une accumulation lysosomale et une activité sécrétoire appelée SASP. Le SASP permet à la cellule de sécréter divers facteurs biochimiques ayant une action paracrine sur les cellules voisines et sur le microenvironnement. De plus, le SASP génère un message autocrine favorable au maintien de l'état sénescence. D'après Gonzalez-Meljem JM et al., 2017.

2.2. Rôles de la sénescence dans le vieillissement cellulaire

La sénescence cellulaire a été déterminée comme à l'origine du vieillissement des tissus et au déclin, lié à l'âge, de la fonction des organes. Des cellules positives pour les marquages β -galactosidase et pour les CDKIs sont retrouvées sur des tissus âgés.

Les cellules sénescences sont liées au vieillissement car elles sont favorables au déclin des capacités régénératrices des tissus adultes. En effet, la surexpression de $p16^{INK4A}$ inhibe la progression du cycle cellulaire des cellules souches et des cellules progénitrices (Janzen V et al., 2006). De plus, l'activité SASP des cellules sénescences modifie la niche environnementale des cellules progénitrices et bloque leur fonction régénérative (Krtolica, A. et al., 2001). De manière intéressante, les cellules progénitrices issues de tissus âgés retrouvent leurs capacités régénératrices en contact d'un microenvironnement juvénile (Figure 47) (Conboy IM et al., 2005). D'autre part, grâce à la sécrétion de protéines matricielles et de protéases, les cellules sénescences remodelent la MEC en une matrice fibreuse, rigide et pro-inflammatoire qui désorganise l'architecture des tissus, ce qui est favorable aux pathologies liées à l'âge.

On sait aussi qu'un message paracrine pro-sénescence, porté par le SASP, permet de maintenir et de propager le phénotype aux cellules voisines. Cette propagation est assurée par la sécrétion de IL1- β et du TGF- β (Nelson G et al., 2012 ; Acosta JC et al., 2013). Le TGF- β favorise la production de ROS qui

déclenche des dommages à l'ADN. Sachant que les cellules sénescées perdent leur fonction, la dissémination du phénotype induit la défaillance fonctionnelle des organes lors du vieillissement.

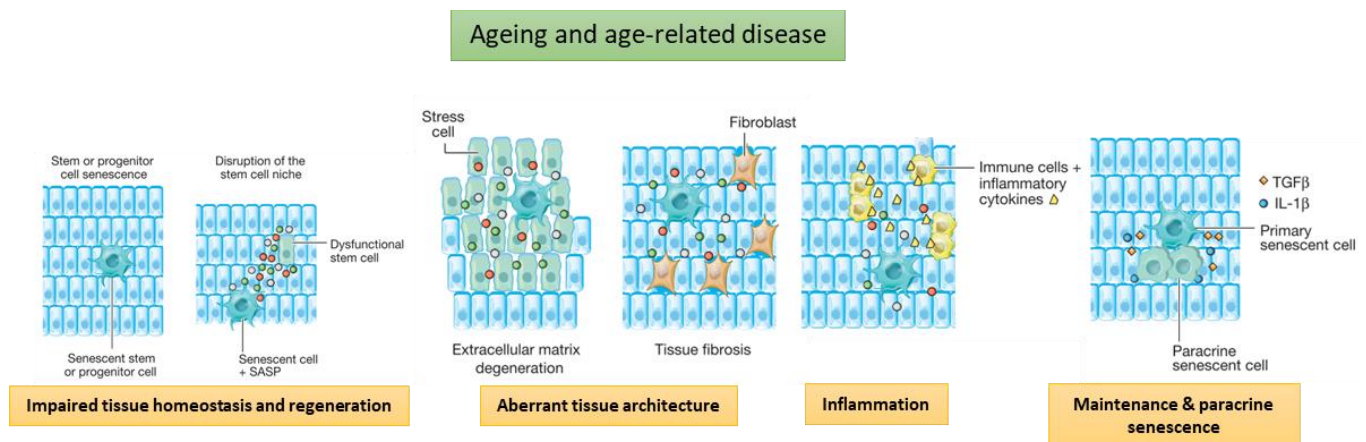


Figure 47 : Rôles des cellules sénescées dans le vieillissement tissulaire et les dysfonctions liées à l'âge. La présence de cellules sénescées altère l'homéostasie de la niche environnementale qui devient hostile au maintien des cellules souches et des cellules progénitrices. Le remodelage de la MEC par les cellules sénescées induit une altération de la structure tridimensionnelle qui rigidifie les tissus et active les fibroblastes environnants favorables à la fibrose des tissus. Le SASP est riche de facteurs pro-inflammatoires pour recruter les cellules immunitaires et induire une inflammation des tissus. Enfin, les cellules sénescées sont maintenues par une action autocrine et un message paracrine favorable à la propagation de cet état sénescé chez les cellules voisines. L'ensemble de ces comportements cellulaires est favorable au vieillissement des tissus et aux maladies liées à l'âge. Adaptation de Jan M. van Deursen, 2014.

2.3. Rôles de la sénescence des cellules endothéliales dans les pathologies liées à l'âge

La sénescence cellulaire est associée à de nombreuses pathologies touchant l'ensemble des organes telles que les fibroses, les maladies métaboliques, dégénératives ou vasculaires. (Figure 54) (Munoz-Espin D et Serrano M, 2014).

Dans l'endothélium, de manière générale, la sénescence des cellules endothéliales est délétère pour le maintien de la paroi vasculaire. D'une part, elle réduit les propriétés progénitrices des cellules endothéliales qui ne peuvent plus renouveler le tissu. D'autre part, la sénescence déclenche une perte de fonction de la cellule endothéliale qui se traduit par une déstabilisation des jonctions intercellulaires. Ainsi, la sénescence des cellules endothéliales induit une altération de la barrière hémato-encéphalique (BHE) caractérisée par un défaut du recouvrement des péricytes et des pieds astrocytaires (Yamazaki Y et al., 2016 ; Kritsilis M et al., 2018). L'absence des cellules murales augmente la perméabilité de la paroi vasculaire associée à un défaut de perfusion des vaisseaux. Les micro-saignements cérébraux sont délétères pour la fonction neuronale et gliale. Ainsi, la sénescence vasculaire est associée à un défaut de myélinisation des axones et à certaines pathologies neurologiques comme Alzheimer (Cortes-Canteli M et al., 2020).

La sénescence prématurée des cellules endothéliales et des VSMCs peut-être soit bénéfique soit néfaste selon le niveau d'activation du système immunitaire. En effet, les VSMCs et les cellules endothéliales qui résident dans les zones sclérosées des vaisseaux présentent une activité β -galactosidase accrue ainsi qu'une augmentation de l'expression des CDKI $p15^{INK4B}$, $p16^{INK4a}$, $p21^{CIP1}$, $p53$ et $p14^{ARF}$ (Holdt LM et al., 2011 ; Ihling C et al., 1997). L'entrée en sénescence des VSMCs permet de limiter la formation de la plaque fibreuse caractéristique de l'athérosclérose (Gonzalez-Navarro H

et al., 2010). Cependant, la sécrétion de cytokines et interleukines participe à la formation des plaques d'athérome. De plus, la sécrétion de protéases tels que MMP12 et MMP13 serait impliquée dans la déstabilisation de la plaque responsable des complications de la maladie (Childs BG et al., 2016).

Dans ces zones vasculaires favorables à l'athérosclérose, le flux sanguin perturbé induit l'activation des voies p53-p21^{CIP1} et GATA4-Twist1 qui initie la sénescence endothéliale et le SASP (Warboys C et al., 2014 ; Mahmoud M et al., 2019). Récemment, une étude a montré le rôle du SASP endothélial sur les défauts de sensibilité à l'insuline dans le diabète de type 2. Cette étude démontre le rôle de la sénescence des cellules endothéliales et de leur SASP pour la progression de maladies métaboliques liés à l'âge (Barinda AJ et al., 2020).

2.4. Rôles de la sénescence dans la progression tumorale

De manière contre-intuitive, la sénescence peut aboutir à une hyperplasie cellulaire inappropriée. Le sécrétome des cellules sénescents peut déclencher l'expression, dans les cellules voisines, des facteurs de reprogrammation cellulaire : NANOG, SOX2 et OCT4 (Ohanna M et al., 2013). Ces facteurs favorisent l'émergence, la survie et la migration de cellules souches cancéreuses à l'origine des tumeurs (Cahu J et al., 2012 , Mosteiro L et al., 2017). De manière paracrine, les facteurs du SASP, produits par des fibroblastes sénescents présents dans le stroma tumoral, agissent sur différentes étapes de la progression tumorale (Alspach E et al., 2013). Par exemple, la sécrétion des interleukines IL-6 et IL-8 stimule l'EMT des cellules épithéliales pré-malignes, la migration et l'invasion des cellules tumorales (Tamm I et al., 1994 ; Ohanna, M. et al., 2013 ; Coppé JP et al., 2008). De plus, la sécrétion massive de protéases par les fibroblastes sénescents, présents dans le stroma tumoral, favorise le remodelage protéolytique de la MEC et facilite les mouvements cellulaires (Liu D et Hornsby PJ, 2007) qui sont de plus guidés par des facteurs SASP solubles ou déposés dans la matrice (Kim YH et al., 2017 ; Farsam V. et al., 2016). Enfin, les nombreux facteurs de croissance et les facteurs inflammatoires produits favorisent la prolifération tumorale (Figure 48).

Il est décrit que l'angiogenèse tumorale est stimulée par les fibroblastes en sénescence qui sécrètent IL-6 (Ancrile B et al., 2007). De plus, le SASP est composé de nombreux facteurs pro-angiogéniques tels que IL-8, MCP-1/2, GROs, PGE2, VEGF, EGF et CSFs (Coppe, J. P et al., 2010 ; Tonini T et al., 2003) et permet de recruter de nombreuses cellules immunitaires connues pour sécréter des facteurs pro-angiogéniques (VEGF, IL-8 et les MMPs). D'autres types d'angiogenèses anarchiques sont induites par le SASP notamment dans les rétinopathies (Oubaha M et al., 2016).

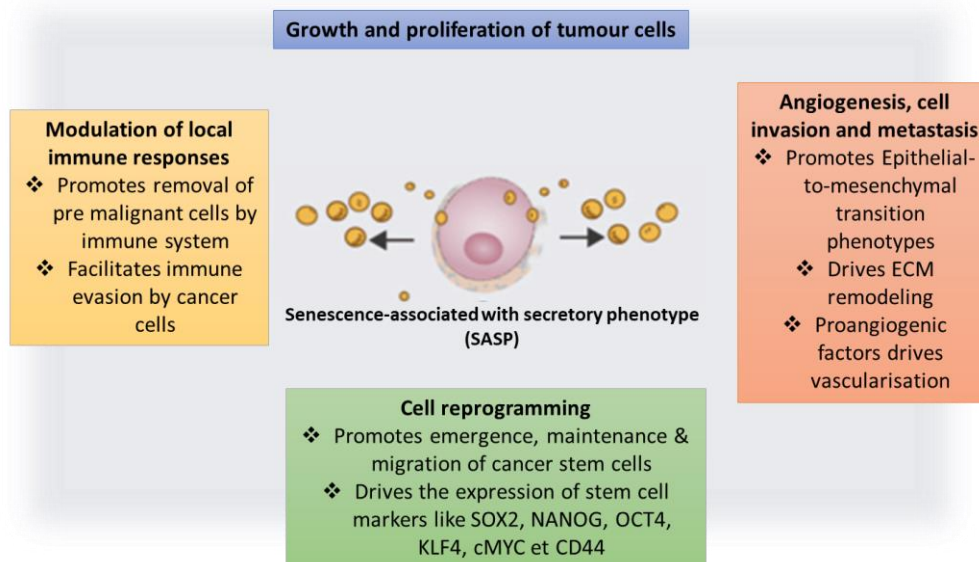


Figure 48 : Rôles du SASP dans la progression tumorale. Adaptation de Gonzalez-Meljem JM et al., 2017.

2.5. Rôles de la sénescence pour la cicatrisation

Le SASP permet d'assurer les différentes étapes de la cicatrisation suite à une blessure. Il permet le recrutement des cellules immunitaires et favorise la prolifération cellulaire nécessaire à la régénération tissulaire. En effet, une brève exposition aux facteurs SASP, induit l'expression de gènes progéniteurs et prolifératifs dans les kératinocytes et favorise la cicatrisation (Ritschka B et al., 2017 ; Demaria M et al., 2014). A l'inverse, une exposition prolongée à ces mêmes facteurs déclenche l'entrée en sénescence. De plus, pour promouvoir le bon déroulement de la cicatrisation, les MMPs associées au SASP permettent de limiter la fibrose excessive associée aux processus de cicatrisation (Krizhanovsky V et al., 2008).

2.6. Rôles de la sénescence au cours du développement

Au cours du développement embryonnaire, des cellules sénescents sont retrouvées dans certaines structures et organes telles que le mésonéphros (rein transitoire), le sac endolymphatique et à l'extrémité de chaque bourgeon de membre, au niveau de la structure AER (*Apical Ectodermal Ridge*). Les cellules sénescents expriment des gènes impliqués dans les voies de signalisation développementales tels que la voie TGF- β , WNT ou Hedgehog. Ces cellules sont présentes dans une fenêtre de temps précise au cours du développement. Elles sont rapidement éliminées par les macrophages du système immunitaire (Storer M et al., 2013). De cette manière, les cellules sénescents modulent la morphogenèse des tissus car elles favorisent la dégradation des tissus en recrutant les macrophages au niveau des aires interdigitales ou les organes primaires tels que le mésonéphros. Aussi, elles limitent la prolifération de certains types cellulaires pour réguler la croissance des tissus (Munoz-Espin D et Serrano M, 2014).

A l'opposé, les facteurs SASP sécrétés favorisent la prolifération des cellules voisines. Ainsi, au niveau de l'AER, les facteurs FGF4 et FGF8 sécrétés par les cellules sénescents stimulent la prolifération des cellules mésenchymateuses adjacentes et favorisent la croissance du bourgeon de membre (Storer M et al., 2013).

3. La dynamique de la sénescence cellulaire

La sénescence est un processus qui s'établit en plusieurs étapes et qui présente différentes cinétiques d'apparition. Il est aujourd'hui possible de dissocier la sénescence précoce de la sénescence tardive qui présentent des comportements cellulaires distincts. La sénescence aigue, qui est associée à des processus physiologiques, se dissocie de la sénescence chronique impliquée dans l'apparition des pathologies liées à l'âge. La dynamique de la sénescence est aussi caractérisée par une réversibilité de l'arrêt du cycle et à l'induction d'une reprogrammation vers un état progéniteur des cellules préalablement sénescents.

3.1. Sénescence précoce vs. Tardive

La sénescence est initiée par l'expression des inhibiteurs de CDKI, p53-p21^{CIP1} et p16^{INK4A} pour un arrêt du cycle cellulaire. Puis se met en place une sénescence précoce qui se traduit par une diminution de l'expression de la lamine B, un remodelage chromatinien et la formation de SAHFs. Ces remodelages chromatiniens déclenchent une reprogrammation de l'expression génique à l'origine du comportement sécrétoire SASP (Figure 49). La plupart des cellules sénescents sont alors éliminées par le phénomène de clairance immunitaire. Néanmoins, certaines échappent à la surveillance immunitaire et entrent dans une phase de sénescence tardive.

Au stade tardif de la sénescence, les cellules vont subir des remaniements chromatiniens drastiques consécutifs à la production de rétrotransposons ou à l'extrusion, dans le cytoplasme, de fragments chromatiniens suite à la protéolyse d'histone (De Cecco M. et al., 2013 ; Ivanov, A. et al., 2013). De nouveaux miRNA exprimés vont minimiser l'expression des facteurs inflammatoires du SASP permettant ainsi aux cellules d'échapper à la clairance immunitaire pour promouvoir le vieillissement des tissus (Bhaumik D. et al., 2009).

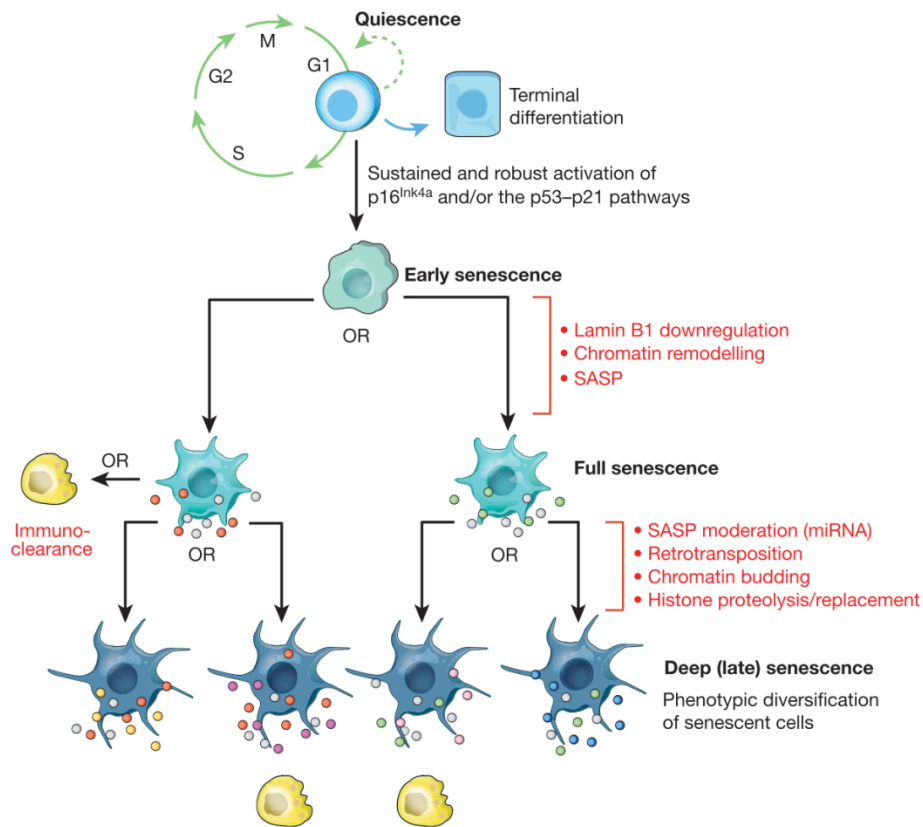


Figure 49 : Les étapes pour l'établissement de l'état sénescence. L'étape initiale de la sénescence est caractérisée par l'activation des inhibiteurs de cycline $p16^{INK4a}$ et/ou $p53-p21$ pour un arrêt du cycle cellulaire. La sénescence précoce se dirige vers une sénescence complète par la sous-expression de la lamine B1 qui induit un remodelage chromatinien en parallèle de l'établissement d'un SASP. La sénescence tardive est caractérisée par des fragments chromatiniques retrouvés dans le cytoplasme, une protéolyse des histones et l'expression de rétrotransposons pour moduler la nature du SASP. Cette hétérogénéité du SASP module l'efficacité de la clairance immunitaire. D'après Jan M. van Deursen, 2014.

3.2. Sénescence aigue vs. Chronique

La sénescence aigue permet de répondre à une blessure pour assurer le bon déroulement de la cicatrisation. Elle est aussi importante pour la croissance des membres et la néo-vascularisation au cours de l'embryogenèse. Cette sénescence aigue repose sur une grande efficacité de la clairance immunitaire qui élimine rapidement les cellules et permet de limiter l'effet du SASP dans le temps et l'espace (Storer, M. et al. 2013). Cette clairance est assurée par les macrophages M1, les cellules NK et les lymphocyte T helper (Kang TW et al., 2011) qui reconnaissent les récepteurs NKG2D (récepteurs de cellules NK) exprimés à la surface de la cellule sénescence (Sagiv A et al., 2016).

A l'opposé, une sénescence chronique est observée dans les processus de vieillissement tissulaires. Lorsque les stress environnementaux et les dommages à l'ADN s'accumulent dans les cellules, l'organisme se protège en limitant la prolifération des cellules qui transitent vers un arrêt du cycle et une entrée en sénescence (Matheu, A et al., 2007). Cependant, le système immunitaire défectueux avec l'âge est moins efficace pour la clairance des cellules sénescences et c'est une sénescence chronique qui s'installe (Wang, J et al., 2011). De cette manière, les cellules sénescences et leur sécrétome inflammatoire contribue à la détérioration des tissus (Figure 50).

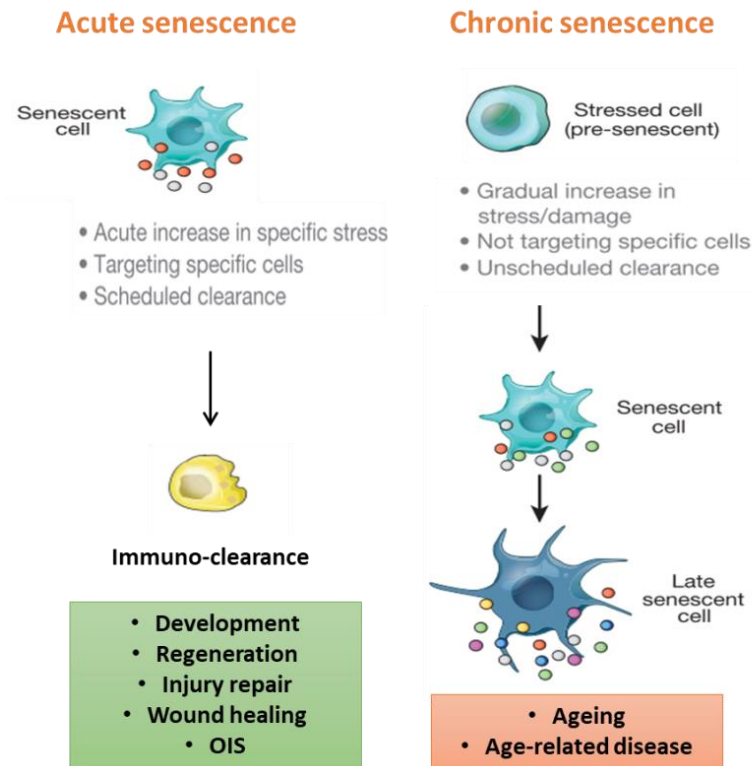


Figure 50 : Plusieurs cinétiques pour établir les diverses propriétés associées à la sénescence. La sénescence aiguë ("acute") est souvent bénéfique et associée aux phénomènes de cicatrisation, de régénération ou au cours du développement de l'embryon. Elle est aussi retrouvée lors de sénescences induites par oncogène pour limiter la progression tumorale. Dans cette sénescence aiguë, les cellules sont rapidement éliminées par le système immunitaire. A l'opposé, une sénescence chronique est caractérisée par un défaut de clairance immunitaire, responsable du vieillissement tissulaire et des maladies liées à l'âge. Adaptation de Jan M. van Deursen, 2014.

3.3. Réversibilité de l'arrêt du cycle

De nombreuses études montrent que l'arrêt du cycle des cellules sénescents est réversible en fonction du contexte cellulaire et du microenvironnement. *In vitro*, les fibroblastes sénescents peuvent retourner dans le cycle grâce à l'inhibition de la voie de signalisation p53 (Dirac AM et Bernards R, 2003). Dans certains types cellulaires, cette réversion n'est possible que dans un contexte signalétique cellulaire particulier où la voie de signalisation p16^{INK4A}-Rb est sous-régulée (Beauséjour CM et al., 2003). On sait aussi qu'une réversion est possible par l'inhibition de la sécrétion d'IL-6, l'interleukine favorable au maintien de l'état sénescents (Kuilman T et al., 2008). Des études pour la reprogrammation cellulaire d'iPS (*induced pluripotent stem cells*) ont montré que le cocktail OCT4, SOX-2, KLF4 et c-MYC induit une activation des voies p53 et INK4 pro-sénescents (Banito A et al., 2009) qui bloquent l'émergence d'iPS. Or, une reprogrammation iPS a pu être obtenue à partir de cellules sénescents répliquatives par un traitement de ce même cocktail avec l'ajout de NANOG et LIN28 (Lapasset L et al., 2011). La présence de SAHFs serait un indicateur de la réversibilité du processus sénescents. Dans leur étude de reprogrammation d'iPS à partir de cellules sénescents, la disparition des foci SAHF précède la reprise du cycle cellulaire (Lapasset L et al., 2011).

De manière intéressante, cette réversion confère aux cellules des caractéristiques de cellules souches et de cellules progénitrices. Cette conversion est favorable aux processus de cicatrisation mais aussi

pour la propagation des cancers (Ritschka B et al., 2017 ; Milanovic M et al., 2018). Ainsi, les cellules sénescentes seraient une source de cellules souches cancéreuses (Figure 51).

Des voies de signalisation permettant aux cellules sénescentes de retourner dans le cycle cellulaire, comme la voie mTOR, seraient impliquées dans cette reprogrammation vers un état souche (Aarts M et al., 2017).

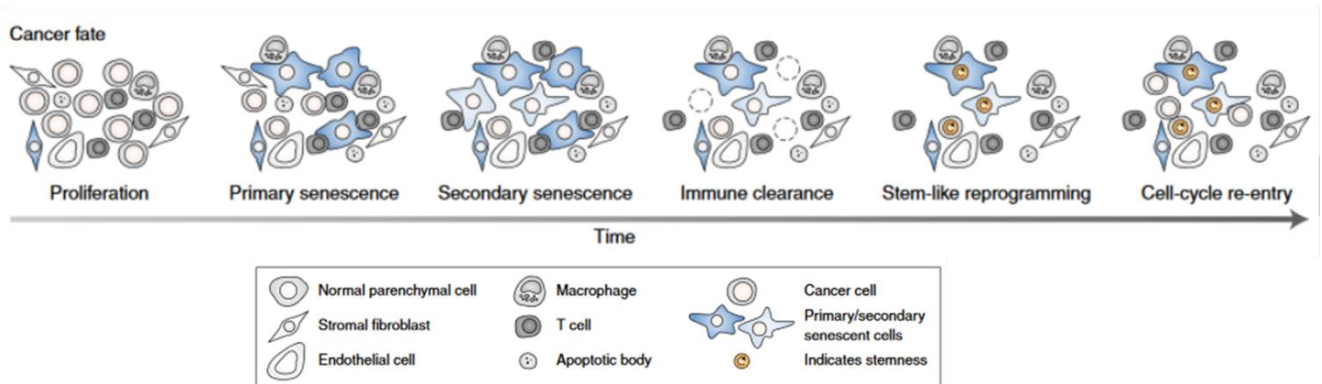


Figure 51 : La reprogrammation vers un état progéniteur associée à la sénescence. Dans les cancers, la prolifération accrue déclenche l'entrée en sénescence de certaines cellules qui grâce à l'activité SASP étendent cet état sénescence aux cellules voisines (la sénescence paracrine ou sénescence secondaire). La clairance immunitaire de certaines cellules sénescentes est favorisée par les facteurs SASP sécrétés. Cependant, les cellules sénescentes restantes peuvent subir une reprogrammation cellule souche/progénitrice et ré-entrer dans le cycle cellulaire. D'après Lee S et Schmitt CA 2019.

II. Objectifs de thèse

Les lésions CCM sont le résultat d'une perte de fonction de la cellule endothéliale qui se traduit par une altération des jonctions intercellulaires et l'initiation d'une angiogenèse anarchique (Carmona et al., 2009 ; Glading et al., 2007 ; Sure et al., 2001). Cette déstabilisation fonctionnelle est le résultat d'une altération de l'homéostasie tensionnelle de la cellule endothéliale. Plus précisément, la perte du complexe CCM bloque le dialogue entre les jonctions intercellulaires dépendantes de la VE-cadhérine et les intégrines aux AFs (Faurobert et al., 2013 ; Whitehead et al., 2009 ; Stockton et al., 2010). Pour réguler ce dialogue, le complexe CCM balance l'activité et contrôle la localisation des kinases ROCK1 et ROCK2 en aval de RhoA. D'une part, la perte du complexe déclenche une suractivation de la kinase ROCK1, qui se traduit par une surproduction des fibres de stress d'actomyosine. D'autre part, la perte du complexe délocalise la kinase ROCK2 des jonctions VE-cadhérines et fragilise les jonctions intercellulaires (Lisowska et al., 2018). L'hypothèse que des défauts de la mécanique cellulaire soient favorables à la formation des lésions CCM est confirmée par l'utilisation de drogues ciblant la voie RhoA/ROCK qui ont été montrées suffisantes pour limiter la taille et la fréquence d'apparition des lésions dans le modèle murin (Shenkar et al., 2019). S'il est admis que la voie RhoA/ROCK joue un rôle pour la formation des lésions CCM, la part de la mécanotransduction et le rôle des kinases ROCK1 et ROCK2 pour la mise en place des lésions CCM restent à définir.

En parallèle, il est décrit que les cellules mutantes pour les protéines CCM, subissent une transition identitaire appelée transition endothélio-mésenchymateuse (EndoMT) (Maddaluno et al., 2013 ; Bravi et al., 2016). Cette transition se traduit par l'expression de gènes mésenchymateux associée à de nouveaux gains de fonction. En effet, par une communication paracrine, les cellules mutantes recrutent les cellules sauvages adjacentes pour qu'elles s'incorporent aux lésions CCM (Malinverno et al., 2019).

Le but de cette thèse a été d'étudier le rôle de la contractilité cellulaire dépendante de l'activité des kinases ROCKs sur le programme d'expression génique de la cellule endothéliale déplétée de la protéine CCM2. Pour cela, j'ai suivi une stratégie expérimentale qui n'avait jamais été utilisée auparavant qui a consisté à comparer le transcriptome des cellules déplétées en CCM2 à celui des cellules déplétées en CCM2 additionnellement déplétées en ROCK1 ou ROCK2. Ces analyses m'ont permis de confirmer le rôle majeur des ROCKs sur la dérégulation de l'expression génique dans les cellules endothéliales déficientes en CCM2. L'analyse minutieuse par Gene ontology des gènes dérégulés m'a permis d'identifier un profil transcriptomique qui n'avait jamais été envisagé et caractéristique d'une sénescence associée à un phénotype sécrétoire ou SASP (Senescence-associated with secretory phenotype).

J'ai ensuite dédié mes travaux à la validation de cet état de la cellule par la mise en évidence phénotypique de cette sénescence prématurée lors de la perte de la protéine CCM2 dans les cellules endothéliales ainsi qu'à la caractérisation des fonctions acquises associées au phénotype sécrétoire tels que l'invasion, la chimio-attraction de cellules endothéliales sauvages et de macrophages et le remodelage de la MEC. Enfin, j'ai montré que ces gains de fonction dépendent des kinases ROCK1 et ROCK2 démontrant leur rôle sur l'identité cellulaire au-delà du « simple » contrôle de la mécanique du cytosquelette.

III. Résultats : Articles

Cerebral Cavernous Malformation 2 deficient endothelial cells undergo a mechanical reprogramming into a senescence associated secretory phenotype.

Daphné Vannier¹, Apeksha Shapeti^{2,3}, Florent Chuffart¹, Sandra Manet¹, Paul Rivier¹, Emmanuelle Planus¹, Olivier Destaing¹, Corinne Albiges-Rizo^{1*}, Hans Van Oosterwyck^{2,3*} and Eva Faurobert^{1*✉}.

1 Institute for Advanced Biosciences, University Grenoble Alpes, INSERM U1209, CNRS UMR5309, site santé, Allée des Alpes 38042 Grenoble, France

2 Biomechanics Section (BMe), Department of Mechanical Engineering, KU Leuven, Leuven, Belgium.

3 Prometheus, div. Skeletal Tissue Engineering, KU Leuven, Leuven, Belgium.

*Co-last authors

✉ corresponding author. E-mail for correspondance: eva.faurobert@univ-grenoble-alpes.fr

Abstract:

Cerebral Cavernous Malformations (CCM) is a cerebrovascular disease in which stacks of dilated haemorrhagic blood capillaries form focally in the brain. Endothelial loss-of-function mutations on any of the three *CCM* genes (*CCM1-3*) are responsible for the familial form of the disease. *CCM1* or *CCM2* disease develops at mid-life later than *CCM3* that develops in childhood. The reasons for these different timings are unknown. Recent studies have shown that *CCM3* lesions form by clonal expansion of *ccm3*-null endothelial cells and recruitment of wild-type endothelial cells. Differently, we show that *CCM2*-silenced endothelial cells enter into a senescence associated with a secretory phenotype (SASP). While exiting the cell cycle and expressing marks of senescence, *CCM2*-silenced endothelial cells acquire secretory functions that they use to invade the extracellular matrix and attract surrounding wild-type endothelial cells and immune cells. Further, we demonstrate that this SASP as a whole depends on the increased cell contractility downstream of ROCK1 and ROCK2 dysfunctions. Mechanistically, ROCK1 and ROCK2 bear complementary functions in setting up a new transcriptomic program with SASP signature and in giving senescent, invasive and chemoattractive features to *CCM2*-silenced endothelial cells. Inhibition of myosin II or of ROCKs blocks the entry into SASP and, importantly, inhibits invasion and chemo-attraction. We propose that premature aging of mutant endothelial cells could be the cause of the mid-life onset of *CCM2* disease. This discovery opens the way to the trial of senolytic drugs to block at their root the defective molecular pathways involved in the *CCM2* disease.

Introduction:

Cerebral Cavemous malformations (CCM) are stacks of overgrown, dilated and haemorrhagic venous capillaries formed by a unique layer of poorly joined endothelial cells (EC) without intervening cerebral mural cells(1). Loss-of-function mutations on 3 genes (*CCM1/Krit1*, *CCM2/Malcavernin*, *CCM3/PDCD10*) are associated with the familial form of the disease(2,3). *CCM1* or *CCM2* associated disease develops later in life than *CCM3* which is a more aggressive form of the disease(4,5).

CCM lesions expand with time and they become infiltrated by immune cells that sustain a chronic inflammatory response(6,7). Intriguingly, CCM lesions are composed of a mosaic of mutant and wild-type EC (8–10). Using confetti mouse engineering, Malinverno and colleagues have further shown that the majority of EC bordering large mature *ccm3* caverns are actually wild-type EC that have been attracted to the lesion site at least in part by mutant EC(10). Other studies have reported that *CCM* mutant EC secrete metalloproteases(11–13) or cytokines(14), over-produce ROS(15), present defective autophagy(16) or that they undergo an endothelial to mesenchymal transition (EndMT)(17). Moreover, loss of CCM proteins activates p38 MAPK(18), ERK5-KLF2/4(19–21) and TLR4 signaling pathways(22). However, how these dysregulations coordinate to generate CCM lesions is not well known.

A conserved feature of *CCM* mutant EC in humans and animal models is an increase in RhoA-dependent ROCK activity(12,23–25). ROCK overactivation stimulates the polymerization of a contractile acto-myosin cytoskeleton that breaks the tensional homeostasis between cell-cell and cell-extracellular matrix (ECM) adhesions(26). We previously showed that this tensional homeostasis is actually under the control of the coupled activities of the two ROCK isoforms. The molecular scaffold formed by the association of *CCM1* and *CCM2* recruits ROCK2 to VE cadherin-complexes to promote the polymerization of a cortical acto-myosin cytoskeleton supporting cell-cell junctions. At the same time, this *CCM/ROCK2* complex keeps ROCK1 activity low thereby limiting the contractility of the cell and its adhesion to the ECM. When the *CCM1/2* complex is lost, ROCK2 delocalizes from VE-cadherin while ROCK1 gets overactivated and promotes the polymerization of numerous β 1 integrin-anchored acto-myosin stress fibers that tear the cell-cell junctions apart(26).

These mechanical defects play a primary role in the development of the disease. Inhibition of both ROCKs with chemical inhibitors, among which fasudil, blocks the genesis of CCM lesions in animal models and their maturation(27–29). However, the toxicity of these drugs precludes their use in patients. It is therefore critical to find new therapies targeting specific downstream pathways. Toward this goal, we need to find a mechanistic explanation that takes into account the different dysregulated traits of *CCM* mutant EC.

Here, our contribution is twofold. First, we report that the transcriptome of *CCM2*-silenced EC presents a signature of a senescence associated with a secretory phenotype (SASP). Cell senescence contributes to a wide variety of human age-related pathologies, including cancer, fibrosis, cardiovascular diseases, type 2 diabetes, or neurological disorders(30). This phenotype defines the ability of cell-cycle-arrested cells to secrete pro-inflammatory

cytokines, chemokines, growth factors and proteases giving rise to ECM remodelling and to the stimulation of neighbour cells proliferation and invasiveness(31). Going further, we indeed confirmed that CCM2-silenced EC enter into premature senescence and acquire degradative and invasive skills that stimulate angiogenesis in vitro. Moreover, they gain paracrine functions through secreted factors that they use to attract wild-type EC and immune cells. Second, we demonstrate that this SASP as a whole depends on the increased cell contractility downstream of ROCK1 and ROCK2 complementary dysfunctions. Inhibition of myosin II motor or of ROCKs blocks the entry of CCM2-silenced EC into SASP and, importantly, inhibits the acquisition of their invasive and chemo-attractive skills. We propose that senolytic drugs currently tested in age-related diseases could also be used to target this mechanically induced SASP to block at their root the defective molecular pathways involved in the CCM2 disease.

Results:

1) A transcriptomic program of senescence associated with a secretory phenotype is turned on by the silencing of CCM2 in HUVEC

CCM1 and CCM2 proteins interact with each other to form a molecular scaffold(32). We previously showed that, owing to the stabilization effect of CCM2 on CCM1, both proteins are lost when CCM2 is silenced(33). We therefore chose to silence CCM2 in order to deplete the entire CCM1/CCM2 complex. To study the role of CCM2 on the gene expression program in EC, we performed RNA sequencing on monolayers of HUVEC transfected with CCM2 targeting siRNA (siCCM2) or with non-targeting siRNA (siNT). The CCM2 silencing efficacy is shown in figure S1A and was similar to that in Lisowska et al., 2018. Two thousand and fifty five differentially expressed genes (DEGs) (fold change [FC] ≥ 2 ; $P < 0.05$, FDR corrected using Benjamini Hochberg method (34)) were identified in HUVEC siCCM2 compared to siNT among which 1318 genes were upregulated while 739 were downregulated.

To investigate the cellular functions altered by the loss of CCM2, we performed a Gene Ontology analysis on these DEGs using cellular component (Fig 1A) and biological process (Fig 1B) annotations. Up-regulated genes were associated with the plasma membrane, secretory vesicles, extracellular matrix and focal adhesions (Fig 1A). They related to ECM organization, cell adhesion and migration, secretion, inflammatory response to cytokines and calcium homeostasis (Fig1B). Differently, down-regulated genes were associated with the nuclear part of the cell, chromosomes, chromatin, the mitotic spindle pole and kinetochores and microtubules (Fig 1A). They relate to DNA replication, recombination and repair, chromosome segregation, microtubule-dependent movements and cell cycle progression (Fig 1B). A Reactome analysis further confirmed these results (Fig 1C). In fact, these up and down-regulated functions are characteristic of a striking unique cellular state; a senescence-associated with a secretory phenotype (SASP) (Fig 1C).

To comfort the hypothesis that a SASP transcriptomic program is turned on in siCCM2 HUVEC, we identified specific signatures of senescence and SASP from the literature corresponding to gene sets enriched in senescent cells among which fibroblasts and endothelial cells(35,36). These gene sets relate to up- and down-regulated genes (Suppl data 1). We then searched for an enrichment in these gene sets in the CCM2-depleted transcriptome using Gene Set Enrichment Analysis (GSEA). We confirmed that these senescence and SASP signatures were indeed significantly enriched in the CCM2-silenced transcriptome (Fig1D, Fig S2). Overall, these functional analyses of the transcriptome suggest that ECs undergo a senescence associated with a secretory phenotype when CCM2 is lost.

2) ROCK-dependent cell contractility controls the SASP transcriptional program in siCCM2 HUVEC

Increased ROCK-dependent cell contractility has a major role in the genesis of CCM lesion. Inhibition of ROCK is sufficient to block the formation of CCM lesion or their maturation(27–29). Going deeper in the analysis of the contribution of each ROCK isoform to the CCM phenotype, we previously showed that the CCM1/2 complex is a scaffold recruiting

ROCK2 at VE-cadherin complexes and limiting ROCK1 kinase activity to maintain the tensional homeostasis between cell-cell and cell-ECM adhesions and to preserve the integrity of the endothelial monolayer(26). However, it is yet unknown whether ROCK-dependent cell contractility is involved in the control of gene expression downstream of CCM2. In the present study, we sought for the contribution of ROCK1 and ROCK2 to the transcriptional program of CCM2-silenced HUVEC. We performed RNA sequencing on monolayers of CCM2-silenced HUVEC additionally silenced for ROCK1 or ROCK2 (Fig S1A) in the same set of experiments as that shown in figure 1. Strikingly, half of the genes dysregulated in the siCCM2 condition had their expression significantly returned toward the control level by the additional silencing of ROCKs (Fig 2A). ROCK2 had a more potent restoring effect than ROCK1. First, it restored almost all of these genes (48% versus 52%) while ROCK1 restored only half of them (23% versus 52%) (Fig 2A). ROCK2 was particularly more potent at restoring downregulated genes than ROCK1 (Fig 2B). Second, ROCK2 silencing rescued the level of expression of these DEGs nearly to the control level whereas ROCK1 silencing rescued it only partially (Fig 2C). Interestingly, ROCK1 and ROCK2 depletion alone had opposite effects on the level of expression of these DEGs, consistently with the reported balance between their functions (26). Importantly, CCM2 and ROCK2 silencing had opposite effects on DEG expression (Fig 2C), suggesting a gain of transcriptional function of ROCK2 when CCM2 is lost. These data demonstrate the crucial role of ROCK signalling on the control of gene expression downstream of CCM2 and identifies ROCK2 as the ROCK isoform mostly involved in this transcriptional dysregulation.

We then studied the restoring effect of ROCK1 or ROCK2 silencing on the biological functions perturbed by CCM2 depletion. Figure 2D shows a clustered expression heatmap of DEGs belonging to the G.O. biological processes presented in figure 1B. Strikingly, the expression of DEGs belonging to the down-regulated nuclear functions was fully restored by ROCK2 depletion while ROCK1 depletion had only a partial effect consistently with the higher restoring effect of ROCK2 on downregulated genes (Fig 2B). Up-regulated perimembrane functions were partially restored by ROCK1 and to a higher extent by ROCK2 silencing (Fig 2D). Finally, we focused on the effect of ROCKs on the senescence signature in siCCM2 transcriptome using GSEA. While this senescence signature was still present upon ROCK1 depletion, it was not anymore present when ROCK2 had been depleted (Fig 2E, Fig S2).

Overall, our transcriptomic analyses show that the transcriptional program of siCCM2 HUVEC presents a ROCK-induced SASP signature and that ROCK2 has a major role on its occurrence.

3) ROCK-dependent cell contractility induces premature cellular senescence in siCCM2 HUVEC

Having shown that a ROCK-dependent SASP transcriptional program is turned on upon the loss of CCM2, we next sought for features of premature senescence in these cells. We looked for different hallmarks, as the combination of multiple traits is required to ascertain senescence(37). HUVEC were analysed at passage 4 when siNT cells are still proliferative

and healthy. In addition to flattening and elongating (fig S3A), they expressed a senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal) activity (Fig 3A). The percentage of SA- β -gal positive cells was about 3-fold increased upon CCM2 silencing (Fig 3B). The mRNA level of several CDK inhibitors was upregulated and that of the transcription factor E2F1, a driver of S phase entry, was dramatically downregulated (fig S1B). Accordingly, the percentage of cells positive for p14/ARF staining was 3-fold increased (Fig 3C, D). Using BrdU incorporation (Fig 3E), we showed a 2-fold reduction in the percentage of cells in S phase and an accumulation in G1 indicative of a defect in the G1/S transition of the cell cycle (Fig 3F). The percentage of cells positive for the proliferative marker Ki67 was accordingly lowered (Fig 3G, H) which translated into a significantly lowered rate of proliferation of the population as measured by impedance (Fig S3B). These cell cycle defects were accompanied by the appearance of senescence-associated heterochromatin foci (SAHF) (Fig 3I, J) and larger nucleus area (Fig S3C). Overall, the combination of all these markers show that the loss of CCM2 indeed induces premature senescence in HUVEC.

Our next goal was to know whether this premature senescence is caused by the mechanical defects provoked by the loss of CCM2. To answer this question, we treated siCCM2 HUVEC with blebbistatin, an inhibitor of the myosin II motor or with Y27632, an inhibitor of ROCK1 and 2 kinase activities. Both treatments abrogated the elongated and flattened shape of siCCM2 HUVEC that regained a more cobblestone shape (Fig S3A, C). Interestingly, these inhibitors of contractility had a restoring effect on all the senescent traits studied above, i.e. SA- β -gal activity, accumulation in G1, and SAHF resulting in restored Ki67+ proliferative cells (fig 3A-D, S3C, D) supporting the fact that increased contractility upon the loss of CCM2 is involved in this premature senescence. However, Y27632 was more potent than blebbistatin at restoring the expression of p14/ARF and the S-phase (Fig 3D, F) suggesting that ROCKs kinase activities regulate signalling pathways that add to the contractility of the cytoskeleton to induce senescence.

We next focused on the contribution of each ROCK isoform to this senescence. Additional silencing of ROCK1 or ROCK2 in siCCM2 HUVEC was similarly efficient in restoring a normal phenotype for most of the features tested (Fig 3B, D, H, J). However, ROCK2 silencing was more efficient in rescuing the G1 phase of the cell cycle (Fig 3C, D), consistently with its better rescuing effect on down-regulated cyclins (Fig S1).

4) ROCK2-dependent secretory phenotype gives siCCM2 HUVEC paracrine chemo-attractive functions toward WT EC and immune cells.

Senescent cells secrete paracrine factors that can promote tumor development in vivo by engaging deleterious inflammatory responses and malignant phenotypes such as proliferation and invasiveness in cell-culture models(38). By RNA-sequencing analysis, we showed that siCCM2 HUVEC overexpress cytokines or inflammatory chemokines among which IL-1A and B, IL8, CXCL1, 2, 8, CCL20 or EREG that are hallmarks of SASP (39). The expression of these SASP associated chemokines was lowered toward the CT level by ROCK1 or ROCK2 silencing (Fig 4A).

In human and CCM mouse models, a chronic inflammation is observed at the site of the CCM lesion where immune cells such as lymphocytes and monocytes are recruited. To test whether the loss of CCM2 leads to the secretion of chemo-attractive cues for immune cells, we measured the capacity of media conditioned by HUVEC to chemo-attract IMAC, a cell line of macrophages. A modified Boyden chamber measuring the impedance of cells that have migrated from the upper chamber was used. The conditioned media produced for 48h by siRNA transfected HUVEC was added to the lower part of the chamber. Almost no transmigration of macrophages was observed in the case of siNT-conditioned media (Fig 4B). Strikingly, siCCM2-conditioned media provoked a rapid transmigration of the macrophages suggesting that siCCM2 HUVEC had secreted chemo-attractive factors that siNT HUVEC had not (Fig 4B). Importantly, this chemo-attraction was inhibited when ROCK2 but not ROCK1 was additionally silenced (Fig 4B). Therefore, siCCM2 HUVEC secrete paracrine factors that can attract immune cells such as macrophages. Moreover, these chemo-attraction skills depend on ROCK2 dysfunction.

In human, CCM lesions are mosaics of mutant and WT ECs. It has recently been shown that CCM3 KO ECs can attract WT EC *in vivo* in brain vasculature and *in vitro* on mixed monolayers(10). To test whether these secreted factors would also have a paracrine effect on the recruitment of WT EC, we measured the capacity of siCCM2-conditioned media to chemo-attract naive HUVEC through a layer of matrigel in a modified Boyden chamber using impedance measurement. Strikingly, siCCM2-conditioned media significantly increased the speed of invasion of serum-starved naive HUVEC through the matrigel showing that chemo-attractive factors secreted by siCCM2 HUVEC could also attract EC (Fig 4C). As for macrophage chemo-attraction, this effect was inhibited by ROCK2 but not ROCK1 additional silencing (Fig 4C). Therefore, we showed that siCCM2 HUVEC produce paracrine factors that attract wild-type EC in a ROCK2-dependent manner. Therefore, generalizing the results on CCM3, we showed that CCM2 silencing in ECs also promote the invasiveness of WT ECs.

These results demonstrate that senescent siCCM2 HUVEC indeed undergo a SASP which is driven by ROCK2 dysfunctions. The consequences of this SASP is the recruitment of wild-type EC and immune cells by siCCM2 HUVEC as reported *in vivo* in CCM lesions.

5) ROCK1-dependent cell contractility gives juxtacrine ECM degradative and invasive skills to siCCM2 HUVEC and their neighbour WT EC.

In cancer, cells undergoing a SASP can also promote tumour development through a juxtacrine effect on their microenvironment by secreting matrix metalloproteinases (MMPs) and extracellular matrix (ECM) remodeling enzymes that facilitate tumour cell invasiveness and metastasis(38). In a similar manner to cancer progression, a SASP-dependent invasion of the brain tissue by EC could lie at the root of CCM lesion formation. Consistently, MMPs have been found around CCM lesions in human(13) and in mouse(12) or zebrafish models(20) and their upregulation has been involved in the CCM defects.

Interestingly, siCCM2 HUVEC overexpressed ECM remodelling mediators including matrix proteins, metalloproteinases and cross-linking enzymes (Fig 5A). The expression of these genes was lowered by the silencing of ROCK1 and to a higher extent of ROCK2 (Fig 5A). To

know whether this new expression program confers invasive skills to siCCM2 HUVEC, we tested their ability to degrade ECM and invade a 3D matrix. To visualize the degradation of the ECM, siRNA transfected HUVEC were cultured overnight on fluorescent gelatin and immunostained for the focal adhesion marker activated β 1 integrin. siNT HUVEC barely degraded the gelatin as expected for differentiated EC (Fig 5B). Conversely and consistently with their new SASP expression program, siCCM2 HUVEC degraded the gelatin through scratch zones appearing dark in the fluorescent layer and which shape suggested that they were produced under focal adhesions (Fig 5B). They were dependent on the activity of MMPs as demonstrated by their complete disappearance upon the MMP inhibitor GM-6001 treatment (Fig S4A). Together with blocking the mechanosensitive assembly of focal adhesions (Fig S4B), Y27632 and blebbistatin blocked gelatin degradation (Fig 5B). We previously showed that additional silencing of ROCK1, but not of ROCK2, lowers mechanical forces and limits excessive focal adhesions formation in siCCM2 HUVEC(26). Accordingly, only ROCK1 but not ROCK2 additional depletion was able to inhibit ECM degradation by siCCM2 HUVEC (Fig 5B). Overall, these data show that ROCK1-dependent increase in cell contractility and in cell-ECM adhesion together with the overexpression of MMPs are responsible for the acquisition by siCCM2 HUVEC of ECM degradative skills.

We next tested whether their new degradative capacities gave invasive skills to siCCM2 HUVEC. To measure 3D invasiveness, GFP-expressing siRNA treated HUVEC were plated on 3D-degradable polyethyl glycol gels. Invasive sprouts were imaged after 18 hours and the maximum invasion distance quantified. siCCM2 HUVEC invaded the 3D gel on a twice longer distance than siNT HUVEC and they mostly invaded as isolated cells with filopodia at their front compared to the collective invasive mode of siNT HUVEC (Fig 5C). Silencing of ROCK1 or blebbistatin treatment reduced the invasiveness of siCCM2 HUVEC to that of siNT HUVEC whereas silencing of ROCK2 enhanced it on the contrary (Fig 5C), showing that cell invasiveness like ECM degradation was dependent on the ROCK1-dependent increased contractility of these cells.

We then asked whether siCCM2 HUVEC could stimulate the sprouting of naïve HUVEC when mixed together on the surface of 3D-PEG gels. Strikingly, we observed that RFP-expressing naïve HUVEC invaded the gels on a twice longer distance when they were mixed with siCCM2 HUVEC than when mixed with siNT HUVEC (Fig 5D). Interestingly, this increased invasion was significantly reduced when naïve HUVEC were mixed with siCCM2+siROCK1 HUVEC but remained unchanged when they were mixed with siCCM2+siROCK2 HUVEC (Fig 5D). It is likely that the ROCK1-dependent juxtacrine proteolytical remodeling of the microenvironment by the mutant EC provide tracks for the WT EC.

Altogether, our results show that senescent siCCM2 HUVEC have acquired a ROCK1-dependent capacity to degrade and invade the ECM. Moreover, they exert a ROCK1-dependent juxtacrine effect through ECM remodelling and a ROCK2-dependent paracrine effect through chemokine secretion on the recruitment of WT HUVEC and macrophages.

Discussion

Many cellular pathways are dysregulated in CCM-deficient EC and it has been difficult to propose a mechanistic model that could take into account all these aspects. Transition in cellular fate(17) upon morphological and mechanical changes during the loss of cell-cell junctions(26,33,40) are contingent with functional defects such as overproduction of ROS(15), decreased autophagy(16), secretion of metalloproteases(11–13) or cytokines(14) and increased p38(18) and MEKK3/KLF2(19–21) and TLR4 signaling(22). Here we show that CCM2-deficient EC engage toward a senescence associated with a secretory phenotype (Fig 6A). To ascertain that CCM2-depleted EC undergo a SASP, multiple senescent traits were validated among which the presence of a transcriptomic SASP signature, SA- β -galactosidase activity, upregulation of CDK inhibitors, cell cycle blockage in G1, presence of SAHF along with the secretion of chemo-attractant factors. A study from Awad's laboratory published during the preparation of this manuscript gives a strong support to our work. They show that aging and CCM brains present common dysregulated features among which 320 common DEG, plasma molecules and imaging biomarkers further supporting that premature aging of the neuro-vascular system could be the cause of CCM disease(41).

SASP is characterized by cell growth arrest, widespread changes in chromatin organization and gene expression(31). These changes also include the secretion of numerous pro-inflammatory cytokines, chemokines, growth factors and proteases(39). SASP can have either beneficial or deleterious effects depending on the context. Acute senescence is beneficial in development, tissue regeneration or cancer through the clearance of senescent cells by the immune system(42). Chronic senescence triggers chronic inflammation that can on the contrary favour age-related diseases including cancer, fibrosis, cardiovascular diseases, type 2 diabetes, osteoarthritis or neurological disorders(30). Indeed, the long-term secreted pro-inflammatory factors promote cell proliferation, microenvironment remodelling, angiogenesis and inflammation in a paracrine manner. Remarkably, decreased autophagy(43), ROS overproduction(44), P38 MAPK(45), KLF2/4(46,47) and TLR4(48) signaling pathways have all been involved in the induction of SASP either through regulation of CDK inhibitors or through the NF κ B or C/EBP β -driven expression of cytokines. Therefore, we propose that each of the dysregulated features of CCM-deficient EC represents a different facet of the same cellular state. Future researches should help reconstructing the chronology of the different events in the framework of this SASP. This should identify key therapeutic targets for either single or combinatorial drug treatments to block at their root the defective molecular pathways involved in the CCM2 disease. Senolytic drugs and drugs targeting the SASP *per se* are currently under pre-clinical trials for cancer therapy or other age-related diseases(30). They could also be tested to prevent the formation and expansion of CCM lesions.

This SASP not only reconciles all the CCM defects but also brings a molecular explanation for the mosaicism of the CCM lesion (Fig 6A). Secreted chemokines and cytokines attract wild-type EC in paracrine and juxtacrine manners and triggers an inflammatory response, another major feature of CCM lesions(10). Not only WT are attracted by CCM-deficient EC but they are triggered to undergo EndMT and express stem cell markers(10). Interestingly,

NF κ B signalling has been shown to activate WNT/ β catenin signalling to induce the EMT of cells into cancer stem cells(49) and to induce cancer cell metastasis in response to IL1 β (50). Therefore, one can assume that a similar mechanism might operate in CCM lesion where senescent cells could induce the dedifferentiation of WT EC through EndMT.

Whereas it has also been observed that Ccm3-null EC attract wild-type EC at the site of the lesion in CCM3 mouse model, major differences in the cellular fate exist with our CCM2-deficient EC model. Clonal expansion of Ccm3-null EC precedes the expansion of the lesion(9,10). Immortalized Ccm3-null EC extracted from these mice proliferate more rapidly than their WT counterparts with more cells in S-phase(10) suggesting that CCM3 depletion leads to an opposite effect on cell proliferation compared to CCM2 depletion. Moreover, the loss of CCM3 actually preserves primary EC from replicative senescence *in vitro*(51). Therefore, opposite mechanisms could lead to the formation of CCM lesions in CCM3 and CCM2 heterozygous individuals upon the second-hit mutation. A rapid clonal proliferation of CCM3-deficient EC may trigger the formation of aggressive lesions early in age whereas an entry in SASP of CCM2-deficient EC may lead to the progressive formation of lesions and to the later onset of the CCM2 disease. Using the confetti reporter system in the Ccm2 mouse model would help studying the initiation and expansion of CCM2 lesions in comparison with the Ccm3 model. However, the absence of increased Ki67 staining in EC lining the lesions compared to normal vessels nor the presence of Ki-67-positive EC clusters in these lesions(52) does not argue in favour of a clonal endothelial proliferation in the iCCM2 KO mouse model.

The second major breakthrough of this study is that the ROCK-dependent mechanotransduction is controlling the occurrence of the SASP. ECs in CCM lesions experience unbalanced forces coming from stagnant blood flow(53) on their luminal side and high ECM stiffness upon abnormal matrix remodeling on their basal side(33). This perturbed extracellular mechanical environment correlates with an increased intracellular tension due to RhoA overactivation (23) and downstream to the disrupted balance between ROCK1 and ROCK2 functions(26). Upon the loss of CCM2, ROCK2 dislocalizes from VE-cadherin junctions while overactivated ROCK1 stimulates the formation β 1 integrin-anchored stress fibers. Here, we uncover for the first time that, beyond their role on the EC architecture, ROCKs dysfunctions are instrumental in a complementary way to the cell entry into SASP (Fig 6B). On the one hand, ROCK2 is involved in the dysregulated expression of not less than half of the genes dysregulated upon CCM2 loss among which genes involved in senescence, cytokine and ECM remodelling enzymes production. The opposite heatmap profiles in absence of CCM2 or ROCK2 indicate that ROCK2 gains a broad transcriptional regulatory function when CCM2 is lost. ROCK2 is also involved in the paracrine chemo-attraction of WT EC and immune cells. On the other hand, ROCK1 enables the mechanosensitive degradation of the ECM and its invasion by the senescent CCM2-depleted EC and in a juxtacrine manner by chemo-attracted WT EC. We previously shown that ROCK1 overactivation allow CCM2-depleted HUVEC to exert stronger traction forces on the ECM (26,33). Since EC pull on their microenvironment to invade it(54), it is likely that these stronger forces are responsible for this enhanced invasion. Moreover, local degradation of the

ECM at sites of high traction forces seems a mechanism by which EC invade. Further investigations will help better understand the molecular events at play.

ROCK1 like ROCK2 also affects gene expression downstream of CCM2, to a lower extent though and inhibition of the myosin motor or silencing of ROCK1 is enough to block senescence. These data suggest that cross-talks exist between the contractility of the actomyosin cytoskeleton and the transcription of genes involved in SASP. Several mechanosensitive transcription factors are known to be regulated by actomyosin polymerization or contractility(55). Moreover, ROCK2 can shuttle into the nucleus where it phosphorylates the chromatin remodeller p300HAT(56). Fascinating future investigations should unravel how ROCK1 and ROCK2 cooperate to regulate chromatin organization and gene expression through the control of mechanosensitive transcription machineries.

Material and Methods

Cell culture and transfections:

Pooled HUVEC were obtained from Lonza. Upon reception, HUVEC at P0 were expanded over 2 passages in Collagen 1 (from Rat tail, BD) coated flasks in complete EGM-2 medium supplemented with 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin at 37°C in a 5% CO₂ - 3% O₂ humidified chamber. HUVEC at passage 3 were transfected twice at 24 h-intervals with 30 nM siRNA and Lipofectamine RNAi max (Life Technologies, ref. 13778-150) according to the manufacturer's instructions in 37°C in a regular 5% CO₂ in a humidified chamber. For double transfections, 30 nM of each siRNA was used. siRNA duplexes for non targeting (ON-TARGET plus Non-targeting siRNA #1, Dharmacon), CCM2 (Dharmacon smartpool ON-TARGET plus Thermo Scientific ref. L-014728-01), ROCK1 (Dharmacon smartpool ON-TARGET plus Thermo Scientific ref. L-003536-00) and ROCK2 (Dharmacon smartpool ON-TARGET plus Thermo Scientific ref. L-004610-00). When required, blebbistatin, Y27632 and GM6001 were used at 10 µM final.

RNA sequencing and differential analysis:

One million of siRNA transfected HUVEC were seeded at confluency 6 hours after the second round of transfection in wells of 6-well plates coated with collagen 1 and cultured for 48h in complete media at 37°C, 5% CO₂. Total RNA were extracted from HUVEC using the NucleoSpin RNA II kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions. cDNA libraries were prepared with the TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation (Illumina) and sequenced on a HiSeq 2500 Illumina platform using single-end 50 basepair reads at the MGX facility (Montpellier). Fastq file were aligned using STAR (2.5.2b) on UCSC hg19 genome. The contents of the annotation directories were downloaded from UCSC on: July 17, 2015. Bam file were counted using htseq-count (0.11.2.) with option -t exon -f bam -r pos -s reverse -m intersection-strict -nonunique none. Differential analyses were performed with SARTools (1.4.1) (57) using DESeq2 (1.12.3) (58) and default options. P-values were adjusted with Benjamini-Hochberg procedure(34) set for 5% of FDR. Heatmaps using a correlation matrix and boxplots were obtained with custom R script (3.3.0). The raw sequencing data used in this study are available in the National Center for Biotechnology Information's Gene Expression Omnibus (GEO) database and is accessible through GEO series accession number (pending).

Bioinformatics analyses:

Gene ontology analyses on DEG in siCCM2 condition (fold change [FC] ≥ 2 ; $P < 0.05$ with FDR corrected using Benjamini-Hochberg method (34)) were made with PANTHER version 15.0 Released 2020-02-14 using slim cellular components and biological processes. Enriched pathways analyses were conducted with Reactome. DEGs ($P < 0.05$, 5% FDR) rescued by additional silencing of ROCK1 or ROCK2 were recovered at the union of Venn diagrams of DEGs in siCCM2 vs siNT and DEGs in siCCM2 vs siCCM2+ROCK1 or ROCK2 respectively. Gene Set Enrichment Analyses were conducted using GSEA software from Broad Institute, UC San Diego(59).

Quantitative RT-PCR:

Purified RNA (1 µg) were reverse transcribed using the iScript Reverse Transcription Supermix (Biorad). Quantitative real-time PCR (Q-PCR) was performed with iTaq Universal SYBR Green Supermix (Biorad) in a 20 µl reaction on a thermal cycler (C-1000 Touch; Bio-Rad Laboratories). Product sizes were controlled by DNA gel electrophoresis and the melt curves were evaluated using CFX Manager (Bio-Rad Laboratories). A total of three housekeeping genes were selected for their stability in our HUVEC cell line, under our experimental conditions, using the three analytical software programs, geNorm, Normfinder and Bestkeeper (60,61). We used the relative expression software tool CFX Manager for relative quantification and normalization was achieved by using a normalization factor from all reference genes(60). The mean of three technical replicates was calculated per biological replicate.

Immunofluorescence staining:

HUVEC were seeded at 5×10^4 cells or 2×10^5 cells in 24-well plates on coverslips coated with 10 µg/ml fibronectin (from human plasma, Sigma Aldrich) and incubated overnight in complete EBM-2 medium. Cells were fixed with 4% PFA, permeabilized with 0.2% Triton X-100, and incubated with anti-activated $\beta 1$ integrin clone 9EG7 ((BD Biosciences, 1/200),), mouse anti β catenin clone 6F9 (Sigma-Aldrich, 1/500), anti p14/ARF (ab216602 Abcam, 1/400) and antiKi-67 (AN9260 Millipore, 1/400) antibodies. After rinsing, coverslips were incubated [Goat anti-Mouse and anti-Rabbit IgG \(H+L\) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor conjugated AF 488, AF 546, AF 647 \(Invitrogen, 1/1000\)](#) and phalloidin conjugates with Atto 647 (Sigma, 1/2000). The coverslips were mounted in Mowiol/DAPI solution and imaged on epifluorescent Axiomager microscope (Zeiss) at 63X magnification. HUVEC positive for p14/ARF or Ki67 were manually counted out of more than 100 cells total.

SA-B-Galactosidase staining:

HUVEC were seeded 48 hours after the second siRNA transfection at a density of 5×10^4 in 24-well plates coated with 10µg/mL fibronectin and incubated overnight in complete EBM-2-medium. Senescence-Associated β -galactosidase activity was assessed using a SA- β -galactosidase staining kit according to the manufacturer's instructions (Cell Signaling). Positive cells were counted manually out of more than 100 cells total.

BrdU assay:

HUVEC were seeded 48 hours after the second siRNA transfection at a density of 2×10^5 cells in 6-well plates coated with 100µg/mL collagen type I from rat and incubated overnight in complete EBM-2-medium. The BrdU assay was performed with the BD Accuri C6 flow cytometer using the APC-BrdU flow kit according to the manufacturer's instructions (Cell Signaling).

xCELLigence proliferation assay:

Proliferation assay was performed using the xCELLigence Real-Time Cell Analysis (RTCA) DP instrument in combination with E-plate 16 (ACEA Biosciences) coated with 100 μ L of 100 μ g/mL collagen type I from rat tail for 30 min at 37°C and washed 2 times with PBS 1X. 40 μ L of complete EBM-2-medium was added and baseline without cells was made with RTCA software. 5x10³ siRNA transfected HUVEC were seeded in 100 μ L of complete EBM-2-medium. Impedance measurements were recorded every 5 min during 72h. Impedance was normalized at 5 hours after seeding to eliminate the contribution of cell spreading and adhesion to the signal. Slope measurement was performed between 24h to 48h.

Matrigel Invasion assay:

This assay was performed using the xCELLigence Real-Time Cell Analysis (RTCA) DP instrument in combination with CIM-Plate 16 (ACEA Biosciences). A layer of 3.3% of growth factor reduced Matrigel (Corning) diluted with EBM basal media was poured on ice in the upper chamber at incubated overnight at 37°C for polymerization. 40 μ L of basal EBM media was added to the upper chamber and the baseline made after equilibration at 37°C. After setting the baseline, 3x10⁴ naïve HUVEC were added to the upper chamber. The conditioned media from siRNA transfected cells were recovered and centrifuged at 12000rpm during 5 min and 160 μ L were added to the lower chamber of the CIM-plate. After one hour of equilibration at 37°C, impedance was measured every 3 minutes during 36 hours.

Chemo-attraction assay:

This assay was performed using the xCELLigence Real-Time Cell Analysis (RTCA) DP instrument in combination with CIM-Plate 16 (ACEA Biosciences). After setting the baseline, 3x10⁴ IMAC were added in 100 μ L of basal EBM in the upper chamber and 48h-conditioned media from siRNA transfected cells added to the lower chamber of the CIM-plate. After 30 min equilibration at 37°C impedance was measured each 3 minutes during 36 hours.

Gelation degradation assay:

Coverslips in 24 well-plates were coated with gelatin-Alexa488 dye as described in (62). Si RNA transfected HUVEC were seeded after the second siRNA transfection at the density of 5x10⁴/wells. HUVEC were incubated in OptiMEM medium overnight in 37°C and CO₂ 5% incubator and fixed with 4% PFA and washed with PBS 3 times. For a quantitative analysis of the degradative skill of siRNA transfected cells, 5 images per condition were randomly acquired with an epifluorescent Axiomager microscope (Zeiss) at 40X magnification and were converted in binary images using a B&W thresholding on image J. The total area of the black zones corresponding to the total area of degradation of the fluorescent gelatin was measured.

3D-PEG invasion assays:

Poly-ethylene glycol (PEG) hydrogels were prepared on ice in EBM complete media by combining an MMP-sensitive peptide modified PEG precursor (8-arm 40kDa,(63)) at 1.5% polymer concentration, 50 μ M Lys-RGD peptide (Pepmic), and 1 μ M Sphingosine-1-Phosphate (S1P, Sigma-Aldrich). The hydrogels were enzymatically crosslinked using a

reconstituted and thrombin-activated Factor XIII (Fibrogammin, CSL Behring, prepared as previously described (64)) at 10% of total hydrogel volume. A 20 μ L volume of the hydrogel suspension was pipetted into a modified imaging chamber (Secure-Seal™ hybridization sealing systems, ThermoFisher Scientific) attached to the bottom of a 24-well plate held vertically (54). The hydrogel was allowed to polymerize for 30 minutes in this orientation at room temperature prior to cell seeding. Depending on the study, a confluent cell monolayer composed of either 5×10^4 siRNA transfected GFP-HUVEC or a 1:1 ratio mixture of siRNA transfected GFP-HUVEC and naïve RFP-HUVEC was let to adhere to PEG meniscus at 37°C, 5% CO₂ for 1 hour and then placed back horizontally with 1mL of EBM complete media. Fixation with 4% PFA in DPBS was performed after 24 hours. Sprouts invading the PEG hydrogel were imaged using a Leica SP8 inverted confocal microscope with an HC PL APO 10x, 0.4 numerical aperture dry objective to obtain image stacks at 1024x1024 pixels with a 50 μ m Z-stack at 1-1.5 μ m Z-spacing. A Z-projection of each image was used to manually quantify invasion distances using the line measurement tool of ImageJ. More than 100 sprouts were analyzed per technical replicate.

