



**HAL**  
open science

# Identification de la protéine "Mutated in Colorectal Cancer" (MCC) comme un nouvel acteur de la voie WNT dans l'organisation polaire du plexus

Valentin Delobel

## ► To cite this version:

Valentin Delobel. Identification de la protéine "Mutated in Colorectal Cancer" (MCC) comme un nouvel acteur de la voie WNT dans l'organisation polaire du plexus. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2024. Français. NNT : 2024BORD0137 . tel-04734430

**HAL Id: tel-04734430**

**<https://theses.hal.science/tel-04734430v1>**

Submitted on 14 Oct 2024

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

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

**THESE PRESENTEE POUR OBTENIR LE GRADE DE  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BORDEAUX**

ECOLE DOCTORALE : n°154 Sciences de la vie et de la santé

SPECIALITE : Biologie cellulaire et physiopathologie

**IDENTIFICATION DE LA PROTEINE “MUTATED IN COLORECTAL  
CANCER” (MCC) COMME UN NOUVEL ACTEUR DE LA VOIE  
WNT DANS L'ORGANISATION POLAIRE DU PLEXUS  
VASCULAIRE**

Par Valentin DELOBEL

Sous la direction de : Cécile DUPLAA

Soutenue le 11 juillet 2024

**Membres du jury :**

M. SALTEL Frédéric, Directeur de Recherche, Université de Bordeaux	Président du Jury
Mme. VION Anne-Clémence, Chargée de Recherche, Université de Nantes	Examinatrice
Mme BRUNET Isabelle, Directrice de Recherche, Collège de France	Rapportrice
Mme. JONES Elisabeth, Professeur, Katholieke Universiteit Leuven	Rapportrice
Mme DUPLAA Cécile, Directrice de recherche, Université de Bordeaux	Directrice de thèse

## Résumé

La signalisation Wnt joue un rôle clé dans le développement d'un plexus vasculaire fonctionnel, assurant ainsi l'homéostasie des tissus. Son dysfonctionnement peut conduire à des pathologies vasculaires telles que les rétinopathies ou les démences. Cependant, les mécanismes moléculaires par lesquels cette voie régule l'architecture vasculaire restent encore mal compris. Dans cette étude, nous avons identifié la protéine « Mutated in Colorectal Cancer » (MCC) comme un nouveau composant de la voie Wnt non canonique de polarité planaire (PCP) dans les cellules endothéliales (CE). *In vitro*, nous avons démontré que MCC est une cible directe de la caséine kinase 1ε (CK1ε), un régulateur clé de la voie Wnt, sous la stimulation par Wnt5a, un ligand de la voie Wnt non canonique.

La suppression de *MCC* par une stratégie de siRNA perturbe la polarisation et la migration dirigée des CE cultivées sous flux laminaire. Pour élucider les mécanismes par lesquels MCC régule la polarité des CE pendant la migration, nous avons utilisé une stratégie de criblage différentiel (BioID) avec une protéine de fusion BirA\*-MCC exprimée dans des CE. Grâce à cette approche, nous avons montré que MCC interagit avec des protéines centrosomales, notamment CEP131. MCC régule le niveau protéique de CEP131 par un mécanisme d'autophagie, ce processus étant contrôlé par l'activation de CK1ε. De plus, nous avons démontré que la restauration de la polarité et de la migration dans les cellules endothéliales traitées avec un siRNA ciblant MCC est possible en inhibant la surexpression de CEP131. Nous proposons ainsi un modèle où l'activation de MCC, médiée par Wnt5a/CK1ε, est essentielle pour maintenir les niveaux de CEP131 dans les CE, ce qui est crucial pour l'organisation polarisée de l'appareil de Golgi pendant la migration dirigée des cellules endothéliales sous conditions de flux.

Pour étudier l'implication de MCC dans le développement vasculaire, nous avons spécifiquement déplété *MCC* dans les CE de souris (*Mcc*<sup>IECKO</sup>). Six jours après la naissance (P6), les souriceaux mutants *Mcc*<sup>IECKO</sup> présentent un retard significatif dans le développement vasculaire rétinien avec un réseau vasculaire moins dense, caractérisé par une réduction de la prolifération et une augmentation de la régression vasculaire. Afin d'analyser les défauts de polarisations des souris mutantes, nous les avons croisées avec des souris rapporteur GNrep. Au niveau du front de migration, les souriceaux mutants *Mcc*<sup>IECKO</sup> présentent des défauts majeurs de polarisation et de migration des Tip Cells. Nous avons émis l'hypothèse que les CE des souris *Mcc*<sup>IECKO</sup> étaient plus sensibles au flux. *In vitro*, dans les CE exposées au flux laminaire, la perte de *MCC* entraîne une augmentation importante de l'expression de *KLF2*, facteur de transcription majeur de réponse aux stress de cisaillement. Les souriceaux ont été traités avec du Captopril, afin de diminuer la pression artérielle. Ce traitement restaure la densité vasculaire chez les souris *Mcc*<sup>IECKO</sup> mais ne réverse pas les défauts de polarité des CE au front de migration.

En résumé, nos résultats révèlent MCC comme un nouvel acteur de la voie Wnt non canonique PCP dans les CE, contribuant à la maturation dynamique et à la formation des vaisseaux sanguins. MCC contrôlerait la stabilité et la fonction des centrosomes, qui sont essentiels pour la migration polarisée des CE. Nos données montrent le double rôle de la voie Wnt non canonique, à la fois dans l'adaptation structurelle des cellules endothéliales et dans leurs fonctions mécano-sensorielles, essentielles pour un développement et un remodelage vasculaire appropriés.

**Mots clefs :** Développement vasculaire – Voie Wnt – Polarité planaire – Mutated in Colorectal Cancer – Flux sanguin – CEP131

## Abstract

Wnt signalling plays a key role in the development of a functional vascular plexus, ensuring tissue homeostasis. Its dysfunction can lead to vascular pathologies such as retinopathy and dementia. However, the molecular mechanisms by which this pathway regulates vascular architecture remain poorly understood. In this study, we identified the Mutated in Colorectal Cancer (MCC) protein as a novel component of the planar cell polarity (PCP) non-canonical Wnt pathway in endothelial cells (ECs). *In vitro*, we demonstrated that MCC is a direct target of casein kinase 1 $\epsilon$  (CK1 $\epsilon$ ), a key regulator of the Wnt pathway, under stimulation by Wnt5a, a ligand of the non-canonical Wnt pathway.

Suppression of *MCC* by an siRNA strategy disrupts polarisation and directed migration of ECs cultured under laminar flow. To elucidate the mechanisms by which MCC regulates EC polarity during migration, we used a differential screening (BioID) strategy with a BirA\*-MCC fusion protein expressed in ECs. Using this approach, we showed that MCC interacts with centrosomal proteins, in particular CEP131. MCC regulates the protein level of CEP131 by an autophagy mechanism, this process being controlled by the activation of CK1 $\epsilon$ . Furthermore, we have demonstrated that restoration of polarity and migration in endothelial cells treated with siRNA targeting *MCC* is possible by inhibiting CEP131 overexpression. We thus propose a model where Wnt5a/CK1 $\epsilon$ -mediated activation of MCC is essential to maintain CEP131 levels in ECs, which is crucial for polarised Golgi apparatus organisation during directed endothelial cell migration under flow conditions.

To investigate the involvement of MCC in vascular development, we specifically depleted MCC in mouse ECs (*Mcc*<sup>iECKO</sup>). Six days after birth (P6), *Mcc*<sup>iECKO</sup> mutant mice show a significant delay in retinal vascular development with a less dense vascular network, characterised by a reduction in proliferation and an increase in vascular regression. To analyse the polarisation defects in the mutant mice, we crossed them with GNrep reporter mice. At the migration front, *Mcc*<sup>iECKO</sup> mutant mice showed major defects in Tip Cells' polarisation and migration. We hypothesised that ECs from *Mcc*<sup>iECKO</sup> mice were more sensitive to flow. *In vitro*, in ECs exposed to laminar flow, loss of MCC resulted in a significant increase in the expression of KLF2, a major transcription factor in response to shear stress. The mice were treated with Captopril to reduce arterial pressure. This treatment restored vascular density in *Mcc*<sup>iECKO</sup> mice, but did not reverse EC polarity defects at the migration front.

In summary, our results reveal MCC as a novel player in the non-canonical PCP Wnt pathway in ECs, contributing to dynamic maturation and blood vessel formation. MCC is thought to control the stability and function of centrosomes, which are essential for polarised EC migration. Our data demonstrate the dual role of the non-canonical Wnt pathway, both in the structural adaptation of endothelial cells and in their mechanosensory functions, which are essential for proper vascular development and remodelling.

**Key words :** Vascular development – Wnt Pathway – Planar Polarity – Mutated in Colorectal Cancer – Blood flow – CEP131

## Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier le Dr Isabelle Brunet et le Pr Elisabeth Jones d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse et d'avoir pris le temps de lire ce manuscrit. Je remercie également les Dr Anne-Clémence Vion et Frédéric Saltel d'avoir accepté de prendre part au jury de ma thèse.

Je remercie le Pr Thierry Couffinhal de m'avoir accueilli au sein de l'INSERM U1034 et pour avoir suivi l'avancée de mes travaux au cours de mes quatre ans de thèse. Merci pour votre confiance, votre écoute et vos critiques qui m'ont permis d'avancer.

Je souhaite remercier profondément ma directrice de thèse Cécile Duplâa, qui a survécu à ces quatre ans à me supporter. Quatre ans à devoir canaliser mon énergie, et mon manque de sucre. Pour ma part, j'ai eu la chance d'être encadré par une scientifique dont la recherche de qualité est une vocation, dont l'investissement et la présence ont été indéfectibles du début à la fin. Cécile m'a appris la rigueur dans la démarche scientifique et dans la présentation des résultats (c'est bon, tous les graphiques ont la même taille et les légendes sont toutes dans la même police, enfin je crois...). J'espère qu'elle ne se plaindra pas trop de moi dans la prochaine réunion du comité de bien-être des maîtres de thèse persécutés (merci Marie-Ange...). Ce projet ne serait jamais allé aussi loin sans elle, sans toutes ces rétines disséquées, sans ses idées et son savoir encyclopédique. J'espère devenir un scientifique aussi ingénieux et cultivé. Merci pour tout Cécile.

Un très grand merci à Béatrice, ma sorcière des western blots. Je pense que je vais garder mes tocs toute ma vie de chercheur ! Sans toi, ce projet ne serait pas allé aussi loin. Merci pour ton aide, ton savoir et ta profonde gentillesse. Tu m'as vraiment beaucoup épaulé pendant ces quatre ans, tant scientifiquement que moralement. Avec Cécile, on a formé un super trio, merci beaucoup.

Un grand merci à Claire, notre jeune, mais petite, maître de conférence. Claire est... très franche. Et ses remarques ont toujours été d'une pertinence saillante. Merci pour tous tes conseils, les abstracts relus et les présentations jugées (#cestmoche). Merci pour toutes ces TREEEEEEEES longues heures de discussion. Pour m'avoir écouté me lamenter sur mes manip ratées pas si ratées, me vanter de mes manip réussies pas si réussies, pour avoir parlé de tout et de rien, pour les chemins de retour dans le très faillible Tram B. Je regrette juste une chose, ne pas avoir goûté le « légendaire » poulet tikka massala...

Un très grand merci à mes collègues de bureau préférées, Juliette et Marie-Lise. Je ne pouvais pas rêver mieux comme compagnie, même si c'est difficile de rédiger, du coup. Je garderai beaucoup de bons souvenirs de ce bureau (si bien rangé), de toutes ces soirées passées ensemble à l'Ultra, à parler anglais, à manger des mozza sticks au Frog (même si rien ne vaut un bon restau bien snob comme j'aime) et à tout ce chocolat dégusté. Marie-Lise, tu

seras pour toujours celle avec qui je suis allé voir en concert, la meilleure, l'indétrônable, la sublime Mylène !!!! C'était une Belle journée, on a Rallumé les étoiles et on n'en est certainement pas ressortis Désenchantés. Je n'oublie pas les M2 qui sont passées par ce bureau. Soizic, notre sirène nationale et Adèle notre garde-manger alsacien. J'espère vous voir le 11 !! Et bien sûr, merci à celui qui nous a rejoint à la fin, Maxime. Tu vas voir, MCC c'est un vrai bonheur. Il y a Mylène et après il y a MCC. Bon courage pour ta thèse, tu es sur la bonne voie.

Merci à nos médecins, Sébastien, Romain et Arthur. Seb, alors qu'un enfant va quitter le nid, tu en as un autre dont tu dois t'occuper maintenant (et il ne stressera pas pour l'envoi d'échantillons de RNA seq). Beaucoup de bonheur avec Eva et le petit Léon. Et Bernard bien sûr. Bon, Romain, je sais que ta meilleure amie c'est Juju mais je te dis quand même merci. C'était un vrai plaisir de t'avoir rencontré et désolé pour tous les créneaux de confocal que je t'ai piqués (en même temps, fallait pas manger tout le chocolat). Arthur, bon courage pour ta thèse. Je suis sûr que tu vas faire un bon travail. Après tout, tes rin sont (presque) aussi bons que les miens. Je remercie également notre professeur préférée Pascale (avec Marie-Lise et Claire, je ne veux pas faire de jalouses). Merci pour ton expertise en flux, en microscopie et pour ta bonne humeur. Merci pour tes conseils, pour tes critiques et pour les pastis landais.

Merci à mon partenaire de souffrance, Paul. On en a passé du temps à se plaindre de nos projets qui n'avancent pas. On aurait peut-être dû bosser au lieu de râler, ça serait allé plus vite. Mais, on aura mangé de bonnes crêpes, de bonnes pizzas et de bonnes poutines. Heureusement qu'on fait du CrossFit... Ah non, pas moi, c'est vrai. Bah, heureusement que je vais à la piscine... Ah plus top c'est vrai... Bon bah, tant pis pour le gras, faut de l'énergie pour une thèse et je suis content de t'avoir eu à mes côtés. Bisous à Sharki.

Je remercie les deux chefs de l'équipe Cancange. Oui, Marie-Ange, je te remercie même si tu as choisi Paul plutôt que moi, que tu fais du cœur et que tu n'aimes pas la polarité. Mais tu verras, tu finiras par faire un projet Hedgehog et polarité. Candice, je me rappellerai que tu es une super guide touristique. Le congrès en Italie, c'était vraiment chouette (des conférences ? C'est quoi ?). En tout cas, je vous remercie toutes les deux. Vous êtes aussi des modèles de scientifiques, pour moi. Je suis sûr que vous avez encore plein de supers papiers qui vous attendent. Bonne continuation !

Merci à tous les autres thésards du labo, passés et présents : Mélo, Célia, Virginie, Ninon, Geoffrey, Margaux, Laurianne, Pierre, Pauline et Laura. Bon courage pour tous vos projets en cours et futurs.

Merci à Sylvain et Maxime pour leur disponibilité et leur adaptabilité. Oui, le post-natal, c'est chiant... Mais voilà, on aime quand c'est chiant sinon on ne ferait pas ce métier. Sylvain, merci pour tous tes mots doux, c'était un vrai déplaisir. Plaisir pardon.

Merci à l'équipe bio mol, Omar, Carole, Anna. Bonne continuation à vous aussi. Carole, merci pour ce voyage au collège de France et cette bonne pâtisserie au Luxembourg et surtout merci pour tous tes gentils compliments pleins de sincérité. Et Omar, je ne peux que te souhaiter de réussir tes concours. Accroche-toi, tu le mérites !

Merci à Christelle et Andréa pour leur support dans notre travail quotidien, pour les petits événements conviviaux organisés à l'unité, c'est toujours très chouette. Et merci à tous les autres membres de l'U1034 : Philippe, Olivier, Fabien, Marin et Alexandre. Merci à Annabelle pour m'avoir dépanné à plusieurs reprises, en culture cellulaire. Tu m'as sauvé plus d'une fois de la noyade. Merci à Chloé, qui m'a fait comprendre à quel point mes premières présentations étaient incompréhensibles pour quelqu'un qui ne fait pas de signalétique. C'était une des meilleures critiques qu'on m'ait faite.

Je remercie très sincèrement la Nouvelle Société Francophone d'Athérosclérose de m'avoir alloué 9 mois de thèse supplémentaires. Ces 9 mois ont été déterminants pour ce projet. Merci à tous les membres du jury qui m'ont fait confiance, aux Dr Muriel Laffargue, Maryse Guérin, Soraya Taleb, Mathilde Varret, Olivier Meilhac, Maxime Cournot et au Pr Philippe Boucher.

Je remercie Gael, Nafiisha et Karen qui sont entrés dans ma vie professionnelle de manière totalement inattendue. A très bientôt, pour une nouvelle aventure...

Je remercie mes amis Pierre, Rémi, Guillaume, Alix et Cécile, la team ingé. Ces quatre ans ont été jalonnés de nombreux week-ends avec vous et ça faisait du bien. Je sais que je ne réponds pas souvent sur la conversation, mais qu'est-ce que ça fait du bien de vous revoir, enfin presque... Je remercie la team Hutech, Clément, Simon, Alice, Laureline, Mélanie, Pierre d'être tous venus à Bordeaux. Je remercie ceux qui pourront venir le 11 juillet et pour les autres j'espère vous revoir avant mon départ. Merci à ma Soso, qui est à mes côtés depuis plus de 10 ans ! N'empêche que j'ai gagné, je serai docteur (enfin on espère...) avant toi !!! Et toc !

Je remercie très chaleureusement ma famille qui m'a porté pendant ces 26 ans. Tout d'abord mes parents. J'ai eu le haut du panier, les meilleurs, toujours là pour moi depuis le début, sans faillir. Si je suis qui je suis, je vous le dois beaucoup. Je remercie mon petit frère, plus grand et plus musclé, c'est le monde à l'envers... Je remercie mes grands-parents, mes oncles et tantes, mes cousins. J'ai une belle famille et ça aide à tenir la cadence. Et Zouzouille !!

En parlant de tenir, je tiens à remercier, bien qu'elle ne lira jamais ces lignes, Mylène pour m'avoir accompagné de sa douce voix et de sa poésie pendant cette thèse. Sa musique m'a toujours aidé dans mes petits coups de mou, à faire passer la préparation des plaques de qPCR plus vite. Elle me transporte, me permet de m'évader comme aucun autre artiste n'a su le faire. C'était un des coups de foudre de cette thèse. A bientôt au Stade de France...

Et enfin, en parlant de coup de foudre, il faut reconnaître que la thèse ce n'est pas de tout repos. Aussi stimulant que stressant, si je n'ai pas explosé en vol, c'est grâce à toi, Nicolas. Bientôt quatre ans que l'on se connaît. Avec toi, tous les soucis s'envolent...

## **Table des abréviations**

ADN: Acide désoxyribonucléique

AKT: Protéine Kinase B

ARN: Acide ribonucléique

ALK1: Activin receptor-like kinase 1

AP-1: Activator Protein 1

APC: Adenomatous polipus coli

APCDD1: APC Down-regulated 1

ATF2: Activating transcription factor 2

ATP: Adénosine triphosphate

BHE: Barrière hémato-encéphalique

BHCR: Barrière hémato-céphalo-rachidienne

BHR: Barrière hémato-rétinienne

BMP: Bone morphogenic protein

$\beta$ -TRCP: Beta-transducin repeat containing

CEP: Centrosomal protein

Cdc42: Cell division control protein 42

CDK : Cyclin dependant kinase

CK1: Caséine kinase 1

COUP-TFII: COUP transcription factor 2

DAAM1: Dishevelled Associated Activator of Morphogenesis 1

DGO: Diego

DKK1: Dickkopf 1

DLL4: Delta-like 4

DVL: Dishevelled

eNOS: Endothelial nitric oxyde synthase

ERK: Extracellular signal-regulated kinase

FMI: Flamingo

FZD: Fzd

GCP:  $\gamma$ -tubulin complex proteins

GEF: Guanine nucleotide exchange factors

GPR: Probable G-protein coupled receptor

GRIP:  $\gamma$ -tubulin ring proteins

GSK3 $\beta$ : Glycogen synthase kinase 3 $\beta$

$\gamma$ TURC:  $\gamma$ -tubulin ring complexes

HES: Hairy and enhancer of split

HEY: Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein

HIF1 $\alpha$ : Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$

HUVEC: Human umbilical veinous endothelial cell

JAM: Junction adhesion molecule

KLF2: Krüppel-like Factor 2

LEF: Lymphoid enhancer factor

LFNG: Lunatic fringe

LRP5/6: Low-density lipoprotein receptor-related proteins 5/6

MAPK: Mitogen-activated protein kinase

MCC: Mutated in Colorectal Cancer

MEK: Mitogen-activated protein kinase

MFNG: Manic fringe

MTOC: Centre organisateur des microtubules

NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

ncMTOC : Centre organisateur des microtubules non centrosomal

NF $\kappa$ B: Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NICD: Notch intra-cellular domain

NO : Nitric oxyde

OIR: Oxygen-induced retinopathy

PCA: Analyse par composante principale

PCP: Planar cell polarity

PCR: Polymerase chain reaction

PDGF $\beta$ : Platelet-derived growth factor  $\beta$

PECAM-1: Platelet endothelial cell adhesion molecule

PI3K: Phosphoinositide 3-kinase

PIP3: Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate

PK: Prickle

PKD: Polycystin

PLK4: Polo-like Kinase 4

PORCN: membrane-bound-O-acetyltransferase porcupine

PP2A: Protein Phosphatase 2A

PTEN: Phosphatase and tensin homolog

PTK7: Tyrosine-protein kinase-like 7

RAS: Rat sarcoma virus

RCPG: Récepteurs membranaires couplés aux protéines G

Rho: Ras homolog family member)

ROCK: Rho associated kinase

ROR2: Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2

SFK: Src family kinase

sFRP: Secreted Frizzled related Protein

SMAD: Mothers against decapentaplegic homolog

SOX17: SRY-box 17

STIL: SCL-interrupting locus protein

TCF: T-cell factor

TSPAN12: Tetraspanin12

VANGL: Vang Gogh like protein

VEGF: Vascular endothelial growth factor

VEGFR: Vascular endothelial growth factor receptor

WIF: Wnt inhibitor factor

ZO: Zonula occludens

# Table des matières

## INTRODUCTION

.....	17
Chapitre 1 : Développement d'un plexus vasculaire .....	18
I- L'endothélium comme interface entre sang et tissu.....	18
a. Rôles et structure générale du réseau vasculaire.....	18
b. Les cellules endothéliales au cœur du fonctionnement des vaisseaux sanguins.....	20
i. Généralités sur les cellules endothéliales.....	20
ii. Les jonctions cellulaires au cœur de la stabilité de l'endothélium .....	20
II- Le développement vasculaire : une histoire de bourgeonnement et de polarité.....	22
a. L'angiogenèse : le développement de nouveaux tubes vasculaires à partir de vaisseaux préexistants .....	22
a. Tip cell et Stalk cell : deux phénotypes endothéliaux transitoires guidant et formant le nouveau plexus .....	22
i. Initiation du bourgeonnement par un gradient de VEGF .....	22
ii. Le premier acteur endothélial de l'angiogenèse : la cellule de tête ou « tip cell » .....	23
iii. Les « talk cells », cellule de la tige, en deuxième ligne de l'angiogenèse .....	24
b. Régulation moléculaire et métabolique de l'angiogenèse .....	25
i. La Voie VEGF/Notch au cœur de la compétition entre tip cells et stalk cells .....	25
ii. Régulation moléculaire de la prolifération au cours de l'angiogenèse .....	27
iii. Régulation métabolique de l'angiogenèse : des besoins différents entre les tip cells et les stalk cells.....	28
c. Quiescence des cellules endothéliales pour le maintien de l'homéostasie vasculaire .....	28
III- La polarité et la migration endothéliale au cœur de l'organisation du plexus vasculaire....	30
a. Principes généraux de la migration et de la polarité.....	30
i. Migration.....	30
ii. Polarité.....	31
b. Les mécanismes de polarité et de migration au cours du développement vasculaire .....	32
i. Perception et réponse des cellules endothéliales au flux laminaire sanguin .....	32
ii. Polarisation des cellules endothéliales selon le flux sanguin.....	34
iii. Migration des cellules endothéliales veineuses contre le flux dans le développement artériel.....	36
iv. Compétition entre signaux mécaniques et chimiques pour la polarisation des cellules endothéliales.....	38
v. Migration des cellules endothéliales au cours du remodelage vasculaire .....	40
c. Le centrosome : une organelle au cœur de la polarité endothéliale .....	43
i. Rôle du centrosome dans le développement vasculaire à travers la polarité et la migration .....	43

ii.	Régulation du matériel centriolaire dans le maintien de la fonctionnalité du centrosome	46
iii.	Réarrangement du cytosquelette de tubuline depuis le centrosome	47
IV-	Un modèle d'étude de l'angiogenèse : la vascularisation post-natale de la rétine murine	49
a.	Principes généraux de la vascularisation de la rétine	49
b.	Compétition entre le gradient de VEGF et le flux lors du développement rétinien	51
Chapitre 2 : Le rôle de la voie Wnt dans le développement et l'homéostasie vasculaire		54
I-	Rôle de la voie Wnt dans le développement du réseau vasculaire	54
a.	Généralités sur la voie de signalisation wnt	54
i.	Les ligands Wnt	55
ii.	La voie canonique Wnt/ $\beta$ -caténine	56
iii.	La voie non-canonique Wnt/PCP	58
a.	La voie Wnt/PCP comme chef d'orchestre de l'organisation planaire du plexus vasculaire	61
II-	Le rôle de la voie Wnt dans la vascularisation de plusieurs tissus	63
a.	Le rôle de la voie Wnt dans la vascularisation de la rétine	63
i.	La voie canonique Wnt/ $\beta$ -caténine dans la vascularisation de la rétine	63
ii.	La voie non-canonique Wnt/PCP dans la vascularisation de la rétine	64
b.	Le rôle de la voie Wnt dans la vascularisation de la barrière hémato-encéphalique	65
i.	Présentation de la barrière hémato-encéphalique	65
ii.	La voie Wnt/ $\beta$ -caténine maintient les propriétés de barrière de la BHE	67
iii.	La voie Wnt/PCP : l'oubliée de la barrière hémato-encéphalique	70
III-	Dérégulation de la voie Wnt dans les pathologies vasculaires	71
a.	Les dérégulations de la voie Wnt dans les pathologies vasculaires ophtalmiques	71
b.	De la démence aux hémorragies cérébrales : les dérégulations de la voie Wnt dans un contexte pathologique dans le cerveau	71
c.	La voie Wnt dans les cellules endothéliales tumorales	72
d.	Conclusion sur le potentiel thérapeutique de la voie Wnt	73
Chapitre 3 : Mutated in Colorectal Cancer Protein (MCC) : un nouvel acteur de la voie Wnt/PCP		74
I-	Présentation générale de la protéine MCC	74
II-	MCC : un suppresseur de tumeur réprimant la voie Wnt/ $\beta$ -caténine	76
a.	Mécanisme d'inhibition de la $\beta$ -caténine par MCC	76
b.	Effet de la délétion épithéliale de <i>Mcc</i> dans un modèle murin de cancer colorectal	78
III-	MCC : un nouvel acteur de la polarité et de la voie Wnt/PCP	79
a.	MCC interagit avec SCRIB dans le cadre de la polarité apico-basale et de la migration	79
b.	Rôle de MCC dans la voie Wnt/PCP au cours de l'embryogenèse	80
<b>RÉSULTATS</b>		83
Chapitre 1 : Etude du rôle de MCC dans l'organisation polaire du réseau vasculaire		84

I-	Contexte scientifique .....	84
II-	Objectif et stratégie .....	85
III-	Manuscrit .....	85
Chapitre 2 : Expérimentations complémentaires sur le rôle de MCC dans l'organisation polaire du réseau vasculaire .....		133
I-	Matériel et méthode complémentaire .....	133
a.	Immunomarquage <i>in toto</i> de l'aorte .....	133
b.	Test <i>in vitro</i> de la perméabilité .....	133
c.	Test <i>in vitro</i> de la prolifération .....	134
d.	Test d'activité kinase .....	134
II-	Etude complémentaire.....	136
a.	Etude de la polarité dans l'aorte murine à P6.....	136
b.	Etude de l'architecture vasculaire et de la polarité au front de migration chez les souris hétérozygotes.....	137
c.	Etude de l'impact de la délétion endothéliale de <i>Mcc</i> sur la perméabilité du réseau vasculaire rétinien .....	139
d.	Etude de l'impact de la délétion endothéliale de <i>Mcc</i> à un âge plus avancé.....	142
e.	La délétion de <i>MCC</i> affecte l'activité des kinases liées au cycle cellulaire .....	143
III-	Conclusions .....	146
<b>CONCLUSIONS &amp; PERSPECTIVES</b> .....		147
I-	Résumé des résultats obtenus .....	148
II-	Limites & perspectives .....	149
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....		153
<b>LISTE DES PUBLICATIONS</b> .....		176
<b>LISTE DES CONGRÈS ET PRIX</b> .....		202

## Table des Figures

<i>Figure 1: Architecture du réseau sanguin</i> .....	19
<i>Figure 2: Structure des jonctions adhérentes</i> .....	21
<i>Figure 3: Structure des jonctions serrées</i> .....	21
<i>Figure 4: Expansion angiogénique au niveau du front vasculaire</i> .....	23
<i>Figure 5: Modèle du mécanisme angiogénique</i> .....	25
<i>Figure 6: Voie de signalisation régissant la compétition entre tip cell et stalk cell</i> .....	26
<i>Figure 7: Rôle de la modulation du cycle cellulaire par ERK/p21 dans la différenciation entre tip et stalk cells</i> .....	27
<i>Figure 8: Migration des cellules veineuses vers le lit artériel</i> .....	29
<i>Figure 9: Schéma des différentes étapes de la migration cellulaire</i> .....	30
<i>Figure 10: Succession des événements de perception et de réponse des cellules endothéliales au flux sanguin</i> .....	34
<i>Figure 11: Schéma illustrant la polarisation des cellules endothéliales selon le flux sanguin</i> .....	35
<i>Figure 12: Schéma récapitulant les caractéristiques moléculaires et cellulaires différenciant veines et artères</i> .....	36
<i>Figure 13: Stade du cycle cellulaire dans les cellules endothéliales artérielles et veineuses de la rétine murine à P6</i> .....	37
<i>Figure 14: Migration des cellules veineuses vers le lit artériel</i> .....	38
<i>Figure 15: Effet dose dépendant du flux et du VEGFA sur la polarité endothéliale</i> .....	39
<i>Figure 16: Schéma des différentes étapes de l'involution vasculaire</i> .....	40
<i>Figure 17: Schéma des différentes étapes de la régression vasculaire</i> .....	41
<i>Figure 18: Microscopie confocale d'un segment de régression vasculaire dans la rétine murine à P6</i> .....	42
<i>Figure 19: Rôle de la régression vasculaire induite par le flux dans la maturation vasculaire</i> .....	42
<i>Figure 20: Microscopie électronique du centrosome</i> .....	43
<i>Figure 21: Démultiplication centrosomale dans la cellule endothéliale</i> .....	45
<i>Figure 22: La démultiplication centrosomale conduit à des cellules endothéliales et à des vaisseaux anormaux</i> .....	45
<i>Figure 23: Effets de la régulation de l'expression de la phosphorylation de CEP131 sur la structure du centrosome</i> .....	47
<i>Figure 24: Nucléation du cytosquelette de tubuline depuis le centrosome</i> .....	48
<i>Figure 25: Rôle du matériel centriolaire dans l'initiation de la ciliogenèse</i> .....	49
<i>Figure 26: Schéma du développement vasculaire dans l'œil de la souris</i> .....	49
<i>Figure 27 : Imagerie confocale de la vascularisation de la souris de P1 à P15</i> .....	50
<i>Figure 28: Segmentation du plexus rétinien selon le stimulus de polarité des cellules endothéliales</i> .....	52
<i>Figure 29: Modulation de la zone de transition S&gt;R par l'intensité du stimulus chimique et mécanique dans la vascularisation de la rétine murine</i> .....	53
<i>Figure 30: Schéma de sécrétion des ligands Wnt</i> .....	55
<i>Figure 31: Système de dégradation de la <math>\beta</math>-caténine en absence de ligand Wnt</i> .....	56
<i>Figure 32: Activation de la voie canonique Wnt en présence de ligand Wnt</i> .....	57
<i>Figure 33: La voie Wnt/PCP régit l'organisation planaire des tissus épithéliaux</i> .....	59
<i>Figure 34: Activation de la voie Wnt/PCP en présence de ligand Wnt</i> .....	60
<i>Figure 35: Modèle du rôle de la voie non-canonique Wnt sur la réorganisation polaire des cellules endothéliales induite par le flux</i> .....	62
<i>Figure 36: La délétion endothéliale de CDC42 entraîne un défaut majeur de polarité endothéliale</i> .....	65
<i>Figure 37: Schéma de la structure de la barrière hémato-encéphalique</i> .....	66
<i>Figure 38: Schéma des rôles des différents récepteurs et co-récepteurs dans la réponse au signal Wnt7</i> .....	68
<i>Figure 39: La voie Wnt dans l'endothélium de la barrière hémato-encéphalique</i> .....	70
<i>Figure 40: Schéma du locus mcc chez le poisson zèbre</i> .....	74
<i>Figure 41: Profil d'expression de Mcc dans différents tissus murins et à différents âges</i> .....	75
<i>Figure 42: Résumé du mécanisme d'inhibition de l'activité transcriptionnelle de la <math>\beta</math>-Caténine par MCC dans le carcinome colorectal</i> .....	77

<b>Figure 43: Proposition d'un rôle de MCC indépendant de la régulation de la <math>\beta</math>-caténine dans la protection contre le cancer colorectal .....</b>	<b>78</b>
<b>Figure 44: Proposition d'un mécanisme de relocalisation de MCC au pôle apical de la cellule épithéliale .....</b>	<b>80</b>
<b>Figure 45: Embryons de poisson zèbre injectés avec des morpholinos dirigés contre <i>mcc</i>.....</b>	<b>80</b>
<b>Figure 46: Photos des différentes catégories d'embryons de poissons zèbres injectés avec un mRNA <i>mcc</i> et un MO <i>wn5b</i>, <i>vangl2</i> ou <i>ror2</i> .....</b>	<b>81</b>
<b>Figure 47: Rôle de MCC épithéliale dans la voie Wnt/PCP au cours de la gastrulation du poisson zèbre .....</b>	<b>82</b>
<b>Figure 48: Schéma de la technologie PamChip.....</b>	<b>135</b>
<b>Figure 49: Volcano plot des peptides phosphorylés différemment entre condition contrôle et siMCC ....</b>	<b>135</b>
<b>Figure 50: La polarité endothéliale aortique n'est pas affectée par la délétion de <i>Mcc</i> chez la souris à P6 ...</b>	<b>137</b>
<b>Figure 51: La délétion hétérozygote de <i>Mcc</i> dans la cellule endothéliale n'entraîne pas de défaut de vascularisation dans la rétine à P6.....</b>	<b>138</b>
<b>Figure 52: La délétion hétérozygote de <i>Mcc</i> dans la cellule endothéliale n'entraîne pas de défaut de polarisation au niveau du front de migration rétinien à P6 .....</b>	<b>139</b>
<b>Figure 53: La délétion endothéliale de <i>Mcc</i> ne déstabilise pas la barrière hémato-rétinienne de souris à P6</b>	<b>141</b>
<b>Figure 54: La délétion de MCC ne diminue pas la perméabilité des cellules endothéliales <i>in vitro</i> .....</b>	<b>141</b>
<b>Figure 55: Les défauts vasculaires dus à la délétion endothéliale de <i>Mcc</i> observés chez la souris à P6 sont résolus à P12 .....</b>	<b>142</b>
<b>Figure 56: Coral plot de l'activité des kinases de cellules endothéliales transfectées avec un siMCC.....</b>	<b>144</b>
<b>Figure 57: La délétion de MCC ne ralentit pas la prolifération des cellules endothéliales en culture .....</b>	<b>145</b>
<b>Figure 58: Schéma bilan du rôle de MCC dans la polarité endothéliale .....</b>	<b>148</b>
<b>Figure 59: Schéma bilan du rôle de MCC dans le développement post-natal du réseau vasculaire rétinien ..</b>	<b>149</b>
<b>Figure 60: MCC, un acteur potentiel du développement de la BHE .....</b>	<b>152</b>

# INTRODUCTION

# Chapitre 1 : Développement d'un plexus vasculaire

## I- L'endothélium comme interface entre sang et tissu

### a. Rôles et structure générale du réseau vasculaire

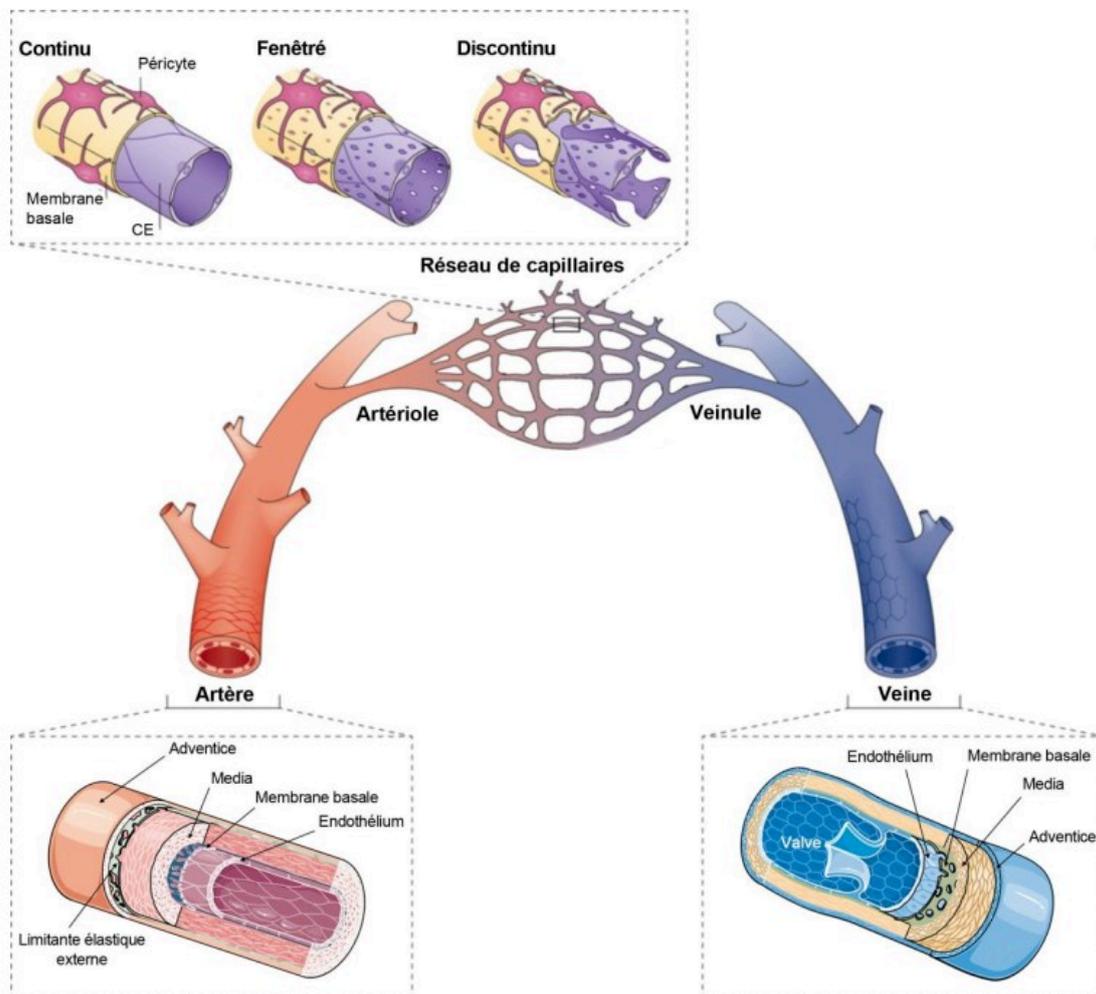
Le rôle des vaisseaux sanguins est primordial dans le maintien de l'homéostasie des tissus. Ils les alimentent en nutriments, en métabolites et en oxygène, qui sont nécessaires à leur fonctionnement. Ils assurent la signalisation paracrine vers les tissus voisins et jouent un rôle dans l'élimination des déchets gazeux et métaboliques en les acheminant vers les organes permettant leur traitement, comme les poumons ou les reins. Ils servent également au transit des cellules immunitaires qui sont capables d'infiltrer les tissus en cas d'inflammation par le phénomène d'adhérence et de diapédèse (Potente & Mäkinen, 2017).