Statistical tests:

Results were assessed by either performing the Tukey's or multiple comparison tests post-ANOVA to control or as otherwise annotated; a 0.5 alpha level was used for all comparisons. Prism software was used to conduct the statistical analysis of all data. $P < 0.05$ was considered to be significant. * $P < 0.05$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.005$. n represents biological replicates.

Figure legends:

Figure 1: A transcriptomic program of senescence associated with secretory phenotype is turned on by the silencing of CCM2 in HUVEC

(A) Gene Ontology enrichment analysis of cellular components in downregulated and upregulated genes in siCCM2 HUVEC compared to siNT HUVEC, bar graphs represent the fold enrichment. (B) Gene Ontology enrichment analysis of biological functions in downregulated and upregulated genes in siCCM2 HUVEC compared to siNT HUVEC, bar graphs represent the fold enrichment. (C) Schematic representation of the Reactome analysis of enriched pathways in siCCM2 HUVEC. (D) GSEA profiles showing a significant normalized enrichment score (NES) of gene sets associated with replicative senescence(35) and SASP(36) in siCCM2 HUVEC transcriptome.

Figure 2: ROCK-dependent cell contractility controls the SASP transcriptional program in siCCM2 HUVEC

(A) Venn diagrams showing overlap of DEGs in siCCM2 HUVEC (yellow) with DEG rescued in siCCM2+siROCK1(Blue) siCCM2+siROCK2(Green). (B) Comparison of the rescuing efficacy of ROCK1 and ROCK2 on up- and down-regulated genes. (C) Heatmap of upregulated (left) and downregulated (right) genes in siCCM2 HUVEC over the 6 siRNA conditions, 3 replicates per condition. (D) Clustered heatmap of GO enriched in up- (left) and down- (right) regulated genes in siCCM2 HUVEC. (E) GSEA profiles showing GSEA enrichment plot showing the loss of significant enrichment in replicative senescence signature in siCCM2+ROCK2 but not siCCM2+ROCK1 HUVEC transcriptome.

Figure 3: ROCK-dependent cell contractility induces premature cellular senescence in siCCM2 HUVEC

(A) Representative images of SA- β galactosidase staining of siRNA-transfected HUVEC or treated with blebbistatin or Y27632 at 10 μ M. (B) Quantification of the % of positive cells for SA- β -galactosidase. Error bars are means \pm SEM from 3 independent experiments. (C) Representative merged images of p14/ARF and DAPI stainings of siRNA-transfected HUVEC (D) Quantification of the percentage of positive cells for p14ARF staining. Error bars are means \pm SEM from 4 (drug treatments) or 5 (additional silencing of ROCKs) independent experiments. (E) Representative BrdU incorporation and DNA content in siNT and siCCM2 HUVEC. (F) Quantification of the percentage of cells in each phases for siRNA-transfected HUVEC or treated with blebbistatin or Y27632 at 10 μ M. Error bars are means \pm SEM from 4 independent experiments. (G) Representative images of the proliferative marker Ki-67 staining (green) merged with DAPI staining of siRNA-transfected HUVEC or treated with blebbistatin or Y27632 at 10 μ M. (H) Quantification of the percentage of cells positive for Ki-67 staining. Error bars are means \pm SEM from 4 independent experiments. (I) Representative images of DAPI staining of siNT and siCCM2 HUVEC. (J) Quantification of the percentage of positive cells for SAHF foci Error bars are means \pm SEM from 8 (additional ROCKs silencing) or 3 (drug treatments) independent experiments. (*) P -value<0.05; (**) P -value<0.005; (***) P -value<0.0005; (****) P -value<0.00005. Scale bars are equal to 10 μ m.

Figure 4: ROCK2-dependent secretory phenotype gives paracrine chemo-attractive skills to siCCM2 HUVEC.

(A) Heatmap of expression of SASP factors over the 4 siRNA conditions, 3 replicates per condition. (B) Quantification of the rate of transmigration of IMAC macrophages measured in a modified Boyden chamber in real time using the xCELLigence system upon chemo-attraction by conditioned media of siRNA-transfected cells. Error bars are means \pm SEM from 2 independent experiments (4 technical replicates per condition). (C) Quantification of the rate of invasion of naïve HUVEC measured in a modified Boyden chamber in real time using the xCELLigence system upon chemo-attraction by conditioned media of siRNA-transfected cells. Error bars are means \pm SEM from 3 independent experiments (2-4 technical replicates per condition). (*) P -value <0.05 ; (**) P -value <0.005 ; (***) P -value <0.0005 ; (****) P -value <0.00005 .

Figure 5: ROCK1-dependent cell contractility gives ECM degradative and invasive skills to siCCM2 HUVEC promoting a juxtacrine effect on WT HUVEC

(A) Heatmap of expression of ECM remodelling mediators over the 4 siRNA conditions, 3 replicates per condition. (B) Representative images of degradation of the fluorescent gelatin by siRNA transfected HUVEC or treated with GM6001, blebbistatin or Y27632 (10 μ M). Scale bars, 10 μ m. (C) Quantification of the degradation area by siRNA transfected or drugs treated HUVEC. Error bars are means \pm SEM from 3 (drug treatments) or 6 (additional silencing of ROCKs) independent experiments. (D) Representative images of siRNA transfected GFP-HUVEC after invasion of 3D-PEG gels. Scale bar, 50 μ m. (E) Quantification of the maximum invasion distance of siRNA transfected HUVEC or treated with blebbistatin. Error bars are means \pm SEM from 3 independent experiments (3 technical replicates per condition) for siRNA transfected HUVEC and 2 for blebbistatin treated HUVEC. (F) Representative images of siRNA transfected GFP-HUVEC and RFP naïve-HUVEC after invasion of 3D-PEG gels. Scale bar, 50 μ m. (G) Quantification of the maximum invasion distance of RFP naïve-HUVEC. Error bars are means \pm SEM from 2 independent experiments (3 technical replicates per condition). (*) P -value <0.05 ; (**) P -value <0.005 ; (***) P -value <0.0005 ; (****) P -value <0.00005 .

Figure 6: A mechano-dependent premature senescence as a proposed mechanism for CCM2 lesion formation. Complementary roles of ROCK1 and ROCK2. (A) (i) In low shear stress capillaries, the mechanical defects due to the loss of CCM2 protein induce a premature senescence of the mutant endothelial cell associated with a secretory phenotype (SASP). (ii) This senescent cell acquires invasive and chemo-attractive skills by secreting metalloproteases and chemokines (iii) that are used to recruit wild-type endothelial cells and promote inflammation at the site of the CCM lesion thereby favouring its expansion. (B) Dysregulated ROCKs have complementary key roles in this SASP. Whereas, they both control the expression of genes involved in the SASP, ROCK2 is specifically required for the paracrine chemo-attraction of WT ECs and immune cells and ROCK1-dependent cell contractility is specifically required for ECM invasion by mutant EC and in a juxtacrine manner by WT ECs.

FigS1: Boxplots of the expression of CCM2, ROCK1, ROCK2 and cell cycle regulators in the 6 siRNA conditions as measured by RNA seq.

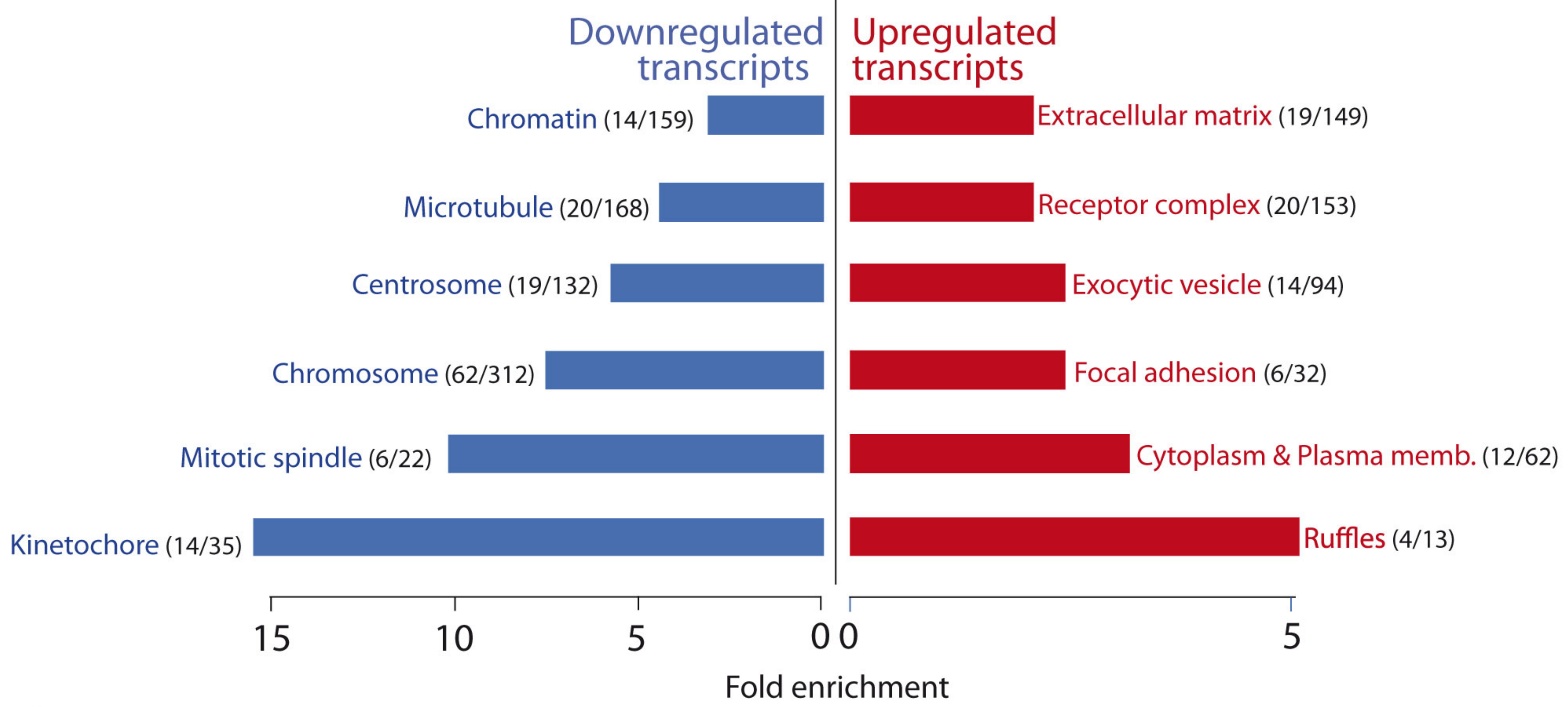
Fig S2: GSEA analyses using different gene sets of senescence. Comparison of the enrichment in siCCM2, siCCM2+ROCK1 and siCCM2+ROCK2

Fig S3: Effect of siRNA silencing on HUVEC morphology and proliferation. (A) Representative phase contrast image at low magnification of siRNA transfected HUVEC or HUVEC treated with drugs. (B) Proliferation rate of siRNA transfected HUVEC measured by impedance using XCELLigence. (C) Histogram of the distribution of the HUVEC population in function of the size of the nucleus. (D) Morphology of cell-cell junctions stained with β catenin and of F-actin cytoskeleton upon treatment with blebbistatin or Y27632. Scale bar, 10 μ m.

Fig S4: β 1 integrin staining of siRNA transfected or drug treated HUVEC spread on gelatin.

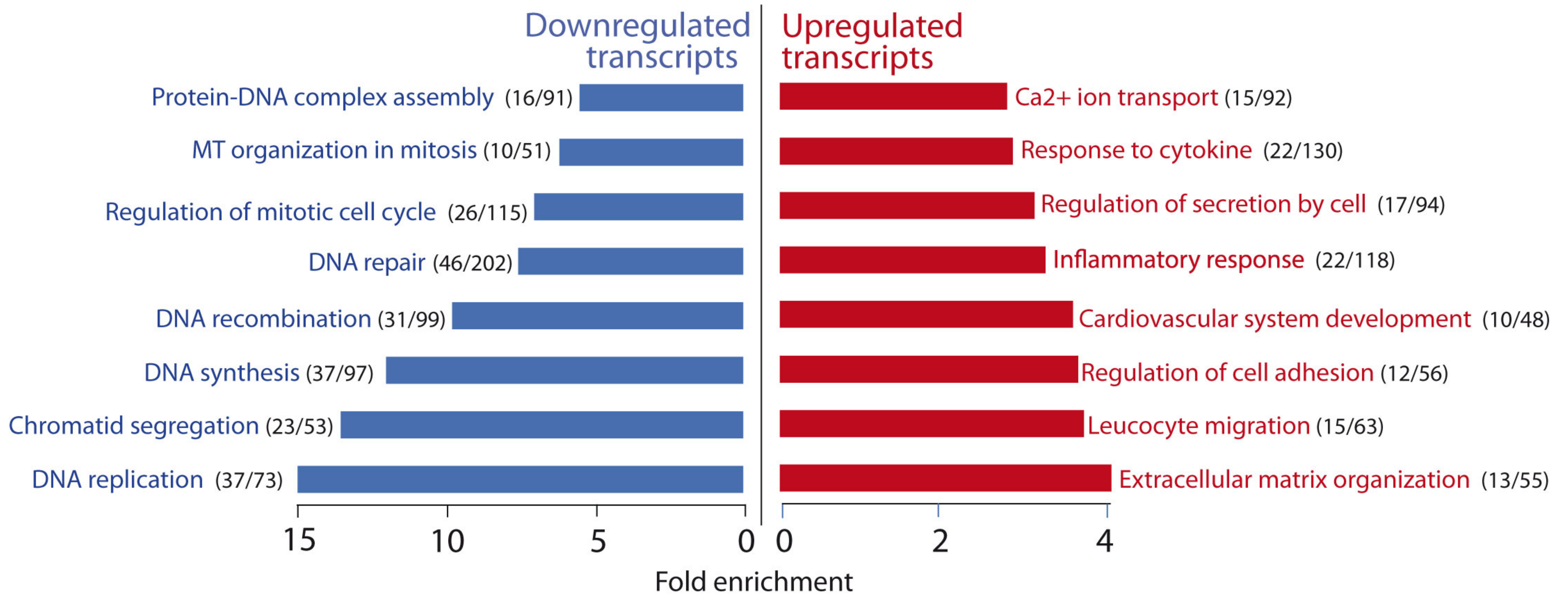
A

G.O. Cellular component



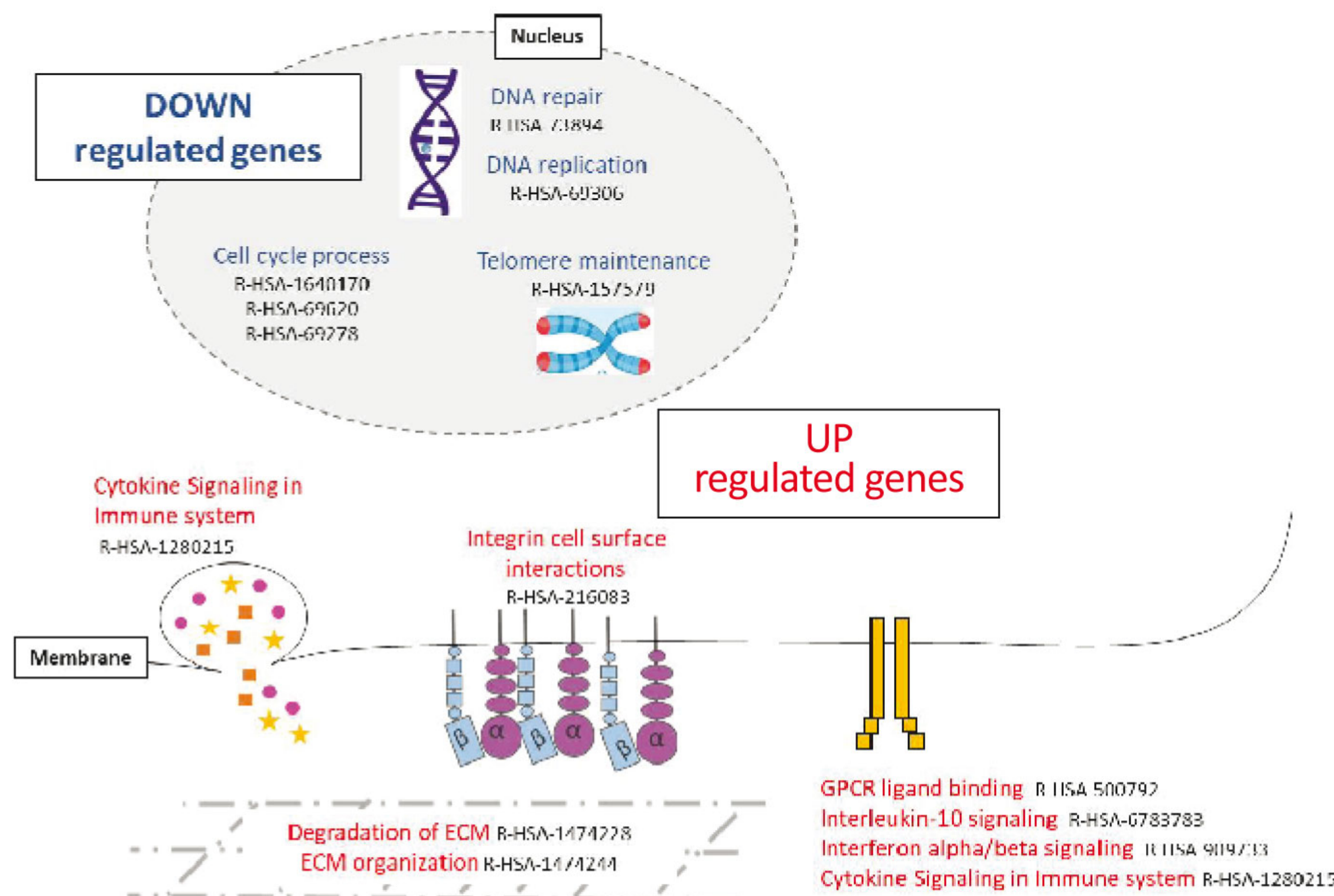
B

G.O. Biological process



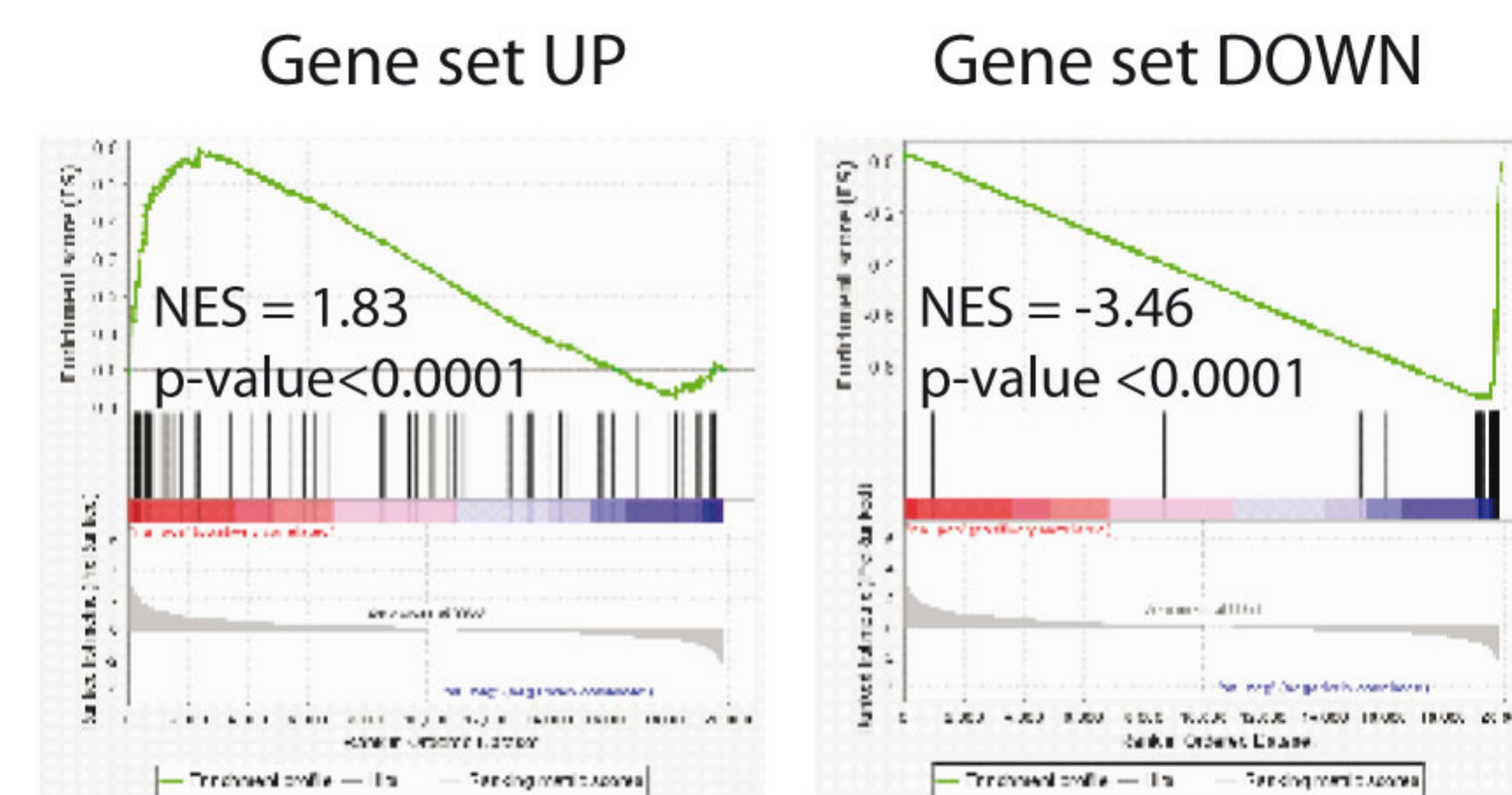
C

SENESCENCE ASSOCIATED WITH A SECRETORY PHENOTYPE (SASP)



D

REPLICATIVE SENESCENCE
siCCM2 vs. siNT



SASP
siCCM2 vs. siNT

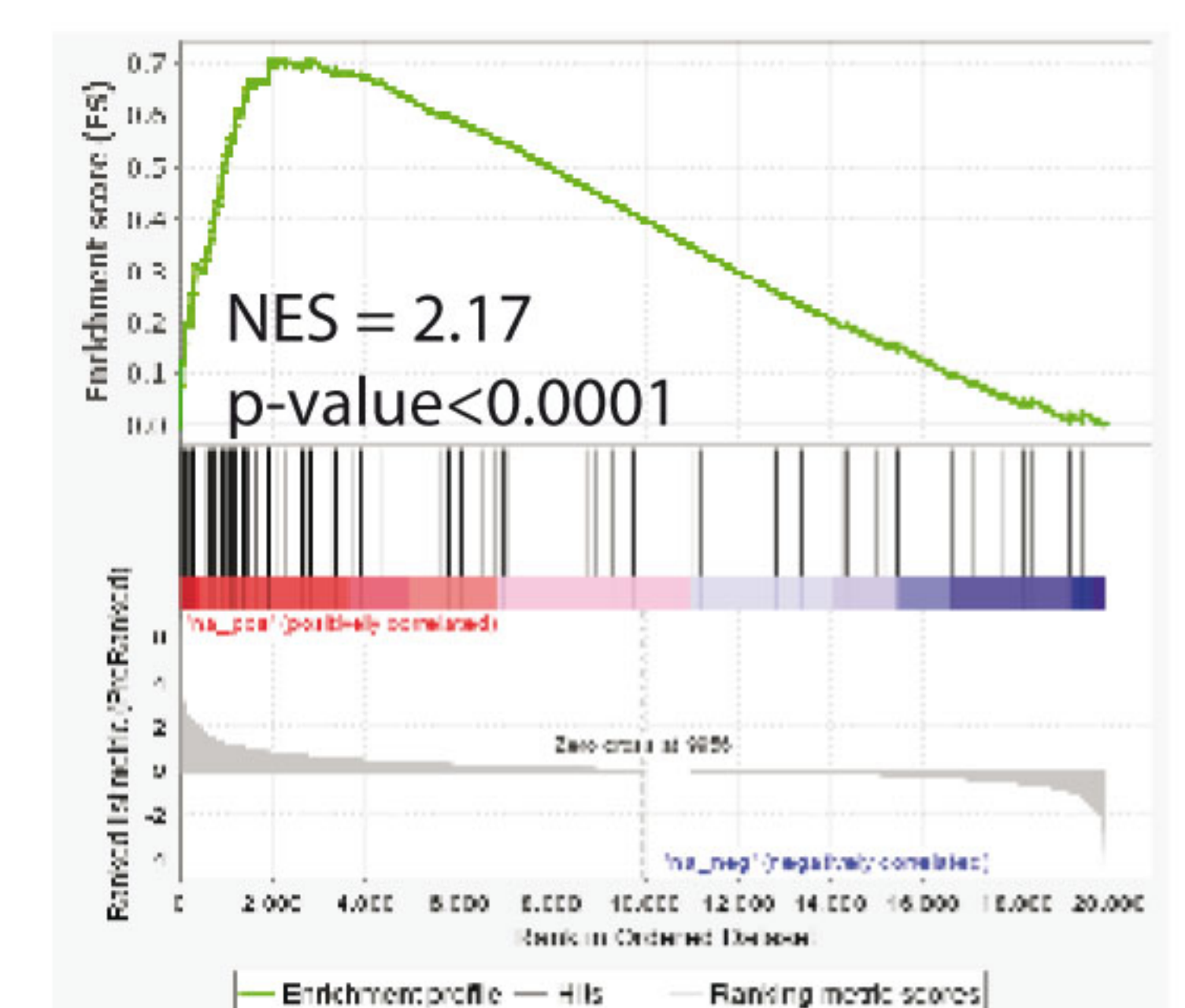


Figure 1

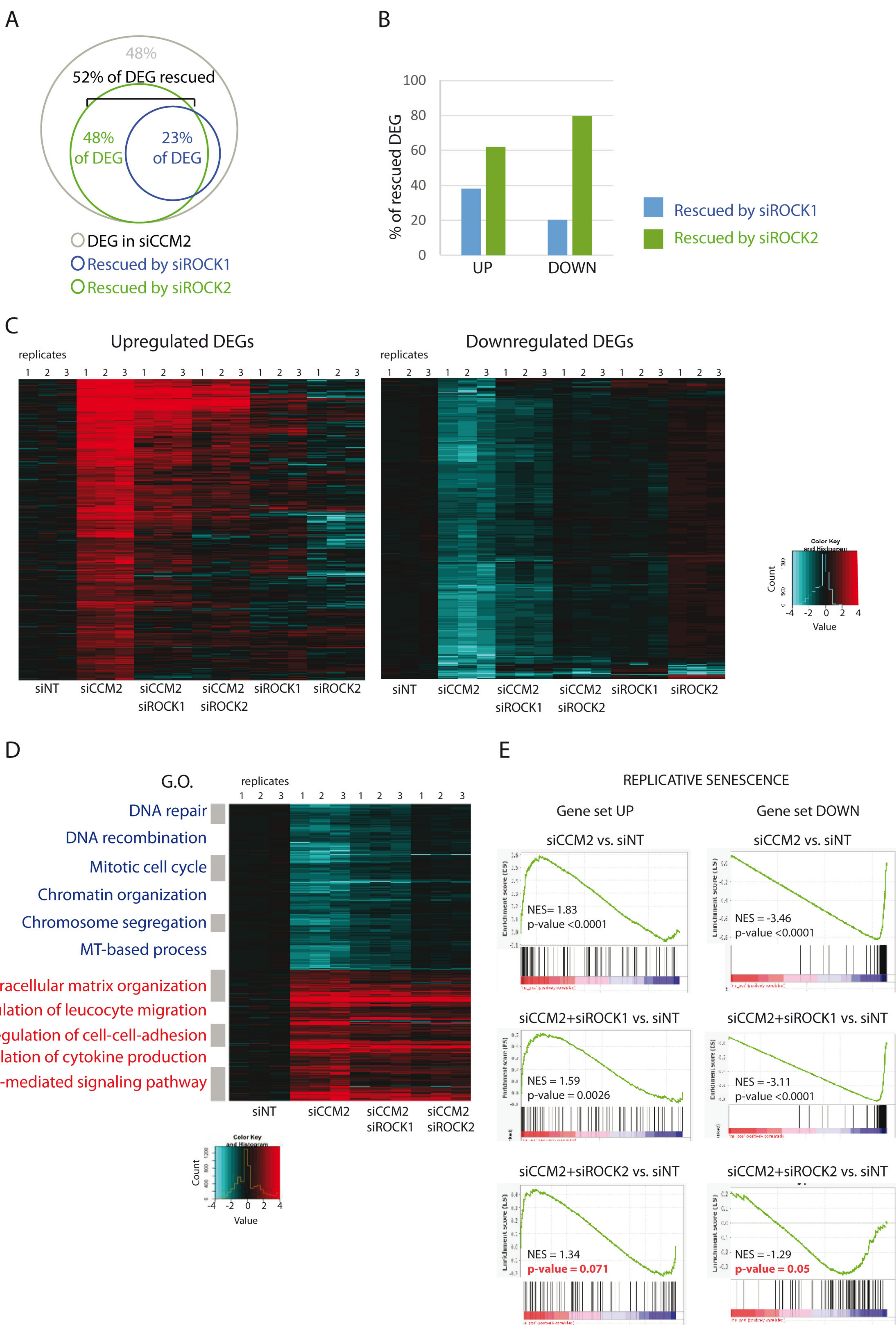


Figure 2

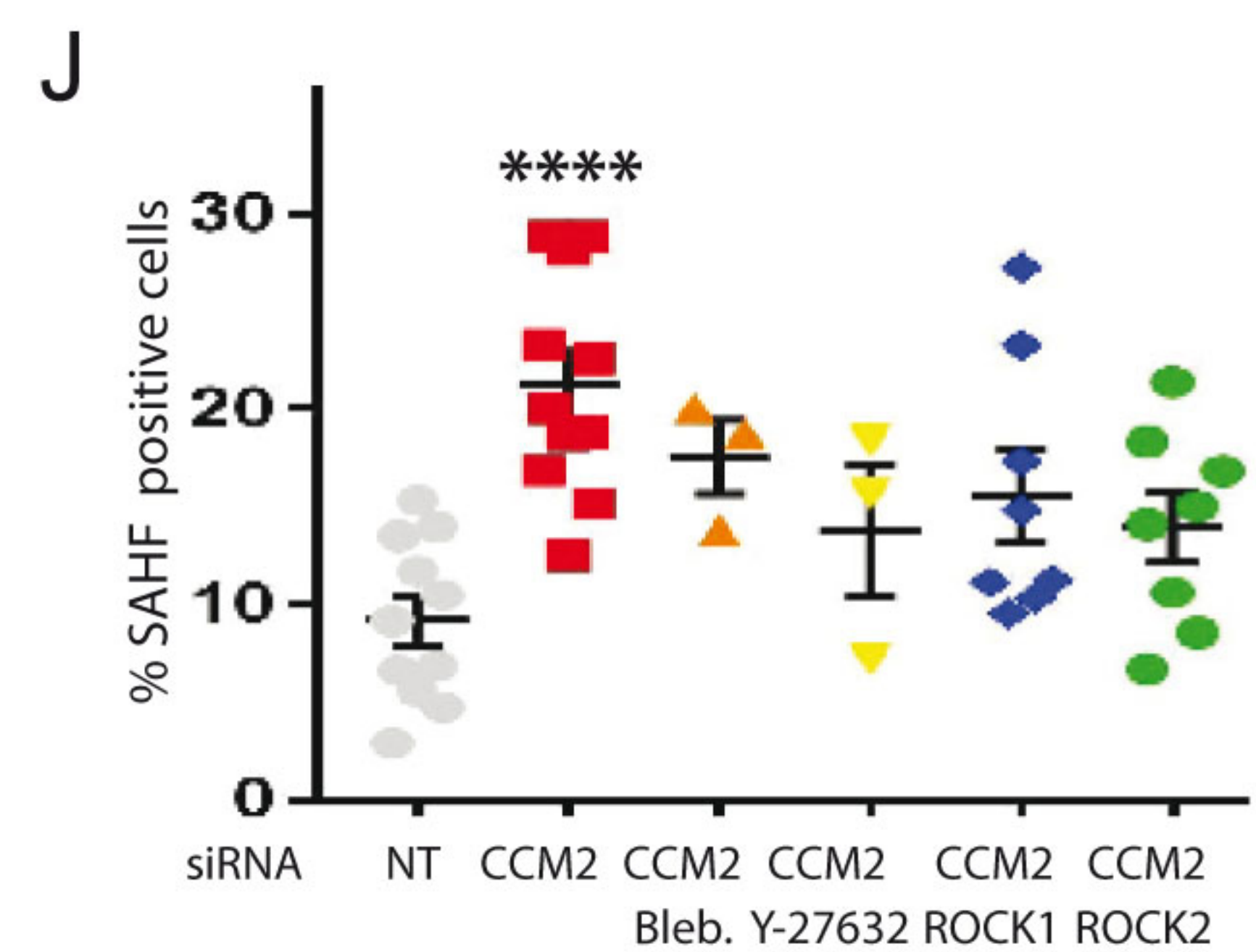
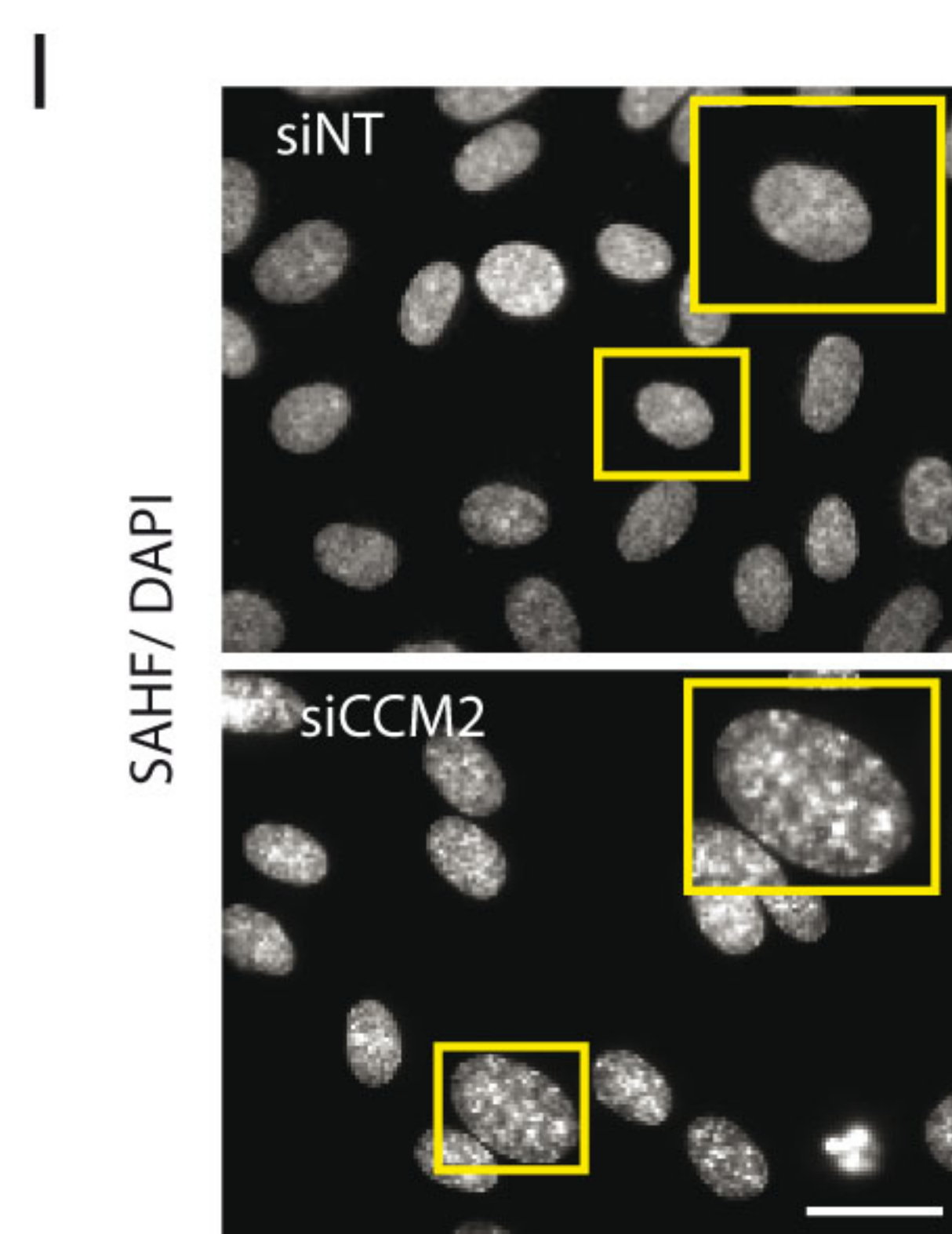
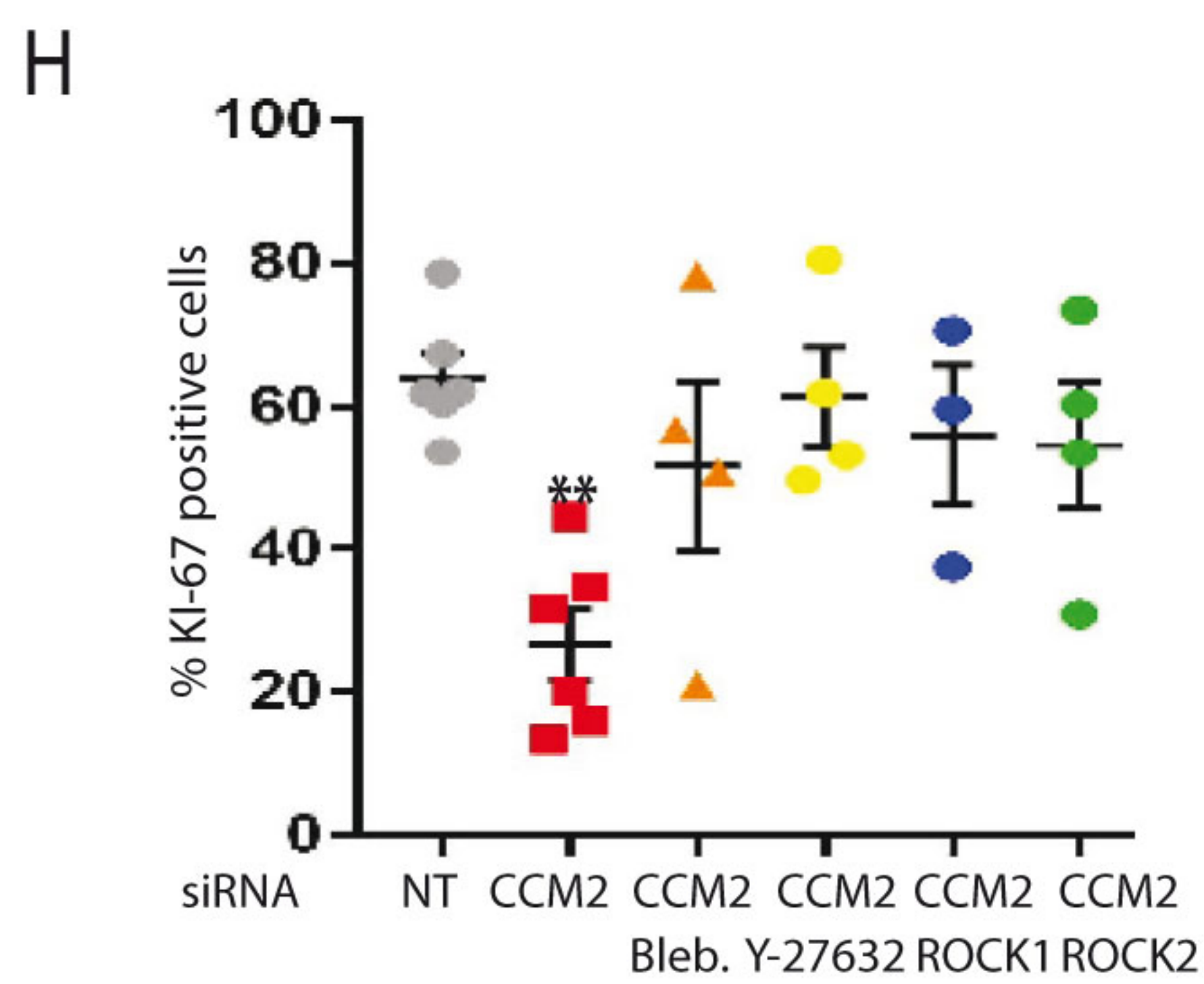
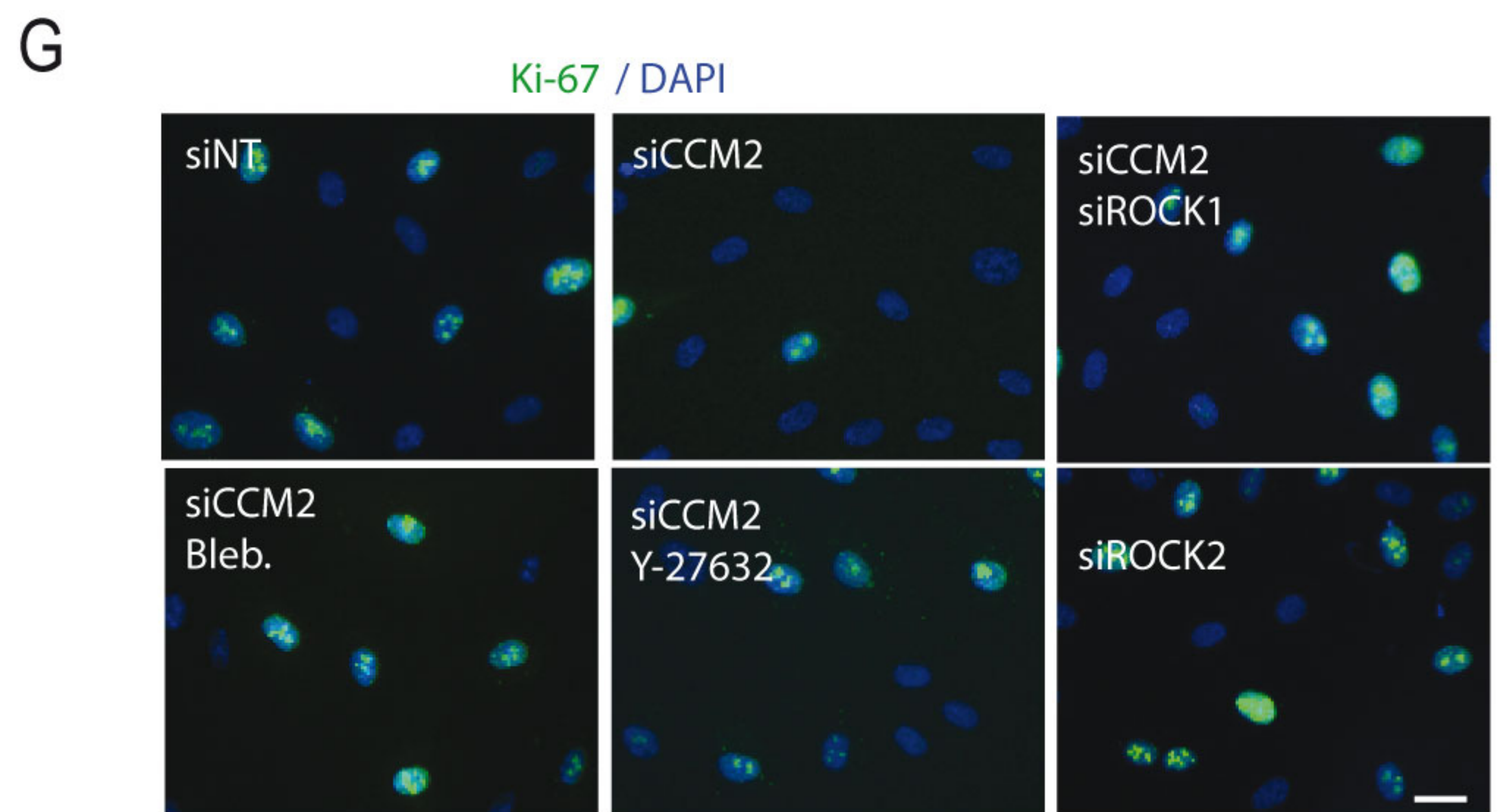
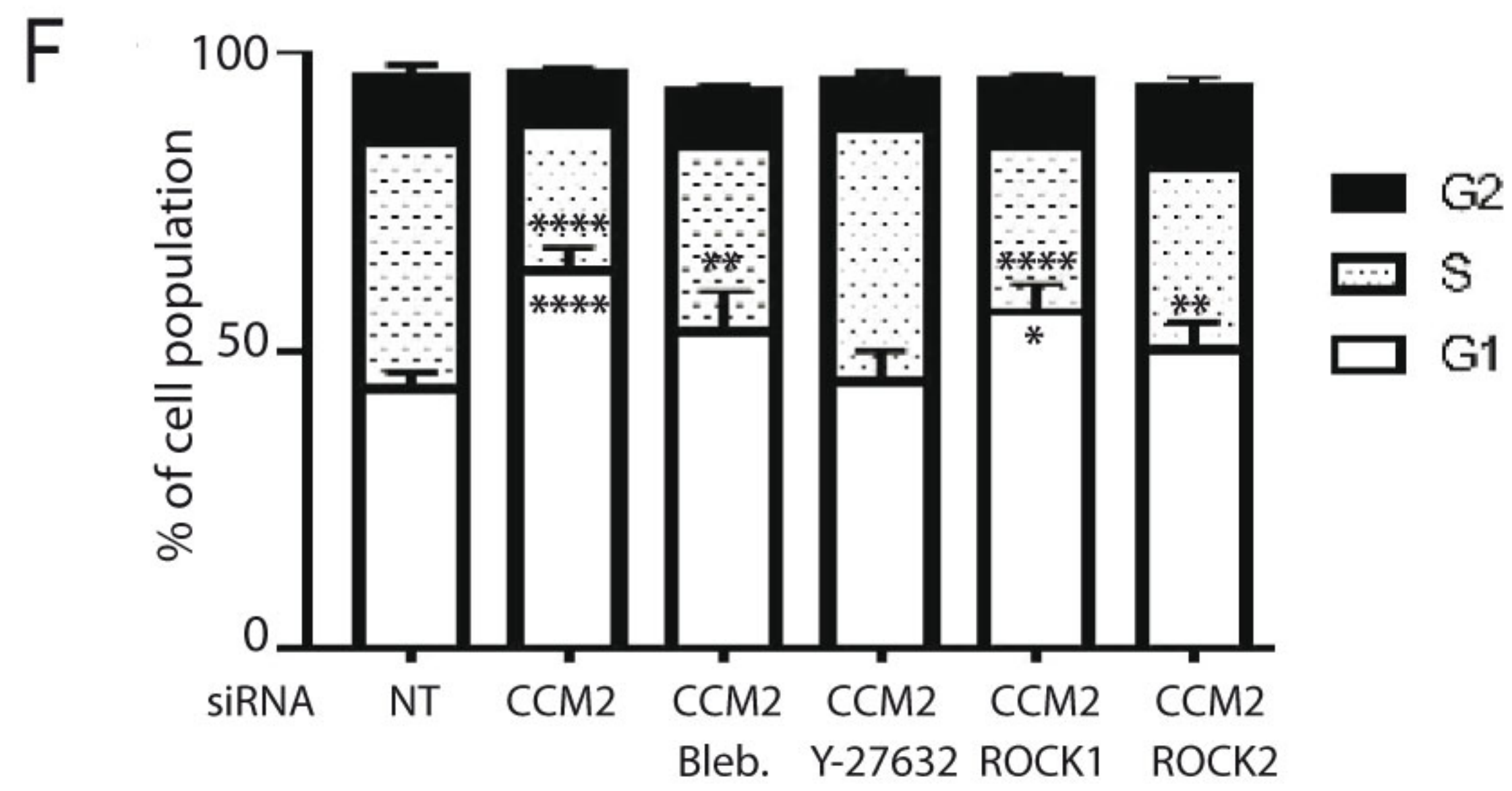
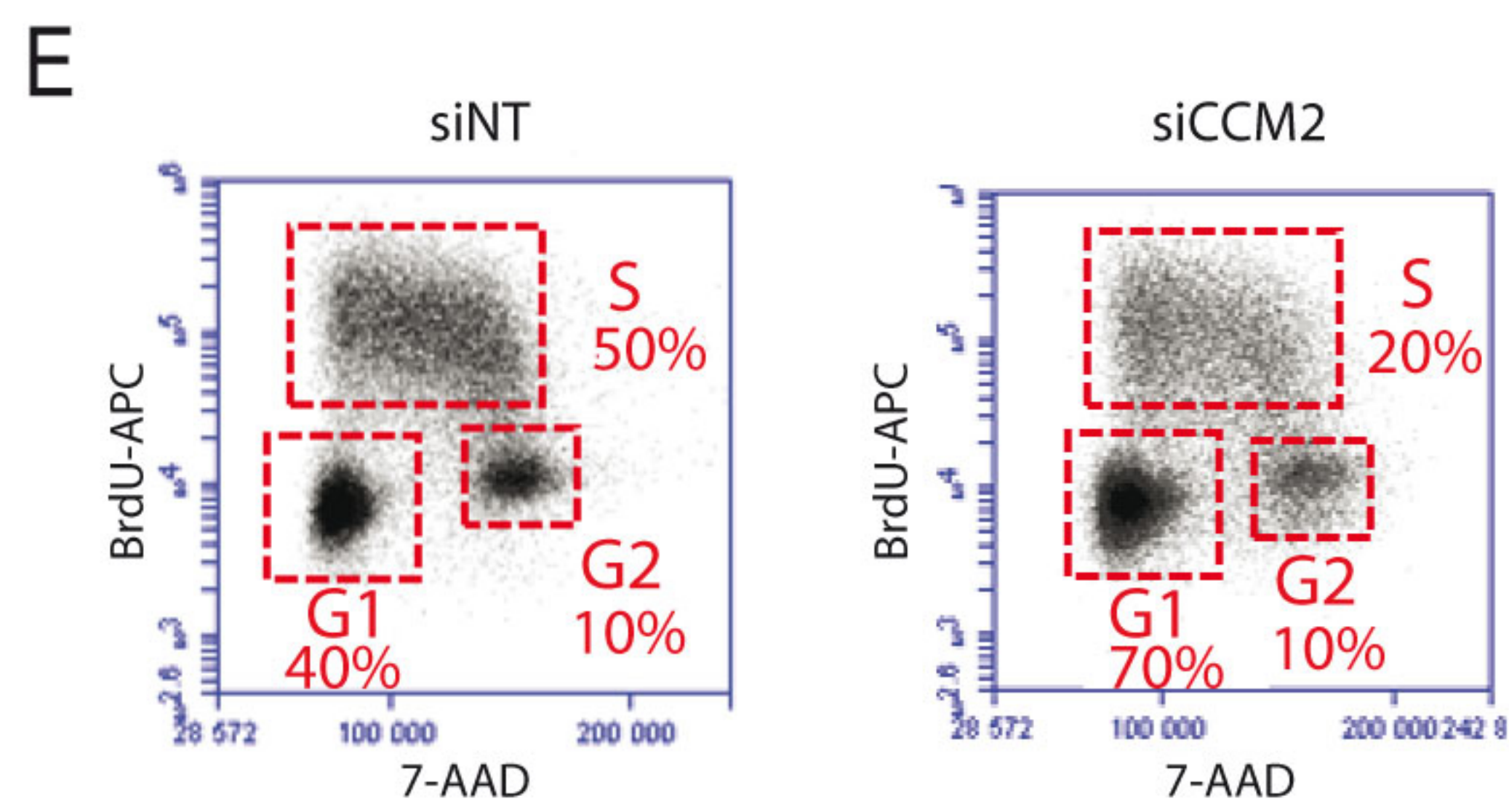
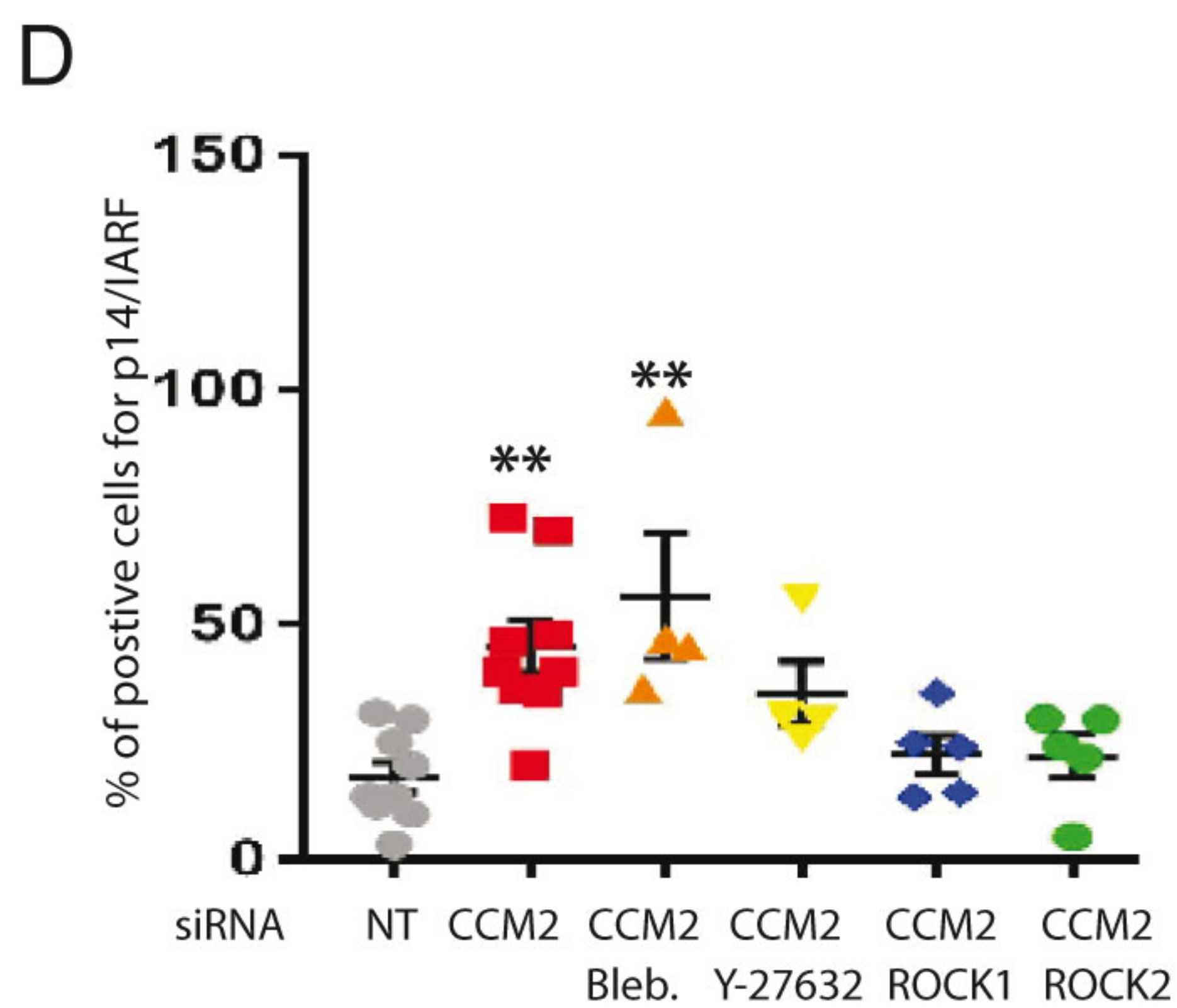
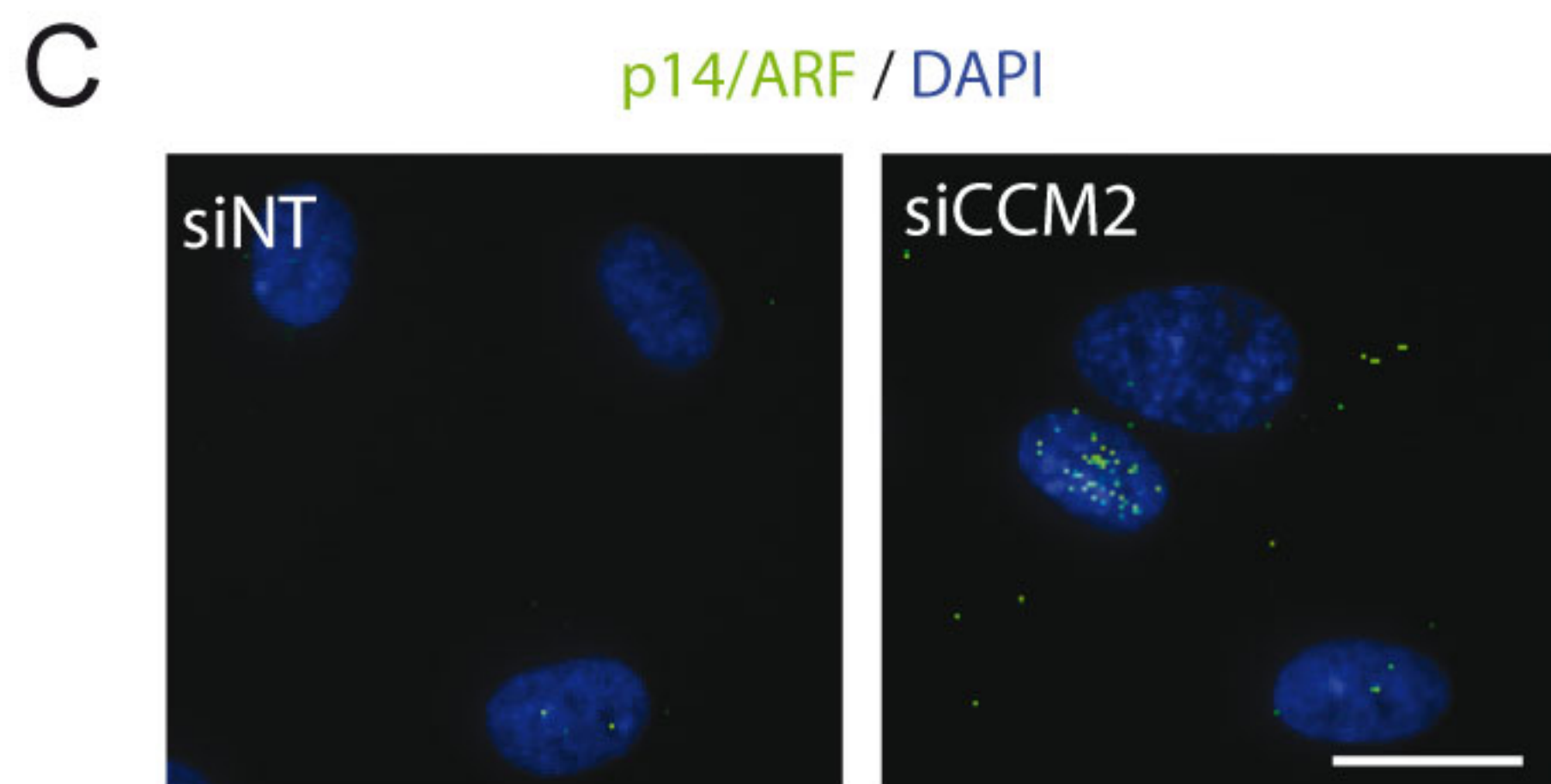
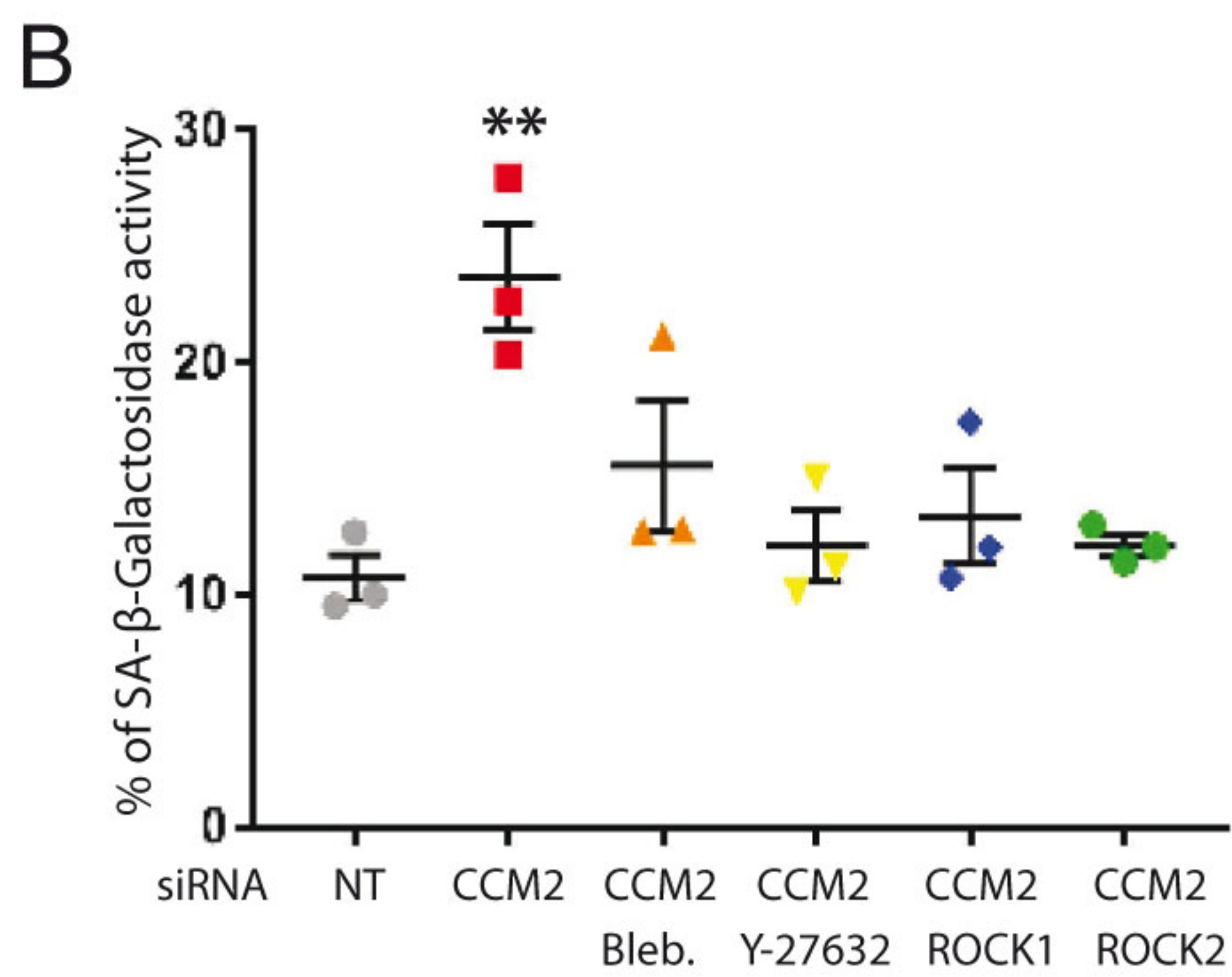
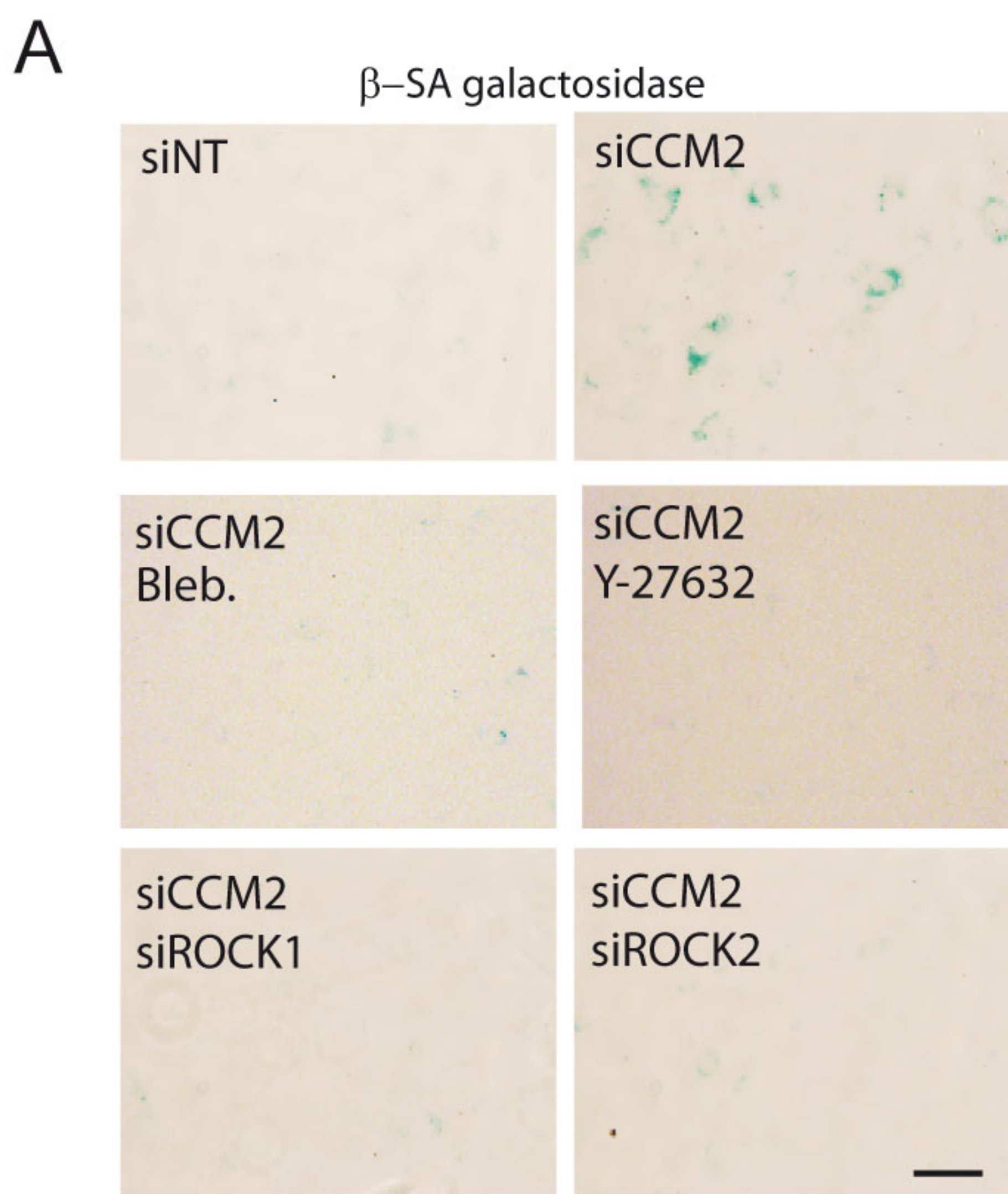
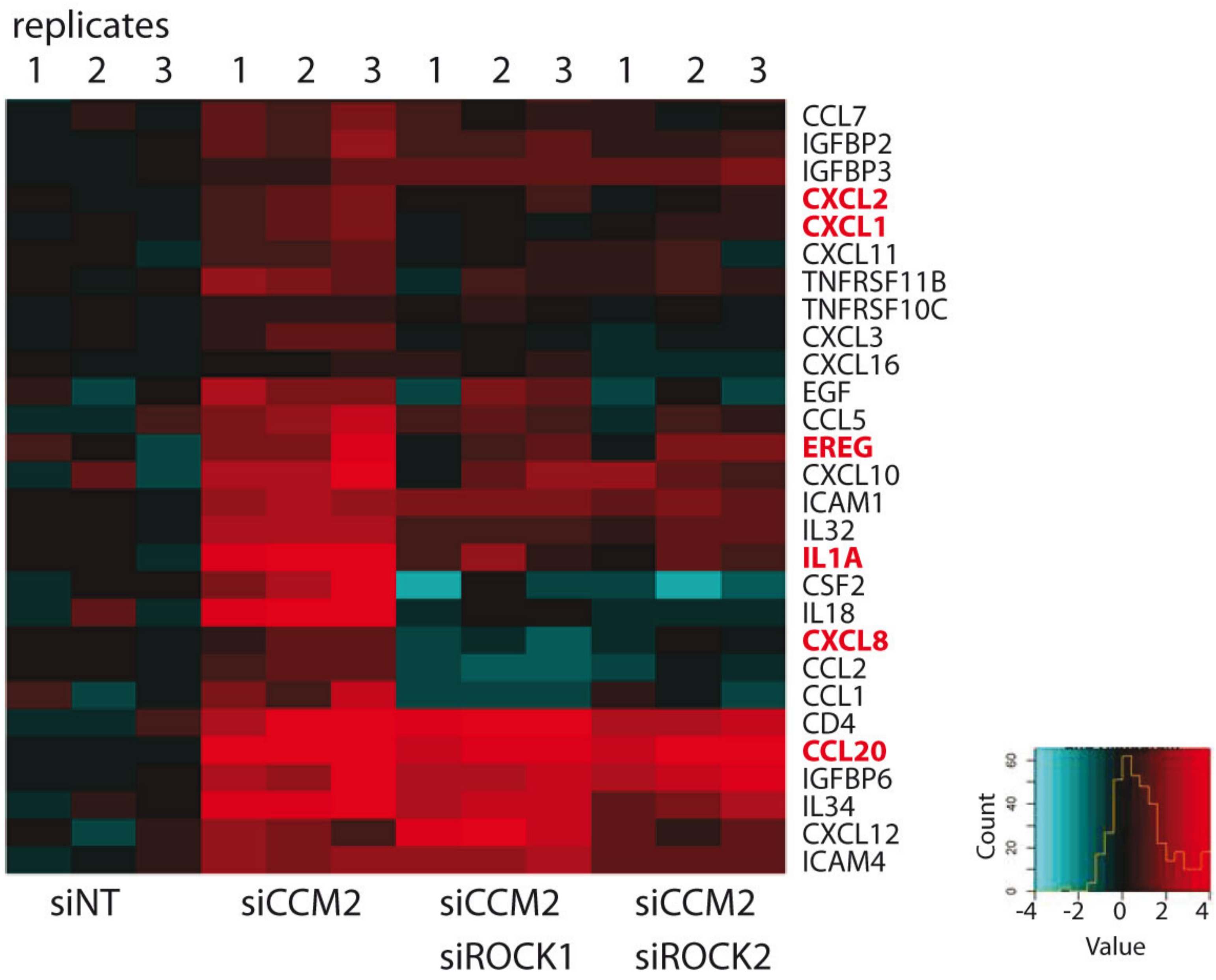


Figure 3

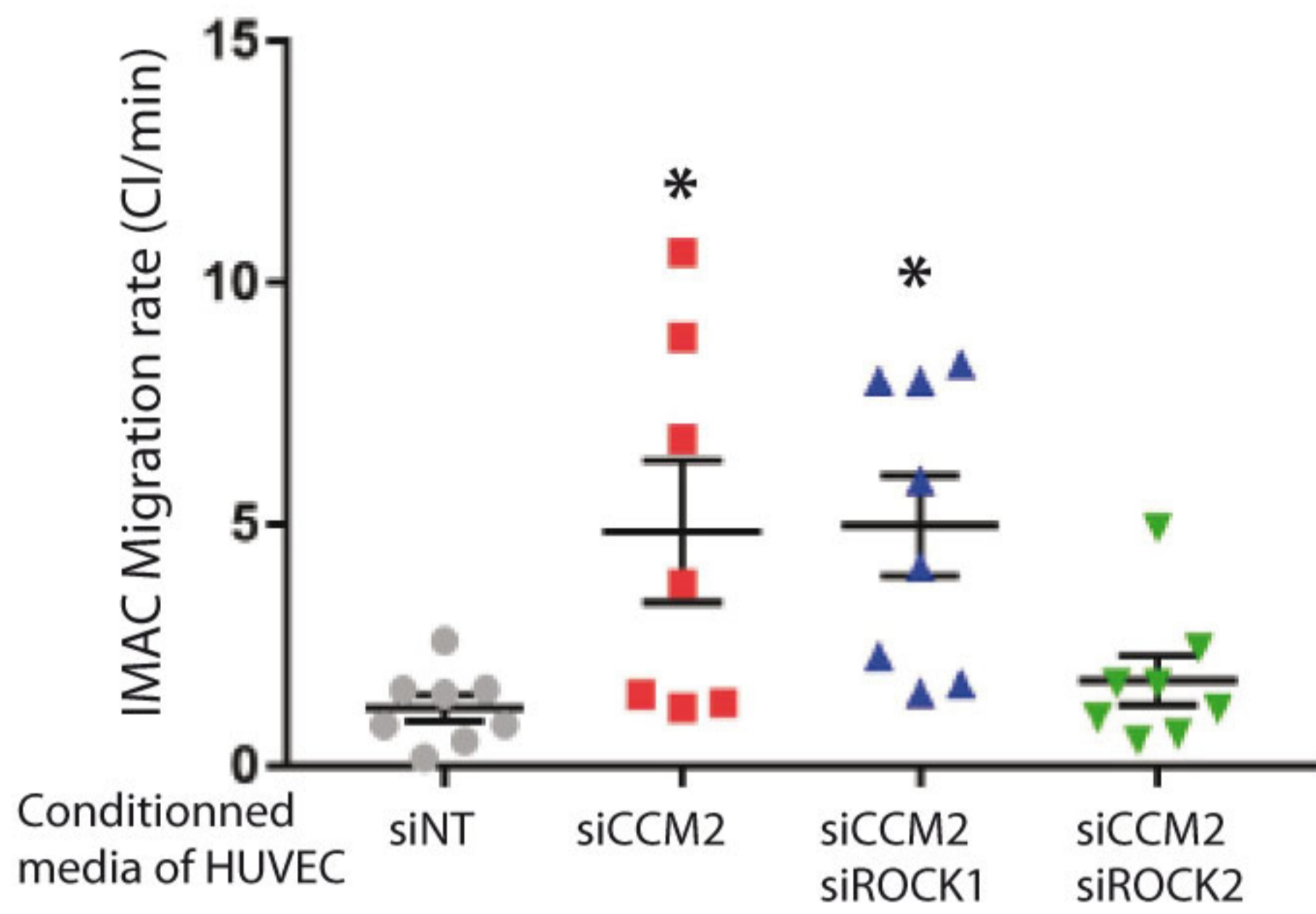
A

Inflammatory chemokines
SASP hallmarks (Coppé et al., 2010)



B

Chemoattraction of macrophages



C

Chemoattraction of HUVEC

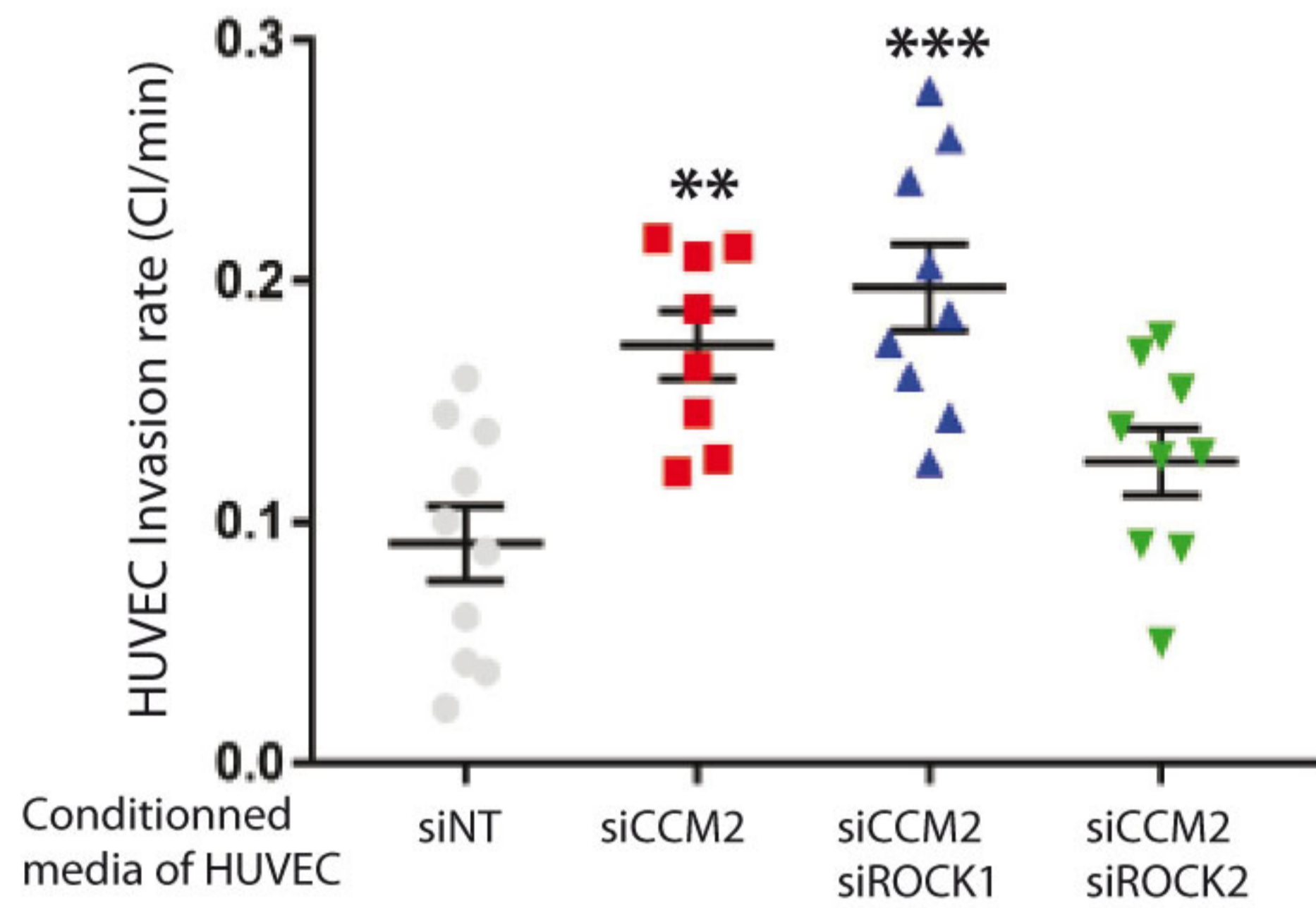


Figure 4

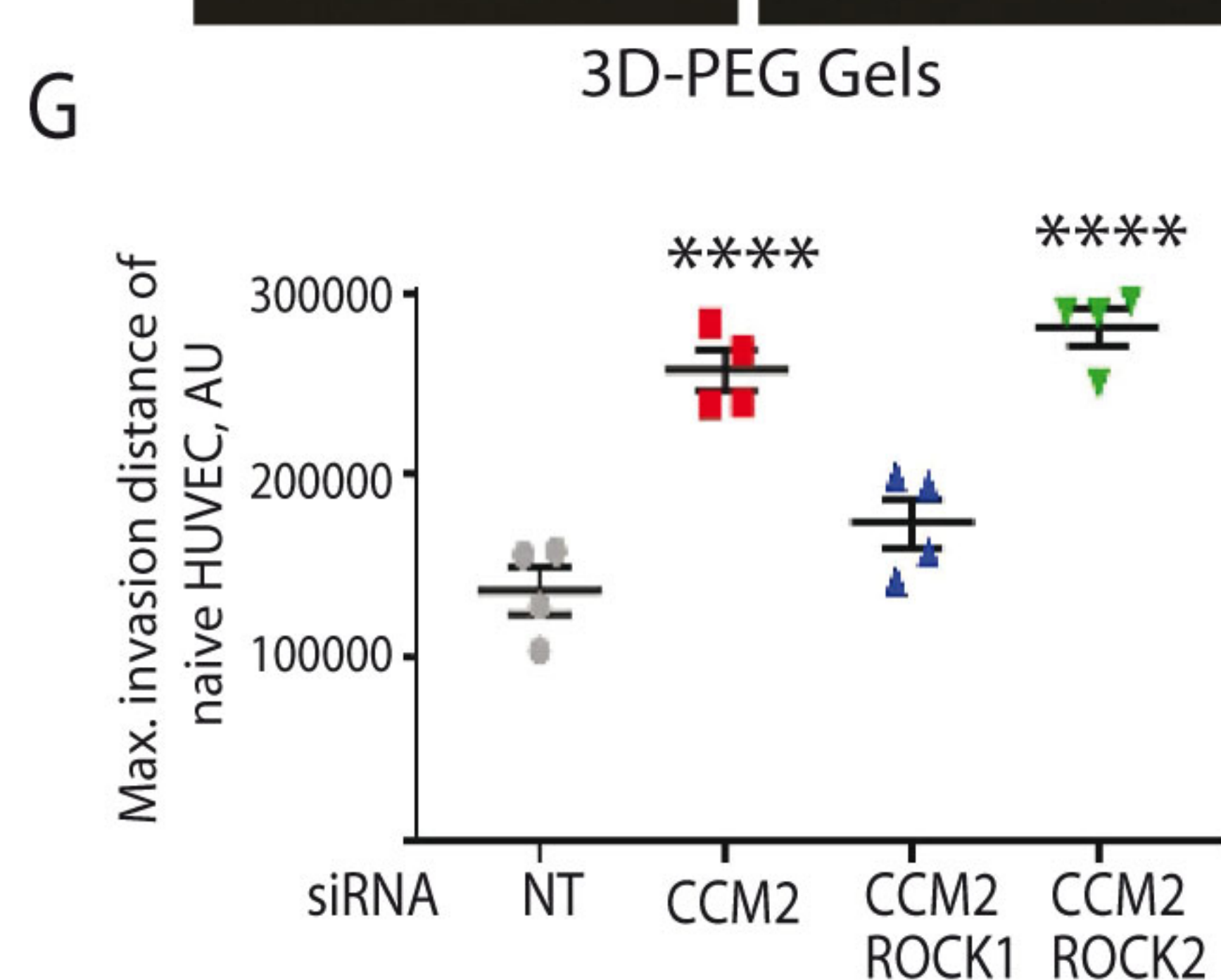
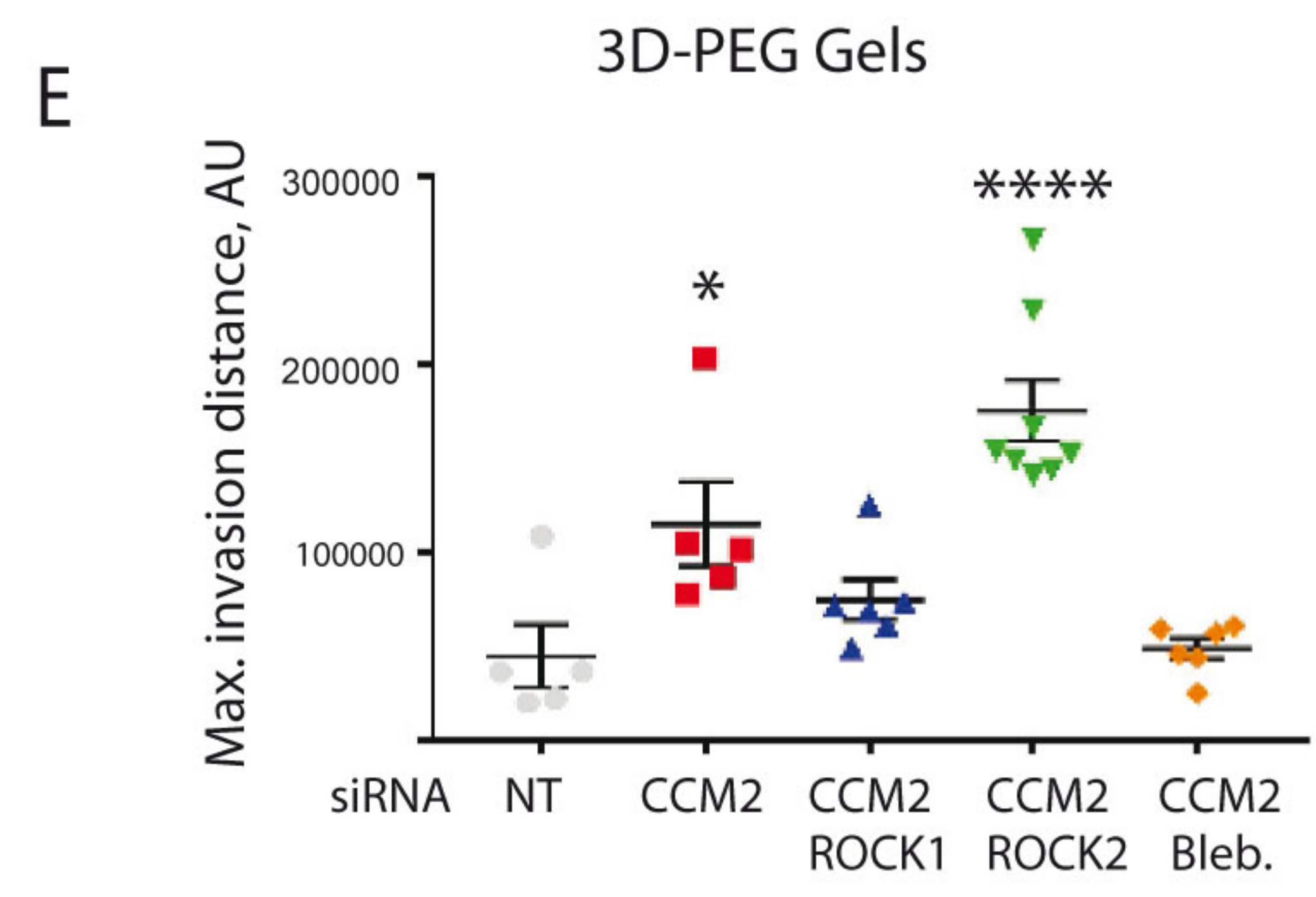
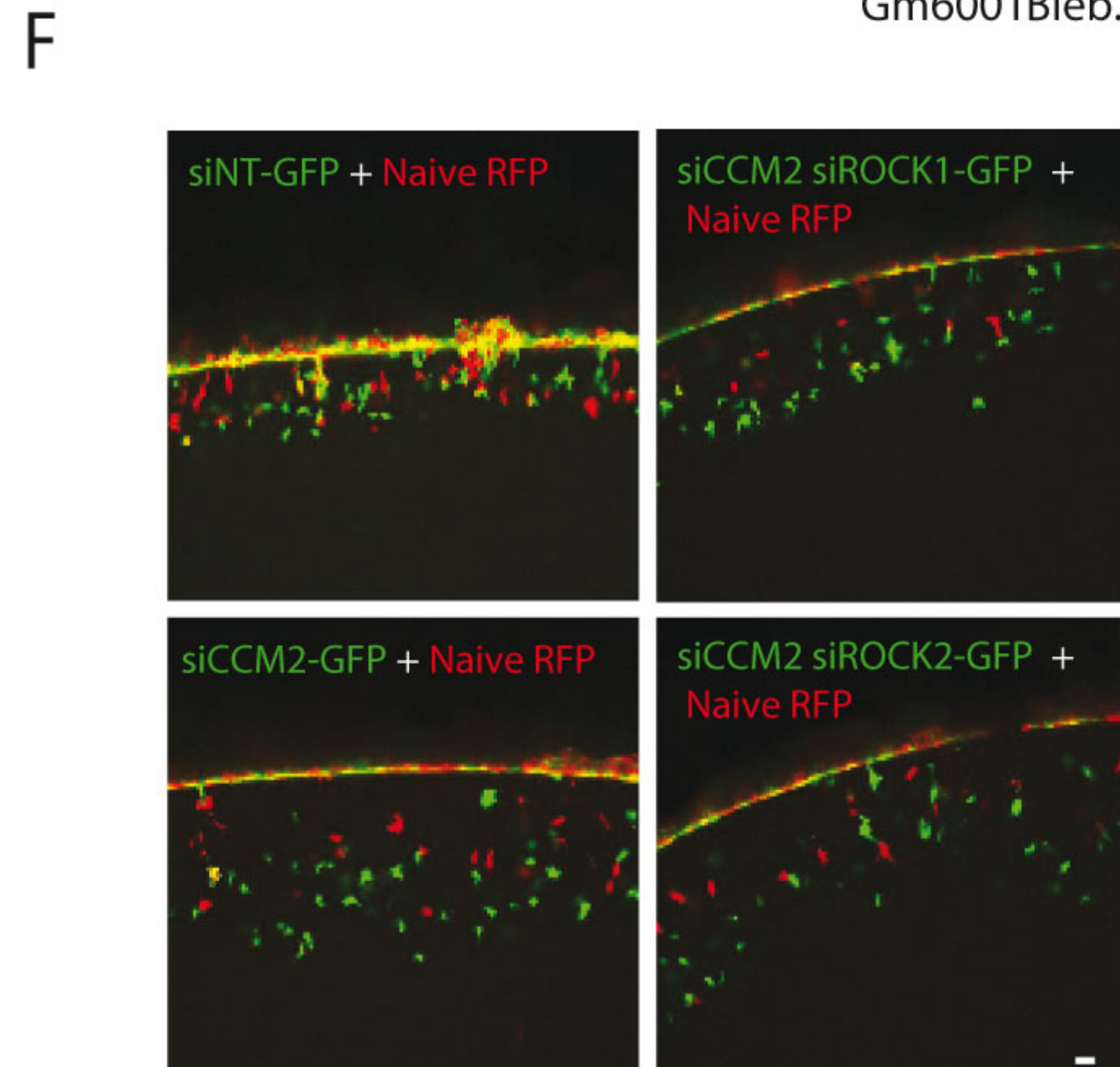
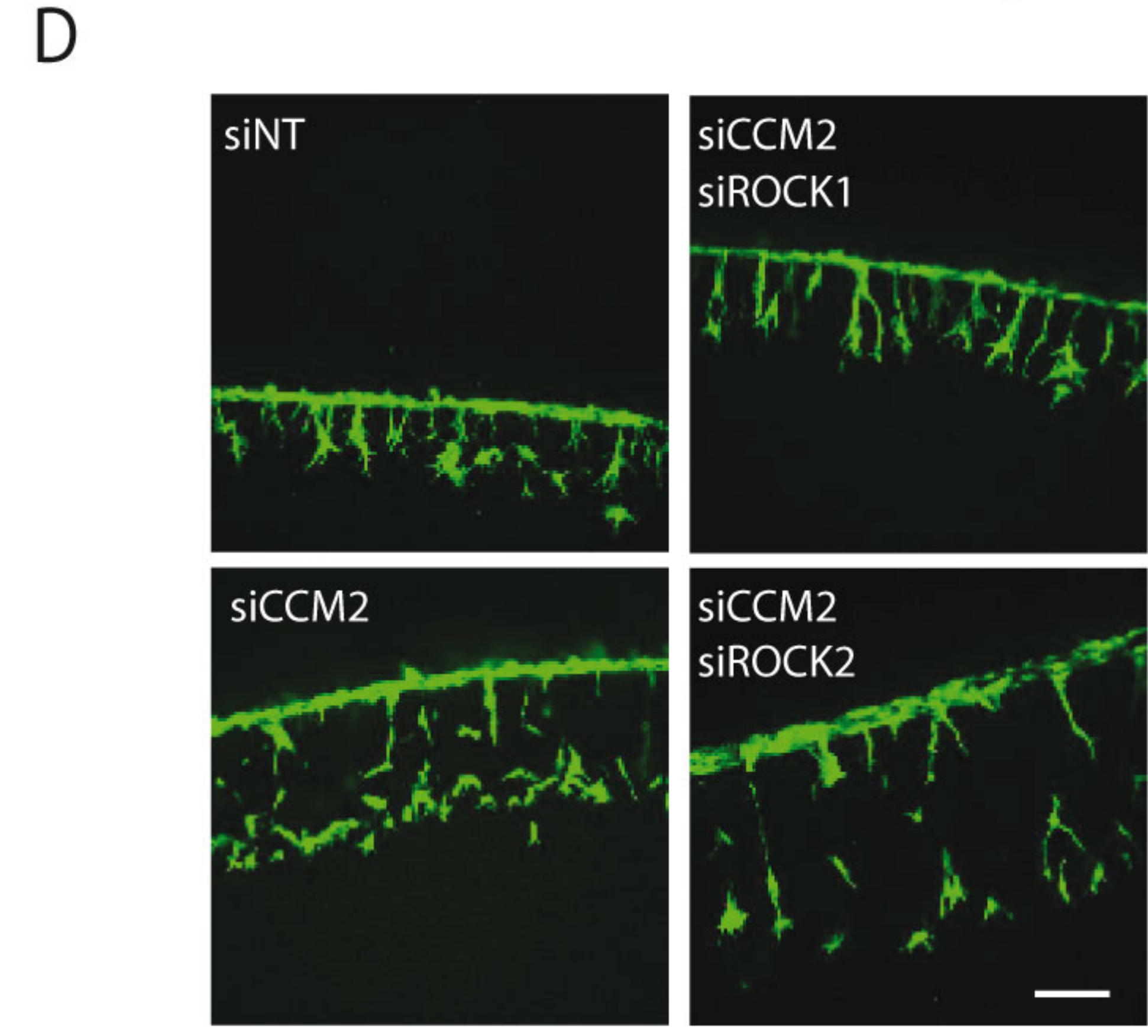
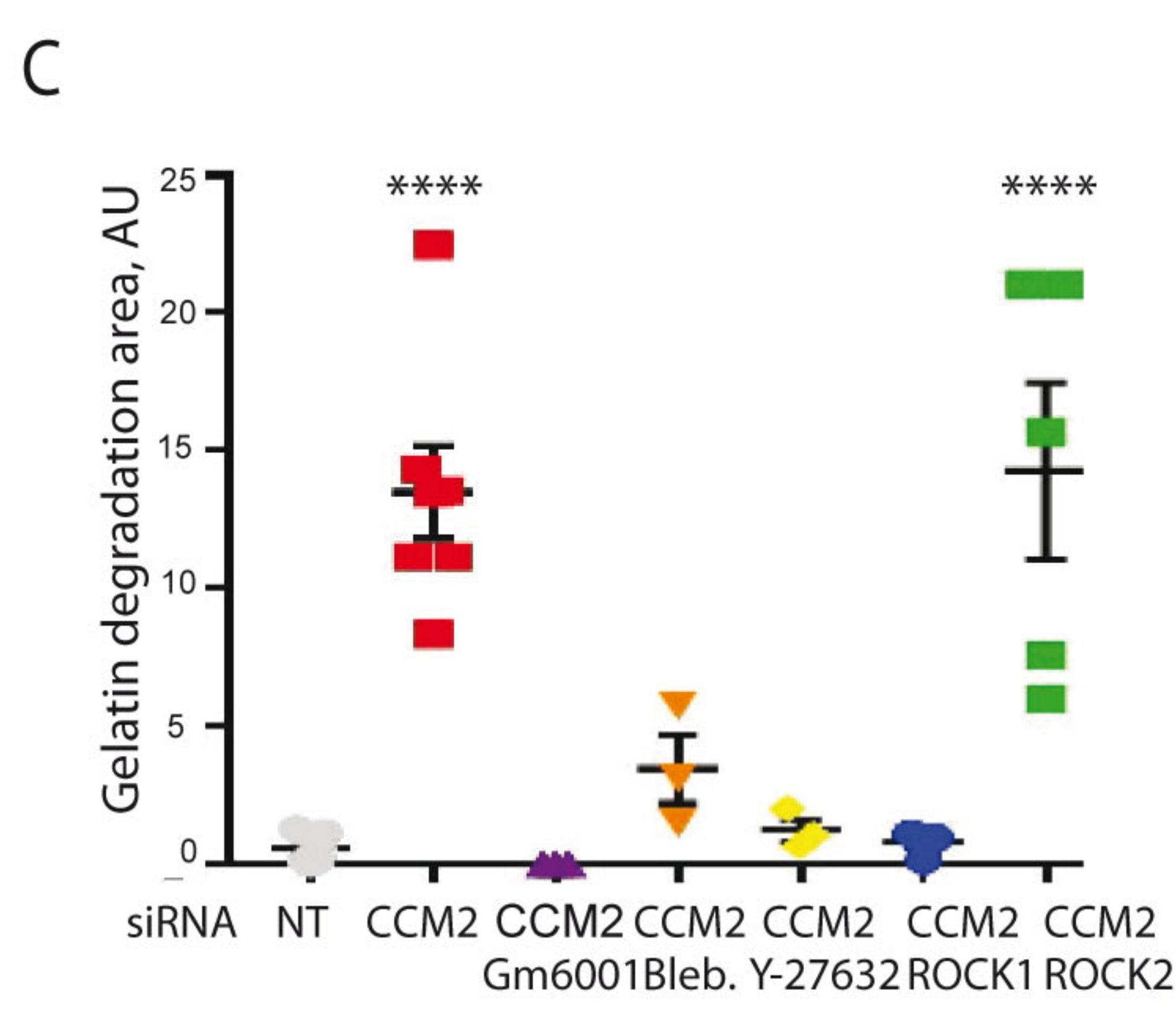
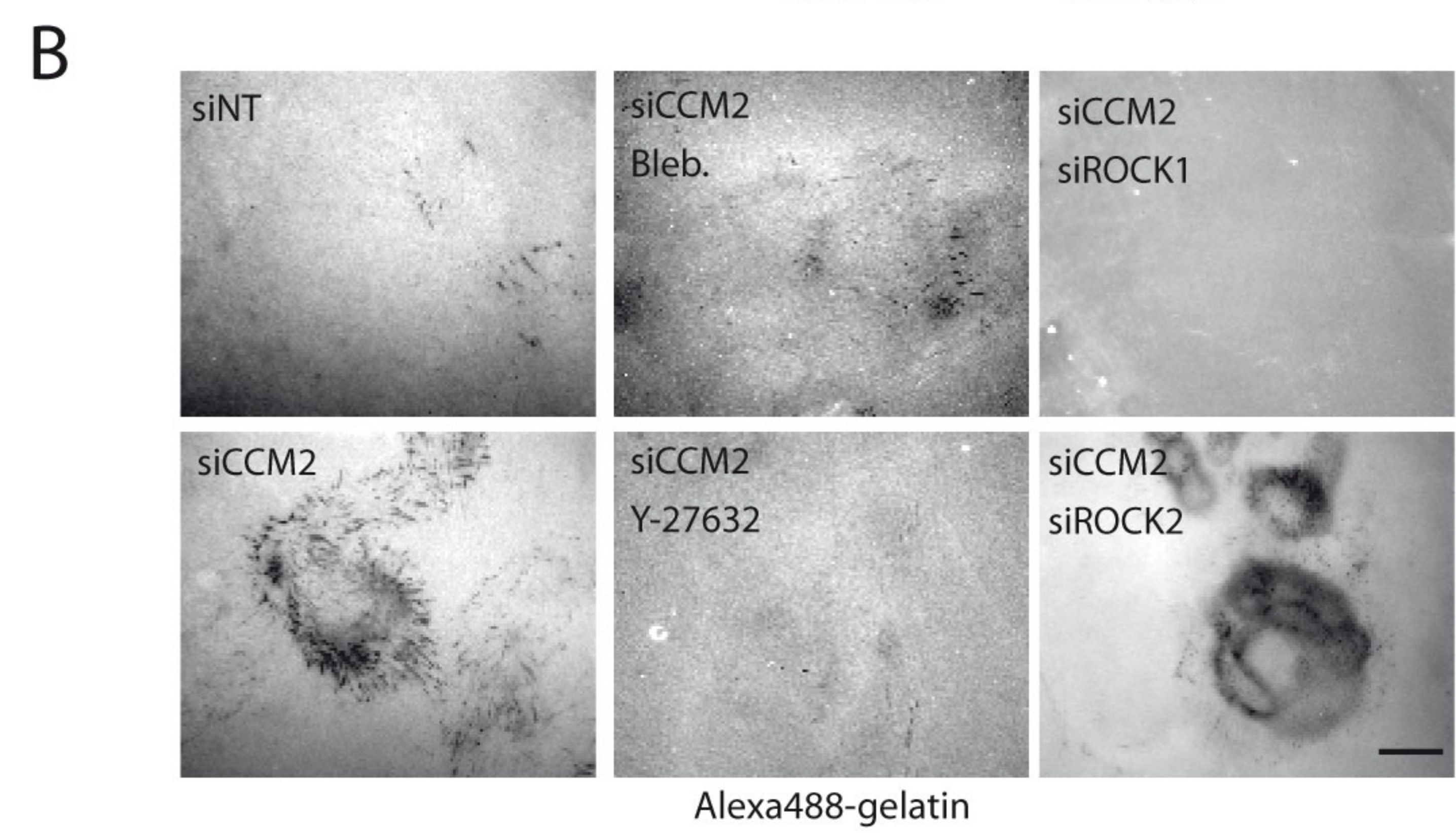
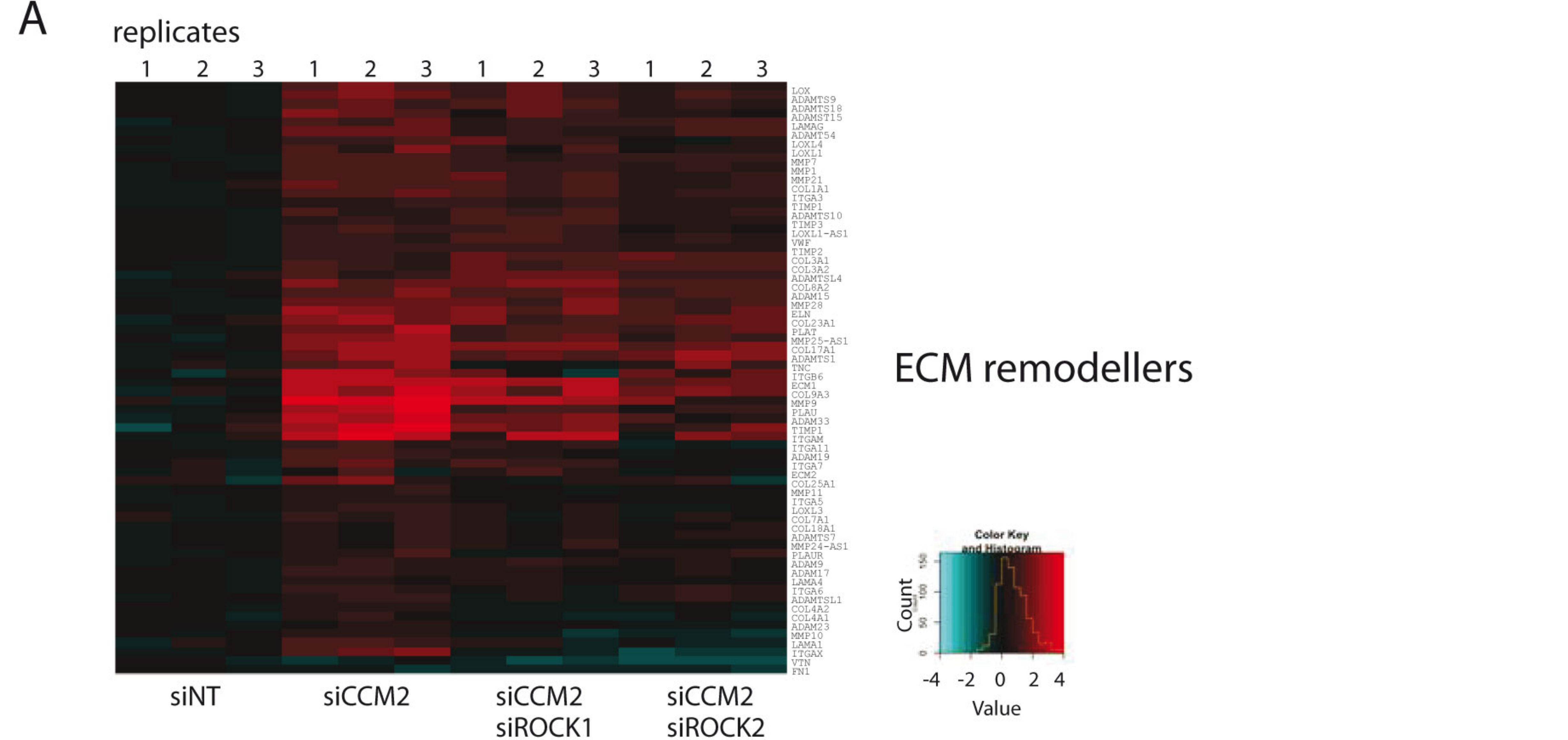
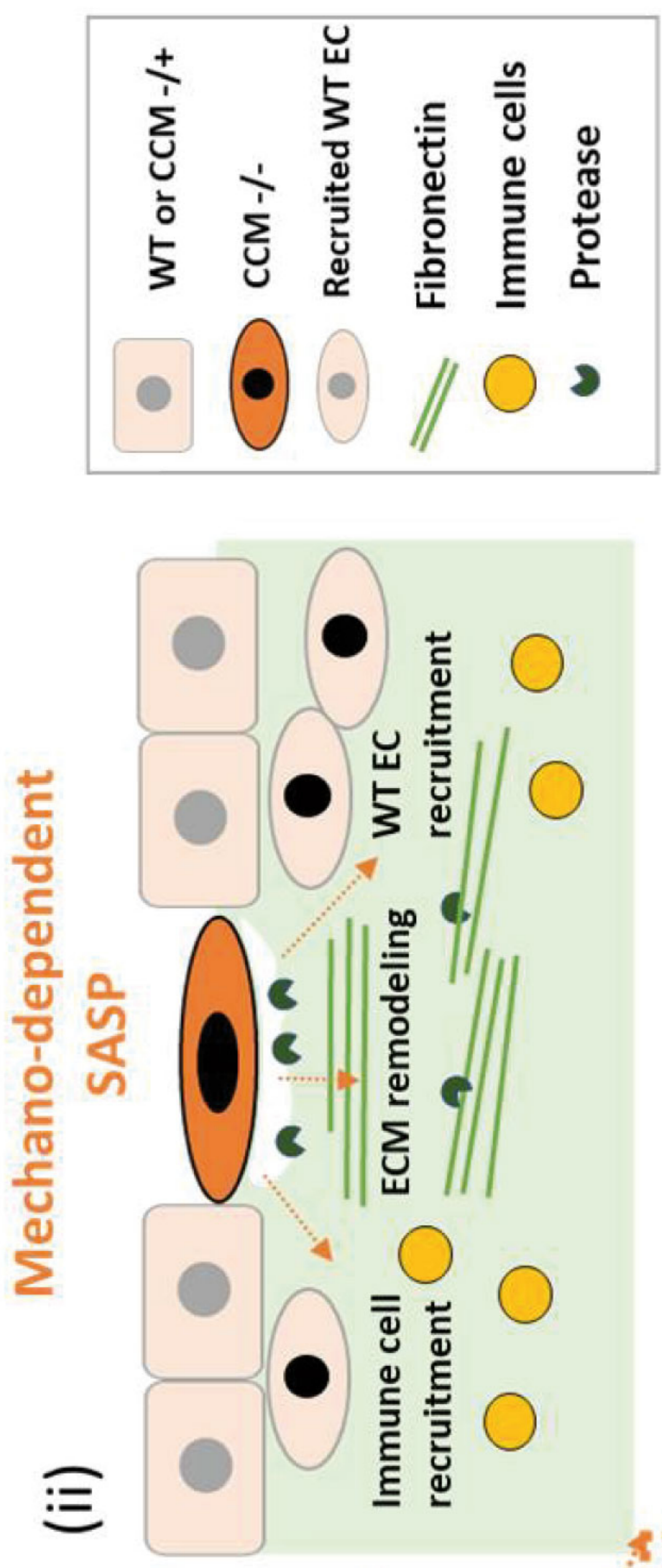


Figure 5

A



B

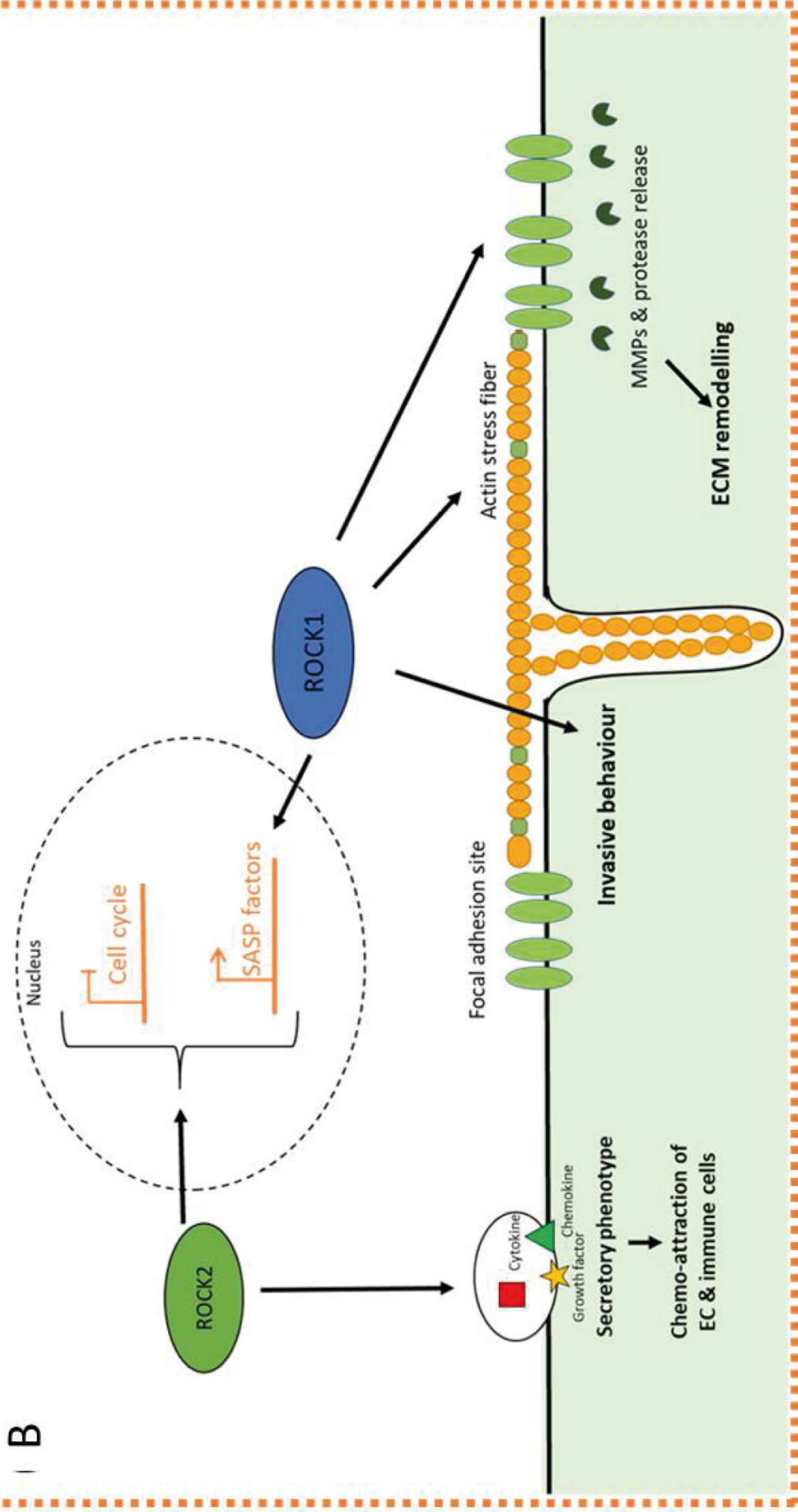
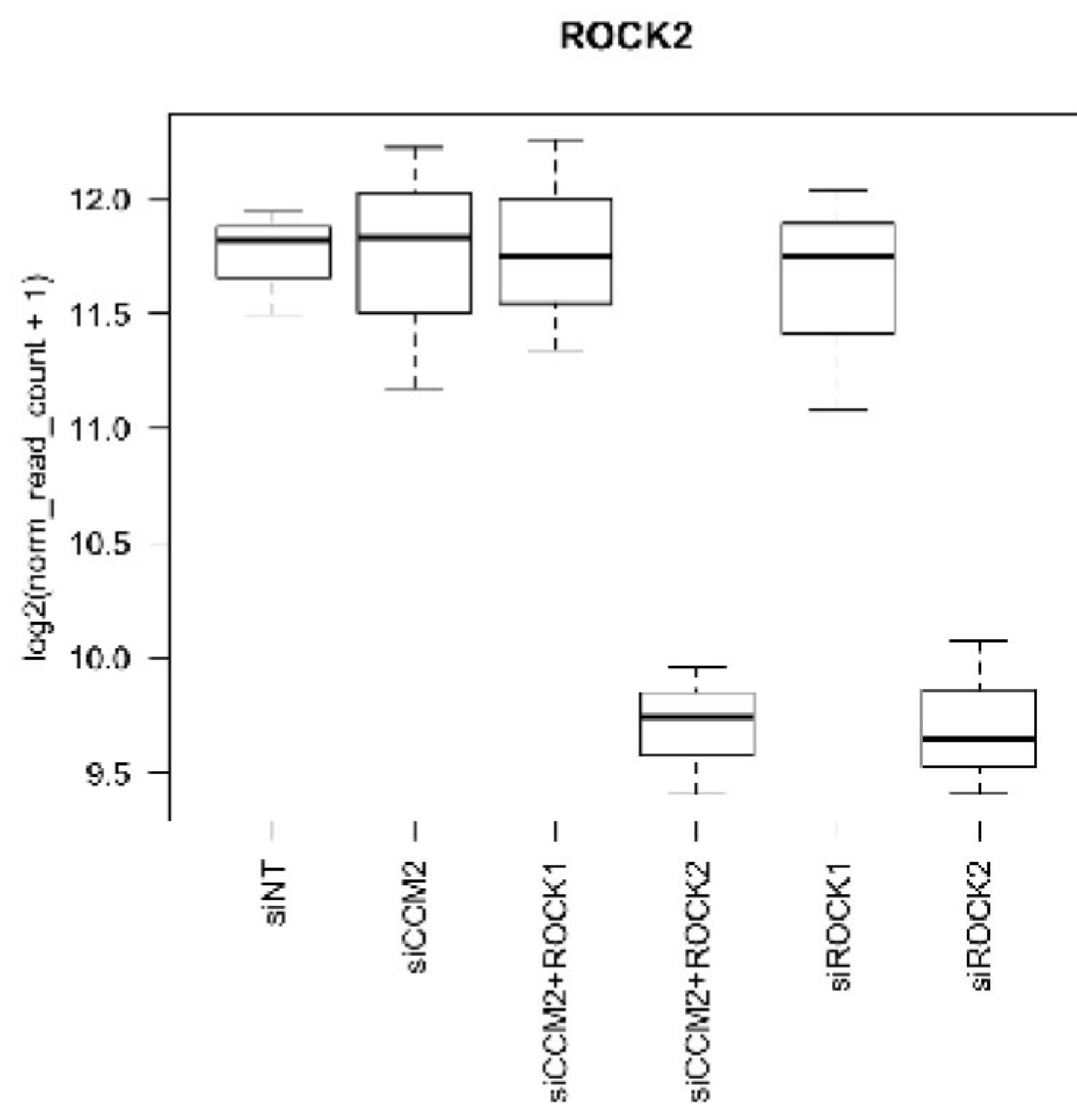
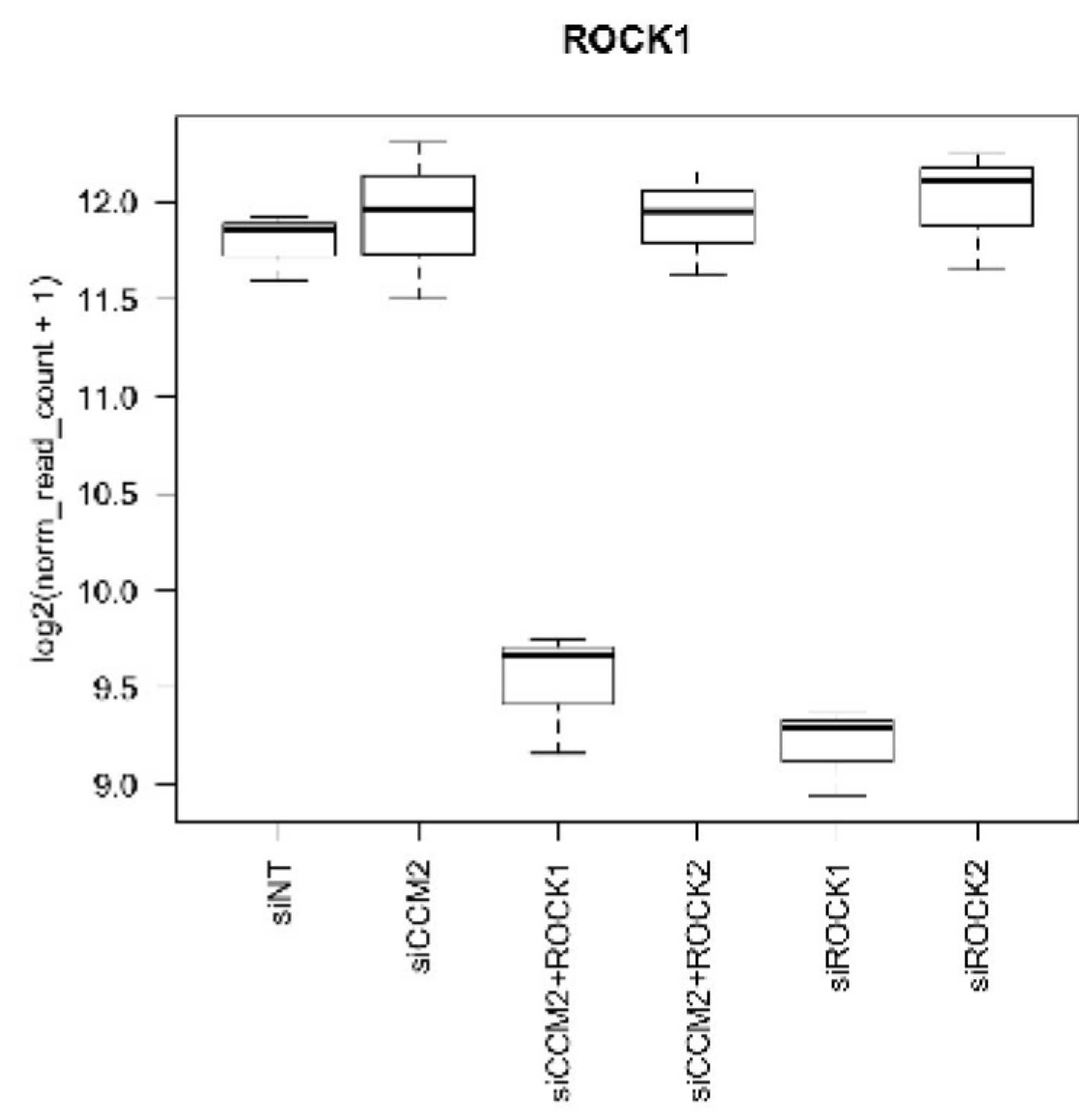
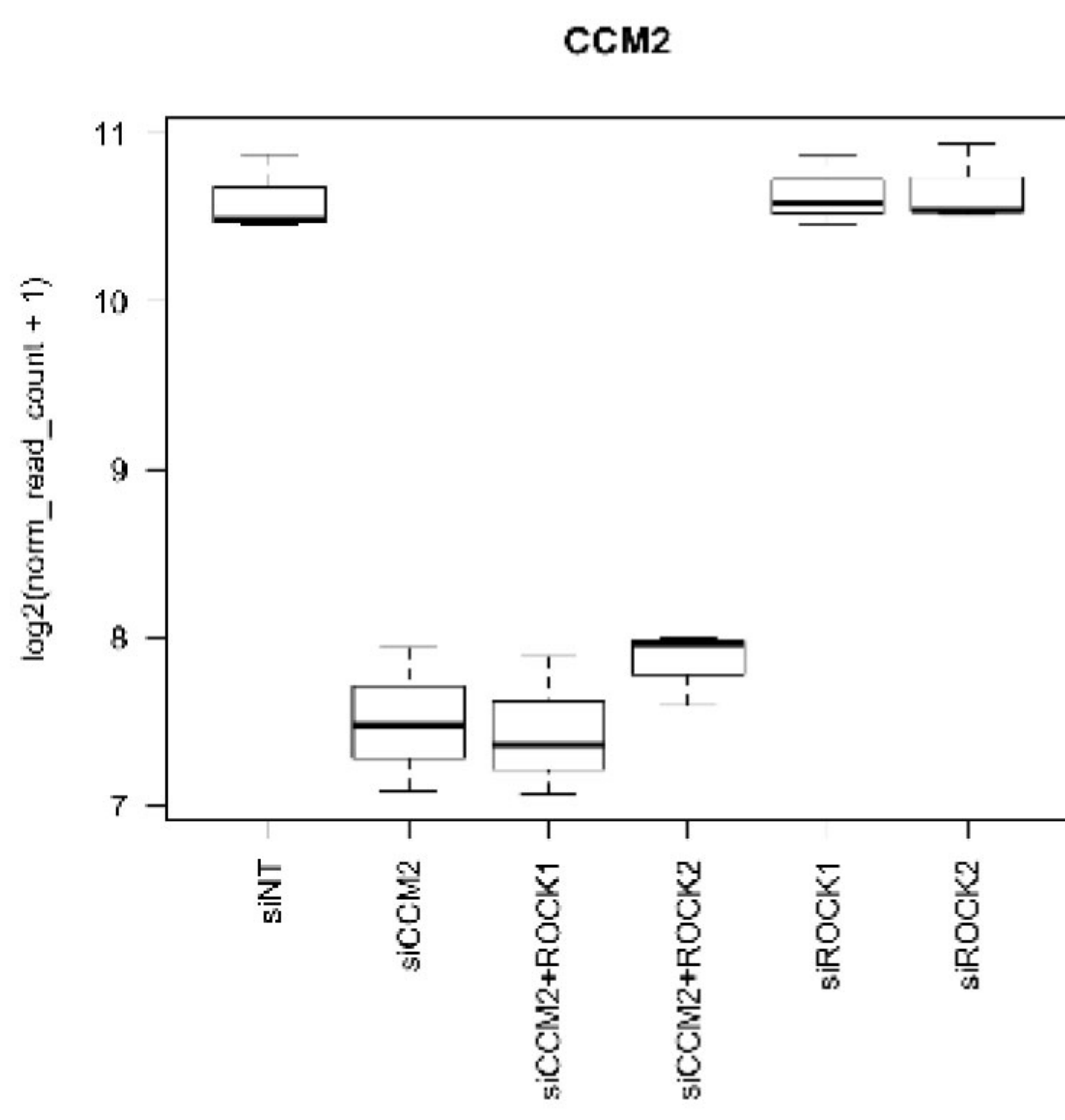


Figure 6

A



B

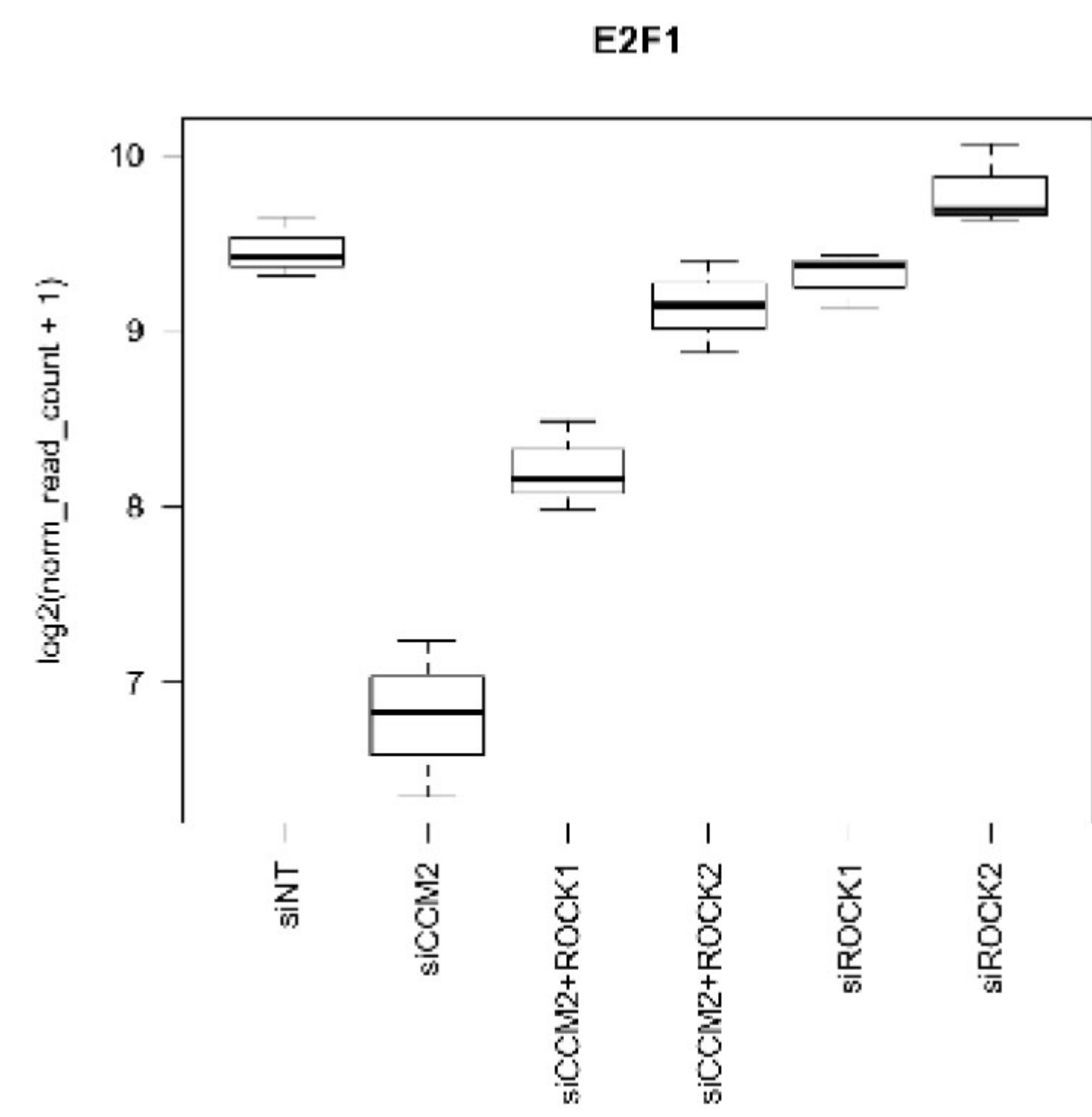
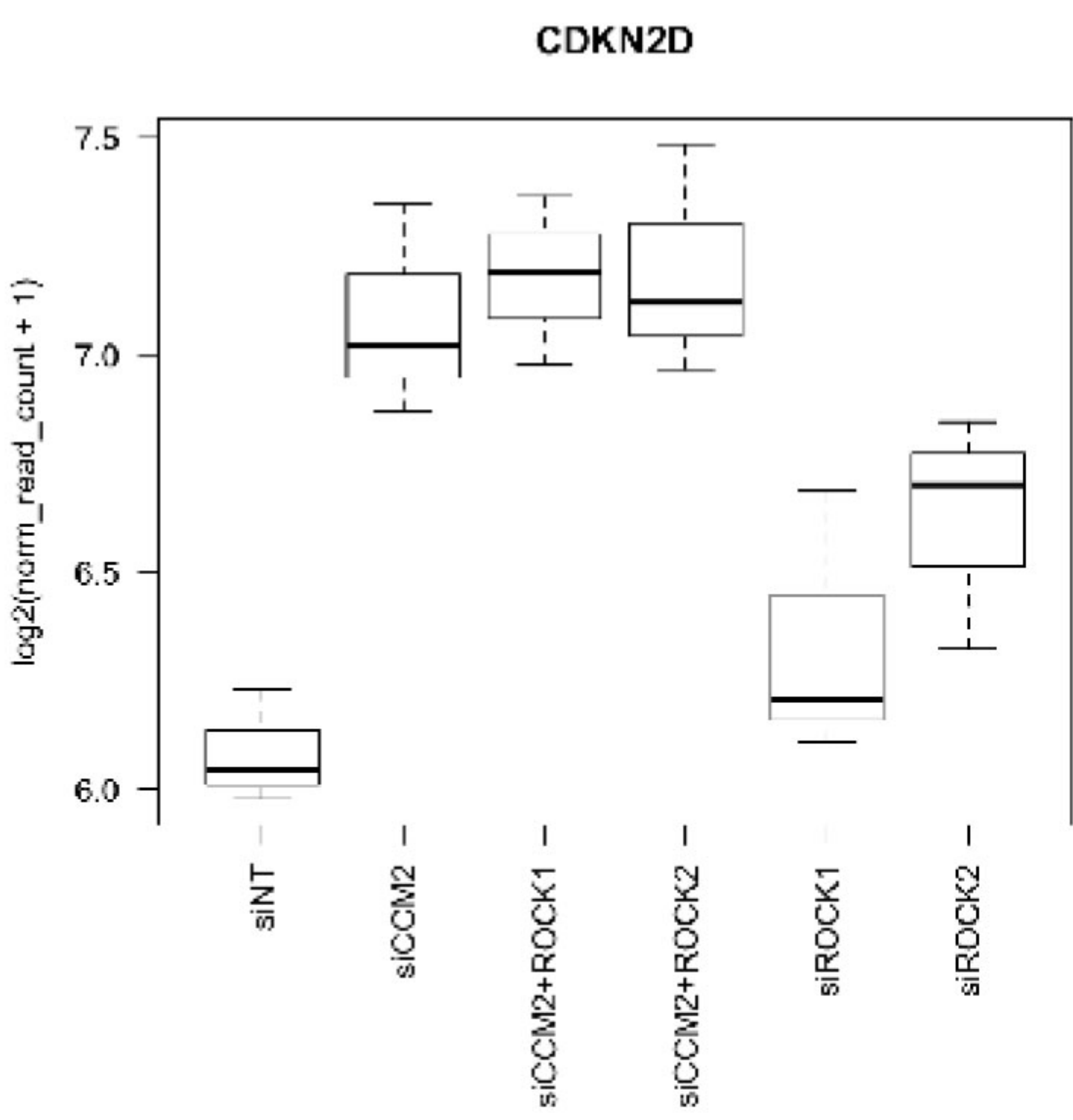
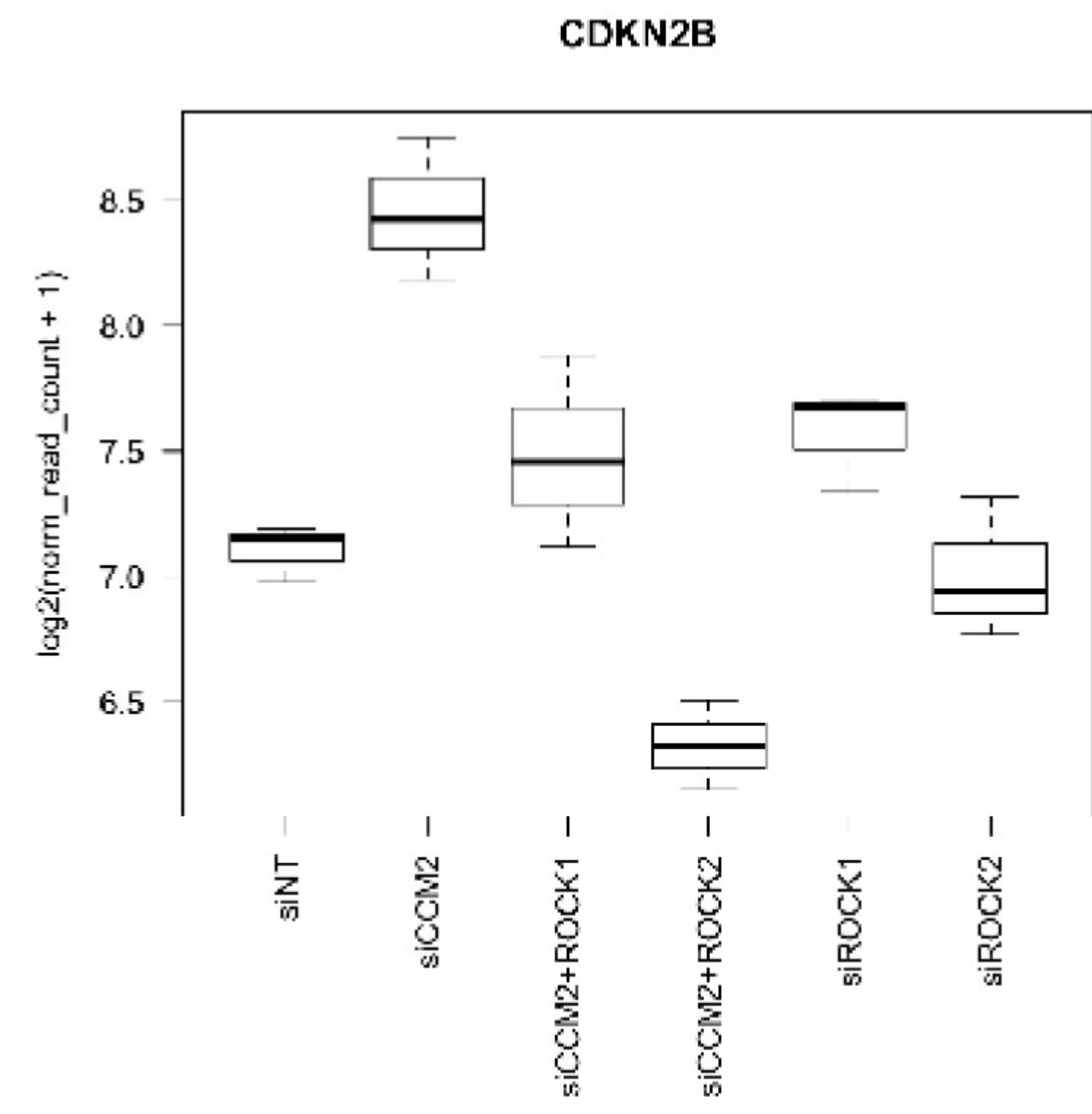
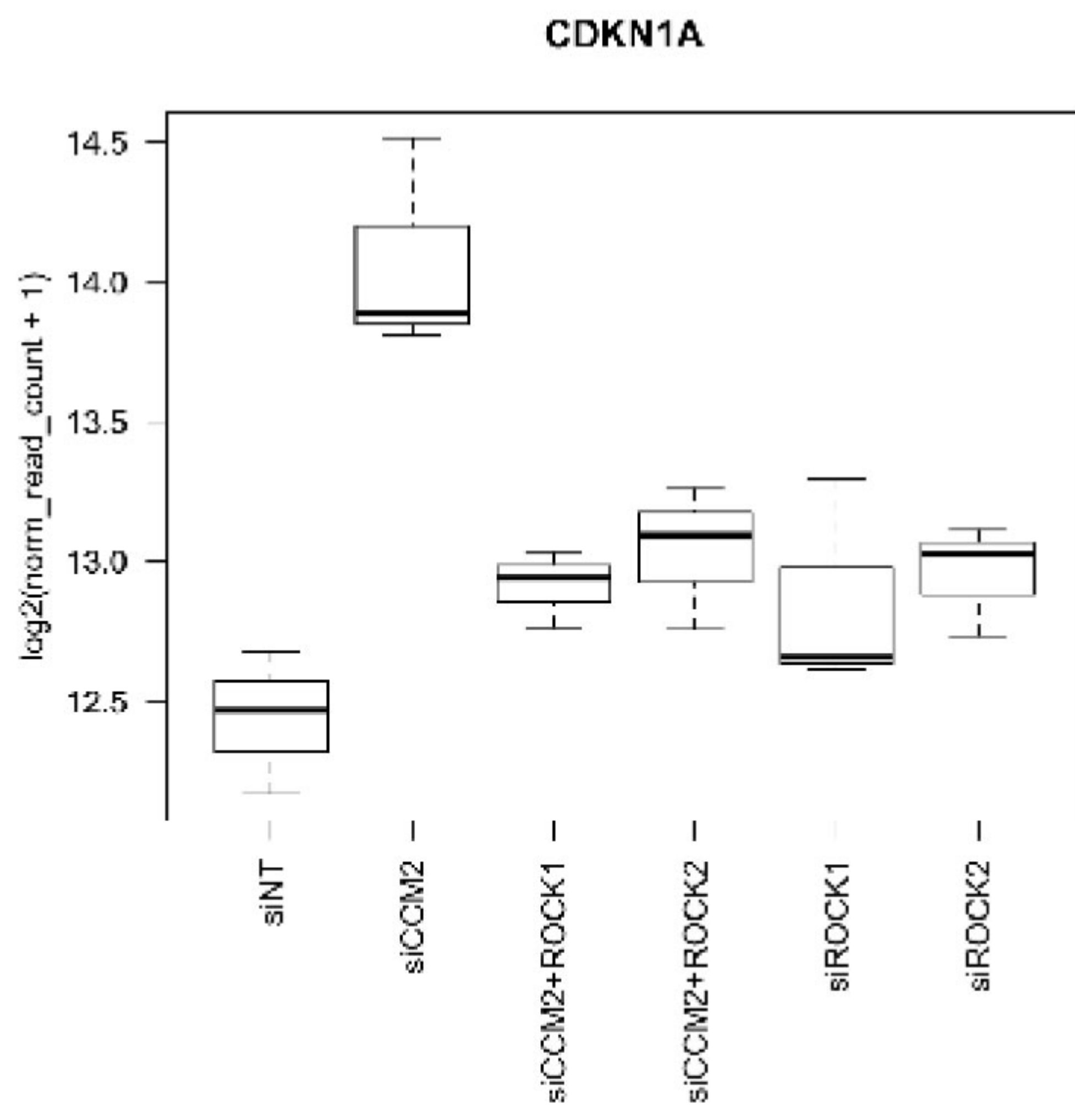