Les vaisseaux sanguins font office d'interface entre le sang et le parenchyme en régulant les échanges entre ces derniers. Selon les tissus, ils peuvent être plus ou moins perméables pour faciliter ces échanges. C'est le cas des poumons ou des reins. Au contraire, dans certains tissus, ils font office de barrière et sont très imperméables afin de préserver les fonctions du parenchyme. C'est le cas de la rétine ou du cerveau (Potente & Mäkinen, 2017).

Le réseau sanguin est composé de trois types de vaisseaux. Les artères irriguent l'organisme avec le sang pompé par le cœur ; les veines transportent le sang pauvre en oxygène venant des organes périphériques vers le cœur ; les capillaires, des vaisseaux de plus petit calibre, relient les veines et les artères entre elles. Plus exactement, les artères se divisent en de plus petits vaisseaux, les artérioles, qui alimentent les capillaires. A l'inverse, les capillaires alimentent les veinules qui se rejoignent pour former les veines (Potente & Mäkinen, 2017).

Les artères et les veines ont une structure similaire bien qu'elle diffère quelque peu, selon leurs fonctions respectives. Les artères sont formées par une succession de couches concentriques. L'intima est la couche directement en contact avec le sang. Elle est formée d'une monocouche de cellules endothéliales continue sécrétant et reposant sur une lame basale. La média est composée d'une couche de cellules musculaires lisses conférant au vaisseau ses propriétés contractiles. Enfin, la couche externe, appelée adventice, est composée de fibres élastiques comme l'élastine et le collagène ainsi que de fibroblastes et de terminaisons nerveuses. Chacune de ces couches se sépare de sa voisine par une limitante

élastique. Dans les veines, ces limitantes élastiques sont absentes. De plus, seules les veines de gros calibre sont recouvertes de cellules musculaires lisses, la plupart étant entourées de péricytes. Les capillaires, quant à eux, présentent une structure plus simple. Ils sont recouverts de péricytes. Ces derniers, directement au contact de l'endothélium, servent de gaine au vaisseau et le stabilise. Ils sont également impliqués dans le transport transendothélial et dans la formation des vaisseaux de type barrière (Armulik et al., 2010). Aujourd'hui, il semble admis que les péricytes possèdent également des propriétés de contractilité (Alarcon-Martinez et al., 2021). L'endothélium des capillaires, au contraire des veines et des artères, peut être fenêtré, voire discontinu, selon le tissu pour faciliter les échanges entre le sang et les tissus (Potente & Mäkinen, 2017).



**Figure 1: Architecture du réseau sanguin**

Présentation schématique de la structure d'un réseau vasculaire composé d'artères, se divisant en artérioles, et de veines, se divisant en veinules, le tout relié par les capillaires. Chacun de ces vaisseaux possède une structure qui lui est propre selon ses fonctions (adapté de Potente & Mäkinen, 2017).

## b. Les cellules endothéliales au cœur du fonctionnement des vaisseaux sanguins

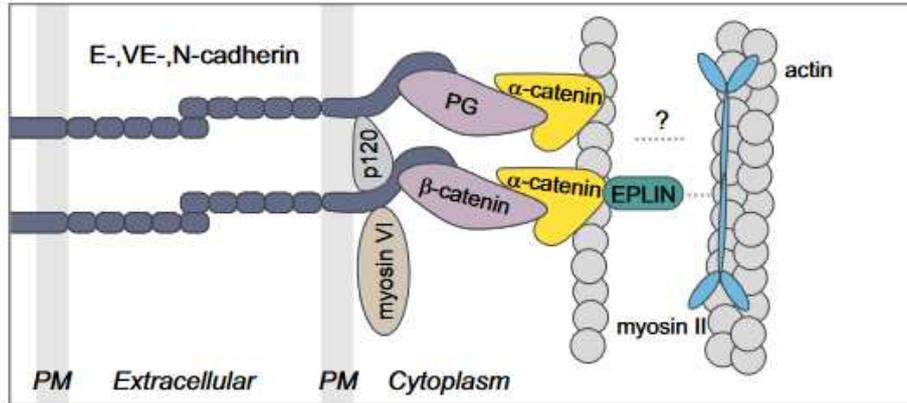
### i. Généralités sur les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales composent la couche des vaisseaux directement au contact du sang. Elles s'organisent en une monocouche dynamique capable de s'adapter à son environnement pour activer diverses fonctions maintenant ainsi l'homéostasie du tissu. Les cellules endothéliales participent à de nombreux événements physiologiques comme l'angiogenèse, le transport des nutriments et des métabolites, la régulation de l'inflammation et de l'hémostase ou encore la réponse aux contraintes de cisaillement induites par le flux sanguin (Potente & Mäkinen, 2017).

Ce qui est fascinant à propos des cellules endothéliales, c'est leur hétérogénéité, selon le tissu dans lequel elles évoluent. En effet, elles sont capables de se spécialiser par le biais de programmes transcriptionnels induits par des facteurs environnementaux comme des facteurs de croissance, des stimuli mécaniques ou métaboliques. Par exemple, les capillaires fenestrés se retrouvent dans les tissus dont le rôle est de filtrer et de sécréter. C'est le cas des glomérules rénaux, des glandes endocrines ou encore de la muqueuse intestinale. Les capillaires discontinus se retrouvent dans les réseaux vasculaires sinusoïdaux comme le foie (Aird, 2012; Potente & Mäkinen, 2017). Il arrive également de constater des différences structurelles et fonctionnelles au sein d'un même réseau. Dans la rétine, les cellules endothéliales se spécialisent selon le type de stimulus (mécanique ou chimique) (Vion et al., 2020). Dans l'os, les capillaires proches du cartilage épiphysaire forment un réseau dense de tubulures parallèles contrôlant les progéniteurs ostéogéniques alors que les capillaires interagissant avec la moelle osseuse sont sinusoïdaux (Kusumbe et al., 2014).

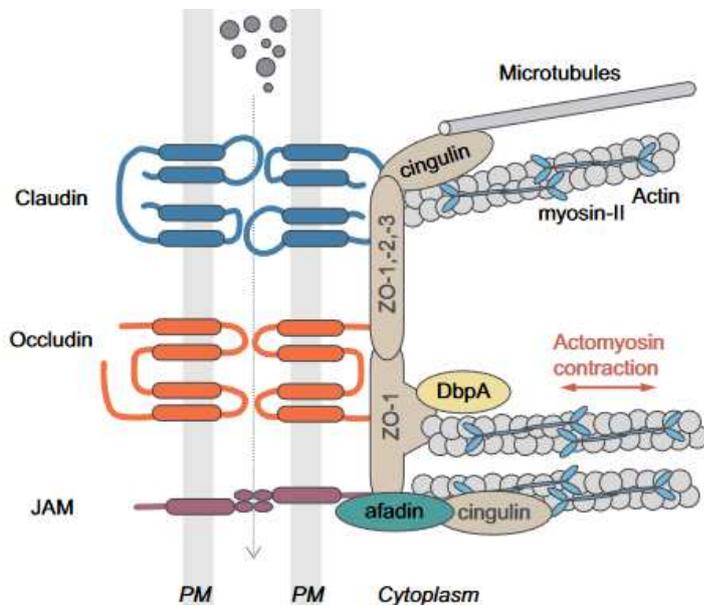
### ii. Les jonctions cellulaires au cœur de la stabilité de l'endothélium

L'endothélium se caractérise par un tapis cellulaire connecté à l'aide de protéines de jonction. Il en existe plusieurs types qui sont plus ou moins exprimés selon les tissus, ajoutant encore à l'hétérogénéité des cellules endothéliales. Les jonctions adhérentes sont formées de la protéine transmembranaire VE-Cadhérine reliée, du côté cytoplasmique, au cytosquelette d'actine par l'intermédiaire d'un complexe de caténines dont la p120-caténine et la  $\beta$ -caténine. On retrouve également la vinculine qui vient stabiliser l'interaction caténine-actine. Ainsi, les jonctions adhérentes assurent une homogénéité du mouvement de la cellule avec ses voisines lorsque celles-ci sont sujettes à des contraintes mécaniques ou lors de la motilité, renforçant l'intégrité de l'endothélium (Angulo-Urarte et al., 2020).



**Figure 2: Structure des jonctions adhérentes**

La Ve-Cadhérine (dans le cas de l'endothélium) interagit avec l' $\alpha$ -caténine et la  $\beta$ -caténine qui sont elles-mêmes reliées au cytosquelette d'actine. La p120-caténine vient consolider ce complexe en interagissant avec la VE-Cadhérine (adapté de Angulo-Urarte et al., 2020).



**Figure 3: Structure des jonctions serrées**

Les protéines transmembranaires claudine, occludine et JAM interagissent avec des intermédiaires cytoplasmiques, dont les protéines ZO-1/2/3, les reliant au cytosquelette (adapté de Angulo-Urarte et al., 2020).

Elles sont reliées à des protéines cytoplasmiques comme ZO-1/2/3 (zonula occludens). C'est par l'intermédiaire de ces protéines intracellulaires que les jonctions serrées sont reliées au cytosquelette d'actine et de tubuline. Elles participent donc également à la transmission des impulsions mécaniques (Angulo-Urarte et al., 2020).

Les jonctions serrées sont très importantes dans l'étanchéité de l'endothélium. Les vaisseaux faisant office de barrière (rétine, cerveau) expriment de haut taux de protéines des jonctions serrées. En rendant les cellules jointives, ces jonctions limitent le passage passif de particules entre les cellules, qu'elles soient grosses comme des protéines ou petites comme des ions. Ces jonctions sont composées de protéines transmembranaires telles que les claudines, occludines et les JAM (jonction adhesion molecule). Ces dernières sont

## II- Le développement vasculaire : une histoire de bourgeonnement et de polarité

Au cours de l'embryogenèse, des cellules souches se différencient en progéniteurs endothéliaux. Ces derniers termineront leur différenciation en cellules endothéliales fonctionnelles, et forment les vaisseaux primordiaux. C'est ce que l'on appelle la vasculogenèse (Vogeli et al., 2006). A partir de ces vaisseaux préexistants, un bourgeonnement puis une migration et une prolifération des cellules endothéliales forment des ramifications et densifient le réseau. Ce processus est appelé angiogenèse (Potente & Mäkinen, 2017). La direction et la structuration spatiale de ce bourgeonnement sont commandées par la polarité des cellules endothéliales (Sewduth et al., 2014). Enfin, le plexus subit une réorganisation due aux forces hémodynamiques qui entraînent une régression des vaisseaux superflus (Franco et al., 2015).

L'ensemble de ces mécanismes aboutit donc à la formation et l'organisation d'un plexus vasculaire fonctionnel. Dans cette partie, nous allons détailler les mécanismes d'angiogenèse, de polarisation et de migration des cellules endothéliales et enfin la réponse des cellules endothéliales au flux dans le cadre de la régression.

### a. L'angiogenèse : le développement de nouveaux tubes vasculaires à partir de vaisseaux préexistants

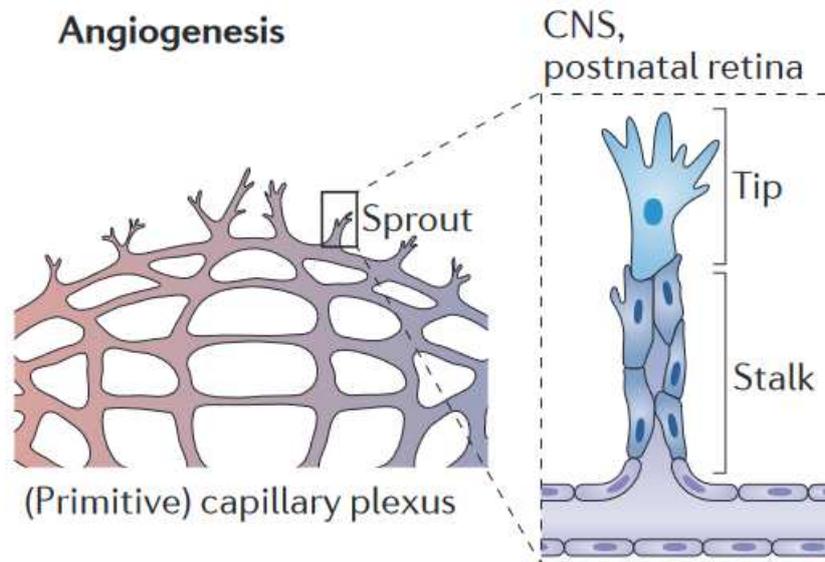
Les premiers vaisseaux se forment au cours de l'embryogenèse par un processus appelé vasculogenèse. Les cellules souches multipotentes mésodermes se différencient en précurseurs endothéliaux, appelés angioblastes (Reischauer et al., 2016). Ces angioblastes se ressemblent afin de former les deux premiers vaisseaux principaux de l'embryon : l'artère dorsale et la veine cardinale (Potente & Mäkinen, 2017). C'est à partir de ces deux vaisseaux que le réseau vasculaire va se développer au cours de l'embryogenèse. On parle alors d'angiogenèse. Celle-ci ne se déroule pas seulement au stade embryonnaire mais également au stade post-natal, notamment au niveau de la rétine et du système nerveux central, deux réseaux vasculaires qui vont nous intéresser dans ce projet.

### a. Tip cell et Stalk cell : deux phénotypes endothéliaux transitoires guidant et formant le nouveau plexus

#### i. Initiation du bourgeonnement par un gradient de VEGF

L'angiogenèse se déroule au niveau du front du plexus vasculaire. Elle commence par un bourgeonnement des cellules endothéliales qui s'y trouvent. Pour comprendre l'origine de

ce phénomène, il faut revenir à l'une des fonctions primaires d'un vaisseau sanguin, à savoir acheminer l'oxygène nécessaire au fonctionnement du tissu. Ainsi, les régions avasculaires, non approvisionnées en oxygène, sont en état d'hypoxie. Celle-ci induit, dans les cellules environnantes (comme les astrocytes ou les macrophages), les mécanismes de réponse au stress oxydatif et donc l'expression de la protéine HIF1 $\alpha$  (Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ ), un facteur de transcription induisant lui-même l'expression de facteurs de croissance tel que le VEGFA (Vascular endothelial growth factor). Ces facteurs de croissance s'accumulent alors au niveau de la zone hypoxique et forment un gradient jusqu'au plexus existant (Ferrara, 2001). Les cellules en première ligne du plexus vont alors acquérir un phénotype aussi spécifique que transitoire et devenir des « tip cells ». Ces tip cells vont guider la formation d'un nouveau tube vasculaire par un autre type de cellules endothéliales : les « stalk cells » (Figure 4).



**Figure 4: Expansion angiogénique au niveau du front vasculaire**

*L'angiogénèse s'initie au niveau du bord du plexus vasculaire où des cellules endothéliales vont capter le gradient de VEGFA et devenir des tip cells. Débute alors la formation d'un nouveau tube vasculaire par un autre phénotype endothélial : les stalk cells (adapté de Potente & Mäkinen, 2017).*

ii. *Le premier acteur endothélial de l'angiogénèse : la cellule de tête ou « tip cell »*

La tip cell n'est pas un type cellulaire à proprement parlé. Il s'agit plutôt d'un phénotype transitoire dont l'origine est variée. Elle peut en effet être autant capillaire que veineuse. Cependant, il semble que les cellules artérielles ne deviennent pas de tip cells (Pasut et al., 2021). Les tip cells expriment à haut niveau le récepteur au VEGFA, le VEGFR-2, et vont donc répondre au gradient de VEGFA par l'activation d'une machinerie transcriptionnelle qui leur est spécifique. Ce signal va notamment potentialiser la réponse aux facteurs angiogéniques par l'expression d'autres récepteurs comme VEGFR3 (Vascular endothelial growth factor

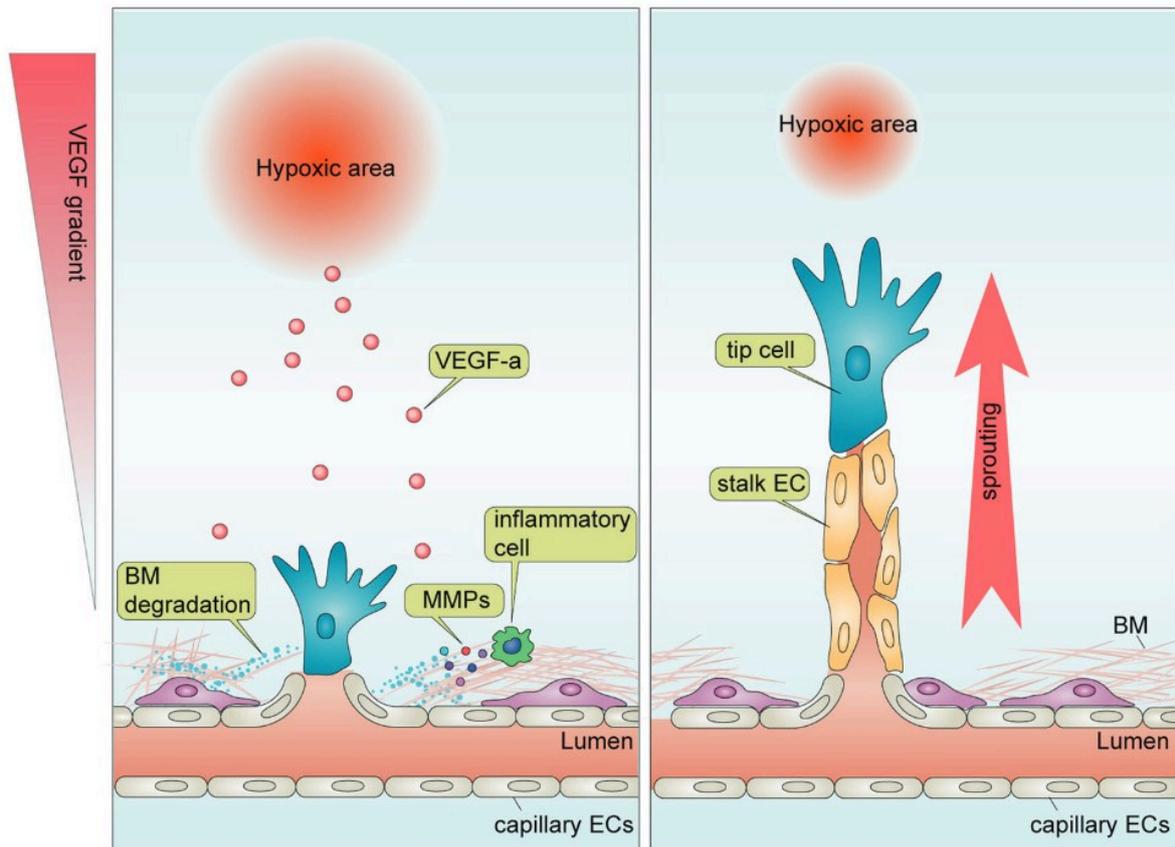
receptor) et UNC5B ou encore PDGFR $\beta$  (Platelet-derived growth factor  $\beta$ ) nécessaire au recrutement des cellules murales (H.-W. Lee et al., 2022). De plus, le signal VEGFA/VEGFR-2 stimule la formation de filopodes, des prolongements du cytosquelette d'actine qui vont s'orienter vers le gradient de VEGF afin de guider la formation du nouveau vaisseau vers la région hypoxique du tissu (Gerhardt et al., 2003).

Afin de migrer, la tip cell doit se désolidariser de son environnement et de son socle en dégradant la matrice extracellulaire et la lame basale (Kalluri, 2003). Le gradient de VEGF stimule les cellules endothéliales et les macrophages ; ces derniers vont exprimer des enzymes de dégradation de la matrice comme les métalloprotéinases (Gonzalez-Avila et al., 2019). Libérée de la matrice, la tip cell peut alors migrer selon le gradient de VEGF.

Aujourd'hui, l'origine exacte des tip cells est encore débattue. En effet, les cellules endothéliales de capillaire étant entourées d'un réseau matriciel peu dense, semblaient plus enclines à s'en libérer et donc à migrer (H.-W. Lee et al., 2022). Cependant, des travaux récents démontrent l'importance des veines dans le processus angiogénique. Les auteurs de cette étude ont effectivement suivi l'expression de marqueurs veineux au cours du développement post-natal du réseau vasculaire rétinien chez la souris. Ils démontrent que ces marqueurs, tout d'abord spécifiques des veines, se retrouvent plus tardivement dans d'autres cellules endothéliales, dont les tip cells. Ils en concluent que les cellules endothéliales veineuses représentent un réservoir pour les tip cells (H.-W. Lee et al., 2021).

### *iii. Les « talk cells », cellule de la tige, en deuxième ligne de l'angiogenèse*

En aval de la tip cell, se trouvent d'autres cellules endothéliales au phénotype également transitoire : les cellules de la tige ou « stalk cells ». Contrairement aux tip cells, elles ne forment que très peu de filopodes et n'expriment pas le VEGFR-2. Si la tip cell évolue dans le plan, les stalk cells s'organisent tridimensionnellement, formant ainsi le lumen des néovaisseaux (Iruela-Arispe & Davis, 2009). De plus, elles assurent la connexion entre le plexus existant et la tip cell. Les néovaisseaux vont ensuite se rapprocher et fusionner par anastomose (Herwig et al., 2011). Ce mécanisme forme ainsi le maillage du réseau vasculaire et permet la circulation du flux sanguin qui consolide alors les jonctions du nouveau tube (Figure 5).



**Figure 5: Modèle du mécanisme angiogénique**

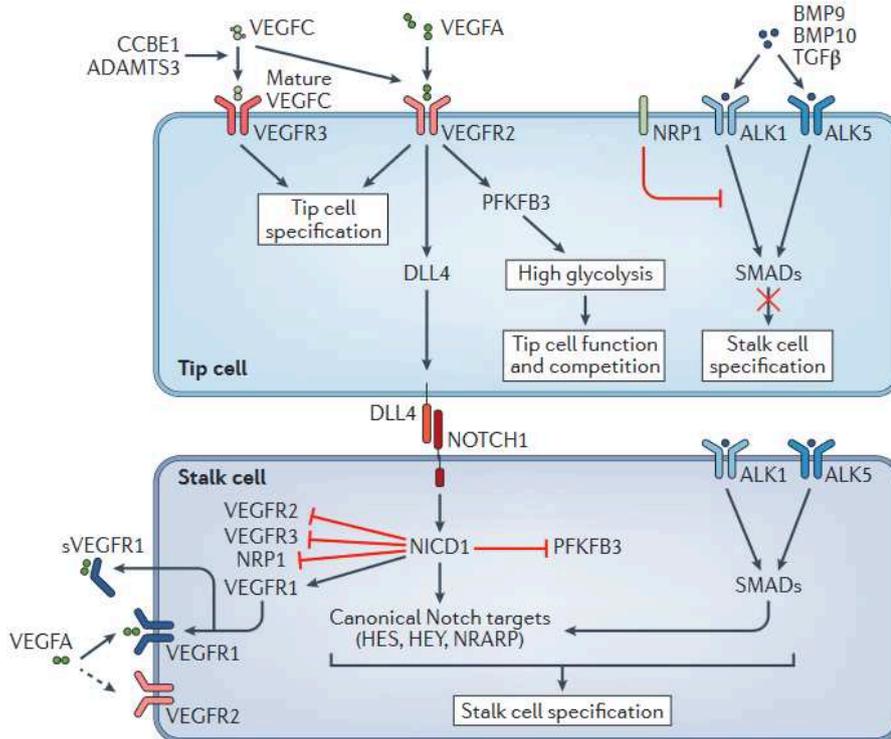
Selon le modèle aujourd'hui largement adopté, la tip cell reçoit le signal VEGFA et migre vers la région hypoxique après avoir dégradé la matrice environnante. Des cellules endothéliales en aval de la tip cell, les stalk cells, migrent et prolifèrent pour former le nouveau vaisseau et son lumen (adapté de H.-W. Lee et al., 2022).

## b. Régulation moléculaire et métabolique de l'angiogénèse

### i. La Voie VEGF/Notch au cœur de la compétition entre tip cells et stalk cells

Comme dit plus haut, les tip cells sont caractérisées par une forte expression du VEGFR-2. Pour être plus exact, les cellules endothéliales sur le front du plexus « doivent se battre » pour devenir une tip cell. C'est à celle qui exprime le plus haut taux de VEGFR-2 et le plus bas taux de VEGFR-1 (un récepteur leurre du VEGFA) que revient le droit de devenir une tip cell (Bentley et al., 2008). Ensuite, l'induction de la voie VEGF entraîne une surexpression du ligand de la voie Notch : DLL4 (Delta-like 4). Ainsi, le DLL4 extra-membranaire de la Tip cell interagit avec le récepteur Notch1 des cellules adjacentes (Hellström et al., 2007). Est donc induit le clivage du domaine intracellulaire de Notch (NICD). NICD transloque alors dans le noyau pour activer l'expression de gènes cibles tels que HES (Hairy and enhancer of split) et HEY (Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein) (Borggreffe & Oswald, 2009). Cette

activation de la voie Notch conduit notamment à une augmentation de l'expression de VEGFR-1. Ces cellules voient alors leur réponse au VEGFA bloquée et la formation des filopodes inhibée. C'est ainsi que la cellule exprimant le plus haut taux de VEGFR-2 devient une tip cell et que les cellules adjacentes deviennent des stalk cells. Celles-ci exprimant en retour peu de DLL4, elles ne peuvent activer la voie Notch dans la tip cell qui maintient une forte expression de VEGFR-2, une faible expression de VEGFR-1 et donc garde le contrôle du bourgeonnement (Benedito et al., 2012). Une inhibition de la voie Notch conduit donc à un niveau de bourgeonnement anormalement élevé, dû à un trop grand nombre de tip cells (Hellström et al., 2007). La voie BMP a également été décrite comme activatrice du phénotype stalk cell. En effet, les gènes cibles de NICD, notamment VEGFR1 et HES1, sont également exprimés sous un stimulus par les ligands BMP9/10 (Bone morphogenic protein) interagissant avec les récepteurs ALK1/5 (Activin receptor-like kinase) (Moya et al., 2012). Tout comme une inhibition de la voie Notch, la répression de la voie SMAD (Mothers against decapentaplegic homolog), notamment en ciblant les ligands BMP9/10, entraîne une multiplication du nombre de tip cells et une angiogenèse aberrante (Ricard et al., 2012).



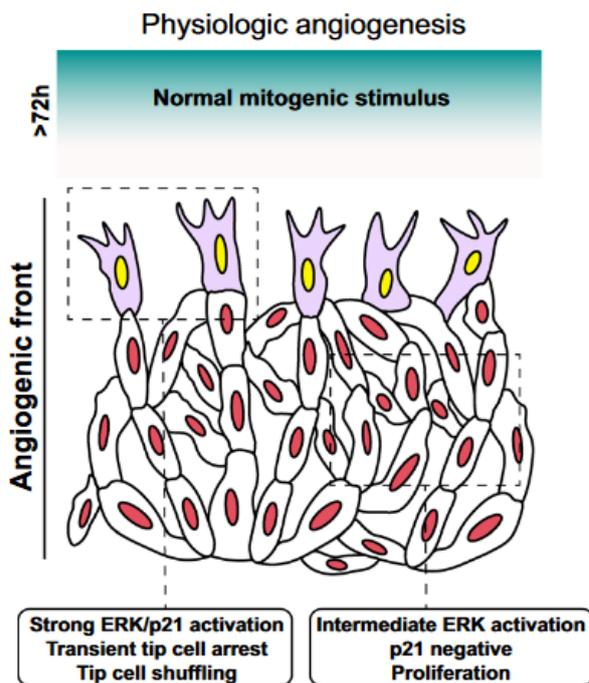
**Figure 6: Voie de signalisation régissant la compétition entre tip cell et stalk cell**

La tip cell exprimant un haut niveau de VEGFR-2 sécrète à sa surface le ligand DLL4 qui interagit avec le récepteur NOTCH1 de la stalk cell. Le domaine intracytoplasmique de NOTCH1, NICD, est clivé et fait office de facteur de transcription pour maintenir le phénotype de stalk cell. La voie BMP/SMAD active également ces gènes. Dans la tip cell, le corécepteur à VEGFR-2, NRP1, inhibe la voie BMP/SMAD, maintenant le phénotype tip cell (adapté de Potente & Mäkinen, 2017).

Enfin, afin de réprimer totalement le phénotype stalk cell dans la tip cell, NRP1, un corécepteur du VEGFR, inhibe l'activité de ALK1/5, réprimant l'activation en aval de SMAD2/3 (Aspalter et al., 2015). Pour prévenir également l'activation de la voie Notch dans les tip cells, celles-ci expriment à de très faibles taux les glycosyltransférases MFNG (Manic fringe) et LFNG (Lunatic fringe) qui glycosylent le ligand Notch. Cette glycosylation favorise l'interaction entre NOTCH1 et DLL4 et défavorise l'interaction entre NOTCH et JAG1, un ligand compétiteur de DLL4 qui réprime la voie Notch. Ainsi, les stalk cells sont sensibles à DLL4 alors que les tip cells sont plutôt sensibles à JAGGED1, empêchant une activation de la voie Notch chez ces dernières (Benedito et al., 2009).

### ii. Régulation moléculaire de la prolifération au cours de l'angiogenèse

Une autre caractéristique différenciant les stalk cells des tip cells est leur capacité à proliférer. Effectivement, si le réseau vasculaire doit s'étendre, cela sous-entend une multiplication du nombre de cellules endothéliales. Ainsi, les stalk cells prolifèrent alors que les tip cells bourgeonnent et migrent (Potente & Mäkinen, 2017).



**Figure 7: Rôle de la modulation du cycle cellulaire par ERK/p21 dans la différenciation entre tip et stalk cells**

Les tip cells présentent une forte activation de ERK/p21, les bloquant en phase G0/G1. Au contraire, la voie Notch bloque l'axe ERK/p21, leur permettant de proliférer (adapté de Mühleder et al., 2021).

Une des voies de signalisation clef dans la régulation de la prolifération des tip et stalk cells est la voie des MAPK (Mitogen-activated protein kinase) qui régule le cycle cellulaire. La kinase ERK1/2 (Extracellular signal-regulated kinase) est au centre de cette régulation (Mühleder et al., 2021). Le signal VEGFA/VEGFR-2 active en aval la voie des MAPK (Simons et al., 2016). De manière intéressante, les tip cells présentent un plus haut taux de phosphorylation de ERK1/2 que les stalk cells et prolifèrent moins (Gerhardt et al., 2003; Pontes-Quero et al., 2019). Ceci est corrélé avec une forte diminution du nombre de tip cells en phase S/G2/M et un blocage en phase G0/G1 (Yasuda et al., 2016). La phosphorylation de ERK1/2 induit

une activation de l'inhibiteur mitotique p21 qui est impliqué dans les mécanismes de checkpoint des phases du cycle cellulaire. De manière intéressante, les tip cells présentent un fort taux d'activation de p21, réprimant leur prolifération. Au contraire, dans les stalk cells, la voie Notch réprime l'activité de ERK1/2, levant le blocage en phase G0/G1 et induisant ainsi leur prolifération. Une inhibition de la voie Notch entraîne donc une diminution de la prolifération et du développement du plexus vasculaire (Pontes-Quero et al., 2019).

*iii. Régulation métabolique de l'angiogenèse : des besoins différents entre les tip cells et les stalk cells*

Les stalk cells étant dans une dynamique proliférative, elles se caractérisent également par un besoin métabolique plus important (Dumas et al., 2020). Un certain nombre d'études mettent en évidence une forte activation des voies métaboliques de synthèse des dNTP (Vizán et al., 2009), nécessaire à la réplication de l'ADN (Acide désoxyribonucléique) et donc à la division cellulaire, ou encore des acides aminés, notamment la glutamine, (B. Kim et al., 2017). Cette augmentation de l'activité métabolique de la cellule entraîne également une augmentation du besoin en énergie avec pour conséquence une plus forte activité glycolytique et une augmentation de la production de l'ATP (Adénosine triphosphate)(De Bock et al., 2013; Schoors et al., 2014).