Figure S1

A

PREMATURE AGING
from Ly DH et al., science 2000

OLD AGING
from Ly DH et al., science 2000

SENESCENCE
from Casella et al, NAR 2019

Gene set UP

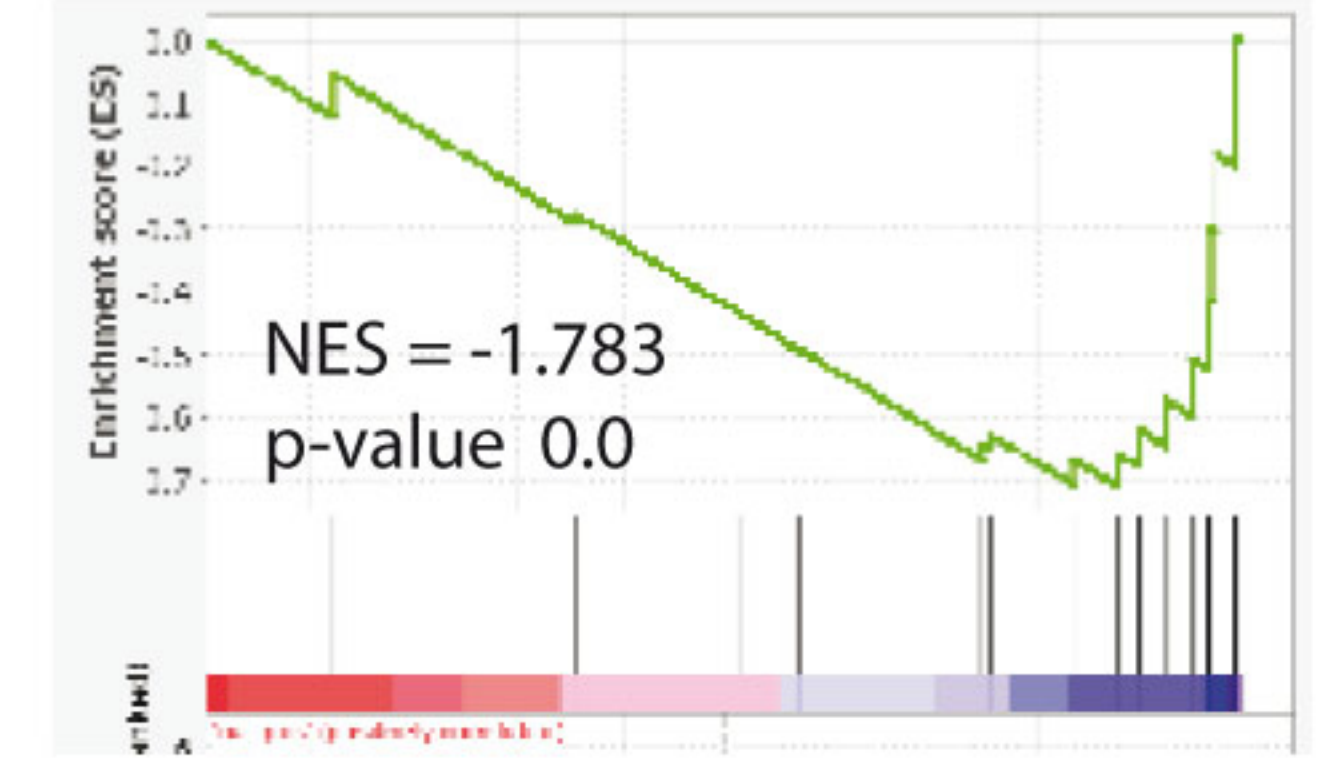
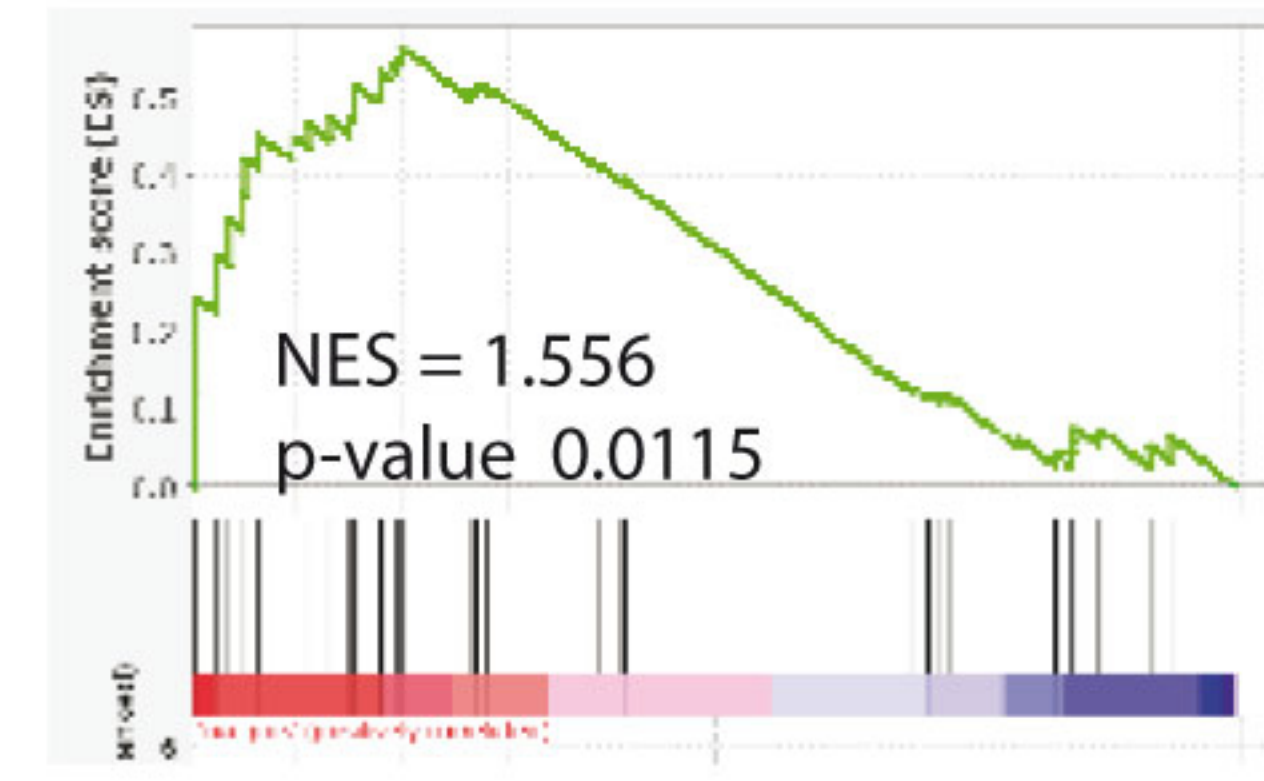
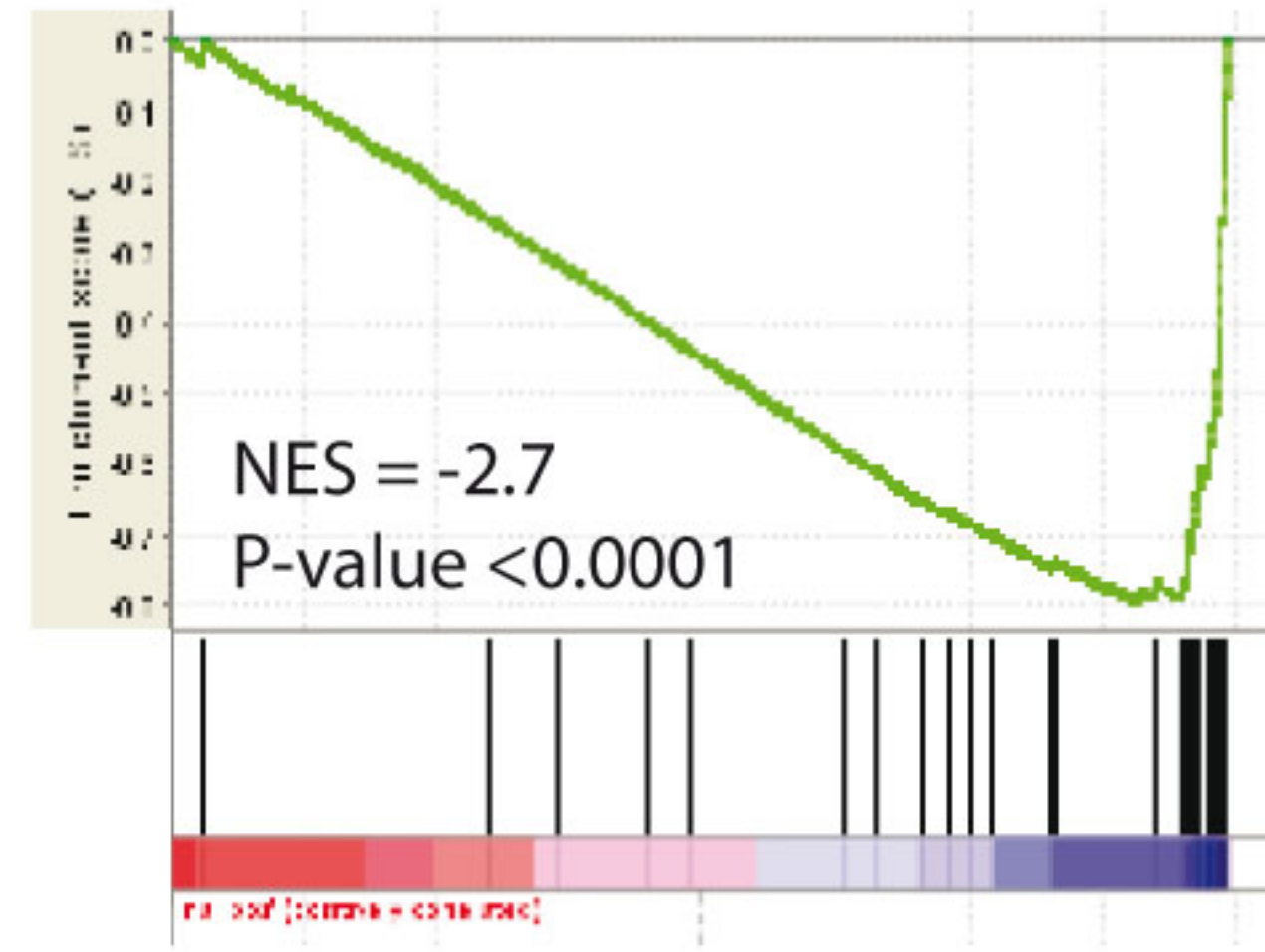
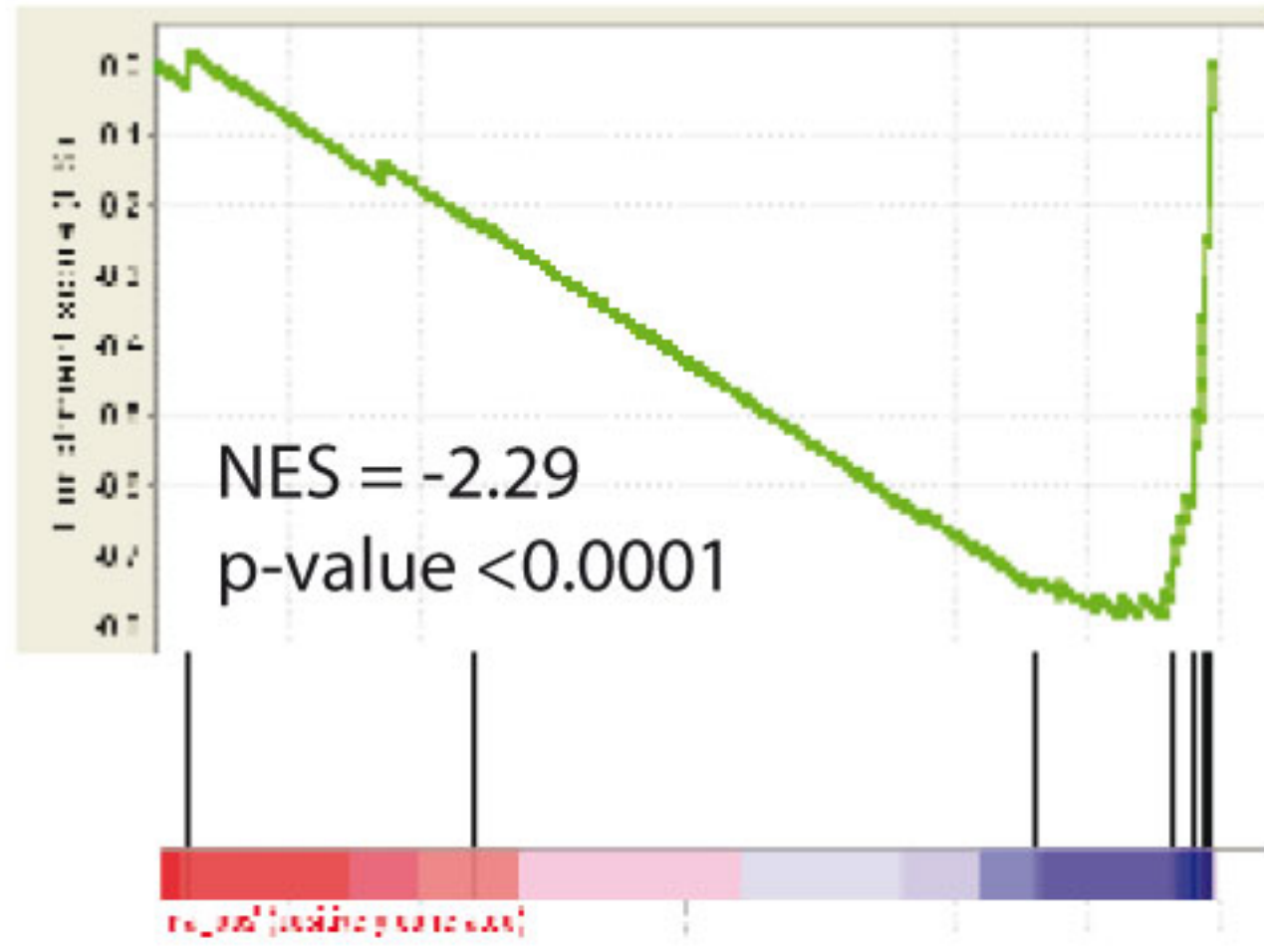
Gene set DOWN

siCCM2 vs. siNT

siCCM2 vs. siNT

siCCM2 vs. siNT

siCCM2 vs. siNT

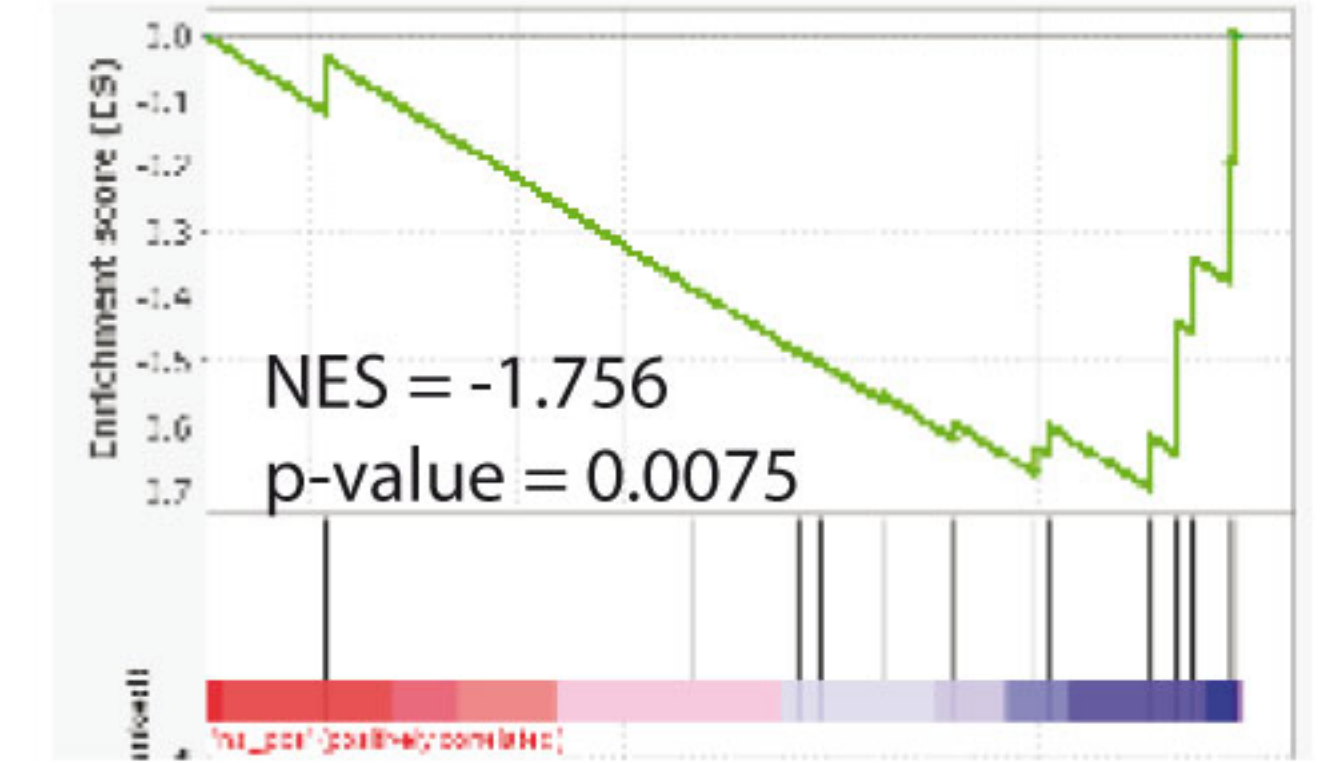
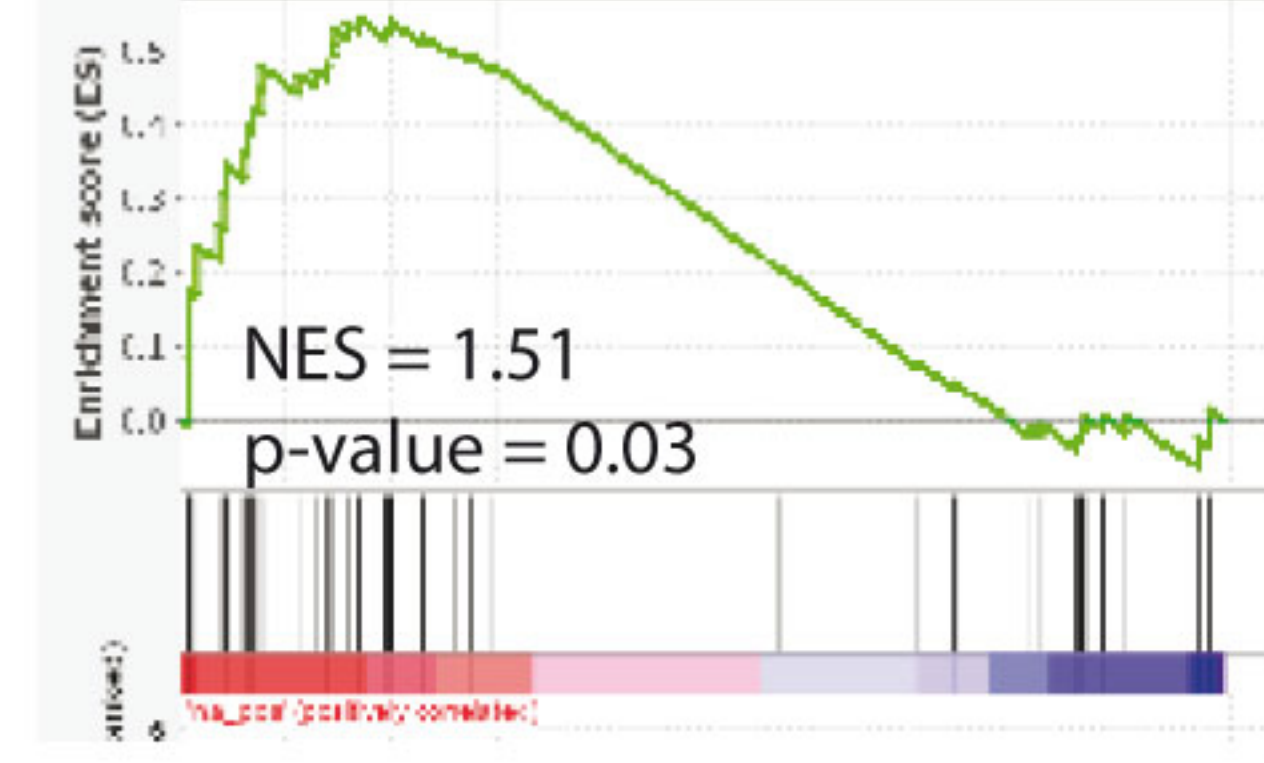
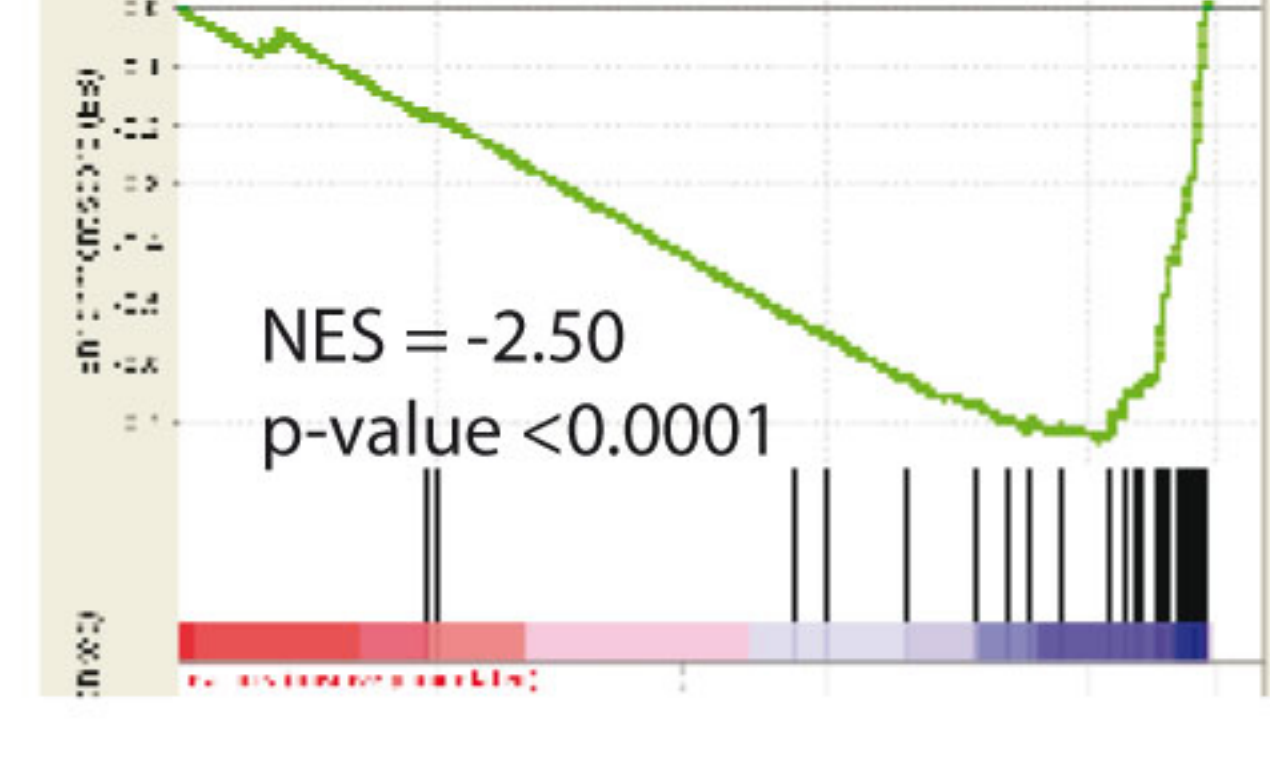
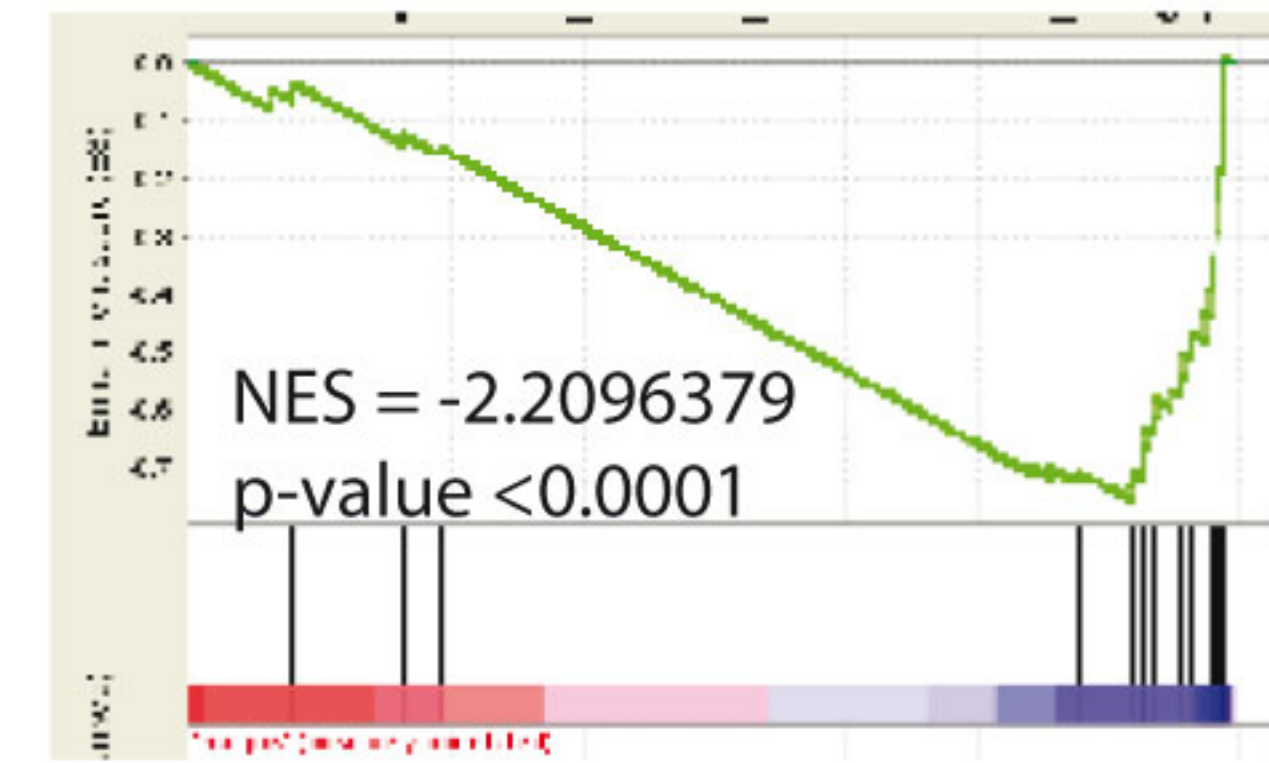


siCCM2+siROCK1 vs. siNT

siCCM2+siROCK1 vs. siNT

siCCM2+siROCK1 vs. siNT

siCCM2+siROCK1 vs. siNT

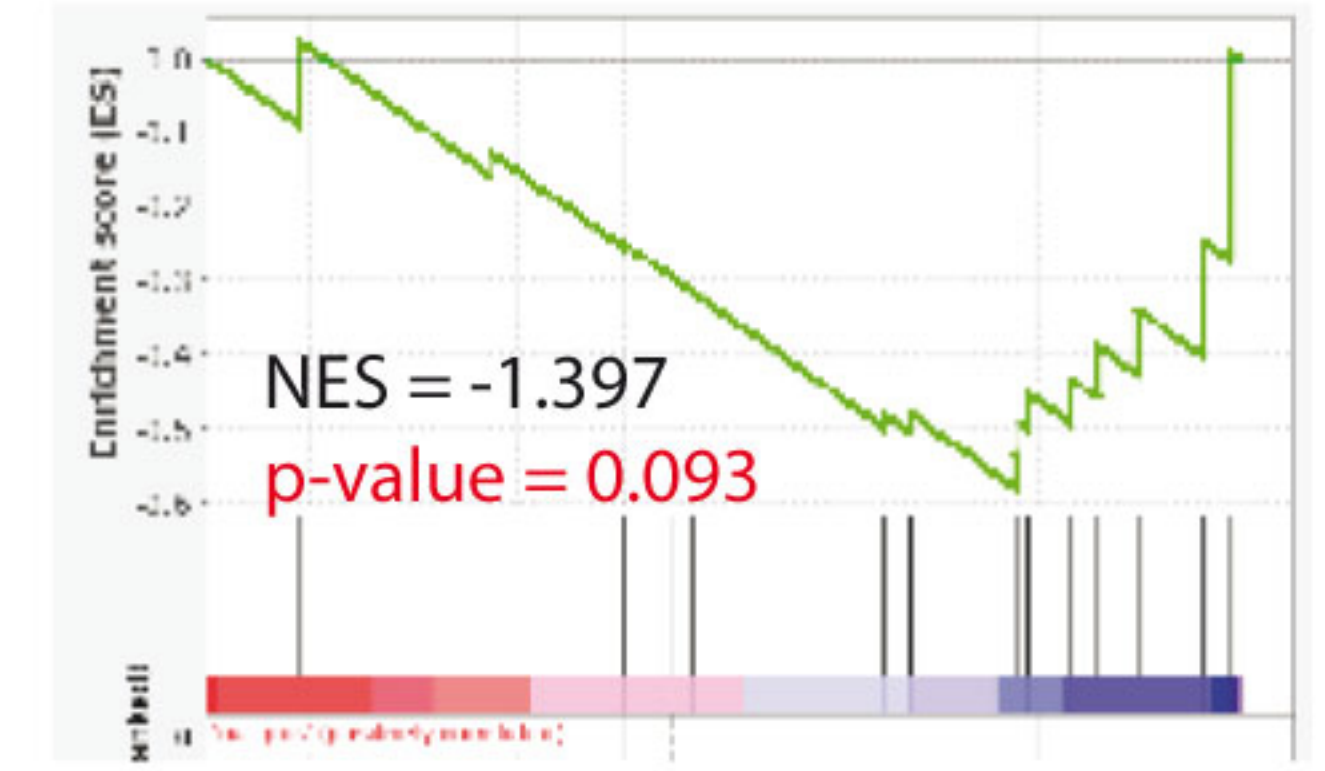
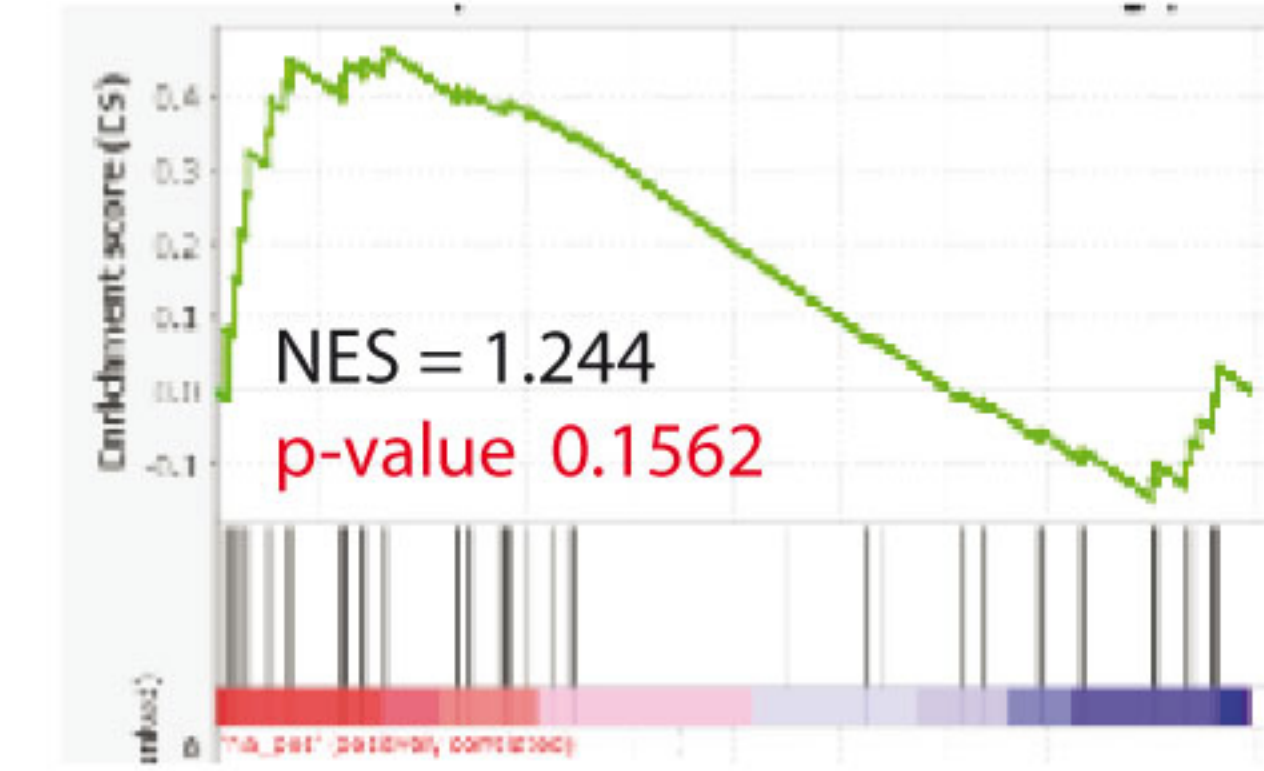
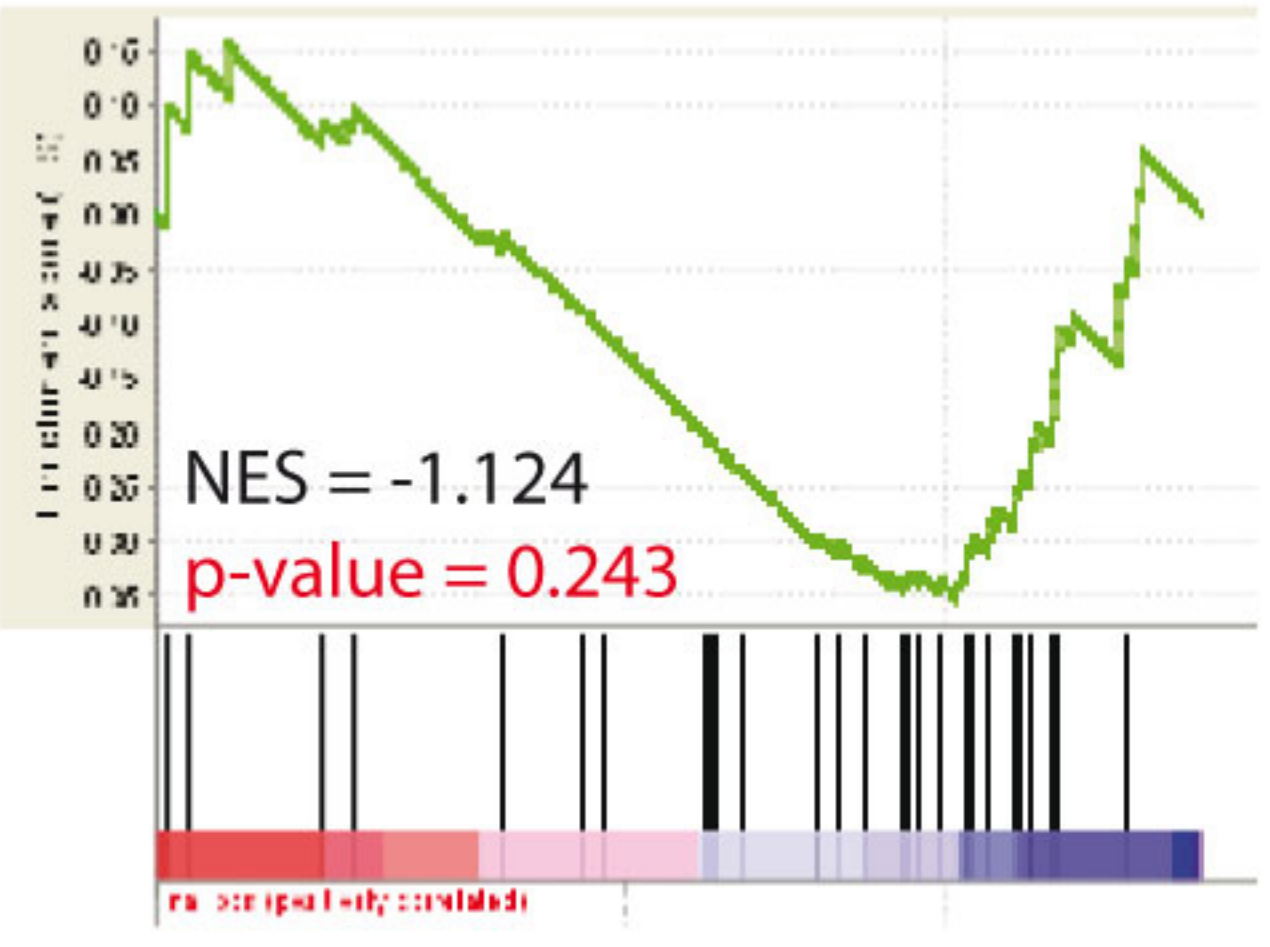
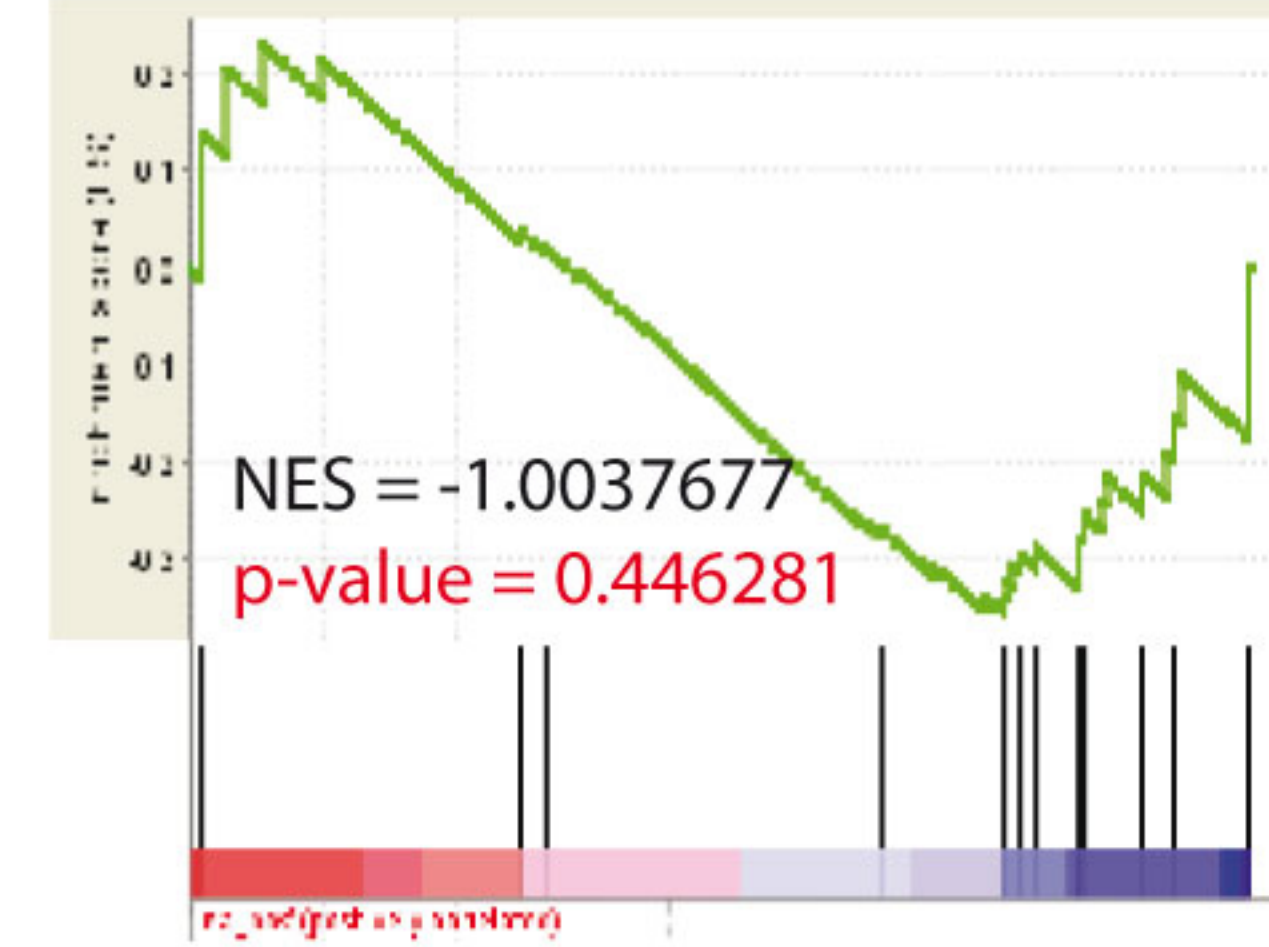


siCCM2+siROCK2 vs. siNT

siCCM2+siROCK2 vs. siNT

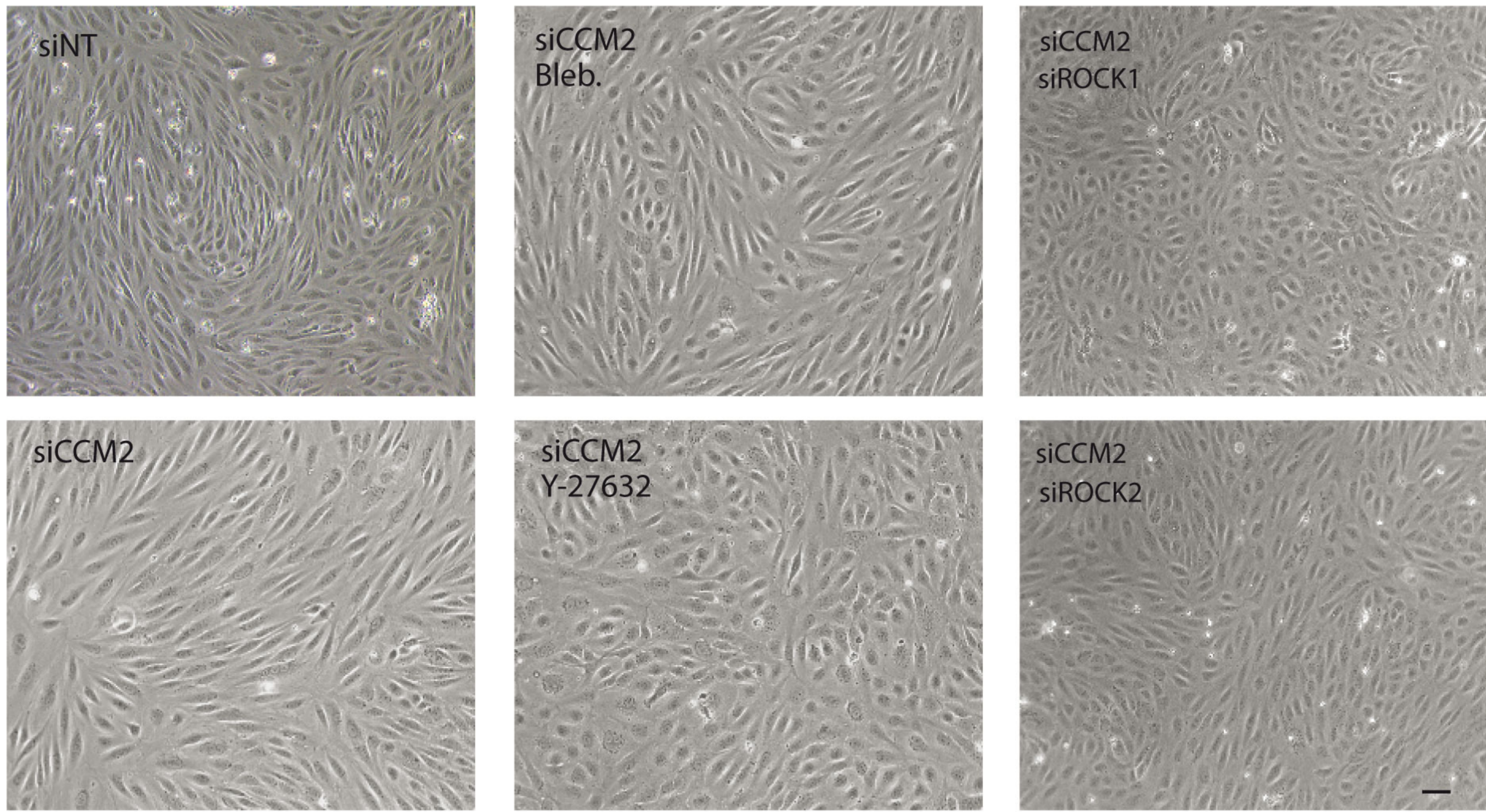
siCCM2+siROCK2 vs. siNT

siCCM2+siROCK2 vs. siNT

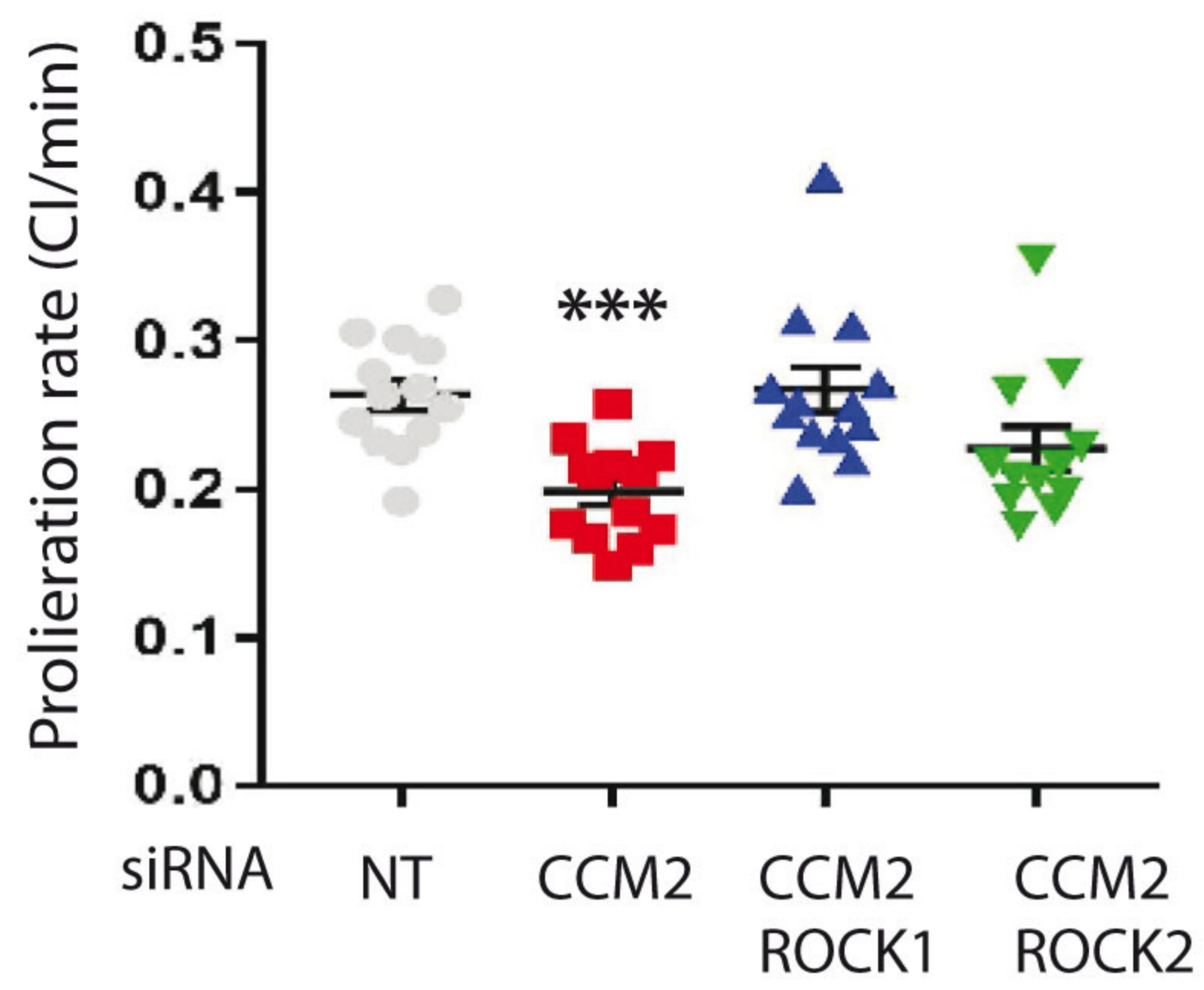


A

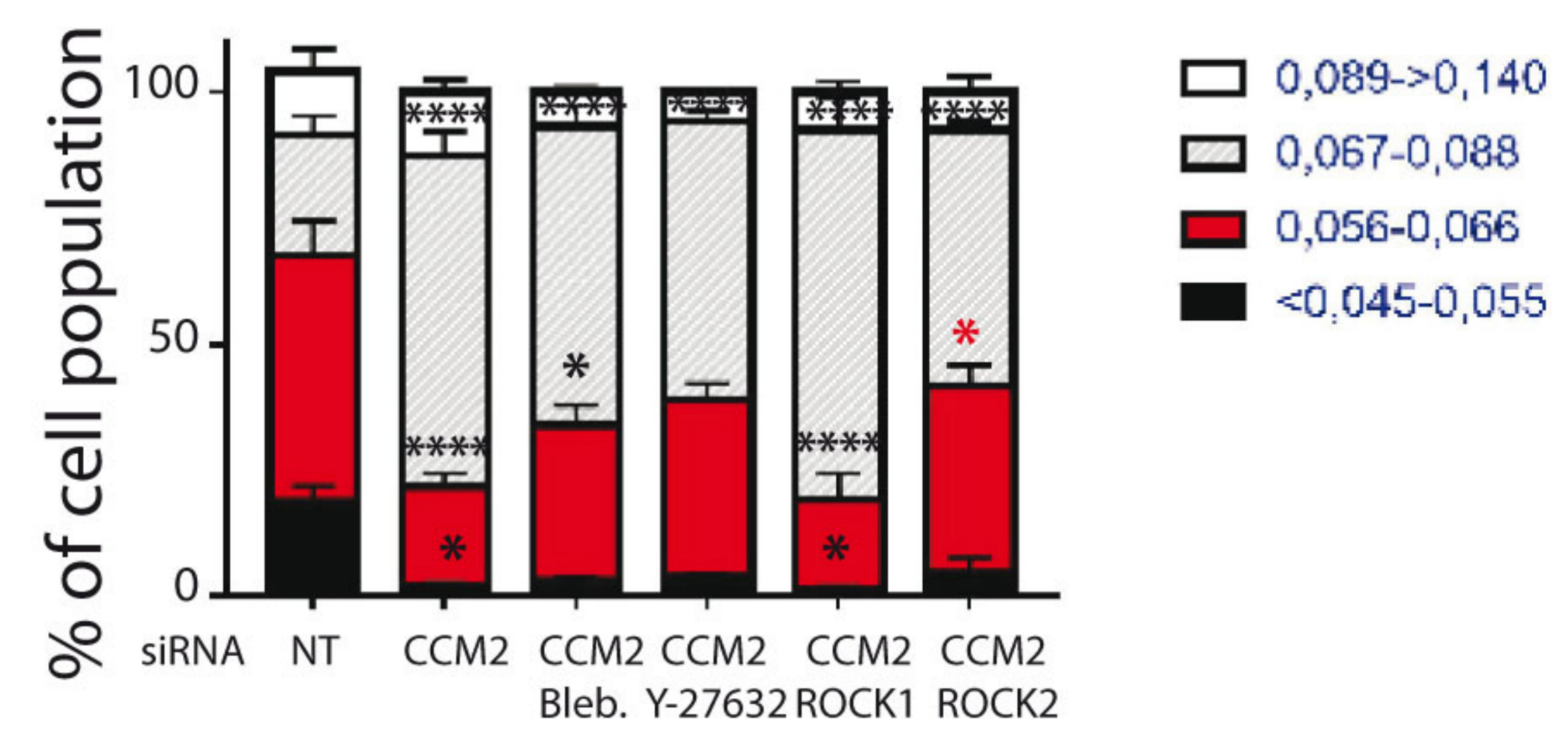
Phase contrast



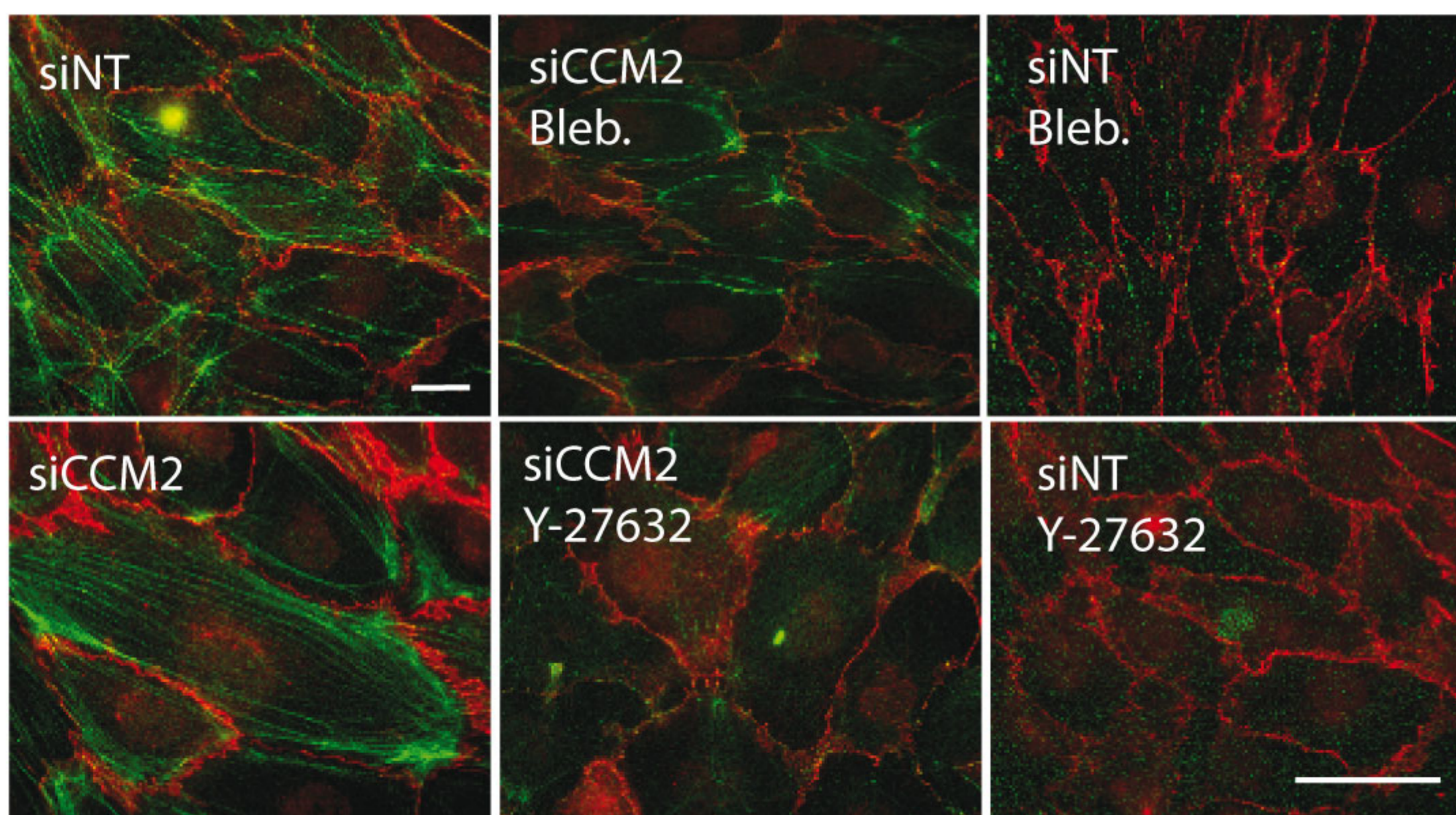
B



C

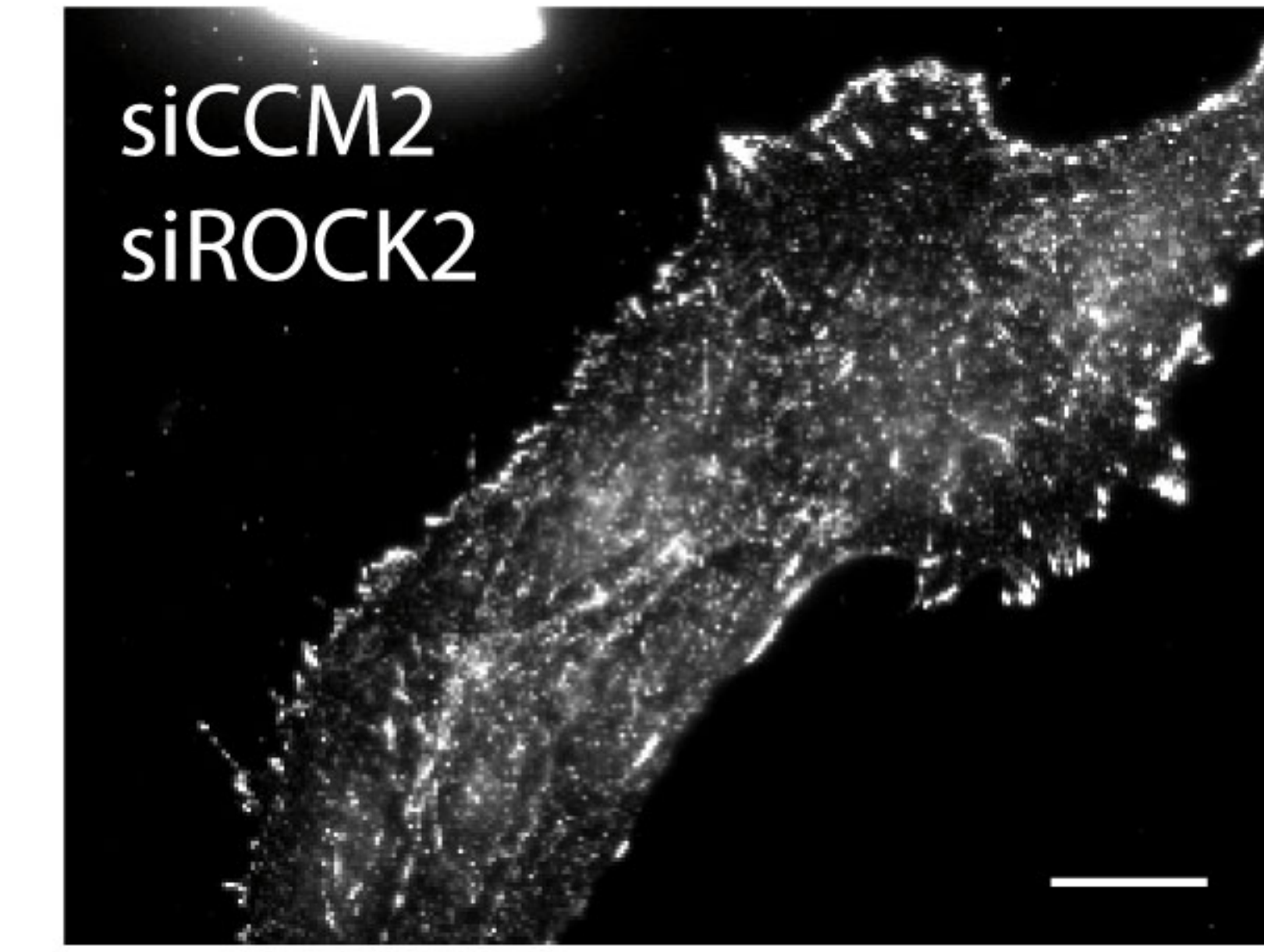
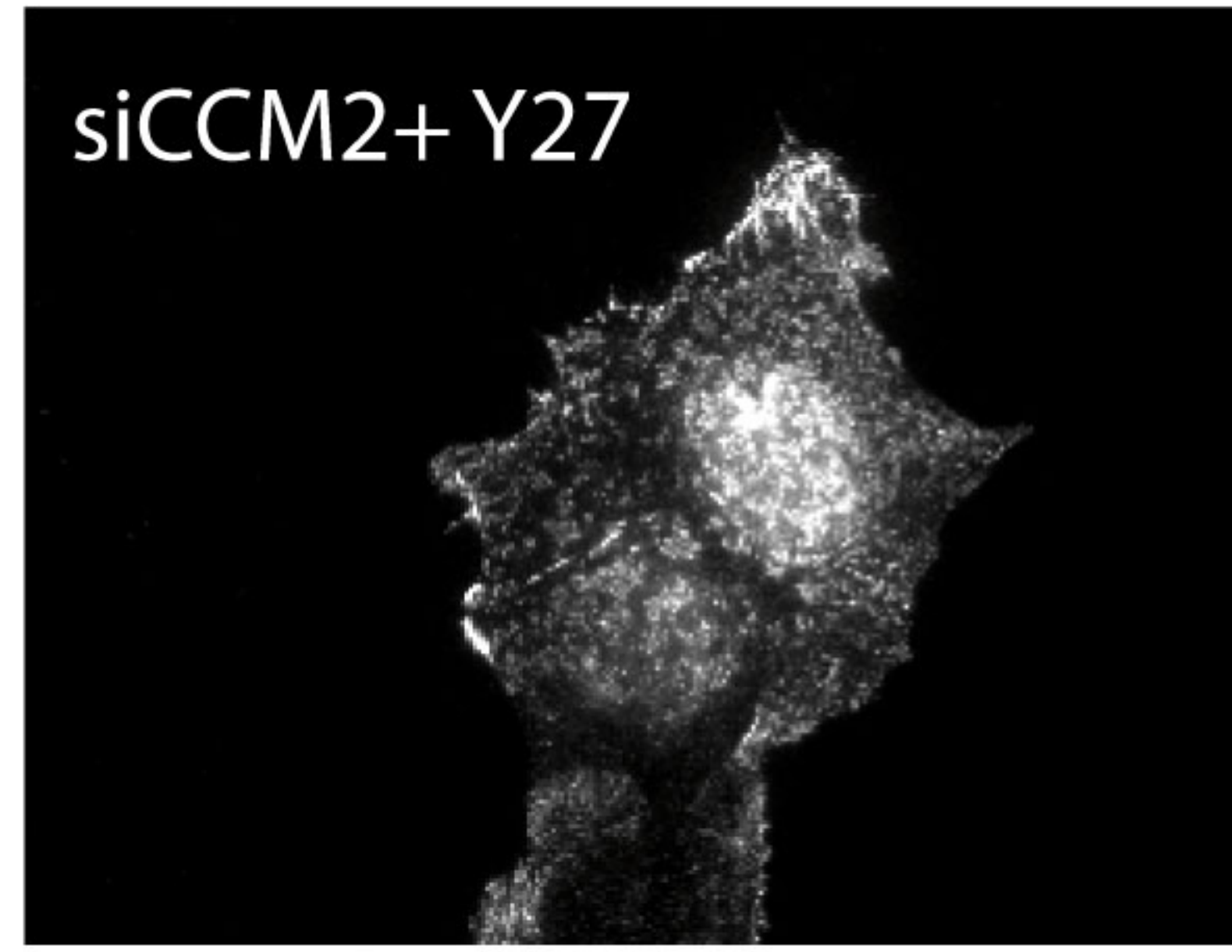
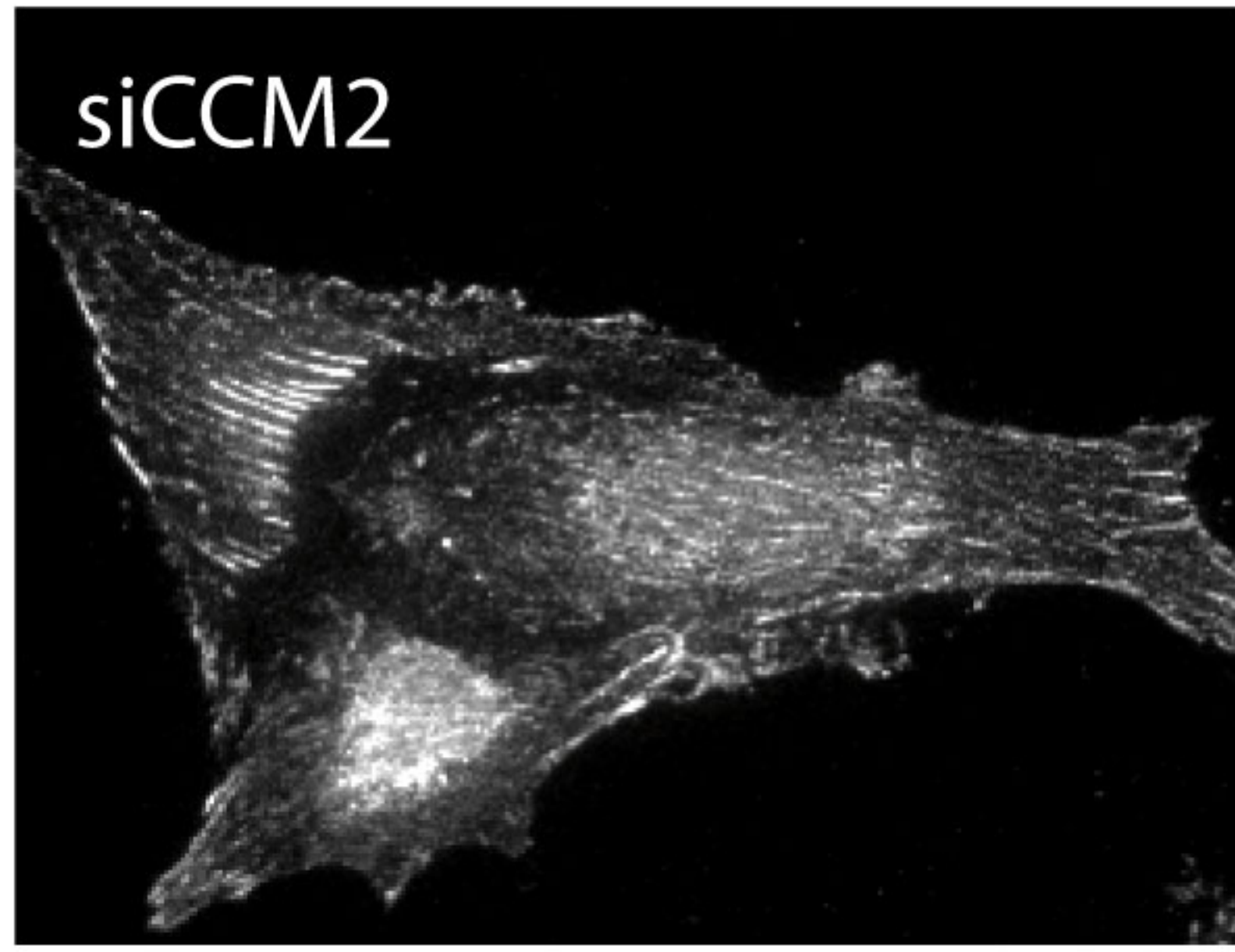
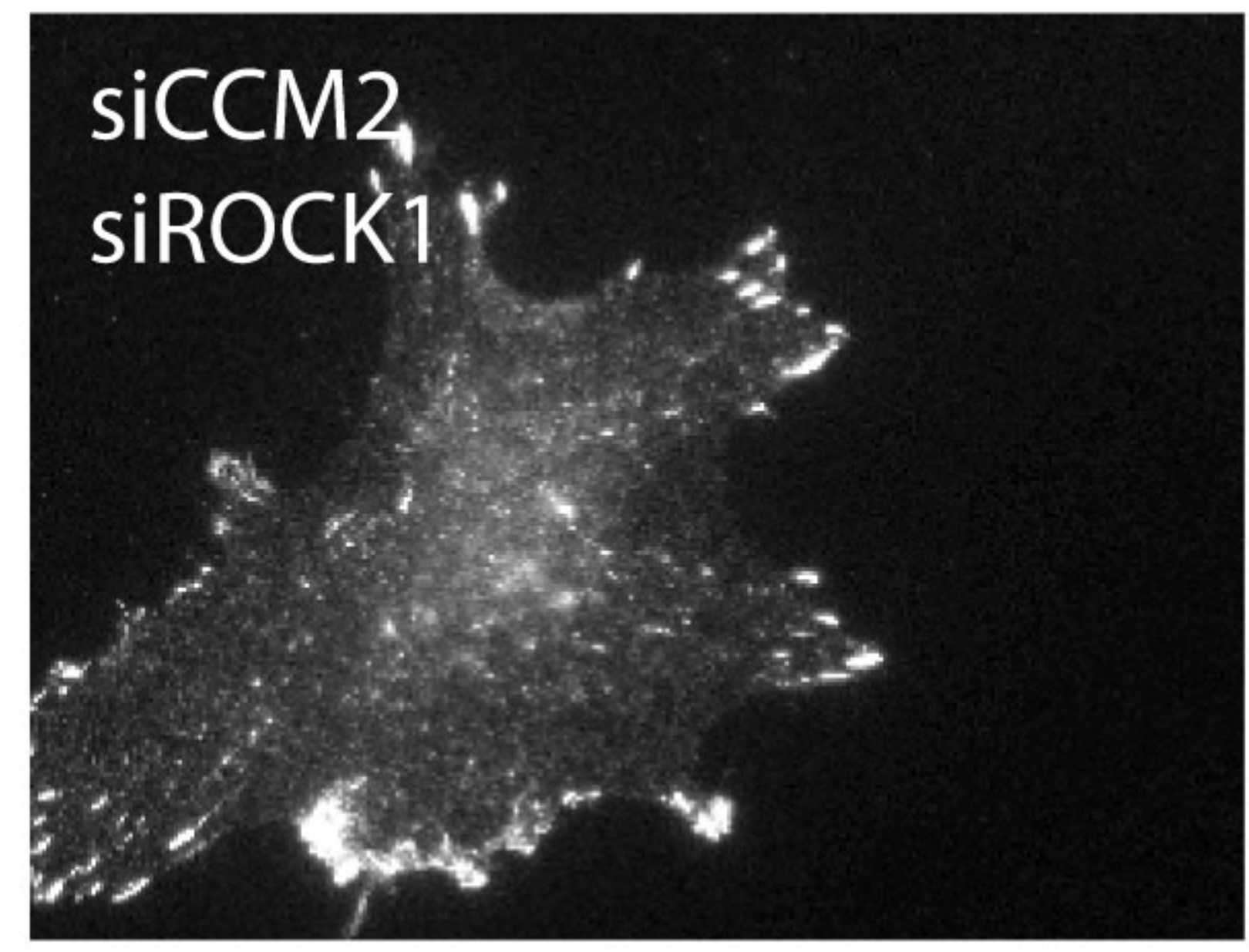
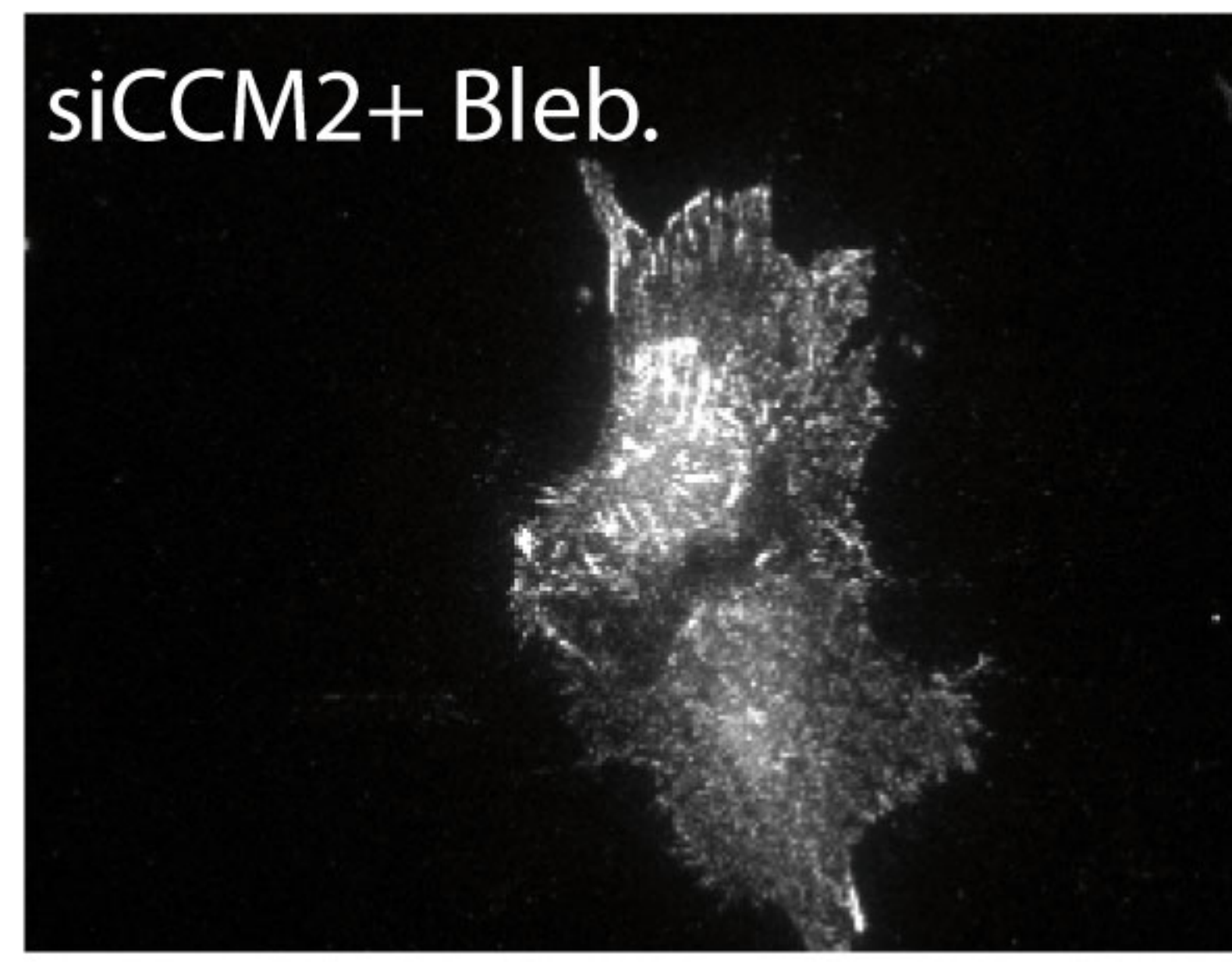
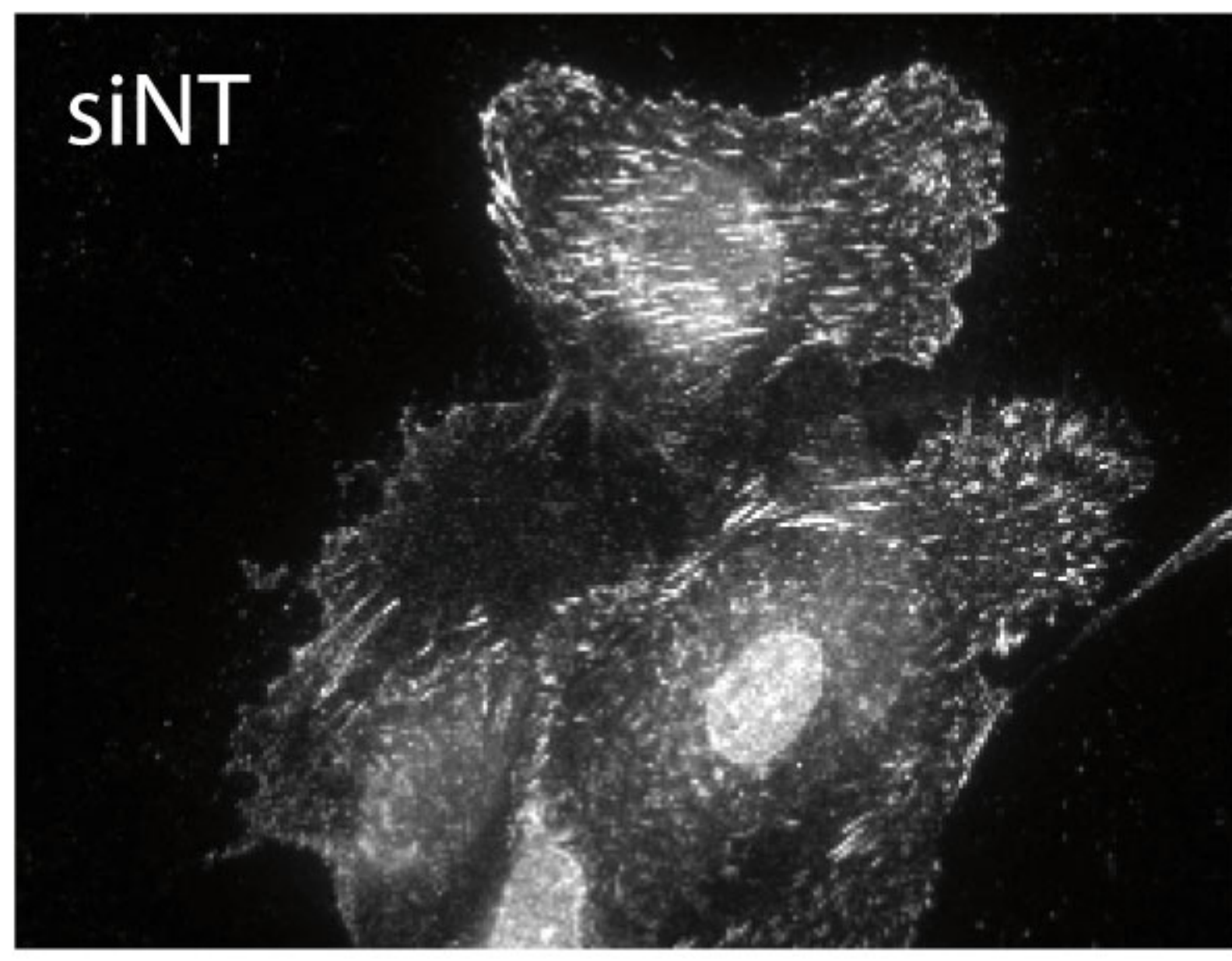


D

 β -catenin / F-actin

A

β 1 integrin



References

1. Clatterbuck RE, Eberhart CG, Crain BJ, Rigamonti D. Ultrastructural and immunocytochemical evidence that an incompetent blood-brain barrier is related to the pathophysiology of cavernous malformations. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* [Internet]. 2001 Aug [cited 2016 Apr 4];71(2):188–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11459890>
2. Labauge P, Denier C, Bergametti F, Tournier-Lasserre E. Genetics of cavernous angiomas. *Lancet Neurol* [Internet]. 2007 Mar [cited 2016 Apr 28];6(3):237–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17303530>
3. Awad IA, Polster SP. Cavernous angiomas: deconstructing a neurosurgical disease. *J Neurosurg* [Internet]. 2019 Jul 1 [cited 2019 Sep 15];131(1):1–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31261134>
4. Riant F, Bergametti F, Fournier HD, Chapon F, Michalak-Provost S, Cecillon M, et al. CCM3 mutations are associated with early-onset cerebral hemorrhage and multiple meningiomas. *Mol Syndromol* [Internet]. 2013 Apr [cited 2020 Jun 30];4(4):165–72. Available from: [/pmc/articles/PMC3666455/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC3666455/?report=abstract)
5. Shenkar R, Shi C, Rebeiz T, Stockton RA, McDonald DA, Mikati AG, et al. Exceptional aggressiveness of cerebral cavernous malformation disease associated with PDCD10 mutations. *Genet Med* [Internet]. 2015 Mar 14 [cited 2017 Jun 1];17(3):188–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25122144>
6. Labauge P, Brunereau L, Lévy C, Laberge S, Houtteville JP. The natural history of familial cerebral cavernomas: A retrospective MRI study of 40 patients. *Neuroradiology* [Internet]. 2000 [cited 2020 Jun 30];42(5):327–32. Available from: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/10872151/>
7. McDonald DA, Shenkar R, Shi C, Stockton RA, Akers AL, Kucherlapati MH, et al. A novel mouse model of cerebral cavernous malformations based on the two-hit mutation hypothesis recapitulates the human disease. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2011;20(2):211–22. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20940147
8. Rath M, Pagenstecher A, Hoischen A, Felbor U. Postzygotic mosaicism in cerebral cavernous malformation. *J Med Genet*. 2020 Mar 1;57(3):212–6.
9. Detter MR, Snellings DA, Marchuk DA. Cerebral cavernous malformations develop through clonal expansion of mutant endothelial cells. *Circ Res* [Internet]. 2018 [cited 2020 Jun 30];123(10):1143–51. Available from: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/30359189/>
10. Malinverno M, Maderna C, Abu Taha A, Corada M, Orsenigo F, Valentino M, et al. Endothelial cell clonal expansion in the development of cerebral cavernous malformations. *Nat Commun* [Internet]. 2019 Dec 24 [cited 2019 Jul 16];10(1):2761. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31235698>
11. Bicer A, Guclu B, Ozkan A, Kurtkaya O, Koc DY, Necmettin Pamir M, et al. Expressions of angiogenesis associated matrix metalloproteinases and extracellular

- matrix proteins in cerebral vascular malformations. *J Clin Neurosci* [Internet]. 2010 Feb [cited 2020 Jun 30];17(2):232–6. Available from: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/20036554/>
12. Zhou Z, Tang AT, Wong W-Y, Bamezai S, Goddard LM, Shenkar R, et al. Cerebral cavernous malformations arise from endothelial gain of MEKK3-KLF2/4 signalling. *Nature* [Internet]. 2016 Apr 7 [cited 2016 May 11];532(7597):122–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27027284>
 13. Fujimura M, Watanabe M, Shimizu H, Tominaga T. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) in cerebral cavernous malformations: Immunohistochemical analysis of MMP-2, -9 and TIMP-2. *Acta Neurochir (Wien)* [Internet]. 2007 Feb [cited 2020 Jul 1];149(2):179–83. Available from: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.insb.bib.cnrs.fr/17043747/>
 14. Noshiro S, Mikami T, Kataoka-Sasaki Y, Sasaki M, Ohnishi H, Ohtaki S, et al. Co-expression of tissue factor and IL-6 in immature endothelial cells of cerebral cavernous malformations. *J Clin Neurosci* [Internet]. 2017 Mar 1 [cited 2020 Jun 30];37:83–90. Available from: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/28087183/>
 15. Goitre L, Balzac F, Degani S, Degan P, Marchi S, Pinton P, et al. KRIT1 regulates the homeostasis of intracellular reactive oxygen species. *PLoS One* [Internet]. 2010 [cited 2020 Jun 30];5(7):1–22. Available from: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.insb.bib.cnrs.fr/20668652/>
 16. Marchi S, Corricelli M, Trapani E, Bravi L, Pittaro A, Delle Monache S, et al. Defective autophagy is a key feature of cerebral cavernous malformations. *EMBO Mol Med* [Internet]. 2015 Nov [cited 2020 Jun 30];7(11):1403–17. Available from: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.insb.bib.cnrs.fr/26417067/>
 17. Maddaluno L, Rudini N, Cuttano R, Bravi L, Giampietro C, Corada M, et al. EndMT contributes to the onset and progression of cerebral cavernous malformations. *Nature* [Internet]. 2013 Jun 9 [cited 2017 Mar 27];498(7455):492–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23748444>
 18. Uhlik MT, Abell AN, Johnson NL, Sun W, Cuevas BD, Lobel-Rice KE, et al. Rac-MEKK3-MKK3 scaffolding for p38 MAPK activation during hyperosmotic shock. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2003 Dec [cited 2016 Apr 9];5(12):1104–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14634666>
 19. Renz M, Otten C, Faurobert E, Rudolph F, Zhu Y, Boulday G, et al. Regulation of β 1 Integrin-Klf2-Mediated Angiogenesis by CCM Proteins. *Dev Cell*. 2015;32(2).
 20. Zhou Z, Rawnsley DR, Goddard LM, Pan W, Cao X-J, Jakus Z, et al. The Cerebral Cavernous Malformation Pathway Controls Cardiac Development via Regulation of Endocardial MEKK3 Signaling and KLF Expression. *Dev Cell* [Internet]. 2015 Jan 26 [cited 2017 Sep 6];32(2):168–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25625206>
 21. Cuttano R, Rudini N, Bravi L, Corada M, Giampietro C, Papa E, et al. KLF4 is a key determinant in the development and progression of cerebral cavernous malformations. *EMBO Mol Med* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2017 Mar 27];8(1):6–24. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26612856>
22. Tang AT, Choi JP, Kotzin JJ, Yang Y, Hong CC, Hobson N, et al. Endothelial TLR4 and the microbiome drive cerebral cavernous malformations. *Nature* [Internet]. 2017 May 10 [cited 2017 May 23];545(7654):305–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28489816>
 23. Whitehead KJ, Chan AC, Navankasattusas S, Koh W, London NR, Ling J, et al. The cerebral cavernous malformation signaling pathway promotes vascular integrity via Rho GTPases. *Nat Med* [Internet]. 2009;15(2):177–84. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19151728
 24. Borikova AL, Dibble CF, Sciaky N, Welch CM, Abell AN, Bencharit S, et al. Rho kinase inhibition rescues the endothelial cell cerebral cavernous malformation phenotype. *J Biol Chem* [Internet]. 2010;285(16):11760–4. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20181950
 25. Stockton RA, Shenkar R, Awad IA, Ginsberg MH. Cerebral cavernous malformations proteins inhibit Rho kinase to stabilize vascular integrity. *J Exp Med* [Internet]. 2010;207(4):881–96. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20308363
 26. Lisowska J, Rödel CJ, Manet S, Miroshnikova YA, Boyault C, Planus E, et al. The CCM1–CCM2 complex controls complementary functions of ROCK1 and ROCK2 that are required for endothelial integrity. *J Cell Sci* [Internet]. 2018 Aug 1 [cited 2018 Oct 9];131(15):jcs216093. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30030370>
 27. McDonald DA, Shi C, Shenkar R, Stockton RA, Liu F, Ginsberg MH, et al. Fasudil decreases lesion burden in a murine model of cerebral cavernous malformation disease. *Stroke* [Internet]. 2011/10/29. 2012;43(2):571–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22034008>
 28. Shenkar R, Shi C, Austin C, Moore T, Lightle R, Cao Y, et al. RhoA Kinase Inhibition With Fasudil Versus Simvastatin in Murine Models of Cerebral Cavernous Malformations. *Stroke* [Internet]. 2017 Jan [cited 2016 Dec 31];48(1):187–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27879448>
 29. Polster SP, Stadnik A, Akers AL, Cao Y, Christoforidis GA, Fam MD, et al. Atorvastatin Treatment of Cavernous Angiomas with Symptomatic Hemorrhage Exploratory Proof of Concept (AT CASH EPOC) Trial. *Neurosurgery* [Internet]. 2019 [cited 2020 Apr 24];85(6):843–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30476251>
 30. Paez-Ribes M, González-Gualda E, Doherty GJ, Muñoz-Espín D. Targeting senescent cells in translational medicine. *EMBO Mol Med* [Internet]. 2019 Dec [cited 2020 Jun 30];11(12). Available from: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/31746100/>
 31. Campisi J. Aging, Cellular Senescence, and Cancer. *Annu Rev Physiol* [Internet]. 2013

- Feb 10 [cited 2020 Jun 30];75(1):685–705. Available from: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/23140366/>
32. Zawistowski JS, Stalheim L, Uhlik MT, Abell AN, Ancrile BB, Johnson GL, et al. CCM1 and CCM2 protein interactions in cell signaling: implications for cerebral cavernous malformations pathogenesis. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2005;14(17):2521–31. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16037064
 33. Faurobert E, Rome C, Lisowska J, Manet-Dupé S, Boulday G, Malbouyres M, et al. CCM1-ICAP-1 complex controls β 1 integrin-dependent endothelial contractility and fibronectin remodeling. *J Cell Biol* [Internet]. 2013/08/07. 2013;202(3):545–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23918940>
 34. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Stat Soc Ser B*. 1995 Jan;57(1):289–300.
 35. Casella G, Munk R, Kim KM, Piao Y, De S, Abdelmohsen K, et al. Transcriptome signature of cellular senescence. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2019 Oct 15 [cited 2019 Nov 7]; Available from: <https://academic.oup.com/nar/advance-article/doi/10.1093/nar/gkz879/5587628>
 36. De Cecco M, Ito T, Petrashen AP, Elias AE, Skvir NJ, Criscione SW, et al. L1 drives IFN in senescent cells and promotes age-associated inflammation. *Nature* [Internet]. 2019 Feb 7 [cited 2020 Jun 30];566(7742):73–8. Available from: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.insb.bib.cnrs.fr/30728521/>
 37. Matjusaitis M, Chin G, Sarnoski EA, Stolzing A. Biomarkers to identify and isolate senescent cells [Internet]. Vol. 29, *Ageing Research Reviews*. Elsevier Ireland Ltd; 2016 [cited 2020 Jun 30]. p. 1–12. Available from: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.insb.bib.cnrs.fr/27212009/>
 38. Faget D V., Ren Q, Stewart SA. Unmasking senescence: context-dependent effects of SASP in cancer [Internet]. Vol. 19, *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group; 2019 [cited 2020 Jun 30]. p. 439–53. Available from: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/31235879/>
 39. Coppé J-P, Desprez P-Y, Krtolica A, Campisi J. The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annu Rev Pathol Mech Dis* [Internet]. 2010 Jan [cited 2019 Jan 5];5(1):99–118. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20078217>
 40. Lampugnani MG, Orsenigo F, Rudini N, Maddaluno L, Boulday G, Chapon F, et al. CCM1 regulates vascular-lumen organization by inducing endothelial polarity. *J Cell Sci* [Internet]. 2010;123(Pt 7):1073–80. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20332120
 41. Koskimäki J, Polster SP, Li Y, Romanos S, Srinath A, Zhang D, et al. Common transcriptome, plasma molecules, and imaging signatures in the aging brain and a Mendelian neurovascular disease, cerebral cavernous malformation. *GeroScience* [Internet]. 2020 Jun 17 [cited 2020 Jun 30]; Available from: <https://pubmed-ncbi-nlm->

nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/32556941/

42. Rhinn M, Ritschka B, Keyes WM. Cellular senescence in development, regeneration and disease. *Dev* [Internet]. 2019 [cited 2020 Jul 1];146(20). Available from: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/31575608/>
43. Cheon SY, Kim H, Rubinsztein DC, Lee JE. Autophagy, cellular aging and age-related human diseases [Internet]. Vol. 28, *Experimental Neurobiology*. Korean Society for Neurodegenerative Disease; 2019 [cited 2020 Jul 1]. p. 643–57. Available from: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.insb.bib.cnrs.fr/31902153/>
44. Salazar G. NADPH oxidases and mitochondria in vascular senescence [Internet]. Vol. 19, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2018 [cited 2020 Jul 1]. Available from: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.insb.bib.cnrs.fr/29710840/>
45. Freund A, Patil CK, Campisi J. p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *EMBO J* [Internet]. 2011 Apr 20 [cited 2020 Jul 1];30(8):1536–48. Available from: <http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1038/emboj.2011.69>
46. Yuedi D, Houbao L, Pinxiang L, Hui W, Min T, Dexiang Z. KLF2 induces the senescence of pancreatic cancer cells by cooperating with FOXO4 to upregulate p21. *Exp Cell Res* [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2020 Jun 26];388(1). Available from: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/31866399/>
47. Xu Q, Liu M, Zhang J, Xue L, Zhang G, Hu C, et al. Overexpression of KLF4 promotes cell senescence through microRNA-203-survivin-p21 pathway. *Oncotarget* [Internet]. 2016 [cited 2020 Jun 26];7(37):60290–302. Available from: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/27531889/>
48. Balistreri CR, Ruvolo G, Lio D, Madonna R. Toll-like receptor-4 signaling pathway in aorta aging and diseases: “its double nature” [Internet]. Vol. 110, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. Academic Press; 2017 [cited 2020 Jul 1]. p. 38–53. Available from: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/28668304/>
49. Schwitalla S, Fingerle AA, Cammareri P, Nebelsiek T, Göktuna SI, Ziegler PK, et al. Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties. *Cell*. 2013 Jan 7;152(1–2):25–38.
50. Eyre R, Alférez DG, Santiago-Gómez A, Spence K, McConnell JC, Hart C, et al. Microenvironmental IL1 β promotes breast cancer metastatic colonisation in the bone via activation of Wnt signalling. *Nat Commun* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2020 Jun 26];10(1). Available from: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/31676788/>
51. Guerrero A, Iglesias C, Raguz S, Florida E, Gil J, Pombo CM, et al. The cerebral cavernous malformation 3 gene is necessary for senescence induction. *Aging Cell* [Internet]. 2015 Apr 1 [cited 2020 Jul 1];14(2):274–83. Available from: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/25655101/>
52. Boulday G, Rudini N, Maddaluno L, Blécon A, Arnould M, Gaudric A, et al. Developmental timing of CCM2 loss influences cerebral cavernous malformations in mice. *J Exp Med* [Internet]. 2011 Aug 29 [cited 2020 Jul 1];208(9):1835–47. Available

from: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/21859843/>

53. Li J, Zhao Y, Coleman P, Chen J, Ting KK, Choi JP, et al. Low fluid shear stress conditions contribute to activation of cerebral cavernous malformation signalling pathways. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* [Internet]. 2019 Nov 29 [cited 2019 Aug 27];1865(11):165519. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31369819>
54. Vaeyens MM, Jorge-Peñas A, Barrasa-Fano J, Steuwe C, Heck T, Carmeliet P, et al. Matrix deformations around angiogenic sprouts correlate to sprout dynamics and suggest pulling activity. *Angiogenesis*. 2020;
55. Finch-Edmondson M, Sudol M. Framework to function: Mechanosensitive regulators of gene transcription [Internet]. Vol. 21, *Cellular and Molecular Biology Letters*. BioMed Central Ltd.; 2016 [cited 2020 Jul 1]. Available from: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/28536630/>
56. Tanaka T, Nishimura D, Wu R-C, Amano M, Iso T, Kedes L, et al. Nuclear Rho kinase, ROCK2, targets p300 acetyltransferase. *J Biol Chem* [Internet]. 2006 Jun 2 [cited 2019 Jan 5];281(22):15320–9. Available from: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M510954200>
57. Varet H, Brillet-Guéguen L, Coppée JY, Dillies MA. SARTools: A DESeq2- and edgeR-based R pipeline for comprehensive differential analysis of RNA-Seq data. *PLoS One* [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2020 Jul 2];11(6). Available from: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/27280887/>
58. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* [Internet]. 2014 Dec 5 [cited 2020 Jul 2];15(12). Available from: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.insb.bib.cnrs.fr/25516281/>
59. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2005 Oct 25 [cited 2020 Jul 2];102(43):15545–50. Available from: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/16199517/>
60. Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* [Internet]. 2004 Mar [cited 2016 Apr 29];26(6):509–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15127793>
61. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* [Internet]. 2002 Jun 18 [cited 2016 Apr 29];3(7):RESEARCH0034. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12184808>
62. Sharma VP, Entenberg D, Condeelis J. High-resolution live-cell imaging and time-lapse microscopy of invadopodium dynamics and tracking analysis. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2013 [cited 2020 Jul 2];1046:343–57. Available from: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/23868599/>

63. Ranga A, Gobaa S, Okawa Y, Mosiewicz K, Negro A, Lutolf MP. 3D niche microarrays for systems-level analyses of cell fate. *Nat Commun* [Internet]. 2014 Jul 14 [cited 2020 Jul 6];5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25027775/>
64. Lutolf MP, Lauer-Fields JL, Schmoekel HG, Metters AT, Weber FE, Fields GB, et al. Synthetic matrix metalloproteinase-sensitive hydrogels for the conduction of tissue regeneration: Engineering cell-invasion characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2003 Apr 29 [cited 2020 Jul 6];100(9):5413–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12686696/>

IV. Discussion & perspectives

1. La relation du modèle CCM à la mécanotransduction

Chez l'Homme, la maladie CCM est caractérisée par la formation de lésions vasculaires cérébrales due à la mutation perte de fonction des gènes codant pour les protéines CCM1-3. Ces protéines forment un complexe qui joue un rôle de plateforme moléculaire pour réguler l'activité et la localisation de partenaires protéiques nécessaires au maintien de l'homéostasie endothéliale.

Un rôle causal de la mécanique cellulaire dans cette pathologie n'est pas encore largement reconnu. Cependant, des études menées sur le modèle CCM montrent la place majeure des voies de signalisations mécano-sensibles responsables de la genèse et de la maturation des lésions CCM. Le Fasudil, inhibiteur de la voie RhoA-ROCK, bloque l'initiation et l'expansion des lésions dans les modèles murins de CCM (Mc Donald DM et al., 2012) et la déplétion de ROCK1, chez le poisson-zèbre, restaure la formation du cœur (Lisowska J et al. et al., 2018).

Au niveau moléculaire, le complexe CCM régule l'homéostasie tensionnelle et l'état de contractilité de la cellule endothéliale car il coordonne l'activité des deux isoformes de la kinase ROCK (ROCK1 et ROCK2) dépendante de RhoA. Les études précédentes au laboratoire ont montré que ces deux isoformes ont des fonctions non redondantes et complémentaires sur l'organisation du cytosquelette d'actomyosine. Le complexe CCM localise ROCK2 aux jonctions dépendantes de la VE-cadhérine pour les stabiliser. Par ailleurs, il inhibe l'activité de ROCK1 pour limiter l'adhésion cellule-matrice dépendante de l'intégrine $\beta 1$ et diminue la contractilité intracellulaire. Il est donc probable que la formation des lésions CCM soit consécutive à un défaut de coordination entre les forces cellule-cellule et les forces cellule-matrice.

De même, des facteurs mécaniques du microenvironnement de la cellule endothéliale sont impliqués dans la formation des lésions. Par exemple, on sait que les forces de cisaillement générées par le flux sanguin sont fortement impliquées dans la formation des lésions CCM. Les cellules endothéliales déplétées pour CCM ont la particularité d'être insensibles aux forces hémodynamiques et sont incapables de s'adapter au flux (Macek Jilkova Z et al., 2014). Ainsi, un flux discontinu augmente la fréquence d'apparition des lésions dans le modèle du poisson-zèbre et favorise la mise en place d'un nouveau programme d'expression génique dans les cellules endothéliales *in vitro* (Rödel CJ et al., 2019 ; Li S et al., 2019). D'ailleurs le rôle des facteurs de transcription mécanosensibles KLF2 et KLF4 pour la formation des lésions CCM confirme l'impact majeur des forces hémodynamiques pour l'initiation de la formation des lésions (Zhou Z et al., 2016 ; Renz M et al., 2015). Enfin, on sait que les cellules endothéliales, déplétées pour CCM, effectuent un remodelage protéolytique et un remodelage par fibrillogenèse de la MEC en association avec un dépôt aberrant de protéines matricielles (collagène III et fibronectine) qui vient rigidifier le milieu et favoriser l'émergence du phénotype CCM (Faurobert E et al., 2013 ; Fujimura M et al., 2007).

2. Découverte d'un SASP mécanosensible

Dans cette étude, j'ai justement cherché à savoir dans quelle mesure la dérégulation de ROCK1 et ROCK2 pouvait, au-delà de son effet sur l'architecture de l'endothélium, avoir un impact sur l'identité de la cellule endothéliale ayant perdu le complexe CCM1/2. J'ai ainsi pu mettre en évidence l'entrée en sénescence associée à un phénotype sécrétoire (SASP) de la cellule endothéliale mutée et j'ai

montré que ce SASP dépend des défauts mécaniques de la cellule. Rétrospectivement, ce SASP mécanosensible permet d'unifier, dans un même modèle, l'ensemble des observations faites dans différents modèles CCM *in vivo* et *in vitro*. En effet, il met en cohérence la surproduction de ROS (Retta S et al., 2010), les défauts de remodelage de la MEC (Faurobert E et al., 2013), la sécrétion de MMPs (Fujimura M et al., 2007), le recrutement de cellules immunitaires (Shi C et al., 2009) et l'attraction des cellules endothéliales sauvages par les mutantes dans les lésions CCM *in vivo* (Detter AM et al., 2018 ; Malinverno M et al., 2019).

Cependant, la découverte d'une entrée en sénescence par les cellules déficientes en CCM2 peut paraître contradictoire avec l'augmentation de prolifération des cellules déficientes en CCM3 décrite dans le modèle murin confetti. En effet, deux études récentes rapportent une prolifération clonale des cellules KO CCM3 qui serait responsable de l'initiation de la formation des lésions. Il n'y a, pour l'instant, aucune d'étude équivalente sur les modèles murins CCM2 et CCM1. En accord avec ces résultats *in vivo*, nous n'avons pas observé de ralentissement de prolifération *in vitro* lorsque CCM3 est perdue contrairement à CCM2 ou CCM1 (résultats non montrés).

De manière intéressante, la mutation de *ccm3* est à l'origine de lésions dès l'enfance, à la différence de la mutation de *ccm1* ou de *ccm2* qui est responsable de l'apparition de lésions à l'âge adulte (après 30-40 ans). Bien que les 3 mutations génèrent des lésions CCM morphologiquement similaires, les études menées sur les différents modèles mutants *in vivo* et *in vitro* démontrent que la protéine CCM3, qui ne s'associe que partiellement avec le complexe CCM1/2, contrôle des voies de signalisation distinctes (Koskimäki J et al., 2019). Il est possible que des mécanismes opposés soient à l'origine de la formation des lésions CCM1/2 et CCM3 ; une prolifération accrue dans le cas de CCM3 qui apparaît dès l'enfance, une entrée progressive en SASP dans le cas de CCM1/2 qui s'exprime en milieu de vie.

Pourtant dans les deux cas, on observe un recrutement de cellules sauvages par chimio-attraction par les cellules mutantes et ce recrutement est responsable de l'expansion de la lésion. Ceci suggère qu'un SASP pourrait avoir lieu chez le mutant CCM3. Or, Malinverno et al décrivent que les cellules endothéliales déficientes en CCM3 effectuent une transition de type endoMT et sont reprogrammées en EPC *in vivo*. En fait, le phénomène SASP est dynamique avec des cellules sénescents capables de rentrer à nouveau dans le cycle cellulaire tout en gardant leur comportement sécrétoire. Par exemple, une telle reprogrammation de cellules sénescents vers un état progéniteur peut être source de cellules souches cancéreuses (Milanovic M et al., 2018). Il est intéressant de noter que cette réversion est régulée par l'expression d'un cocktail de facteurs dont KLF2 et KLF4 font partie (cocktail Yamanaka) (Lee et Schmitt, 2019).

Considérer cette dynamique de réversion de la sénescence pourrait peut-être réconcilier les différents modèles CCM. Il serait intéressant d'étudier la chronologie des comportements cellulaires selon les modèles CCM depuis une sénescence vers un état souche/ progéniteur et voir si celle-ci est corrélée avec la cinétique d'apparition des lésions CCM chez la souris.

Ces travaux ouvrent la voie vers des tests de drogues qui ciblent le SASP pour bloquer la formation des lésions CCM. L'utilisation de substances sénolytiques permet d'éliminer les cellules sénescents en induisant leur apoptose ou en bloquant le SASP. Bien que ces drogues soient efficaces, elles restent toxiques pour l'organisme, la sénescence faisant partie des mécanismes physiologiques pour la régénération des tissus. Pourtant, plusieurs composés sénolytiques dérivés de produits naturels et

ayant l'avantage d'être moins toxiques ont été découverts. Parmi ces composés, on distingue la fisétin (un dérivé naturel de la flavone), la quercétin, le piperlongumin et EF24 (analogue de la curcumine) (Zhu Y et al., 2017 ; Paez-Ribes M et al., 2019; Li W et al., 2019). Il serait intéressant de tester ces substances afin de voir si elles bloquent la formation des lésions CCM *in vivo*.

3. Rôle des ROCKs dans l'avènement du SASP

Ces travaux décrivent des actions distinctes et complémentaires des kinases ROCK1 et ROCK2 pour l'avènement du SASP. L'utilisation de la blebbistatine nous a permis de montrer que ces effets sont reliés à la mécanique de la cellule par sa capacité à générer des forces notamment au niveau des sites adhésifs cellule-cellule et cellule-matrice.

3.1 Rôle de ROCK2 sur le programme transcriptomique pour l'entrée en sénescence

L'analyse RNA-seq révèle que ROCK2 réprime l'expression de nombreux gènes impliqués dans le maintien des télomères, le contrôle du cycle cellulaire et la réponse aux dommages à l'ADN, entraînant ainsi l'entrée en sénescence des cellules déplétées en CCM2. La comparaison des profils d'expression génique des cellules déplétées en CCM2 ou en ROCK2 montre que, lorsque CCM2 est perdue, ROCK2 acquiert un gain de fonction sur l'expression génique vraisemblablement suite à sa translocation au noyau. En effet, il a été montré que ROCK2 peut se localiser au noyau (Tanaka T et al., 2006) où il est possible qu'il régule l'activité de remodeleurs chromatiniens tels que EZH2 ou p300 HAT.

Nos résultats transcriptomiques ne révèlent pas de surexpression des déacétylases (HDAC) ou méthyltransférases connues pour favoriser l'enrichissement de marques épigénétiques répressives. Cependant, nous retrouvons une sous-expression, dépendante de ROCK2, de la méthyltransférase EZH2, une protéine du polycomb. Cette inhibition pourrait être responsable de la surexpression de KLF2 et de p21^{CIP1} lors de la perte de CCM2 (Taniguchi H et al., 2012 ; Béguelin W et al., 2017). D'autre part, il a été montré que ROCK2 interagit avec et phosphoryle le remodeleur chromatинien p300 HAT, une acétyltransférase, pour l'activer dans le compartiment nucléaire (Tanaka T et al., 2006). L'activation de p300 est associée à l'entrée des cellules en sénescence par l'induction d'un arrêt du cycle (Sen P et al., 2019) et stimule l'expression de facteurs SASP lorsque p300 est associé à C/EBP- β (Salotti J et Johnson PF, 2019). Dans la continuité de ces travaux de thèse, il serait intéressant de décrire la dynamique du transport nucléaire de ROCK2 et d'étudier l'impact de cette dynamique sur l'activité des remodeleurs chromatiniens lors de la perte de CCM2.

Enfin, la voie p53 est une autre piste intéressante pour la mise en place de la sénescence lors de la perte de CCM2. Nos analyses GSEA révèlent une signature génique associée à l'activation de la voie p53 lors de la perte de CCM2 qui n'est plus retrouvée lorsque ROCK2 est additionnellement déplétée. L'activation de cette voie p53 se traduit par l'inactivation de nombreux gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (Engeland K, 2018). Or l'activation de ce facteur est dépendant de son état de phosphorylation (Kruse JP et Gu W, 2009). Il serait intéressant de vérifier le rôle de ROCK2 sur la phosphorylation de p53. Ces résultats permettraient de comprendre comment ROCK2 régule, en amont, le programme transcriptomique pour l'entrée en sénescence.

3.2. Rôle de ROCK2 sur la chimio-attraction

Nous avons mis en évidence le rôle spécifique de ROCK2 dans la fonction chimio-attractante des cellules endothéliales mutantes pour attirer les cellules endothéliales naïves et les cellules immunitaires. Pour comprendre de quelle manière ROCK2 agit sur l'efficacité du SASP, il serait intéressant d'étudier la nature du sécrétome SASP lors de la perte de ROCK1 ou de ROCK2 dans les cellules déplétées pour CCM2. Cette étude nous permettrait de mettre en évidence les facteurs SASP sécrétés et responsable de la propagation des lésions CCM. De cette manière, l'utilisation d'anticorps bloquant contre les facteurs SASP, responsables des comportements invasifs dans les lésions, pourrait être envisagée pour un futur traitement thérapeutique chez les patients atteints de la maladie CCM. De manière plus générale, nous pourrions proposer d'étudier l'action des kinases ROCK sur l'activité endoplasmique, lysosomale et l'activité des transports vésiculaires nécessaire à la sécrétion des cytokines et autres facteurs chimio-attractants associés au SASP. La sécrétion des cytokines pro-inflammatoire est stimulée par la voie LPS-TLR4 pour favoriser le recrutement du système immunitaire lors d'une infection bactérienne (Song J et al., 2007). Dans le modèle CCM, le récepteur TLR4 est surexprimé et l'activation de la voie LPS-TLR4 augmente la fréquence de formation des lésions CCM chez les souris mutante *Krit1* et *Ccm2* (Tang AT et al., 2017). De manière intéressante, la surexpression de ROCK1 active la voie LPS-TLR4 dans les cellules épithéliales et l'utilisation de l'inhibiteur Y-27632 est suffisante pour limiter l'activation de cette voie favorable à l'inflammation des tissus (Gong J et al., 2018). Il serait intéressant de comprendre le rôle des kinases ROCK1 et de ROCK2 dans l'activation de la voie LPS-TLR4 pour la sécrétion des cytokines associées au SASP lors de la perte de CCM2.

3.3. Rôle de ROCK1 sur le remodelage protéolytique de la MEC

Nous décrivons le rôle spécifique de ROCK1 pour le remodelage protéolytique de la MEC. La déplétion additionnelle de ROCK1 limite la dégradation matricielle dépendante de la sécrétion de MMPs des cellules endothéliales déplétées pour CCM2. A l'inverse, la déplétion additionnelle de ROCK2 n'a pas d'effet. L'étude des figures de dégradation révèle que les protéases sont sécrétées au niveau des AFs de la cellule. Or, ROCK1 en stimulant la formation des fibres de stress d'actomyosine permet la maturation des AFs plus rapide lors de la perte de CCM2 (Lisowska J et al., 2018). Dans la continuité de ces travaux de thèse, il serait intéressant de décrire les partenaires protéiques mécanosensibles recrutés aux AFs et responsables de la sécrétion des protéases par les cellules endothéliales déplétées en CCM2. Une analyse protéomique des partenaires de ROCK1 réalisée au laboratoire a montré que ROCK1 interagit avec la clathrine et NECAP2 (résultats non publiés). NECAP2 permet le recyclage rapide des protéines de surface au travers des endosomes précoces pour leur ré-adressage à la membrane plasmique. Il assure le recrutement d'AP1 sur ces vésicules à clathrine (Chamberland JP et al., 2016). Il est possible que la suractivation de ROCK1 modifie le recyclage de MT1-MMP pour augmenter son expression de surface cellulaire et favoriser la sécrétion des MMP-2 et -9.

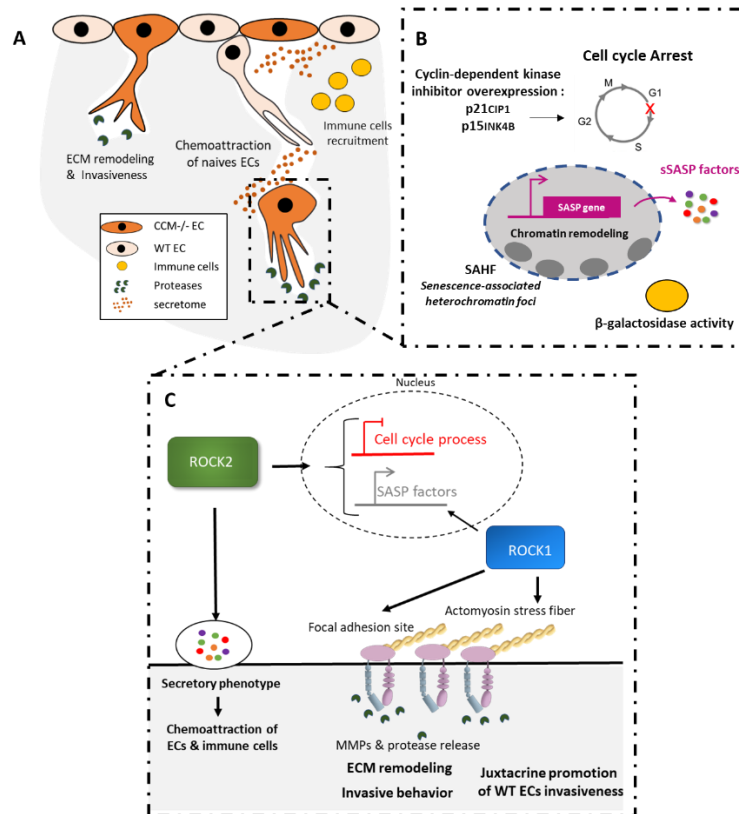


Figure 52 : Un SASP mécanosensible associé à de nouvelles fonctions cellulaires lors de la perte de CCM2 dans les CE. **(A)** Gain de nouvelles fonctions cellulaires lors de la perte de CCM2 dans les CE. Les cellules déplétées pour CCM2 sont capables de remodeler et d’envahir la MEC par une dégradation protéolytique dépendante de la sécrétion de MMPs. Ce remodelage de la MEC permet de stimuler l’invasion de CE naïves, un phénomène que l’on peut définir comme une attraction juxtacrine. De plus, l’activité sécrétoire observée chez les cellules déplétées pour CCM2 promeut l’invasion des CE naïves par chémo-attraction qui en parallèle, attire et stimule la migration de cellules immunitaires. **(B)** Une reprogrammation vers une sénescence associée à un phénotype sécrétoire lors de la perte de CCM2 dans les CE. Les cellules déplétées pour CCM2 sont positives pour de nombreux marqueurs clés permettant de confirmer une entrée en sénescence. De plus, les cellules mutantes expriment de nombreux facteurs SASP solubles laissant supposer une activité sécrétoire accrues. **(C)** Les kinases ROCK1 et ROCK2 jouent des rôles distincts pour l’avènement du SASP lors de la perte de CCM2. Lors de la perte de CCM2, l’augmentation de la contractilité dépendante de l’activité de la kinase ROCK1 est responsable du remodelage matriciel qui favorise l’invasion des CE mutantes et stimule l’invasion des CE naïves par un effet juxtacrine. La kinase ROCK2 est responsable de l’activité sécrétoire des cellules mutantes qui permet la chémo-attraction des cellules immunitaires et des CE naïves. Aussi, ROCK2 est responsable de l’inhibition transcriptionnelle massive observée dans les cellules mutantes à l’origine de leur entrée en sénescence. Les kinases ROCK1 et ROCK2 affectent communément l’expression des facteurs SASP ce qui suggère qu’il existe un cross-talk entre la contractilité dépendante de ROCK1 et l’expression des gènes SASP.

3.4. Rôle de ROCK1 sur l’invasion en 3D de la MEC

Cette étude décrit aussi que ROCK1 est responsable du gain de fonction invasif des cellules endothéliales déplétées pour CCM2. Cette invasion cellulaire est favorisée par la dégradation de la matrice en association avec un déplacement par traction de la cellule grâce à la formation de protrusions (Vaeyens MM et al., 2020). La vitesse d’invasion est régulée par les remaniements du cytosquelette qui modulent la dynamique des protrusions, la force de traction des cellules ainsi que des voies de signalisation pro-invasives. En effet, l’état de contractilité de la cellule peut moduler le recrutement et la formation des complexes protéiques au niveau des AFs. Ces complexes signalétiques peuvent moduler les capacités invasives en activant des effecteurs en aval ou en activant d’autres récepteurs situés à la membrane cellulaire (Bordeleau et Reinhart-king, 2016).

La vitesse d'invasion est aussi régulée par la force de traction générée par la cellule sur sa matrice (Vaeyens MM et al., 2020). Pour vérifier si ROCK1 favorise l'invasion cellulaire en augmentant les forces de traction appliquées sur la matrice, des expériences de TFM (*traction force microscopy*) sur une matrice 3D sont en cours dans le laboratoire de Hans Van Oosterwyck avec qui nous effectuons une collaboration. Ces expériences nous permettront de mieux comprendre comment les kinases ROCKs agissent sur l'invasion des cellules endothéliales déplétées pour CCM2.

De la même manière que les vaisseaux tumoraux, les lésions CCM seraient le résultat d'une angiogenèse anarchique pour former des vaisseaux dilatés et hémorragiques. En effet, lors de la perte des protéines CCM, la voie NOTCH-DELTA est inhibée et déclenche un comportement d'invasion angiogénique (Kar S et al., 2016). Au cours de cette thèse, nous avons montré que les cellules déplétées en CCM2, en envahissant la MEC, se séparent les unes des autres et prennent un phénotype de cellule leader avec des extensions membranaires à l'avant. Nous avons montré pour la première fois que ceci dépend de l'hyperactivation de ROCK1. De manière intéressante, les cellules déplétées pour CCM2 surexpriment des marqueurs de cellules leaders, tels que CD34 (Siemerink M et al., 2012) ou VEGFR2 (résultats issus de notre analyse transcriptomique).

Ainsi, il est possible qu'une altération des voies de communication qui régissent la sélection de la cellule leader, soit responsables de la formation des lésions CCM. Notre hypothèse repose sur une altération de l'efficacité de l'inhibition latérale qui engendrerait la sélection de plusieurs cellules leader pour induire la formation de vaisseaux hémorragiques, dilatés et anarchiques. L'action sécrétoire du SASP pourrait être une source d'amplification de ces défauts de communication intercellulaire. En effet, un environnement pro-inflammatoire riche en cytokines et interleukines favorise l'émergence de cellules leader (Chen W et al., 2019)

4. Régulation par les ROCKs des voies de signalisation qui déclenchent l'entrée en sénescence lors de la perte de CCM2

Les études menées depuis une dizaine d'année, sur la biologie des protéines CCM, convergent vers un rôle majeur des voies MAPK (incluant ERK5 et p38MAPK) et TGF- β pour l'apparition des lésions CCM (Cunha S et al., 2017 ; Uhlik MT et al., 2003). Ces mêmes voies ont également été décrites pour contrôler l'entrée en sénescence (Zhang Y et al., 2017 ; Munoz-Espin D et Serrano M, 2014). La question sera maintenant de savoir comment la mécanique cellulaire régule ces voies pour l'apparition des lésions CCM. En phosphorylant leurs cibles, les ROCKs pourraient jouer sur la stabilité des intermédiaires de ces voies de signalisation, leur interaction avec d'autres partenaires ou leur localisation.

Par exemple, il est décrit que la voie RhoA/ROCK régule la voie TGF- β /Smad2/smad3 pour favoriser l'expression de p21^{CIP1} (Kamaraju AK et Roberts AB, 2004). En particulier, ROCK2 est un régulateur négatif de la voie TGF- β car il lie le récepteur TGF β RI pour favoriser son internalisation et sa dégradation lysosomale (Zhang Y et al., 2009). On sait aussi que les kinases ROCKs favorise la phosphorylation de la MAPK p38 nécessaire à la sécrétion de CXCL8 dans les cellules Caco-2 (Banerjee S et McGee DW, 2016).

5. Régulation par les ROCKs des facteurs de transcription mécanosensibles pour l'entrée en sénescence lors de la perte de CCM2

En aval de ces voies, il sera important d'étudier l'activité des facteurs de transcription actifs dans le modèle CCM et de comprendre comment la mécanique cellulaire et les ROCKs régulent leur activité. De manière frappante, tous les facteurs de transcription activés lors de la perte de CCM sont connus pour jouer un rôle au cours de la sénescence.

La surexpression des facteurs de transcription KLF2 et KLF4 est nécessaire à la formation des lésions CCM *in vivo*. Or ces facteurs activent directement l'expression des CDKI p15^{INK} et p21^{CIP1} en se liant à leur promoteur (Taniguchi H et al., 2012 ; Bjerke GA et al., 2011 ; Xu Q et al., 2016). De plus, KLF4 a été décrit comme un activateur de la voie p53 pour initier l'arrêt du cycle cellulaire (Yoon HS et al., 2003).

Dans notre modèle d'HUVEC déplétées en CCM2, nos analyses GSEA révèlent une augmentation significative de l'activité des facteurs KLF2 et KLF4 qui semble régulée par les ROCKs. Pour comprendre de quelle manière les ROCKs agissent sur l'activité des facteurs KLF2 et KLF4, j'ai étudié la répartition cytoplasme/noyau de KLF2 et de KLF4 lors de la perte de CCM2 en fonction de la présence ou non de ROCK1 ou de ROCK2. Je n'ai pas vu de différences dans leur localisation, majoritairement nucléaire, ni lors de la perte de CCM2, ni lors de la délétion additionnelle de ROCK1 ou de ROCK2. Il serait maintenant intéressant d'étudier les modifications post-traductionnelles de KLF2 et de KLF4 et le rôle des kinases ROCKs sur ces modifications. On peut aussi envisager que les ROCKs phosphorylent directement ces facteurs de transcription. Des sites potentiels de phosphorylation soit retrouvés en prédiction (Figure 52). Et de manière intéressante, ROCK2 présente des sites de phosphorylation spécifiques pour les facteurs KLF2 et KLF4. Cependant, dans la littérature, la phosphorylation des protéines KLF2 et KLF4 est associée à une limitation de leur activité transcriptionnelle ou à leur dégradation (Wang R et al., 2013 ; Kim MO et al., 2012).

Il est également possible que les ROCKs aient une action indirecte sur l'activité de ces facteurs de transcription KLF2 et KLF4. En effet, il est décrit que p300/CBP acétyle le facteur KLF4 pour stimuler son activité transcriptionnelle (Evans PM et al., 2007) et que cette phosphorylation modifie la capacité de KLF4 à agir soit comme un oncogène soit comme un suppresseur de tumeur (Jia ZM et al., 2016). Ainsi, ROCK2 pourrait moduler l'activité de KLF4 par l'intermédiaire de p300 (Tanaka T et al., 2006).

GPS Group Base Prediction System

KLF2		KLF4	
ROCK1	ROCK2	ROCK1	ROCK2
S192	S192	T33	T33
S263	S263	T96	T96
T269	T269	S177	S177
T327	T327	T316	T316
S342	S342	S421	S421
S344	S344	T427	T427
	T271	T429	T429
	T297	T485	T485
		S500	S500
		S502	S502
			S246
			T394
			T455

Figure 53 : Prédiction des sites de phosphorylation des protéines KLF2 et KLF4 par les kinases ROCK1 et ROCK2. Données issues de la base de données et site web GPS "Group Base Prediction System". Les sites phosphorylés spécifiquement par ROCK2 sont représentés en orange.

Une autre de nos hypothèses repose sur un recrutement nucléaire de co-facteurs activateurs de KLF2 ou de KLF4 qui dépendrait de l'activité des kinases ROCKs. Par exemple le complexe formé par KLF4 et ses co-facteurs Meis2 et Pbx1 stimule l'expression de p15^{INK4} en se liant à son promoteur (Bjerke GA et al., 2011). La technique de marquage de proximité par la biotine ligase BioID est actuellement développée dans le laboratoire pour étudier les partenaires nucléaires de KLF2 et de KLF4 lors de la perte de CCM2 et le rôle des kinases ROCKs pour le recrutement de ces partenaires.

Parmi ces partenaires potentiels, le facteur de transcription mécanosensible NF-kappaB est majoritairement impliqué dans la reprogrammation SASP car il dirige l'expression de nombreuses cytokines et autres molécules pro-inflammatoires. Moléculairement, la translocation de NF-kappaB et de son co-facteur AP1 est régulée par l'activation du récepteur TLR4 et des MAPK en aval. Or, dans une récente étude, il est décrit que la surexpression de ROCK1 active la voie LPS/TLR4/NF-kappaB pour favoriser l'expression de plusieurs cytokines (IL-6, IL-8, IL1 β et TNF α) (Gong J et al., 2018). Dans le modèle CCM, une augmentation de l'expression de TLR4 est observée et l'activation de ce récepteur, par le LPS, favorise l'apparition des lésions. Nos analyses GSEA montrent un enrichissement significatif des gènes cibles de ce facteur de transcription NF-kappaB et CEBP β lors de la perte de CCM2 dans les HUVECs. De manière intéressante, on sait que des drogues inhibitrices de la voie RhoA/ROCK, comme le fasudil ou le Y-27632, limite la translocation nucléaire de NF-kappaB en association avec une diminution de son activité transcriptionnelle (Rodriguez PL, et al., 2007 ; Xie X et al., 2013). Ainsi, il serait intéressant de comprendre comment les ROCKs régulent l'activité du facteur de transcription NF-kappaB qui serait responsable du SASP lors de la perte de la protéine CCM2.

Dans notre modèle, la surexpression de la majorité des facteurs SASP est dépendante autant de ROCK1 que de ROCK2. Il sera intéressant dans le futur de comprendre comment les activités de ces deux kinases s'intègrent pour aboutir à cette régulation mécanosensible des gènes du SASP. Il est possible que l'hypercontractilité du cytosquelette, dépendante de l'action de ROCK1, contrôle la translocation nucléaire de co-facteurs de transcription mécanosensibles qui lient ROCK2 pour faciliter son action sur l'expression des gènes SASP. Parmi ces facteurs de transcription, MRTF-A, YAP ou TAZ

sont des facteurs de transcription mécanosensibles dont l'adressage au noyau est régulé par l'état de polymérisation ou la contractilité du cytosquelette d'actomyosine (Aragona M et al., 2013 ; Zhao XH et al., 2007). Il a été montré que ROCK2 permet la translocation au noyau de YAP (Torrino S et al., 2019) de même que ROCK1 celle de MRTF (Blomme B et al., 2019; Meng C et al., 2018; Wang N et al., 2013). Or, ces facteurs sont associés à la sénescence cellulaire (Sakuma K et al., 2008 ; Miyajima C et al., 2019). Pour étudier les interactions possibles de ces co-facteurs avec ROCK2 et comprendre les relations entre ROCK1 et ROCK2, le marquage de proximité par la biotine ligase BioID constituera une approche clé du laboratoire pour identifier les co-facteurs de ROCK2 sensibles à l'action mécanique de ROCK1 lors de la perte de CCM2.

V. Références

- Aarts, Marieke, Athena Georgilis, Meryam Beniazza, Patrizia Beolchi, Ana Banito, Thomas Carroll, Marizela Kulisic, et al. 2017. "Coupling ShRNA Screens with Single-Cell RNA-Seq Identifies a Dual Role for MTOR in Reprogramming-Induced Senescence." *Genes & Development* 31 (20): 2085–98. <https://doi.org/10.1101/gad.297796.117>.
- Abbott, N Joan. 2002. "Astrocyte-Endothelial Interactions and Blood-Brain Barrier Permeability." *Journal of Anatomy* 200 (6): 629–38. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2002.00064.x>.
- Abbott, N Joan, Adjanie A K Patabendige, Diana E M Dolman, Siti R Yusof, and David J Begley. 2010. "Structure and Function of the Blood-Brain Barrier." *Neurobiology of Disease* 37 (1): 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.030>.
- Abdeen, Amr A, Jared B Weiss, Junmin Lee, and Kristopher A Kilian. 2014. "Matrix Composition and Mechanics Direct Proangiogenic Signaling from Mesenchymal Stem Cells." *Tissue Engineering. Part A* 20 (19–20): 2737–45. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2013.0661>.
- Abe, Tatsuya, M Morishige, H Ooba, T Kamida, M Fujiki, H Kobayashi, T Sakoda, and Y Kimba. 2009. "The Association between High VEGF Levels and Multiple Probable Punctuate Cavernous Malformations." *Acta Neurochirurgica* 151 (7): 855–59. <https://doi.org/10.1007/s00701-009-0410-6>.
- Acosta, Juan Carlos, Ana Banito, Torsten Wuestefeld, Athena Georgilis, Peggy Janich, Jennifer P Morton, Dimitris Athineos, et al. 2013. "A Complex Secretory Program Orchestrated by the Inflammasome Controls Paracrine Senescence." *Nature Cell Biology* 15 (8): 978–90. <https://doi.org/10.1038/ncb2784>.
- Agarwal, Shailesh, Shawn Loder, David Cholok, Joshua Peterson, John Li, David Fireman, Christopher Breuler, et al. 2016. "Local and Circulating Endothelial Cells Undergo Endothelial to Mesenchymal Transition (EndMT) in Response to Musculoskeletal Injury." *Scientific Reports* 6 (September): 32514. <https://doi.org/10.1038/srep32514>.
- Aird, William C. 2007. "Phenotypic Heterogeneity of the Endothelium: II. Representative Vascular Beds." *Circulation Research* 100 (2): 174–90. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000255690.03436.ae>.
- Akers, Amy L., Eric Johnson, Gary K. Steinberg, Joseph M. Zabramski, and Douglas A. Marchuk. 2009. "Biallelic Somatic and Germline Mutations in Cerebral Cavernous Malformations (CCMs): Evidence for a Two-Hit Mechanism of CCM Pathogenesis." *Human Molecular Genetics* 18 (5): 919–30. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn430>.
- Alford, Andrea I, and Kurt D Hankenson. 2006. "Matricellular Proteins: Extracellular Modulators of Bone Development, Remodeling, and Regeneration." *Bone* 38 (6): 749–57. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2005.11.017>.
- Alspach, Elise, Yujie Fu, and Sheila A Stewart. 2013. "Senescence and the Pro-Tumorigenic Stroma." *Critical Reviews in Oncogenesis* 18 (6): 549–58. <https://doi.org/10.1615/critrevoncog.2014010630>.
- Amado-Azevedo, Joana, Erik T Valent, and Geerten P Van Nieuw Amerongen. 2014. "Regulation of the Endothelial Barrier Function: A Filum Granum of Cellular Forces, Rho-GTPase Signaling and Microenvironment." *Cell and Tissue Research* 355 (3): 557–76. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1828-6>.

- Amano, M, M Ito, K Kimura, Y Fukata, K Chihara, T Nakano, Y Matsuura, and K Kaibuchi. 1996. "Phosphorylation and Activation of Myosin by Rho-Associated Kinase (Rho-Kinase)." *The Journal of Biological Chemistry* 271 (34): 20246–49. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.34.20246>.
- Ancrile, Brooke, Kian-Huat Lim, and Christopher M Counter. 2007. "Oncogenic Ras-Induced Secretion of IL6 Is Required for Tumorigenesis." *Genes & Development* 21 (14): 1714–19. <https://doi.org/10.1101/gad.1549407>.
- Aragona, Mariaceleste, Tito Panciera, Andrea Manfrin, Stefano Giullitti, Federica Michielin, Nicola Elvassore, Sirio Dupont, and Stefano Piccolo. 2013. "A Mechanical Checkpoint Controls Multicellular Growth through YAP/TAZ Regulation by Actin-Processing Factors." *Cell* 154 (5): 1047–59. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.042>.
- Armstrong, Ehrin J, and Joyce Bischoff. 2004. "Heart Valve Development: Endothelial Cell Signaling and Differentiation." *Circulation Research* 95 (5): 459–70. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000141146.95728.da>.
- Armulik, Annika, Alexandra Abramsson, and Christer Betsholtz. 2005. "Endothelial/Pericyte Interactions." *Circulation Research* 97 (6): 512–23. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000182903.16652.d7>.
- Asahara, T, H Masuda, T Takahashi, C Kalka, C Pastore, M Silver, M Kearne, M Magner, and J M Isner. 1999. "Bone Marrow Origin of Endothelial Progenitor Cells Responsible for Postnatal Vasculogenesis in Physiological and Pathological Neovascularization." *Circulation Research* 85 (3): 221–28. <https://doi.org/10.1161/01.res.85.3.221>.
- Asahara, T, T Murohara, A Sullivan, M Silver, R van der Zee, T Li, B Witzenbichler, G Schatteman, and J M Isner. 1997. "Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis." *Science (New York, N.Y.)* 275 (5302): 964–67. <https://doi.org/10.1126/science.275.5302.964>.
- Astrof, Sophie, and Richard O Hynes. 2009. "Fibronectins in Vascular Morphogenesis." *Angiogenesis* 12 (2): 165–75. <https://doi.org/10.1007/s10456-009-9136-6>.
- Attieh, Youmna, Andrew G Clark, Carina Grass, Sophie Richon, Marc Pocard, Pascale Mariani, Nadia Elkhatib, Timo Betz, Basile Gurchenkov, and Danijela Matic Vignjevic. 2017. "Cancer-Associated Fibroblasts Lead Tumor Invasion through Integrin-B3-Dependent Fibronectin Assembly." *The Journal of Cell Biology* 216 (11): 3509–20. <https://doi.org/10.1083/jcb.201702033>.
- Austad, Steven N, and Jessica M Hoffman. 2018. "Is Antagonistic Pleiotropy Ubiquitous in Aging Biology?" *Evolution, Medicine, and Public Health* 2018 (1): 287–94. <https://doi.org/10.1093/emph/eoy033>.
- Avvisato, Christopher L, Xiang Yang, Salim Shah, Becky Hoxter, Weiqun Li, Richard Gaynor, Richard Pestell, Aydin Tozeren, and Stephen W Byers. 2007. "Mechanical Force Modulates Global Gene Expression and Beta-Catenin Signaling in Colon Cancer Cells." *Journal of Cell Science* 120 (Pt 15): 2672–82. <https://doi.org/10.1242/jcs.03476>.
- Azzi, Sandy, and Julie Gavard. 2014. "Blood Vessels in Cancer: Can't Stop Whispering." *Medecine/Sciences* 30 (4): 408–14. <https://doi.org/10.1051/medsci/20143004015>.
- Banerjee, Sayantan, and Dennis W McGee. 2016. "ROCK Activity Affects IL-1-Induced Signaling Possibly through MKK4 and P38 MAPK in Caco-2 Cells." *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal* 52 (8): 878–84. <https://doi.org/10.1007/s11626-016-0050-0>.
- Baratchi, Sara, Markus Knoerzer, Khashayar Khoshmanesh, Arnan Mitchell, and Peter McIntyre. 2017. "Shear Stress Regulates TRPV4 Channel Clustering and Translocation from Adherens Junctions to the Basal Membrane." *Scientific Reports* 7 (1): 15942. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16276-7>.

- Barichello, T, A Collodel, R Hasbun, and R Morales. 2019. "An Overview of the Blood-Brain Barrier." *Neuromethods Humana Press, New York, NY* 142.
- Barinda, Agian Jeffilano, Koji Ikeda, Dhite Bayu Nugroho, Donytra Arby Wardhana, Naoto Sasaki, Sakiko Honda, Ryota Urata, Satoaki Matoba, Ken-Ichi Hirata, and Noriaki Emoto. 2020. "Endothelial Progeria Induces Adipose Tissue Senescence and Impairs Insulin Sensitivity through Senescence Associated Secretory Phenotype." *Nature Communications* 11 (1): 481. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14387-w>.
- Barry, Adrienne K, Ning Wang, and Deborah E Leckband. 2015. "Local VE-Cadherin Mechanotransduction Triggers Long-Ranged Remodeling of Endothelial Monolayers." *Journal of Cell Science* 128 (7): 1341–51. <https://doi.org/10.1242/jcs.159954>.
- Bartkova, Jirina, Nousin Rezaei, Michalis Liontos, Panagiotis Karakaidos, Dimitris Kletsas, Natalia Issaeva, Leandros-Vassilios F Vassiliou, et al. 2006. "Oncogene-Induced Senescence Is Part of the Tumorigenesis Barrier Imposed by DNA Damage Checkpoints." *Nature* 444 (7119): 633–37. <https://doi.org/10.1038/nature05268>.
- Bass, Mark D, and Martin J Humphries. 2002. "Cytoplasmic Interactions of Syndecan-4 Orchestrate Adhesion Receptor and Growth Factor Receptor Signalling." *The Biochemical Journal* 368 (Pt 1): 1–15. <https://doi.org/10.1042/BJ20021228>.
- Bautch, Victoria L. 2011. "Stem Cells and the Vasculature." *Nature Medicine* 17 (11): 1437–43. <https://doi.org/10.1038/nm.2539>.
- Bazzoni, Gianfranco, and Elisabetta Dejana. 2004. "Endothelial Cell-to-Cell Junctions: Molecular Organization and Role in Vascular Homeostasis." *Physiological Reviews* 84 (3): 869–901. <https://doi.org/10.1152/physrev.00035.2003>.
- Beamish, Jeffrey A, Ping He, Kandice Kottke-Marchant, and Roger E Marchant. 2010. "Molecular Regulation of Contractile Smooth Muscle Cell Phenotype: Implications for Vascular Tissue Engineering." *Tissue Engineering. Part B, Reviews* 16 (5): 467–91. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2009.0630>.
- Beauséjour, Christian M, Ana Krtolica, Francesco Galimi, Masashi Narita, Scott W Lowe, Paul Yaswen, and Judith Campisi. 2003. "Reversal of Human Cellular Senescence: Roles of the P53 and P16 Pathways." *The EMBO Journal* 22 (16): 4212–22. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg417>.
- Béguelin, Wendy, Martín A Rivas, María T Calvo Fernández, Matt Teater, Alberto Purwada, David Redmond, Hao Shen, et al. 2017. "EZH2 Enables Germinal Centre Formation through Epigenetic Silencing of CDKN1A and an Rb-E2F1 Feedback Loop." *Nature Communications* 8 (1): 877. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01029-x>.
- Bentley, Katie, Claudio Areias Franco, Andrew Philippides, Raquel Blanco, Martina Dierkes, Véronique Gebala, Fabio Stanchi, et al. 2014. "The Role of Differential VE-Cadherin Dynamics in Cell Rearrangement during Angiogenesis." *Nature Cell Biology* 16 (4): 309–21. <https://doi.org/10.1038/ncb2926>.
- Bentley, Katie, Holger Gerhardt, and Paul A Bates. 2008. "Agent-Based Simulation of Notch-Mediated Tip Cell Selection in Angiogenic Sprout Initialisation." *Journal of Theoretical Biology* 250 (1): 25–36. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2007.09.015>.
- Béraud-Dufour, Sophie, Romain Gautier, Corinne Albiges-Rizo, Pierre Chardin, and Eva Faurobert. 2007. "Krit 1 Interactions with Microtubules and Membranes Are Regulated by Rap1 and Integrin Cytoplasmic Domain Associated Protein-1." *The FEBS Journal* 274 (21): 5518–32. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.06068.x>.