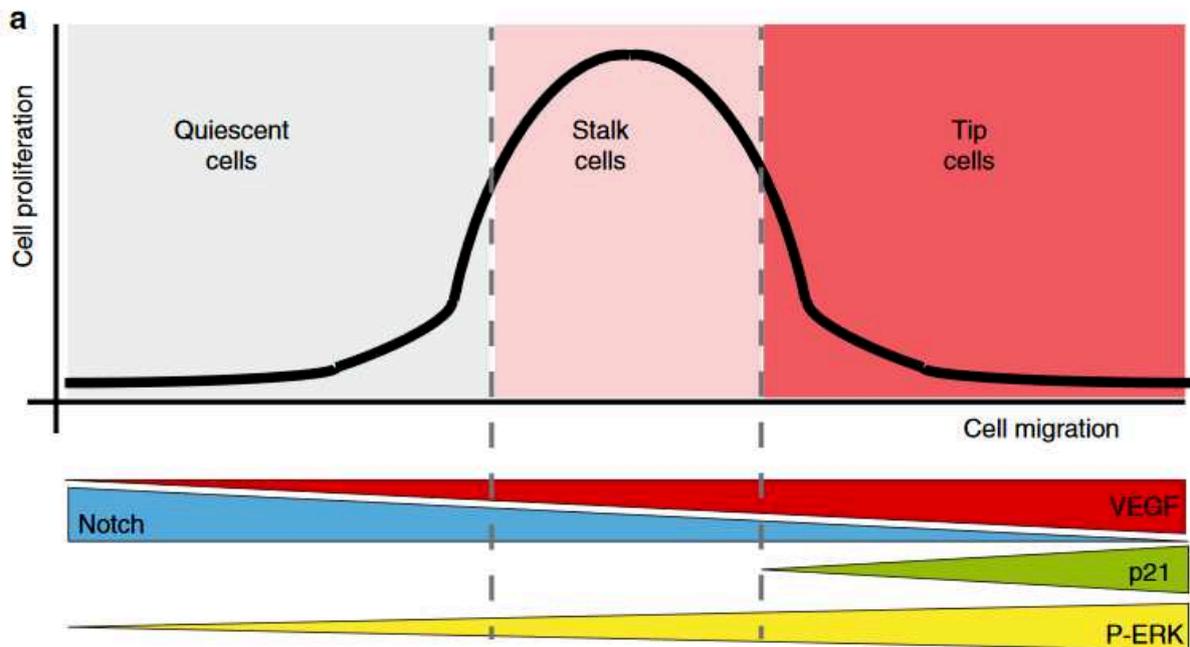
De son côté, la tip cell doit également augmenter sa production d'ATP afin de réorganiser son cytosquelette d'actine pour former des filopodes (De Bock et al., 2013; van Horssen et al., 2009). Les métabolismes de la glutamine et de l'asparagine sont également activés afin d'induire la migration des tip cells (Huang et al., 2017). Pour finir, les tip cells se caractérisent par un fort besoin en proline afin de réguler la synthèse de collagène pour la sécrétion de la matrice au niveau de la zone avasculaire (Rohlenova et al., 2020).

**c. Quiescence des cellules endothéliales pour le maintien de l'homéostasie vasculaire**

Pour terminer, l'angiogenèse repose sur un troisième type de cellules endothéliales : les cellules endothéliales quiescentes. Lorsqu'un vaisseau s'est pleinement formé après le processus angiogénique, les cellules endothéliales entrent dans un état où elles ne se divisent plus et ne migrent plus. Cet état est cependant réversible si nécessaire (Potente & Mäkinen, 2017). L'état de quiescence résulte d'une augmentation du signal Notch où NICD induit la transcription du gène PTEN (Phosphatase and tensin homolog). PTEN inhibe ensuite le cycle cellulaire et la cellule passe du phénotype stalk à quiescent (Pontes-Quero et al., 2019; Serra

et al., 2015). La quiescence est également induite par le flux sanguin puisque la sensibilité des cellules endothéliales aux contraintes laminaires active le facteur de transcription KLF2 qui réprime l'expression de gènes angiogéniques tels que VEGFR-2 ou des gènes impliqués dans la glycolyse (Doddaballapur et al., 2015).

Tout comme les stalk cells et les tip cells, les cellules endothéliales quiescentes sont caractérisées par une certaine signature métabolique. Leur état non actif implique évidemment de plus faibles besoins en énergie. Elles maintiennent un taux d'ATP basal permettant d'effectuer leurs fonctions primaires de cellules endothéliales (Dumas et al., 2020). Les cellules quiescentes ont également besoin d'une production de NADPH (Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) pour maintenir les propriétés de barrière du plexus vasculaire (Li et al., 2019). Une dérégulation de ces voies métaboliques conduit effectivement à une disruption de la barrière, notamment dans des rétinopathies.



**Figure 8: Migration des cellules veineuses vers le lit artériel**

*Dans la tip cell, une forte activation de la signalisation VEGF/VEGFR-2 induit la phosphorylation de ERK1/2 et donc la répression du passage de la phase G1 à S par p21. La cellule ne prolifère pas mais migre. Dans la stalk cell, la voie Notch est modérément activée, réprimant ainsi l'inhibition du cycle cellulaire par p21. La stalk cell prolifère. Enfin, l'activité de la voie Notch augmente dans la cellule quiescente. PTEN inhibe le cycle cellulaire. La cellule ne migre plus et ne prolifère plus (adapté de Pontes-Quero et al., 2019).*

Il a enfin été démontré qu'une réactivation des voies de prolifération dans les cellules quiescentes menait à des malformations vasculaires. En effet, une réactivation de l'axe PI3K-AKT (Phosphoinositide 3-kinase – Protéine Kinase B) et RAS-MAPK (Rat sarcoma virus) induit

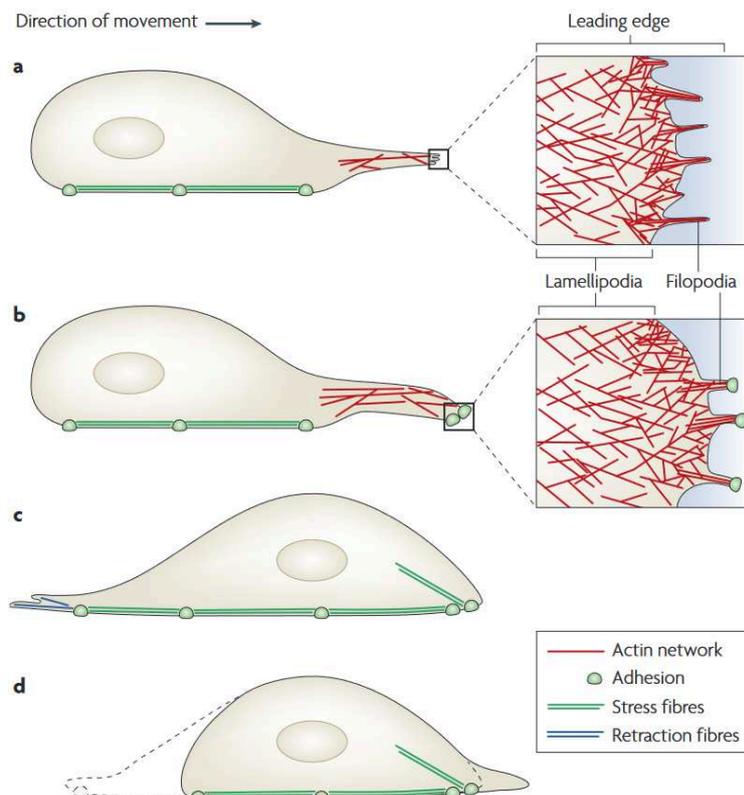
une angiogenèse aberrante (Eerola et al., 2003; Limaye et al., 2015). Cependant, cette réactivation est nécessaire dans le cas de la cicatrisation par exemple, pour reformer le plexus lésé.

### III- La polarité et la migration endothéliale au cœur de l'organisation du plexus vasculaire

#### a. Principes généraux de la migration et de la polarité

##### i. Migration

Nous l'avons dit plus tôt, pour permettre l'expansion vasculaire, mais également au cours du remodelage du plexus, les cellules endothéliales doivent migrer. Cette migration implique une réorganisation du cytosquelette d'actine conjuguée aux forces d'interaction entre la cellule endothéliale et ses voisines et son substrat (Fonseca et al., 2020). Cette réorganisation du cytosquelette d'actine permet la formation des lamellipodes et des filopodes. Ce sont deux formes de protrusions cellulaires qui diffèrent selon l'organisation du cytosquelette d'actine. Dans les lamellipodes, les fibres s'entrecroisent avec un angle de 70°. Au contraire, les filaments caractéristiques des filopodes sont rectilignes et parallèles. La formation de ces protrusions initie la migration de la cellule (Figure 9.a). Ensuite, la cellule forme de nouveaux points d'adhésion focaux (Figure 9.b) et le cytoplasme de la cellule se réorganise. En effet, le noyau est poussé vers l'avant de la cellule par la contractation des



**Figure 9: Schéma des différentes étapes de la migration cellulaire**

a. Réorganisation des filaments d'actine à l'avant de la cellule pour former les lamellipodes et les filopodes afin d'allonger le cytoplasme dans la direction de la migration.

b. Formation de nouveaux points focaux à l'avant de la cellule afin de créer un nouvel ancrage à la cellule.

c. Réorganisation des organelles vers l'avant de la cellule par la contraction de filaments d'actino-myosine.

d. L'arrière de la cellule est poussé vers l'avant par des fibres de rétraction.

(adapté de Mattila & Lappalainen, 2008).

filaments d'actino-myosine (**Figure 9.c**). Enfin, des fibres de rétractation poussent l'arrière de la cellule vers l'avant et les points d'adhésion à l'arrière de la cellule se défont (**Figure 9.d**) (**Mattila & Lappalainen, 2008**).

## ii. Polarité

Afin de migrer de manière efficace, la cellule doit s'orienter dans le plan. On parle alors de polarité planaire. Il existe cependant d'autres formes de polarité endothéliale régissant la formation des vaisseaux sanguins. La polarité apicobasale des cellules endothéliales a, par exemple, été beaucoup étudiée dans le cadre de la formation du lumen des vaisseaux (**Pelton et al., 2014**). Ces mécanismes sont aujourd'hui mieux connus que ceux de la polarité planaire et nous ne les développerons pas ici.

La polarisation planaire des cellules se fait grâce à la réception de stimuli. Il existe plusieurs types de stimuli capables d'induire cette orientation. Tout d'abord, il y a le chimiotactisme dans le cas d'un stimulus ayant la forme d'une molécule biologique soluble active, comme par exemple un gradient de VEGF. L'haptotactisme se caractérise non par des molécules solubles comme stimulus mais par des molécules actives emprisonnées dans une matrice. Nous pouvons enfin citer le méchanotactisme qui est induit par des forces mécaniques comme par exemple le flux laminaire sanguin dans les vaisseaux. La réception de ces stimuli engendre l'activation localisée de voies de signalisation responsables alors d'une polarisation de la cellule endothéliale dans le plan. À différencier de la polarité apico-basale, cette polarité planaire définit un avant et un arrière à la cellule (**Fonseca et al., 2020**). Celle-ci est visible par la répartition de certaines molécules, dans un premier temps. Par exemple, la PI3K s'active à l'avant de la cellule, accumulant au même endroit du PIP3 (Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate). Ce-dernier est nécessaire à l'activation des GEF (Guanine nucleotide exchange factors), une famille de protéines qui activent les petites GTPases Rho (Ras homolog family member) telles que RAC, CDC42 (Cell division control protein 42) ou encore RhoA (**Benard et al., 1999; Weiner, 2002**). Ces GTPases sont nécessaires à la formation des lamellipodes ou au repositionnement du centre organisateur des microtubules (MTOC), localisé au niveau de l'organelle appelée centrosome, et de l'appareil de Golgi à l'avant de la cellule (**Fonseca et al., 2020; J. S. H. Lee et al., 2005**). La position à la fois du centrosome et de l'appareil de Golgi dans la cellule devient alors un marqueur de sa polarisation (**Hikita et al., 2018**) et de la direction de sa migration, liant intimement polarité et migration. Nous

reparlerons plus tard du rôle prépondérant du centrosome dans la polarisation et la migration des cellules endothéliales.

## b. Les mécanismes de polarité et de migration au cours du développement vasculaire

Bien évidemment, la polarisation des cellules endothéliales, et donc leur migration dirigée, font partie intégrante du développement d'un plexus vasculaire fonctionnel. Nous allons voir dans cette partie comment ces fonctions endothéliales orchestrent le développement vasculaire. Tout d'abord, nous allons étudier la façon dont les cellules endothéliales se polarisent selon le flux sanguin.

### i. Perception et réponse des cellules endothéliales au flux laminaire sanguin

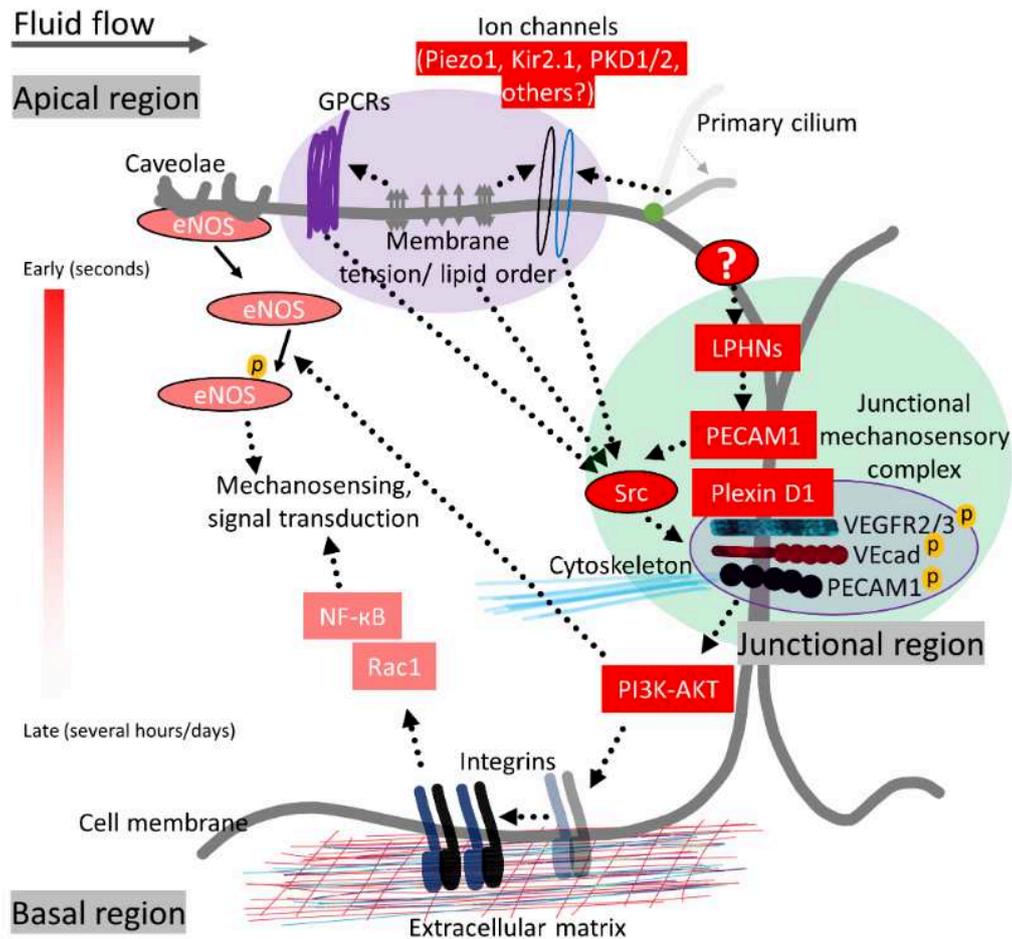
Les cellules endothéliales sont constamment soumises au flux sanguin et l'endothélium se caractérise par sa capacité à sentir et à répondre à celui-ci. Leur morphologie s'y adapte, notamment en s'allongeant et en se positionnant de manière parallèle à celui-ci (Nerem et al., 1981). De plus, en sentant ce flux, les cellules endothéliales participent à l'homéostasie vasculaire. Nous l'avons dit plus haut, le flux laminaire sanguin augmente l'expression du facteur de transcription KLF2 (Krüppel-like Factor 2) (Dekker et al., 2002). En effet, les contraintes de cisaillement induisent l'activation de MEK5 (Mitogen activated kinase) qui phosphoryle ERK5 qui active à son tour le facteur de transcription MEF2 qui lui-même entraîne la transcription du gène *Klf2* (Parmar et al., 2006). KLF2 inhibe alors la prolifération et permet donc la stabilisation du plexus (Doddaballapur et al., 2015). Ce facteur de transcription permet également de maintenir l'homéostasie de l'environnement sanguin sous contraintes de cisaillement en activant l'expression de gènes anticoagulants comme *THBD* (thrombomoduline) et anti-oxydants comme *NOS3* codant pour eNOS (Endothelial nitric oxide synthase) (van Thienen et al., 2006). Il réprime également la voie pro-inflammatoire NFκB (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) ou c-JUN/ATF2 (Activating transcription factor 2) (H. Das et al., 2006; Fledderus et al., 2007). Ainsi, KLF2 possède des propriétés athéroprotectrices.

Un certain nombre d'acteurs sont impliqués dans la perception du flux sanguin par les cellules endothéliales. On peut par exemple citer le cil primaire, les canaux ioniques, les complexes jonctionnels, les cavéoles ou encore des mécanorécepteurs (Davis et al., 2023; Tanaka et al., 2021).

L'événement le plus précoce de la perception du flux par les cellules endothéliales est l'activation de canaux ioniques comme Piezo1, PKD1/2 (Polycystin) permettant la sortie des ions  $K^+$ . La modification des charges membranaires et cytoplasmiques induit l'augmentation de  $Ca^{2+}$  cytoplasmique permettant la synthèse de NO (nitric oxyde) et donc la vasodilatation (Olesen et al., 1988). Le cil primaire est également un des premiers acteurs à rentrer en jeu dans la perception du flux, puisqu'il n'est actif qu'au tout début de ce mécanisme (Tanaka et al., 2021). Le cil primaire est une protrusion de la cellule formée par des prolongements du cytosquelette de tubuline depuis le centrosome (Wheatley et al., 1996). Etranger au mécanisme de motilité, il se courbe selon l'intensité du flux afin d'induire une élévation du taux de calcium cytoplasmique via des canaux ioniques (Eisa-Beygi et al., 2018). Une fois l'endothélium stable, le flux laminaire inhibe la formation de ce cil qui n'est observé que dans des régions de flux turbulent (Van der Heiden et al., 2008). Les récepteurs membranaires couplés aux protéines G (RCPG), sont également de la partie. Ils activent des kinases de la famille Src qui interagissent ensuite avec les complexes jonctionnels (Hu et al., 2006) et sont impliqués dans l'allongement des cellules par rapport au flux. Enfin, les derniers acteurs de la réponse précoce sont les cavéoles. Les cavéoles sont des petites invaginations de la membrane enrichie en une variété de lipides comme les cavines, le cholestérol et les sphingolipides (T. Richter et al., 2008). L'expression de CAV1, un constituant protéique des cavéolines, augmente avec le flux dans les cellules endothéliales (Rizzo et al., 2003). eNOS se désolidarise alors des cavéoles, et notamment de Cav-1 en condition de flux laminaire, induisant son activité de synthèse du NO (Minshall et al., 2003).

Ces premiers éléments de réponse au flux activent notamment la formation de complexes jonctionnels, qui sont  $Ca^{2+}$  dépendants. Ce complexe jonctionnel est formé par l'association de PECAM-1 (Platelet endothelial cell adhesion molecule 1) à la VE-Cadhérine et aux récepteurs VEGFR2/3 (Tzima et al., 2005). Plus exactement, en association avec la VE-Cadhérine, PECAM-1 active SFK (Src family kinase), une kinase de la famille Src, suite à l'application des contraintes de cisaillement sur la cellule. SFK phosphoryle alors VEGFR2/3 pour l'associer à son tour au complexe jonctionnel (Conway et al., 2013; Coon et al., 2015). Ce complexe active ensuite une série de mécanismes résultant en l'adaptation de l'endothélium au flux laminaire et donc à l'homéostasie vasculaire. En effet, les kinases de la voie PI3k/AKT activent les intégrines, protéines transmembranaires reliées à la lame basale, régulant ainsi l'alignement des cellules endothéliales par rapport au flux. Le système des petites GTPases RhoA est également activé pour induire une réorganisation du cytosquelette d'actine,

permettant à la cellule de renforcer sa charpente et de résister aux contraintes de cisaillement. Cela permet également une liaison entre cellules car le cytosquelette d'actine est relié aux jonctions cellulaires, ce qui uniformise la réponse physique des cellules aux contraintes de cisaillement (Collins et al., 2012). Enfin, l'activation de l'axe PI3K/AKT permet également l'activation de eNOS (Fleming et al., 2005).



**Figure 10: Succession des événements de perception et de réponse des cellules endothéliales au flux sanguin**

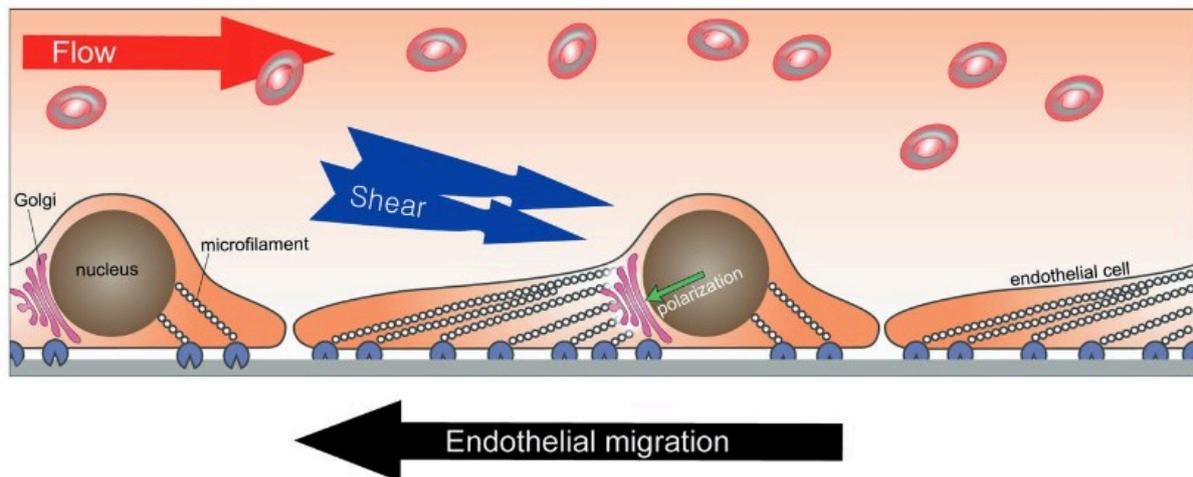
Le flux sanguin induit d'abord une réponse précoce des cellules endothéliales qui augmente l'influx de  $Ca^{2+}$  cytoplasmique et induit la formation d'un complexe jonctionnel. Ce dernier, pivot de la réponse des cellules endothéliales au flux, permet leur organisation selon le flux et la production de NO pour favoriser la vasodilatation et l'homéostasie vasculaire (adapté de Tanaka et al., 2021).

### ii. Polarisation des cellules endothéliales selon le flux sanguin

Le flux induit une réorganisation des organelles de la cellule et notamment du centrosome et du Golgi (Hikita et al., 2018). A la fin du XX<sup>ème</sup> siècle, des expérimentations sur des cellules endothéliales en culture ont démontré qu'en condition statique, les cellules ne se

polarisaient pas mais qu'au contraire elles se polarisaient dans des conditions de culture sous flux laminaire (Coan et al., 1993). Sur un modèle de cellules endothéliales de veine ombilicale (HUVEC), il a été observé que la cellule endothéliale se polarisait à l'inverse du flux (Sonmez et al., 2020), bien que selon le modèle de culture en flux utilisé, les résultats divergent et la polarisation peut être observée dans le sens du flux. Mais la réalité *in vivo* est que dans plusieurs lits vasculaires chez la souris, dont l'aorte, les cellules endothéliales se polarisent contre le flux (Morgan et al., 2011). Dans la rétine, il est également observée, dans les artères et les veines, une polarisation des cellules endothéliales contre le flux (Franco et al., 2015; Hikita et al., 2018). Cette polarité selon le flux a également été rapportée chez le poisson zèbre, le cochon et le lapin, montrant que c'est un mécanisme conservé entre espèces et organes (H.-W. Lee et al., 2022).

Si la polarité des cellules endothéliales est observée à l'opposé du flux, il est naturel de penser qu'il en est de même pour leur migration. Ce fut effectivement prouvé par une imagerie *in vivo* réalisée sur le sac vitellin de la souris. L'utilisation d'un modèle transgénique marquant les membranes endothéliales en rouge et les noyaux endothéliaux en vert a permis de suivre leur migration et d'attester qu'elles migraient bien contre flux (Udan et al., 2013). Ce mécanisme est essentiel dans le développement vasculaire et notamment le développement artériel.



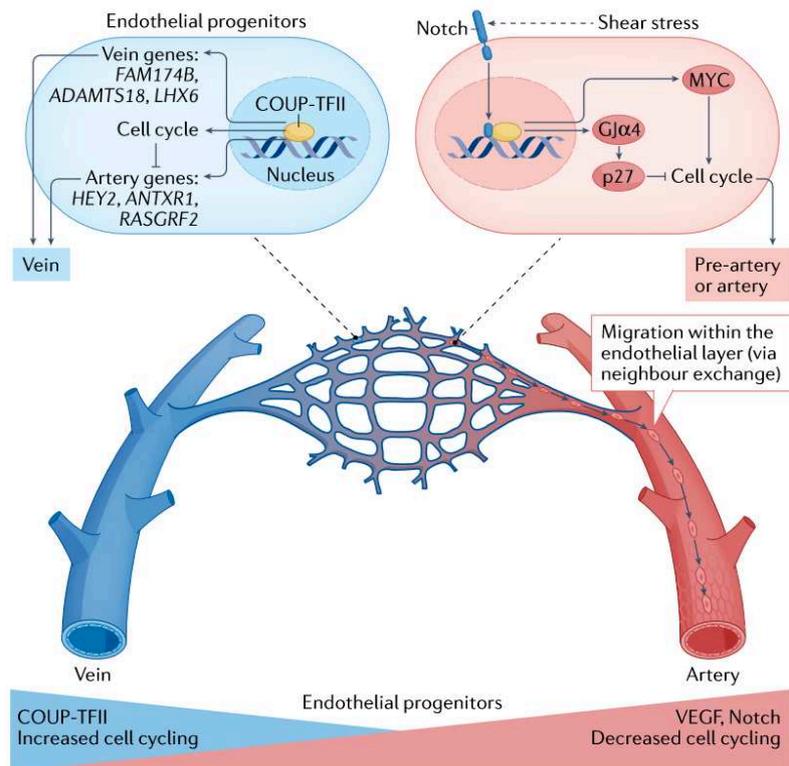
**Figure 11: Schéma illustrant la polarisation des cellules endothéliales selon le flux sanguin**

En sentant les forces de cisaillement induites par le flux sanguin, la cellule endothéliale se réorganise en se polarisant dans le sens inverse du flux. C'est donc contre ce dernier qu'elle migre (adapté de H.-W. Lee et al., 2022).

iii. Migration des cellules endothéliales veineuses contre le flux dans le développement artériel

La migration des cellules endothéliales contre le flux est un mécanisme nécessaire au cours du développement des artères pour une simple et bonne raison : les artères ne prolifèrent pas, rendant nécessaire un approvisionnement du lit artériel en cellules endothéliales (Trimm & Red-Horse, 2023). Pour comprendre cette différence, il faut revenir sur la différenciation artérioveineuse.

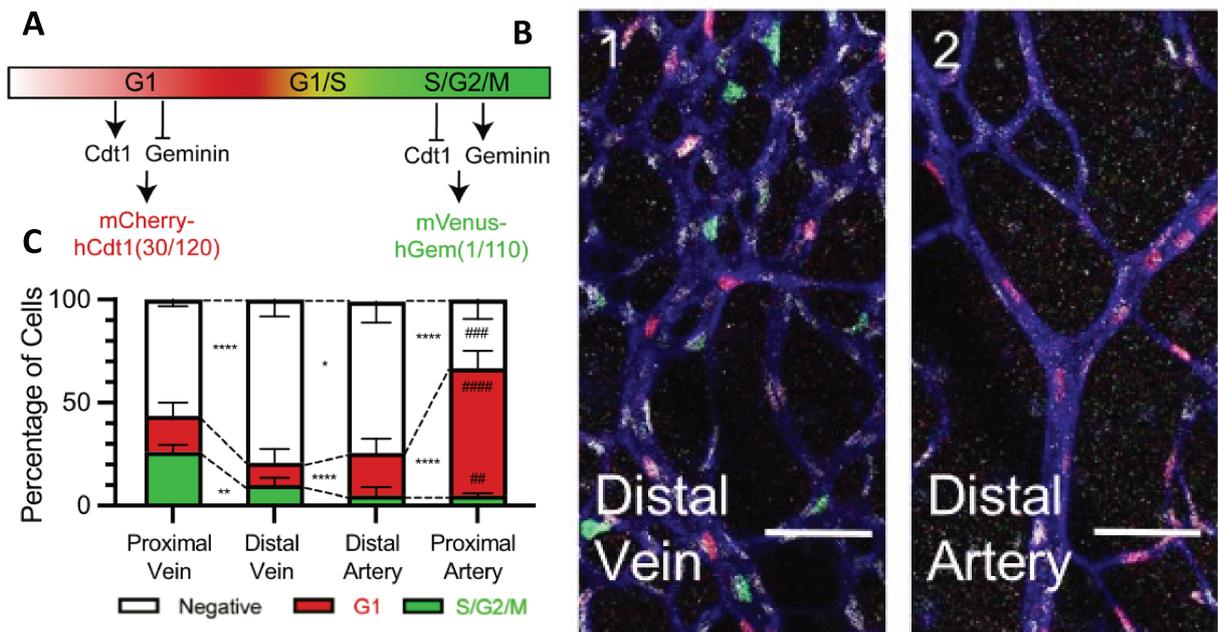
Dans les artères, le flux laminaire induit l'activation de l'axe Notch-Connexin 37-p27 qui inhibe le cycle cellulaire (Acharya et al., 2023; Fang et al., 2017). De plus, les artères se caractérisent par une forte expression de KLF2 qui induit également un arrêt du cycle cellulaire (Chavkin et al., 2022; Doddaballapur et al., 2015). Cet arrêt du cycle cellulaire permet l'expression de marqueurs artériels tels que Ephrine B2 ou le facteur de transcription SOX17 (SRY-box 17) (Corada et al., 2013, 2014). Au contraire, les veines prolifèrent, notamment grâce à l'expression du facteur de transcription COUP-TFII (COUP transcription factor) qui réprime les marqueurs artériels responsables de l'arrêt du cycle cellulaire (Sissaoui et al., 2020).



**Figure 12: Schéma récapitulant les caractéristiques moléculaires et cellulaires différenciant veines et artères**

Les veines se caractérisent pour une levée de l'inhibition du cycle cellulaire par COUP-TFII qui réprime l'activité de l'axe Notch/Connexin37/p27. Au contraire, dans les artères, cet axe est actif ce qui empêche les cellules endothéliales artérielles de proliférer (adapté de Trimm & Red-Horse, 2023).

Ces différences en terme de prolifération entre veines et artères ont pu être observées *in vivo* dans la rétine de la souris par l'utilisation du modèle FUCCI (Mort et al., 2014), qui induit l'expression de protéines fluorescentes dans les noyaux des cellules selon leur stade de cycle cellulaire. Ainsi, à P6, les cellules endothéliales artérielles sont effectivement bloquées en phase G1 alors que celles des veines sont en phase G1 tardive, voire en phase G2/M. (Chavkin et al., 2022).



**Figure 13: Stade du cycle cellulaire dans les cellules endothéliales artérielles et veineuses de la rétine murine à P6**

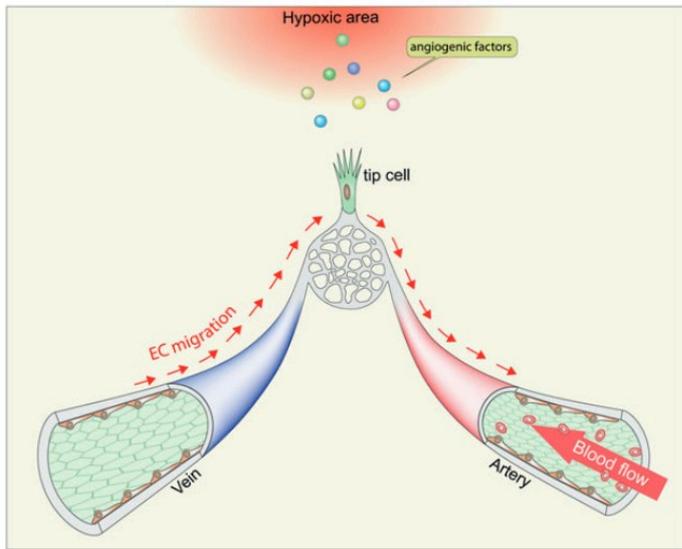
a. Après injection de tamoxifène, le système FUCCI, sous contrôle du promoteur *Cdh5*, induit l'expression de protéines fluorescentes relocalisées au noyau selon l'état du cycle cellulaire. Les cellules rouges sont en phase G1, les jaunes en phase G1/S et les vertes en phase G2/M. Les cellules blanches sont dites négatives.

b. Imagerie confocale de rétines de souris FUCCI à P6 au niveau d'une veine et d'une artère distale.

c. Quantification de la proportion de cellules endothéliales selon leur stade de cycle cellulaire et leur localisation montrant un fort taux de prolifération dans les veines et très faible dans les artères.

(adapté de Chavkin et al., 2022).

Ainsi, les artères ne proliférant pas, il est légitime de se demander comment elles peuvent se développer. La réponse est par la migration contre le flux. Nous avons discuté plus haut de l'origine des tip cells. Une étude démontrait que les cellules endothéliales veineuses représentaient une source pour celles-ci. Dans cette même étude, les auteurs montrent que des cellules endothéliales d'origine veineuse se retrouvaient dans le lit artériel (H.-W. Lee et al., 2021). L'utilisation de technique d'imagerie en direct au niveau du sac vitellin de la souris



**Figure 14: Migration des cellules veineuses vers le lit artériel**

Les cellules endothéliales veineuses migrent contre le flux pour rejoindre et participer à l'extension du lit vasculaire artériel. Là, ces cellules vont se différencier, via le flux et la voie Notch, en cellules artérielles (adapté de H.-W. Lee et al., 2022).

perdent leurs propriétés migratoires. Cependant, des études réalisées sur le poisson zèbre démontrent que, dans un cas de cicatrisation, les cellules veineuses retrouvent leurs propriétés migratoires et prolifératives pour participer à la reconstruction du plexus lésé (C. Xu et al., 2014).

#### iv. Compétition entre signaux mécaniques et chimiques pour la polarisation des cellules endothéliales

Jusqu'à présent, nous avons beaucoup parlé de polarisation des cellules endothéliales par rapport au flux. Mais il existe également une polarité planaire indépendante du flux, notamment au niveau des tip cells. C'est bien par le phénomène de chimiotactisme exercé par le gradient de VEGF que la migration des tip cells est induite (Potente et al., 2011). En effet, les tip cells ne sont pas au contact du flux car le lumen n'a qu'un diamètre très faible, voire inexistant (Koo et al., 2016). Ce faisant, les néovaisseaux dont la formation est initiée par les tip cells ne sont que très peu, voire pas, perfusés.

Ainsi, tout comme le flux, le gradient de VEGF induit la réorganisation polaire de la tip cell pour initier sa migration. Cependant, contrairement au flux, il semble moins clair dans quel sens les tip cells se polarisent par rapport au gradient de VEGF. Certaines études trouvent une

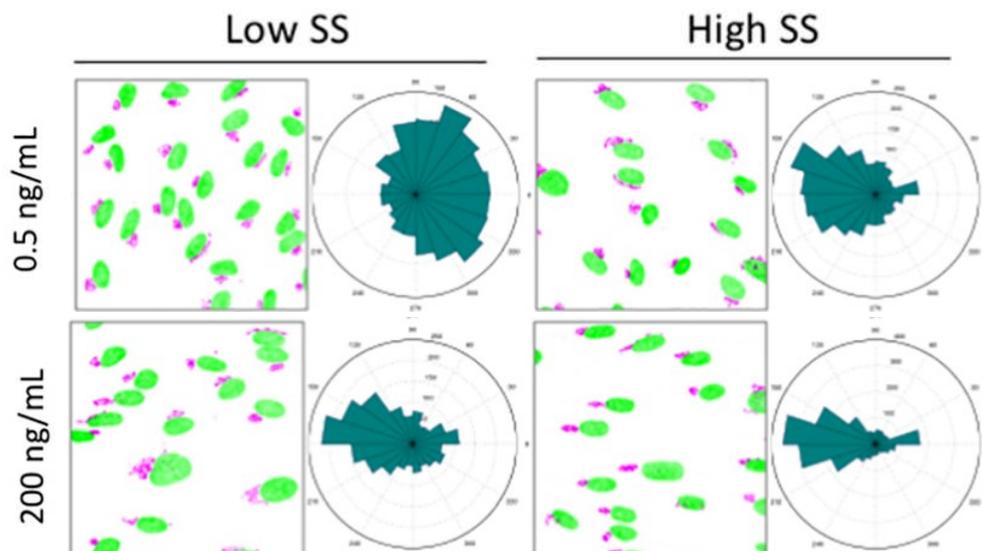
a non seulement démontré que les cellules endothéliales migraient contre le flux, mais qu'en plus ces cellules migraient depuis les veines et remontaient le réseau capillaire jusqu'aux artères (Udan et al., 2013). Ce phénomène est d'ailleurs conservé dans plusieurs organes dont la rétine, le cerveau ou encore le derme. Au final, au stade post-

angiogénique, environ 80% des cellules endothéliales du plexus seraient d'origine veineuse (H.-W. Lee et al., 2021). De leur côté, les cellules veineuses deviennent quiescentes à l'âge adulte, ne prolifèrent plus et

majorité de tip cells polarisées contre le gradient (Dubrac et al., 2016). D'autres études trouvent autant de cellules polarisées contre et vers le gradient de VEGF (Laviña et al., 2018).

Une dernière question demeure sur la polarité planaire des cellules endothéliales. Quel signal, entre le flux et le VEGF, stimule la réorganisation planaire de ces cellules ? Une étude *in vitro*, conduite récemment par les Dr Anne-Clémence Vion et Holger Gerhardt, a permis de mieux comprendre comment les cellules endothéliales intégraient les signaux chimiques et mécaniques transmis par leur environnement (Vion et al., 2020).

Sous un faible flux laminaire ( $2 \text{ dyn/cm}^2$ ) et à une concentration physiologique de VEGFA, les cellules endothéliales sont modérément polarisées. Mais lorsque la concentration de VEGFA augmente, comme au niveau du gradient de VEGFA dans l'environnement d'une tip cell, les cellules se polarisent fortement contre le flux. Cependant, en condition de flux laminaire fort ( $20 \text{ dyn/cm}^2$ ), le VEGFA n'a qu'un effet marginal sur la polarité des cellules endothéliales. De plus, seul un flux laminaire élevé peut stimuler la migration des cellules endothéliales contre le flux. Enfin, les auteurs démontrent que les effets du VEGFA et du flux laminaire élevé sont inhibés par la délétion de VEGFR-2. Ainsi, ce récepteur servirait de traducteur de l'information, orientant la polarité des cellules endothéliales en fonction de la concentration de VEGF et de l'intensité du flux laminaire (Vion et al., 2020).



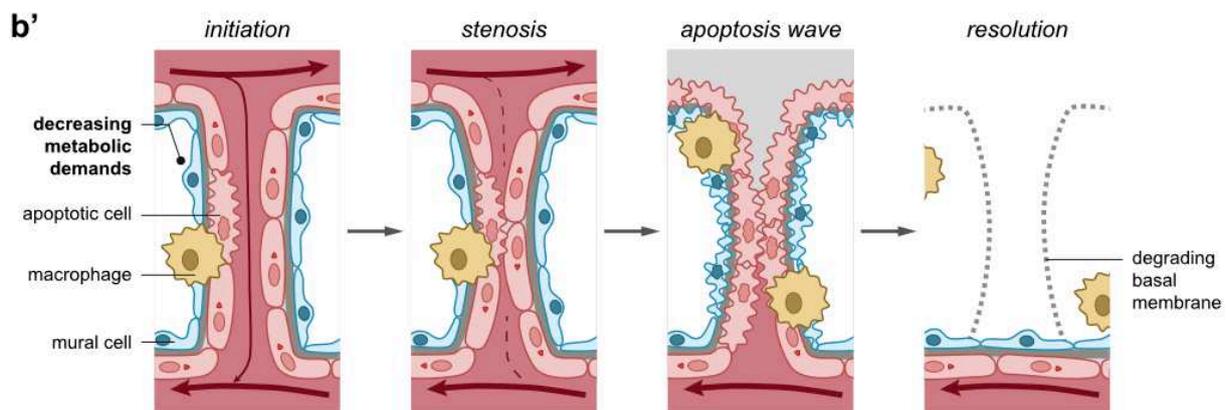
**Figure 15: Effet dose dépendant du flux et du VEGFA sur la polarité endothéliale**

Images représentatives d'immunomarquage au Dapi (noyau) et au GM130 (Golgi) afin de calculer l'angle de polarité des cellules endothéliales selon le flux. A faible concentration de VEGFA et à faible débit, les cellules sont peu polarisées. Une forte concentration de VEGFA ou une augmentation du débit polarisent les cellules contre le flux (adapté de Vion et al., 2020).

v. *Migration des cellules endothéliales au cours du remodelage vasculaire*

Il nous reste à évoquer un dernier mécanisme important du développement vasculaire : le remodelage vasculaire. Il peut prendre deux formes : l'involution ou la régression (Franco et al., 2015; Ouarné et al., 2021).

L'involution vasculaire consiste en la suppression spontanée de vaisseaux dans des zones à faible demande métabolique ou dont la fonction n'est plus utile. Par exemple, lorsque la glande mammaire n'est plus stimulée par l'allaitement, la demande métabolique de production de lait devient moins importante ; une partie des vaisseaux disparaît car ils ne sont plus utiles (Walker et al., 1989). Dans l'œil, la vascularisation de la rétine est précédée par un autre réseau vasculaire appelé hyaloïde. Chez la souris, vers P6-P7, celui-ci commence à disparaître car il n'est plus utile à ce stade de développement où la rétine se vascularise (Ito & Yoshioka, 1999). Tout d'abord, une sténose referme le lumen des vaisseaux concernés (Poché et al., 2015). Le flux induisant la voie de survie AKT, son arrêt induit donc une vague apoptotique des cellules endothéliales (Poché et al., 2015; Watson et al., 2017). Des cellules macrophages sont également recrutées afin d'induire cette vague apoptotique et de dégrader la matrice résiduelle (Mitchell et al., 1998). L'involution vasculaire est donc la disparition de tout ou partie d'un plexus.



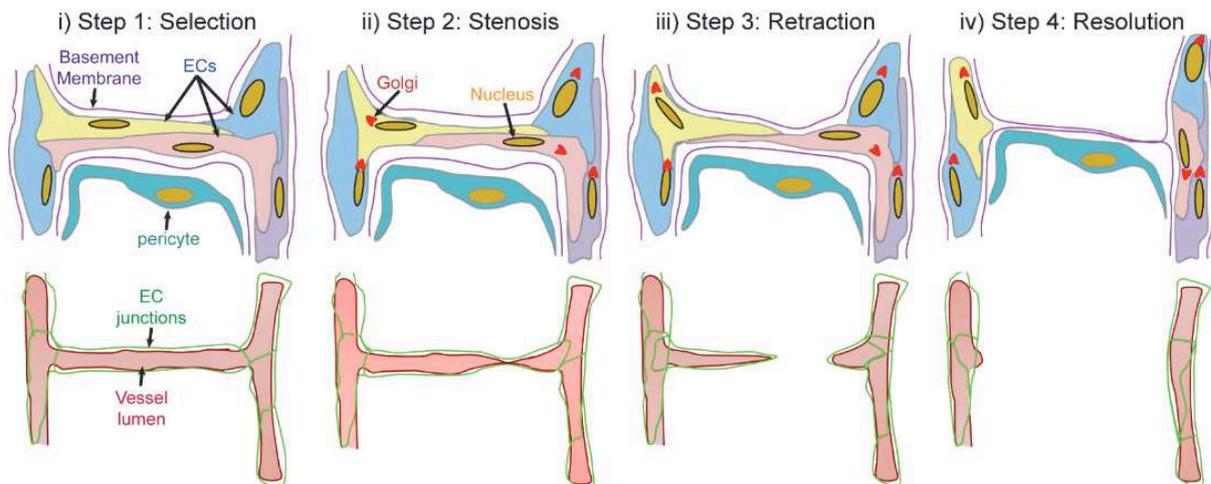
**Figure 16: Schéma des différentes étapes de l'involution vasculaire**

Tout d'abord, les vaisseaux sont « choisis » selon une baisse de demande métabolique. Puis survient une sténose refermant le lumen. L'absence de flux, et donc l'absence d'activation de la voie de survie AKT, enclenche une vague apoptotique dans le segment sténosé. Des macrophages viennent ensuite dégrader les restes de cet ancien vaisseau (adapté de Ouarné et al., 2021).

Au cours de l'angiogenèse, de nouvelles ramifications se forment et se rejoignent par anastomose, complexifiant ainsi le réseau. Certains segments sont cependant peu perfusés et

paraissent donc superflus. Par conséquent, ils régressent pour optimiser la circulation du sang dans le plexus (Q. Chen et al., 2012). Cette régression se fait en plusieurs étapes (Franco et al., 2015):

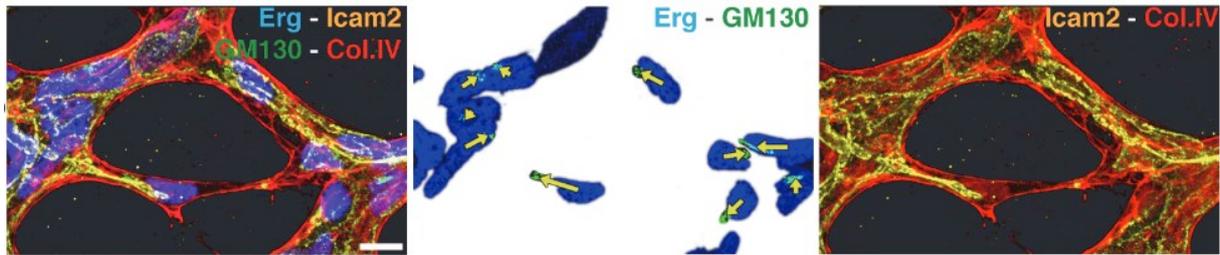
- Etape 1 : la baisse du flux est identifiée par les mécanosenseurs des cellules endothéliales
- Etape 2 : une sténose diminue le diamètre du lumen. Les cellules endothéliales se polarisent de manière opposée et initient le désassemblage des complexes jonctionnels.
- Etape 3 : les cellules endothéliales migrent afin de procéder à la rétractation du vaisseau et ne forment plus de jonctions.
- Etape 4 : il ne reste plus qu'une matrice résiduelle (« sleeve » en anglais) à l'endroit où a eu lieu cette régression.



**Figure 17: Schéma des différentes étapes de la régression vasculaire**

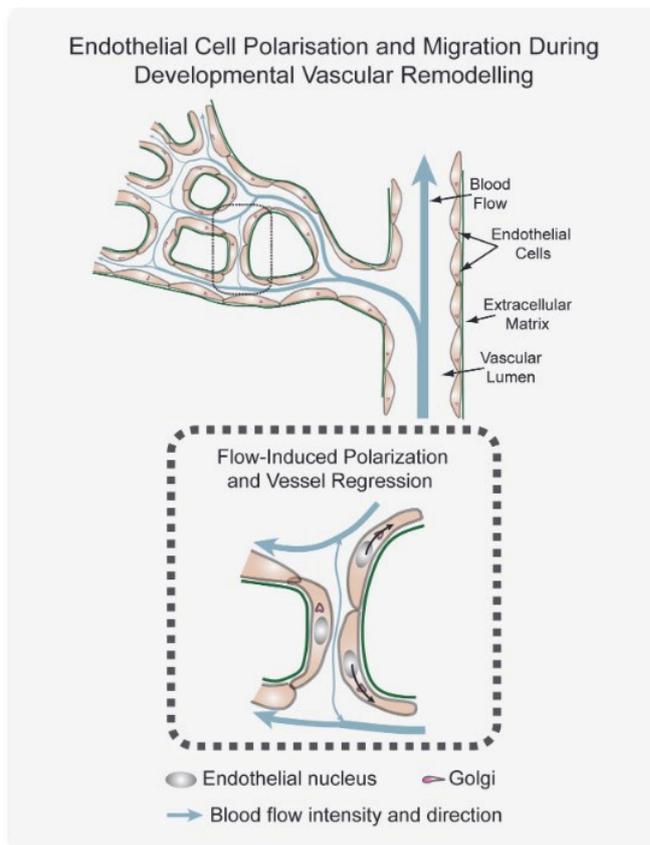
Contrairement à l'involution, ici les cellules endothéliales ne meurent pas par suicide programmé. Au contraire, elles migrent pour rejoindre d'autres segments vasculaires (adapté de Franco et al., 2015).

Ce phénomène de régression vasculaire est observable avec de la microscopie *in vivo* sur des embryons de poisson zèbre. Il est possible d'assister aux différentes étapes énoncées ci-dessus et notamment à la migration des cellules endothéliales (Franco et al., 2015). Chez la souris, dans la rétine, il est possible d'observer les fragments qui ont régressé à l'aide d'un immunomarquage ciblant les vaisseaux sanguins (anticorps dirigés contre CD31) et la matrice extra-cellulaire sécrétée par les vaisseaux sanguins (Collagène IV). Ainsi, un fragment positif au marquage matriciel mais négatif au marquage endothélial indique la présence d'une zone de régression vasculaire.



**Figure 18: Microscopie confocale d'un segment de régression vasculaire dans la rétine murine à P6**

L'immunomarquage cible *Erg* pour le noyau des cellules endothéliales, *ICAM-2* pour le lumen des vaisseaux, *GM130* pour marquer l'appareil de Golgi et donc observer la polarisation des cellules et enfin *COLLIV* pour marquer la matrice endothéliale. On peut constater la présence de fragments *COLLIV+*/*ICAM2-* ainsi qu'un phénomène de sténose avec une cellule endothéliale polarisée à l'opposé du segment de régression (adapté de Franco et al., 2015).



**Figure 19: Rôle de la régression vasculaire induite par le flux dans la maturation vasculaire**

Réponse des cellules endothéliales à une baisse de flux par une régression vasculaire (adapté de Franco et al., 2015).

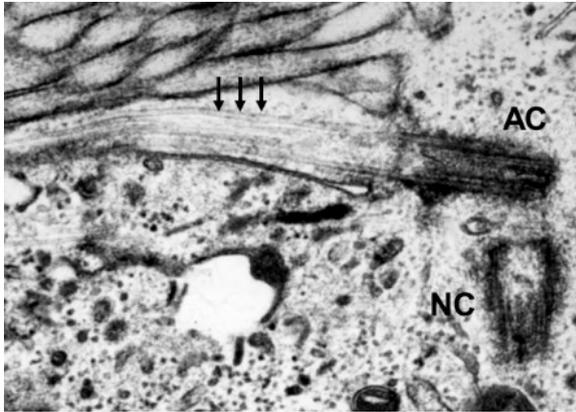
le plexus vasculaire devient mature au stade post-angiogénique et atteint un état de pleine fonctionnalité en éliminant des segments vasculaires non perfusés.

Pour terminer, différentes études ont bien démontré que l'apoptose n'était pas impliquée dans ce phénomène de régression. En effet, des immunomarquages ciblant la Caspase-3 clivée, un marqueur d'initiation de l'apoptose, révèlent l'absence de mort cellulaire programmée au niveau des fragments de régression (Franco et al., 2015). De plus, dans des modèles transgéniques murins de délétions de l'effecteur apoptotique BAX, les mécanismes de régression vasculaire ainsi que la densité et l'architecture vasculaire ne sont pas affectés (Watson et al., 2016).

Ainsi, par la réponse des cellules endothéliales au flux, il est proposé que

### c. Le centrosome : une organelle au cœur de la polarité endothéliale

Nous l'avons dit à plusieurs reprises dans ce paragraphe, pour migrer au cours du développement vasculaire, la cellule se réorganise, se polarise. Cette polarité se traduit notamment par un repositionnement du centrosome. Il est donc temps de détailler davantage ce qu'est le centrosome et comment son fonctionnement est régulé.



**Figure 20: Microscopie électronique du centrosome**

*Photo d'un centrosome inactif (NC) et d'un centrosome actif (AC) à la base d'un cil primaire (flèche noire) dans le rein de cochon (adapté de Sergeevich Shakhov et al. 2023).*

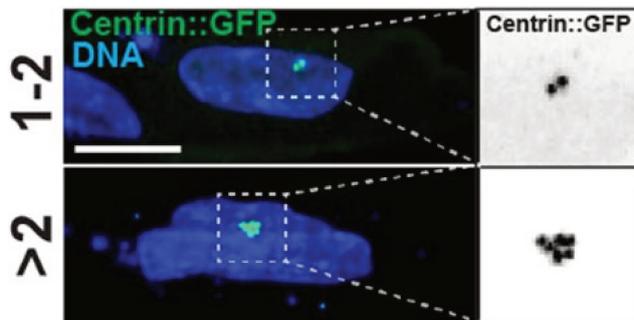
Le centrosome est une organelle dépourvue de membrane, composé des centrioles, un assemblage de neuf triplets de filaments de microtubule (**Figure 20**) et d'un amas de molécules composant le matériel centriolaire (*centriolar satellite* en anglais). Parmi ces molécules, on retrouve principalement les protéines centrosomes (CEP). C'est depuis ce centrosome que s'organise le cytosquelette de microtubule, notamment par la régulation du matériel centriolaire, d'où son autre nom de centre organisateur des microtubules. Ainsi, le centrosome régit les événements cellulaires liés à la dynamique des microtubules comme la formation du fuseau mitotique lors de l'interphase de la mitose, la formation du cil primaire (**Figure 20**) et enfin la polarisation et la migration cellulaire (**Doxsey et al., 2005**).

#### *i. Rôle du centrosome dans le développement vasculaire à travers la polarité et la migration*

Le centrosome n'est pas une organelle inerte puisque sa position varie selon les besoins de la cellule ; autrement dit si elle prolifère, si elle migre etc. *In vitro*, le centrosome d'une monocouche de cellules endothéliales qui n'est pas en phase de prolifération est placé de manière aléatoire. Des expérimentations de test cicatriciel sur des cellules endothéliales ont démontré que les cellules au niveau du front de migration repositionnaient leur centrosome à l'avant du noyau dans l'axe de migration de la cellule (**Luxton & Gundersen, 2011**). Cette réorientation est d'ailleurs impossible lorsque les cellules endothéliales sont traitées avec un agent de dénucléation de la tubuline, ce qui est associé à un défaut de migration des cellules endothéliales (**Gotlieb et al., 1983; Hotchkiss et al., 2002**). Au contraire, réprimer la relocalisation du centrosome déstabilise le réseau de fibres de stress dans la cellule (**Coomber,**

1993). Ainsi, par le biais du réseau de microtubule, le centrosome se repositionne dans la cellule afin d'initier sa migration. Plus précisément, une étude a démontré que la dynéine s'associait avec la protéine de polarité Par3 pour repositionner le centrosome via le cytosquelette de microtubule. Cette étude, conduite dans les fibroblastes, montre qu'en condition favorisant la migration (test cicatriciel), la dynéine et Par3 s'accumulaient au niveau des zones de contact cellule-cellule et plus précisément à l'extrémité des filaments de microtubule. Cette association stabiliserait le cytosquelette de tubuline, permettant à la dynéine d'exercer une tension sur le réseau de tubuline afin de permettre le repositionnement du centrosome. Ainsi, la délétion de Par3 ou de la dynéine conduit à une impossibilité du centrosome de se relocaliser et donc d'initier la migration (Schmoranz et al., 2009). Il est cependant important de noter que ces études de dynamique de relocalisation du centrosome n'ont pas été effectuées dans les cellules endothéliales. Enfin, le réseau de tubuline n'est pas le seul acteur de la dynamique centrosomale puisque le cytosquelette d'actine serait également impliqué dans le repositionnement du centrosome, notamment au cours de la mitose (Uzbekov et al., 2002).

Ainsi, le centrosome est largement impliqué dans les capacités migratoires des cellules endothéliales. Naturellement, s'est posée la question du rôle du centrosome dans le développement vasculaire. Des études ont effectivement démontré que le centrosome était impliqué dans l'angiogenèse de par sa capacité à promouvoir la migration mais également la prolifération. En effet, l'inhibition de l'expression de protéines du matériel centriolaire, telles que CEP70 ou CEP135, peut avoir un impact sur la relocalisation du centrosome, sur la dynamique du cytosquelette de microtubule et sur la polymérisation du cytosquelette d'actine par Rac et Cdc42. Ces dérégulations affectant la migration et le bourgeonnement. Il est également constaté un défaut de polarisation du fuseau mitotique, affectant ainsi la prolifération également importante au cours de l'angiogenèse (Shi et al., 2012; K. Wang et al., 2023). D'autres études dans le poisson zèbre démontrent que la protéine centrosomale CEP41 est nécessaire pour la résorption du cil primaire, ce qui serait initiateur de l'angiogenèse. En effet, le cil primaire joue un rôle dans la perception de l'hypoxie et du gradient de VEGF. Il doit cependant se résorber pour permettre à la dynamique endothéliale de se mettre en place. CEP41 favoriserait cet événement (Ki et al., 2020). Ces quelques études montrent un aspect important du centrosome et des protéines du matériel centriolaire dans le développement vasculaire mais à ce jour, il n'y a que très peu d'études qui traitent du sujet notamment dans le plexus vasculaire rétinien ou du cerveau.

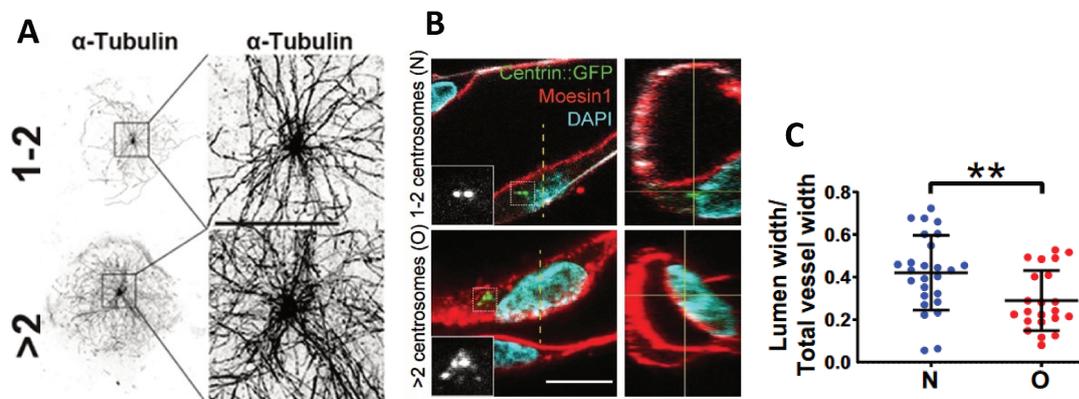


**Figure 21: Démultiplication centrosomale dans la cellule endothéliale**

Imagerie confocale de noyaux et de centrosomes de cellules ayant un nombre normal (1 ou 2) et un nombre anormal de centrosome (>2) (adapté de Kushner et al., 2020).

Enfin, il est important de noter qu'une dérégulation centrosomale est associée à une angiogenèse aberrante, notamment dans le contexte de la vascularisation tumorale. En effet, les tumeurs sécrètent un fort taux de VEGF afin de suractiver la formation de nouveaux vaisseaux pour satisfaire ses besoins énergétiques élevés. Cette forte concentration de VEGF active la voie MEK/ERK et la voie AKT, permettant

l'accumulation de la Cycline E et la suractivation de la CDK2 (Cyclin dépendant kinase) (Taylor et al., 2010). Lors de l'initiation de la mitose, c'est bien l'axe Cycline E/CDK2 qui induit la duplication du centrosome nécessaire à la formation des fuseaux mitotiques (Lacey et al., 1999). Ainsi, dans les cellules endothéliales tumorales, la sécrétion anormale de VEGF conduit à une démultiplication du nombre de centrosomes (>2) (Figure 21) dans la cellule endothéliale (Taylor et al., 2010). Dans ce cas, quel est l'impact de ces anomalies centrosomales sur le développement des vaisseaux sanguins tumoraux ?



**Figure 22: La démultiplication centrosomale conduit à des cellules endothéliales et à des vaisseaux anormaux**

a. Squelettisation du réseau de microtubule dans des cellules endothéliales avec ou sans excès de centrosome, 15 secondes après dénucléation du réseau. Nous pouvons observer sur ces images que la tubuline se renucléarise de manière anarchique chez les cellules endothéliales présentant un nombre anormal de centrosomes (adapté de Kushner et al., 2016).

b. Imagerie confocale de cellules endothéliales cultivées en 3D pour induire la formation d'un lumen. Les cellules présentant un surnombre de centrosomes possèdent un lumen anormalement rétracté. Quantification associée du diamètre du lumen (adapté de Buglak et al., 2020).

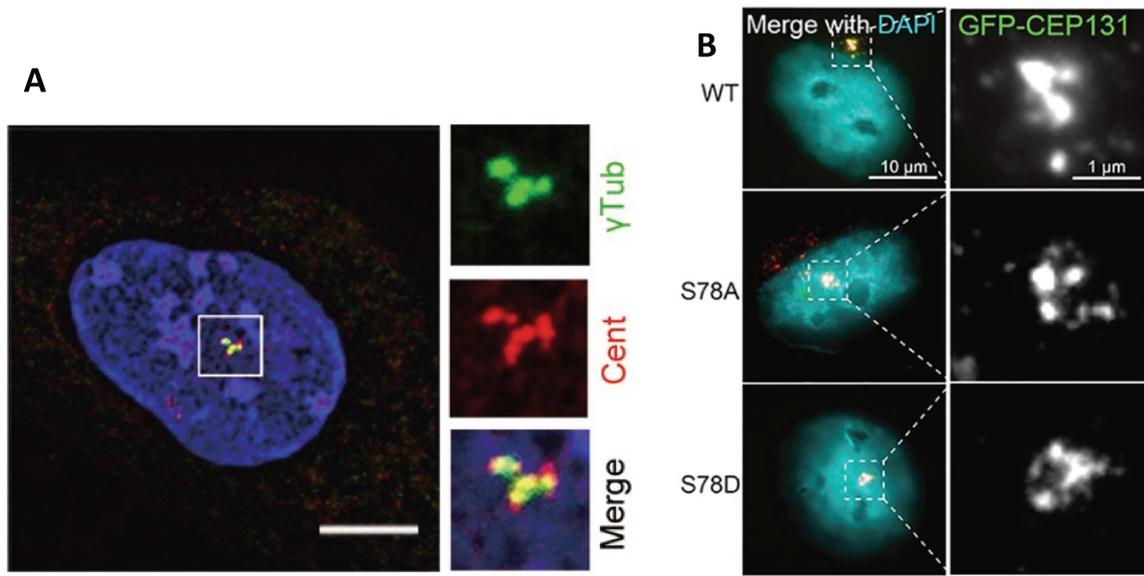
Lorsque des vaisseaux sanguins se caractérisent par une démultiplication centrosomale, ceux-ci ont une architecture tout à fait anormale. Dans un premier temps, les cellules endothéliales sont mal polarisées et présentent un cytosquelette de tubuline anarchique (**Figure 22.a**) ainsi que des capacités de bourgeonnement et de migration des cellules endothéliales perturbées (**Kushner et al., 2016**). Ces dérégulations des fonctions endothéliales conduisent à la formation de vaisseaux au lumen anormal (**Figure 22.b**) et à la géométrie tortueuse (**Buglak et al., 2020**).

ii. *Régulation du matériel centriolaire dans le maintien de la fonctionnalité du centrosome*

Les protéines CEP jouent un rôle majeur dans la fonctionnalité du centrosome et du cytosquelette de tubuline. Nous l'avons vu précédemment, la démultiplication du centrosome entraîne une dysfonction des cellules endothéliales mais le contraire est également vrai. Réprimer la duplication du centrosome ou l'expression de ces CEP entraîne également des dysfonctions cellulaires. La fonctionnalité du centrosome est donc régie par une balance métastable de l'expression de ces CEP notamment via l'autophagie (**Holdgaard et al., 2019**). Si ces dernières sont trop exprimées, le centrosome devient anarchique et si elles sont trop peu exprimées, le centrosome ne remplit pas ses fonctions. La Polo-like Kinase 4 (PLK4) semble être au cœur de ce mécanisme puisqu'elle phosphoryle un grand nombre de protéines centrosomales, dont elle-même, pour réguler leur dégradation et leur activité. PLK4 participe notamment à la duplication des centrioles. (**Cunha-Ferreira et al., 2013; Denu et al., 2019; Hori et al., 2016; D. H. Kim et al., 2019**). On comprend donc pourquoi une balance fine de l'expression de ces protéines est nécessaire pour maintenir un centrosome fonctionnel.

Parmi l'imbraglio de protéines du matériel centriolaire, une attirera particulièrement notre attention au cours de ce travail : CEP131. CEP131 a été décrit comme acteur de la ciliogenèse en formant un complexe au niveau du corps basal du cil (**Z. Wu et al., 2024**). Cependant, lorsque son niveau protéique devient anormal, CEP131 promeut l'amplification centrosomale comme cela a été démontré dans un modèle *in vitro* de carcinome. L'augmentation du niveau de CEP131 favorise son interaction avec PLK4, induisant une phosphorylation de CEP131 sur les résidus S21 et T205 permettant le recrutement de STIL (SCL-interrupting locus protein) qui stabilise PLK4, favorisant la duplication centrosomale (**D. H. Kim et al., 2019**). De plus, la surexpression de CEP131 est associée à faible pronostic chez les patients atteints de carcinome hépatocellulaire. En effet, cela favoriserait la prolifération et la migration des cellules cancéreuses (**X.-H. Liu et al., 2017**). De manière intéressante, une autre étude démontre que

la phosphorylation de CEP131 sur le résidu S78 par PLK4 préserve la fonctionnalité du centrosome. En effet, les cellules exprimant un CEP131 muté sur la S78 ou totalement déplétées en CEP131 présentent un matériel centriolaire dispersé et donc un centrosome dysfonctionnel (Denu et al., 2019). Ainsi, la régulation fine du niveau protéique et de la phosphorylation de CEP131 participe au bon fonctionnement du centrosome. Cependant, il n'y a encore aucune étude ayant tenté de disséquer ces mécanismes dans la cellule endothéliale.



**Figure 23: Effets de la régulation de l'expression de la phosphorylation de CEP131 sur la structure du centrosome**

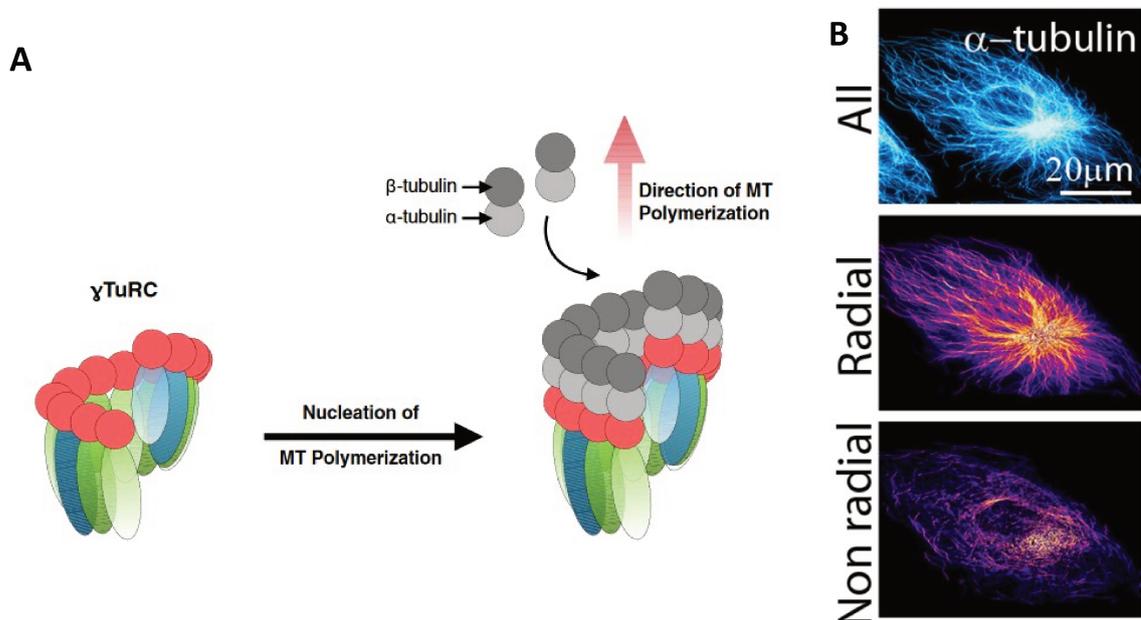
a. Cellule U2OS transfectée avec un plasmide CEP131-HA possédant un centrosome surnuméraire (>2), (adapté de D. H. Kim et al., 2019).

b. Structure du centrosome de HeLa sauvages ou exprimant un CEP131 muté sur le résidu S78. La mutation de la sérine phosphorylée par PLK4 entraîne une dispersion du matériel centriolaire (adapté de Denu et al., 2019).

### iii. Réarrangement du cytosquelette de tubuline depuis le centrosome

Le centrosome est donc un centre organisateur des microtubules. C'est de cette base que se réalise la nucléation de la tubuline. La  $\gamma$ -Tubuline s'accumule au niveau du centrosome et s'associe avec plusieurs familles de protéines comme les GRIPs ( $\gamma$ -tubulin ring proteins) ou les GCPs ( $\gamma$ -tubulin complex proteins) pour former un anneau basal au réseau de tubuline appelé  $\gamma$ -TuRC. Cet anneau joue deux rôles : recruter des protéines permettant la nucléation de l' $\alpha$ -tubuline et de la  $\beta$ -tubuline et orienter cette nucléation (Figure 24.a) (Oakley et al., 2015). Ainsi, la  $\gamma$ -Tubuline est fréquemment utilisée en immunomarquage pour observer les

centrioles et leur niveau de duplication. Il a également été rapporté la possibilité de la formation de MTOC non-centrosomaux mais ceci requiert également la présence du  $\gamma$ -TuRC pour la nucléation de la tubuline (Oakley et al., 2015). On distingue alors la tubuline radiale, d'origine centrosomale, de la tubuline non radiale (Figure 24.b).



**Figure 24: Nucléation du cytosquelette de tubuline depuis le centrosome**

a. Rôle du  $\gamma$ -TuRC au cours de la nucléation du cytosquelette de tubuline. (adapté de Oakley et al., 2015)

b. Observation par STED microscopie de la tubuline radiale et non radiale dans une cellule endothéliale. (adapté de Martin et al., 2018).

Par sa régulation du cytosquelette de tubuline, le centrosome est impliqué dans la formation du cil primaire (ainsi que dans sa résorption comme nous l'avons vu plus haut). La ciliogenèse est divisée en deux événements : l'initiation par la formation du corps basal et l'élongation du cil. Un certain nombre de CEP sont impliqués dans ces processus (Figure 25) puisque les centrioles forment le corps basal et s'encrent à la membrane. CEP131 interviendrait dans le recrutement au niveau des centrioles de CEP162 et CEP290, cette dernière participant à l'ancrage des centrioles à la membrane. Ce complexe permettrait le recrutement d'autres protéines induisant une déformation de la membrane conduisant à l'élongation du cil (Z. Wu et al., 2024).

Le cytosquelette de tubuline formant l'axonème, autrement dit le corps du cil, subit un certain nombre de modifications post-traductionnelles (acétylation, glycosylation, glutamylation etc.). CEP41 joue un rôle dans la glutamylation de la tubuline favorisant la

formation du cil. Une mutation de CEP41 est associée avec le syndrome de Joubert (J. E. Lee et al., 2012). Ce syndrome se caractérise par une hypoplasie cérébrale accompagnée de retards psychomoteurs et d'apraxie oculomotrice. Ces symptômes résultent de malformations du cil primaire au niveau de plusieurs organes causant des défauts de développement.