- Bertrand, Julien Y, Neil C Chi, Buyung Santoso, Shutian Teng, Didier Y R Stainier, and David Traver. 2010. "Haematopoietic Stem Cells Derive Directly from Aortic Endothelium during Development." *Nature* 464 (7285): 108–11. <https://doi.org/10.1038/nature08738>.
- Betsholtz, Christer. 2004. "Insight into the Physiological Functions of PDGF through Genetic Studies in Mice." *Cytokine & Growth Factor Reviews* 15 (4): 215–28. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2004.03.005>.
- Betz, Charles, Anna Lenard, Heinz Georg Belting, and Markus Affolter. 2016. "Cell Behaviors and Dynamics during Angiogenesis." *Development (Cambridge)* 143 (13): 2249–60. <https://doi.org/10.1242/dev.135616>.
- Bhattacharya, Resham, Sucharita Senbanerjee, Zhiyong Lin, Samy Mir, Anne Hamik, Ping Wang, Priyabrata Mukherjee, Debabrata Mukhopadhyay, and Mukesh K Jain. 2005. "Inhibition of Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor-Mediated Angiogenesis by the Kruppel-like Factor KLF2." *The Journal of Biological Chemistry* 280 (32): 28848–51. <https://doi.org/10.1074/jbc.C500200200>.
- Bhaumik, Dipa, Gary K Scott, Shiruyeh Schokrpur, Christopher K Patil, Arturo V Orjalo, Francis Rodier, Gordon J Lithgow, and Judith Campisi. 2009. "MicroRNAs MiR-146a/b Negatively Modulate the Senescence-Associated Inflammatory Mediators IL-6 and IL-8." *Aging* 1 (4): 402–11. <https://doi.org/10.18632/aging.100042>.
- Binet, Romuald, Damien Ythier, Ana I Robles, Manuel Collado, Delphine Larrieu, Claire Fonti, Elisabeth Brambilla, et al. 2009. "WNT16B Is a New Marker of Cellular Senescence That Regulates P53 Activity and the Phosphoinositide 3-Kinase/AKT Pathway." *Cancer Research* 69 (24): 9183–91. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1016>.
- Bischof, Oliver, Olivier Kirsh, Mark Pearson, Koji Itahana, Pier Giuseppe Pelicci, and Anne Dejean. 2002. "Deconstructing PML-Induced Premature Senescence." *The EMBO Journal* 21 (13): 3358–69. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf341>.
- Bjerke, Glen A, Cathy Hyman-Walsh, and David Wotton. 2011. "Cooperative Transcriptional Activation by Klf4, Meis2, and Pbx1." *Molecular and Cellular Biology* 31 (18): 3723–33. <https://doi.org/10.1128/MCB.01456-10>.
- Blanchoin, Laurent, Rajaa Boujemaa-Paterski, Cécile Sykes, and Julie Plastino. 2014. "Actin Dynamics, Architecture, and Mechanics in Cell Motility." *Physiological Reviews* 94 (1): 235–63. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2013>.
- Blomme, Benoit, Christophe Deroanne, Alexia Hulin, Charles Lambert, Jean-Olivier Defraigne, Betty Nusgens, Marc Radermecker, and Alain Colige. 2019. "Mechanical Strain Induces a Pro-Fibrotic Phenotype in Human Mitral Valvular Interstitial Cells through RhoC/ROCK/MRTF-A and Erk1/2 Signaling Pathways." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 135 (October): 149–59. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2019.08.008>.
- Boon, Reinier A, Joost O Fledderus, Oscar L Volger, Eva J A van Wanrooij, Evangelia Pardali, Frank Weesie, Johan Kuiper, Hans Pannekoek, Peter ten Dijke, and Anton J G Horrevoets. 2007. "KLF2 Suppresses TGF-Beta Signaling in Endothelium through Induction of Smad7 and Inhibition of AP-1." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27 (3): 532–39. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000256466.65450.ce>.
- Bordeleau, Francois, Brooke N Mason, Emmanuel Macklin Lollis, Michael Mazzola, Matthew R Zanotelli, Sahana Somasegar, Joseph P Califano, et al. 2017. "Matrix Stiffening Promotes a Tumor Vasculature Phenotype." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (3): 492–97. <https://doi.org/10.1073/pnas.1613855114>.

- Bordeleau, Francois, and Cynthia A Reinhart-King. 2016. "Tuning Cell Migration: Contractility as an Integrator of Intracellular Signals from Multiple Cues." *F1000Research* 5. <https://doi.org/10.12688/f1000research.7884.1>.
- Borikova, Asya L, Christopher F Dibble, Noah Sciaky, Christopher M Welch, Amy N Abell, Sompop Bencharit, and Gary L Johnson. 2010. "Rho Kinase Inhibition Rescues the Endothelial Cell Cerebral Cavernous Malformation Phenotype." *The Journal of Biological Chemistry* 285 (16): 11760–64. <https://doi.org/10.1074/jbc.C109.097220>.
- Bornstein, P. 2000. "Matricellular Proteins: An Overview." *Matrix Biology : Journal of the International Society for Matrix Biology* 19 (7): 555–56. [https://doi.org/10.1016/s0945-053x\(00\)00103-7](https://doi.org/10.1016/s0945-053x(00)00103-7).
- Boulday, Gwénola, Anne Blécon, Nathalie Petit, Fabrice Chareyre, Luis A Garcia, Michiko Niwa-Kawakita, Marco Giovannini, and Elisabeth Tournier-Lasserre. 2009. "Tissue-Specific Conditional CCM2 Knockout Mice Establish the Essential Role of Endothelial CCM2 in Angiogenesis: Implications for Human Cerebral Cavernous Malformations." *Disease Models & Mechanisms* 2 (3–4): 168–77. <https://doi.org/10.1242/dmm.001263>.
- Boulday, Gwénola, Noemi Rudini, Luigi Maddaluno, Anne Blécon, Minh Arnould, Alain Gaudric, Françoise Chapon, Ralf H Adams, Elisabetta Dejana, and Elisabeth Tournier-Lasserre. 2011. "Developmental Timing of CCM2 Loss Influences Cerebral Cavernous Malformations in Mice." *The Journal of Experimental Medicine* 208 (9): 1835–47. <https://doi.org/10.1084/jem.20110571>.
- Bouvard, Daniel, Jeroen Pouwels, Nicola De Franceschi, and Johanna Ivaska. 2013. "Integrin Inactivators: Balancing Cellular Functions in Vitro and in Vivo." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 14 (7): 430–42. <https://doi.org/10.1038/nrm3599>.
- Bouvard, Daniel, Lucile Vignoud, Sandra Dupé-Manet, Nadia Abed, Henri-Noël Fournier, Carole Vincent-Monegat, Saverio Francesco Retta, Reinhard Fassler, and Marc R Block. 2003. "Disruption of Focal Adhesions by Integrin Cytoplasmic Domain-Associated Protein-1 Alpha." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (8): 6567–74. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211258200>.
- Bravi, Luca, Matteo Malinverno, Federica Pisati, Noemi Rudini, Roberto Cuttano, Roberto Pallini, Maurizio Martini, et al. 2016. "Endothelial Cells Lining Sporadic Cerebral Cavernous Malformation Cavernomas Undergo Endothelial-to-Mesenchymal Transition." *Stroke*. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.115.011867>.
- Butcher, Darci T., Tamara Alliston, and Valerie M. Weaver. 2009. "A Tense Situation: Forcing Tumour Progression." *Nature Reviews Cancer* 9 (2): 108–22. <https://doi.org/10.1038/nrc2544>.
- Cahu, J, S Bustany, and B Sola. 2012. "Senescence-Associated Secretory Phenotype Favors the Emergence of Cancer Stem-like Cells." *Cell Death & Disease* 3 (12): e446. <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.183>.
- Callaghan, T M, and K-P Wilhelm. 2008. "A Review of Ageing and an Examination of Clinical Methods in the Assessment of Ageing Skin. Part I: Cellular and Molecular Perspectives of Skin Ageing." *International Journal of Cosmetic Science* 30 (5): 313–22. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2008.00454.x>.
- Calleja-Agius, J, Y Muscat-Baron, and M P Brincat. 2007. "Skin Ageing." *Menopause International* 13 (2): 60–64. <https://doi.org/10.1258/175404507780796325>.
- Campisi, Judith. 2013. "Aging, Cellular Senescence, and Cancer." *Annual Review of Physiology* 75: 685–705. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183653>.
- Campisi, Judith, and Fabrizio d'Adda di Fagagna. 2007. "Cellular Senescence: When Bad Things Happen to Good Cells." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8 (9): 729–40. <https://doi.org/10.1038/nrm2233>.

- Canel, Marta, Alan Serrels, Margaret C Frame, and Valerie G Brunton. 2013. "E-Cadherin-Integrin Crosstalk in Cancer Invasion and Metastasis." *Journal of Cell Science* 126 (Pt 2): 393–401. <https://doi.org/10.1242/jcs.100115>.
- Caolo, Vincenzo, Hanna M Peacock, Bahar Kasaai, Geertje Swennen, Emma Gordon, Lena Claesson-Welsh, Mark J Post, Peter Verhamme, and Elizabeth A V Jones. 2018. "Shear Stress and VE-Cadherin." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 38 (9): 2174–83. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.310823>.
- Carden, D, F Xiao, C Moak, B H Willis, S Robinson-Jackson, and S Alexander. 1998. "Neutrophil Elastase Promotes Lung Microvascular Injury and Proteolysis of Endothelial Cadherins." *The American Journal of Physiology* 275 (2): H385–92. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1998.275.2.H385>.
- Cardoso, Cécile, Minh Arnould, Coralie De Luca, Cécile Otten, Salim Abdelilah-Seyfried, Alonso Heredia, Anne-Louise Leutenegger, Markus Schwaninger, Elisabeth Tournier-Lasserre, and Gwénola Boulday. 2020. "Novel Chronic Mouse Model of Cerebral Cavernous Malformations." *Stroke*, 1272–78. <https://doi.org/10.1161/strokeaha.119.027207>.
- Carmeliet, P, and R K Jain. 2000. "Angiogenesis in Cancer and Other Diseases." *Nature* 407 (6801): 249–57. <https://doi.org/10.1038/35025220>.
- Carmeliet, Peter, and Rakesh K. Jain. 2011. "Molecular Mechanisms and Clinical Applications of Angiogenesis." *Nature* 473 (7347): 298–307. <https://doi.org/10.1038/nature10144>.
- Carmona, Guillaume, Stephan Göttig, Alessia Orlandi, Jürgen Scheele, Tobias Bänderle, Manfred Jugold, Fabian Kiessling, et al. 2009. "Role of the Small GTPase Rap1 for Integrin Activity Regulation in Endothelial Cells and Angiogenesis." *Blood* 113 (2): 488–97. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-138438>.
- Cavalcanti, Daniel D, M Yashar S Kalani, Nikolay L Martirosyan, Justin Eales, Robert F Spetzler, and Mark C Preul. 2012. "Cerebral Cavernous Malformations: From Genes to Proteins to Disease." *Journal of Neurosurgery* 116 (1): 122–32. <https://doi.org/10.3171/2011.8.JNS101241>.
- Cerutti, Camilla, and Anne J Ridley. 2017. "Endothelial Cell-Cell Adhesion and Signaling." *Experimental Cell Research* 358 (1): 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.06.003>.
- Chamberland, John P, Lauren T Antonow, Michel Dias Santos, and Brigitte Ritter. 2016. "NECAP2 Controls Clathrin Coat Recruitment to Early Endosomes for Fast Endocytic Recycling." *Journal of Cell Science* 129 (13): 2625–37. <https://doi.org/10.1242/jcs.173708>.
- Chambers, Rachel C, Patricia Leoni, Naftali Kaminski, Geoffrey J Laurent, and Renu A Heller. 2003. "Global Expression Profiling of Fibroblast Responses to Transforming Growth Factor-Beta1 Reveals the Induction of Inhibitor of Differentiation-1 and Provides Evidence of Smooth Muscle Cell Phenotypic Switching." *The American Journal of Pathology* 162 (2): 533–46. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)63847-3](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)63847-3).
- Chandra, Tamir, Kristina Kirschner, Jean-Yves Thuret, Benjamin D Pope, Tyrone Ryba, Scott Newman, Kashif Ahmed, et al. 2012. "Independence of Repressive Histone Marks and Chromatin Compaction during Senescent Heterochromatic Layer Formation." *Molecular Cell* 47 (2): 203–14. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.06.010>.
- Chang, Eugene, Lalitha Nayak, and Mukesh K Jain. 2017. "Krüppel-like Factors in Endothelial Cell Biology." *Current Opinion in Hematology* 24 (3): 224–29. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000337>.
- Chen, K D, Y S Li, M Kim, S Li, S Yuan, S Chien, and J Y Shyy. 1999. "Mechanotransduction in Response to Shear Stress. Roles of Receptor Tyrosine Kinases, Integrins, and Shc." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (26): 18393–400. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.26.18393>.

- Chen, Michael J, Tomomasa Yokomizo, Brandon M Zeigler, Elaine Dzierzak, and Nancy A Speck. 2009. "Runx1 Is Required for the Endothelial to Haematopoietic Cell Transition but Not Thereafter." *Nature* 457 (7231): 887–91. <https://doi.org/10.1038/nature07619>.
- Chen, Wei, Jizhong Lou, Evan A Evans, and Cheng Zhu. 2012. "Observing Force-Regulated Conformational Changes and Ligand Dissociation from a Single Integrin on Cells." *The Journal of Cell Biology* 199 (3): 497–512. <https://doi.org/10.1083/jcb.201201091>.
- Chen, Wenqi, Peng Xia, Heping Wang, Jihao Tu, Xinyue Liang, Xiaoling Zhang, and Lisha Li. 2019. "The Endothelial Tip-Stalk Cell Selection and Shuffling during Angiogenesis." *Journal of Cell Communication and Signaling* 13 (3): 291–301. <https://doi.org/10.1007/s12079-019-00511-z>.
- Chen, Xiao Lei, Ju-Ock Nam, Christine Jean, Christine Lawson, Colin T Walsh, Erik Goka, Ssang-Taek Lim, et al. 2012. "VEGF-Induced Vascular Permeability Is Mediated by FAK." *Developmental Cell* 22 (1): 146–57. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.11.002>.
- Chicas, Agustin, Xiaowo Wang, Chaolin Zhang, Mila McCurrach, Zhen Zhao, Ozlem Mert, Ross A Dickins, Masashi Narita, Michael Zhang, and Scott W Lowe. 2010. "Dissecting the Unique Role of the Retinoblastoma Tumor Suppressor during Cellular Senescence." *Cancer Cell* 17 (4): 376–87. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.01.023>.
- Chien, Yuchen, Claudio Scoppo, Xiaowo Wang, Xueping Fang, Brian Balgley, Jessica E Bolden, Prem Premririt, et al. 2011. "Control of the Senescence-Associated Secretory Phenotype by NF-KB Promotes Senescence and Enhances Chemosensitivity." *Genes & Development* 25 (20): 2125–36. <https://doi.org/10.1101/gad.17276711>.
- Childs, Bennett G, Darren J Baker, Tobias Wijshake, Cheryl A Conover, Judith Campisi, and Jan M van Deursen. 2016. "Senescent Intimal Foam Cells Are Deleterious at All Stages of Atherosclerosis." *Science (New York, N.Y.)* 354 (6311): 472–77. <https://doi.org/10.1126/science.aaf6659>.
- Choquet, H el ene, Eliana Trapani, Luca Goitre, Lorenza Trabalzini, Amy Akers, Marco Fontanella, Blaine L Hart, et al. 2016. "Cytochrome P450 and Matrix Metalloproteinase Genetic Modifiers of Disease Severity in Cerebral Cavernous Malformation Type 1." *Free Radical Biology & Medicine* 92 (March): 100–109. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.01.008>.
- Christensen, Adam P, and David P Corey. 2007. "TRP Channels in Mechanosensation: Direct or Indirect Activation?" *Nature Reviews. Neuroscience* 8 (7): 510–21. <https://doi.org/10.1038/nrn2149>.
- Chuang, Hsiang-Hao, Shao-Wei Liang, Zee-Fen Chang, and Hsiao-Hui Lee. 2013. "Ser1333 Phosphorylation Indicates ROCK1 Activation." *Journal of Biomedical Science* 20 (1): 83. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-20-83>.
- Chuang, Hsiang-Hao, Chih-Hsuan Yang, Yeou-Guang Tsay, Chih-Yi Hsu, Ling-Ming Tseng, Zee-Fen Chang, and Hsiao-Hui Lee. 2012. "ROCKII Ser1366 Phosphorylation Reflects the Activation Status." *The Biochemical Journal* 443 (1): 145–51. <https://doi.org/10.1042/BJ20111839>.
- Chuntharpursat-Bon, E, O V Povstyan, M J Ludlow, H J Gaunt, P D Baxter, and D J Beech. 2019. "Cell Adhesion Molecule Interaction with Piezo1 Channels Is a Mechanism for Sub Cellular Regulation of Mechanical Sensitivity." *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/602532>.
- Clatterbuck, R E, C G Eberhart, B J Crain, and D Rigamonti. 2001. "Ultrastructural and Immunocytochemical Evidence That an Incompetent Blood-Brain Barrier Is Related to the Pathophysiology of Cavernous Malformations." *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 71 (2): 188–92. <https://doi.org/10.1136/jnnp.71.2.188>.

- Cleaver, Ondine, and Douglas A. Melton. 2003. "Endothelial Signaling during Development." *Nature Medicine* 9 (6): 661–68. <https://doi.org/10.1038/nm0603-661>.
- Collins, Caitlin, Christophe Guilluy, Christopher Welch, E Timothy O'Brien, Klaus Hahn, Richard Superfine, Keith Burridge, and Ellie Tzima. 2012. "Localized Tensional Forces on PECAM-1 Elicit a Global Mechanotransduction Response via the Integrin-RhoA Pathway." *Current Biology : CB* 22 (22): 2087–94. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.08.051>.
- Conboy, Irina M, Michael J Conboy, Amy J Wagers, Eric R Girma, Irving L Weissman, and Thomas A Rando. 2005. "Rejuvenation of Aged Progenitor Cells by Exposure to a Young Systemic Environment." *Nature* 433 (7027): 760–64. <https://doi.org/10.1038/nature03260>.
- Conway, Daniel E, and Martin A Schwartz. 2013. "Flow-Dependent Cellular Mechanotransduction in Atherosclerosis." *Journal of Cell Science* 126 (Pt 22): 5101–9. <https://doi.org/10.1242/jcs.138313>.
- Coppé, Jean-Philippe, Pierre-Yves Desprez, Ana Krtolica, and Judith Campisi. 2010. "The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression." *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 5 (1): 99–118. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-121808-102144>.
- Coppé, Jean-Philippe, Christopher K Patil, Francis Rodier, Yu Sun, Denise P Muñoz, Joshua Goldstein, Peter S Nelson, Pierre-Yves Desprez, and Judith Campisi. 2008. "Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the P53 Tumor Suppressor." *PLoS Biology* 6 (12): 2853–68. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060301>.
- Corada, Monica, Marco Francesco Morini, and Elisabetta Dejana. 2014. "Signaling Pathways in the Specification of Arteries and Veins." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 34 (11): 2372–77. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.303218>.
- Corpet, Armelle, and Manuel Stucki. 2014. "Chromatin Maintenance and Dynamics in Senescence: A Spotlight on SAHF Formation and the Epigenome of Senescent Cells." *Chromosoma* 123 (5): 423–36. <https://doi.org/10.1007/s00412-014-0469-6>.
- Cortes-Canteli, Marta, and Costantino Iadecola. 2020. "Alzheimer's Disease and Vascular Aging." *Journal of the American College of Cardiology* 75 (8): 942–51. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.10.062>.
- Coultas, Leigh, Kallayane Chawengsaksophak, and Janet Rossant. 2005. "Endothelial Cells and VEGF in Vascular Development." *Nature* 438 (7070): 937–45. <https://doi.org/10.1038/nature04479>.
- Cröse, Lisa E S, Thomas L Hilder, Noah Sciaky, and Gary L Johnson. 2009. "Cerebral Cavernous Malformation 2 Protein Promotes Smad Ubiquitin Regulatory Factor 1-Mediated RhoA Degradation in Endothelial Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 284 (20): 13301–5. <https://doi.org/10.1074/jbc.C900009200>.
- Cruz-Munoz, William, and Rama Khokha. 2008. "The Role of Tissue Inhibitors of Metalloproteinases in Tumorigenesis and Metastasis." *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 45 (3): 291–338. <https://doi.org/10.1080/10408360801973244>.
- Cunha, Sara I, Petra U Magnusson, Elisabetta Dejana, and Maria Grazia Lampugnani. 2017. "Deregulated TGF- β /BMP Signaling in Vascular Malformations." *Circulation Research* 121 (8): 981–99. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.309930>.
- Cuttano, Roberto, Noemi Rudini, Luca Bravi, Monica Corada, Costanza Giampietro, Eleanna Papa, Marco Francesco Morini, et al. 2016. "KLF4 Is a Key Determinant in the Development and Progression of Cerebral Cavernous Malformations." *EMBO Molecular Medicine* 8 (1): 6–24. <https://doi.org/10.15252/emmm.201505433>.

- d'Adda di Fagagna, Fabrizio, Philip M Reaper, Lorena Clay-Farrace, Heike Fiegler, Philippa Carr, Thomas Von Zglinicki, Gabriele Saretzki, Nigel P Carter, and Stephen P Jackson. 2003. "A DNA Damage Checkpoint Response in Telomere-Initiated Senescence." *Nature* 426 (6963): 194–98. <https://doi.org/10.1038/nature02118>.
- Daneshjou, Nazila, Nathan Sieracki, Geerten P van Nieuw Amerongen, Daniel E Conway, Martin A Schwartz, Yulia A Komarova, and Asrar B Malik. 2015. "Rac1 Functions as a Reversible Tension Modulator to Stabilize VE-Cadherin Trans-Interaction." *The Journal of Cell Biology* 208 (1): 23–32. <https://doi.org/10.1083/jcb.201409108>.
- Dass, Kathleen, Aamir Ahmad, Asfar S Azmi, Sarah H Sarkar, and Fazlul H Sarkar. 2008. "Evolving Role of UPA/UPAR System in Human Cancers." *Cancer Treatment Reviews* 34 (2): 122–36. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2007.10.005>.
- Cecco, Marco De, Steven W Criscione, Edward J Peckham, Sara Hillenmeyer, Eliza A Hamm, Jayameenakshi Manivannan, Abigail L Peterson, Jill A Kreiling, Nicola Neretti, and John M Sedivy. 2013. "Genomes of Replicatively Senescent Cells Undergo Global Epigenetic Changes Leading to Gene Silencing and Activation of Transposable Elements." *Aging Cell* 12 (2): 247–56. <https://doi.org/10.1111/accel.12047>.
- Smet, Frederik De, Inmaculada Segura, Katrien De Bock, Philipp J Hohensinner, and Peter Carmeliet. 2009. "Mechanisms of Vessel Branching: Filopodia on Endothelial Tip Cells Lead the Way." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 29 (5): 639–49. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.185165>.
- Debacq-Chainiaux, Florence, Emmanuelle Boilan, Jérémie Dedessus Le Moutier, Geoffroy Weemaels, and Olivier Toussaint. 2010. "P38(MAPK) in the Senescence of Human and Murine Fibroblasts." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 694: 126–37. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7002-2_10.
- Dechat, Thomas, Stephen A Adam, Pekka Taimen, Takeshi Shimi, and Robert D Goldman. 2010. "Nuclear Lamins." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (11): a000547. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000547>.
- Dejana, Elisabetta, Karen K. Hirschi, and Michael Simons. 2017. "The Molecular Basis of Endothelial Cell Plasticity." *Nature Communications* 8 (1): 14361. <https://doi.org/10.1038/ncomms14361>.
- Dejana, Elisabetta, and Dietmar Vestweber. 2013. "The Role of VE-Cadherin in Vascular Morphogenesis and Permeability Control." *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 116: 119–44. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394311-8.00006-6>.
- Dekker, Rob J, Reinier A Boon, Mariska G Rondaij, Astrid Kragt, Oscar L Volger, Yvonne W Elderkamp, Joost C M Meijers, Jan Voorberg, Hans Pannekoek, and Anton J G Horrevoets. 2006. "KLF2 Provokes a Gene Expression Pattern That Establishes Functional Quiescent Differentiation of the Endothelium." *Blood* 107 (11): 4354–63. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-08-3465>.
- Dekker, Rob J, Simone van Soest, Ruud D Fontijn, Sonia Salamanca, Philip G de Groot, Ed VanBavel, Hans Pannekoek, and Anton J G Horrevoets. 2002. "Prolonged Fluid Shear Stress Induces a Distinct Set of Endothelial Cell Genes, Most Specifically Lung Krüppel-like Factor (KLF2)." *Blood* 100 (5): 1689–98. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-01-0046>.
- Vecchio, P J Del, A Siflinger-Birnboim, J M Shepard, R Bizios, J A Cooper, and A B Malik. 1987. "Endothelial Monolayer Permeability to Macromolecules." *Federation Proceedings* 46 (8): 2511–15.
- Demaria, Marco, Naoko Ohtani, Sameh A Youssef, Francis Rodier, Wendy Toussaint, James R Mitchell, Remi-Martin Laberge, et al. 2014. "An Essential Role for Senescent Cells in Optimal Wound Healing through Secretion of PDGF-AA." *Developmental Cell* 31 (6): 722–33. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.11.012>.

- Denier, Christian, Pierre Labauge, Françoise Bergametti, Florence Marchelli, Florence Riant, Minh Arnoult, Jacqueline Maciazek, Eric Vicaut, Laurent Brunereau, and Elisabeth Tournier-Lasserre. 2006. "Genotype-Phenotype Correlations in Cerebral Cavernous Malformations Patients." *Annals of Neurology* 60 (5): 550–56. <https://doi.org/10.1002/ana.20947>.
- Deschênes-Simard, Xavier, Frédéric Lessard, Marie France Gaumont-Leclerc, Nabeel Bardeesy, and Gerardo Ferbeyre. 2014. "Cellular Senescence and Protein Degradation: Breaking down Cancer." *Cell Cycle* 13 (12): 1840–58. <https://doi.org/10.4161/cc.29335>.
- Detter, Matthew R., Daniel A. Snellings, and Douglas A. Marchuk. 2018. "Cerebral Cavernous Malformations Develop through Clonal Expansion of Mutant Endothelial Cells." *Circulation Research* 123 (10): 1143–51. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.313970>.
- Dimri, G P, X Lee, G Basile, M Acosta, G Scott, C Roskelley, E E Medrano, M Linskens, I Rubelj, and O Pereira-Smith. 1995. "A Biomarker That Identifies Senescent Human Cells in Culture and in Aging Skin in Vivo." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (20): 9363–67. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.20.9363>.
- Dirac, Annette M G, and René Bernards. 2003. "Reversal of Senescence in Mouse Fibroblasts through Lentiviral Suppression of P53." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (14): 11731–34. <https://doi.org/10.1074/jbc.C300023200>.
- DiStefano, Peter V, Julia M Kuebel, Ingrid H Sarelius, and Angela J Glading. 2014. "KRIT1 Protein Depletion Modifies Endothelial Cell Behavior via Increased Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Signaling." *The Journal of Biological Chemistry* 289 (47): 33054–65. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.582304>.
- Dorland, Yvonne L., and Stephan Huvenerers. 2016. "Cell–Cell Junctional Mechanotransduction in Endothelial Remodeling." *Cellular and Molecular Life Sciences* 74 (2): 279–92. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2325-8>.
- Dörr, Jan R, Yong Yu, Maja Milanovic, Gregor Beuster, Christin Zasada, J Henry M Däbritz, Jan Lisec, et al. 2013. "Synthetic Lethal Metabolic Targeting of Cellular Senescence in Cancer Therapy." *Nature* 501 (7467): 421–25. <https://doi.org/10.1038/nature12437>.
- Douguet, Dominique, Amanda Patel, Aimin Xu, Paul M Vanhoutte, and Eric Honoré. 2019. "Piezo Ion Channels in Cardiovascular Mechanobiology." *Trends in Pharmacological Sciences* 40 (12): 956–70. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2019.10.002>.
- Draheim, Kyle M, Xiaofeng Li, Rong Zhang, Oriana S Fisher, Giulia Villari, Titus J Boggon, and David A Calderwood. 2015. "CCM2-CCM3 Interaction Stabilizes Their Protein Expression and Permits Endothelial Network Formation." *The Journal of Cell Biology* 208 (7): 987–1001. <https://doi.org/10.1083/jcb.201407129>.
- Drake, C J, and P A Fleming. 2000. "Vasculogenesis in the Day 6.5 to 9.5 Mouse Embryo." *Blood* 95 (5): 1671–79.
- Dupont, Sirio. 2016. "Role of YAP/TAZ in Cell-Matrix Adhesion-Mediated Signalling and Mechanotransduction." *Experimental Cell Research* 343 (1): 42–53. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.10.034>.
- Egeblad, Mikala, Morten G Rasch, and Valerie M Weaver. 2010. "Dynamic Interplay between the Collagen Scaffold and Tumor Evolution." *Current Opinion in Cell Biology* 22 (5): 697–706. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.08.015>.

- Elgendy, Mohamed, Clare Sheridan, Gabriela Brumatti, and Seamus J Martin. 2011. "Oncogenic Ras-Induced Expression of Noxa and Beclin-1 Promotes Autophagic Cell Death and Limits Clonogenic Survival." *Molecular Cell* 42 (1): 23–35. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.02.009>.
- Elosegui-Artola, Alberto, Ion Andreu, Amy E M Beedle, Ainhoa Lezamiz, Marina Uroz, Anita J Kosmalska, Roger Oriá, et al. 2017. "Force Triggers YAP Nuclear Entry by Regulating Transport across Nuclear Pores." *Cell* 171 (6): 1397-1410.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.008>.
- Engeland, Kurt. 2018. "Cell Cycle Arrest through Indirect Transcriptional Repression by P53: I Have a DREAM." *Cell Death and Differentiation* 25 (1): 114–32. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.172>.
- Engler, Adam J, Shamik Sen, H Lee Sweeney, and Dennis E Discher. 2006. "Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification." *Cell* 126 (4): 677–89. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.044>.
- Erickson, S, O Sangfelt, M Heyman, J Castro, S Einhorn, and D Grandér. 1998. "Involvement of the Ink4 Proteins P16 and P15 in T-Lymphocyte Senescence." *Oncogene* 17 (5): 595–602. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201965>.
- Erusalimsky, Jorge D, and Chris Skene. 2009. "Mechanisms of Endothelial Senescence." *Experimental Physiology* 94 (3): 299–304. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2008.043133>.
- Esser, S, M G Lampugnani, M Corada, E Dejana, and W Risau. 1998. "Vascular Endothelial Growth Factor Induces VE-Cadherin Tyrosine Phosphorylation in Endothelial Cells." *Journal of Cell Science* 111 (Pt 1 (July): 1853–65.
- Evans, Paul M, Wen Zhang, Xi Chen, Jun Yang, Kishor K Bhakat, and Chunming Liu. 2007. "Krüppel-like Factor 4 Is Acetylated by P300 and Regulates Gene Transcription via Modulation of Histone Acetylation." *The Journal of Biological Chemistry* 282 (47): 33994–2. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701847200>.
- Ewald, Jonathan A, Joshua A Desotelle, George Wilding, and David F Jarrard. 2010. "Therapy-Induced Senescence in Cancer." *Journal of the National Cancer Institute* 102 (20): 1536–46. <https://doi.org/10.1093/jnci/djq364>.
- Fan, Yanbo, Haocheng Lu, Wenying Liang, Wenting Hu, Jifeng Zhang, and Y. Eugene Chen. 2017. "Krüppel-like Factors and Vascular Wall Homeostasis." *Journal of Molecular Cell Biology* 9 (5): 352–63. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjx037>.
- Farsam, Vida, Abhijit Basu, Martina Gatzka, Nicolai Treiber, Lars A Schneider, Medhanie A Mulaw, Tanja Lucas, et al. 2016. "Senescent Fibroblast-Derived Chemerin Promotes Squamous Cell Carcinoma Migration." *Oncotarget* 7 (50): 83554–69. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13446>.
- Faubert, Eva, and Corinne Albiges-Rizo. 2010. "Recent Insights into Cerebral Cavernous Malformations: A Complex Jigsaw Puzzle under Construction." *FEBS Journal* 277 (5): 1084–96. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07537.x>.
- Faubert, Eva, Claire Rome, Justyna Lisowska, Sandra Manet-Dupé, Gwénola Boulday, Marilyne Malbouyres, Martial Balland, et al. 2013. "CCM1-ICAP-1 Complex Controls B1 Integrin-Dependent Endothelial Contractility and Fibronectin Remodeling." *Journal of Cell Biology* 202 (3): 545–61. <https://doi.org/10.1083/jcb.201303044>.
- Fidalgo, Miguel, Ana Guerrero, María Fraile, Cristina Iglesias, Celia M Pombo, and Juan Zalvide. 2012. "Adaptor Protein Cerebral Cavernous Malformation 3 (CCM3) Mediates Phosphorylation of the Cytoskeletal Proteins Ezrin/Radixin/Moesin by Mammalian Ste20-4 to Protect Cells from Oxidative Stress." *The Journal of Biological Chemistry* 287 (14): 11556–65. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.320259>.

- Finney, Alexandra C, Karen Y Stokes, Christopher B Pattillo, and A Wayne Orr. 2017. "Integrin Signaling in Atherosclerosis." *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 74 (12): 2263–82. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2490-4>.
- Fisher, Aron B, Abu B Al-Mehdi, and Yefim Manevich. 2002. "Shear Stress and Endothelial Cell Activation." *Critical Care Medicine* 30 (5 Suppl): S192-7. <https://doi.org/10.1097/00003246-200205001-00004>.
- Fisher, Oriana S., and Titus J. Boggon. 2014. "Signaling Pathways and the Cerebral Cavernous Malformations Proteins: Lessons from Structural Biology." *Cellular and Molecular Life Sciences* 71 (10): 1881–92. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1532-9>.
- Fledderus, Joost O, Reinier A Boon, Oscar L Volger, Hanna Hurttila, Seppo Ylä-Herttuala, Hans Pannekoek, Anna-Liisa Levenon, and Anton J G Horrevoets. 2008. "KLF2 Primes the Antioxidant Transcription Factor Nrf2 for Activation in Endothelial Cells." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 28 (7): 1339–46. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.165811>.
- Fleming, Ingrid. 2010. "Molecular Mechanisms Underlying the Activation of ENOS." *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology* 459 (6): 793–806. <https://doi.org/10.1007/s00424-009-0767-7>.
- Frantz, Christian, Kathleen M. Stewart, and Valerie M. Weaver. 2010. "The Extracellular Matrix at a Glance." *Journal of Cell Science* 123 (24): 4195–4200. <https://doi.org/10.1242/jcs.023820>.
- Freund, Adam, Remi-Martin Laberge, Marco Demaria, and Judith Campisi. 2012. "Lamin B1 Loss Is a Senescence-Associated Biomarker." *Molecular Biology of the Cell* 23 (11): 2066–75. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-10-0884>.
- Fujimura, M, M Watanabe, H Shimizu, and T Tominaga. 2007. "Expression of Matrix Metalloproteinases (MMPs) and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase (TIMP) in Cerebral Cavernous Malformations: Immunohistochemical Analysis of MMP-2, -9 and TIMP-2." *Acta Neurochirurgica* 149 (2): 179–83; discussion 183. <https://doi.org/10.1007/s00701-006-0929-8>.
- Fukata, M, and K Kaibuchi. 2001. "Rho-Family GTPases in Cadherin-Mediated Cell-Cell Adhesion." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 2 (12): 887–97. <https://doi.org/10.1038/35103068>.
- Garlanda, C, and E Dejana. 1997. "Heterogeneity of Endothelial Cells. Specific Markers." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 17 (7): 1193–1202. <https://doi.org/10.1161/01.atv.17.7.1193>.
- Garry, Ambroise, Bérengère Fromy, Nicolas Blondeau, Daniel Henrion, Frédéric Brau, Pierre Gounon, Nicolas Guy, Catherine Heurteaux, Michel Lazdunski, and Jean Louis Saumet. 2007. "Altered Acetylcholine, Bradykinin and Cutaneous Pressure-Induced Vasodilation in Mice Lacking the TREK1 Potassium Channel: The Endothelial Link." *EMBO Reports* 8 (4): 354–59. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400916>.
- Gasparics, Ákos, László Rosivall, István A Krizbai, and Attila Sebe. 2016. "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* 310 (9): H1055-63. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00042.2016>.
- Gavard, Julie, and J Silvio Gutkind. 2006. "VEGF Controls Endothelial-Cell Permeability by Promoting the Beta-Arrestin-Dependent Endocytosis of VE-Cadherin." *Nature Cell Biology* 8 (11): 1223–34. <https://doi.org/10.1038/ncb1486>.
- Gavard, Julie, Vyomesh Patel, and J Silvio Gutkind. 2008. "Angiopoietin-1 Prevents VEGF-Induced Endothelial Permeability by Sequestering Src through MDia." *Developmental Cell* 14 (1): 25–36. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.10.019>.

- Geiger, Benjamin, Joachim P Spatz, and Alexander D Bershadsky. 2009. "Environmental Sensing through Focal Adhesions." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 10 (1): 21–33. <https://doi.org/10.1038/nrm2593>.
- Geiger, Benjamin, and Kenneth M. Yamada. 2011. "Molecular Architecture and Function of Matrix Adhesions." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3 (5): 1–21. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005033>.
- Gerhardt, H, H Wolburg, and C Redies. 2000. "N-Cadherin Mediates Pericytic-Endothelial Interaction during Brain Angiogenesis in the Chicken." *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists* 218 (3): 472–79. [https://doi.org/10.1002/1097-0177\(200007\)218:3<472::AID-DVDY1008>3.0.CO;2-#](https://doi.org/10.1002/1097-0177(200007)218:3<472::AID-DVDY1008>3.0.CO;2-#).
- Gerhardt, Holger, and Christer Betsholtz. 2003. "Endothelial-Pericyte Interactions in Angiogenesis." *Cell and Tissue Research* 314 (1): 15–23. <https://doi.org/10.1007/s00441-003-0745-x>.
- Gerhardt, Holger, Matthew Golding, Marcus Fruttiger, Christiana Ruhrberg, Andrea Lundkvist, Alexandra Abramsson, Michael Jeltsch, et al. 2003. "VEGF Guides Angiogenic Sprouting Utilizing Endothelial Tip Cell Filopodia." *The Journal of Cell Biology* 161 (6): 1163–77. <https://doi.org/10.1083/jcb.200302047>.
- Ghaleb, Amr M, Mandayam O Nandan, Sengthong Chanchevalap, W Brian Dalton, Irfan M Hisamuddin, and Vincent W Yang. 2005. "Krüppel-like Factors 4 and 5: The Yin and Yang Regulators of Cellular Proliferation." *Cell Research* 15 (2): 92–96. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290271>.
- Giampietro, Costanza, Andrea Disanza, Luca Bravi, Miriam Barrios-Rodiles, Monica Corada, Emanuela Frittoli, Cecilia Savorani, et al. 2015. "The Actin-Binding Protein EPS8 Binds VE-Cadherin and Modulates YAP Localization and Signaling." *The Journal of Cell Biology* 211 (6): 1177–92. <https://doi.org/10.1083/jcb.201501089>.
- Gibson, Christopher C, Weiquan Zhu, Chadwick T Davis, Jay A Bowman-Kirigin, Aubrey C Chan, Jing Ling, Ashley E Walker, et al. 2015. "Strategy for Identifying Repurposed Drugs for the Treatment of Cerebral Cavernous Malformation." *Circulation* 131 (3): 289–99. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.010403>.
- Glading, Angela J, and Mark H Ginsberg. 2010. "Rap1 and Its Effector KRIT1/CCM1 Regulate Beta-Catenin Signaling." *Disease Models & Mechanisms* 3 (1–2): 73–83. <https://doi.org/10.1242/dmm.003293>.
- Glading, Angela, Jaewon Han, Rebecca A Stockton, and Mark H Ginsberg. 2007. "KRIT-1/CCM1 Is a Rap1 Effector That Regulates Endothelial Cell Cell Junctions." *The Journal of Cell Biology* 179 (2): 247–54. <https://doi.org/10.1083/jcb.200705175>.
- Goetz, Jacky G, and Miguel Angel Del Pozo. 2011. "[Caveolin-1 forces matrix remodeling]." *Medecine sciences : M/S. France*. <https://doi.org/10.1051/medsci/20112711009>.
- Gomez Perdiguero, Elisa, Athanasia Liabotis-Fontugne, Mélanie Durand, Clément Faye, Sylvie Ricard-Blum, Manuel Simonutti, Sébastien Augustin, et al. 2016. "ANGPTL4–Avβ3 Interaction Counteracts Hypoxia-Induced Vascular Permeability by Modulating Src Signalling Downstream of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2." *The Journal of Pathology* 240 (4): 461–71. <https://doi.org/10.1002/path.4805>.
- Gong, Jianying, Linan Guan, Pei Tian, Chao Li, and Yi Zhang. 2018. "Rho Kinase Type 1 (ROCK1) Promotes Lipopolysaccharide-Induced Inflammation in Corneal Epithelial Cells by Activating Toll-Like Receptor 4 (TLR4)-Mediated Signaling." *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* 24 (May): 3514–23. <https://doi.org/10.12659/MSM.907277>.
- Gonzalez-Meljem, Jose Mario, John Richard Apps, Helen Christina Fraser, and Juan Pedro Martinez-Barbera. 2018. "Paracrine Roles of Cellular Senescence in Promoting Tumourigenesis." *British Journal of Cancer* 118 (10): 1283–88. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0066-1>.

- González-Navarro, Herminia, Yafa Naim Abu Nabah, Angela Vinué, María J Andrés-Manzano, Manuel Collado, Manuel Serrano, and Vicente Andrés. 2010. "P19(ARF) Deficiency Reduces Macrophage and Vascular Smooth Muscle Cell Apoptosis and Aggravates Atherosclerosis." *Journal of the American College of Cardiology* 55 (20): 2258–68. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2010.01.026>.
- Gordon, Grant R J, Sean J Mulligan, and Brian A MacVicar. 2007. "Astrocyte Control of the Cerebrovasculature." *Glia* 55 (12): 1214–21. <https://doi.org/10.1002/glia.20543>.
- Gorgoulis, Vassilis G, and Thanos D Halazonetis. 2010. "Oncogene-Induced Senescence: The Bright and Dark Side of the Response." *Current Opinion in Cell Biology* 22 (6): 816–27. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.07.013>.
- Grashoff, Carsten, Brenton D Hoffman, Michael D Brenner, Ruobo Zhou, Maddy Parsons, Michael T Yang, Mark A McLean, et al. 2010. "Measuring Mechanical Tension across Vinculin Reveals Regulation of Focal Adhesion Dynamics." *Nature* 466 (7303): 263–66. <https://doi.org/10.1038/nature09198>.
- Gudi, S, J P Nolan, and J A Frangos. 1998. "Modulation of GTPase Activity of G Proteins by Fluid Shear Stress and Phospholipid Composition." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (5): 2515–19. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.5.2515>.
- Guilak, Farshid, Daniel M Cohen, Bradley T Estes, Jeffrey M Gimble, Wolfgang Liedtke, and Christopher S Chen. 2009. "Control of Stem Cell Fate by Physical Interactions with the Extracellular Matrix." *Cell Stem Cell* 5 (1): 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.06.016>.
- Guilluy, Christophe, Vinay Swaminathan, Rafael Garcia-Mata, E Timothy O'Brien, Richard Superfine, and Keith Burridge. 2011. "The Rho GEFs LARG and GEF-H1 Regulate the Mechanical Response to Force on Integrins." *Nature Cell Biology* 13 (6): 722–27. <https://doi.org/10.1038/ncb2254>.
- Gunning, Peter W, Edna C Hardeman, Pekka Lappalainen, and Daniel P Mulvihill. 2015. "Tropomyosin - Master Regulator of Actin Filament Function in the Cytoskeleton." *Journal of Cell Science* 128 (16): 2965–74. <https://doi.org/10.1242/jcs.172502>.
- Hahn, Cornelia, and Martin A Schwartz. 2009. "Mechanotransduction in Vascular Physiology and Atherogenesis." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10 (1): 53–62. <https://doi.org/10.1038/nrm2596>.
- Hamik, Anne, Zhiyong Lin, Ajay Kumar, Mercedes Balcells, Sumita Sinha, Jonathan Katz, Mark W Feinberg, Robert E Gerzsten, Elazer R Edelman, and Mukesh K Jain. 2007. "Kruppel-like Factor 4 Regulates Endothelial Inflammation." *The Journal of Biological Chemistry* 282 (18): 13769–79. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700078200>.
- Haque, Farhana, David J Lloyd, Dawn T Smallwood, Carolyn L Dent, Catherine M Shanahan, Andrew M Fry, Richard C Trembath, and Sue Shackleton. 2006. "SUN1 Interacts with Nuclear Lamin A and Cytoplasmic Nesprins to Provide a Physical Connection between the Nuclear Lamina and the Cytoskeleton." *Molecular and Cellular Biology* 26 (10): 3738–51. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.10.3738-3751.2006>.
- Hara, E, R Smith, D Parry, H Tahara, S Stone, and G Peters. 1996. "Regulation of P16CDKN2 Expression and Its Implications for Cell Immortalization and Senescence." *Molecular and Cellular Biology* 16 (3): 859–67. <https://doi.org/10.1128/mcb.16.3.859>.
- Harburger, David S, and David A Calderwood. 2009. "Integrin Signalling at a Glance." *Journal of Cell Science* 122 (Pt 2): 159–63. <https://doi.org/10.1242/jcs.018093>.
- Hartmann, Svenja, Anne J Ridley, and Susanne Lutz. 2015. "The Function of Rho-Associated Kinases ROCK1 and ROCK2 in the Pathogenesis of Cardiovascular Disease." *Frontiers in Pharmacology* 6: 276. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00276>.

- Hatanaka, Kunihiro, Anthony A Lanahan, Masahiro Murakami, and Michael Simons. 2012. "Fibroblast Growth Factor Signaling Potentiates VE-Cadherin Stability at Adherens Junctions by Regulating SHP2." *PloS One* 7 (5): e37600. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037600>.
- HAYFLICK, L. 1965. "THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS." *Experimental Cell Research* 37 (March): 614–36. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(65\)90211-9](https://doi.org/10.1016/0014-4827(65)90211-9).
- He, S, B L Cook, B E Deverman, U Weihe, F Zhang, V Prachand, J Zheng, and S J Weintraub. 2000. "E2F Is Required to Prevent Inappropriate S-Phase Entry of Mammalian Cells." *Molecular and Cellular Biology* 20 (1): 363–71. <https://doi.org/10.1128/mcb.20.1.363-371.2000>.
- He, Yun, Haifeng Zhang, Luyang Yu, Murat Gunel, Titus J Boggan, Hong Chen, and Wang Min. 2010. "Stabilization of VEGFR2 Signaling by Cerebral Cavernous Malformation 3 Is Critical for Vascular Development." *Science Signaling* 3 (116): ra26. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000722>.
- Hellström, M, H Gerhardt, M Kalén, X Li, U Eriksson, H Wolburg, and C Betsholtz. 2001. "Lack of Pericytes Leads to Endothelial Hyperplasia and Abnormal Vascular Morphogenesis." *The Journal of Cell Biology* 153 (3): 543–53. <https://doi.org/10.1083/jcb.153.3.543>.
- Hellström, Mats, Li Kun Phng, Jennifer J. Hofmann, Elisabet Wallgard, Leigh Coultas, Per Lindblom, Jackelyn Alva, et al. 2007. "Dll4 Signalling through Notch1 Regulates Formation of Tip Cells during Angiogenesis." *Nature* 445 (7129): 776–80. <https://doi.org/10.1038/nature05571>.
- Hellström, Mats, Li-Kun Phng, and Holger Gerhardt. 2007. "VEGF and Notch Signaling: The Yin and Yang of Angiogenic Sprouting." *Cell Adhesion & Migration* 1 (3): 133–36. <https://doi.org/10.4161/cam.1.3.4978>.
- Heydarkhan-Hagvall, Sepideh, Gisela Helenius, Bengt R Johansson, Julie Y Li, Erney Mattsson, and Bo Risberg. 2003. "Co-Culture of Endothelial Cells and Smooth Muscle Cells Affects Gene Expression of Angiogenic Factors." *Journal of Cellular Biochemistry* 89 (6): 1250–59. <https://doi.org/10.1002/jcb.10583>.
- Hill, Robert A, Lei Tong, Peng Yuan, Sasidhar Murikinati, Shobhana Gupta, and Jaime Grutzendler. 2015. "Regional Blood Flow in the Normal and Ischemic Brain Is Controlled by Arteriolar Smooth Muscle Cell Contractility and Not by Capillary Pericytes." *Neuron* 87 (1): 95–110. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.06.001>.
- Hoenicke, Lisa, and Lars Zender. 2012. "Immune Surveillance of Senescent Cells--Biological Significance in Cancer- and Non-Cancer Pathologies." *Carcinogenesis* 33 (6): 1123–26. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs124>.
- Hogan, Benjamin M, Jeroen Bussmann, Hartwig Wolburg, and Stefan Schulte-Merker. 2008. "Ccm1 Cell Autonomously Regulates Endothelial Cellular Morphogenesis and Vascular Tubulogenesis in Zebrafish." *Human Molecular Genetics* 17 (16): 2424–32. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn142>.
- Holdt, Lesca Miriam, Kristina Sass, Gábor Gäbel, Hendrik Bergert, Joachim Thiery, and Daniel Teupser. 2011. "Expression of Chr9p21 Genes CDKN2B (P15(INK4b)), CDKN2A (P16(INK4a)), P14(ARF) and MTAP in Human Atherosclerotic Plaque." *Atherosclerosis* 214 (2): 264–70. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2010.06.029>.
- Horton, Edward R, Jonathan D Humphries, Jenny James, Matthew C Jones, Janet A Askari, and Martin J Humphries. 2016. "The Integrin Adhesome Network at a Glance." *Journal of Cell Science* 129 (22): 4159–63. <https://doi.org/10.1242/jcs.192054>.
- Hotulainen, Pirta, and Pekka Lappalainen. 2006. "Stress Fibers Are Generated by Two Distinct Actin Assembly Mechanisms in Motile Cells." *The Journal of Cell Biology* 173 (3): 383–94. <https://doi.org/10.1083/jcb.200511093>.

- Hsieh, Chung-Yu, Huai-Yu Hsiao, Wan-Yi Wu, Ching-Ann Liu, Yu-Chih Tsai, Yuen-Jen Chao, Danny L Wang, and Hsyue-Jen Hsieh. 2009. "Regulation of Shear-Induced Nuclear Translocation of the Nrf2 Transcription Factor in Endothelial Cells." *Journal of Biomedical Science* 16 (1): 12. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-16-12>.
- Huveneers, Stephan, and Johan de Rooij. 2013. "Mechanosensitive Systems at the Cadherin-F-Actin Interface." *Journal of Cell Science* 126 (Pt 2): 403–13. <https://doi.org/10.1242/jcs.109447>.
- Huveneers, Stephan, Joppe Oldenburg, Emma Spanjaard, Gerard van der Krogt, Ilya Grigoriev, Anna Akhmanova, Holger Rehmann, and Johan de Rooij. 2012. "Vinculin Associates with Endothelial VE-Cadherin Junctions to Control Force-Dependent Remodeling." *The Journal of Cell Biology* 196 (5): 641–52. <https://doi.org/10.1083/jcb.201108120>.
- Huynh, John, Nozomi Nishimura, Kuldeepsinh Rana, John M Peloquin, Joseph P Califano, Christine R Montague, Michael R King, Chris B Schaffer, and Cynthia A Reinhart-King. 2011. "Age-Related Intimal Stiffening Enhances Endothelial Permeability and Leukocyte Transmigration." *Science Translational Medicine* 3 (112): 112ra122. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002761>.
- Hynes, Richard O. 2009. "The Extracellular Matrix: Not Just Pretty Fibrils." *Science (New York, N.Y.)* 326 (5957): 1216–19. <https://doi.org/10.1126/science.1176009>.
- Hynes, Richard O, and Alexandra Naba. 2012. "Overview of the Matrisome--an Inventory of Extracellular Matrix Constituents and Functions." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4 (1): a004903. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004903>.
- Iacovino, Michelina, Diana Chong, Istvan Szatmari, Lynn Hartweck, Danielle Rux, Arianna Caprioli, Ondine Cleaver, and Michael Kyba. 2011. "HoxA3 Is an Apical Regulator of Haemogenic Endothelium." *Nature Cell Biology* 13 (1): 72–78. <https://doi.org/10.1038/ncb2137>.
- Ihling, C, G Menzel, E Wellens, J S Mönting, H E Schaefer, and A M Zeiher. 1997. "Topographical Association between the Cyclin-Dependent Kinases Inhibitor P21, P53 Accumulation, and Cellular Proliferation in Human Atherosclerotic Tissue." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 17 (10): 2218–24. <https://doi.org/10.1161/01.atv.17.10.2218>.
- Iizuka, Michiro, Kazushi Kimura, Shujie Wang, Katsuhiko Kato, Mutsuki Amano, Kozo Kaibuchi, and Akira Mizoguchi. 2012. "Distinct Distribution and Localization of Rho-Kinase in Mouse Epithelial, Muscle and Neural Tissues." *Cell Structure and Function* 37 (2): 155–75. <https://doi.org/10.1247/csf.12018>.
- Iozzo, Renato V, Jason J Zoeller, and Alexander Nyström. 2009. "Basement Membrane Proteoglycans: Modulators Par Excellence of Cancer Growth and Angiogenesis." *Molecules and Cells* 27 (5): 503–13. <https://doi.org/10.1007/s10059-009-0069-0>.
- Ishizaki, T, M Naito, K Fujisawa, M Maekawa, N Watanabe, Y Saito, and S Narumiya. 1997. "P160ROCK, a Rho-Associated Coiled-Coil Forming Protein Kinase, Works Downstream of Rho and Induces Focal Adhesions." *FEBS Letters* 404 (2–3): 118–24. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(97\)00107-5](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(97)00107-5).
- Ivanov, Andre, Jeff Pawlikowski, Indrani Manoharan, John van Tuyn, David M Nelson, Taranjit Singh Rai, Parisha P Shah, et al. 2013. "Lysosome-Mediated Processing of Chromatin in Senescence." *The Journal of Cell Biology* 202 (1): 129–43. <https://doi.org/10.1083/jcb.201212110>.
- Jaalouk, Diana E, and Jan Lammerding. 2009. "Mechanotransduction Gone Awry." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 10 (1): 63–73. <https://doi.org/10.1038/nrm2597>.
- Jacob, Abitha, and Rytis Prekeris. 2015. "The Regulation of MMP Targeting to Invadopodia during Cancer Metastasis." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 3: 4. <https://doi.org/10.3389/fcell.2015.00004>.

- Jain, Rakesh K. 2003. "Molecular Regulation of Vessel Maturation." *Nature Medicine* 9 (6): 685–93. <https://doi.org/10.1038/nm0603-685>.
- Jakobsson, Lars, Claudio A Franco, Katie Bentley, Russell T Collins, Bas Ponsioen, Irene M Aspalter, Ian Rosewell, et al. 2010. "Endothelial Cells Dynamically Compete for the Tip Cell Position during Angiogenic Sprouting." *Nature Cell Biology* 12 (10): 943–53. <https://doi.org/10.1038/ncb2103>.
- Janzen, Viktor, Randolph Forkert, Heather E Fleming, Yoriko Saito, Michael T Waring, David M Dombkowski, Tao Cheng, Ronald A DePinho, Norman E Sharpless, and David T Scadden. 2006. "Stem-Cell Ageing Modified by the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor P16INK4a." *Nature* 443 (7110): 421–26. <https://doi.org/10.1038/nature05159>.
- Järveläinen, Hannu, Annele Sainio, Markku Koulu, Thomas N Wight, and Risto Penttinen. 2009. "Extracellular Matrix Molecules: Potential Targets in Pharmacotherapy." *Pharmacological Reviews* 61 (2): 198–223. <https://doi.org/10.1124/pr.109.001289>.
- Jia, Zhuo-Min, Xing Ai, Jing-Fei Teng, Yun-Peng Wang, Bao-Jun Wang, and Xu Zhang. 2016. "P21 and CK2 Interaction-Mediated HDAC2 Phosphorylation Modulates KLF4 Acetylation to Regulate Bladder Cancer Cell Proliferation." *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 37 (6): 8293–8304. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4618-1>.
- Jilkova, Zuzana Macek, Justyna Lisowska, Sandra Manet, Claude Verdier, Valerie Deplano, Christian Geindreau, Eva Faurobert, et al. 2014. "CCM Proteins Control Endothelial B1 Integrin Dependent Response to Shear Stress." *Biology Open* 3 (12): 1228–35. <https://doi.org/10.1242/bio.201410132>.
- Julian, Linda, and Michael F Olson. 2014. "Rho-Associated Coiled-Coil Containing Kinases (ROCK): Structure, Regulation, and Functions." *Small GTPases* 5: e29846. <https://doi.org/10.4161/sgtp.29846>.
- Jung, Keun-Hwa, Kon Chu, Sang-Wuk Jeong, Hee-Kwon Park, Hee-Joon Bae, and Byung-Woo Yoon. 2003. "Cerebral Cavernous Malformations with Dynamic and Progressive Course: Correlation Study with Vascular Endothelial Growth Factor." *Archives of Neurology* 60 (11): 1613–18. <https://doi.org/10.1001/archneur.60.11.1613>.
- Jung, Seung Hee, Hyun Jung Hwang, Donghee Kang, Hyun A Park, Hyung Chul Lee, Daecheol Jeong, Keunwook Lee, Heon Joo Park, Young-Gyu Ko, and Jae-Seon Lee. 2019. "MTOR Kinase Leads to PTEN-Loss-Induced Cellular Senescence by Phosphorylating P53." *Oncogene* 38 (10): 1639–50. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0521-8>.
- Kadler, Karl E, Adele Hill, and Elizabeth G Canty-Laird. 2008. "Collagen Fibrillogenesis: Fibronectin, Integrins, and Minor Collagens as Organizers and Nucleators." *Current Opinion in Cell Biology* 20 (5): 495–501. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.06.008>.
- Kamaraju, Anil K, and Anita B Roberts. 2005. "Role of Rho/ROCK and P38 MAP Kinase Pathways in Transforming Growth Factor-Beta-Mediated Smad-Dependent Growth Inhibition of Human Breast Carcinoma Cells in Vivo." *The Journal of Biological Chemistry* 280 (2): 1024–36. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403960200>.
- Kang, Chanhee, Qikai Xu, Timothy D Martin, Mamie Z Li, Marco Demaria, Liviu Aron, Tao Lu, Bruce A Yankner, Judith Campisi, and Stephen J Elledge. 2015. "The DNA Damage Response Induces Inflammation and Senescence by Inhibiting Autophagy of GATA4." *Science (New York, N.Y.)* 349 (6255): aaa5612. <https://doi.org/10.1126/science.aaa5612>.
- Kang, Tae-Won, Tetyana Yevsa, Norman Woller, Lisa Hoenicke, Torsten Wuestefeld, Daniel Dauch, Anja Hohmeyer, et al. 2011. "Senescence Surveillance of Pre-Malignant Hepatocytes Limits Liver Cancer Development." *Nature* 479 (7374): 547–51. <https://doi.org/10.1038/nature10599>.

- Kaplon, Joanna, Liang Zheng, Katrin Meissl, Barbara Chaneton, Vitaly A Selivanov, Gillian Mackay, Sjoerd H van der Burg, et al. 2013. "A Key Role for Mitochondrial Gatekeeper Pyruvate Dehydrogenase in Oncogene-Induced Senescence." *Nature* 498 (7452): 109–12. <https://doi.org/10.1038/nature12154>.
- Kar, Souvik, Arpita Baisanry, Arya Nabavi, and Helmut Bertalanffy. 2016. "Role of Delta-Notch Signaling in Cerebral Cavernous Malformations." *Neurosurgical Review* 39 (4): 581–89. <https://doi.org/10.1007/s10143-015-0699-y>.
- Kassianidou, Elena, and Sanjay Kumar. 2015. "A Biomechanical Perspective on Stress Fiber Structure and Function." *Biochimica et Biophysica Acta* 1853 (11 Pt B): 3065–74. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.04.006>.
- Kelly, Brian D, Sean F Hackett, Kiichi Hirota, Yuji Oshima, Zheqing Cai, Shannon Berg-Dixon, Ashley Rowan, Zhijiang Yan, Peter A Campochiaro, and Gregg L Semenza. 2003. "Cell Type-Specific Regulation of Angiogenic Growth Factor Gene Expression and Induction of Angiogenesis in Nonischemic Tissue by a Constitutively Active Form of Hypoxia-Inducible Factor 1." *Circulation Research* 93 (11): 1074–81. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000102937.50486.1B>.
- Khatau, Shyam B, Christopher M Hale, P J Stewart-Hutchinson, Meet S Patel, Colin L Stewart, Peter C Searson, Didier Hodzic, and Denis Wirtz. 2009. "A Perinuclear Actin Cap Regulates Nuclear Shape." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (45): 19017–22. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908686106>.
- Kim, Miso, Suji Kim, Jae Hyang Lim, ChuHee Lee, Hyoung Chul Choi, and Chang-Hoon Woo. 2012. "Laminar Flow Activation of ERK5 Protein in Vascular Endothelium Leads to Atheroprotective Effect via NF-E2-Related Factor 2 (Nrf2) Activation." *The Journal of Biological Chemistry* 287 (48): 40722–31. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.381509>.
- Kim, Myoung Ok, Sung-Hyun Kim, Yong-Yeon Cho, Janos Nadas, Chul-Ho Jeong, Ke Yao, Dong Joon Kim, et al. 2012. "ERK1 and ERK2 Regulate Embryonic Stem Cell Self-Renewal through Phosphorylation of Klf4." *Nature Structural & Molecular Biology* 19 (3): 283–90. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2217>.
- Kim, Young Hwa, Yong Won Choi, Jeonghun Lee, Euy Young Soh, Jang-Hee Kim, and Tae Jun Park. 2017. "Senescent Tumor Cells Lead the Collective Invasion in Thyroid Cancer." *Nature Communications* 8 (May): 15208. <https://doi.org/10.1038/ncomms15208>.
- Kobayashi, Eri H, Takafumi Suzuki, Ryo Funayama, Takeshi Nagashima, Makiko Hayashi, Hiroki Sekine, Nobuyuki Tanaka, et al. 2016. "Nrf2 Suppresses Macrophage Inflammatory Response by Blocking Proinflammatory Cytokine Transcription." *Nature Communications* 7 (May): 11624. <https://doi.org/10.1038/ncomms11624>.
- Korn, Claudia, and Hellmut G Augustin. 2015. "Mechanisms of Vessel Pruning and Regression." *Developmental Cell* 34 (1): 5–17. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.06.004>.
- Kortlever, Roderik M, Paul J Higgins, and René Bernards. 2006. "Plasminogen Activator Inhibitor-1 Is a Critical Downstream Target of P53 in the Induction of Replicative Senescence." *Nature Cell Biology* 8 (8): 877–84. <https://doi.org/10.1038/ncb1448>.
- Koskimäki, Janne, Romuald Girard, Yan Li, Laleh Saadat, Hussein A Zeineddine, Rhonda Lightle, Thomas Moore, et al. 2019. "Comprehensive Transcriptome Analysis of Cerebral Cavernous Malformation across Multiple Species and Genotypes." *JCI Insight* 4 (3). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.126167>.
- Kovacic, Jason C, Nadia Mercader, Miguel Torres, Manfred Boehm, and Valentin Fuster. 2012. "Epithelial-to-Mesenchymal and Endothelial-to-Mesenchymal Transition: From Cardiovascular Development to Disease." *Circulation* 125 (14): 1795–1808. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.040352>.

- Koyama, M, M Ito, J Feng, T Seko, K Shiraki, K Takase, D J Hartshorne, and T Nakano. 2000. "Phosphorylation of CPI-17, an Inhibitory Phosphoprotein of Smooth Muscle Myosin Phosphatase, by Rho-Kinase." *FEBS Letters* 475 (3): 197–200. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(00\)01654-9](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)01654-9).
- Kritsilis, Marios, Sophia V Rizou, Paraskevi N Koutsoudaki, Konstantinos Evangelou, Vassilis G Gorgoulis, and Dimitrios Papadopoulos. 2018. "Ageing, Cellular Senescence and Neurodegenerative Disease." *International Journal of Molecular Sciences* 19 (10). <https://doi.org/10.3390/ijms19102937>.
- Krizbai, István A, Ákos Gasparics, Péter Nagyórszi, Csilla Fazakas, Judit Molnár, Imola Wilhelm, Rita Bencs, László Rosivall, and Attila Sebe. 2015. "Endothelial-Mesenchymal Transition of Brain Endothelial Cells: Possible Role during Metastatic Extravasation." *PLoS One* 10 (3): e0123845. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123845>.
- Krizhanovsky, Valery, Monica Yon, Ross A Dickins, Stephen Hearn, Janelle Simon, Cornelius Miething, Herman Yee, Lars Zender, and Scott W Lowe. 2008. "Senescence of Activated Stellate Cells Limits Liver Fibrosis." *Cell* 134 (4): 657–67. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.06.049>.
- Krtolica, Ana, Simona Parrinello, Stephen Lockett, Pierre-Yves Desprez, and Judith Campisi. 2001. "Senescent Fibroblasts Promote Epithelial Cell Growth and Tumorigenesis: A Link between Cancer and Aging." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (21): 12072–77. <https://doi.org/10.1073/pnas.211053698>.
- Kruse, Jan-Philipp, and Wei Gu. 2009. "Modes of P53 Regulation." *Cell* 137 (4): 609–22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.050>.
- Kuilman, Thomas, Chrysiis Michaloglou, Liesbeth C W Vredevelde, Sirith Douma, Remco van Doorn, Christophe J Desmet, Lucien A Aarden, Wolter J Mooi, and Daniel S Peeper. 2008. "Oncogene-Induced Senescence Relayed by an Interleukin-Dependent Inflammatory Network." *Cell* 133 (6): 1019–31. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.039>.
- Kumar, Akhilesh, Saritha Sandra D'Souza, Oleg V Moskvina, Huishi Toh, Bowen Wang, Jue Zhang, Scott Swanson, Lian-Wang Guo, James A Thomson, and Igor I Slukvin. 2017. "Specification and Diversification of Pericytes and Smooth Muscle Cells from Mesenchymoangioblasts." *Cell Reports* 19 (9): 1902–16. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.05.019>.
- Kuo, C T, M L Veselits, K P Barton, M M Lu, C Clendenin, and J M Leiden. 1997. "The LKLF Transcription Factor Is Required for Normal Tunica Media Formation and Blood Vessel Stabilization during Murine Embryogenesis." *Genes & Development* 11 (22): 2996–3006. <https://doi.org/10.1101/gad.11.22.2996>.
- Kureishi, Y, S Kobayashi, M Amano, K Kimura, H Kanaide, T Nakano, K Kaibuchi, and M Ito. 1997. "Rho-Associated Kinase Directly Induces Smooth Muscle Contraction through Myosin Light Chain Phosphorylation." *The Journal of Biological Chemistry* 272 (19): 12257–60. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.19.12257>.
- Kurz, Haymo, Torsten Gärtner, Peter S. Egli, and Bodo Christ. 1996. "First Blood Vessels in the Avian Neural Tube Are Formed by a Combination of Dorsal Angioblast Immigration and Ventral Sprouting of Endothelial Cells." *Developmental Biology* 173 (1): 133–47. <https://doi.org/10.1006/dbio.1996.0012>.
- Laberge, Remi-Martin, Pierre Awad, Judith Campisi, and Pierre-Yves Desprez. 2012. "Epithelial-Mesenchymal Transition Induced by Senescent Fibroblasts." *Cancer Microenvironment : Official Journal of the International Cancer Microenvironment Society* 5 (1): 39–44. <https://doi.org/10.1007/s12307-011-0069-4>.