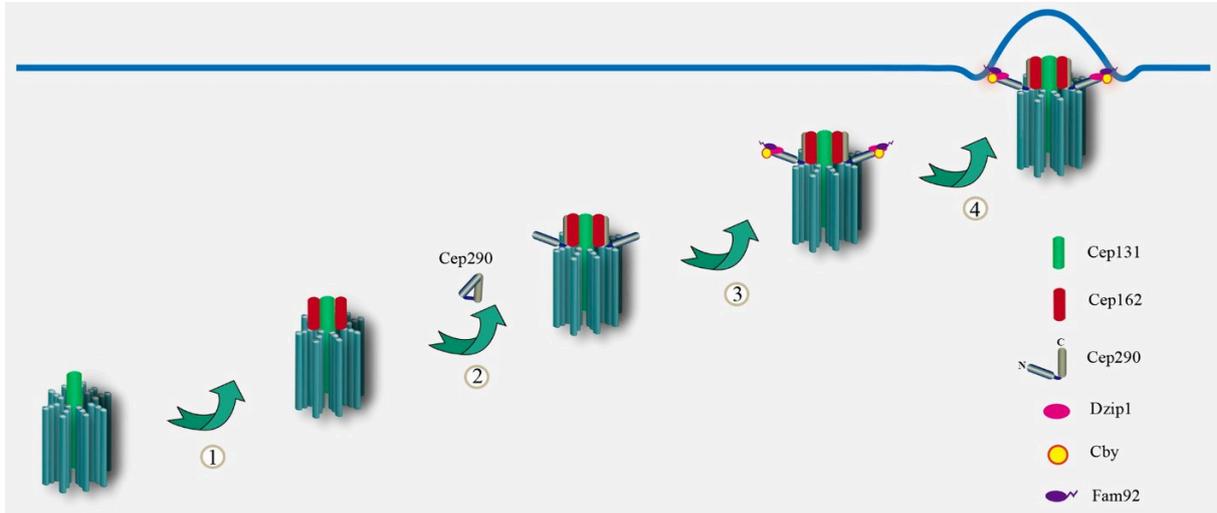


Figure 25: Rôle du matériel centriolaire dans l'initiation de la ciliogenèse

(adapté de Z. Wu et al., 2024).

#### IV- Un modèle d'étude de l'angiogenèse : la vascularisation post-natale de la rétine murine

##### a. Principes généraux de la vascularisation de la rétine

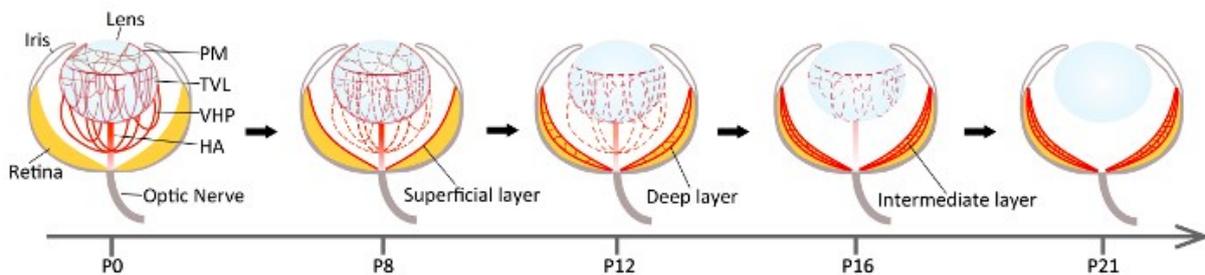
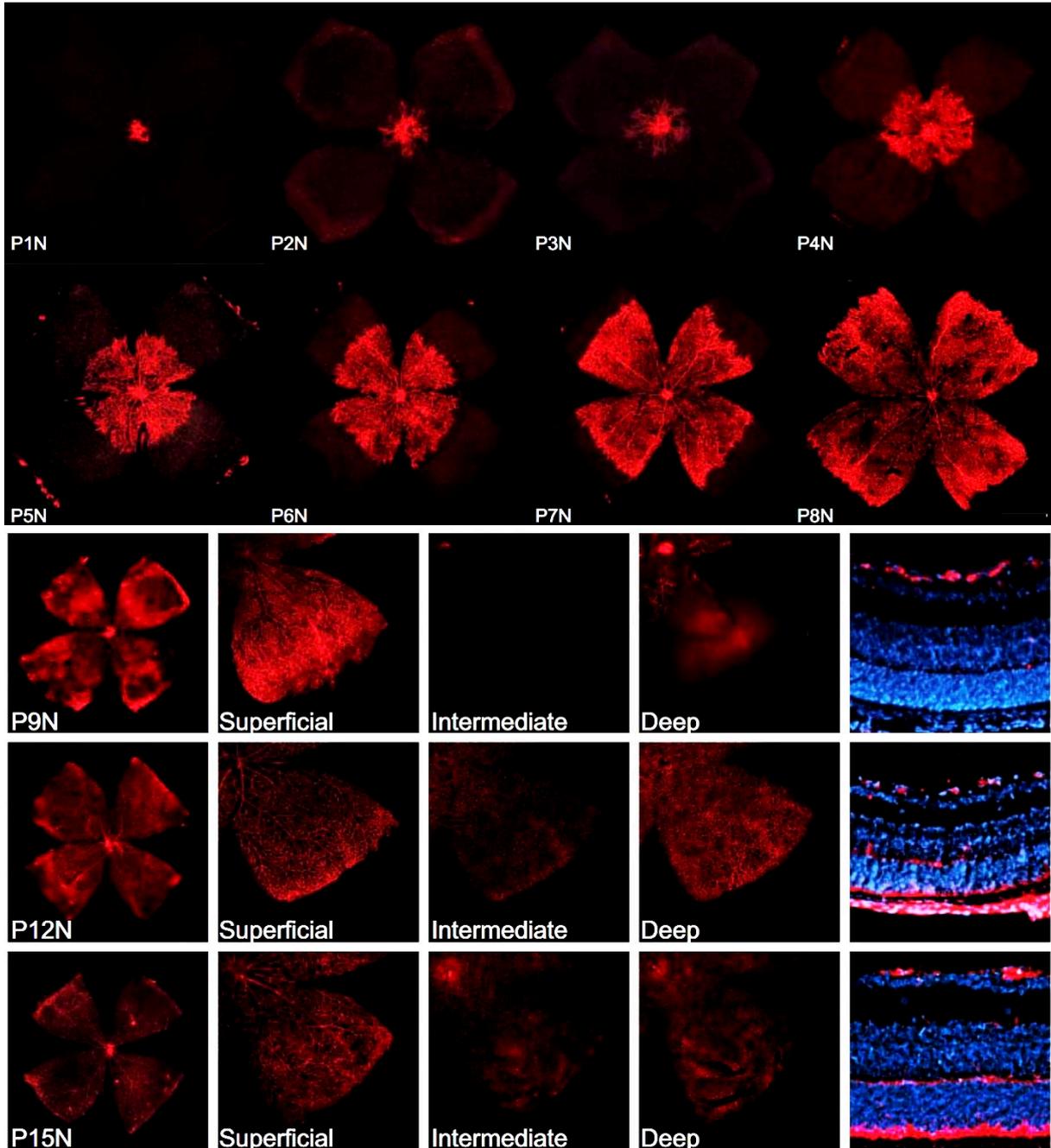


Figure 26: Schéma du développement vasculaire dans l'œil de la souris

Avant la naissance, la rétine est avasculaire et l'œil est alimenté par un réseau artériel appelé hyaloïde. Celui-ci disparaît par involution alors que la rétine se vascularise pour former trois plexus superposés (adapté de Z. Wang et al., 2019).

Beaucoup des mécanismes cités ci-dessus ont été découverts et étudiés dans le modèle de vascularisation post-natale de la rétine chez la souris. C'est un modèle relativement simple à mettre en place au laboratoire et à étudier. A la naissance, la rétine de la souris est avasculaire. L'œil est alimenté en sang par un réseau primaire artériel nommé le hyaloïde qui

disparaît par involution au moment où le réseau vasculaire rétinien se développe (Z. Wang et al., 2019). Ensuite, un premier plexus se forme via les mécanismes d'angiogenèse décrits ci-dessus pendant la première semaine de vie de l'animal. A P8, le plexus atteint le bout de la rétine et la veine principale ainsi que certains capillaires plongent sous ce premier plexus pour former un plexus profond qui sera complètement développé vers P12. Un plexus intermédiaire se développe entre P12 et P17 (Dorrell & Friedlander, 2006; Stahl et al., 2010)



**Figure 27 : Imagerie confocale de la vascularisation de la souris de P1 à P15**

*Immunomarquage des vaisseaux sanguins à l'Isolectine B4 (IB4) montrant la densification de la rétine et la formation des deux plexus profonds (adapté de Stahl et al., 2010).*

La vascularisation de la rétine est guidée par les astrocytes qui se développent avant la naissance de l'animal vers le stade E19. A la naissance de l'animal, le lit astrocytaire est complètement formé (Dorrell et al., 2002). En plus du gradient de VEGF, les cellules endothéliales sont donc guidées par les astrocytes au cours de l'expansion du plexus en s'alignant par rapport aux fibres gliales et en formant des jonctions avec celles-ci via la R-Cadhérine. Plus précisément, c'est par le biais des filopodes des tip cells que le lien entre cellules endothéliales et astrocytes est initié. En effet, comme énoncé plus haut, les astrocytes sécrètent du VEGF pour attirer les tip cells par chimiotactisme (Dorrell et al., 2002; Gerhardt et al., 2003).

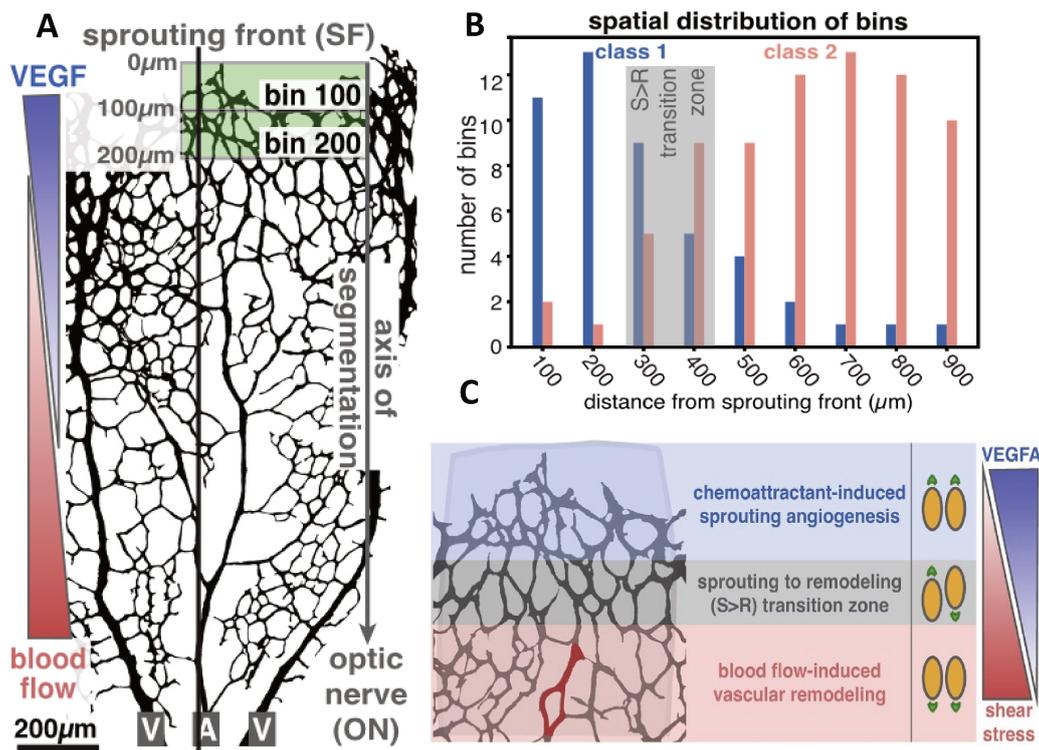
### b. Compétition entre le gradient de VEGF et le flux lors du développement rétinien

Nous l'avons décrit dans ce chapitre, le développement vasculaire implique deux mécanismes majeurs : l'angiogenèse, dépendante du VEGF et la régression vasculaire, dépendante du flux. Dans la rétine, une étude récente, conduite par l'équipe du Dr Cláudio Franco à Lisbonne, a élucidé la répartition de ces mécanismes au sein du plexus primaire rétinien au cours de son développement (Barbacena et al., 2022).

Les auteurs ont évalué, dans cette étude, plusieurs paramètres morphométriques pour caractériser le réseau vasculaire dans une fenêtre tous les 100µm (Figure 28.a). Ils ont ainsi analysé la densité vasculaire, la densité de bifurcations, la quantité de zones avasculaires, la moyenne de la taille des zones avasculaires ou encore le diamètre moyen des vaisseaux. Par une analyse statistique de composante principale (PCA) ils ont pu délimiter la rétine en trois zones (Figure 28.b): le front de migration répondant au chimiotactisme du VEGF, la zone proche du nerf optique où les cellules se polarisent selon le flux et une zone intermédiaire dite de transition S>R (Figure 28.c) (Barbacena et al., 2022).

L'intérêt de cette étude réside également dans les expérimentations de modulation de la transition S>R. Cette zone peut se déplacer le long du plexus suivant l'importance des stimuli mécanique ou chimique. Ainsi, lorsque les souris sont traitées par injection de VEGF à P5, avec un sacrifice à P6, le phénomène angiogénique est accru avec une augmentation du nombre de tip cells et une augmentation de la densité vasculaire. De plus, la zone de transition est déplacée d'environ 250µm vers le nerf optique (Figure 29.a). Au contraire, lorsque les souris sont injectées avec un inhibiteur du VEGF, soluble VEGF Receptor1 (sVEGFR1, sFLT1), le phénomène angiogénique est réduit avec une baisse de la densité vasculaire, associée à une

augmentation de régression, et une baisse du nombre de tip cells. La transition S>R n'est cette fois pas visible. Les auteurs interprètent cela par une forte sensibilité au traitement à sFLT1 et supposent que la transition à lieu dans la première fenêtre, c'est-à-dire sur les 100 premiers microns en partant du front de migration. De la même manière, la modulation du flux joue sur cette zone de transition. Une augmentation du flux sanguin avec un traitement à l'angiotensine-II (injection de P3 à P5 pour un sacrifice à P6) mime les effets de sFLT1 (Figure 29.b) et l'injection de Captopril, un inhibiteur des enzymes de conversion de l'angiotensine-II qui réduit le débit sanguin, mime les effets de l'injection au VEGFA (Barbacena et al., 2022).



**Figure 28: Segmentation du plexus rétinien selon le stimulus de polarité des cellules endothéliales**

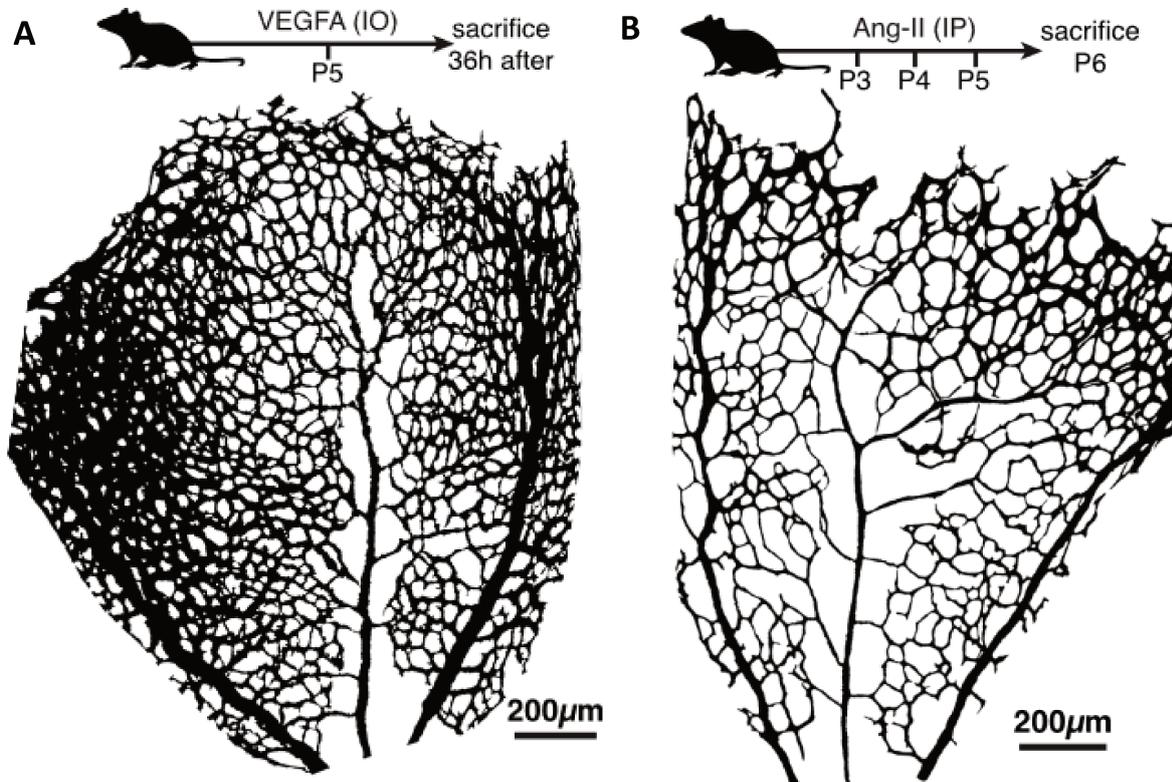
a. Représentation de la segmentation entre effet du VEGF et du flux sur la polarité des cellules endothéliales. Les rectangles verts représentent des exemples de fenêtres utilisées pour quantifier les paramètres morphométriques du plexus.

b. Après réalisation de l'analyse statistique PCA, les auteurs ont identifié deux classes de caractéristiques du plexus, l'une correspondant à l'effet VEGFA et l'autre à l'effet flux. Pour chaque fenêtre, ils ont déterminé le nombre de rétines correspondant à la classe 1 ou à la classe 2. C'est par la répartition des classes 1 et 2 que les auteurs ont pu segmenter la rétine en trois zones. La zone d'angiogenèse correspond à la zone où l'on trouve le plus la classe 1 et inversement la zone proche du nerf optique correspond à celle où l'on retrouve majoritairement la classe 2. La zone intermédiaire correspond à une transition appelée S>R.

c. Représentation de la segmentation d'une rétine en trois zones.

(Adapté de Barbacena et al., 2022).

Cette étude fait écho au travail des docteurs Anne-Clémence Vion et Holger Gerhardt (Vion et al., 2020). En effet, ces deux études démontrent que l'intensité du signal chimique ou mécanique est ce qui gouverne la polarité planaire des cellules endothéliales et la balance entre zone d'angiogenèse et zone de régression vasculaire.



**Figure 29: Modulation de la zone de transition S>R par l'intensité du stimulus chimique et mécanique dans la vascularisation de la rétine murine**

a. Squelette vasculaire d'une rétine de souris à P6 traitée avec du VEGFA. La zone de transition S>R est déplacée d'environ 230µm vers le nerf optique.

b. Squelette vasculaire d'une rétine de souris à P6 traitée avec de l'angiotensine-II où la transition S>R n'est plus visible.

(Adapté de Barbacena et al., 2022).

## Chapitre 2 : Le rôle de la voie Wnt dans le développement et l'homéostasie vasculaire

### I- Rôle de la voie Wnt dans le développement du réseau vasculaire

#### a. Généralités sur la voie de signalisation wnt

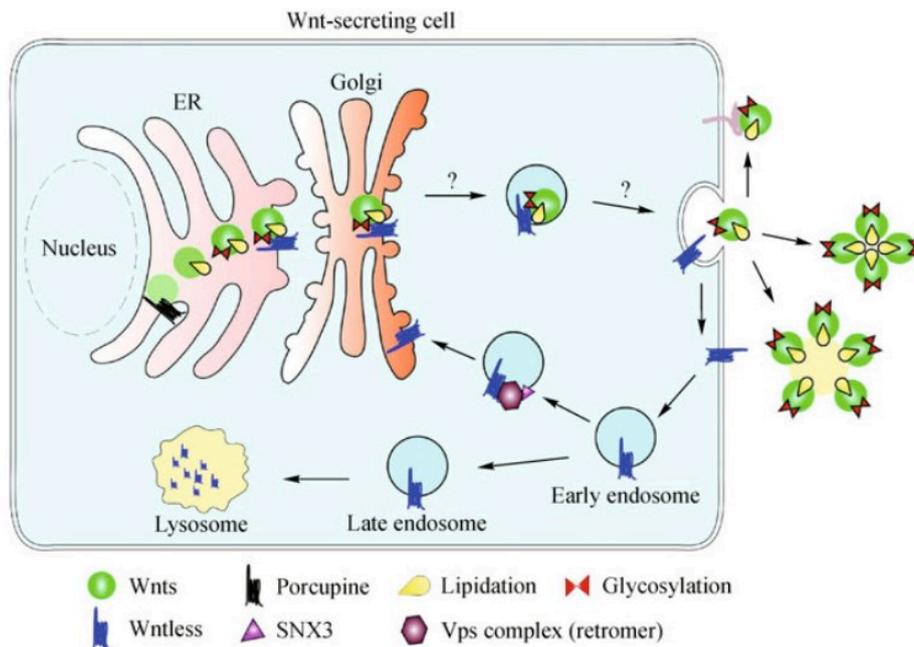
La régulation de l'angiogenèse et de la polarité endothéliale est gouvernée par un certain nombre de voies de signalisation. L'une d'entre elles est la voie de signalisation Wnt. Celle-ci est activée par la formation de complexes de ligands/récepteurs/co-récepteurs. Les principaux ligands sont les ligands Wnt. Ce ne sont pas moins de 19 de ces derniers qui ont été identifiés aujourd'hui (Nusse & Clevers, 2017). Dans la majorité des cas, ces ligands interagissent avec les récepteurs de la famille Frizzled (Fzd) et les co-récepteurs « low-density lipoprotein receptor-related proteins (LRP) 5/6 (Gordon & Nusse, 2006). Mais la voie Wnt est complexe et de nombreuses autres protéines peuvent remplacer celles citées ci-dessus. Dans cette partie, nous allons tenter de comprendre le fonctionnement de ce maelstrom d'interactions protéiques qu'est la voie Wnt et son rôle dans le développement d'un plexus vasculaire en prenant deux exemples : la barrière hémato-rétinienne (BHR) et la barrière hémato-encéphalique (BHE).

De manière dichotomique, deux voies de signalisation Wnt ont été caractérisées. La voie canonique Wnt/ $\beta$ -caténine d'une part et la voie non-canonique Wnt de polarité planaire (PCP) d'autre part (Gordon & Nusse, 2006; Rao & Kühl, 2010). La première repose sur l'activation et la translocation de la  $\beta$ -caténine dans le noyau, activant la transcription de gènes cibles. La seconde est indépendante de la  $\beta$ -caténine et est décrite comme inhibant la voie canonique (Grumolato et al., 2010; Sewduth et al., 2014). Ainsi, ces deux voies ne sont pas indépendantes et s'entrecroisent, notamment par le biais de la protéine Dishevelled (DVL) qui se retrouve au carrefour de ces deux axes signalétiques et qui, selon le signal réceptionné, est phosphorylée sur des domaines précis, la redirigeant vers l'une ou l'autre des voies Wnt (Beitia et al., 2021). L'étude du rôle de la voie Wnt dans l'endothélium est essentielle pour comprendre la mise en place d'un plexus vasculaire fonctionnel. Si la voie canonique a été grandement caractérisée, le rôle de la PCP dans la cellule endothéliale reste plus nébuleux.

*i. Les ligands Wnt*

De nombreux ligands Wnt ont été identifiés chez l'homme, la souris, le xénope ou la drosophile. Certains sont conservés entre ces espèces alors que d'autres leur sont uniques. Ces protéines sont hautement liposolubles et subissent des modifications post-traductionnelles les rendant fonctionnelles. En effet, il a été démontré que des cystéines bien précises étaient palmitoylées par la « membrane-bound-O-acetyltransferase porcupine » (PORCN), leur conférant leur propriété hydrophobe et ainsi limitant leur diffusion aux cellules voisines des cellules sécrétrices (Willert et al., 2003). Les ligands Wnt sont palmitoylés par PORCN au niveau du réticulum endoplasmique rugueux puis ils se lient à la protéine Wntless, aussi connue sous le nom de GPR177 (Probable G-protein coupled receptor), permettant la formation de vésicules de sécrétion (Bänziger et al., 2006; S. Das et al., 2012).

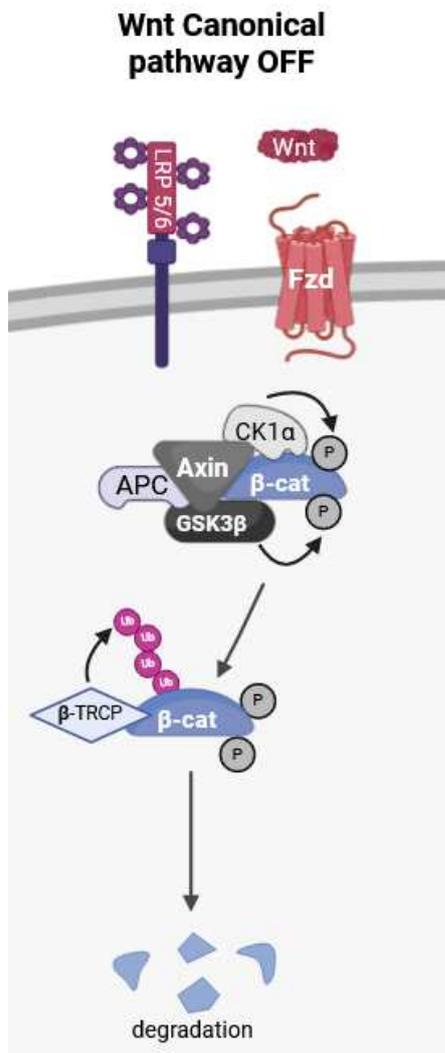
Une fois sécrétés, les ligands Wnt se lient à leur récepteur respectif. Des études cristallographiques démontrent que la queue lipidique de ces protéines est impliquée dans leur interaction avec les récepteurs FZD. Au niveau du récepteur, des domaines riches en cystéines ont été identifiés comme sites d'interaction avec les ligands Wnt (Janda et al., 2012).



**Figure 30: Schéma de sécrétion des ligands Wnt**

Après palmitoylation au niveau du RER, les ligands Wnt forment des vésicules de sécrétion en se liant à la protéine Wntless. Une fois sécrétés par exocytose, les ligands liposolubles diffusent très localement vers les cellules voisines (adapté Das et al., 2012).

ii. La voie canonique Wnt/ $\beta$ -caténine



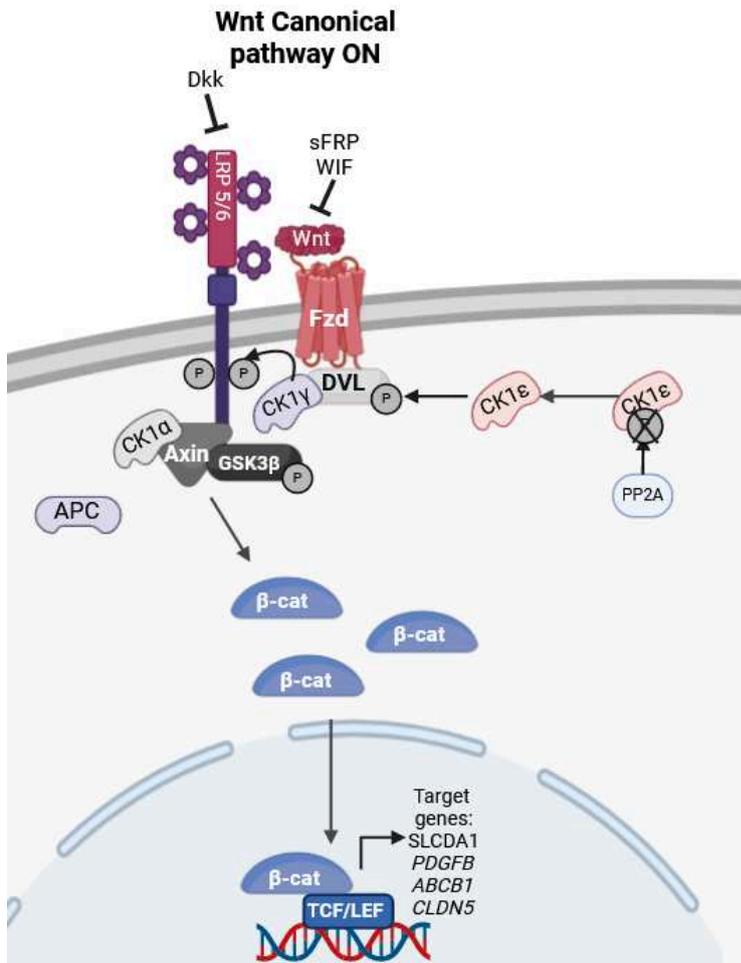
**Figure 31: Système de dégradation de la  $\beta$ -caténine en absence de ligand Wnt**

La voie de signalisation Wnt canonique est caractérisée comme une voie de prolifération et de stabilisation des vaisseaux, notamment de la BHE et de la BHR (Daneman et al., 2009; Liebner et al., 2008; Xu et al., 2004). Des défauts de cette voie entraînent une rupture des propriétés de barrière ainsi que des retards et des anomalies de développement du plexus vasculaire.

La  $\beta$ -caténine joue un rôle central dans cet axe de signalisation. En absence de ligand Wnt, la  $\beta$ -caténine cytoplasmique est ciblée par un complexe de dégradation formé des kinases CK1 $\alpha$  (Caseine Kinase 1) et GSK3 $\beta$  (Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$ ), d'Axin1 et d'APC (Adenomatous polipus coli) (Sakanaka et al., 1998). Axin1 fait office de protéine de structure pour le complexe. La  $\beta$ -caténine est alors phosphorylée par CK1 $\alpha$  sur la Ser45, permettant GSK3 $\beta$  de phosphoryler la Ser33, la Ser37 et la Thr41 (Yost et al., 1996). Enfin, APC redirige la  $\beta$ -caténine phosphorylée vers la  $\beta$ -TRCP (beta-transducin repeat containing) qui l'ubiquitine pour un adressage au protéasome et ainsi entraîner sa dégradation (Rao & Kühl, 2010; Xing et al., 2003). Une

mutation sur les sites de phosphorylation ciblés par CK1 $\alpha$  et GSK3 $\beta$  stabilise la  $\beta$ -caténine et prévient sa dégradation au protéasome (Rao & Kühl, 2010).

Pour l'activation de la voie canonique, les complexes de ligands/récepteurs/co-récepteurs varient mais de manière générale, le ligand Wnt se lie avec le récepteur FZD qui forme alors un complexe avec le co-récepteur LRP5/6. Les ligands Wnt3a ou Wnt1 ont été décrits comme activateurs de cet axe canonique (Nusse & Clevers, 2017). CK1 $\epsilon$  est activée par déphosphorylation par PP2A (Protein Phosphatase 2A) et phosphoryle alors DVL, stabilisant l'interaction de cette protéine avec LRP5/6 (Del Valle-Pérez et al., 2011). Ainsi, CK1 $\gamma$  est



**Figure 32: Activation de la voie canonique Wnt en présence de ligand Wnt**

recrutée afin de phosphoryler LRP5/6 (Davidson et al., 2005). C'est alors que le complexe CK1α/Axin1/GSK3β se lie à LRP 5/6. GSK3β reste sous sa forme phosphorylée, et Axin1 est déphosphorylée, ce qui correspond à leur forme inactive. Le complexe est libéré de son interaction avec DVL/LRP5/6 et inclus dans des vésicules d'endocytose (Bilic et al., 2007). La β-caténine est préservée de la dégradation par le complexe de destruction et est transloquée dans le noyau. Elle s'associe alors au couple de facteurs de transcription TCF/LEF (T-cell factor/Lymphoid enhancer-binding factor) afin d'activer l'expression de gènes impliqués dans les fonctions de barrière tels que *CLDN5* (Claudine 5), *SLC2A1* (GLUT1), *PDGFB* ou encore *ABCB1* (Daneman et al., 2009; Kania et al., 2011; Liebner et al., 2008; Reis et al., 2012). Des gènes de prolifération sont également ciblés par la β-Caténine tels que *CCND1* (Cyclin D1) (Nusse & Clevers, 2017). Lorsque la voie canonique est dans sa configuration inactive et que la β-caténine est dégradée, l'expression des gènes cibles est réprimée (Cavallo et al., 1998). Traditionnellement, le niveau des transcrits *LEF1* et *AXIN2* est considéré comme une lecture pertinente de l'activité transcriptionnelle de la β-caténine, étant des cibles de celle-ci (Nusse & Clevers, 2017).

Selon le tissu ou le signal, d'autres protéines peuvent être impliquées dans l'induction de la voie Wnt/β-caténine. Le ligand Norrin est également capable d'induire l'activation de cette voie en se liant au récepteur FZD4 et au co-récepteur TSPAN12 (Tetraspanin 12) (Lai et al., 2017).

Afin de réguler l'angiogenèse, et de prévenir une prolifération anarchique des vaisseaux, un certain nombre d'inhibiteurs de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine sont sécrétés. En effet, les facteurs sécrétés de la famille sFRP ou encore WIF-1 séquestrent les facteurs Wnt empêchant leur liaison avec les récepteurs FZD (Dufourcq et al., 2008; Ramachandran et al., 2012). Par exemple, en bloquant la transduction du signal Wnt, sFRP-1 réduit l'expression des gènes de prolifération *CCND1* et *CDK2*, réprimant la prolifération des cellules endothéliales. Ainsi, des études ont démontré que sFRP-1 perturbe la néo-vascularisation post-ischémique du muscle murin (Ezan et al., 2004). La famille des inhibiteurs Dickkopf (DKK), au contraire de WIF-1 ou des sFRP, se fixe sur le co-récepteur LRP5/6 pour prévenir la formation du complexe ligand/récepteur/co-récepteur et induire l'endocytose du co-récepteur (Niehrs, 2006).

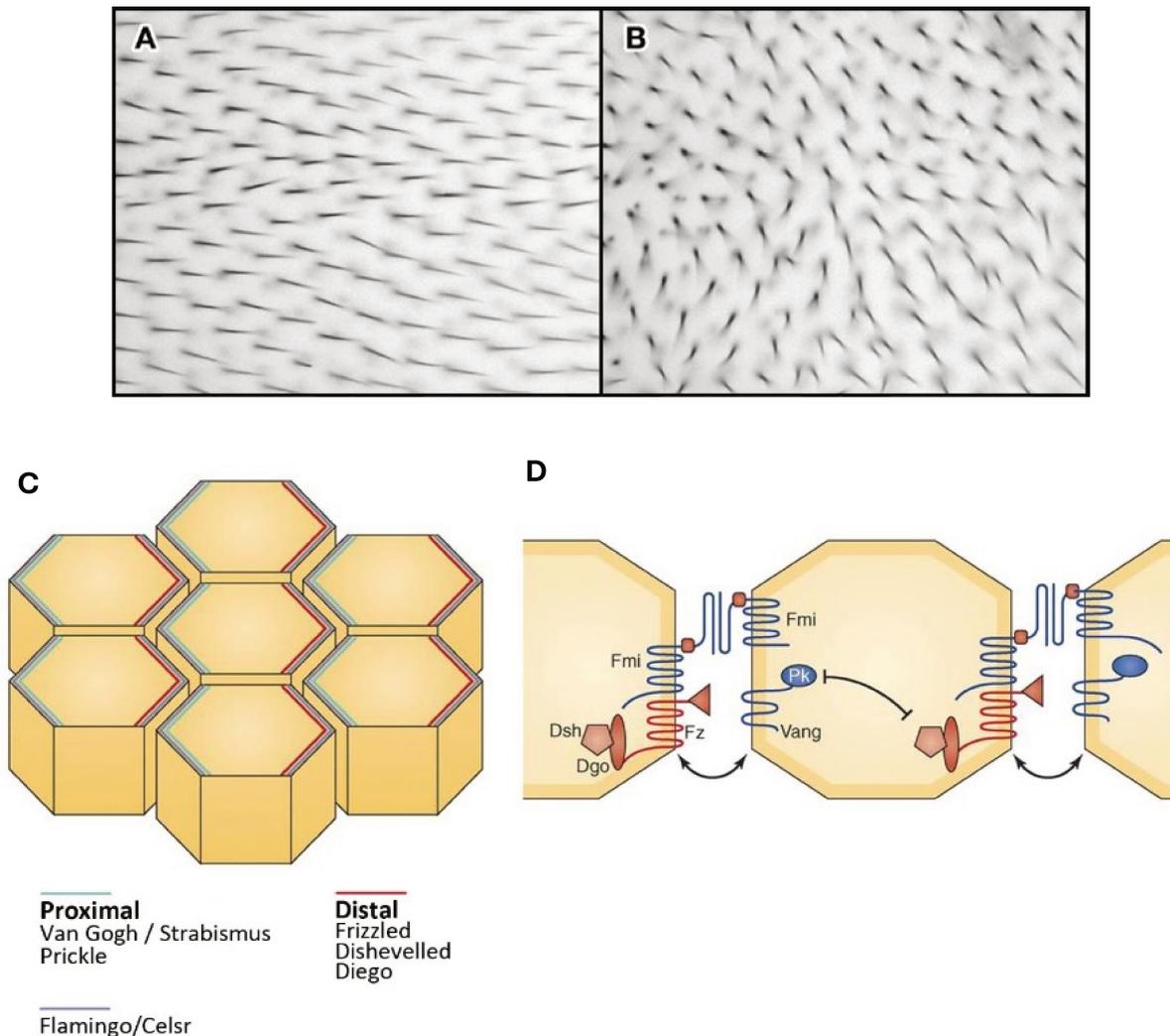
### iii. La voie non-canonique Wnt/PCP

La voie non-canonique Wnt PCP a été caractérisée dans l'organisme *Drosophila melanogaster* (Goodrich & Strutt, 2011) ou encore dans la cochlée de la souris (Huarcaya Najarro et al., 2020). Elle régule la polarité des cellules épithéliales dans le plan orthogonal à l'axe apico-basal. En se polarisant, la cellule transmet cette information à ses voisines qui se polarisent à leur tour. Ainsi, un tissu complet se polarise uniformément. Cette fonction de polarité planaire permet la bonne orientation des soies de l'aile de la drosophile ce qui confère à l'insecte des propriétés aérodynamiques au cours du vol.

La voie PCP est guidée par des protéines centrales conservées. D'une part, des complexes membranaires tels que FZD, Flamingo (FMI chez les vertébrés) ou Van Gogh (VANGL chez les vertébrés) transmettent l'information de polarité aux cellules voisines (Devenport, 2014). D'autre part, les protéines cytoplasmiques, telles que DVL, Diego (DGO chez les vertébrés) ou Prickle (PK chez les vertébrés), traduisent les signaux de la voie Wnt/PCP en réponse cellulaire (Butler & Wallingford, 2017; Devenport, 2014). Via l'activation de DVL, le système des petites GTPases, comme RhoA ou RAC1 est activé afin d'induire une réorganisation du cytosquelette d'actine (J. Wu & Mlodzik, 2009).

Les études réalisées dans *Drosophila melanogaster* démontrent que l'asymétrie de la localisation des protéines corps de la voie PCP aux pôles opposés de chaque cellule est essentielle dans la polarisation des cellules (Simons & Mlodzik, 2008). Au niveau distal, nous retrouvons accumulés le récepteur FZD et les protéines cytoplasmiques DVL et DGO alors qu'au niveau proximal sont localisés le récepteur VANGL et la protéine cytoplasmique PK. Ainsi,

les récepteurs distaux communiquent préférentiellement avec les récepteurs proximaux de la cellule voisine (Chen et al., 2008; Struhl et al., 2012). L'asymétrie de la répartition des protéines centrales est notamment régulée par leur phosphorylation. Par exemple, le récepteur VANGL est phosphorylé par CK1 $\epsilon$ , le relocalisant du côté proximal de la cellule (Kelly et al., 2016). Une rupture de ce système provoque des anomalies anatomiques, notamment une orientation anarchique des follicules pileux (Zallen, 2007).

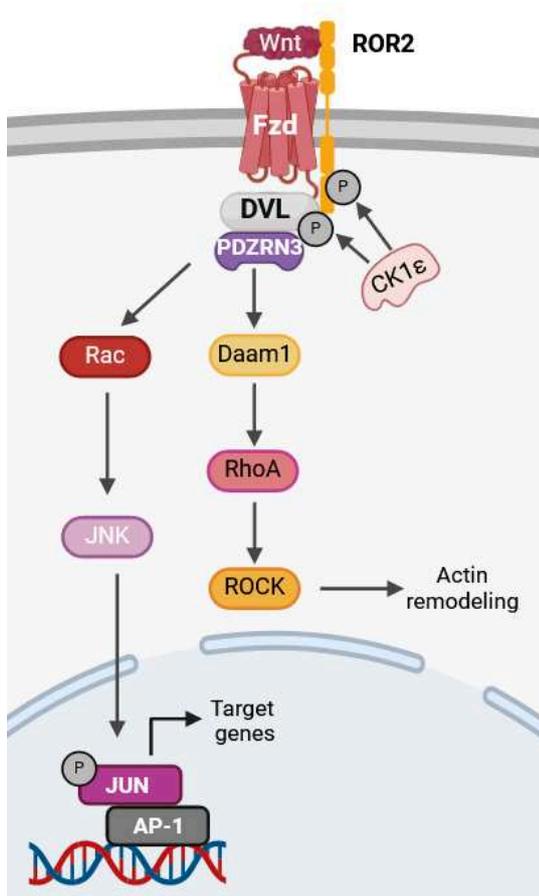


**Figure 33: La voie Wnt/PCP régit l'organisation planaire des tissus épithéliaux**

(A, B) Photo d'extension du cytosquelette de cellules épithéliales des ailes de *Drosophila melanogaster* produisant des poils uniformément orientés distalement chez la mouche sauvage (A). Les mutants pour *fzd* présentent une désorientation des poils (B) (adapté de Zallen, 2007).

(C) Représentation de la répartition asymétrique des protéines corps de la voie PCP avec Vgl et Pr réparties sur le côté proximal et Fzd, Dvl et Dgo réparties sur le côté distal.

(D) Modèle de la transmission de l'information de polarité entre cellules adjacentes. Le complexe Fzd/Fmi interagit avec le complexe Vgl/Fmi de la cellule voisine. Fmi forme des homodimères entre deux cellules adjacentes (adapté de Devenport, 2014).



**Figure 34: Activation de la voie Wnt/PCP en présence de ligand Wnt**

Chez le poisson zèbre et chez le mammifère, la voie PCP est primordiale au cours de la gastrulation, du développement des membres ou de l'élongation des intestins en coordonnant l'orientation des cellules (Montcouquiol et al., 2003; Seifert & Mlodzik, 2007). D'autres études démontrent que la voie PCP commande des fonctions telles que la division cellulaire asymétrique et la migration dirigée (Wallingford, 2012). Bien que le rôle des ligands Wnt soit encore débattu dans la polarité planaire chez la drosophile, leur rôle dans la voie PCP des vertébrés est établi (Chen et al., 2008; Wu et al., 2013). Les ligands Wnt4, Wnt5a et Wnt11 ont été décrits comme activateurs de la voie Wnt/PCP (Andre et al., 2015; Heinonen et al., 2011). Le ligand Wnt se lie au récepteur FZD ou VANGL, lié au corécepteur ROR2 (Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2) ou PTK7 (Tyrosine-protein kinase-like 7), et CK1δ/ε phosphoryle DVL qui active alors le système des petites GTPases Rho via son interaction avec DAAM1. Les GTPases Rho induisent alors l'activité des kinases ROCK (Rho associated kinase) ou CDC42, impliquées dans la réorganisation du cytosquelette d'actine par des mécanismes de polymérisation et dépolymérisation. Cette réorganisation du cytosquelette permet notamment la polarisation de la cellule par repositionnement du centrosome, la formation des filopodes et des lamellipodes pour la migration et la motilité cellulaire (Bryja et al., 2007; Habas et al., 2001; Schmoranzler et al., 2009). Indépendamment de DAAM1, DVL peut activer JNK via RAC, phosphorylant le facteur de transcription c-JUN qui transloque dans le noyau pour interagir avec AP-1 et induire la transcription de gènes cibles (Habas et al., 2003). L'ubiquitine ligase PDZRN3 participe à l'activation de ces mécanismes en interagissant avec DVL et DAAM1. Sa délétion entraîne une baisse de l'activité transcriptionnelle de c-Jun et des défauts de polarisation et de migration endothéliale. *In vivo*, la délétion endothéliale de PDZRN3 déstabilise le développement rétinien notamment à cause d'une dépolarisation des cellules

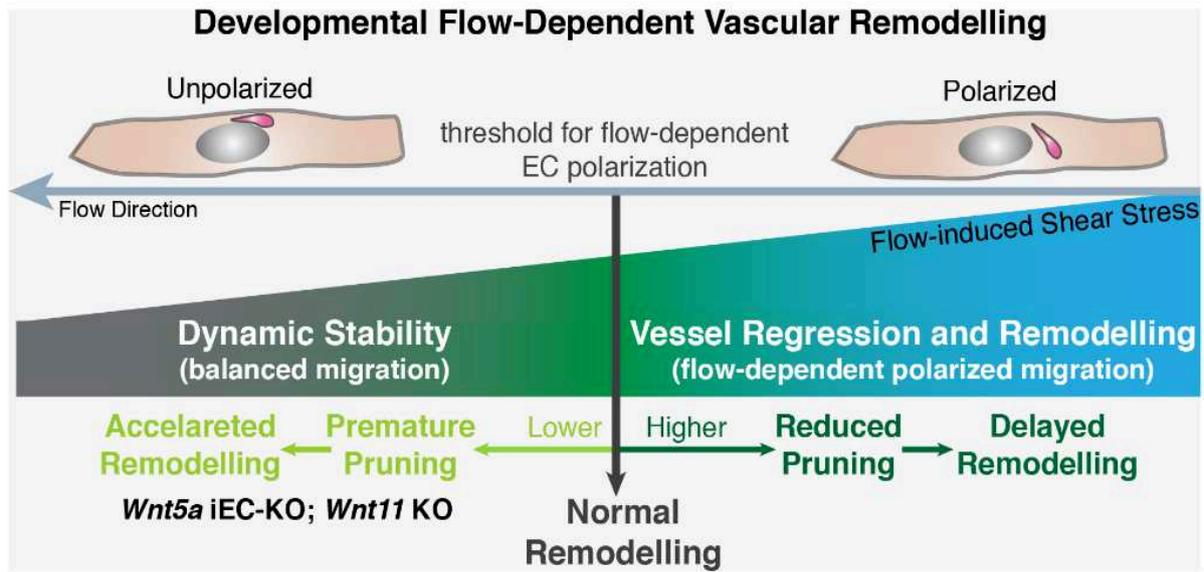
(Sewduth et al., 2014). Cette activité de PDZRN3 est induite par l'axe Wnt-5a/ROR2 (Konopelski Snavely et al., 2021; Sewduth et al., 2014). En plus des récepteurs FZD ou VANGL, le corécepteur ROR2 est un acteur important dans l'activation de cette voie PCP. CK1 $\epsilon$  le phosphoryle en réponse à un stimulus par le ligand Wnt-5a afin de prévenir sa dégradation via le système lysosomal potentialisant ainsi la transduction du signal Wnt/PCP (Curto et al., 2018). Notre laboratoire a récemment démontré que le corécepteur ROR2 contrôlait la polarité endothéliale, notamment en activant la réorganisation du cytosquelette via Cdc42. En effet, dans l'endothélium aortique de la souris âgées de 6 jours, les cellules endothéliales sont majoritairement polarisées contre le flux. Une délétion endothéliale de ROR2 déstabilise cette polarité. De manière intéressante, la proportion de cellules non polarisées augmente avec l'âge, en corrélation avec une baisse de l'expression de ROR2 (Bougaran et al., 2023).

La voie Wnt/PCP dans la mise en place de l'endothélium reste encore mal caractérisée. Un manque de clarté et de consensus à propos de la définition des fonctions de la PCP endothéliale, de la façon d'analyser la régulation des effecteurs et de mesurer l'activation du signal moléculaire entrave sa caractérisation dans l'endothélium. Par exemple, les gènes ciblés par c-Jun dans le cadre de la PCP ne sont pas caractérisés, contrairement aux cibles de la  $\beta$ -caténine. La lecture transcriptionnelle en aval de la voie est donc très difficile. Pour mieux comprendre l'implication de la PCP dans l'endothélium, il apparaît primordial de caractériser les événements moléculaires reliant l'activation de la voie par les ligands Wnt et l'activation de c-Jun ou des fonctions de polarité planaire (Bats et al., 2022).

#### a. La voie Wnt/PCP comme chef d'orchestre de l'organisation planaire du plexus vasculaire

Comme décrit dans le chapitre précédent, les vaisseaux sanguins sont formés d'une monocouche de cellules endothéliales. La structure tridimensionnelle de cette monocouche est induite par la polarité planaire des cellules qui la composent. La voie Wnt a été décrite comme régulatrice de ce phénomène. Tout d'abord, des études démontrent que la délétion du gène *Wnt5a* chez le poisson zèbre altère la formation du plexus vasculaire. En effet, une désorganisation des vaisseaux intersegmentaires et de la vascularisation dorsale est observée (Cirone et al., 2008). De plus, *Wnt5a* et *Wnt11* ont été démontrés comme étant des modulateurs de la réponse des cellules endothéliales au flux. En effet, une délétion de ces ligands non-canoniques d'origine endothéliale accroît la sensibilité des cellules au flux en augmentant le taux de polarisation contre le flux dans les capillaires et augmentant ainsi la

régression vasculaire. Il faut cependant noter qu'une surexpression de Wnt5a ne bloque pas la régression vasculaire ni ne prévient l'augmentation de la régression vasculaire induite par un traitement à l'angiotensine-II. Ainsi, la voie non-canonique Wnt n'est pas activatrice de la réponse des cellules endothéliales par rapport au flux mais module le seuil de polarisation de celles-ci par rapport au flux, prévenant une régression prématurée des vaisseaux et une diminution de la densité vasculaire (Franco et al., 2016).



**Figure 35: Modèle du rôle de la voie non-canonique Wnt sur la réorganisation polaire des cellules endothéliales induite par le flux**

Wnt5a, et par extension la voie non-canonique Wnt, contrôle la balance de réponse des cellules endothéliales au flux. En somme, son absence entraîne une surréaction des cellules endothéliales par rapport au flux et augmente la régression vasculaire, diminuant ainsi la densité vasculaire. La voie non-canonique prévient ce genre de régression anormale (adapté de Franco et al., 2016).

Les ligands non-canoniques Wnt coordonnent également la réorganisation intracellulaire des cellules endothéliales en activant le système des petites GTPases RhoA et CDC42. La réorganisation du cytosquelette d'actine renforce son lien avec les jonctions adhérentes et permet une polarisation coordonnée des cellules endothéliales. Cette régulation par la voie Wnt/PCP est nécessaire pour la migration collective des cellules endothéliales (Carvalho et al., 2019). Une inhibition de ces mécanismes entraîne des défauts de structure vasculaire, notamment une diminution de la densité vasculaire. Des modèles de délétions endothéliales d'acteurs de la PCP comme PDZRN3 (Sewduth et al., 2014) présentent également une anomalie de la polarisation du réseau vasculaire de la rétine chez des modèles de mutants murins.

## II- Le rôle de la voie Wnt dans la vascularisation de plusieurs tissus

### a. Le rôle de la voie Wnt dans la vascularisation de la rétine

#### i. La voie canonique Wnt/ $\beta$ -caténine dans la vascularisation de la rétine

La délétion endothéliale de la  $\beta$ -caténine a un effet tout à fait délétère sur la vascularisation de la rétine. En effet, une diminution de la prolifération endothéliale est constatée ainsi qu'une baisse de la densité vasculaire et du nombre de tip cells (Martowicz et al., 2019). Ces données indiquent l'importance de la voie canonique dans le processus angiogénique et donc dans le développement du plexus rétinien. La difficulté réside dans l'identification des acteurs en amont de la  $\beta$ -caténine et qui induit son activité transcriptionnelle.

Au début du XXI<sup>ème</sup> siècle, des études ont démontré un lien génétique entre la voie Wnt et des pathologies vasculaires rétiniennes chez l'Homme (Q. Xu et al., 2004). Un des premiers gènes de la voie Wnt identifiés comme déficients dans les pathologies rétiniennes est le gène *Ndp* codant pour le ligand canonique Norrin. Les souris déficientes pour ce gène présentent des défauts majeurs au niveau du plexus avec un retard de vascularisation de la rétine, une perte de l'intégrité de la BHR et un important défaut de formation des plexus intermédiaires et profonds. De plus, la Norrin contrôle le recrutement des cellules murales. En effet, sa délétion entraîne un recrutement anormal de cellules musculaires lisses sur les capillaires et les veines. Un phénotype similaire est retrouvé chez les souris déficientes pour les gènes des récepteurs *Fzd4* et *Tspan12* (Lai et al., 2017; M. Richter et al., 1998; Y. Wang et al., 2012; Ye et al., 2009; Zuercher et al., 2012). Le phénotype des mutants murins pour *Lrp5* est également assez similaire à celui des mutants *Ndp* (Kato et al., 2002). Ces études démontrent l'importance de l'association de la Norrin avec le complexe de récepteurs/co-récepteurs FZD4/LRP5/TSPAN12. En aval de ce signal, la  $\beta$ -caténine contrôle la transcription des gènes *CLDN5* et *MFSD2A*, tous deux impliqués dans l'intégrité de la barrière hémato-rétinienne étant respectivement un gène de protéine de jonction et un gène d'un inhibiteur de PLVAP, un acteur de la transcytose (J. Chen et al., 2012; Junge et al., 2009; Z. Wang et al., 2020; Ye et al., 2009). Ces données de la littérature montrent un rôle important de la voie canonique dans le maintien des propriétés de barrière et dans l'angiogenèse. De plus, au niveau de la tip cell, la voie canonique induit l'expression de Sox17, ce qui promeut, en parallèle de la signalisation du

VEGF, l'expression de DLL4. La voie Wnt/ $\beta$ -caténine participe ainsi à la différenciation des cellules endothéliales en tip cell et au maintien du phénotype stalk cell des cellules voisines (Corada et al., 2013).

La voie Wnt est complexe et d'autres protéines peuvent se substituer à celles citées ci-dessus. Les travaux de notre laboratoire ont démontré que le récepteur FZD7 activait DVL et par conséquent la  $\beta$ -caténine pour contrôler l'angiogenèse rétinienne. Ainsi, la délétion endothéliale de *Fzd7* entraîne une diminution de la prolifération ainsi qu'une baisse de densité vasculaire. Enfin, une diminution du bourgeonnement au niveau des tip cells était également constatée. De manière intéressante, la signalisation DLL4/Notch était également déficiente chez les souris délétées pour *Fzd7* dans les cellules endothéliales. Ces données démontrent donc une connexion entre ces deux voies au niveau des tip cells : la voie Wnt/ $\beta$ -caténine induit la voie Notch (Peghaire et al., 2016).

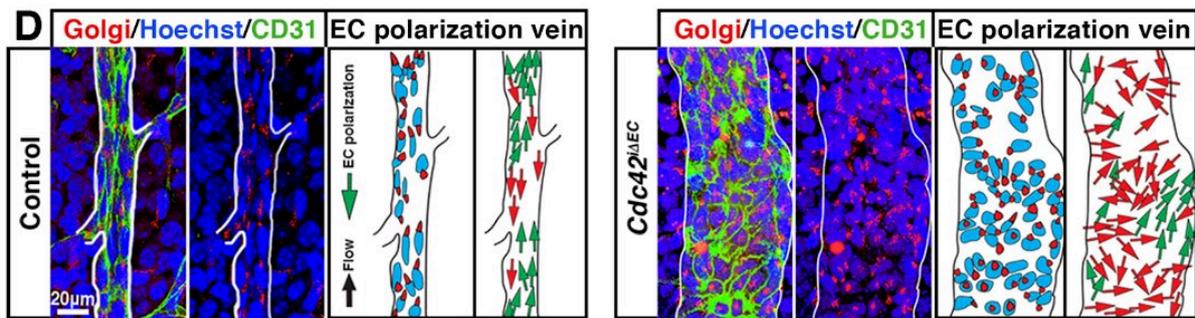
Enfin, la voie Wnt est impliquée dans les mécanismes d'involution du réseau hyaloïde. Plusieurs ligands non-canoniques ont en effet été décrits comme activateurs de ce processus. La délétion du ligand Norrin se caractérise par une persistance du réseau hyaloïde à un âge où il aurait dû disparaître (Kato et al., 2002). Le ligand canonique Wnt7b est sécrété par les macrophages afin d'induire également cette involution en activant l'apoptose dans les cellules endothéliales du hyaloïde (Lobov et al., 2005).

## *ii. La voie non-canonique Wnt/PCP dans la vascularisation de la rétine*

Dans le paragraphe précédent, nous avons vu que la voie canonique était impliquée dans l'angiogenèse et le bourgeonnement au niveau des tip cells. Nous allons voir dans ce paragraphe que la voie Wnt/PCP est plutôt impliquée dans les mécanismes structurant le plexus vasculaire.

Tout d'abord, la voie non-canonique dirige la réponse des cellules endothéliales au flux et permet de maintenir le niveau de régression vasculaire à la normale. En effet, comme décrit plus haut, la délétion de facteurs Wnt non-canoniques (Wnt5a et Wnt11) augmente le phénomène de régression vasculaire résultant en un plexus plus lâche (Franco et al., 2016). Ce phénotype est mimé par la délétion endothéliale de la protéine EVI impliquée dans la sécrétion des facteurs non-canoniques (Korn et al., 2014).

La voie non-canonique est également impliquée dans la polarité des cellules endothéliales. L'ubiquitine ligase non-canonique PDZRN3 gouverne la migration directionnelle des cellules endothéliales via leur polarité. Sa délétion dans les vaisseaux entraîne donc des défauts de structure du plexus (Sewduth et al., 2014). Le système des petites GTPases est également essentiel pour maintenir la polarité des cellules endothéliales. Une délétion de CDC42 entraîne des défauts majeurs de polarité dans les veines. Les cellules endothéliales veineuses étant désorientées, elles ne sont plus capables de migrer vers les artères. Il y a donc une accumulation de cellules endothéliales dans les veines qui deviennent très épaisses et sécrètent un taux anormal de Collagène IV (Laviña et al., 2018). Pour finir, la polarité des tip cells joue un rôle clef dans leur migration directionnelle. Il a été démontré que l'axe Wnt5a/ROR2 contrôlait cette polarité (Carvalho et al., 2019). C'est également le cas de la petite GTPase CDC42 qui est également nécessaire dans la formation des filopodes (Laviña et al., 2018).



**Figure 36: La délétion endothéliale de CDC42 entraîne un défaut majeur de polarité endothéliale**

Immunofluorescence au niveau de rétine murine à P6. On peut constater une accumulation anormale de cellules endothéliales dans la veine des souris  $Cdc42^{\Delta EC}$  due à un défaut majeur de leur polarité (adapté de Laviña et al., 2018).

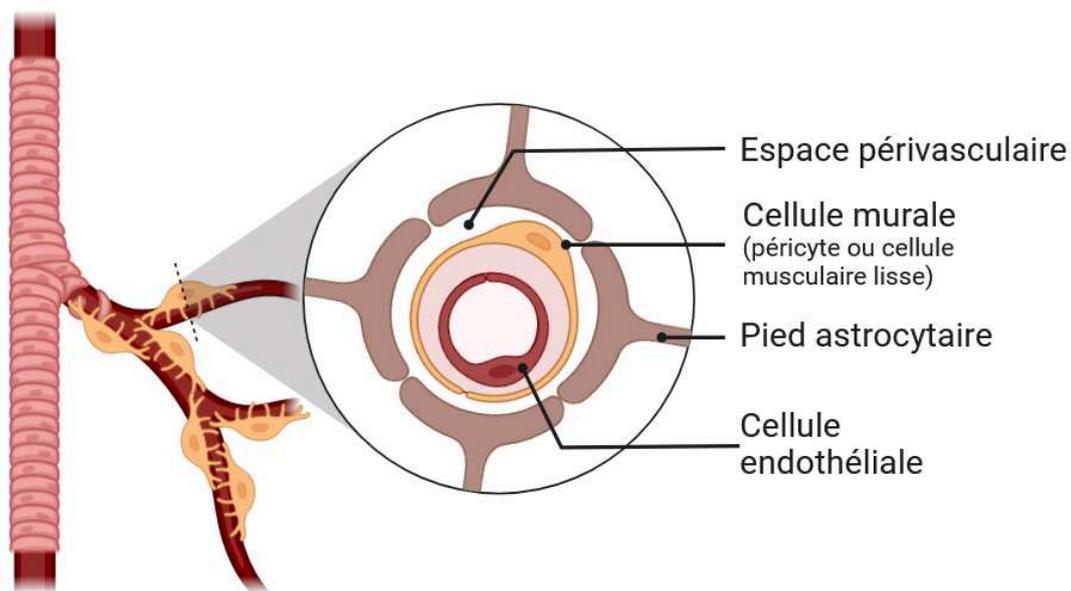
## b. Le rôle de la voie Wnt dans la vascularisation de la barrière hémato-encéphalique

### i. Présentation de la barrière hémato-encéphalique

La BHE est un autre exemple de plexus vasculaire dont le développement est en partie dirigé par la voie Wnt. Elle forme une interface entre le sang et le parenchyme cérébral. Elle pourrait être assimilée à une douane, contrôlant et sélectionnant tout constituant la traversant afin de protéger les fonctions neurologiques et synaptiques du cerveau (Bundgaard & Abbott, 2008; Zhao et al., 2015). En effet, les dysfonctions de la BHE sont maintenant reconnues

comme des facteurs aggravant ou accélérant la survenue de maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer ou le déclin cognitif lié au vieillissement (Iturria-Medina et al., 2016; Sweeney et al., 2019).

La BHE se compose d'un ensemble de types cellulaires dont la communication et les interactions permettent de remplir ses fonctions de protection. Tout d'abord, les cellules endothéliales de la BHE sont uniques dans l'organisme de par leurs fonctions spécifiques. La BHE est en effet composée d'un endothélium jointif non fenestré dont les cellules expriment un fort taux de protéines de jonction, notamment les jonctions serrées (Claudine 5, Occludine) (Huber et al., 2001; Wolburg & Lippoldt, 2002). De plus, elles expriment un grand nombre de transporteurs spécifiques, présentent un faible taux de transcytose et une faible expression de molécules d'adhésion leucocytaire assurant ainsi un contrôle strict des molécules et cellules passant du sang vers le parenchyme. Des études démontrent, d'ailleurs, une hausse du taux de transcytose au cours du vieillissement, participant ainsi au déclin cognitif (Andreone et al., 2017; Ben-Zvi et al., 2014; Yang et al., 2020).



**Figure 37: Schéma de la structure de la barrière hémato-encéphalique**

La BHE se compose ensuite de cellules murales : les cellules musculaires lisses au niveau des artères et de certaines veines pénétrantes et les péricytes au niveau des capillaires. Cette gaine de cellules murales est impliquée dans la régulation du flux sanguin et renforce la structure de la barrière et une perte de ces dernières est également associée à la pathogenèse de maladies neurodégénératives (Sengillo et al., 2013). Tout comme les cellules endothéliales,

les cellules murales sécrètent de la matrice extra-cellulaire. Des défauts de sécrétion de cette matrice sont également associés aux maladies neurodégénératives (Nirwane et al., 2024).

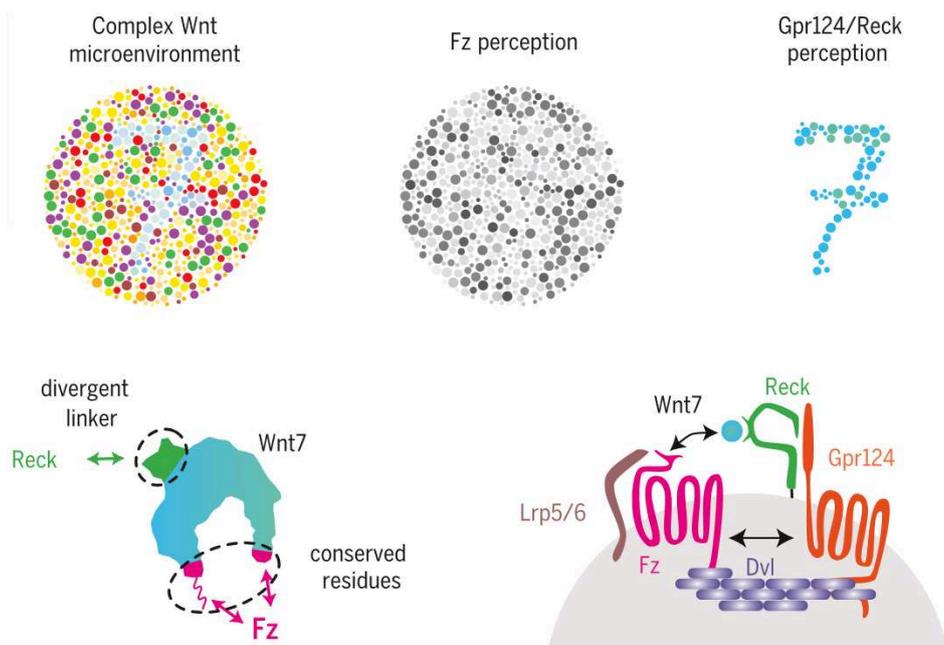
Enfin, les astrocytes projettent leurs pieds jusqu'aux vaisseaux. Ces derniers forment également une barrière appelée la *glia limitans* (Verkhatsky & Pivoriūnas, 2023). Ils interagissent avec les autres types cellulaires de la barrière afin d'en réguler les fonctions (Cheslow & Alvarez, 2016; Mishra et al., 2016). Ils sécrètent notamment des facteurs Wnt stimulant les propriétés de barrière des cellules endothéliales de la BHE (Guérit et al., 2021).

ii. *La voie Wnt/ $\beta$ -caténine maintient les propriétés de barrière de la BHE*

La voie canonique Wnt joue un rôle clef lors du développement post-natal de la BHE. Des modèles murins de rapporteur de l'activité de la voie canonique ont démontré une forte activité embryonnaire alors qu'au stade post-natal celle-ci s'effondre. La délétion spécifique du gène *Ctnnb1* codant pour la  $\beta$ -caténine dans la cellule endothéliale entraîne une mort embryonnaire due à des hémorragies cérébrales (Daneman et al., 2009). Lorsque sa délétion est induite après la naissance, des défauts angiogéniques sont identifiés dans le cervelet et les cibles de la  $\beta$ -caténine sont moins exprimées dans des extraits de cerveau totaux. Enfin, une disruption de la barrière est observée (Martowicz et al., 2019). La voie canonique est donc primordiale dans le maintien de l'intégrité de la BHE. Celle-ci est activée par l'interaction de ligands Wnt7a/7b avec le récepteur FZD4 (Liebner et al., 2008; Y. Wang et al., 2018) et les co-récepteurs LRP6 (Zhou et al., 2014), RECK et GPR124 (Cho et al., 2017). Plus précisément, RECK servirait de « décodeur » du signal Wnt7 et GPR124 induirait l'interaction de FZD4, notamment en participant au recrutement intracytoplasmique de DVL, qui sans ces deux co-récepteurs, ne pourrait se lier avec les ligands Wnt7 (Eubelen et al., 2018; Vallon et al., 2018).

Le ligand Norrin peut se substituer à Wnt7a/7b et également activer la voie Wnt/ $\beta$ -caténine au niveau de la BHE en interagissant avec le co-récepteur TSPAN12 (Junge et al., 2009; Zhou et al., 2014). Cependant, toute la complexité de l'analyse de cette voie réside dans la redondance et les compensations entre ligands et récepteurs. Il a été observé que la délétion seule des ligands canoniques Wnt7a ou Norrin entraînait moins d'effets délétères sur l'intégrité de la BHE que lorsqu'ils étaient simultanément délétés. La perméabilité est en effet grandement altérée chez les souris doublement délétées pour ces gènes dans la cellule endothéliale comme le montre l'extravasation de la NHS-biotine et l'augmentation de l'expression de PLVAP. De la même manière, la délétion du récepteur FZD4 potentialise l'effet

de la délétion de Wnt7a et la délétion du récepteurs TSPAN12 potentialise l'effet de la délétion de Norrin (Y. Wang et al., 2018). Récemment, l'axe Netrin-1/UNC5B a également été identifié comme activateur de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, induisant l'expression des gènes cibles de la  $\beta$ -caténine, et assurant l'intégrité de la BHE. Un anticorps bloquant la liaison de Netrin-1 au récepteur UNC5B entraînerait une disruption de la barrière. Les auteurs de l'étude envisagent une utilisation thérapeutique de cet anticorps pour faciliter le passage de médicaments à travers la barrière (Boyé et al., 2022).



**Figure 38: Schéma des rôles des différents récepteurs et co-récepteurs dans la réponse au signal Wnt7**

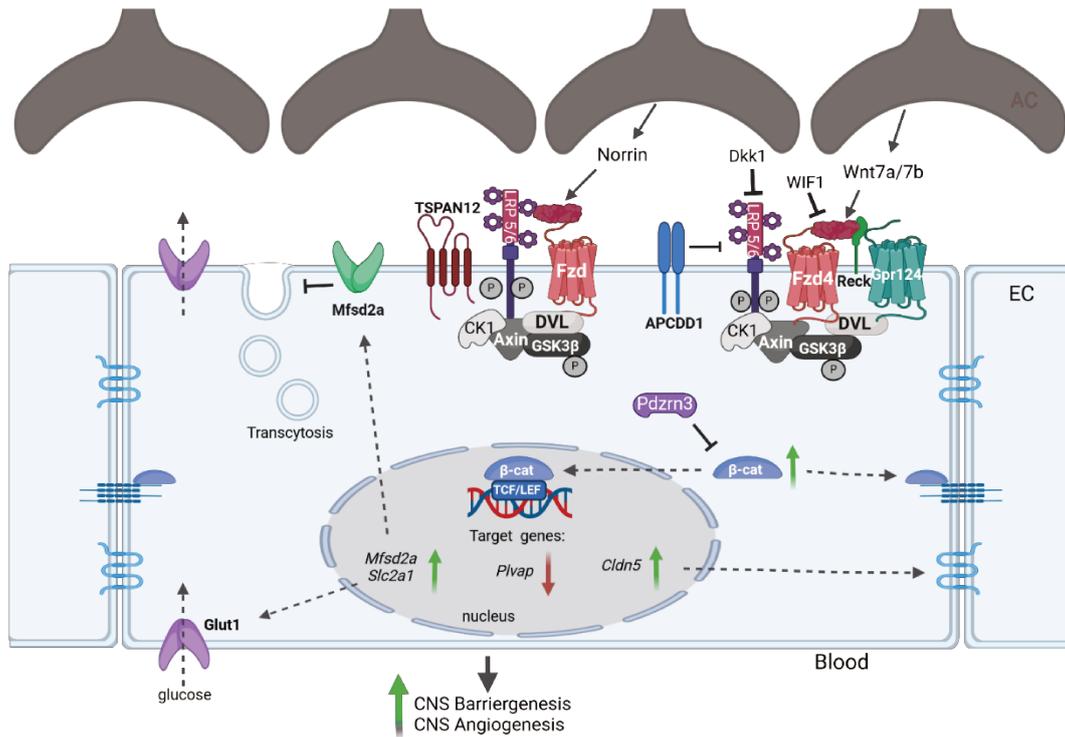
Chacun des récepteurs joue un rôle qui permet in fine le recrutement de DVL pour l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine (adapté de Eubelen et al. 2018).

La voie Wnt/ $\beta$ -caténine est également impliquée dans la différenciation des cellules endothéliales en cellules spécialisées de barrière. Son activation induit l'expression de gènes conférant des propriétés d'imperméabilité à l'endothélium comme *CLDN5* ou *Slc2a1* (GLUT-1) ou encore des gènes de matrice extracellulaire. Au contraire, l'activation de la voie induit l'expression de MFSD2A, un inhibiteur du marqueur de transcytose PLVAP (Daneman et al., 2009; Jensen et al., 2019; Liebner et al., 2008; Z. Wang et al., 2020; Zhou et al., 2014). Une étude récente démontre le rôle de la signalisation endothéliale Wnt- $\beta$ -caténine dans le contrôle de l'angiogenèse cérébrale en utilisant des modèles transgéniques de poisson zèbre. La signalisation Wnt, via Wnt7A/B, permettrait l'acquisition par les cellules endothéliales d'un phénotype angiogénique organotypique. Les auteurs montrent que l'activation de la voie de

signalisation Wnt induit l'expression d'une métalloprotéinase matricielle, MMP25 dans les cellules endothéliales du cerveau dites Tip Cells. MMP25 clive les chaînes  $\alpha 5/6$  du collagène IV sécrété par des fibroblastes méningés et permettrait ainsi l'invasion des vaisseaux dans le cerveau (Schevenels et al., 2024). Enfin, il a été rapporté que les cellules endothéliales de barrière cultivées en laboratoire finissent par se différencier, notamment à cause d'une perte de l'activité de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine due à un repliement de la chromatine au niveau de certains gènes clefs comme *MFSD2A*. De manière intéressante, une stabilisation de la  $\beta$ -caténine ne permet pas de restaurer un phénotype de barrière dans ces cellules en culture, suggérant que d'autres voies sont nécessaires pour induire de telles propriétés (Sabbagh & Nathans, 2020).