- Lai, Yi, Yang Shen, Xiao-Heng Liu, Yi Zhang, Ye Zeng, and Ying-Fen Liu. 2011. "Interleukin-8 Induces the Endothelial Cell Migration through the Activation of Phosphoinositide 3-Kinase-Rac1/RhoA Pathway." *International Journal of Biological Sciences* 7 (6): 782–91. <https://doi.org/10.7150/ijbs.7.782>.
- Lampugnani, M G, M Resnati, M Raiteri, R Pigott, A Pisacane, G Houen, L P Ruco, and E Dejana. 1992. "A Novel Endothelial-Specific Membrane Protein Is a Marker of Cell-Cell Contacts." *The Journal of Cell Biology* 118 (6): 1511–22. <https://doi.org/10.1083/jcb.118.6.1511>.
- Lanner, Fredrik, Marcus Sohl, and Filip Farnebo. 2007. "Functional Arterial and Venous Fate Is Determined by Graded VEGF Signaling and Notch Status during Embryonic Stem Cell Differentiation." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27 (3): 487–93. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000255990.91805.6d>.
- Lant, Benjamin, Bin Yu, Marilyn Goudreault, Doug Holmyard, James D R Knight, Peter Xu, Linda Zhao, et al. 2015. "CCM-3/STRIPAK Promotes Seamless Tube Extension through Endocytic Recycling." *Nature Communications* 6 (1): 6449. <https://doi.org/10.1038/ncomms7449>.
- Lawson, N D, N Scheer, V N Pham, C H Kim, A B Chitnis, J A Campos-Ortega, and B M Weinstein. 2001. "Notch Signaling Is Required for Arterial-Venous Differentiation during Embryonic Vascular Development." *Development (Cambridge, England)* 128 (19): 3675–83.
- Guelte, Armelle Le, Eva-Maria Galan-Moya, Julie Dwyer, Lucas Treps, Garance Kettler, Jagoda K Hebda, Sonia Dubois, et al. 2012. "Semaphorin 3A Elevates Endothelial Cell Permeability through PP2A Inactivation." *Journal of Cell Science* 125 (Pt 17): 4137–46. <https://doi.org/10.1242/jcs.108282>.
- Lee, Bo Yun, Jung A Han, Jun Sub Im, Amelia Morrone, Kimberly Johung, Edward C Goodwin, Wim J Kleijer, Daniel DiMaio, and Eun Seong Hwang. 2006. "Senescence-Associated Beta-Galactosidase Is Lysosomal Beta-Galactosidase." *Aging Cell* 5 (2): 187–95. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2006.00199.x>.
- Lee, P-F, Y Bai, R L Smith, K J Bayless, and A T Yeh. 2013. "Angiogenic Responses Are Enhanced in Mechanically and Microscopically Characterized, Microbial Transglutaminase Crosslinked Collagen Matrices with Increased Stiffness." *Acta Biomaterialia* 9 (7): 7178–90. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.04.001>.
- Lee, Soyoung, and Clemens A Schmitt. 2019. "The Dynamic Nature of Senescence in Cancer." *Nature Cell Biology* 21 (1): 94–101. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0249-2>.
- Lenard, Anna, Elin Ellertsdottir, Lukas Herwig, Alice Krudewig, Loïc Sauter, Heinz-Georg Belting, and Markus Affolter. 2013. "In Vivo Analysis Reveals a Highly Stereotypic Morphogenetic Pathway of Vascular Anastomosis." *Developmental Cell* 25 (5): 492–506. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.05.010>.
- Levental, Kandice R, Hongmei Yu, Laura Kass, Johnathon N Lakins, Mikala Egeblad, Janine T Erler, Sheri F T Fong, et al. 2009. "Matrix Crosslinking Forces Tumor Progression by Enhancing Integrin Signaling." *Cell* 139 (5): 891–906. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.10.027>.
- Li, Fangfei, Yu Lan, Youliang Wang, Jun Wang, Guan Yang, Fanwei Meng, Hua Han, Anming Meng, Yaping Wang, and Xiao Yang. 2011. "Endothelial Smad4 Maintains Cerebrovascular Integrity by Activating N-Cadherin through Cooperation with Notch." *Developmental Cell* 20 (3): 291–302. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.01.011>.
- Li, Jia, Yang Zhao, Paul Coleman, Jinbiao Chen, Ka Ka Ting, Jaesung Peter Choi, Xiangjian Zheng, Mathew A Vadas, and Jennifer R Gamble. 2019. "Low Fluid Shear Stress Conditions Contribute to Activation of Cerebral Cavernous Malformation Signalling Pathways." *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease* 1865 (11): 165519. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.07.013>.

- Li, Shaohua, Caroline Van Den Diepstraten, Sudhir J D'Souza, Bosco M C Chan, and J Geoffrey Pickering. 2003. "Vascular Smooth Muscle Cells Orchestrate the Assembly of Type I Collagen via Alpha2beta1 Integrin, RhoA, and Fibronectin Polymerization." *The American Journal of Pathology* 163 (3): 1045–56. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)63464-5](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)63464-5).
- Li, Wen, Yonghan He, Rongping Zhang, Guangrong Zheng, and Daohong Zhou. 2019. "The Curcumin Analog EF24 Is a Novel Senolytic Agent." *Aging* 11 (2): 771–82. <https://doi.org/10.18632/aging.101787>.
- Lin, A W, M Barradas, J C Stone, L van Aelst, M Serrano, and S W Lowe. 1998. "Premature Senescence Involving P53 and P16 Is Activated in Response to Constitutive MEK/MAPK Mitogenic Signaling." *Genes & Development* 12 (19): 3008–19. <https://doi.org/10.1101/gad.12.19.3008>.
- Lisowska, Justyna, Claudia Jasmin Ro, Sandra Manet, Yekaterina A Miroshnikova, Cyril Boyault, Emmanuelle Planus, Elisabeth Tournier-Iasserve, and Martial Balland. 2018. "The CCM1 – CCM2 Complex Controls Complementary Functions of ROCK1 and ROCK2 That Are Required for Endothelial Integrity" 3: 1–15. <https://doi.org/10.1242/jcs.216093>.
- Liu, Dan, and Peter J Hornsby. 2007. "Senescent Human Fibroblasts Increase the Early Growth of Xenograft Tumors via Matrix Metalloproteinase Secretion." *Cancer Research* 67 (7): 3117–26. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3452>.
- Liu, Jian J, Rebecca A Stockton, Alexandre R Gingras, Ararat J Ablooglu, Jaewon Han, Andrey A Bobkov, and Mark H Ginsberg. 2011. "A Mechanism of Rap1-Induced Stabilization of Endothelial Cell–Cell Junctions." *Molecular Biology of the Cell* 22 (14): 2509–19. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-02-0157>.
- Liu, Zhijun, John L Tan, Daniel M Cohen, Michael T Yang, Nathan J Sniadecki, Sami Alom Ruiz, Celeste M Nelson, and Christopher S Chen. 2010. "Mechanical Tugging Force Regulates the Size of Cell-Cell Junctions." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (22): 9944–49. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914547107>.
- Lobjois, Valérie. 2005. "Cyclin D." *Med Sci (Paris)* 21 (1): 19–22. <https://doi.org/10.1051/medsci/200521119>.
- Loughna, Siobhan, and Thomas N Sato. 2001. "Angiopoietin and Tie Signaling Pathways in Vascular Development." *Matrix Biology* 20 (5): 319–25. [https://doi.org/10.1016/S0945-053X\(01\)00149-4](https://doi.org/10.1016/S0945-053X(01)00149-4).
- Lowe, Scott W, Enrique Cepero, and Gerard Evan. 2004. "Intrinsic Tumour Suppression." *Nature* 432 (7015): 307–15. <https://doi.org/10.1038/nature03098>.
- Lowery, Drew M, Karl R Clauser, Majbrit Hjerrild, Dan Lim, Jes Alexander, Kazuhiro Kishi, Shao-En Ong, Steen Gammeltoft, Steven A Carr, and Michael B Yaffe. 2007. "Proteomic Screen Defines the Polo-Box Domain Interactome and Identifies Rock2 as a Plk1 Substrate." *The EMBO Journal* 26 (9): 2262–73. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601683>.
- Lu, Pengfei, Ken Takai, Valerie M Weaver, and Zena Werb. 2011. "Extracellular Matrix Degradation and Remodeling in Development and Disease." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3 (12). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005058>.
- Lucas, Treps, and Gavard Julie. 2015. "L'angiogenèse Tumorale (44)," no. 1: 989–95.
- Macip, Salvador, Makoto Igarashi, Li Fang, Angus Chen, Zhen-Qiang Pan, Sam W Lee, and Stuart A Aaronson. 2002. "Inhibition of P21-Mediated ROS Accumulation Can Rescue P21-Induced Senescence." *The EMBO Journal* 21 (9): 2180–88. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.9.2180>.

- MacVicar, Brian A, and Eric A Newman. 2015. "Astrocyte Regulation of Blood Flow in the Brain." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7 (5). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020388>.
- Maddaluno, Luigi, Noemi Rudini, Roberto Cuttano, Luca Bravi, Costanza Giampietro, Monica Corada, Luca Ferrarini, et al. 2013. "EndMT Contributes to the Onset and Progression of Cerebral Cavernous Malformations." *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature12207>.
- Maekawa, M, T Ishizaki, S Boku, N Watanabe, A Fujita, A Iwamatsu, T Obinata, K Ohashi, K Mizuno, and S Narumiya. 1999. "Signaling from Rho to the Actin Cytoskeleton through Protein Kinases ROCK and LIM-Kinase." *Science (New York, N.Y.)* 285 (5429): 895–98. <https://doi.org/10.1126/science.285.5429.895>.
- Mahmoud, Marwa, Celine Souilhol, Jovana Serbanovic-Canic, and Paul Evans. 2019. "GATA4-Twist1 Signalling in Disturbed Flow-Induced Atherosclerosis." *Cardiovascular Drugs and Therapy* 33 (2): 231–37. <https://doi.org/10.1007/s10557-019-06863-3>.
- Makanya, Andrew N., Ruslan Hlushchuk, and Valentin G. Djonov. 2009. "Intussusceptive Angiogenesis and Its Role in Vascular Morphogenesis, Patterning, and Remodeling." *Angiogenesis* 12 (2): 113–23. <https://doi.org/10.1007/s10456-009-9129-5>.
- Malinverno, Matteo, Claudio Maderna, Abdallah Abu Taha, Monica Corada, Fabrizio Orsenigo, Mariaelena Valentino, Federica Pisati, et al. 2019. "Endothelial Cell Clonal Expansion in the Development of Cerebral Cavernous Malformations." *Nature Communications* 10 (1): 2761. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10707-x>.
- Mancini, Maria L, Aleksandra Terzic, Barbara A Conley, Leif H Oxburgh, Teodora Nicola, and Calvin P H Vary. 2009. "Endoglin Plays Distinct Roles in Vascular Smooth Muscle Cell Recruitment and Regulation of Arteriovenous Identity during Angiogenesis." *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists* 238 (10): 2479–93. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22066>.
- Maninová, Miloslava, and Tomáš Vomastek. 2016. "Dorsal Stress Fibers, Transverse Actin Arcs, and Perinuclear Actin Fibers Form an Interconnected Network That Induces Nuclear Movement in Polarizing Fibroblasts." *The FEBS Journal*. England. <https://doi.org/10.1111/febs.13836>.
- Mao, Yong, and Jean E Schwarzbauer. 2005. "Fibronectin Fibrillogenesis, a Cell-Mediated Matrix Assembly Process." *Matrix Biology : Journal of the International Society for Matrix Biology* 24 (6): 389–99. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2005.06.008>.
- Marcelo, Kathrina L., Lauren C. Goldie, and Karen K. Hirschi. 2013. "Regulation of Endothelial Cell Differentiation and Specification." *Circulation Research* 112 (9): 1272–87. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.300506>.
- Marchi, Saverio, Mariangela Corricelli, Eliana Trapani, Luca Bravi, Alessandra Pittaro, Simona Delle Monache, Letizia Ferroni, et al. 2015. "Defective Autophagy Is a Key Feature of Cerebral Cavernous Malformations." *EMBO Molecular Medicine* 7 (11): 1403–17. <https://doi.org/10.15252/emmm.201505316>.
- Matheu, Ander, Antonio Maraver, Peter Klatt, Ignacio Flores, Isabel Garcia-Cao, Consuelo Borrás, Juana M Flores, Jose Viña, Maria A Blasco, and Manuel Serrano. 2007. "Delayed Ageing through Damage Protection by the Arf/P53 Pathway." *Nature* 448 (7151): 375–79. <https://doi.org/10.1038/nature05949>.
- Matsui, T, M Maeda, Y Doi, S Yonemura, M Amano, K Kaibuchi, S Tsukita, and S Tsukita. 1998. "Rho-Kinase Phosphorylates COOH-Terminal Threonines of Ezrin/Radixin/Moesin (ERM) Proteins and Regulates Their Head-to-Tail Association." *The Journal of Cell Biology* 140 (3): 647–57. <https://doi.org/10.1083/jcb.140.3.647>.

- McDonald, J A, D G Kelley, and T J Broekelmann. 1982. "Role of Fibronectin in Collagen Deposition: Fab' to the Gelatin-Binding Domain of Fibronectin Inhibits Both Fibronectin and Collagen Organization in Fibroblast Extracellular Matrix." *The Journal of Cell Biology* 92 (2): 485–92. <https://doi.org/10.1083/jcb.92.2.485>.
- McQuibban, G Angus, Jiang-Hong Gong, Julie P Wong, John L Wallace, Ian Clark-Lewis, and Christopher M Overall. 2002. "Matrix Metalloproteinase Processing of Monocyte Chemoattractant Proteins Generates CC Chemokine Receptor Antagonists with Anti-Inflammatory Properties in Vivo." *Blood* 100 (4): 1160–67.
- Medici, Damian. 2016. "Endothelial-Mesenchymal Transition in Regenerative Medicine." *Stem Cells International* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/6962801>.
- Mehta, Vedanta, Kar-Lai Pang, Daniel Rozbesky, Katrin Nather, Adam Keen, Dariusz Lachowski, Youxin Kong, et al. 2020. "The Guidance Receptor Plexin D1 Is a Mechanosensor in Endothelial Cells." *Nature* 578 (7794): 290–95. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1979-4>.
- Meinke, Peter, Thuy Duong Nguyen, and Manfred S Wehnert. 2011. "The LINC Complex and Human Disease." *Biochemical Society Transactions* 39 (6): 1693–97. <https://doi.org/10.1042/BST20110658>.
- Meng, Chao, Yongping He, Zhaoqiang Wei, Yulin Lu, Fu Du, Guofang Ou, Nan Wang, et al. 2018. "MRTF-A Mediates the Activation of COL1A1 Expression Stimulated by Multiple Signaling Pathways in Human Breast Cancer Cells." *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 104 (August): 718–28. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.05.092>.
- Meng, Fanyong, Isa Mambetsariev, Yufeng Tian, Yvonne Beckham, Angelo Meliton, Alan Leff, Margaret L Gardel, Michael J Allen, Konstantin G Birukov, and Anna A Birukova. 2015. "Attenuation of Lipopolysaccharide-Induced Lung Vascular Stiffening by Lipoxin Reduces Lung Inflammation." *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 52 (2): 152–61. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0468OC>.
- Milanovic, Maja, Dorothy N Y Fan, Dimitri Belenki, J Henry M Däbritz, Zhen Zhao, Yong Yu, Jan R Dörr, et al. 2018. "Senescence-Associated Reprogramming Promotes Cancer Stemness." *Nature* 553 (7686): 96–100. <https://doi.org/10.1038/nature25167>.
- Milanovic, Maja, Yong Yu, and Clemens A Schmitt. 2018. "The Senescence-Stemness Alliance - A Cancer-Hijacked Regeneration Principle." *Trends in Cell Biology* 28 (12): 1049–61. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.09.001>.
- Miyajima, Chiharu, Yuki Kawarada, Yasumichi Inoue, Chiaki Suzuki, Kana Mitamura, Daisuke Morishita, Nobumichi Ohoka, Takeshi Imamura, and Hidetoshi Hayashi. 2020. "Transcriptional Coactivator TAZ Negatively Regulates Tumor Suppressor P53 Activity and Cellular Senescence." *Cells* 9 (1). <https://doi.org/10.3390/cells9010171>.
- Mohammadi, Moosa, Shaun K Olsen, and Regina Goetz. 2005. "A Protein Canyon in the FGF-FGF Receptor Dimer Selects from an à La Carte Menu of Heparan Sulfate Motifs." *Current Opinion in Structural Biology* 15 (5): 506–16. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2005.09.002>.
- Monaghan, Elizabeth, Volodia Gueorguiev, Cynthia Wilkins-Port, and Paula J McKeown-Longo. 2004. "The Receptor for Urokinase-Type Plasminogen Activator Regulates Fibronectin Matrix Assembly in Human Skin Fibroblasts." *The Journal of Biological Chemistry* 279 (2): 1400–1407. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310374200>.
- Morgan, Mark R, Martin J Humphries, and Mark D Bass. 2007. "Synergistic Control of Cell Adhesion by Integrins and Syndecans." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8 (12): 957–69. <https://doi.org/10.1038/nrm2289>.

- Morgan-Fisher, Marie, Ulla M Wewer, and Atsuko Yoneda. 2013. "Regulation of ROCK Activity in Cancer." *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society* 61 (3): 185–98. <https://doi.org/10.1369/0022155412470834>.
- Morita, K, H Sasaki, M Furuse, and S Tsukita. 1999. "Endothelial Claudin: Claudin-5/TMVCF Constitutes Tight Junction Strands in Endothelial Cells." *The Journal of Cell Biology* 147 (1): 185–94. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.1.185>.
- Morrison, Leslie, and Amy Akers. 2019. "Cerebral Cavernous Malformation , Familial Summary Genetic Counseling Diagnosis Suggestive Findings." *GeneReviews*, 1–26.
- Mosteiro, Lluç, Cristina Pantoja, Alba de Martino, and Manuel Serrano. 2018. "Senescence Promotes in Vivo Reprogramming through P16(INK)(4a) and IL-6." *Aging Cell* 17 (2). <https://doi.org/10.1111/ace.12711>.
- Mott, Joni D, and Zena Werb. 2004. "Regulation of Matrix Biology by Matrix Metalloproteinases." *Current Opinion in Cell Biology* 16 (5): 558–64. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.07.010>.
- Muñoz-Espín, Daniel, Marta Cañamero, Antonio Maraver, Gonzalo Gómez-López, Julio Contreras, Silvia Murillo-Cuesta, Alfonso Rodríguez-Baeza, et al. 2013. "Programmed Cell Senescence during Mammalian Embryonic Development." *Cell* 155 (5): 1104–18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.019>.
- Muñoz-Espín, Daniel, and Manuel Serrano. 2014. "Cellular Senescence: From Physiology to Pathology." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 15 (7): 482–96. <https://doi.org/10.1038/nrm3823>.
- Murphy, Gillian. 2008. "The ADAMs: Signalling Scissors in the Tumour Microenvironment." *Nature Reviews. Cancer* 8 (12): 929–41. <https://doi.org/10.1038/nrc2459>.
- Murthy, Swetha E, Adrienne E Dubin, Tess Whitwam, Sebastian Jojoa-Cruz, Stuart M Cahalan, Seyed Ali Reza Mousavi, Andrew B Ward, and Ardem Patapoutian. 2018. "OSCA/TMEM63 Are an Evolutionarily Conserved Family of Mechanically Activated Ion Channels." *ELife* 7 (November). <https://doi.org/10.7554/eLife.41844>.
- Nakagawa, O, K Fujisawa, T Ishizaki, Y Saito, K Nakao, and S Narumiya. 1996. "ROCK-I and ROCK-II, Two Isoforms of Rho-Associated Coiled-Coil Forming Protein Serine/Threonine Kinase in Mice." *FEBS Letters* 392 (2): 189–93. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00811-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00811-3).
- Narita, Masashi, Sabrina Núñez, Edith Heard, Masako Narita, Athena W Lin, Stephen A Hearn, David L Spector, Gregory J Hannon, and Scott W Lowe. 2003. "Rb-Mediated Heterochromatin Formation and Silencing of E2F Target Genes during Cellular Senescence." *Cell* 113 (6): 703–16. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00401-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00401-x).
- Nawroth, Roman, Gregor Poell, Alexander Ranft, Stephan Kloep, Ulrike Samulowitz, Gregor Fachinger, Matthew Golding, David T Shima, Urban Deutsch, and Dietmar Vestweber. 2002. "VE-PTP and VE-Cadherin Ectodomains Interact to Facilitate Regulation of Phosphorylation and Cell Contacts." *The EMBO Journal* 21 (18): 4885–95. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf497>.
- Nelson, Glyn, James Wordsworth, Chunfang Wang, Diana Jurk, Conor Lawless, Carmen Martin-Ruiz, and Thomas von Zglinicki. 2012. "A Senescent Cell Bystander Effect: Senescence-Induced Senescence." *Aging Cell* 11 (2): 345–49. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2012.00795.x>.
- Newell-Litwa, Karen A, Mathilde Badoual, Hannelore Asmussen, Heather Patel, Leanna Whitmore, and Alan Rick Horwitz. 2015. "ROCK1 and 2 Differentially Regulate Actomyosin Organization to Drive Cell and Synaptic Polarity." *The Journal of Cell Biology* 210 (2): 225–42. <https://doi.org/10.1083/jcb.201504046>.

- Niu, Niu, Suowen Xu, Yanni Xu, Peter J Little, and Zheng-Gen Jin. 2019. "Targeting Mechanosensitive Transcription Factors in Atherosclerosis." *Trends in Pharmacological Sciences* 40 (4): 253–66. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2019.02.004>.
- Nunes, Kenia Pedrosa, Christine S Rigsby, and R Clinton Webb. 2010. "RhoA/Rho-Kinase and Vascular Diseases: What Is the Link?" *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 67 (22): 3823–36. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0460-1>.
- Ohanna, Mickaël, Yann Cheli, Caroline Bonet, Vanessa F Bonazzi, Marilyn Allegra, Sandy Giuliano, Karine Bille, et al. 2013. "Secretome from Senescent Melanoma Engages the STAT3 Pathway to Favor Reprogramming of Naive Melanoma towards a Tumor-Initiating Cell Phenotype." *Oncotarget* 4 (12): 2212–24. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1143>.
- Ohnesorge, Nils, Dorothee Viemann, Nicole Schmidt, Tobias Czymai, Désirée Spiering, Mirco Schmolke, Stephan Ludwig, Johannes Roth, Matthias Goebeler, and Marc Schmidt. 2010. "Erk5 Activation Elicits a Vasoprotective Endothelial Phenotype via Induction of Kruppel-like Factor 4 (KLF4)." *The Journal of Biological Chemistry* 285 (34): 26199–210. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.103127>.
- Ohtani, N, Z Zebedee, T J Huot, J A Stinson, M Sugimoto, Y Ohashi, A D Sharrocks, G Peters, and E Hara. 2001. "Opposing Effects of Ets and Id Proteins on P16INK4a Expression during Cellular Senescence." *Nature* 409 (6823): 1067–70. <https://doi.org/10.1038/35059131>.
- Oldenburg, Joppe, Gerard van der Krogt, Floor Twiss, Annika Bongaarts, Yasmin Habani, Johan A Slotman, Adriaan Houtsmuller, Stephan Huvneers, and Johan de Rooij. 2015. "VASP, Zyxin and TES Are Tension-Dependent Members of Focal Adherens Junctions Independent of the α -Catenin-Vinculin Module." *Scientific Reports* 5 (November): 17225. <https://doi.org/10.1038/srep17225>.
- Olson, Eric N, and Alfred Nordheim. 2010. "Linking Actin Dynamics and Gene Transcription to Drive Cellular Motile Functions." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 11 (5): 353–65. <https://doi.org/10.1038/nrm2890>.
- Orjalo, Arturo V, Dipa Bhaumik, Bridget K Gengler, Gary K Scott, and Judith Campisi. 2009. "Cell Surface-Bound IL-1 α Is an Upstream Regulator of the Senescence-Associated IL-6/IL-8 Cytokine Network." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (40): 17031–36. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905299106>.
- Orlidge, A, and P A D'Amore. 1987. "Inhibition of Capillary Endothelial Cell Growth by Pericytes and Smooth Muscle Cells." *The Journal of Cell Biology* 105 (3): 1455–62. <https://doi.org/10.1083/jcb.105.3.1455>.
- Orsenigo, Fabrizio, Costanza Giampietro, Aldo Ferrari, Monica Corada, Ariane Galaup, Sara Sigismund, Giuseppe Ristagno, et al. 2012. "Phosphorylation of VE-Cadherin Is Modulated by Haemodynamic Forces and Contributes to the Regulation of Vascular Permeability in Vivo." *Nature Communications* 3: 1208. <https://doi.org/10.1038/ncomms2199>.
- Ottaviano, Adam J, Limin Sun, Vijayalakshmi Ananthanarayanan, and Hidayatullah G Munshi. 2006. "Extracellular Matrix-Mediated Membrane-Type 1 Matrix Metalloproteinase Expression in Pancreatic Ductal Cells Is Regulated by Transforming Growth Factor-Beta1." *Cancer Research* 66 (14): 7032–40. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4421>.
- Oubaha, Malika, Khalil Miloudi, Agnieszka Dejda, Vera Guber, Gaëlle Mawambo, Marie-Anne Germain, Guillaume Bourdel, et al. 2016. "Senescence-Associated Secretory Phenotype Contributes to Pathological Angiogenesis in Retinopathy." *Science Translational Medicine* 8 (362): 362ra144. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf9440>.

- Padarti, Akhil, and Jun Zhang. 2018. "Recent Advances in Cerebral Cavernous Malformation Research." *Vessel Plus* 2. <https://doi.org/10.20517/2574-1209.2018.34>.
- Paez-Ribes, Marta, Estela González-Gualda, Gary J Doherty, and Daniel Muñoz-Espín. 2019. "Targeting Senescent Cells in Translational Medicine." *EMBO Molecular Medicine* 11 (12): e10234. <https://doi.org/10.15252/emmm.201810234>.
- Page-McCaw, Andrea, Andrew J Ewald, and Zena Werb. 2007. "Matrix Metalloproteinases and the Regulation of Tissue Remodelling." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8 (3): 221–33. <https://doi.org/10.1038/nrm2125>.
- Pagenstecher, Axel, Sonja Stahl, Ulrich Sure, and Ute Felbor. 2009. "A Two-Hit Mechanism Causes Cerebral Cavernous Malformations: Complete Inactivation of CCM1, CCM2 or CCM3 in Affected Endothelial Cells." *Human Molecular Genetics* 18 (5): 911–18. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn420>.
- Palmero, I, C Pantoja, and M Serrano. 1998. "P19ARF Links the Tumour Suppressor P53 to Ras." *Nature*. England. <https://doi.org/10.1038/25870>.
- Panayotou, G, P End, M Aumailley, R Timpl, and J Engel. 1989. "Domains of Laminin with Growth-Factor Activity." *Cell* 56 (1): 93–101. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90987-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90987-2).
- Parmar, Kush M, H Benjamin Larman, Guohao Dai, Yuzhi Zhang, Eric T Wang, Sripriya N Moorthy, Johannes R Kratz, et al. 2006. "Integration of Flow-Dependent Endothelial Phenotypes by Kruppel-like Factor 2." *The Journal of Clinical Investigation* 116 (1): 49–58. <https://doi.org/10.1172/JCI24787>.
- Parsons, J Thomas, Alan Rick Horwitz, and Martin A Schwartz. 2010. "Cell Adhesion: Integrating Cytoskeletal Dynamics and Cellular Tension." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 11 (9): 633–43. <https://doi.org/10.1038/nrm2957>.
- Patel-Hett, Sunita, and Patricia A. D'Amore. 2011. "Signal Transduction in Vasculogenesis and Developmental Angiogenesis." *International Journal of Developmental Biology* 55 (4–5): 353–69. <https://doi.org/10.1387/ijdb.103213sp>.
- Pearson, M, R Carbone, C Sebastiani, M Cioce, M Fagioli, S Saito, Y Higashimoto, et al. 2000. "PML Regulates P53 Acetylation and Premature Senescence Induced by Oncogenic Ras." *Nature* 406 (6792): 207–10. <https://doi.org/10.1038/35018127>.
- Peet, Daniel, and Sarah Linke. 2006. "Regulation of HIF: Asparaginyl Hydroxylation." *Novartis Foundation Symposium* 272: 37-53,131-140.
- Pellegrin, Stéphanie, and Harry Mellor. 2007. "Actin Stress Fibres." *Journal of Cell Science* 120 (Pt 20): 3491–99. <https://doi.org/10.1242/jcs.018473>.
- Pepper, M S. 1997. "Transforming Growth Factor-Beta: Vasculogenesis, Angiogenesis, and Vessel Wall Integrity." *Cytokine & Growth Factor Reviews* 8 (1): 21–43. [https://doi.org/10.1016/s1359-6101\(96\)00048-2](https://doi.org/10.1016/s1359-6101(96)00048-2).
- Piccolo, Stefano, Sirio Dupont, and Michelangelo Cordenonsi. 2014. "The Biology of YAP/TAZ: Hippo Signaling and Beyond." *Physiological Reviews* 94 (4): 1287–1312. <https://doi.org/10.1152/physrev.00005.2014>.
- Piera-Velazquez, Sonsoles, and Sergio A. Jimenez. 2019. "Endothelial to Mesenchymal Transition: Role in Physiology and in the Pathogenesis of Human Diseases." *Physiological Reviews* 99 (2): 1281–1324. <https://doi.org/10.1152/physrev.00021.2018>.

- Platel, Valentin, Sébastien Faure, Isabelle Corre, and Nicolas Clere. 2019. "Endothelial-to-Mesenchymal Transition (EndoMT): Roles in Tumorigenesis, Metastatic Extravasation and Therapy Resistance." *Journal of Oncology* 2019: 8361945. <https://doi.org/10.1155/2019/8361945>.
- Plummer, Nicholas W, Carol J Gallione, Sudha Srinivasan, Jon S Zawistowski, David N Louis, and Douglas A Marchuk. 2004. "Loss of P53 Sensitizes Mice with a Mutation in Ccm1 (KRIT1) to Development of Cerebral Vascular Malformations." *The American Journal of Pathology* 165 (5): 1509–18. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63409-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63409-8).
- Pollard, Thomas D. 2007. "Regulation of Actin Filament Assembly by Arp2/3 Complex and Formins." *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 36: 451–77. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.35.040405.101936>.
- Potenta, S, E Zeisberg, and R Kalluri. 2008. "The Role of Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer Progression." *British Journal of Cancer* 99 (9): 1375–79. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604662>.
- Potter, Daniel R, Jurgen van Teeffelen, Hans Vink, and Bernard M van den Berg. 2015. "Perturbed Mechanotransduction by Endothelial Surface Glycocalyx Modification Greatly Impairs the Arteriogenic Process." *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 309 (4): H711-7. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00257.2015>.
- Pries, A R, T W Secomb, and P Gaehtgens. 2000. "The Endothelial Surface Layer." *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology* 440 (5): 653–66. <https://doi.org/10.1007/s004240000307>.
- Public, Orphanet Grand. 2008. "Le Cavernome Cérébral." *Encyclopédie Orphanet Grand Public*, 1–12. www.orpha.net/data/patho/Pub/fr/CavernomeCerebral-FRfrPub1072.pdf.
- Rai, Taranjit Singh, and Peter D Adams. 2012. "Lessons from Senescence: Chromatin Maintenance in Non-Proliferating Cells." *Biochimica et Biophysica Acta* 1819 (3–4): 322–31. <https://doi.org/10.1016/j.bbarm.2011.07.014>.
- Ramsauer, Markus, Dorothee Krause, and Rolf Dermietzel. 2002. "Angiogenesis of the Blood-Brain Barrier in Vitro and the Function of Cerebral Pericytes." *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16 (10): 1274–76. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0814fje>.
- Rath, Matthias, Axel Pagenstecher, Alexander Hoischen, and Ute Felbor. 2019. "Postzygotic Mosaicism in Cerebral Cavernous Malformation." *Journal of Medical Genetics* 57 (3): 212–16. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2019-106182>.
- Reitsma, Sietze, Dick W Slaaf, Hans Vink, Marc A M J van Zandvoort, and Mirjam G A oude Egbrink. 2007. "The Endothelial Glycocalyx: Composition, Functions, and Visualization." *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology* 454 (3): 345–59. <https://doi.org/10.1007/s00424-007-0212-8>.
- Renz, Marc, Cécile Otten, Eva Faurobert, Franziska Rudolph, Yuan Zhu, Gwénola Boulday, Johan Duchene, et al. 2015. "Regulation of B1 Integrin-Klf2-Mediated Angiogenesis by CCM Proteins." *Developmental Cell* 32 (2): 181–90. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.12.016>.
- Retta, Saverio Francesco, and Angela J Glading. 2016. "Oxidative Stress and Inflammation in Cerebral Cavernous Malformation Disease Pathogenesis: Two Sides of the Same Coin." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 81 (Pt B): 254–70. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.09.011>.
- Riabov, Vladimir, Alexandru Gudima, Nan Wang, Amanda Mickley, Alexander Orekhov, and Julia Kzhyshkowska. 2014. "Role of Tumor Associated Macrophages in Tumor Angiogenesis and Lymphangiogenesis." *Frontiers in Physiology* 5: 75. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00075>.

- Riant, Florence, Françoise Bergametti, Xavier Ayrignac, Gwenola Boulday, and Elisabeth Tournier-Lasserre. 2010. "Recent Insights into Cerebral Cavernous Malformations: The Molecular Genetics of CCM." *The FEBS Journal* 277 (5): 1070–75. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07535.x>.
- Riento, Kirsi, Rosa M Guasch, Ritu Garg, Boquan Jin, and Anne J Ridley. 2003. "RhoE Binds to ROCK I and Inhibits Downstream Signaling." *Molecular and Cellular Biology* 23 (12): 4219–29. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.12.4219-4229.2003>.
- Riento, Kirsi, Nick Totty, Priam Villalonga, Ritu Garg, Rosa Guasch, and Anne J Ridley. 2005. "RhoE Function Is Regulated by ROCK I-Mediated Phosphorylation." *The EMBO Journal* 24 (6): 1170–80. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600612>.
- Ritschka, Birgit, Mekayla Storer, Alba Mas, Florian Heinzmann, Mari Carmen Ortells, Jennifer P Morton, Owen J Sansom, Lars Zender, and William M Keyes. 2017. "The Senescence-Associated Secretory Phenotype Induces Cellular Plasticity and Tissue Regeneration." *Genes & Development* 31 (2): 172–83. <https://doi.org/10.1101/gad.290635.116>.
- Riveline, D, E Zamir, N Q Balaban, U S Schwarz, T Ishizaki, S Narumiya, Z Kam, B Geiger, and A D Bershadsky. 2001. "Focal Contacts as Mechanosensors: Externally Applied Local Mechanical Force Induces Growth of Focal Contacts by an MDia1-Dependent and ROCK-Independent Mechanism." *The Journal of Cell Biology* 153 (6): 1175–86. <https://doi.org/10.1083/jcb.153.6.1175>.
- Rödel, Claudia Jasmin, Cécile Otten, Stefan Donat, Marta Lourenço, Dorothea Fischer, Benno Kuroepka, Alessio Paolini, Christian Freund, and Salim Abdelilah-Seyfried. 2019. "Blood Flow Suppresses Vascular Anomalies in a Zebrafish Model of Cerebral Cavernous Malformations." *Circulation Research* 125 (10): e43–54. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.315076>.
- Rodriguez, Pedro L, Sutapa Sahay, Oyeniye O Olabisi, and Ian P Whitehead. 2007. "ROCK I-Mediated Activation of NF-KappaB by RhoB." *Cellular Signalling* 19 (11): 2361–69. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.07.021>.
- Rosen, Jonathan N, Vanessa M Sogah, Lillian Y Ye, and John D Mably. 2013. "Ccm2-like Is Required for Cardiovascular Development as a Novel Component of the Heg-CCM Pathway." *Developmental Biology* 376 (1): 74–85. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.01.006>.
- Ross, Tyler D, Brian G Coon, Sanguk Yun, Nicolas Baeyens, Keiichiro Tanaka, Mingxing Ouyang, and Martin A Schwartz. 2013. "Integrins in Mechanotransduction." *Current Opinion in Cell Biology* 25 (5): 613–18. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2013.05.006>.
- Rozario, Tania, and Douglas W DeSimone. 2010. "The Extracellular Matrix in Development and Morphogenesis: A Dynamic View." *Developmental Biology* 341 (1): 126–40. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.10.026>.
- Ruhrberg, Christiana, Holger Gerhardt, Matthew Golding, Rose Watson, Sofia Ioannidou, Hajime Fujisawa, Christer Betsholtz, and David T Shima. 2002. "Spatially Restricted Patterning Cues Provided by Heparin-Binding VEGF-A Control Blood Vessel Branching Morphogenesis." *Genes & Development* 16 (20): 2684–98. <https://doi.org/10.1101/gad.242002>.
- Sack, Kelsey D, Madelane Teran, and Matthew A Nugent. 2016. "Extracellular Matrix Stiffness Controls VEGF Signaling and Processing in Endothelial Cells." *Journal of Cellular Physiology* 231 (9): 2026–39. <https://doi.org/10.1002/jcp.25312>.
- Sadaie, Mahito, Rafik Salama, Thomas Carroll, Kosuke Tomimatsu, Tamir Chandra, Andrew R J Young, Masako Narita, et al. 2013. "Redistribution of the Lamin B1 Genomic Binding Profile Affects Rearrangement of Heterochromatic Domains and SAHF Formation during Senescence." *Genes & Development* 27 (16): 1800–1808. <https://doi.org/10.1101/gad.217281.113>.

- Sagiv, Adi, Dominick G A Burton, Zhana Moshayev, Ezra Vadai, Felix Wensveen, Shifra Ben-Dor, Ofra Golani, Bojan Polic, and Valery Krizhanovsky. 2016. "NKG2D Ligands Mediate Immunosurveillance of Senescent Cells." *Aging* 8 (2): 328–44. <https://doi.org/10.18632/aging.100897>.
- Sainson, Richard C A, Douglas A Johnston, Henry C Chu, Matthew T Holderfield, Martin N Nakatsu, Steven P Crampton, Jaeger Davis, Erin Conn, and Christopher C W Hughes. 2008. "TNF Primes Endothelial Cells for Angiogenic Sprouting by Inducing a Tip Cell Phenotype." *Blood* 111 (10): 4997–5007. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-08-108597>.
- Sakuma, Kunihiro, Mai Akiho, Hiroyuki Nakashima, Hiroshi Akima, and Masahiro Yasuhara. 2008. "Age-Related Reductions in Expression of Serum Response Factor and Myocardin-Related Transcription Factor A in Mouse Skeletal Muscles." *Biochimica et Biophysica Acta* 1782 (7–8): 453–61. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2008.03.008>.
- Sakurai, Atsuko, Colleen L Doçi, and J Silvio Gutkind. 2012. "Semaphorin Signaling in Angiogenesis, Lymphangiogenesis and Cancer." *Cell Research* 22 (1): 23–32. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.198>.
- Salama, Rafik, Mahito Sadaie, Matthew Hoare, and Masashi Narita. 2014. "Cellular Senescence and Its Effector Programs." *Genes & Development* 28 (2): 99–114. <https://doi.org/10.1101/gad.235184.113>.
- Salceda, S, and J Caro. 1997. "Hypoxia-Inducible Factor 1alpha (HIF-1alpha) Protein Is Rapidly Degraded by the Ubiquitin-Proteasome System under Normoxic Conditions. Its Stabilization by Hypoxia Depends on Redox-Induced Changes." *The Journal of Biological Chemistry* 272 (36): 22642–47. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.36.22642>.
- Salotti, Jacqueline, and Peter F Johnson. 2019. "Regulation of Senescence and the SASP by the Transcription Factor C/EBPβ." *Experimental Gerontology* 128 (December): 110752. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2019.110752>.
- Samuel, Michael S, Jose I Lopez, Ewan J McGhee, Daniel R Croft, David Strachan, Paul Timpson, June Munro, et al. 2011. "Actomyosin-Mediated Cellular Tension Drives Increased Tissue Stiffness and β-Catenin Activation to Induce Epidermal Hyperplasia and Tumor Growth." *Cancer Cell* 19 (6): 776–91. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.05.008>.
- Sangwung, Panjamaporn, Guangjin Zhou, Lalitha Nayak, E Ricky Chan, Sandeep Kumar, Dong-won Kang, Rongli Zhang, et al. 2017. "KLF2 and KLF4 Control Endothelial Identity and Vascular Integrity" 2 (4): 1–9. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.91700DS1>.
- Saoncella, S, F Echtermeyer, F Denhez, J K Nowlen, D F Mosher, S D Robinson, R O Hynes, and P F Goetinck. 1999. "Syndecan-4 Signals Cooperatively with Integrins in a Rho-Dependent Manner in the Assembly of Focal Adhesions and Actin Stress Fibers." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (6): 2805–10. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.6.2805>.
- Sapet, Cédric, Stéphanie Simoncini, Béatrice Lorioid, Denis Puthier, José Sampol, Catherine Nguyen, Françoise Dignat-George, and Francine Anfosso. 2006. "Thrombin-Induced Endothelial Microparticle Generation: Identification of a Novel Pathway Involving ROCK-II Activation by Caspase-2." *Blood* 108 (6): 1868–76. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-04-014175>.
- Schaefer, Liliana, and Roland M Schaefer. 2010. "Proteoglycans: From Structural Compounds to Signaling Molecules." *Cell and Tissue Research* 339 (1): 237–46. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0821-y>.
- Schaks, Matthias, Grégory Giannone, and Klemens Rottner. 2019. "Actin Dynamics in Cell Migration." *Essays in Biochemistry* 63 (5): 483–95. <https://doi.org/10.1042/EBC20190015>.

- Schulz, Gerald B, Elfriede Wieland, Joycelyn Wüsthube-Lausch, Gwénola Boulday, Iris Moll, Elisabeth Tournier-Lasserre, and Andreas Fischer. 2015. "Cerebral Cavernous Malformation-1 Protein Controls DLL4-Notch3 Signaling Between the Endothelium and Pericytes." *Stroke* 46 (5): 1337–43. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.114.007512>.
- Schwartz, Martin Alexander. 2010. "Integrins and Extracellular Matrix in Mechanotransduction." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (12): a005066. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005066>.
- Sebbagh, M, C Renvoizé, J Hamelin, N Riché, J Bertoglio, and J Bréard. 2001. "Caspase-3-Mediated Cleavage of ROCK I Induces MLC Phosphorylation and Apoptotic Membrane Blebbing." *Nature Cell Biology* 3 (4): 346–52. <https://doi.org/10.1038/35070019>.
- Sebbagh, Michael, Jocelyne Hamelin, Jacques Bertoglio, Eric Solary, and Jacqueline Bréard. 2005. "Direct Cleavage of ROCK II by Granzyme B Induces Target Cell Membrane Blebbing in a Caspase-Independent Manner." *The Journal of Experimental Medicine* 201 (3): 465–71. <https://doi.org/10.1084/jem.20031877>.
- Sechler, J L, and J E Schwarzbauer. 1997. "Coordinated Regulation of Fibronectin Fibril Assembly and Actin Stress Fiber Formation." *Cell Adhesion and Communication* 4 (6): 413–24. <https://doi.org/10.3109/15419069709004458>.
- Sen, Payel, Yemin Lan, Catherine Y Li, Simone Sidoli, Greg Donahue, Zhixun Dou, Brian Frederick, et al. 2019. "Histone Acetyltransferase P300 Induces De Novo Super-Enhancers to Drive Cellular Senescence." *Molecular Cell* 73 (4): 684-698.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.01.021>.
- Sena, Laura A, and Navdeep S Chandel. 2012. "Physiological Roles of Mitochondrial Reactive Oxygen Species." *Molecular Cell* 48 (2): 158–67. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.025>.
- SenBanerjee, Sucharita, Zhiyong Lin, G Brandon Atkins, Daniel M Greif, Ravi M Rao, Ajay Kumar, Mark W Feinberg, et al. 2004. "KLF2 Is a Novel Transcriptional Regulator of Endothelial Proinflammatory Activation." *The Journal of Experimental Medicine* 199 (10): 1305–15. <https://doi.org/10.1084/jem.20031132>.
- Serrano, M, A W Lin, M E McCurrach, D Beach, and S W Lowe. 1997. "Oncogenic Ras Provokes Premature Cell Senescence Associated with Accumulation of P53 and P16INK4a." *Cell* 88 (5): 593–602. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81902-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81902-9).
- Shadfan, Miriam, Vanessa Lopez-Pajares, and Zhi-Min Yuan. 2012. "MDM2 and MDMX: Alone and Together in Regulation of P53." *Translational Cancer Research* 1 (2): 88–89.
- Sharpless, N E, and R A DePinho. 1999. "The INK4A/ARF Locus and Its Two Gene Products." *Current Opinion in Genetics & Development* 9 (1): 22–30. [https://doi.org/10.1016/s0959-437x\(99\)80004-5](https://doi.org/10.1016/s0959-437x(99)80004-5).
- Shenkar, Robert, J Paul Elliott, Katrina Diener, Judith Gault, Ling-Jia Hu, Randall J Cohrs, Tzulip Phang, Lawrence Hunter, Robert E Breeze, and Issam A Awad. 2003. "Differential Gene Expression in Human Cerebrovascular Malformations." *Neurosurgery* 52 (2): 465–68. <https://doi.org/10.1227/01.neu.0000044131.03495.22>.
- Shenkar, Robert, Changbin Shi, Cecilia Austin, Thomas Moore, Rhonda Lightle, Ying Cao, Lingjiao Zhang, et al. 2017. "RhoA Kinase Inhibition With Fasudil Versus Simvastatin in Murine Models of Cerebral Cavernous Malformations." *Stroke* 48 (1): 187–94. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.116.015013>.
- Shi, Changbin, Robert Shenkar, H Hunt Batjer, Irene J Check, and Issam A Awad. 2007. "Oligoclonal Immune Response in Cerebral Cavernous Malformations. Laboratory Investigation." *Journal of Neurosurgery* 107 (5): 1023–26. <https://doi.org/10.3171/JNS-07/11/1023>.

- Shi, Changbin, Robert Shenkar, Hongyan Du, Edward Duckworth, Harish Raja, H Hunt Batjer, and Issam A Awad. 2009. "Immune Response in Human Cerebral Cavernous Malformations." *Stroke* 40 (5): 1659–65. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.538769>.
- Shi, Changbin, Robert Shenkar, Hussein A Zeineddine, Romuald Girard, Maged D Fam, Cecilia Austin, Thomas Moore, et al. 2016. "B-Cell Depletion Reduces the Maturation of Cerebral Cavernous Malformations in Murine Models." *Journal of Neuroimmune Pharmacology : The Official Journal of the Society on Neuroimmune Pharmacology* 11 (2): 369–77. <https://doi.org/10.1007/s11481-016-9670-0>.
- Shi, Dingding, and Wei Gu. 2012. "Dual Roles of MDM2 in the Regulation of P53: Ubiquitination Dependent and Ubiquitination Independent Mechanisms of MDM2 Repression of P53 Activity." *Genes & Cancer* 3 (3–4): 240–48. <https://doi.org/10.1177/1947601912455199>.
- Shimi, Takeshi, Veronika Butin-Israeli, Stephen A Adam, Robert B Hamanaka, Anne E Goldman, Catherine A Lucas, Dale K Shumaker, Steven T Kosak, Navdeep S Chandel, and Robert D Goldman. 2011. "The Role of Nuclear Lamin B1 in Cell Proliferation and Senescence." *Genes & Development* 25 (24): 2579–93. <https://doi.org/10.1101/gad.179515.111>.
- Short, S M, G A Talbott, and R L Juliano. 1998. "Integrin-Mediated Signaling Events in Human Endothelial Cells." *Molecular Biology of the Cell* 9 (8): 1969–80. <https://doi.org/10.1091/mbc.9.8.1969>.
- Siemerink, Martin J., Ingeborg Klaassen, Ilse M.C. Vogels, Arjan W. Griffioen, Cornelis J.F. Van Noorden, and Reinier O. Schlingemann. 2012. "CD34 Marks Angiogenic Tip Cells in Human Vascular Endothelial Cell Cultures." *Angiogenesis* 15 (1): 151–63. <https://doi.org/10.1007/s10456-011-9251-z>.
- Song, Jeongmin, Matthew J Duncan, Guojie Li, Cheryl Chan, Richard Grady, Ann Stapleton, and Soman N Abraham. 2007. "A Novel TLR4-Mediated Signaling Pathway Leading to IL-6 Responses in Human Bladder Epithelial Cells." *PLoS Pathogens* 3 (4): e60. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030060>.
- Stein, G H, M Beeson, and L Gordon. 1990. "Failure to Phosphorylate the Retinoblastoma Gene Product in Senescent Human Fibroblasts." *Science (New York, N.Y.)* 249 (4969): 666–69. <https://doi.org/10.1126/science.2166342>.
- Stockton, Rebecca A, Robert Shenkar, Issam A Awad, and Mark H Ginsberg. 2010. "Cerebral Cavernous Malformations Proteins Inhibit Rho Kinase to Stabilize Vascular Integrity" 207 (4): 881–96. <https://doi.org/10.1084/jem.20091258>.
- Storer, Mekayla, Alba Mas, Alexandre Robert-Moreno, Matteo Pecoraro, M Carmen Ortells, Valeria Di Giacomo, Reut Yosef, et al. 2013. "Senescence Is a Developmental Mechanism That Contributes to Embryonic Growth and Patterning." *Cell* 155 (5): 1119–30. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.041>.
- Stupack, Dwayne G, and David A Cheresch. 2002. "ECM Remodeling Regulates Angiogenesis: Endothelial Integrins Look for New Ligands." *Science's STKE : Signal Transduction Knowledge Environment* 2002 (119): pe7. <https://doi.org/10.1126/stke.2002.119.pe7>.
- Suchting, Steven, Catarina Freitas, Ferdinand le Noble, Rui Benedito, Christiane Bréant, Antonio Duarte, and Anne Eichmann. 2007. "The Notch Ligand Delta-like 4 Negatively Regulates Endothelial Tip Cell Formation and Vessel Branching." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (9): 3225–30. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611177104>.
- Sure, U, N Butz, J Schlegel, A M Siegel, J P Wakat, H D Mennel, S Bien, and H Bertalanffy. 2001. "Endothelial Proliferation, Neoangiogenesis, and Potential de Novo Generation of Cerebrovascular Malformations." *Journal of Neurosurgery* 94 (6): 972–77. <https://doi.org/10.3171/jns.2001.94.6.0972>.

- Swain, Sandip M, Joelle M-J Romac, Rafiq A Shahid, Stephen J Pandol, Wolfgang Liedtke, Steven R Vigna, and Rodger A Liddle. 2020. "TRPV4 Channel Opening Mediates Pressure-Induced Pancreatitis Initiated by Piezo1 Activation." *The Journal of Clinical Investigation* 130 (5): 2527–41. <https://doi.org/10.1172/JCI134111>.
- Takano, Takahiro, Guo-Feng Tian, Weiguo Peng, Nanhong Lou, Witold Libionka, Xiaoning Han, and Maiken Nedergaard. 2006. "Astrocyte-Mediated Control of Cerebral Blood Flow." *Nature Neuroscience* 9 (2): 260–67. <https://doi.org/10.1038/nn1623>.
- Tamm, I, T Kikuchi, I Cardinale, and J G Krueger. 1994. "Cell-Adhesion-Disrupting Action of Interleukin 6 in Human Ductal Breast Carcinoma Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (8): 3329–33. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.8.3329>.
- Tammela, Tuomas, Georgia Zarkada, Harri Nurmi, Lars Jakobsson, Krista Heinolainen, Denis Tvorogov, Wei Zheng, et al. 2011. "VEGFR-3 Controls Tip to Stalk Conversion at Vessel Fusion Sites by Reinforcing Notch Signalling." *Nature Cell Biology* 13 (10): 1202–13. <https://doi.org/10.1038/ncb2331>.
- Tammela, Tuomas, Georgia Zarkada, Elisabet Wallgard, Aino Murtomäki, Steven Suchting, Maria Wirzenius, Marika Waltari, et al. 2008. "Blocking VEGFR-3 Suppresses Angiogenic Sprouting and Vascular Network Formation." *Nature* 454 (7204): 656–60. <https://doi.org/10.1038/nature07083>.
- Tanaka, Toru, Dai Nishimura, Ray-Chang Wu, Mutsuki Amano, Tatsuya Iso, Larry Kedes, Hiroshi Nishida, Koza Kaibuchi, and Yasuo Hamamori. 2006. "Nuclear Rho Kinase, ROCK2, Targets P300 Acetyltransferase." *The Journal of Biological Chemistry* 281 (22): 15320–29. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510954200>.
- Tang, Alan T, Jaesung P Choi, Jonathan J Kotzin, Yiqing Yang, Courtney C Hong, Nicholas Hobson, Romuald Girard, et al. 2017. "Endothelial TLR4 and the Microbiome Drive Cerebral Cavernous Malformations." *Nature* 545 (7654): 305–10. <https://doi.org/10.1038/nature22075>.
- Taniguchi, H, F V Jacinto, A Villanueva, A F Fernandez, H Yamamoto, F J Carmona, S Puertas, et al. 2012. "Silencing of Kruppel-like Factor 2 by the Histone Methyltransferase EZH2 in Human Cancer." *Oncogene* 31 (15): 1988–94. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.387>.
- Tanriover, Gamze, Yasemin Seval, Leyla Sati, Murat Gunel, and Necdet Demir. 2009. "CCM2 and CCM3 Proteins Contribute to Vasculogenesis and Angiogenesis in Human Placenta." *Histology and Histopathology* 24 (10): 1287–94. <https://doi.org/10.14670/HH-24.1287>.
- Taranum, Surayya, Ilknur Sur, Rolf Müller, Wenshu Lu, R N Rashmi, Martina Munck, Sascha Neumann, Iakowos Karakesisoglou, and Angelika A Noegel. 2012. "Cytoskeletal Interactions at the Nuclear Envelope Mediated by Nesprins." *International Journal of Cell Biology* 2012: 736524. <https://doi.org/10.1155/2012/736524>.
- Tepper, Oren M, Jennifer M Capla, Robert D Galiano, Daniel J Ceradini, Matthew J Callaghan, Mark E Kleinman, and Geoffrey C Gurtner. 2005. "Adult Vasculogenesis Occurs through in Situ Recruitment, Proliferation, and Tubulization of Circulating Bone Marrow-Derived Cells." *Blood* 105 (3): 1068–77. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-03-1051>.
- Theocharis, Achilleas D, Spyros S Skandalis, Chrysostomi Gialeli, and Nikos K Karamanos. 2016. "Extracellular Matrix Structure." *Advanced Drug Delivery Reviews* 97 (February): 4–27. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.001>.
- Thi, Mia M, John M Tarbell, Sheldon Weinbaum, and David C Spray. 2004. "The Role of the Glycocalyx in Reorganization of the Actin Cytoskeleton under Fluid Shear Stress: A 'Bumper-Car' Model." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (47): 16483–88. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407474101>.

- Thirant, Cécile, Eva-Maria Galan-Moya, Luiz Gustavo Dubois, Sébastien Pinte, Philippe Chafey, Cédric Broussard, Pascale Varlet, et al. 2012. "Differential Proteomic Analysis of Human Glioblastoma and Neural Stem Cells Reveals HDGF as a Novel Angiogenic Secreted Factor." *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 30 (5): 845–53. <https://doi.org/10.1002/stem.1062>.
- Thuan, Duong Thi Bich, Hatem Zayed, Ali H Eid, Haissam Abou-Saleh, Gheyath K Nasrallah, Arduino A Mangoni, and Gianfranco Pintus. 2018. "A Potential Link Between Oxidative Stress and Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Systemic Sclerosis." *Frontiers in Immunology* 9: 1985. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01985>.
- Tonini, Tiziana, Francesca Rossi, and Pier Paolo Claudio. 2003. "Molecular Basis of Angiogenesis and Cancer." *Oncogene* 22 (42): 6549–56. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206816>.
- Torrino, Stéphanie, François-René Roustan, Lisa Kaminski, Thomas Bertero, Sabrina Pisano, Damien Ambrosetti, Maeva Dufies, et al. 2019. "UBTD1 Is a Mechano-Regulator Controlling Cancer Aggressiveness." *EMBO Reports* 20 (4). <https://doi.org/10.15252/embr.201846570>.
- Twiss, Floor, Quint Le Duc, Suzanne Van Der Horst, Hamid Tabdili, Gerard Van Der Krogt, Ning Wang, Holger Rehmann, Stephan Huvneers, Deborah E Leckband, and Johan De Rooij. 2012. "Vinculin-Dependent Cadherin Mechanosensing Regulates Efficient Epithelial Barrier Formation." *Biology Open* 1 (11): 1128–40. <https://doi.org/10.1242/bio.20122428>.
- Tzima, Eleni, Mohamed Irani-Tehrani, William B Kiosses, Elizabetta Dejana, David A Schultz, Britta Engelhardt, Gaoyuan Cao, Horace DeLisser, and Martin Alexander Schwartz. 2005. "A Mechanosensory Complex That Mediates the Endothelial Cell Response to Fluid Shear Stress." *Nature* 437 (7057): 426–31. <https://doi.org/10.1038/nature03952>.
- Uhlik, Mark T, Amy N Abell, Nancy L Johnson, Weiyong Sun, Bruce D Cuevas, Katherine E Lobel-Rice, Eric A Horne, Mark L Dell'Acqua, and Gary L Johnson. 2003. "Rac-MEKK3-MKK3 Scaffolding for P38 MAPK Activation during Hyperosmotic Shock." *Nature Cell Biology* 5 (12): 1104–10. <https://doi.org/10.1038/ncb1071>.
- Ullman, K S, M A Powers, and D J Forbes. 1997. "Nuclear Export Receptors: From Importin to Exportin." *Cell* 90 (6): 967–70. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80361-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80361-x).
- Untergasser, G., R. Gander, H. Rumpold, E. Heinrich, E. Plas, and P. Berger. 2003. "TGF- β Cytokines Increase Senescence-Associated Beta-Galactosidase Activity in Human Prostate Basal Cells by Supporting Differentiation Processes, but Not Cellular Senescence." *Experimental Gerontology* 38 (10): 1179–88. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2003.08.008>.
- Untergasser, Gerold, Stephan Madersbacher, and Peter Berger. 2005. "Benign Prostatic Hyperplasia: Age-Related Tissue-Remodeling." *Experimental Gerontology* 40 (3): 121–28. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2004.12.008>.
- Vaeyens, Marie-Mo, Alvaro Jorge-Peñas, Jorge Barrasa-Fano, Apeksha Shapeti, Maarten Roeffaers, and Hans Van Oosterwyck. 2020. "Acto-Myosin Dependent Invasion of Endothelial Sprouts in Collagen." *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)*, June. <https://doi.org/10.1002/cm.21624>.
- Buul, Jaap D van, and Ilse Timmerman. 2016. "Small Rho GTPase-Mediated Actin Dynamics at Endothelial Adherens Junctions." *Small GTPases* 7 (1): 21–31. <https://doi.org/10.1080/21541248.2015.1131802>.
- Deursen, Jan M van. 2014. "The Role of Senescent Cells in Ageing." *Nature* 509 (7501): 439–46. <https://doi.org/10.1038/nature13193>.

- Vernier, Mathieu, Véronique Bourdeau, Marie-France Gaumont-Leclerc, Olga Moiseeva, Virginie Bégin, Fred Saad, Anne-Marie Mes-Masson, and Gerardo Ferbeyre. 2011. "Regulation of E2Fs and Senescence by PML Nuclear Bodies." *Genes & Development* 25 (1): 41–50. <https://doi.org/10.1101/gad.1975111>.
- Vichard, Ines Desanlis, Grant N Wheeler, and Dylan R Edwards. 2015. "The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs) Family." *Genome Biology* 16 (1): 113. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0676-3>.
- Wallez, Yann, and Philippe Huber. 2008. "Endothelial Adherens and Tight Junctions in Vascular Homeostasis, Inflammation and Angiogenesis." *Biochimica et Biophysica Acta* 1778 (3): 794–809. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.09.003>.
- Wang, Fang-Tao, Wei Sun, Jing-Tao Zhang, and Yue-Zu Fan. 2019. "Cancer-Associated Fibroblast Regulation of Tumor Neo-Angiogenesis as a Therapeutic Target in Cancer." *Oncology Letters* 17 (3): 3055–65. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.9973>.
- Wang, Jianwei, Hartmut Geiger, and K Lenhard Rudolph. 2011. "Immunoaging Induced by Hematopoietic Stem Cell Aging." *Current Opinion in Immunology* 23 (4): 532–36. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2011.05.004>.
- Wang, Kuei-Chun, Yi-Ting Yeh, Phu Nguyen, Elaine Limqueco, Jocelyn Lopez, Satenick Thorossian, Kun-Liang Guan, Yi-Shuan J Li, and Shu Chien. 2016. "Flow-Dependent YAP/TAZ Activities Regulate Endothelial Phenotypes and Atherosclerosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (41): 11525–30. <https://doi.org/10.1073/pnas.1613121113>.
- Wang, Nan, Rui Zhang, Shui-Jing Wang, Chun-Ling Zhang, Li-Bin Mao, Chun-Yu Zhuang, Yan-Yang Tang, Xue-Gang Luo, Hao Zhou, and Tong-Cun Zhang. 2013. "Vascular Endothelial Growth Factor Stimulates Endothelial Differentiation from Mesenchymal Stem Cells via Rho/Myocardin-Related Transcription Factor--a Signaling Pathway." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 45 (7): 1447–56. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.04.021>.
- Wang, Rui, Yan Wang, Ning Liu, Chunguang Ren, Cong Jiang, Kai Zhang, Su Yu, et al. 2013. "FBW7 Regulates Endothelial Functions by Targeting KLF2 for Ubiquitination and Degradation." *Cell Research* 23 (6): 803–19. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.42>.
- Wang, Yu, and Mark A McNiven. 2012. "Invasive Matrix Degradation at Focal Adhesions Occurs via Protease Recruitment by a FAK-P130Cas Complex." *The Journal of Cell Biology* 196 (3): 375–85. <https://doi.org/10.1083/jcb.201105153>.
- Warboys, Christina M, Amalia de Luca, Narges Amini, Le Luong, Hayley Duckles, Sarah Hsiao, Alex White, et al. 2014. "Disturbed Flow Promotes Endothelial Senescence via a P53-Dependent Pathway." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 34 (5): 985–95. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.303415>.
- WATSON, J D. 1972. "Origin of Concatemeric T7DNA." *Nature New Biology* 239 (94): 197–201. <https://doi.org/10.1038/newbio239197a0>.
- Wei, Shu, Ye Li, Sean P Polster, Christopher R Weber, Issam A Awad, and Le Shen. 2020. "Cerebral Cavernous Malformation Proteins in Barrier Maintenance and Regulation." *International Journal of Molecular Sciences* 21 (2). <https://doi.org/10.3390/ijms21020675>.
- Wei, Spencer C, and Jing Yang. 2016. "Forcing through Tumor Metastasis: The Interplay between Tissue Rigidity and Epithelial-Mesenchymal Transition." *Trends in Cell Biology* 26 (2): 111–20. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.09.009>.

- Wen, Wenyu, Wei Liu, Jing Yan, and Mingjie Zhang. 2008. "Structure Basis and Unconventional Lipid Membrane Binding Properties of the PH-C1 Tandem of Rho Kinases." *The Journal of Biological Chemistry* 283 (38): 26263–73. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803417200>.
- White, Eric S, and Andrés F Muro. 2011. "Fibronectin Splice Variants: Understanding Their Multiple Roles in Health and Disease Using Engineered Mouse Models." *IUBMB Life* 63 (7): 538–46. <https://doi.org/10.1002/iub.493>.
- Whitehead, Kevin J, Aubrey C Chan, Sutip Navankasattusas, Wonshill Koh, Nyall R London, Jing Ling, Anne H Mayo, et al. 2009. "The Cerebral Cavemous Malformation Signaling Pathway Promotes Vascular Integrity via Rho GTPases." *Nature Medicine* 15 (2): 177–84. <https://doi.org/10.1038/nm.1911>.
- Willis, Colin L, Lopa Leach, Garry J Clarke, Christopher C Nolan, and David E Ray. 2004. "Reversible Disruption of Tight Junction Complexes in the Rat Blood-Brain Barrier, Following Transitory Focal Astrocyte Loss." *Glia* 48 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1002/glia.20049>.
- Winkler, Ethan A, Robert D Bell, and Berislav V Zlokovic. 2011. "Lack of Smad or Notch Leads to a Fatal Game of Brain Pericyte Hopscotch." *Developmental Cell* 20 (3): 279–80. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.03.002>.
- Wright, W E, M A Piatyszek, W E Rainey, W Byrd, and J W Shay. 1996. "Telomerase Activity in Human Germline and Embryonic Tissues and Cells." *Developmental Genetics* 18 (2): 173–79. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6408\(1996\)18:2<173::AID-DVG10>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6408(1996)18:2<173::AID-DVG10>3.0.CO;2-3).
- Wu, C, V M Keivens, T E O'Toole, J A McDonald, and M H Ginsberg. 1995. "Integrin Activation and Cytoskeletal Interaction Are Essential for the Assembly of a Fibronectin Matrix." *Cell* 83 (5): 715–24. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90184-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90184-1).
- Wüstehube, Joycelyn, Arne Bartol, Sven S Liebler, René Brüttsch, Yuan Zhu, Ute Felbor, Ulrich Sure, Hellmut G Augustin, and Andreas Fischer. 2010. "Cerebral Cavemous Malformation Protein CCM1 Inhibits Sprouting Angiogenesis by Activating DELTA-NOTCH Signaling." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (28): 12640–45. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000132107>.
- Xie, Xi, Jing Peng, Xiuting Chang, Kaipeng Huang, Juan Huang, Shaogui Wang, Xiaoyan Shen, Peiqing Liu, and Heqing Huang. 2013. "Activation of RhoA/ROCK Regulates NF-KB Signaling Pathway in Experimental Diabetic Nephropathy." *Molecular and Cellular Endocrinology* 369 (1–2): 86–97. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.01.007>.
- Xie, Zhongwen, Wen Su, Shu Liu, Guogang Zhao, Karyn Esser, Elizabeth A Schroder, Mellani Lefta, Harald M Stauss, Zhenheng Guo, and Ming Cui Gong. 2015. "Smooth-Muscle BMAL1 Participates in Blood Pressure Circadian Rhythm Regulation." *The Journal of Clinical Investigation* 125 (1): 324–36. <https://doi.org/10.1172/JCI76881>.
- Xu, Jie, Jayanti Mathur, Emilie Vessières, Scott Hammack, Keiko Nonomura, Julie Favre, Linda Grimaud, et al. 2018. "GPR68 Senses Flow and Is Essential for Vascular Physiology." *Cell* 173 (3): 762-775.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.076>.
- Xu, Qing, Mei Liu, Ju Zhang, Liyan Xue, Guo Zhang, Chenfei Hu, Zaozao Wang, et al. 2016. "Overexpression of KLF4 Promotes Cell Senescence through MicroRNA-203-Survivin-P21 Pathway." *Oncotarget* 7 (37): 60290–302. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11200>.
- Yamamizu, Kohei, Taichi Matsunaga, Hideki Uosaki, Hiroyuki Fukushima, Shiori Katayama, Mina Hiraoka-Kanie, Kohnosuke Mitani, and Jun K Yamashita. 2010. "Convergence of Notch and Beta-Catenin Signaling Induces Arterial Fate in Vascular Progenitors." *The Journal of Cell Biology* 189 (2): 325–38. <https://doi.org/10.1083/jcb.200904114>.