Si l'implication de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine endothéliale est plutôt claire au stade post-natal, son rôle dans le maintien de l'homéostasie ou dans la pathogenèse de maladies neuro-dégénératives, notamment, chez l'individu adulte, reste assez flou. Plusieurs équipes ont rapporté une activation de cette voie au niveau de la vascularisation cérébrale de l'adulte (Zhou et al., 2014). De plus elle serait toujours nécessaire pour maintenir son intégrité. En effet, une délétion endothéliale de la  $\beta$ -caténine chez la souris adulte entraîne la présence de pétéchies dans le parenchyme, une perte de l'intégrité des jonctions ainsi qu'une augmentation de l'inflammation (Tran et al., 2016). De plus, l'inhibition de la sécrétion de facteurs Wnt par les astrocytes chez la souris, par la délétion de la protéine Wntless ou GPR177, provoque des œdèmes et une augmentation de l'extravasation de traceurs fluorescents (Guérit et al., 2021).

Enfin, comme décrit plus tôt, de nombreux inhibiteurs sont sécrétés pour empêcher l'interaction entre les ligands Wnt et les récepteurs. Cependant, la régulation de la voie Wnt par ses inhibiteurs n'est que très peu caractérisée dans la vascularisation du système nerveux central. Le régulateur négatif de la voie Wnt APCDD1 (APC Down-regulated 1) est effectivement très exprimé dans la vascularisation du cortex comparé à celle d'autres organes comme le foie (Daneman et al., 2009). Les inhibiteurs WIF-1 et DKK1 (Dickkopf 1) ont été eux décrits comme des perturbateurs du phénotype de barrière dans un type de médulloblastome. Ces tumeurs seraient alors plus sensibles à la chimiothérapie, la disruption de la barrière facilitant le passage des médicaments du sang vers la tumeur (Phoenix et al., 2016). Cependant, aucune donnée ne décrit comment ces inhibiteurs régulent le développement et l'angiogenèse de la BHE via la voie Wnt/ $\beta$ -caténine.



**Figure 39: La voie Wnt dans l'endothélium de la barrière hémato-encéphalique**

(adapté de Bats et al., 2023).

### iii. La voie Wnt/PCP : l'oubliée de la barrière hémato-encéphalique

Contrairement à la voie canonique, la voie non-canonique Wnt est très peu décrite dans le développement de la BHE. Il a été démontré que Wnt-5a par exemple ne participait pas au maintien des propriétés de barrière (Liebner et al., 2008).

Ce manque de données à propos de la voie canonique est dû à une difficulté d'étudier les fonctions endothéliales qui lui sont propres dans le cerveau. En effet, le réseau 2D de la rétine facilite l'étude de la migration et de la polarité et la littérature a bien caractérisé le rôle de la voie Wnt/PCP dans ces mécanismes. Mais à cause de la structure 3D du réseau vasculaire cérébral, déterminer le sens du flux et identifier un front de migration au niveau de cette vascularisation reste encore très difficile aujourd'hui.

Cependant, notre équipe a montré le rôle de PDZRN3 dans le maintien de l'intégrité de la BHE en utilisant des mutants génétiques murins. Une surexpression endothéliale de PDZRN3 entraîne la mort des embryons par hémorragie cérébrale (Sewduth et al., 2017). Au contraire, la délétion endothéliale de PDZRN3 diminue la rupture de la BHE post-ischémique (Sewduth et al., 2017). De plus, PDZRN3 augmentant la perméabilité de la BHE, sa surexpression accélère la survenue du déclin cognitif chez la souris. Enfin, sa délétion dans la cellule endothéliale

atténue la pathogenèse d'Alzheimer notamment en renforçant les jonctions serrées. Ces travaux démontrent que PDZRN3, et par extension la voie Wnt non-canonique, exerce bien un rôle répressif sur la voie Wnt-canonique dans la vascularisation cérébrale (Gueniot et al., 2022).

### III- Dérégulation de la voie Wnt dans les pathologies vasculaires

#### a. Les dérégulations de la voie Wnt dans les pathologies vasculaires ophtalmiques

Très vite étudiée dans la rétine, la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, et notamment ses dérégulations ont été associées à la pathogenèse de maladies vasculaires dans la rétine. Nous en avons parlé plus haut, la maladie de Norrie est un syndrome congénital rare associé à une cécité dès la naissance. La délétion du gène *Ndp* codant pour le ligand canonique Norrin est en grande partie responsable des symptômes de cette maladie dus à une persistance du hyaloïde et une baisse de l'angiogenèse rétinienne (Berger et al., 1992).

Mais la maladie de Norrie n'est pas le seul exemple de maladies ophtalmiques souffrant de dérégulation de la voie Wnt. C'est également le cas de la vitréorétinopathie exsudative familiale, la maladie de Coats ou encore des rétinopathies ischémiques ou induites par l'oxygène. Toutes sont caractérisées par des mutations au niveau de gènes d'acteurs de la voie Wnt (*NDP*, *LRP5*, *TSPAN12*, *FZD4*) voire au niveau de gènes cibles de la  $\beta$ -caténine (*DLG1*, *JAG1*, etc). Une suractivation de la voie canonique conduit à une angiogenèse pathologique alors qu'une inhibition provoque des défauts majeurs de vascularisation et est généralement associée à de la cécité (Bats et al., 2022).

#### b. De la démence aux hémorragies cérébrales : les dérégulations de la voie Wnt dans un contexte pathologique dans le cerveau

La voie Wnt/ $\beta$ -caténine étant impliquée dans le maintien des propriétés de barrière, c'est tout naturellement que plusieurs équipes se sont intéressées à l'impact de ces dérégulations dans la perte de la cognition et *a fortiori* dans les maladies neurodégénératives. Par exemple, l'inhibition de la voie Wnt, favorisant l'infiltration de cellules immunitaires, est associée à l'apparition de la sclérose en plaque (Lengfeld et al., 2017).

Un certain nombre d'études démontrent également le lien entre perturbation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine et la maladie d'Alzheimer (L. Liu et al., 2014), notamment car cela réduirait les niveaux de glycoprotéine-p, le transporteur impliqué dans la clairance de la  $\beta$ -

amyloïde (J. C. Lim et al., 2008). Les cellules endothéliales de BHE chez des patients ou des modèles murins d'Alzheimer perdent également leurs propriétés de barrière avec une réduction de l'expression de gènes cibles de la  $\beta$ -caténine comme *SLC2A1* (Mooradian et al., 1997) et *CLDN5* (Zhu et al., 2022). Une étude récente démontre d'ailleurs qu'une réactivation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine en stimulant l'activation du co-récepteur LRP5/6 dans la cellule endothéliale restaurerait partiellement les fonctions de barrière dans un modèle murin d'Alzheimer (Q. Wang et al., 2022). Au contraire, il semblerait que la voie Wnt/PCP, et notamment PDZRN3, accélère la survenue du déclin cognitif (Gueniot et al., 2022).

Le syndrome d'Huntington, une autre maladie neurodégénérative, serait également liée à la voie Wnt/ $\beta$ -caténine. En effet, l'étude de cellules souches pluripotentes induites en cellules endothéliales de barrière issues de patients atteints de cette maladie présentent des défauts angiogéniques et de barrière (R. G. Lim et al., 2017).

Outre les maladies neurodégénératives, des études récentes ont démontré un effet protecteur de FDZ7 sur la BHE à la suite d'une hémorragie cérébrale. Son activation par le ligand WISP1 restaure partiellement les fonctions de barrière, permettant de préserver les fonctions neurologiques. En effet, l'activation de FDZ7 post-hémorragie induit la diminution de la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine - et donc sa dégradation - et l'expression des protéines de jonction VE-Cadhérine, ZO-1 et Claudine 5 (He et al., 2021). Au contraire, comme précisé un peu plus haut, notre équipe a démontré que l'activation de la voie Wnt/PCP aggravait la disruption de la barrière post-ischémie (Sewduth et al., 2017).

### c. La voie Wnt dans les cellules endothéliales tumorales

La voie Wnt/ $\beta$ -caténine étant pro-angiogénique, c'est tout naturellement que de nombreuses études la retrouvent suractivée au niveau des tumeurs solides afin de promouvoir l'angiogenèse tumorale. Celle-ci est critique dans l'apport de nutriments répondant aux besoins métaboliques gargantuesques des tumeurs mais également pour la propagation des métastases. Elle fait d'ailleurs partie des six propriétés biologiques nécessaires à la survie d'une tumeur solide (Hanahan & Weinberg, 2011).

La voie Wnt/ $\beta$ -caténine est associée à la production, par les cellules cancéreuses, d'un grand nombre de facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGFA, les métalloprotéinases et eNOS (Vaish & Sanyal, 2012). De plus, des études ont noté une suractivation de cette voie dans les cellules endothéliales de vaisseaux tumoraux notamment dans le glioblastome

(Manoranjan & Provias, 2022). Tout naturellement, des essais cliniques ont débuté pour des thérapies anti-angiogéniques ciblant notamment la voie Wnt. Malheureusement, celles-ci se sont avérées peu fructueuses, la survie des patients ne s'améliorant pas significativement (Viallard & Larrivée, 2017). En effet, sans vaisseaux, pas de médicaments acheminés vers la tumeur. Le problème a donc été pris à l'envers. En effet, les vaisseaux sanguins tumoraux sont anormaux. Ils sont hétérogènes dans leur structure (parfois denses, parfois peu denses), tortueux et donc mal perfusés et perméables, ne facilitant pas l'acheminement des médicaments vers la tumeur (Baish et al., 2011). L'idée est donc de normaliser ces vaisseaux afin de maximiser l'accès de la tumeur aux agents thérapeutiques (Goel et al., 2012).

Une des possibilités des thérapies de normalisation est donc de restaurer les propriétés de barrière des vaisseaux via la voie Wnt. Une étude a par exemple démontré dans un modèle murin de gliome que restaurer l'activité de la  $\beta$ -caténine augmentait les niveaux de DLL4, induisant ainsi la voie Notch et une diminution du nombre de tip cells. De plus, l'induction de l'expression de *Pdgfrb* via la  $\beta$ -caténine dans la cellule endothéliale augmentait le recrutement des péricytes au niveau de la BHE. Les vaisseaux retournaient de nouveau dans un état de quiescence et proliféraient moins, réduisant ainsi l'angiogenèse tumorale (Reis et al., 2012).

Sac-1004 est une molécule capable d'augmenter la perfusion des vaisseaux et de diminuer la perméabilité en agissant sur les jonctions adhérentes de VE-Cadhérine et en activant le système des petites GTPases. Une étude récente démontre qu'associée au Sunitinib, un anticorps dirigé contre le VEGF, Sac-1004 représentait une stratégie prometteuse dans la guérison de tumeurs solides (K. Lee et al., 2014). Ces données montrent une importance de la voie Wnt/PCP dans la normalisation vasculaire.

#### d. Conclusion sur le potentiel thérapeutique de la voie Wnt

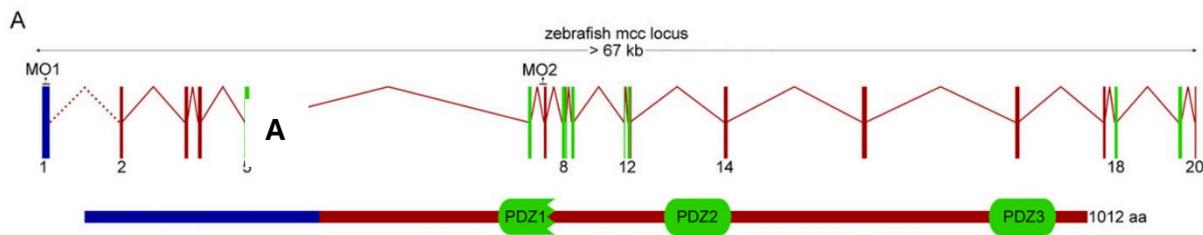
Ainsi, la voie Wnt semble être un élément clef à cibler au cours de thérapies afin d'atténuer et de guérir les symptômes de maladies vasculaires, notamment dans l'œil et le cerveau. Un certain nombre d'études ont démontré le potentiel d'agents thérapeutiques tentant de restaurer cette voie dans la cellule endothéliale dans un contexte pathologique (Bats et al., 2022). La voie Wnt est également prometteuse dans les thérapies de normalisation vasculaire dans le cadre du cancer étant donné son rôle dans le maintien des propriétés de barrière et dans l'organisation polaire des cellules.

## Chapitre 3 : Mutated in Colorectal Cancer Protein (MCC) : un nouvel acteur de la voie Wnt/PCP

L'identification de nouveaux partenaires de la voie Wnt/PCP dans la cellule endothéliale est cruciale pour mieux comprendre la structuration des réseaux vasculaires. La protéine Mutated in Colorectal Cancer (MCC) a été identifiée comme liée à la fois à la voie Wnt/ $\beta$ -caténine et à la voie Wnt/PCP. Son rôle dans ces voies a été majoritairement décrit dans la cellule épithéliale et aucune donnée dans la littérature n'est actuellement disponible concernant MCC dans la cellule endothéliale. Cependant, au vu des données de la littérature, MCC pourrait bien être un partenaire nouveau et intéressant à étudier dans la voie Wnt endothéliale.

### I- Présentation générale de la protéine MCC

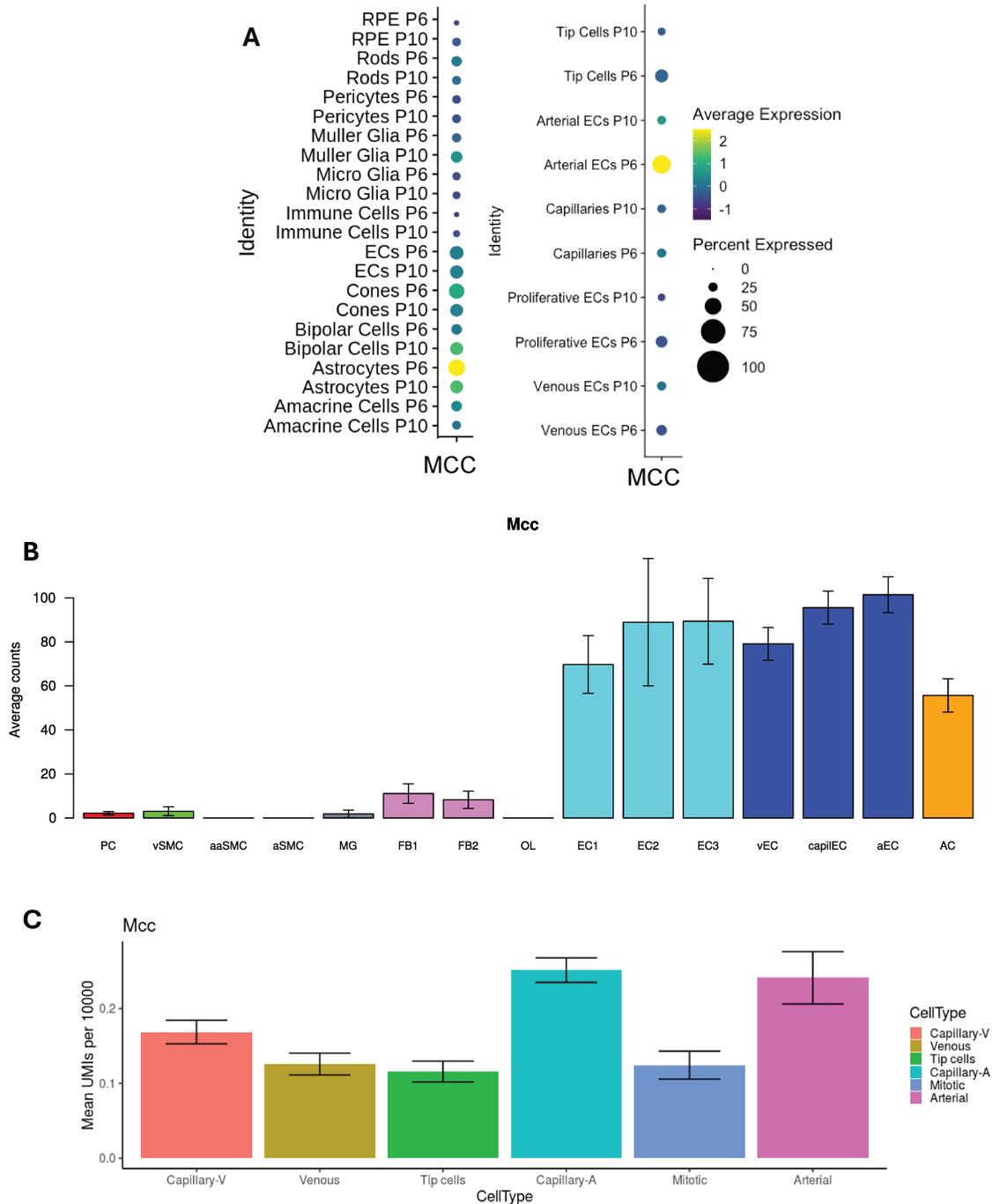
Le gène *MCC* code pour une protéine de 829 acides aminés et d'un poids de 100 KDa. Elle est formée de trois domaines PDZ impliqués dans les interactions protéiques.



**Figure 40: Schéma du locus *mcc* chez le poisson zèbre**

Le gène est hautement conservé entre le poisson, l'Homme et la souris, tout particulièrement au niveau des domaines PDZ (adapté de Young et al. 2014).

Ce gène est hautement conservé chez de nombreuses espèces, dont l'Homme et la souris. Cependant, elle ne présente que de très faibles homologies de séquence avec d'autres protéines connues (Kinzler et al., 1991). Une étude a répertorié les différents tissus où MCC était exprimé. Des niveaux d'expression élevés ont été retrouvés dans les microvillosités des cellules rénales, pancréatiques, hépatiques et intestinales. MCC est également exprimé dans le cerveau et plus précisément dans le cortex, le cervelet et le plexus choroïde. Cependant, il n'est pas exprimé dans les tissus cardiaque et osseux (Senda et al., 1999). En utilisant des bases de données de séquençage ARN (Acide ribonucléique) en cellule unique (Sabbagh et al., 2018; Vanlandewijck et al., 2018; Zarkada et al., 2021), nous avons découvert que dans plusieurs organes, MCC était hautement exprimé dans les cellules endothéliales.



**Figure 41: Profil d'expression de Mcc dans différents tissus murins et à différents âges**

a. Diagramme à points des niveaux d'expression de Mcc dans différents clusters cellulaires et de types de cellules endothéliales chez la souris à P6 et P10.

b. Niveau d'expression de Mcc dans la barrière hémato-encéphalique de la souris adulte. Base de données utilisée : <http://betsholtzlab.org/VascularSingleCells/database.html>.

c. Niveau d'expression de Mcc dans différents clusters de cellules endothéliales isolées de cerveau de souris à P7. Base de données utilisée : <https://markfsabbagh.shinyapps.io/vectrdb/>.

MCC est décrit comme une protéine impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, bloquant le passage de la phase G1 à la phase S dans des cellules NIH3T3. Plus précisément,

l'expression de MCC au cours des différentes phases de cycle cellulaire reste constante. Cependant, MCC est hyperphosphorylé au cours de la transition G1/S. Bien que les auteurs n'explorent pas davantage cette question de phosphorylation, ils démontrent cependant que la surexpression de MCC dans les NIH3T3 bloque les cellules en phase G1 (Matsumine et al., 1996). Une étude plus tardive lie la phosphorylation de MCC sur la Ser118 et la Ser120 par la PI3K aux mécanismes de réparation de l'ADN (Pangon et al., 2010). Cette étude permet d'envisager le rôle de MCC comme un suppresseur de tumeur. C'est ce que plusieurs études ont démontré, notamment sur le rôle de MCC dans la régulation de la voie NFκB. En effet, l'induction de l'expression de MCC dans des cellules du cancer colorectal réduit l'activité de la voie NFκB, et ce même sous un stimulus LPS ou TGFα (Sigglekow et al., 2012).

## II- MCC : un suppresseur de tumeur réprimant la voie Wnt/β-caténine

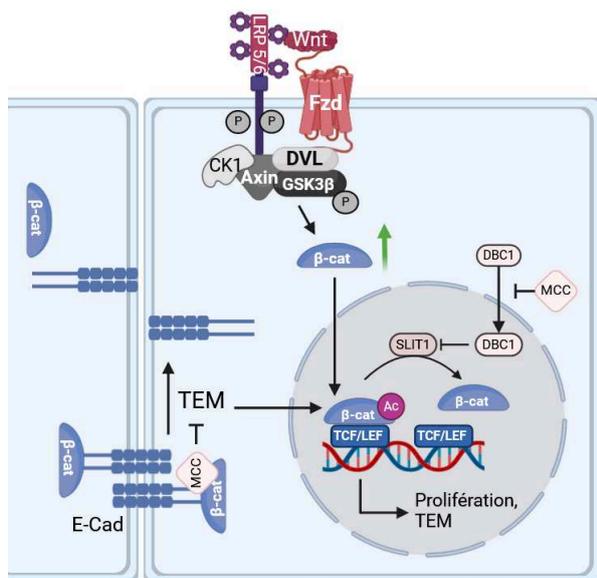
### a. Mécanisme d'inhibition de la β-caténine par MCC

L'expression du gène *MCC* se retrouve fréquemment réprimée dans plusieurs carcinomes, notamment le cancer colorectal. Le gène *MCC* est localisé dans la région chromosomique 5q21, région fréquemment mutée dans la Polypose Adénomateuse Familiale (FAP). Mais contrairement à ce que son nom laisse penser, *MCC* est assez peu fréquemment muté puisque une mutation n'est constatée que dans 6 à 8% des cancers chez l'humain (Cancer Genome Atlas Network, 2012; Nishisho et al., 1991). Des études plus poussées ont montré que le gène muté dans la région 5q21 chez les patients atteints de polypose adénomateuse familiale (FAP) n'était pas *MCC* mais *APC*, codant pour une des protéines du complexe de dégradation de la β-caténine (Nishisho et al., 1991). Cependant, le promoteur contrôlant l'expression de *MCC* est lui fréquemment méthylé avec près de 80% de patients atteints de polypes festonnés et 50% des patients atteints de cancers colorectaux sporadiques concernés (Fukuyama et al., 2008; Kohonen-Corish et al., 2007). Ces observations suggèrent un rôle important de MCC dans la prévention de la survenue de cancers colorectaux.

De manière intéressante, MCC a été découvert comme inhibiteur de la β-caténine capable de réprimer son activité transcriptionnelle. L'expression de MCC empêche la liaison de la β-caténine avec le complexe transcriptionnel TCF/LEF. De plus, MCC bloque la prolifération des cellules de cancer colorectal induite par Wnt3a (Fukuyama et al., 2008). Une autre étude démontre que dans plusieurs types d'hépatocarcinomes, le miARN-494 est surexprimé. Celui-

ci cible la région 3'UTR du transcrit *MCC* et réprime son expression, levant l'inhibition de MCC sur la  $\beta$ -caténine et augmentant la prolifération des cellules cancéreuses (L. Lim et al., 2014). De manière similaire, la répression de son expression dans le cancer du sein est associée à une augmentation de la  $\beta$ -caténine nucléaire, augmentant notamment l'expression de ses gènes cibles tels que *CCND1*, un gène de prolifération. Dans un modèle de cellules mammaires cancéreuses, un traitement à la 5-Aza-2'deoxyctidine, un inhibiteur de la méthylation de l'ADN, diminue l'expression des gènes ciblés par la  $\beta$ -caténine (Mukherjee et al., 2016).

Une étude a démontré précisément le mécanisme d'action de MCC sur la  $\beta$ -caténine dans un modèle de lignée de carcinome colorectal. SIRT1 est une désacétylase agissant sur les histones et sur certains facteurs de transcription comme la  $\beta$ -caténine pour réprimer leur rôle transcriptionnel. La protéine DBC1 est capable de transloquer dans le noyau afin de réprimer l'activité de SIRT1 (Srisuttee et al., 2012). Il a par la suite été démontré que MCC séquestre DBC1 dans le cytoplasme, l'empêchant d'inhiber SIRT1 (Pangon et al., 2015). Une autre étude démontre que, dans des lignées de cellules de carcinome colorectal, MCC se lie à la E-cadhérine et à la  $\beta$ -caténine pour consolider les jonctions adhérentes et empêcher la transition épithéliale mésenchymateuse (Benthani et al., 2018). Cette étude semble se confirmer lorsque l'on constate que la méthylation du promoteur de *MCC* est associée avec une propagation des cellules tumorales aux ganglions lymphatiques chez les patients atteints d'un cancer colorectal (Kohonen-Corish et al., 2007). Ainsi, MCC empêche les cellules tumorales de devenir métastatiques via la transition épithéliale-mésenchymateuse.



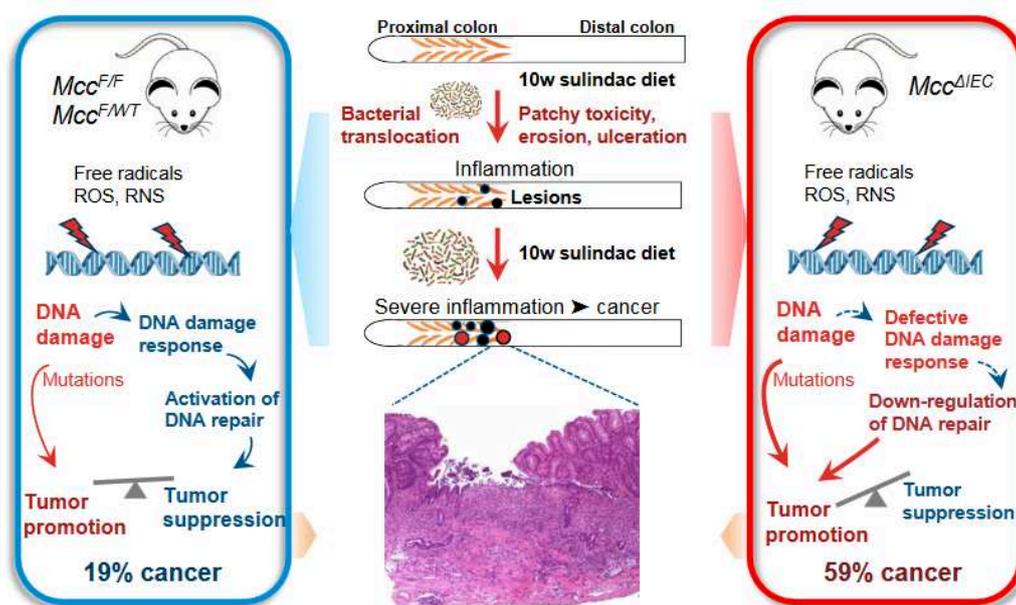
**Figure 42: Résumé du mécanisme d'inhibition de l'activité transcriptionnelle de la  $\beta$ -Caténine par MCC dans le carcinome colorectal**

*MCC séquestre à la fois la  $\beta$ -caténine au niveau des jonctions, empêchant la transition épithéliale mésenchymateuse et DBC1 dans le cytoplasme, l'empêchant de réprimer la désacétylase SLIT1 qui réprime l'activité transcriptionnelle de la  $\beta$ -caténine.*

**b. Effet de la délétion épithéliale de *Mcc* dans un modèle murin de cancer colorectal**

L'équipe du Dr Kohonen-Corish a mis au point un modèle murin de délétion épithéliale de *Mcc* qui est à ce jour le seul modèle murin concernant *Mcc*. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'impact de la délétion de *Mcc* dans les cellules épithéliales du colon dans la dégénération de microlésions ou de cellules pré-tumorales du colon.

Les auteurs induisent des lésions du colon avec du Sulindac et comparent le transcriptome des souris *Mcc<sup>f/f</sup>* et des souris *Mcc<sup>ΔIEC</sup>*. Ils observent une augmentation de l'expression de gènes de l'inflammation tels que des gènes d'interleukines, des récepteurs leucocytaires et de dégradation de la matrice. Au contraire, les mécanismes de réparation de l'ADN sont dérégulés. De manière étonnante, les gènes de la  $\beta$ -caténine sont bien induits par le traitement au Sulindac mais ils n'augmentent pas davantage avec la délétion de *Mcc*. Cette étude met en évidence un autre rôle suppresseur de tumeur de MCC indépendant de la régulation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine. En effet, des immunohistochimies réalisées sur des coupes de colon de souris révèlent que, chez les souris *Mcc<sup>f/f</sup>* comme *Mcc<sup>ΔIEC</sup>*, la  $\beta$ -caténine est toujours fortement associée à la E-cadhérine au niveau des jonctions (Currey et al., 2019).



**Figure 43: Proposition d'un rôle de MCC indépendant de la régulation de la  $\beta$ -caténine dans la protection contre le cancer colorectal**

(adapté de Currey et al., 2019).

### III- MCC : un nouvel acteur de la polarité et de la voie Wnt/PCP

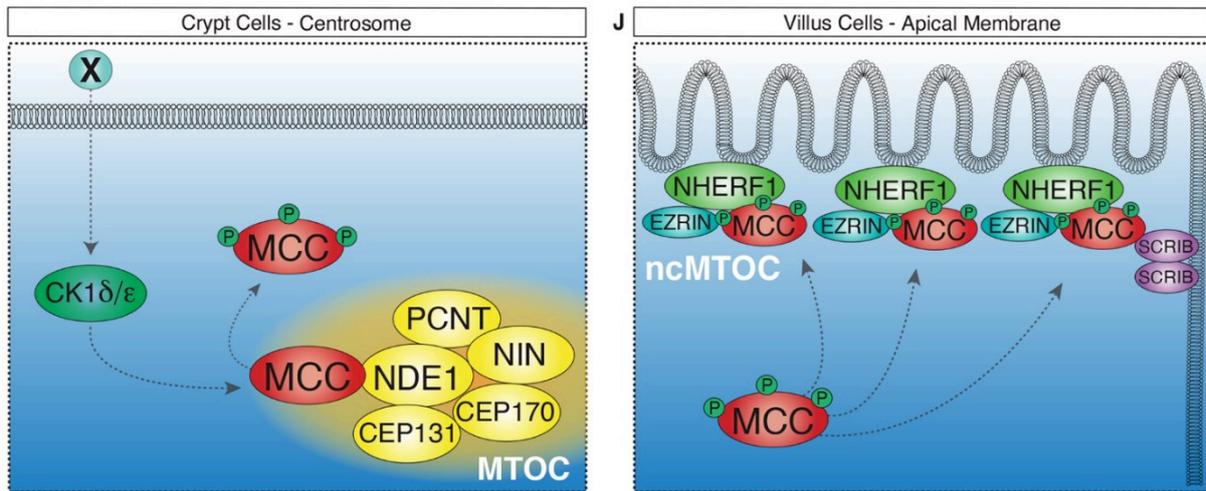
#### a. MCC interagit avec SCRIB dans le cadre de la polarité apico-basale et de la migration

Indépendamment de son rôle de régulateur du cycle cellulaire, MCC a été décrit comme partenaire d'interaction de la protéine de SCRIB participant à la polarité des cellules épithéliales.

SCRIB est un partenaire de la voie PCP décrit pour la première fois dans l'organisme *Drosophila melanogaster*. Il est largement impliqué dans la polarité et la migration des cellules épithéliales. Cette protéine active le système des petites GTPases RhoA, RAC et CDC42. Elle permet notamment une réorganisation du cytosquelette d'actine pour la formation des lamellipodes lors de la motilité cellulaire (Dow et al., 2007; Nola et al., 2008).

MCC a été décrit comme un partenaire d'interaction de SCRIB. Dans les cellules épithéliales, MCC et SCRIB colocalisent au niveau de la membrane où elles interagissent. La délétion de *MCC* entraîne des défauts de migration des cellules indiquant son importance dans ce mécanisme. Il semble cependant que MCC régule la migration indépendamment des petites GTPases induites par SCRIB (Arnaud et al., 2009). En effet, une étude plus tardive démontre que MCC interagit avec SCRIB via la phosphorylation de la Ser828, en position -1 de son troisième domaine PDZ. Ainsi, SCRIB interagirait ensuite avec la Myosine-IIIB pour favoriser la formation des lamellipodes, favorisant la migration (Pangon et al., 2012).

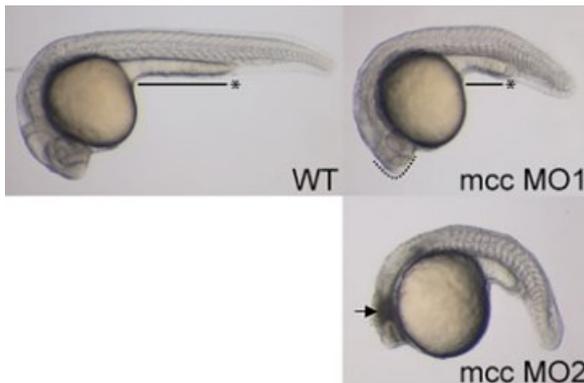
Récemment, MCC a également été associé à l'organisation apico-basale de la cellule épithéliale. Associé, au centrosome, il est phosphorylé par CK1 $\delta/\epsilon$  pour être relocalisé au centre organisateur des microtubules non centrosomal (ncMTOC) au niveau des villosités des cellules épithéliales. Une fois relocalisé, MCC interagirait avec SCRIB afin de réguler l'organisation apico-basale de la cellule épithéliale (Tomaz et al., 2022).



**Figure 44: Proposition d'un mécanisme de relocalisation de MCC au pôle apical de la cellule épithéliale**

Par un stimulus inconnu, la kinase CK1 $\delta/\epsilon$  phosphoryle MCC, sur une sérine inconnue, le désolidarisant du mTOC pour le relocaliser au ncMTOC où il interagit avec SCRIB entre autres (adapté de Tomaz et al., 2022).

### b. Rôle de MCC dans la voie Wnt/PCP au cours de l'embryogenèse



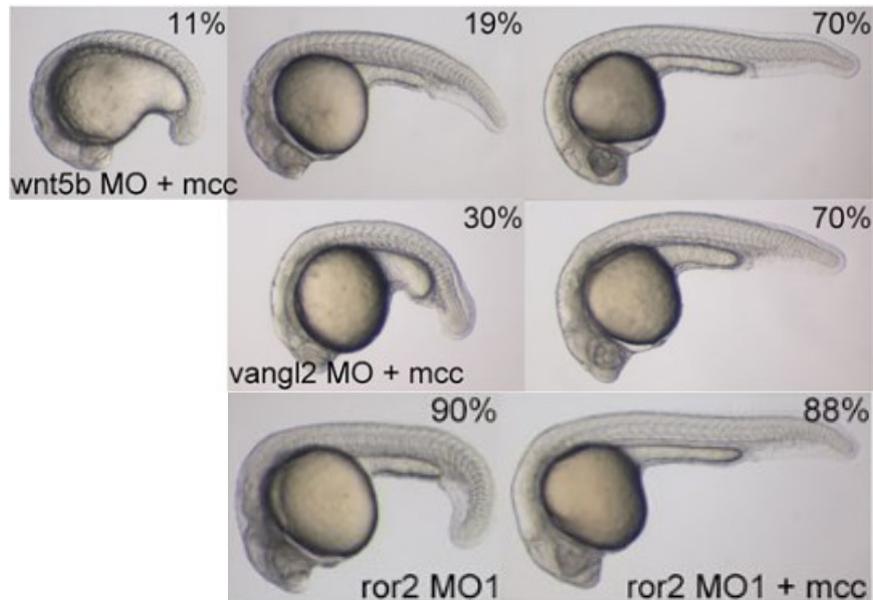
**Figure 45: Embryons de poisson zèbre injectés avec des morpholinos dirigés contre *mcc***

L'axe embryonnaire des poissons zèbres injectés avec les morpholinos *mcc* est plus court. On peut également observer une microcéphalie (flèche noire) (adapté de Young et al., 2014).

MCC a été également caractérisé comme un acteur de la voie Wnt/PCP au cours de l'embryogenèse du poisson zèbre et plus précisément au cours de la gastrulation. Les embryons injectés à l'aide d'un morpholino (MO) dirigé contre *mcc* présentent des microcéphalies, des microphthalmies et un axe embryonnaire plus court et recourbé.