- Yamazaki, Yu, Darren J Baker, Masaya Tachibana, Chia-Chen Liu, Jan M van Deursen, Thomas G Brott, Guojun Bu, and Takahisa Kanekiyo. 2016. "Vascular Cell Senescence Contributes to Blood-Brain Barrier Breakdown." *Stroke* 47 (4): 1068–77. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.115.010835>.
- Yancopoulos, G D, S Davis, N W Gale, J S Rudge, S J Wiegand, and J Holash. 2000. "Vascular-Specific Growth Factors and Blood Vessel Formation." *Nature* 407 (6801): 242–48. <https://doi.org/10.1038/35025215>.
- Yang, Baohua, and Victor Rizzo. 2013. "Shear Stress Activates ENOS at the Endothelial Apical Surface Through B1 Containing Integrins and Caveolae." *Cellular and Molecular Bioengineering* 6 (3): 346–54. <https://doi.org/10.1007/s12195-013-0276-9>.
- Yang, Gong, Daniel G Rosen, Zhihong Zhang, Robert C Jr Bast, Gordon B Mills, Justin A Colacino, Imelda Mercado-Uribe, and Jinsong Liu. 2006. "The Chemokine Growth-Regulated Oncogene 1 (Gro-1) Links RAS Signaling to the Senescence of Stromal Fibroblasts and Ovarian Tumorigenesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (44): 16472–77. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605752103>.
- Yang, Xiangsheng, Qi Li, Xi Lin, Yanlin Ma, Xiaojing Yue, Zhenyin Tao, Fen Wang, et al. 2012. "Mechanism of Fibrotic Cardiomyopathy in Mice Expressing Truncated Rho-Associated Coiled-Coil Protein Kinase 1." *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 26 (5): 2105–16. <https://doi.org/10.1096/fj.11-201319>.
- Yao, Mingxi, Wu Qiu, Ruchuan Liu, Artem K Efremov, Peiwen Cong, Rima Seddiki, Manon Payre, et al. 2014. "Force-Dependent Conformational Switch of α -Catenin Controls Vinculin Binding." *Nature Communications* 5 (1): 4525. <https://doi.org/10.1038/ncomms5525>.
- Yoneda, Atsuko, Hinke A B Multhaupt, and John R Couchman. 2005. "The Rho Kinases I and II Regulate Different Aspects of Myosin II Activity." *The Journal of Cell Biology* 170 (3): 443–53. <https://doi.org/10.1083/jcb.200412043>.
- Yoon, Hong S, Xinming Chen, and Vincent W Yang. 2003. "Kruppel-like Factor 4 Mediates P53-Dependent G1/S Cell Cycle Arrest in Response to DNA Damage." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (4): 2101–5. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211027200>.
- You, Chao, Ibrahim Erol Sandalcioğlu, Philipp Dammann, Ute Felbor, Ulrich Sure, and Yuan Zhu. 2013. "Loss of CCM3 Impairs DLL4-Notch Signalling: Implication in Endothelial Angiogenesis and in Inherited Cerebral Cavernous Malformations." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 17 (3): 407–18. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12022>.
- Young, Andrew R J, Masako Narita, Manuela Ferreira, Kristina Kirschner, Mahito Sadaie, Jeremy F J Darot, Simon Tavaré, et al. 2009. "Autophagy Mediates the Mitotic Senescence Transition." *Genes & Development* 23 (7): 798–803. <https://doi.org/10.1101/gad.519709>.
- Young, Arthur P, Susanne Schlisio, Yoji Andrew Minamishima, Qing Zhang, Lianjie Li, Chiara Grisanzio, Sabina Signoretti, and William G Jr Kaelin. 2008. "VHL Loss Actuates a HIF-Independent Senescence Programme Mediated by Rb and P400." *Nature Cell Biology* 10 (3): 361–69. <https://doi.org/10.1038/ncb1699>.
- Yurchenco, Peter D. 2011. "Basement Membranes: Cell Scaffoldings and Signaling Platforms." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3 (2): 1–27. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004911>.
- Zaidel-Bar, Ronen, and Benjamin Geiger. 2010. "The Switchable Integrin Adhesome." *Journal of Cell Science* 123 (Pt 9): 1385–88. <https://doi.org/10.1242/jcs.066183>.
- Zakrzewicz, Andreas, Timothy W Secomb, and Axel R Pries. 2002. "Angioadaptation: Keeping the Vascular System in Shape." *News in Physiological Sciences : An International Journal of Physiology Produced Jointly*

- by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society 17 (October): 197–201. <https://doi.org/10.1152/nips.01395.2001>.
- Zanconato, Francesca, Michelangelo Cordenonsi, and Stefano Piccolo. 2016. “YAP/TAZ at the Roots of Cancer.” *Cancer Cell* 29 (6): 783–803. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.05.005>.
- Zawistowski, Jon S, Lisa Stalheim, Mark T Uhlik, Amy N Abell, Brooke B Ancrile, Gary L Johnson, and Douglas A Marchuk. 2005. “CCM1 and CCM2 Protein Interactions in Cell Signaling: Implications for Cerebral Cavernous Malformations Pathogenesis.” *Human Molecular Genetics* 14 (17): 2521–31. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi256>.
- Zeineddine, Hussein A., Romuald Girard, Laleh Saadat, Le Shen, Rhonda Lightle, Thomas Moore, Ying Cao, et al. 2019. “Phenotypic Characterization of Murine Models of Cerebral Cavernous Malformations.” *Laboratory Investigation* 99 (3): 319–30. <https://doi.org/10.1038/s41374-018-0030-y>.
- Zeisberg, Elisabeth M, Scott Potenta, Liang Xie, Michael Zeisberg, and Raghu Kalluri. 2007. “Discovery of Endothelial to Mesenchymal Transition as a Source for Carcinoma-Associated Fibroblasts.” *Cancer Research* 67 (21): 10123–28. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-3127>.
- Zhang, Hongyue, Ying Liu, Lixin Yan, Wei Du, Xiaodan Zhang, Min Zhang, He Chen, et al. 2018. “Bone Morphogenetic Protein-7 Inhibits Endothelial-Mesenchymal Transition in Pulmonary Artery Endothelial Cell under Hypoxia.” *Journal of Cellular Physiology* 233 (5): 4077–90. <https://doi.org/10.1002/jcp.26195>.
- Zhang, Rugang, Wei Chen, and Peter D Adams. 2007. “Molecular Dissection of Formation of Senescence-Associated Heterochromatin Foci.” *Molecular and Cellular Biology* 27 (6): 2343–58. <https://doi.org/10.1128/MCB.02019-06>.
- Zhang, Y, Y Xiong, and W G Yarbrough. 1998. “ARF Promotes MDM2 Degradation and Stabilizes P53: ARF-INK4a Locus Deletion Impairs Both the Rb and P53 Tumor Suppression Pathways.” *Cell* 92 (6): 725–34. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81401-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81401-4).
- Zhang, Yu, Xiang Li, Jingjing Qi, Jialu Wang, Xingfeng Liu, Haiwen Zhang, Sheng-Cai Lin, and Anming Meng. 2009. “Rock2 Controls TGFbeta Signaling and Inhibits Mesoderm Induction in Zebrafish Embryos.” *Journal of Cell Science* 122 (Pt 13): 2197–2207. <https://doi.org/10.1242/jcs.040659>.
- Zhang, Yun, Peter B Alexander, and Xiao-Fan Wang. 2017. “TGF-β Family Signaling in the Control of Cell Proliferation and Survival.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 9 (4). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022145>.
- Zhao, Xiao-Han, Carol Laschinger, Pam Arora, Katalin Szász, Andras Kapus, and Christopher A McCulloch. 2007. “Force Activates Smooth Muscle Alpha-Actin Promoter Activity through the Rho Signaling Pathway.” *Journal of Cell Science* 120 (Pt 10): 1801–9. <https://doi.org/10.1242/jcs.001586>.
- Zheng, Xiangjian, Chong Xu, Annie O Smith, Amber N Stratman, Zhiying Zou, Benjamin Kleaveland, Lijun Yuan, et al. 2012. “Dynamic Regulation of the Cerebral Cavernous Malformation Pathway Controls Vascular Stability and Growth.” *Developmental Cell* 23 (2): 342–55. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.06.004>.
- Zhong, Aileen, Zahra Mirzaei, and Craig A Simmons. 2018. “The Roles of Matrix Stiffness and SS-Catenin Signaling in Endothelial-to-Mesenchymal Transition of Aortic Valve Endothelial Cells.” *Cardiovascular Engineering and Technology* 9 (2): 158–67. <https://doi.org/10.1007/s13239-018-0363-0>.
- Zhong, C, M Chrzanowska-Wodnicka, J Brown, A Shaub, A M Belkin, and K Burridge. 1998. “Rho-Mediated Contractility Exposes a Cryptic Site in Fibronectin and Induces Fibronectin Matrix Assembly.” *The Journal of Cell Biology* 141 (2): 539–51. <https://doi.org/10.1083/jcb.141.2.539>.

- Zhou, Zinan, David R. Rawnsley, Lauren M. Goddard, Wei Pan, Xing Jun Cao, Zoltan Jakus, Hui Zheng, et al. 2015. "The Cerebral Cavernous Malformation Pathway Controls Cardiac Development via Regulation of Endocardial MEKK3 Signaling and KLF Expression." *Developmental Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.12.009>.
- Zhou, Zinan, Alan T Tang, Weng-Yew Wong, Sharika Bamezai, Lauren M Goddard, Robert Shenkar, Su Zhou, et al. 2016. "Cerebral Cavernous Malformations Arise from Endothelial Gain of MEKK3-KLF2/4 Signalling." *Nature* 532 (7597): 122–26. <https://doi.org/10.1038/nature17178>.
- Zhu, J, D Woods, M McMahon, and J M Bishop. 1998. "Senescence of Human Fibroblasts Induced by Oncogenic Raf." *Genes & Development* 12 (19): 2997–3007. <https://doi.org/10.1101/gad.12.19.2997>.
- Zhu, Jieqing, Christopher V Carman, Minsoo Kim, Motomu Shimaoka, Timothy A Springer, and Bing-Hao Luo. 2007. "Requirement of Alpha and Beta Subunit Transmembrane Helix Separation for Integrin Outside-in Signaling." *Blood* 110 (7): 2475–83. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-03-080077>.
- Zhu, Yi, Ewald J Doornebal, Tamar Pirtskhalava, Nino Giorgadze, Mark Wentworth, Heike Fuhrmann-Stroissnigg, Laura J Niedernhofer, Paul D Robbins, Tamara Tchkonja, and James L Kirkland. 2017. "New Agents That Target Senescent Cells: The Flavone, Fisetin, and the BCL-X(L) Inhibitors, A1331852 and A1155463." *Aging* 9 (3): 955–63. <https://doi.org/10.18632/aging.101202>.
- Zhu, Yuan, Qun Wu, Moritz Fass, Jin-Fang Xu, Chao You, Oliver Müller, I Erol Sandalcioglu, Jian-Min Zhang, and Ulrich Sure. 2011. "In Vitro Characterization of the Angiogenic Phenotype and Genotype of the Endothelia Derived from Sporadic Cerebral Cavernous Malformations." *Neurosurgery* 69 (3): 722. <https://doi.org/10.1227/NEU.0b013e318219569f>.
- Zonta, Micaela, María Cecilia Angulo, Sara Gobbo, Bernhard Rosengarten, Konstantin-A Hossmann, Tullio Pozzan, and Giorgio Carmignoto. 2003. "Neuron-to-Astrocyte Signaling Is Central to the Dynamic Control of Brain Microcirculation." *Nature Neuroscience* 6 (1): 43–50. <https://doi.org/10.1038/nn980>.
- Zuazo-Gatzelu, Iratxe, and Oriol Casanovas. 2018. "Unraveling the Role of Angiogenesis in Cancer Ecosystems." *Frontiers in Oncology* 8: 248. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00248>.

VI. Annexes

Immunofluorescence of cell-cell and cell-extracellular matrix adhesive defects in *in vitro* endothelial CCM model. Juxtacrine role of mutant extracellular matrix on wild-type endothelial cells.

Sandra Manet, Daphné Vannier, Anne-Pascale Bouin, Justyna Lisowska, Corinne Albiges-Rizo and Eva Faurobert*.

Address:

Institute for Advanced Biosciences, University Grenoble Alpes, INSERM U1209, CNRS UMR5309, site santé, Allée des Alpes 38042 Grenoble, France

*Corresponding author

E-mail for correspondance: eva.faurobert@univ-grenoble-alpes.fr

Running title: Studying cell adhesion in *in vitro* endothelial CCM model

Keywords: Integrins, VE-cadherin, acto-myosin cytoskeleton, CCM, focal adhesion, Adherens junctions, contractility, mechanotransduction, extracellular matrix.

Abstract:

Endothelial cells lining Cerebral Caveros Malformations (CCM) present strong adhesive and mechanical defects. Increased cell contractility is a driver to the onset and the expansion of the CCM lesions. 2D *in vitro* endothelial models have been developed from either endothelial cells isolated from *ccm1-3* knock-out mice or CCM1-3-silenced primary endothelial cells. These *in vitro* models faithfully recapitulate the adhesive and contractile defects of the CCM-deficient endothelial cells such as increased cell-extracellular matrix (ECM) adhesion through β 1 integrin-anchored actin stress fibers, abnormal remodeling of the ECM and destabilized VE-cadherin-dependent cell-cell junctions. Using such 2D *in vitro* CCM models, we have shown that the ECM remodeled by CCM-depleted endothelial cells can propagate CCM-like adhesive defects to wild-type endothelial cells, a process potentially pertinent to CCM lesion expansion. Here, we detail methods for studying the morphology of focal adhesions, acto-myosin cytoskeleton and VE-cadherin-dependent Adherens junctions by immunofluorescence and morphometric analyses. Moreover, we detail the protocols to produce and purify remodeled ECM and to test its effect on endothelial cell adhesion.

1-Introduction

Changes in the morphology of the endothelial cells lining Cerebral Cavernous Malformations and their underlying extracellular matrix (ECM) were reported since the very first ultrastructural analyses of human lesions [1–3]. Intercellular gaps are observed from where blood has leaked. The basal lamina can be focally multilaminar and is directly embedded in a dense collagenous matrix. No ensheathing mural cells are present. Immunohistochemistry has revealed that endothelial cells in human CCM lesions express higher levels of phosphorylated myosin light chain (pMLC), a marker of acto-myosin contractility, compared to normal blood vessels in the periphery [4]. These morphological defects were later observed in the zebrafish and mouse CCM animal models [5,6,7,8]. In parallel, 2D *in vitro* models of CCM-deficient endothelial cells have been elaborated from either endothelial cells isolated from CCM mutant animals or CCM1-3-silenced primary endothelial cells. These *in vitro* models faithfully recapitulate the CCM morphological defects [4,9,10,11]. CCM-deficient endothelial cells present numerous transversal actin stress fibers decorated with phosphorylated myosin. They spread and elongate on plastic much more than their wild-type counterparts and present increased cell-ECM focal adhesions and disrupted cell-cell junctions (Fig 1)[10]. By recapitulating the *in vivo* morphological defects, these *in vitro* models are very precious for in-depth molecular analyses that are difficult to perform in *in vivo* models. For these reasons and because they allow large throughput experiments, they have also been successfully used for therapeutic drug screenings [12, 13].

Beyond being simple markers of the disease, we and others have started to show that the cell adhesion and contractility defects are indeed drivers of the CCM pathology. Inhibition of the cell contractility through inhibition of the phosphorylation of the myosin light chain is sufficient to block the formation of lesions and their expansion in mouse CCM model [14–16]. In normal blood vessels, the tension within the endothelium equilibrates with the forces

generated by the blood flow on its luminal side and by the stiffness of the extracellular matrix on its basal side [17, 18]. Obviously, this tensional homeostasis is lost in Cerebral Cavernous Malformations. Ballooning of the lumen strongly slows down the blood flow lowering the associated shear stress while paradoxically endothelial cells become highly contractile and the ECM most likely stiffens [10]. Molecular analyses further suggested that CCM proteins allow the mechanical adaptation of the endothelial cells to these external forces, preserving the physical integrity of the endothelium [10, 19–21].

Endothelial cells sense external mechanical signals via adhesive structures localized at cell-cell junctions and at the interface with the ECM through respectively VE-cadherin and integrin clusters [22]. These transmembrane receptors connect intracellularly to the contractile acto-myosin cytoskeleton and coordinately organize it to equilibrate tensions between cell-cell and cell-ECM junctions [23]. CCM1-3 proteins associate to form a molecular scaffold downstream of Rap1 [24, 25], a small GTPase regulating the cross-talk between integrins and cadherins [26]. This CCM complex stabilizes cell-cell junctions by recruiting β catenin, Rac and the Rho kinase ROCK2 to VE-cadherin [27–29] and it limits cell-ECM adhesions by stabilizing ICAP-1, a negative regulator of β 1 integrin activation, and inhibiting RhoA [9, 10, 30]. When the CCM complex is lost, Rac and ROCK2 are delocalized from VE-cadherin while β 1 integrin, RhoA and its downstream effector the Rho kinase ROCK1 get overactivated [9, 10, 29]. This results in the polymerization of numerous β 1 integrin-anchored acto-myosin stress fibers that tear the cell-cell junctions apart [29].

Subsequently to their increased contractility and integrin-dependent adhesions, CCM-depleted endothelial cells remodel ECM very differently than control cells. By firmly pulling on extracellular globular fibronectin (FN), they provoke its polymerization in straight and parallel fibers (Fig 3A) [10]. This organization is reminiscent of that of cancer stroma and is a

distinctive feature of stiff tissues [31]. We proposed that stiffening of the ECM feeds back onto cell contractility, maintaining a positive feedback loop between cell and ECM rigidity (Fig 2) [10]. Remarkably, we showed that this abnormally remodeled ECM is able to confer a CCM-like contractile phenotype to naïve endothelial cells cultured on it as evidenced by their increased stress fibers (Fig 3B), destabilized VE-cadherin junctions and impaired barrier function [10]. We thus proposed the existence of a mid-range propagation mechanism in which a newly mutated cell would transmit defects through the ECM to adjacent wild-type cells, which in turn would propagate the defects to their neighbors. This model was recently comforted by two publications showing that CCM lesions correspond to mosaics of mutant and wild-type endothelial cells [32, 33]. Moreover, elegant experiments showed that transplanted *ccm*^{-/-} endothelial cells in *ccm*^{+/+} animals could attract endothelial cells of the host to form abnormal vessels suggesting that CCM lesions could result from the attraction of wild-type cells by mutant ones [33].

The purpose of this methodological review is twofold. We will describe technics to study i- the effect of silencing CCM proteins or any other related signaling protein on ECM remodeling, cell-ECM and cell-cell adhesions ii- the effect of remodeled mutant ECM on the adhesion of endothelial cells. We first describe how to prepare silenced HUVEC and decellularized remodeled mutant ECM. Then we describe how to culture cells and perform immunofluorescence stainings of ECM proteins, integrin-dependent focal adhesions, actin cytoskeleton and VE-cadherin junctions. Finally, we detail how to proceed to the morphometric analyses of the images. The procedure of culturing naïve endothelial cells on decellularized mutant ECM opens the way to the identification of components presented by the ECM, such as growth factors or cytokines, that contribute to the paracrine effect of CCM mutant endothelial cells on wild-type ones.

2. Materials

2.1 HUVEC culture

1. T75 plastic cell culture treated flask.
2. Coating solution: Collagen Type I rat tail. Prepare a collagen solution at 100 µg/ml in sterile water for cell culture pyrogen-free, mycoplasma-free, calcium-free, magnesium-free. Store at 4°C for several weeks.
3. HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) from Lonza supplier (500 000 cells, pooled human umbilical vein endothelial cells).
4. Endothelial cell growth medium (EGM-2 BulletKit, Lonza).
5. [Endothelial cell growth basal medium](#) (EBM-2, Lonza).
6. Freezing media: 95% bovine calf serum, 5% anhydrous dimethyl sulfoxide (DMSO).
6. Phosphate buffer saline PBS: (PBS calcium-free, magnesium-free)
7. 100 µg/ml penicillin
8. 100 µg/ml streptomycin.
9. Trypsin-EDTA solution: 10X Trypsin and 0.5 M EDTA in sterile PBS.

2.2 Transient transfection of siRNA

1. siRNA duplexes for CT (ON-TARGET plus Non-targeting siRNA #1, Dharmacon), CCM1 (siRNA silencer inventoried CCM1, Ambion) and CCM2 (SMARTpool: ON-TARGETplus CCM2 siRNA, Dharmacon).
2. Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent - Delivery of siRNA (Invitrogen)
3. Opti-MEM I Reduced Serum Media (Invitrogen).

2.3 Production of remodeled ECM

1. 24-well plate, tissue culture-treated
2. Round glass coverslips (12 or 14 mm diameter)
3. Coating solution: 20 µg/ml fibronectin from human plasma in PBS. Store until one week at 4°C.
4. 0.5% (v/v) Triton X-100 in H₂O.
5. 50 mM ammonium hydroxide (NH₄OH) in H₂O.

2.4 Cell spreading and culture on FN-coated glass or remodeled ECM

1. Trypsin inhibitor : 1 mg/ml in PBS
2. 1% Bovine serum albumin in EGM-2
3. EGM-2 medium containing 5% FN-depleted bovine calf serum. To deplete serum from FN, first heat at 56°C for 1 h, incubate in batch with Gelatin-Sepharose 4B beads by rotation on a wheel at 4°C (5 ml of beads for 100 ml of serum) for 4 hours, centrifuge at 2500 g for 10 min and recover the supernatant. Make aliquots and store at -20°C.

2.5 Reagents for Immunostaining

1. 0.2 M Phosphate buffer: 140 mM Na₂HPO₄, 60 mM NaH₂PO₄, pH 7.3
2. Fixation solution: 4% or 8% (w/v) Paraformaldehyde : Weight 20 g (4%) or 40 g (8%) of paraformaldehyde in 250 ml of H₂O, dissolve at 60°C (no more than 65°C), add 1 ml of 0,1 M NaOH and stir 30 min more. Then add 250 ml of 0.2 M Phosphate buffer . Store at 4°C.
3. Permeabilization buffer: 0.3% (v/v) Triton X-100 in PBS. Store at 4°C.
4. Blocking solution: 10% goat serum (v/v) in PBS. Prepare fresh.
5. Primary antibodies: Rabbit anti-human fibronectin (Sigma-Aldrich, 1/200), rabbit anti-human collagen type IV (Novotec, 1/80), mouse anti-β3 integrin clone 23C6 (BD

Biosciences 1/200), rat anti-activated β 1 integrin clone 9EG7 (BD Biosciences, 1/200), rabbit anti-pMLC Ser19 (Cell Signaling, 1/50), mouse anti-zyxin (Synaptic system, 1/100), mouse anti-VE-cadherin clone BV9 (Millipore, 1/200), mouse anti β catenin clone 6F9 (Sigma-Aldrich, 1/500) antibodies.

6. Secondary antibodies: [Goat anti-Mouse and anti-Rabbit IgG \(H+L\) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor conjugated AF 488](#), AF 546, AF 647 (Invitrogen, 1/1000).

7. Phalloidin conjugates with AlexaFluor 488 (Invitrogen, 1/5000) and Atto 647 (Sigma, 1/2000).

8. Wash solution (PBT): 3% BSA and 0.05% Tween 20 in PBS. Store at -20°C.

9. Mounting medium: 24% glycerol (w/v), 10% Mowiol (w/v) in 10mM Tris-HCl (pH 8.5) and 10 μ g/ml DAPI.

2.6 Morphometric analysis

Most of the analysis described in this chapter are performed with FIJI (<https://imagej.net/Fiji>) [34], a flavor of ImageJ, and can easily be automated by macros. Some codes described below are available upon request.

3. Methods

3.1 Amplification and storage of HUVEC

1. Add 5 ml of collagen solution in 3 T75 tissue culture flasks for 30 min at 37°C.

Wash with PBS. Flasks can be stored at 4°C up to a week.

2. At reception, split HUVEC from cryopreserved vial directly in the 3 coated T75 flasks containing 10 ml of EGM-2. (*See note 1*).

3. Place the flasks in an incubator at 37°C, 3% O₂, 5% CO₂. (*See note 2*).

4. On the next day, change media with 10 ml of fresh EGM-2 to remove traces of anhydrous dimethyl sulfoxide. Let cells grow and change media every other day.

5. At confluency, wash cells with sterile PBS and add 1 ml of trypsin-EDTA solution for few minutes at 37°C in 5% CO₂ incubator. Tap the plate to detach completely the cells. When cells are detached, neutralize trypsin by addition of 9 ml of EGM-2. At this stage, the cells are at passage p1. Freeze aliquots in freezing media. (*See note 3*).

6. Seed 2.5×10^5 cells p1 per flask in 5 T75 flasks and grow them at 37°C, 3% O₂, 5% CO₂ in EGM-2.

7. At confluency, trypsinize HUVEC p1 and freeze the maximum of cells p2 as described in step 5 of section 3.1. From passage 2, cultivate HUVEC in regular conditions (37°C, 5% CO₂ and atmospheric % O₂) and humidified chamber according to the manufacturer's instructions. (*See note 4*).

3.2 Silencing of CCM genes by RNA interference

1. Start from confluent HUVEC at passage 2. Trypsinize to detach and neutralize with EGM-2. Count and directly seed 1.5×10^6 cells in collagen I-coated T75 flask in 10 ml EGM-2 without antibiotics. Incubate in 5% CO₂ at 37°C. (*See note 5*).

2. The next morning, prepare a mix for RNAi transfection : in one conical 15 ml-polypropylene *tube* add 22,5 µl of lipofectamine RNAi max to 1.125 ml of OptiMEM and in a second 15 ml-tube prepare 2.7 µl of siRNA (100 µM stock) in 1.125 ml of OptiMEM. Add the lipofectamine mix to the siRNA mix, gently tap the tube with your fingers. Snap centrifuge to pellet drops at the bottom of the tube. Incubate for 15 min at room temperature.

During this time, replace medium over cells with 7.5 ml fresh EGM-2 without antibiotics. After the 15 min of incubation, add the siRNA/liposomes mix drop by drop onto the cells and incubate at 37°C, 5% CO₂.

3. Remove media 4 hours later and add 7.5 ml of complete EGM-2 without antibiotics.
4. On the next day, repeat a second round of transfection as in steps 2. (*see note 6*)

3.3 Production and purification of remodeled ECM

1. Sterilize glass coverslips by dipping into 100% ethanol and insert the coverslips into the wells of a sterile 24 well-plate. Rinse with PBS.

2. Prepare a FN solution at 20 µg/ml in PBS. Add 0.5 ml of FN solution per 24-well. Incubate plate for 1 h at 37°C or overnight at 4°C. Wash coated coverslips twice with sterile PBS.

3. Trypsinize silenced HUVEC with trypsin-EDTA, count cells, neutralize trypsin with 1 mg/ml trypsin inhibitor and seed 2×10^5 HUVECs in 2 ml EGM-2 per 24-well on the layer of fibronectin for 48 h at 37°C, 3% O₂, 5% CO₂. (*See note 7*).

4. Lyse cells with 0.5% Triton X-100 for 15 min on ice.

5. Remove nuclei by incubating with 50 mM NH₄OH for 15 min on ice. (*See note 8*).

6. Wash 3 times with PBS at room temperature.

7. To check for FN remodeling, fix some coverslips with 4% PFA for 10 min at 37°C and wash twice in PBS. Store at 4°C.

8. The rest of the coverslips is kept at 4°C up to 5 days.

3.4 Study of adhesion of silenced HUVEC on FN or of naive HUVEC on remodeled ECM

3.4.1 Early spreading of sparse HUVEC on FN-coated glass or remodeled ECM

-Study of focal adhesions

1. Trypsinize silenced or naïve HUVEC at passage 3 and neutralize trypsin with 1 mg/ml trypsin inhibitor. Count, pellet and resuspend cells in serum-free EGM-2 with 1% BSA at 6×10^5 cells/ml. Incubate cells in suspension for 30 min at 37°C in a water bath. (*See notes 9, 10*).

2. To achieve a sparse density, plate 3×10^4 cells (50 μ l) on either FN-coated (silenced HUVEC) or remodeled ECM (naïve HUVEC) coverslips in 0.5 ml EGM-2 containing 5% FN-depleted serum. (*See note 11*).

3. Let cells spread in a 5% CO₂, 37°C incubator for 1 h.

4. Aspirate media and directly fix cells with 4% PFA for 10 min at RT.

5. Wash twice in PBS. Store at 4°C in PBS.

-Study of acto-myosin cytoskeleton

1. Incubate silenced or naïve HUVEC at passage 3 in EGM-2 containing 1% BSA for 30 min at 37°C as in step 1 of “Study of focal adhesions”.

2. Plate 3×10^4 cells in EGM-2 depleted in FN on either FN-coated (silenced HUVEC) or remodeled ECM (naïve HUVEC) coverslips in 0.5 ml EGM-2 containing 5% FN-depleted serum.

3. Let the cells spread for 4 h.

4. Aspirate media and directly fix cells with 4% PFA 10 min at RT.

5. Wash twice in PBS. Store at 4°C in PBS.

3.4.2 Culture of confluent HUVEC on FN coated glass or remodeled ECM to study VE-cadherin junctions

1. Trypsinize silenced HUVEC or naïve HUVEC at passage 3 and resuspend them at 2.5×10^5 cells/ml in complete EGM-2.
2. Plate 2.5×10^5 cells on either FN-coated (20 μ g/ml) (silenced HUVEC) or remodeled ECM (naïve HUVEC) coverslips.
3. Remove medium when cells are adherent and replace with 2 ml of complete EGM-2.
4. Cultivate in 5% CO₂ at 37°C for 48 h.
5. Remove 1 ml of media from each well and put back to the incubator to reequilibrate the temperature in the plate.
6. Add 1 ml of prewarmed 8% PFA to each well and incubate for 10 min at 37°C. Store at 4°C in PBS. (*See note 12*).

3.5 Immunofluorescence studies

3.5.1 General protocol of immunofluorescence

This protocol is used to stain FN, collagen IV, Zyxin, VE-cadherin, β catenin.

1. Permeabilize cells on coverslips with permeabilization solution for 10 min at room temperature.
2. Wash once with PBS.
3. Block for 30 min at 37°C in 150 μ l of blocking solution.
4. Aspirate blocking solution and add 150 μ l of primary antibodies diluted in blocking solution and incubate for 1 h at 37°C.
5. Wash twice with PBT and incubate for 5 min at room temperature

6. Remove PBT and add diluted secondary antibodies and phalloidin in blocking solution for 45 min at 37°C.

7. Wash twice with PBT and incubate for 5 min in PBT at room temperature in the dark. Remove last wash of PBT.

8. Wash in PBS to remove detergent and let it on coverslips until mounting.

9. Mount coverslips on glass slides by inverting them on a drop of mounting medium.

10. Dry glass slides in the dark overnight before visualization under the microscope.

The mounting media hardens overnight. (*See note 13*).

3.5.2 Immunofluorescence of β integrins

For immunostaining of β integrins, permeabilization in step 1 of Section 3.5.1 is omitted to reduce intracellular background. If intracellular proteins are co-stained, first incubate in blocking solution for 30 min at 37°C, then add β integrins antibodies diluted in blocking solution for 1h at 37°C. Wash twice with PBT. After these steps, proceed to step 1 of section 3.5.1 for the staining of intracellular antigens. At step 6 of section 3.5.1, add all the secondary antibodies.

3.5.3 Immunofluorescence of pMLC

Permeabilize with 0,3% Triton in blocking solution containing 5% goat serum for 1h at room temperature. At step 4 of section 3.5.1, incubate pMLC (ser19) primary antibody at 1/50 in PBS containing 0.3% Triton overnight at 4°C into a humidified chamber (*see note 14*). Wash 3 times with PBS for 5 min and wash once with 0,4 M NaCl in PBS. Continue immunostaining at step 6 of section 3.5.1 with secondary antibodies and washes with PBT before mounting.

3.6 Morphometric analyses of cell shape and immunostainings

The quality of the images will be determinant for the analysis. It is necessary to acquire images in native or Tiff format and with as less background as possible. Confocal or SD images are usually preferable.

3.6.1 Image segmentation

Create masks and analyze area and morphology of isolated cells from images of actin, membrane protein or cytosolic protein staining :

1. Set image type : Image > Type > 8-bits
2. Set scale (Analyze > Set Scale)
3. Create mask (Image > Adjust > Threshold or plugin GDSC > thresholding > Edge Mask or plugin morphoLibJ > Segmentation) and save mask (File > Save As > Tiff) and ROI (File > Save As > XY Coordinates)
4. Set measurements: area, shape descriptors, perimeter, center of mass (Analyze > Set Measurements...)
5. Measure (Analyze > Measure)

3.6.2 Analysis of focal adhesions

1. Set scale (Analyze > Set Scale)
2. If necessary denoising of image (Process > Filters > Unsharp Mask, Process > Subtract Background, Process > Noise > Despeckle, Plugin TopHatfilter...)
3. Segmentation : threshold the image (Image > Adjust > Threshold or AutoThreshold)
4. Separate adjacent FA by Watershed algorithm (Process > Binary > Watershed or Plugins > Irregular Watershed)

5. Set measurements: area, shape descriptors, perimeter, center of mass (Analyze > Set Measurements...)
6. Detect FA: Analyze > Analyze Particles... with options Display Results and Clear Results. (*see notes 15, 16*).

3.6.3 Analysis of stress fibers

1. Set scale (Analyze > Set Scale)
2. If necessary denoising of image (Process > Filters > Unsharp Mask, Process > Subtract Background, Process > Noise > Despeckle, Plugin TopHatfilter...)
3. Apply Laplacian filter (Plugin FeatureJ Laplacian or plugin Mexican Hat Filter)
4. Set image type : Image > Type > 8-bits
5. Create mask (Image > Adjust > Threshold or Auto Threshold and Process > Binary > Convert to Mask)
6. Use the Plugin “Ridge Detection” to detect and measure the fibers.

Anisotropy can be calculated after denoising the image using the Plugin OrientationJ or the macro FibrilTool [35].

3.6.4 Analysis of junction thickness (*see note 17*)

1. Set image type : Image > Type > 8-bit
2. Denoise the image (Process > Filters > Unsharp Mask, Process > Subtract Background, Process > Noise > Despeckle, Plugin TopHatfilter...)
3. Segmentation : threshold the image (Image > Adjust > Threshold or AutoThreshold)
4. Duplicate image (Image > Duplicate)
5. On the first image measure the length of the junctions :

- a. Use gaussian or median filter to smooth irregularities (Process > Filters > Gaussian Blur or Median)
 - b. Create binary image (Process > Binary > Make binary)
 - c. Reduce objects to 1 pixel wide representations (Process > Binary > Skeletonize)
 - d. Select the resulting skeleton (Edit > Selection > Create selection)
 - e. Set measurement: area (Analyze > Set Measurements...)
 - f. Measure the length of junctions (Analyze > Measure)
6. On the second image:
- a. Create binary image (Process > Binary > Make binary)
 - b. If necessary fill holes to reduce nonspecific spots (Process > Binary > Fill Holes)
 - c. Select the resulting mask of junctions (Edit > Selection > Create selection)
 - d. Set measurement: area (Analyze > Set Measurements...)
 - e. Measure the area of junctions (Analyze > Measure)

Divide area of the second image (area of junctions) by area of the first, skeletonized image (length of junction).

4. Notes:

1. Do not centrifuge cells before seeding. It leads to a high rate of cell death.
2. 3% O₂ creates a physiological oxygen environment. Cells cultured in 3% O₂ grow faster, live longer, and show lower stress than at atmospheric O₂ (20% O₂). If no 5% CO₂-3% O₂ incubator is available, cultivate in regular 5% CO₂ incubator.
3. HUVEC can be stored at -80°C for one year. For longer storage, it is recommended to keep them in liquid nitrogen.
4. Amplification and storage of primary cells are made at early passages to avoid cell dedifferentiation. All experiments are done with HUVEC of less than 4 passages.

5. Only use EGM-2 from Lonza for siRNA transfection of HUVEC. We have had no success with other endothelial cell media from other companies.
6. Two rounds of siRNA transfection are required to silence efficiently the CCM proteins. Silenced HUVEC can be used 24 h after the second round of transfection and up to 72 h after.
7. Do not let the cells remodel the FN for too long (maximum 48 h) to avoid the formation of FN clots on the coverslip. If no 5% CO₂ -3% O₂ incubator is available, use a standard 5% CO₂ incubator.
8. Check the removal of the nuclei under microscope. If needed, aspirate and add again NH₄OH for 15 min on ice to remove completely the nuclei.
9. Incubation of the cell suspension in BSA allows the detachment of trypsinized ECM fragments from integrins resetting the level of occupied integrins to zero.
10. For FN-coated coverslips, coat coverslips with FN as in step 2 of section 3.3. A range of FN concentrations from 1 (0,3 µg/cm²) to 10 µg/ml (3 µg/cm²) is recommended to better document the differences in focal adhesions and acto-myosin fibers between CT- and CCM- silenced HUVEC.
11. FN is depleted from media to avoid its deposition onto the remodeled ECM or the FN-coated coverslip.
12. Cell-cell junctions are sensitive to changes in temperature during the fixation. Work quickly. Do not aspirate the media but instead dilute twice the prewarmed 8% PFA in the well. The plate can be placed on a polystyrene holder to avoid contact with the hood.
13. To mount a coverslip on a glass slide, bend a long syringe needle at 90°. Scratch the bottom of the well at the periphery on the coverglass with the needle tip until it catches and lifts the cover slip a bit. Then carefully grab the coverslip with tweezers.

14. To limit the consumption of anti pMLC antibody, coverslips can be incubated upside down on 50 ul-drops of diluted antibody on parafilm overnight in a humidified chamber.
15. In order to optimize the detection, combine different masks with different settings: for example, a first detection of small and elongated FA, a second detection of medium FA with higher circularity, and a third detection of big elongated FA. Create masks of all detections and combine them with the Image Calculator “OR” function (Process > Image Calculator).
16. Alternatively, the web site “Focal Adhesion Analysis Server” (<https://faas.bme.unc.edu/>), in particular for time-lapse images analysis can be used.
17. For segmentation and analysis of confluent cells, cellbordertracker (<https://www.medizin.uni-muenster.de/anatomie2/forschung/cellbordertracker/>) [36] can be used.

Acknowledgements: This work was supported by CNRS, INSERM, the French agency for scientific research (ANR), Ligue Nationale contre le Cancer, Association pour la Recherche sur le Cancer, Fondation pour la Recherche Médicale and Espoir Isère Cancer.

5. References

1. Wong JH, Awad IA, Kim JH (2000) Ultrastructural pathological features of cerebrovascular malformations: a preliminary report. *Neurosurgery* 46:1454–1459
2. Clatterbuck RE, Eberhart CG, Crain BJ, Rigamonti D (2001) Ultrastructural and immunocytochemical evidence that an incompetent blood-brain barrier is related to the pathophysiology of cavernous malformations. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 71:188–

3. Tanriover G, Sozen B, Seker A, Kilic T, Gunel M, Demir N (2013) Ultrastructural analysis of vascular features in cerebral cavernous malformations. *Clin Neurol Neurosurg* 115:438–444 . doi: 10.1016/j.clineuro.2012.06.023
4. Stockton RA, Shenkar R, Awad IA, Ginsberg MH (2010) Cerebral cavernous malformations proteins inhibit Rho kinase to stabilize vascular integrity. *J Exp Med* 207:881–896
5. Hogan BM, Bussmann J, Wolburg H, Schulte-Merker S (2008) *ccm1* cell autonomously regulates endothelial cellular morphogenesis and vascular tubulogenesis in zebrafish. *Hum Mol Genet* 17:2424–2432
6. Chan AC, Drakos SG, Ruiz OE, Smith AC, Gibson CC, Ling J, Passi SF, Stratman AN, Sacharidou A, Revelo MP, Grossmann AH, Diakos NA, Davis GE, Metzstein MM, Whitehead KJ, Li DY (2011) Mutations in 2 distinct genetic pathways result in cerebral cavernous malformations in mice. *J Clin Invest* 121:1871–1881
7. Boulday G, Rudini N, Maddaluno L, Blecon A, Arnould M, Gaudric A, Chapon F, Adams RH, Dejana E, Tournier-Lasserre E (2011) Developmental timing of *CCM2* loss influences cerebral cavernous malformations in mice. *J Exp Med* 208:1835–1847
8. McDonald DA, Shenkar R, Shi C, Stockton RA, Akers AL, Kucherlapati MH, Kucherlapati R, Brainer J, Ginsberg MH, Awad IA, Marchuk DA (2011) A novel mouse model of cerebral cavernous malformations based on the two-hit mutation hypothesis recapitulates the human disease. *Hum Mol Genet* 20:211–222
9. Whitehead KJ, Chan AC, Navankasattusas S, Koh W, London NR, Ling J, Mayo AH, Drakos SG, Jones CA, Zhu W, Marchuk DA, Davis GE, Li DY (2009) The cerebral

cavernous malformation signaling pathway promotes vascular integrity via Rho GTPases. *Nat Med* 15:177–184

10. Faurobert E, Rome C, Lisowska J, Manet-Dupé S, Boulday G, Malbouyres M, Balland M, Bouin AP, Kéramidas M, Bouvard D, Coll JL, Ruggiero F, Tournier-Lasserre E, Albiges-Rizo C, Manet-Dupe S, Boulday G, Malbouyres M, Balland M, Bouin AP, Keramidas M, Bouvard D, Coll JL, Ruggiero F, Tournier-Lasserre E, Albiges-Rizo C (2013) CCM1-ICAP-1 complex controls beta1 integrin-dependent endothelial contractility and fibronectin remodeling. *J Cell Biol* 202:545–561 . doi: 10.1083/jcb.201303044
11. Zheng X, Xu C, Di Lorenzo A, Kleaveland B, Zou Z, Seiler C, Chen M, Cheng L, Xiao J, He J, Pack MA, Sessa WC, Kahn ML (2010) CCM3 signaling through sterile 20-like kinases plays an essential role during zebrafish cardiovascular development and cerebral cavernous malformations. *J Clin Invest* 120:2795–2804 . doi: 10.1172/JCI39679
12. Gibson CC, Zhu W, Davis CT, Bowman-Kirigin JA, Chan AC, Ling J, Walker AE, Goitre L, Delle Monache S, Retta SF, Shiu Y-TE, Grossmann AH, Thomas KR, Donato AJ, Lesniewski LA, Whitehead KJ, Li DY (2015) Strategy for identifying repurposed drugs for the treatment of cerebral cavernous malformation. *Circulation* 131:289–99 . doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.010403
13. Otten C, Knox J, Boulday G, Eymery M, Haniszewski M, Neuenschwander M, Radetzki S, Vogt I, Hähn K, De Luca C, Cardoso C, Hamad S, Igual Gil C, Roy P, Albiges-Rizo C, Faurobert E, von Kries JP, Campillos M, Tournier-Lasserre E, Derry WB, Abdelilah-Seyfried S (2018) Systematic pharmacological screens uncover novel pathways involved in cerebral cavernous malformations. *EMBO Mol Med* 10:e9155 .

doi: 10.15252/emmm.201809155

14. McDonald DA, Shi C, Shenkar R, Stockton RA, Liu F, Ginsberg MH, Marchuk DA, Awad IA (2012) Fasudil decreases lesion burden in a murine model of cerebral cavernous malformation disease. *Stroke* 43:571–574 . doi: 10.1161/STROKEAHA.111.625467
15. Shenkar R, Shi C, Austin C, Moore T, Lightle R, Cao Y, Zhang L, Wu M, Zeineddine HA, Girard R, McDonald DA, Rorrer A, Gallione C, Pytel P, Liao JK, Marchuk DA, Awad IA (2017) RhoA Kinase Inhibition With Fasudil Versus Simvastatin in Murine Models of Cerebral Cavernous Malformations. *Stroke* 48:187–194 . doi: 10.1161/STROKEAHA.116.015013
16. Shenkar R, Peiper A, Pardo H, Moore T, Lightle R, Girard R, Hobson N, Polster SP, Koskimäki J, Zhang D, Lyne SB, Cao Y, Chaudagar K, Saadat L, Gallione C, Pytel P, Liao JK, Marchuk D, Awad IA (2019) Rho Kinase Inhibition Blunts Lesion Development and Hemorrhage in Murine Models of Aggressive *Pdcd10/Ccm3* Disease. *Stroke* 50:738–744 . doi: 10.1161/STROKEAHA.118.024058
17. Huveneers S, Daemen MJAP, Hordijk PL (2015) Between Rho(k) and a hard place: the relation between vessel wall stiffness, endothelial contractility, and cardiovascular disease. *Circ Res* 116:895–908 . doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.305720
18. Baeyens N, Bandyopadhyay C, Coon BG, Yun S, Schwartz MA (2016) Endothelial fluid shear stress sensing in vascular health and disease. *J Clin Invest* 126:821–8 . doi: 10.1172/JCI83083
19. Jilkova ZM, Lisowska J, Manet S, Verdier C, Deplano V, Geindreau C, Faurobert E, Albigès-Rizo C, Duperray AD (2014) CCM proteins control endothelial β 1 integrin

- dependent response to shear stress. *Biol Open* 3: . doi: bio.201410132 [pii]
10.1242/bio.201410132
20. Donat S, Lourenço M, Paolini A, Otten C, Renz M, Abdelilah-Seyfried S (2018) *Heg1* and *Ccm1/2* proteins control endocardial mechanosensitivity during zebrafish valvulogenesis. *Elife* 7: . doi: 10.7554/eLife.28939
 21. Li J, Zhao Y, Coleman P, Chen J, Ting KK, Choi JP, Zheng X, Vadas MA, Gamble JR (2019) Low fluid shear stress conditions contribute to activation of cerebral cavernous malformation signalling pathways. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 1865:165519 . doi: 10.1016/j.bbadis.2019.07.013
 22. Mui KL, Chen CS, Assoian RK (2016) The mechanical regulation of integrin-cadherin crosstalk organizes cells, signaling and forces. *J Cell Sci*. doi: 10.1242/jcs.183699
 23. Han MKL, de Rooij J (2016) Converging and Unique Mechanisms of Mechanotransduction at Adhesion Sites. *Trends Cell Biol*. doi: 10.1016/j.tcb.2016.03.005
 24. Glading A, Han J, Stockton RA, Ginsberg MH (2007) KRIT-1/CCM1 is a Rap1 effector that regulates endothelial cell cell junctions. *J Cell Biol* 179:247–254
 25. Beraud-Dufour S, Gautier R, Albiges-Rizo C, Chardin P, Faurobert E (2007) Krit 1 interactions with microtubules and membranes are regulated by Rap1 and integrin cytoplasmic domain associated protein-1. *Febs J* 274:5518–5532
 26. RETTA S, BALZAC F, AVOLIO M (2006) Rap1: A turnabout for the crosstalk between cadherins and integrins. *Eur J Cell Biol* 85:283–293 . doi: 10.1016/j.ejcb.2005.09.007

27. Glading AJ, Ginsberg MH (2010) Rap1 and its effector KRIT1/CCM1 regulate beta-catenin signaling. *Dis Model Mech* 3:73–83 . doi: 10.1242/dmm.003293
28. Uhlik MT, Abell AN, Johnson NL, Sun W, Cuevas BD, Lobel-Rice KE, Horne EA, Dell'Acqua ML, Johnson GL (2003) Rac-MEKK3-MKK3 scaffolding for p38 MAPK activation during hyperosmotic shock. *Nat Cell Biol* 5:1104–10 . doi: 10.1038/ncb1071
29. Lisowska J, Rödel CJ, Manet S, Miroshnikova YA, Boyault C, Planus E, De Mets R, Lee H-H, Destaing O, Mertani H, Boulday G, Tournier-Lasserre E, Balland M, Abdelilah-Seyfried S, Albiges-Rizo C, Faurobert E (2018) The CCM1–CCM2 complex controls complementary functions of ROCK1 and ROCK2 that are required for endothelial integrity. *J Cell Sci* 131:jcs216093 . doi: 10.1242/jcs.216093
30. Borikova AL, Dibble CF, Sciaky N, Welch CM, Abell AN, Bencharit S, Johnson GL (2010) Rho kinase inhibition rescues the endothelial cell cerebral cavernous malformation phenotype. *J Biol Chem* 285:11760–11764
31. Goetz JG, Minguet S, Navarro-Lérida I, Lazcano JJ, Samaniego R, Calvo E, Tello M, Osteso-Ibáñez T, Pellinen T, Echarri A, Cerezo A, Klein-Szanto AJP, Garcia R, Keely PJ, Sánchez-Mateos P, Cukierman E, Del Pozo MA (2011) Biomechanical Remodeling of the Microenvironment by Stromal Caveolin-1 Favors Tumor Invasion and Metastasis. *Cell* 146:148–163 . doi: 10.1016/j.cell.2011.05.040
32. Detter MR, Snellings DA, Marchuk DA (2018) Cerebral Cavernous Malformations Develop Through Clonal Expansion of Mutant Endothelial Cells. *Circ Res* 123:1143–1151 . doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.313970
33. Malinverno M, Maderna C, Abu Taha A, Corada M, Orsenigo F, Valentino M, Pisati F, Fusco C, Graziano P, Giannotta M, Yu QC, Zeng YA, Lampugnani MG, Magnusson

- PU, Dejana E (2019) Endothelial cell clonal expansion in the development of cerebral cavernous malformations. *Nat Commun* 10:2761 . doi: 10.1038/s41467-019-10707-x
34. Schindelin J, Arganda-carreras I, Frise E, Kaynig V, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez J, White DJ, Hartenstein V, Tomancak P, Cardona A (2019) Fiji - an Open Source platform for biological image analysis. *9*: . doi: 10.1038/nmeth.2019.Fiji
35. Uyttewaal M, Wrzalik R, Boudaoud A, Burian A, Borowska-wykre D, Kwiatkowska D, Hamant O (2014) FibrilTool , an ImageJ plug-in to quantify fibrillar structures in raw microscopy images. *9*: . doi: 10.1038/nprot.2014.024
36. Seebach J, Abu A, Janine T, Nico L (2015) The CellBorderTracker , a novel tool to quantitatively analyze spatiotemporal endothelial junction dynamics at the subcellular level. *Histochem Cell Biol* 144:517–532 . doi: 10.1007/s00418-015-1357-8

Figure legends:

Figure 1: Immunostainings of β 1 integrin-dependent focal adhesions, acto-myosin cytoskeleton and VE-cadherin-dependent junctions in 2D *in vitro* CCM model. A- β 1 integrin and merged β 1 integrin/F-actin stainings of CT- and CCM2- silenced HUVEC spread for 1 hour on FN-coated glass (0,3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Scale bar: 2 μm . B- Merged pMLC and F-actin stainings of CT- and CCM2- silenced HUVEC spread for 4 hours on FN-coated glass (0,3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Scale bar: 5 μm C- Merged VE-cadherin and F-actin stainings and β catenin staining of CT- and CCM2- silenced HUVEC cultured for 48 hours on FN-coated glass (6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Scale bar: 10 μm .

Figure 2: β 1 activation upon loss in CCM1 or 2 drives a loop between endothelial cell contractility and ECM with deleterious effect on cell–cell junctions. In a quiescent vessel, ICAP-1 maintains low β 1 integrin activation. Endothelial cells are well joined and VE-cadherin adherens junctions are stabilized by a cytoplasmic adaptor complex that recruits junctional actomyosin cytoskeleton. Upon CCM1 or CCM2 depletion, ICAP-1 protein is destabilized and lost. β 1 integrin is activated and activates in turn RhoA/ROCK-dependent actin stress fiber formation. Increased β 1 integrin activation and cell contractility result in aberrant remodeling of ECM in linear and parallel fibers onto which cells spread and flatten. A self-sustaining mechanical loop is initiated that increases intra- and external tensions destabilizing cell–cell junctions. (Permission from Faurobert et al., JCB 2013; doi/10.1083/jcb.20130304).

Figure 3: Juxtacrine effect of remodeled ECM from CCM2-depleted HUVEC on naïve endothelial cell adhesion. A- Immunostainings of FN and collagen IV of decellularized ECM remodeled by CT- or CCM2-depleted HUVEC Scale bar: 2 μ m. B- pMLC and F-actin stainings of naïve HUVEC spread for 4 hours on decellularized ECM remodeled by CT- or CCM2-depleted HUVEC and stained for FN. Scale bar: 5 μ m.

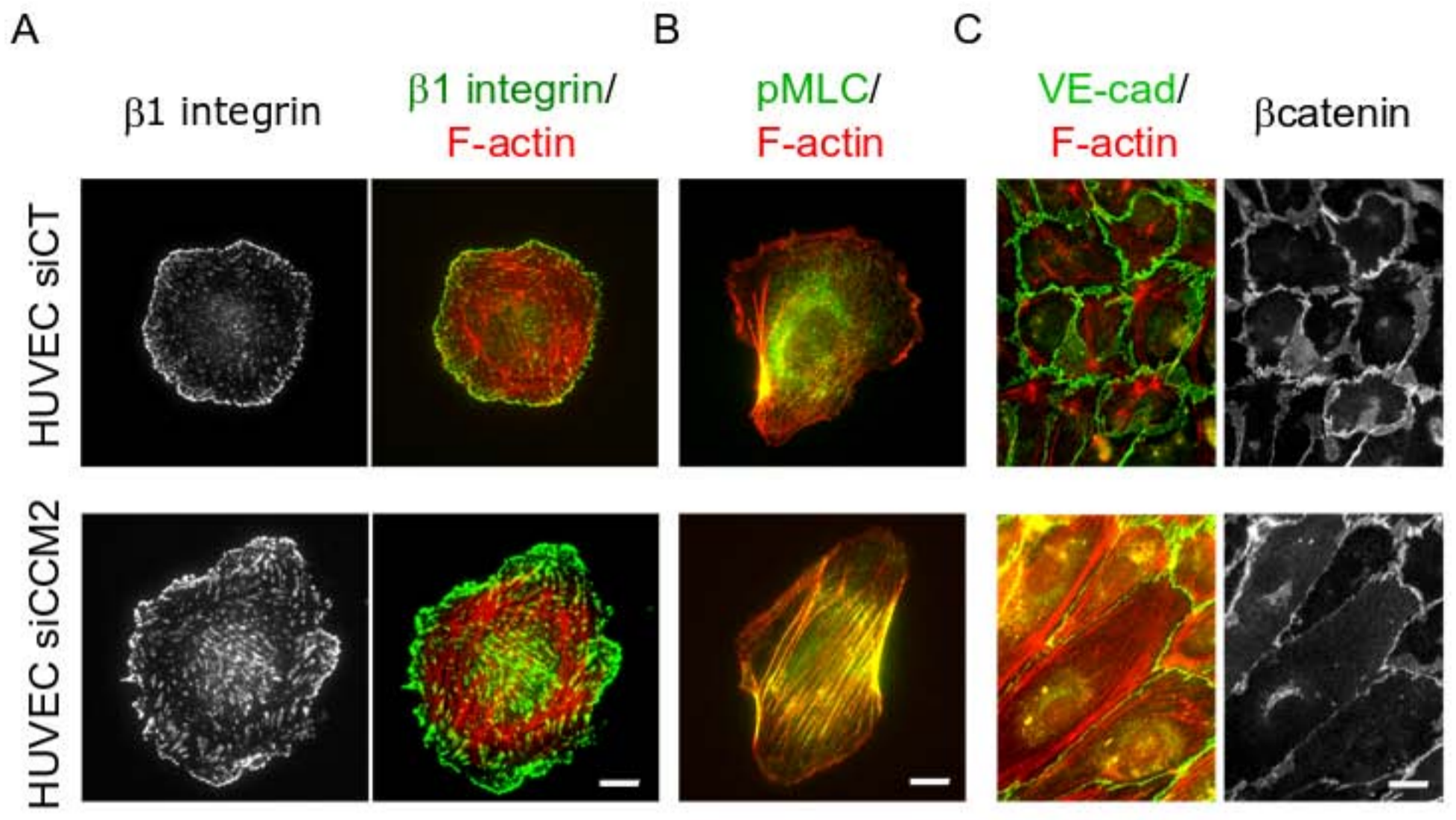


Figure 1

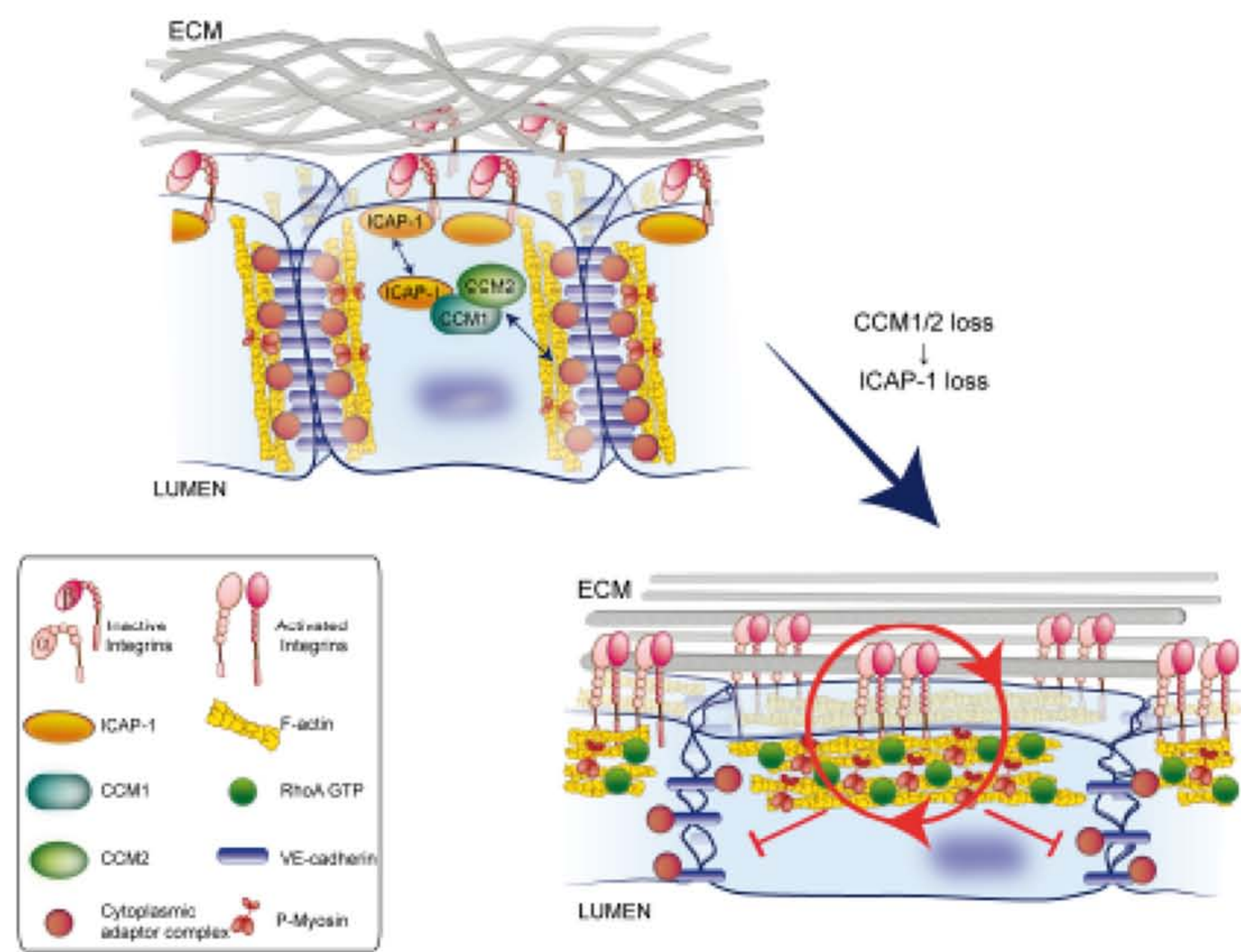


Figure 2

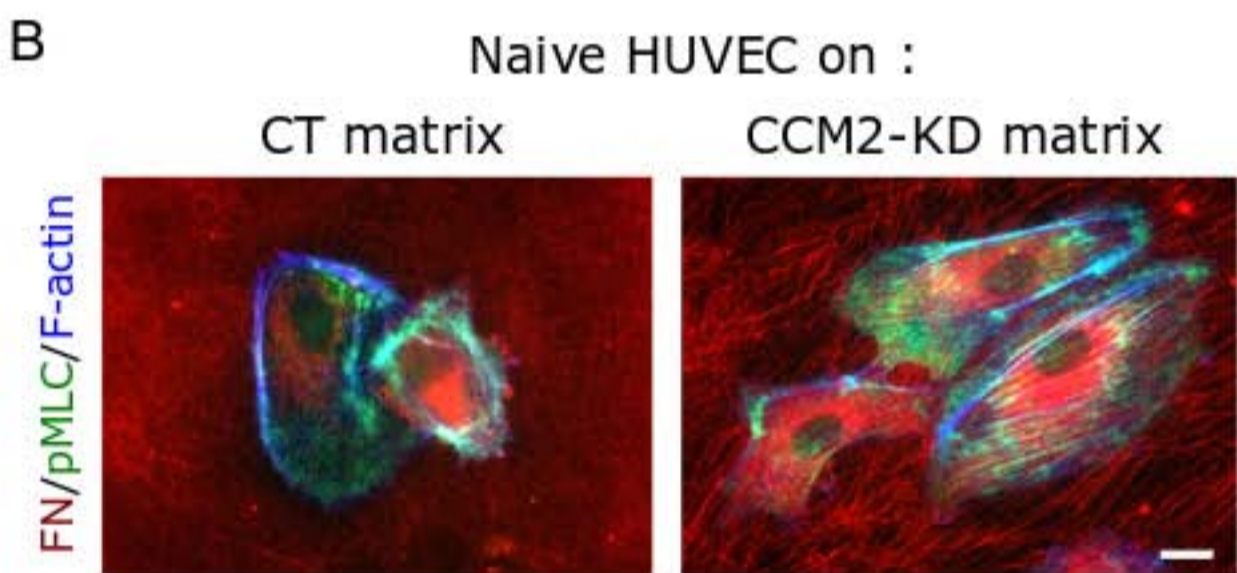
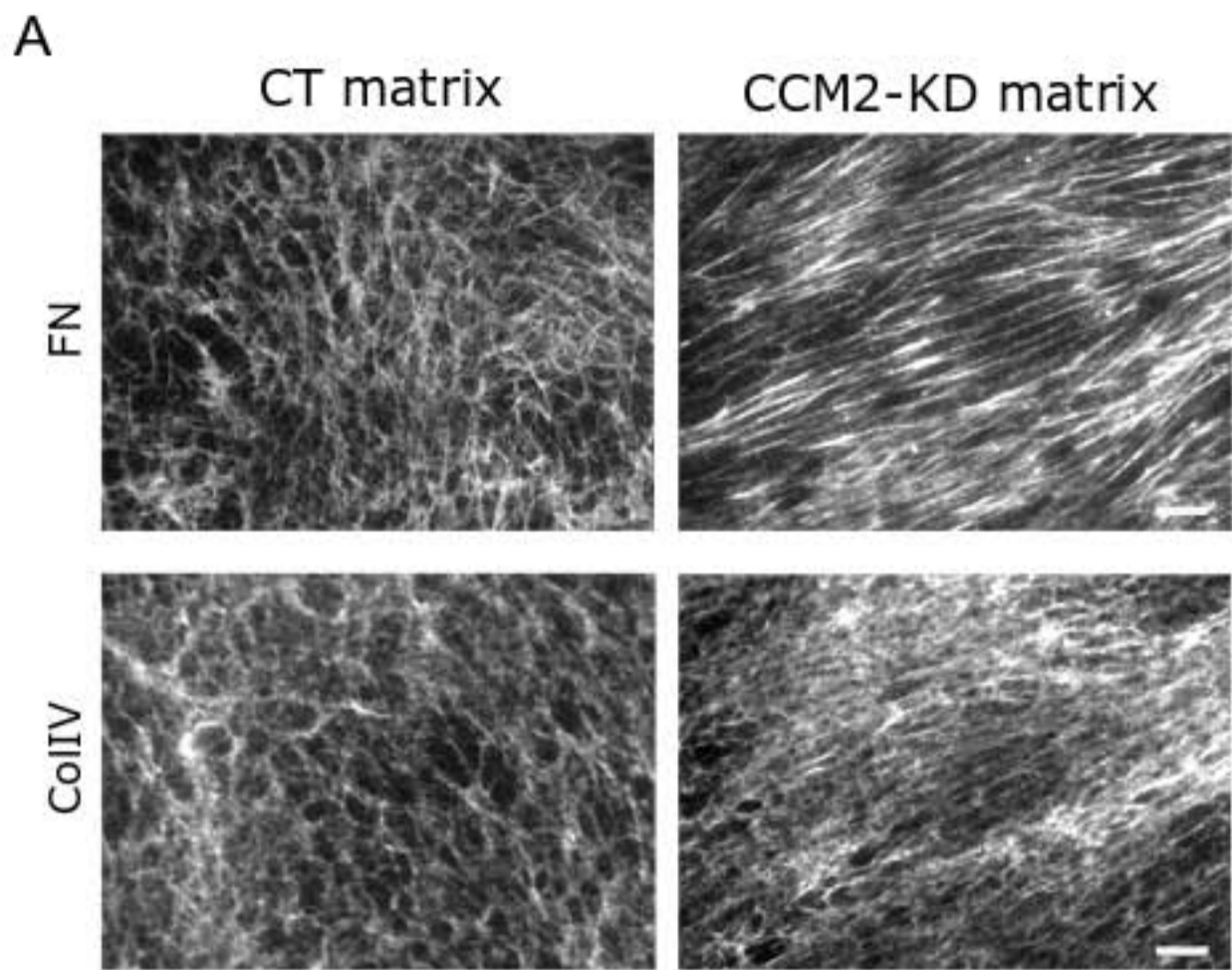


Figure 3

Les lésions CCM (Cerebral Cavernous Malformations) sont formées d'un empilement de vaisseaux capillaires tortueux, dilatés et hémorragiques situés dans le cerveau. Ces capillaires cérébraux sont dépourvus de cellules murales et sont formés d'une monocouche de cellules endothéliales (CE) peu jointives. La mutation perte de fonction de l'un des 3 gènes *ccm* (*ccm1*, *ccm2* et *ccm3*) est suffisante pour induire la formation de lésions CCM chez l'Homme. Dans les différents modèles mutants *ccm*, les CE présentent une homéostasie tensionnelle défectueuse caractérisée par un défaut de coordination entre les forces d'adhésions cellule-matrice et cellule-cellule. Ceci se traduit par la formation de fibres contractiles d'actomyosine ancrées sur de nombreuses adhérences focales à intégrine $\beta 1$ et par la perte des jonctions intercellulaires dépendantes de VE-cadhérine. L'association des protéines CCM1-3 forme une plateforme moléculaire qui contrôle, en aval de RhoA, l'activité des kinases ROCK1 et ROCK2 sur l'organisation du cytosquelette d'acto-myosine. Le complexe CCM recrute ROCK2 aux jonctions dépendantes de VE-cadhérine pour promouvoir un réseau d'actine cortical stabilisateur de ces jonctions intercellulaires alors que dans le même temps, il inhibe l'activité de ROCK1 pour réduire la formation de fibres de stress ventrales et ainsi limiter l'adhésion de la CE à la matrice extracellulaire. Il est connu que le microenvironnement de la lésion est remodelé notamment par des cellules immunitaires qui s'infiltrent pour déclencher une réponse inflammatoire chronique et favoriser l'expansion de la lésion. Il est également connu que les CE mutantes sécrètent des métalloprotéases et des cytokines, qu'elles surproduisent des ROS et qu'elles subissent une transition endothélio-mésenchymateuse (endoMT). Enfin, les lésions CCM sont des mosaïques de CE mutantes et sauvages qui sont recrutées au cours du temps dans la lésion. Néanmoins, le lien qui existe entre tous ces phénomènes favorables à la progression de la lésion CCM est encore mal compris et reste à élucider.

Abstract

CCM (Cerebral Cavernous Malformations) lesions are formed by stacks of tortuous, dilated and hemorrhagic capillaries located in the brain. These brain capillaries are devoid of mural cells and are formed of a monolayer of weakly joined endothelial cells (EC). The loss of function mutation in one of the 3 *ccm* genes (*ccm1*, *ccm2* and *ccm3*) is sufficient to induce the formation of CCM lesions in humans. In the different *ccm* mutant models, the ECs present defective tensional homeostasis characterized by a lack of coordination between the cell-matrix and cell-cell forces. This results in the formation of contractile actomyosin fibers anchored on numerous focal adhesions containing $\beta 1$ integrin and in the loss of VE-cadherin-dependent intercellular junctions. The association of CCM1-3 proteins forms a molecular scaffold that controls downstream of RhoA the activity of ROCK1 and ROCK2 on the organization of the acto-myosin cytoskeleton. The CCM complex recruits ROCK2 at the VE-cadherin dependent junctions to promote a network of cortical actin stabilizing these intercellular junctions while at the same time, it inhibits the activity of ROCK1 to reduce the formation of ventral stress fibers and thus limit the adhesion of the EC to the extracellular matrix. It is known that the microenvironment in the lesion is reshaped in particular by immune cells that infiltrate it to trigger a chronic inflammatory response and promote the expansion of the lesion. It is also known that mutant ECs secrete metalloproteases and cytokines, that they overproduce ROS and that they undergo an endothelio-mesenchymal transition (endoMT). Finally, CCM lesions are mosaics of mutant and wild-type ECs recruited into the lesion over time. However, whether a link exists between all these phenomena conducive to the progression of the CCM lesion is not known and remains to be elucidated. My work during this PhD allowed me to propose a model that unifies all these cellular behaviors. Indeed, I have highlighted a premature aging of endothelial cells depleted in CCM2. I have shown that this senescence is associated with a secretory behavior SASP (Senescence Associated with a Secretory Phenotype) which gives the EC the ability to actively reshape its environment, in particular by degrading it locally, to invade it and attract by chemo-attraction wild EC and immune cells. The second major contribution of my work has been to show that this SASP is due to the dysregulation of the mechanics of the EC. Indeed, I have shown that the increase in intracellular contractility associated with the loss of balance between the activities of ROCK1 and ROCK2 is responsible for this SASP. Inhibiting myosin II or depleting ROCK1 or ROCK2 restores the expression of half of the genes dysregulated by the loss of CCM2, blocks the appearance of senescence markers as well as the invasive and chemo-attractive capacities of CCM2-depleted ECs. These results open the way to the identification of new therapeutic targets responsible for the appearance and expansion of CCM lesions.