Les auteurs ont ensuite supposé que MCC agissait en aval de la signalisation Wnt5B/ROR2/VANGL2. Ils ont donc injecté des mRNA *mcc* à des embryons de poisson zèbre

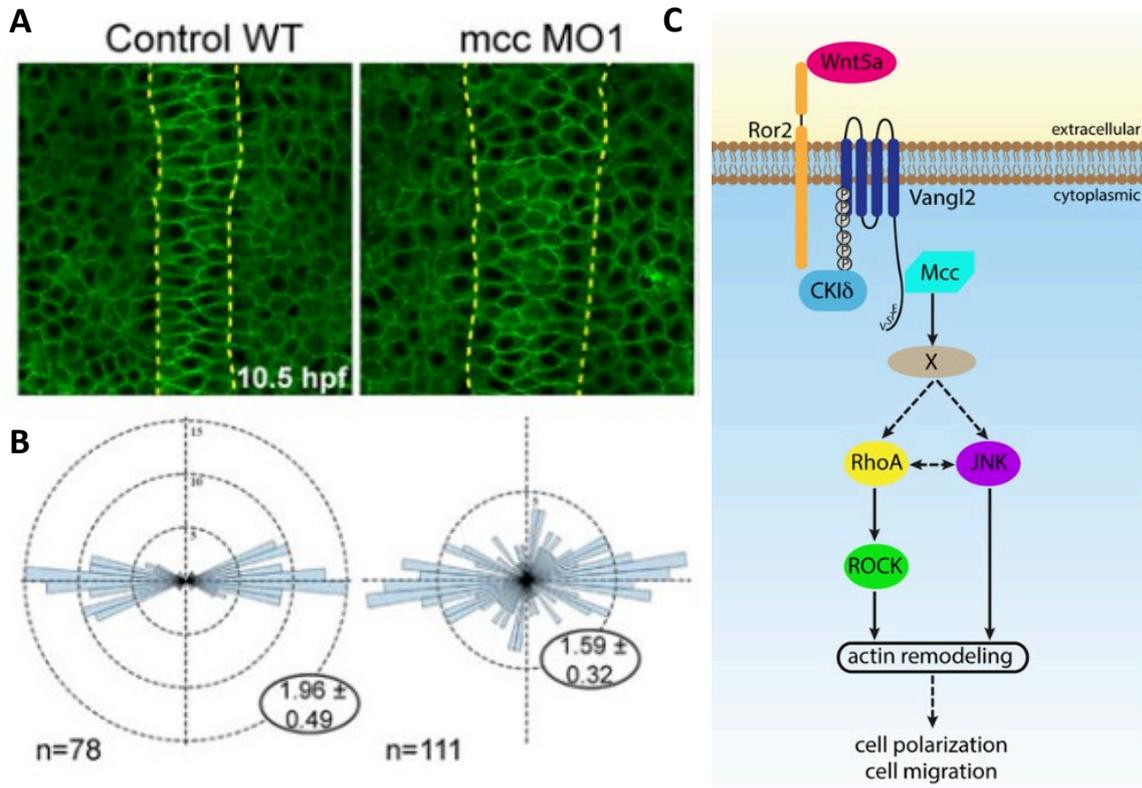
traités avec des MO dirigés contre *wnt5b*, *vangl2* ou *ror2*. L'injection de mRNA *mcc* est capable de restaurer plus ou moins les défauts de développement observés chez les poissons délétés pour *wnt5b*, *vangl2* ou *ror2*. Les auteurs ont également démontré que MCC interagissait avec VANGL2. Ces données démontrent que MCC est impliqué dans la convergence et l'extension au cours de la gastrulation, en aval de la signalisation Wnt5b/Vangl2.



**Figure 46: Photos des différentes catégories d'embryons de poissons zèbres injectés avec un mRNA *mcc* et un MO *wnt5b*, *vangl2* ou *ror2***

L'injection d'un mRNA dirigé contre *mcc* sur les embryons délétés pour *wnt5b* conduit à trois phénotypes. Dans 70% des cas, les défauts morphologiques dus à la délétion de *wnt5b* sont restaurés. Dans le cas de la délétion de *vangl2*, seulement deux classes phénotypiques sont relevées et dans 70% des cas, *mcc* restaure les défauts morphologiques. Dans le cas de *ROR2*, *mcc* restaure le phénotype dû à sa délétion dans 88% des embryons (adapté de Young et al. 2014).

Ensuite, les auteurs ont étudié l'impact de MCC dans la fonction de polarité planaire. Au cours de la convergence et de l'extension, les cellules épithéliales s'allongent, se réorganisent médiolatralement et s'intercalent en tête-bêche. Les auteurs ont quantifié la polarité des cellules épithéliales de la notochorde et de l'ectoderme. Dans les poissons zèbres contrôles, les cellules sont polarisées de manière opposée alors que dans les poissons zèbres injectés avec des morpholinos dirigés contre *mcc*, cette polarité est perturbée et l'agencement en tête-bêche des cellules est perdu. La répression de VANGL2 donne un résultat similaire. Pour terminer, une activation de JNK et de la petite GTPase RhoA est capable de restaurer les défauts de gastrulation dans les poissons zèbres injectés avec un morpholino dirigé contre *mcc*. Ces données démontrent qu'au cours de la gastrulation, dans la cellule épithéliale, MCC interagit avec le complexe VANGL2/ROR2 sous un stimulus Wnt5b afin d'induire la polarité planaire par le système des petites GTPases et donc une réorganisation du cytosquelette (Young et al., 2014).



**Figure 47: Rôle de MCC épithéliale dans la voie Wnt/PCP au cours de la gastrulation du poisson zèbre**

a. Imagerie confocale de cellules épithéliales de la notochorde de poissons zèbres *ctl* et injectés avec un MO *mcc*

b. Quantification de la polarité des cellules épithéliales de la notochorde mettant en évidence une dérégulation de cette fonction chez les poissons zèbres MO *mcc*

c. Proposition de signalisation Wnt/PCP/MCC

(adapté de Young et al., 2014).

# RÉSULTATS

# Chapitre 1 : Etude du rôle de MCC dans l'organisation polaire du réseau vasculaire

## I- Contexte scientifique

La voie Wnt/PCP a été décrite comme orchestratrice de l'architecture vasculaire au cours du développement du plexus, notamment via la polarisation et la migration des cellules endothéliales. La délétion endothéliale de PDZRN3 entraîne par exemple une disruption de la polarité et donc un retard de migration des cellules endothéliales. Des défauts dans la structure des vaisseaux de la rétine murine à P6 sont observés (Sewduth et al., 2014). Cependant, il apparaît encore peu clair comment PDZRN3 contrôle la polarisation des cellules endothéliales. Certains acteurs en aval de la voie l'axe Wnt5a/PCP comme les petites GTPases ou les protéines liées au cytosquelette ont été étudiés (Carvalho et al., 2019; Laviña et al., 2018) mais ils ne sont impliqués que dans la relocalisation du centrosome. Actuellement, la voie Wnt/PCP souffre d'un certain manque de caractérisation. Il reste des chaînons manquants à caractériser permettant de faire le lien entre la signalisation en amont de la PCP, plutôt documenté (Carvalho et al., 2019; Franco et al., 2016; Konopelski Snaveley et al., 2021; Sewduth et al., 2014) et le contrôle de la polarité. La régulation du centrosome elle-même reste très peu connue dans la cellule endothéliale. Quelques études pointent l'importance de certaines CEP au cours de l'angiogenèse (Shi et al., 2012; K. Wang et al., 2023) mais aucun mécanisme réel n'est proposé, et encore moins, un lien entre la voie Wnt/PCP et la polarité.

Le laboratoire avait pour objectif de trouver de nouveaux partenaires de la voie Wnt/PCP dans la cellule endothéliale afin de mieux caractériser cet axe de signalisation. Pour ce faire, la méthode du BioID, qui repose sur un marquage de proximité des partenaires d'interaction d'une protéine d'intérêt, ici PDZRN3, a été employée. Par analyse de spectrométrie de masse, MCC a été fortement détecté parmi les partenaires d'interaction potentiels de PDZRN3. Non seulement MCC a été décrit comme à la fois un inhibiteur de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine (Benthani et al., 2018; Pangon et al., 2015) et comme une protéine de polarité (Arnaud et al., 2009; Tomaz et al., 2022), mais différentes bases de données de séquençage ARN en cellules uniques le révèle également comme relativement spécifique des cellules endothéliales dans plusieurs organes tels que la rétine, la BHE ou les poumons (Sabbagh & Nathans, 2020; Vanlandewijck et al., 2018; Zarkada et al., 2021).

## II- Objectif et stratégie

L'objectif de ce travail de thèse est donc d'étudier le rôle de MCC dans la voie de signalisation Wnt/PCP endothéliale. Plus précisément, nous cherchons dans cette étude à caractériser l'implication de MCC dans la signalisation et les fonctions Wnt/PCP. Pour ce faire, deux approches ont été privilégiées. D'une part, une analyse *in vitro* basée sur des études signalétiques et fonctionnelles sur un modèle de cellules endothéliales en culture et d'autre part, nous avons généré au laboratoire un modèle murin de délétion endothéliale de *Mcc* inducible par tamoxifène. Ce modèle est utilisé pour suivre le développement post-natal du plexus vasculaire rétinien, son architecture, et l'état de polarisation des cellules endothéliales.

## III- Manuscrit

Ci-après se trouve le manuscrit de l'article exposant les résultats de ce travail de thèse. Il est sur le point d'être soumis à *Developmental Cell*. Le format est donc adapté aux exigences de l'éditeur.

**Title: Autophagy-driven CEP131 stability by MCC links endothelial polarity to vascular remodeling**

Valentin Delobel<sup>1</sup>, Béatrice Jaspard<sup>1</sup>, Claire Peghaire<sup>1</sup>, Maxime Michot<sup>1</sup>, Juliette Vours<sup>1</sup>, Romain Boulestreau<sup>1</sup>, Thierry Couffinal<sup>1,2</sup>, Cécile Duplâa<sup>1</sup>.

1. Univ. Bordeaux, Inserm, UMR1034, Biology of Cardiovascular Diseases, F-33600 Pessac, France

2. CHU de Bordeaux, Service des Maladies Cardiaques et Vasculaires, F-33600 Pessac, France

### Summary

The establishment and maintenance of endothelial cell (EC) polarity are essential for proper vascular development, but the underlying molecular mechanisms remain incompletely understood. Here, we identify the mutated in colorectal cancer (MCC) protein as a critical regulator of EC polarity and migration through the Wnt/Planar Cell Polarity (PCP) signaling pathway. MCC interacts with the centrosomal protein CEP131, regulating its stability via an autophagy-dependent mechanism, which is essential for centrosome integrity and EC polarization. *In vivo* studies, using a postnatal retinal angiogenesis model, reveal that MCC plays a pivotal role in integrating mechanical shear stress signals with Wnt/PCP signaling, ensuring proper vascular remodeling and morphogenesis. Loss of MCC disrupts this process, leading to defective EC polarization, impaired directional migration, and abnormal vascular architecture.

These findings reveal a novel mechanistic link between autophagy, centrosomal protein stability, and endothelial polarity, highlighting MCC's dual role in structural adaptation and mechano-sensory regulation of vascular development. This study provides new insights into the molecular cross-talk between autophagy and Wnt/PCP signaling, offering potential therapeutic targets for vascular-related diseases.

## **INTRODUCTION**

The formation of a stable vascular plexus is a complex and highly regulated process essential for the proper functioning of the circulatory system. This process is pivotal during embryonic development and continues to be significant throughout life in processes such as wound healing, tissue regeneration, and pathological conditions like cancer<sup>1</sup>. The development of a vascular plexus involves multiple stages, including angiogenesis and vessel maturation<sup>2</sup>. In sprouting angiogenesis, endothelial cells (ECs) at the tips of existing vessels, known as tip cells, migrate towards angiogenic signals, while stalk cells proliferate to elongate the sprout<sup>3</sup>.

The proper function and stabilization of the vascular plexus are maintained through hemodynamic forces such as shear stress. Shear stress, resulting from blood flow, influences endothelial cell alignment, polarization, and function, contributing to the adaptive remodeling of the vascular network<sup>4</sup>. The critical role of hemodynamic forces was shown in shaping the vascular network. The authors demonstrated that blood flow is essential for the proper lumen formation within developing vessels, a process crucial for establishing functional blood circulation<sup>5</sup>. Endothelial cells (ECs) respond to shear stress by reorganizing their cytoskeleton, which is necessary for lumen expansion and stabilization<sup>6</sup>. This dynamic adjustment ensures that the vessels can efficiently transport blood, thus maintaining tissue homeostasis.

The Wnt planar cell polarity (PCP) pathway, also known as the non canonical Wnt pathway is a highly conserved signaling pathway that regulates the orientation and coordinated movement of cells within the plane of a tissue<sup>7,8,9</sup>. In the context of vascular development, the PCP pathway is essential for the directional migration and alignment of ECs, which are critical for the formation of a functional and stable vascular plexus. PCP signaling involves several core components<sup>10</sup>, including Frizzled receptors, Dishevelled (Dvl1-3), Van Gogh-like (Vangl), and Celsr (Celsr1-3). These proteins interact to establish cellular asymmetry and coordinate the polarized behavior of cells. The inhibition of PCP signaling through non-canonical Wnt mutant was reported to disrupt ECs growth, polarity, migration, and impaired angiogenesis<sup>11</sup>. Vangl2 and Celsr1 have been associated with vascular defects in mice<sup>12</sup>. The ubiquitin ligase PDZRN3 promotes endocytosis of the Frizzled/Dvl3 complex for PCP signaling, required for vascular morphogenesis<sup>13,14</sup>. Besides the transmembrane protein, some other proteins can bind with Dvl to control angiogenesis. Like a member of a subgroup of formins, DAAM1 can bind to Dvl and inhibit angiogenesis by inducing actin polymerization and microtubule stabilization in ECs<sup>15</sup>. Kif26b, a kinesin, together with Dvl3/Daam1 initiates EC polarity through the control of the PCP signaling pathway-dependent activation in angiogenesis<sup>15</sup>.

One important regulator of cell polarity is the centrosome, which acts as a microtubule organizing center. At the molecular level, the centrosome plays a pivotal role in EC polarization, a critical process for vessel sprouting and formation. Centrosome positioning determines the front-rear polarity of ECs, and organize microtubules to direct the Golgi apparatus towards the leading edge, facilitating vesicle trafficking and membrane delivery necessary for cell migration<sup>16</sup>. Centrosome integrity is crucial for the proper migration and alignment of ECs during angiogenesis. Disruptions in centrosome function led to aberrant EC behavior, resulting in unstable and poorly formed vascular structures. This underscores the importance of centrosomal regulation in maintaining vascular stability and function during angiogenic processes<sup>17,18</sup>. However, our understanding of the intricate mechanisms governing vascular formation and stability, particularly emphasizing the roles of blood flow and centrosome polarization is still unclear.

In this study, using proximity-dependent biotinylation (BioID), we identified the colorectal cancer mutated protein (MCC) as a pivotal regulator in directing EC polarity and migration via the PCP signaling pathway. MCC influences the spatial orientation and directional movement of ECs, essential for sprouting angiogenesis. It exerts control over EC migration by stabilizing centriolar satellite proteins, notably CEP131, which plays a crucial role in maintaining centrosome integrity and function. This stability is achieved through an autophagy-dependent mechanism that regulates the level and localization of CEP131 within the cell. *In vivo* deletion of *Mcc* in ECs reveals its crucial role in vascular morphogenesis, particularly in response to shear stress and blood flow.

## **RESULTS**

### ***Proximity-dependent biotinylation (BioID) analysis identifies MCC as a substrate for PDZRN3 in endothelial cells***

The E3 ubiquitin ligase PDZRN3 is considered as a partner of the non-canonical Wnt pathway in endothelial cells (EC)<sup>19-21</sup>. However, the identities of physiological and relevant PDZRN3-associated proteins in EC remain poorly understood. Given that PDZRN3 is an E3 ubiquitin ligase, it may be involved in weak and transient interactions with substrates that are difficult to identify using traditional co-immunoprecipitation methods. To address this, we employed a proximity-dependent biotin identification method (BioID) utilizing a minimal biotin ligase (BirA\*)-Flag<sup>22</sup>. For these studies, we constructed a lentiviral vector in which the biotin ligase (BirA\*) was fused to the N-terminus of full-length human PDZRN3 (BirA\*-PDZRN3). To ensure binding specificity, BirA\* was also fused to another E3 ubiquitin ligase, TRIM47, which is highly expressed in human and mouse brain EC<sup>23</sup> (BirA\*-TRIM47), or left uncoupled (BirA\*) (Figure 1A). Infected Human Brain Microvascular Endothelial cells (HBMEC) were cultured, followed by addition of biotin for 3 hours to induce labeling of cellular proteins. In total, we identified 1858 high-confidence protein-protein

interactions (PPIs) (Figure 1A). After subtracting background proteins highly found in the non-coupled BirA condition and non-specific proteins interacting with TRIM47, 55 were detected only in the BirA\*-PDZRN3 condition. The Colorectal Cancer Mutated protein (MCC), appeared to be the most abundant of PDZRN3-interacting proteins (Figure 1A). To confirm the interaction, HBMEC were infected with a lentivirus expressing PDZRN3-V5. Immunoprecipitated PDZRN3 could pull down endogenous MCC protein and conversely, MCC immunoprecipitation resulted in the pull down of PDZRN3-V5 (Figure 1B). We surveyed scRNA-Seq data obtained from adult lung and brain ECs and vascular-associated cell types, using the following database: <http://betsholtzlab.org/VascularSingleCells/database.html><sup>25,26</sup>. Among these data sets, we observed various levels of *Mcc* mainly in the different subtype of lung and brain ECs, Interestingly, MCC expression in other cell types, such as mural and perivascular cells, is very low compared to ECs. (Figure S1.A-B). We then established that MCC transcripts are likely the products of active gene expression in EC using BulkECexplorer tool<sup>27</sup> (Figure S1-C). We then analyzed scRNA-Seq data generated from P6 and P10 ECs isolated from retina and brain in respectively the database from A. Dubrac's group<sup>24</sup> and the database from J. Nathans' group (<https://doi.org/10.7554/eLife.36187.042>) (Figure S1.D-E). These analyses reveal that *Mcc* is enriched in different subtypes of ECs including capillary, venous, arterial, and tip cells. In addition, Overall, these analyses reveal a potential role for endothelial MCC in regulating blood vessel growth and maintenance during development.

### ***MCC induces non canonical Wnt PCP pathway and inhibits the Wnt canonical $\beta$ -catenin pathway in endothelial cells***

Previous studies have shown that PDZRN3 signaling influences the Wnt PCP pathway. To assess whether MCC expression modifies the Wnt PCP pathway, we stimulated HBMECs with recombinant Wnt3a or Wnt5a proteins known to activate the canonical and non-canonical Wnt pathways, respectively. HBMEC were transfected with small interfering RNA (siRNA) for control (siCTL) or the *MCC* gene (siMCC) into primary cultured HBMECs confirming *MCC* gene knockdown efficiency through immunoblotting in both basal and stimulated conditions (Wnt3a and 5a). Our findings demonstrated an increase in MCC protein levels following 1 hour of Wnt5a stimulation, but not with Wnt3a (Figure 1C-D). We then explored whether MCC is essential for activating Wnt5a signaling. Our studies revealed that MCC downregulation prevented the typical increase in phosphorylated c-jun levels observed at 15 and 30 minutes post-Wnt5a treatment in ECs (Figure 1E-F). Additionally, we utilized an AP1 reporter plasmid to assess non-canonical Wnt pathway activity in HeLa cells. Co-transfection of the AP1 reporter with MCC resulted in an increase in non canonical Wnt activity, as indicated by elevated luciferase activity (Figure 1G).

Previous literature suggests that the Wnt PCP non-canonical signaling pathway may inhibit the  $\beta$ -catenin pathway<sup>28-30</sup>. To investigate this, we stimulated HBMECs with Wnt3a and observed an upregulation of Wnt-related genes such as AXIN2 and LEF1 through quantitative PCR analysis (qPCR), which were further enhanced following MCC downregulation, implying that MCC negatively regulates the canonical Wnt pathway (Figure 1H). Conversely, increased MCC levels appeared to suppress Wnt3a-dependent canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling, as demonstrated by reduced TOPflash luciferase activity<sup>31</sup> (Figure 1I).

Collectively, this provides substantial evidence that MCC serves as a novel modulator of the non-canonical Wnt pathway in ECs and plays a significant role in inhibiting the  $\beta$ -catenin pathway.

### ***MCC is required for endothelial cell polarization during migration***

Non-canonical Wnt signaling plays a crucial role in the directional migration of ECs, a process essential for sprouting angiogenesis. We observed that siMCC ECs exhibited a significant reduction of 40%, in directional migration toward the wound area (Figure 2A-B). Further exploration of MCC's impact on EC directional migration under flow conditions was conducted. Confluent HBMEC were subjected to shear stress in a parallel flow chamber, and their migration dynamics and behaviors were monitored through time-lapse imaging. The results demonstrated that while MCC depletion did not alter migration velocity, it significantly compromised the straightness of the migration paths in HBMECs (Figure 2C). We also analyzed the effects of MCC depletion on EC morphological parameters, focusing on cell axial planar polarity under fluid shear stress. For this purpose, ECs were cultured for 72 hours on an orbital shaker, exposed to oriented shear stress, with cells under static conditions serving as controls. We quantified cell morphology and polarity using an open-source image analysis software, polarity-JaM<sup>34</sup>. After 72 hours, ECs at the well edge (exposed to laminar flow) were harvested, revealing increased endogenous MCC levels, suggesting MCC's involvement in the EC response to shear stress (Figure 2D-E). As anticipated, these cells elongated and aligned their stress fibers with the flow direction, in contrast to cells in static conditions<sup>35</sup>. We then observed that siMCC ECs exhibited increased sensibility to the flow; they displayed a more elongated morphology than siCTL ECs (Figure 2F; Figure S4A-B). Moreover, under shear stress conditions, MCC depletion significantly upregulated the expression of KLF2, a key transcription factor responsive to shear stress (Figure 2G).

We further evaluated planar polarization by measuring the position of the microtubule organizing center (MTOC) relative to the nucleus and orientation towards the flow direction (Figure 2H).

Indeed, siCTL ECs submitted to laminar flow exhibited a typical radial microtubule array in front of the nucleus, whereas *MCC* depletion disrupted the asymmetric microtubule reorganization (Figure 2F). Under static culture conditions, siCTL and si*MCC* ECs remained randomly polarized. By 72 hours, as expected, the si*MCC* led to disorganized polarities, reflected by a low polarity index ( $P_i=0.155$ ) at the edge of the plate, in contrast to control samples ( $P_i=0.545$ ) (Figure 2H-I). siCTL ECs were primarily polarized in the flow direction, with the MTOC positioned in front of the nucleus relative to the flow whereas a significant reduction in flow-oriented ECs was observed under si*MCC* conditions (Figure 2J).

### ***MCC regulates the centriolar protein, CEP131 via an autophagy mechanism***

To elucidate the molecular mechanisms through which *MCC* signals regulates EC polarity during migration, we utilized bioID with a BirA\*-*MCC* fusion protein expressed in HBMECs. This approach confirmed the kinase CK1 $\epsilon$  as a primary interactor of *MCC* as previously reported in HEK293<sup>36</sup>. Here, we identified several known centrosomal proteins proximal to *MCC*, including CEP131 and to a lesser extent CEP85 (Figure 3A). A comprehensive investigation of PPIs through gene ontology related to molecular function indicated that *MCC* associates with a diverse array of proteins functionally involved in centrosome and MTOC organization in ECs (Figure S5). Previous studies have reported colocalization of *MCC* with centrosomal proteins in epithelial cells<sup>36</sup>. Here, we confirmed *MCC* interaction following the coimmunoprecipitation of endogenous *MCC* with CEP131 in HEK293 cell extracts expressing CEP131 fused either with a Flag or a GFP tag (Figure 3B). We examined *MCC* protein distribution in ECs subcellular fractionation following SDS-PAGE analysis. We showed a localization of endogenous *MCC* in cellular fractions enriched with CEP85, CEP131 and endosomal markers as Rab5, but not in the fraction of Flotillin-2, a caveolar vesicle element (Figure 3C). As CEP131 was involved in cellular processes such as cell polarity and migration<sup>37</sup>, we then explored the regulatory role of *MCC* on CEP131. Interestingly, *MCC* depletion in ECs resulted in increased levels of CEP131 protein, while the levels of CEP85 remained unchanged (Figure 3D-E). To ensure that this regulation of CEP131 was not due to off-target effects of si*MCC*, we employed three distinct siRNAs targeting *MCC*. Each of these siRNAs achieved comparable gene silencing of *MCC* and elicited a similar increase in CEP131 expression (Figure S6).

The stability of the centrosome is known to be regulated through the selective autophagic degradation of centriolar satellite components<sup>38</sup>. To explore this possibility further, we cotransfected HEK293 with *MCC*-Flag and Cep131-GFP. Confocal microscopy revealed that overexpression of *MCC* induced Lamp2+ vesicles formation and showed that Cep131-GFP colocalized in Lamp2+/*MCC*+ vesicles. As expected, treatment with the lysosomal inhibitor,

bafilomycine A1 (Baf) for 4 hours resulted in an increase in CEP131 accumulation in MCC+ Lamp2+ vesicles (Figure 3F-G).

These findings collectively suggest that MCC signaling regulates CEP131 levels through a selective autophagic process. Interestingly, p62/SQSTM1 was identified as a potential proximal protein interactant of MCC in ECs (Figure 3A). P62 is an adaptor protein which mediates the recruitment of poly ubiquitinated protein aggregates to the autophagic machinery. As PDZRN3 is an E3 ubiquitin ligase that interacts with MCC, we first searched whether PDZRN3 ubiquitinates MCC. Cotransfection with MCC-Flag and ubiquitin ligase either with or without PDZRN3-V5 and immunoprecipitation with anti-ubiquitin antibodies demonstrate that PDZRN3 led to an increase in MCC ubiquitination. Baf treatment increases both ubiquitinated MCC and PDZRN3 levels revealing that autophagy governs a turnover of ubiquitinated MCC and PDZRN3 pools (Figure 3H). We then tested whether PDZRN3 induced MCC ubiquitination favors MCC interaction with p62. Immunoprecipitation analysis revealed that MCC-p62 interaction was prominently increased under Pdzrn3-V5 expression (Figure 3I). We then reported that MCC interaction with CEP131 was enhanced under PDZRN3 expression using IP experiments (Figure 3J). Finally, we tested the ability of MCC to recruit CEP131 in p62 positive vesicles. Cotransfected HEK293 with MCC-Flag, Cep131-GFP and p62-mcherry were analyzed by confocal microscopy. We showed that ectopically expressed p62 and CEP131 were found to be located in the cytoplasm in round small bodies. In agreement with the biochemical analyses, overexpression of MCC induced an aggregation of CEP131 and p62 in large autophagic intense bodies (Figure 3K). Taken together, we propose a theoretical mechanism for the regulation of the centrosomal CEP131 level via an autophagic flux based on ubiquitination of MCC induced by PDZRN3 which then promotes the recruitment of p62 in large vesicles filled with Cep131 (Figure 3L).

### ***Regulation of CEP131 level via an autophagy mechanism triggers polarized EC migration***

We then questioned whether the altered polarized migration of ECs following *MCC* depletion could be linked to CEP131 dysregulation. To address this, we knocked down *CEP131* in HBMEC cells (Figure 4A). Remarkably, silencing *CEP131* in siMCC ECs restored normal cell migration, whereas *CEP131* depletion alone did not impact wound closure rate (Figure 4B-C). We further quantitatively characterized in HBMEC centrosome polarity responses to flow in a rotating directional flow assay under *CEP131* depletion. The collective strength migration was quantified using the polarity index (Pi) (Figure 4D). We showed that knockdown of both *MCC* and *CEP131* reversed the polarization of ECs impaired by the silencing of *MCC* alone (both *MCC* and *CEP131* siRNA treated cells, Pi=0.643 vs siMCC alone condition, Pi=0.150). It should be noted that

silencing *CEP131* in ECs does not alter centrosome orientation under flow shear stress when compared to control conditions (si*CEP131* ECs,  $P_i=0.536$  vs siCTL ECs,  $P_i=0.606$ ) (Figure 4D). Additionally, we noted that simultaneous depletion of *MCC* and *CEP131* results in more ECs aligning in the direction of the flow than in controls. (Figure 4E). Finally, we analyzed whether the autophagic flux is required for polarized EC migration. We reported that Baf treatment during 6 hours impaired centrosome positioning in front of the nucleus under flow shear stress (Figure 4F-G).

Our data support a model where *MCC* is essential for maintaining *CEP131* levels in ECs, which is crucial for the organized, polarized structure of the Golgi apparatus during directed EC migration under flow conditions.

### ***Endothelial Mcc depletion leads to defect in vascular retinal angiogenesis***

In ECs, the orientation of the nucleus relative to the Golgi apparatus has shown a strong correlation with both directed cell movement<sup>39</sup> and the alignment of cells within tissues<sup>6</sup>. Given that the Wnt PCP signaling *regulated polarized cell behaviors* during physiological processes, we hypothesized that *Mcc* depletion in ECs could impair their ability to polarize at the front during sprouting angiogenesis.

To investigate this, we developed *Mcc<sup>IECKO</sup>* mice. These mice were created by crossbreeding *Mcc<sup>ff</sup>* mice<sup>40</sup> with *Cdh5(PAC)-Cre<sup>ERT2</sup>* mice<sup>41</sup>, enabling specific deletion of *Mcc* in ECs (Figure 5A). Upon tamoxifen induction from postnatal day 3 (P3) to day 5 (P5), we observed by qPCR a significant reduction by 50% in *Mcc* expression in lung ECs (Figure 5B). This targeted deletion resulted in significantly disrupted retinal angiogenesis by P6 (Figure 5C) as evidenced by a decrease in radial growth (30% decrease) and vascular density near both arteries and veins (Figure 5D). This developmental delay correlated with a 50% increase in Collagen IV empty vascular sleeves, suggesting enhanced vascular regression (Figure 5E-F) and a reduction in the proliferation of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine-positive (EdU<sup>+</sup>) ECs (45%) (Figure 5G-H). Despite these disruptions, the number of sprouts at the front edge remained comparable between *Mcc<sup>IECKO</sup>* and *Mcc<sup>ff</sup>* littermates (Figure 5I-J).

### ***Endothelial Mcc depletion regulates endothelial polarity in vivo***

At the sprouting front, polarization was significantly disrupted in *Mcc<sup>IECKO</sup>* mutants. *Mcc<sup>IECKO</sup>* mutants displayed a reduced number of ECs with ERG+ nuclei aligned perpendicularly to the migration front (engaged), which potentially hinders the process of sprouting angiogenesis (Figure

6A-B). To further probe the role of endothelial *Mcc* in polarity during angiogenesis, we utilized a dual fluorescent reporter mouse line named GNrep<sup>61</sup>, which facilitates the fluorescent labeling of nuclei (GFP) and the Golgi apparatus (mCherry). We generated GNrep *Mcc*<sup>IECKO</sup> mice by crossing GNrep mice with *Cdh5(PAC) Cre*<sup>ERT2</sup> *Mcc*<sup>ff</sup> and GNrep *Cre*<sup>+</sup> Control mice by crossing GNrep mice with *Cdh5(PAC) Cre*<sup>ERT2</sup> *Mcc*<sup>ff/+</sup>. GNrep cassette was activated following tamoxifen injection at P3 to P5 prior sacrifice at P6 (Figure 6C).

In major arterial and venous vessels, we observed no apparent defects in the orientation of the Golgi apparatus relative to blood flow in *Mcc*<sup>IECKO</sup> mutants compared to control littermates (Figure S6A-B). However, at the sprouting front, polarization was significantly disrupted in GNrep *Mcc*<sup>IECKO</sup> mutants compared to GNrep *Cre*<sup>+</sup> Control mice. In CD31 labeled vessel segments, we defined axial cell polarity vectors for each EC based on the nucleus' center of mass and the Golgi apparatus's position. We measured the angle of the EC's axial polarity vector with the sprouting front edge axis and calculated a polarity index (Figure 6D). As expected in the GNrep *Cre*<sup>+</sup> control retina, ECs exhibited high polarity with a polarity index of 0.381. Conversely, GNrep *Mcc*<sup>IECKO</sup> ECs showed significantly reduced polarity, indicated by a polarity index (Pi) value of 0.178 (Figure 6F-G). Consistent with these findings, ECs at the migration front display Golgi apparatus organization preferentially at the rear (58 %) with only 14 % in the side of the nuclei at P6. In contrast in the GNrep *Mcc*<sup>IECKO</sup> mutant retina, ECs polarization appears random; 41% of ECs exhibited Golgi apparatus orientation at the side of the spouting direction axis (Figure 6H).

### ***Mcc controls endothelial polarity toward the direction of flow in a shear rate dependent manner***

The development of the retinal vascular plexus involves two critical processes: polarized sprouting of the endothelium at the migration front, and vascular regression and remodeling predominantly governed by blood flow dynamics. Here, we hypothesized that loss of *Mcc* in ECs, which leads to increased vascular regression and enhanced remodeling of the plexus in *Mcc*<sup>IECKO</sup> mutants, makes ECs more susceptible to shear stress. We then reasoned that decreasing shear stress might rescue the excessive remodeling process in *Mcc*<sup>IECKO</sup> mutants. To test this, control littermates and *Mcc*<sup>IECKO</sup> pups received intraperitoneal injections of captopril (an angiotensin-converting enzyme inhibitor) to lower blood pressure (Figure 7A).

This treatment led to the restoration of vascular density around major vessels such as arteries and veins, as well as at the sprouting front in *Mcc*<sup>IECKO</sup> mutant pups (Figure 7B-C). Control littermates showed a significant increase in vascular density in the different beds under this low blood pressure condition (Figure 7B-C). A comparable level of vessel regression was observed between the control and *Mcc*<sup>IECKO</sup> mutant pups (Figure 7D-E).

We subsequently examined the polarization of ECs at the migration front, given that morphogenic angiogenic events are independent of blood shear stress<sup>1</sup>. Under captopril, we found an increase of sprout number at the front of Control littermates but not in *Mcc*<sup>IECKO</sup> pups (Figure 7F-G). We then investigated whether new angiogenic sprouts at the front were unperfused. Intravenous injection of sulfo-NHS-biotin facilitated the examination of the perfused vascular bed. At P6, the front edge of the retina displayed robust angiogenesis, marked by engaged ECs that had not yet been perfused. Conversely, in *Mcc*<sup>IECKO</sup> mutants, disrupted EC polarization compromised the formation of an actively sprouting front, as indicated by the presence of perfused vessel segments filled with SulfoNHSbiotin. (Figure 7H). Utilizing the Golgi-nucleus axis in GNrep mice to measure EC polarity (Figure 7I), we analyzed the extent to which the leader cells at the front side were affected in their polarization pattern under low shear stress. We found that in GNrep Cre+ control mice, captopril treatment led to an increase of EC polarized toward the front (35%) with 45% EC remaining polarized toward the rear (Figure 7J-L). In contrast, in GNrep *Mcc*<sup>IECKO</sup> mutant pups under captopril treatment, ECs exhibited a misorientation of their Golgi toward the flow direction with 42 % of ECs displaying a Golgi localized at the side of the nucleus (Figure 7J-L). Taken together, these data suggest that deletion of MCC in ECs impaired their response to angiogenic clues at the front of migration.

## **DISCUSSION**

This study reveals that the Colorectal Cancer Mutated protein (MCC), identified as a substrate for PDZRN3 via BioID, plays a key role in the non-canonical PCP pathway in ECs. MCC regulates non-canonical Wnt signaling essential for the directed migration and organization of ECs during angiogenesis. These findings underscore MCC's critical function in controlling the precise spatial and temporal dynamics of cell migration necessary for new blood vessel formation.

### ***MCC's Role in Wnt Signaling Pathways***

We first demonstrated that in ECs, MCC has a role in modulating the balance between non-canonical PCP and canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathways. Stimulation with Wnt5a increases MCC levels, a response not observed with Wnt3a, suggesting a selective involvement of MCC in the non-canonical pathway in ECs. Further experiments using siRNA-mediated knockdown of *MCC* revealed alterations in the phosphorylation levels of c-jun, highlighting MCC's influence on downstream Wnt signaling pathway. Additionally, the suppression of *MCC* resulted in increased expression of canonical Wnt signaling targets such as *AXIN2* and *LEF1*, coupled with

a reduction in major non-canonical proteins like *PTK7*<sup>42</sup> and *DKK1*<sup>43</sup>. These proteins are integral to the non-canonical Wnt pathway, pointing to the role of MCC as a regulatory switch between both signaling pathways in ECs. Consistent with these observations, depletion of *Mcc* during zebrafish gastrulation led to abnormalities in convergence and extension movements, similar to phenotypes observed in mutants of non-canonical PCP pathway components such as *Wnt5a* and *Vangl2*<sup>44</sup>. In the context of colorectal cancer, MCC interacts with components of the  $\beta$ -catenin destruction complex, influencing  $\beta$ -catenin stabilization and transcriptional activity, which are central to the canonical Wnt signaling pathway<sup>45-47</sup>. Interestingly, a study revealed that loss of MCC expression in a mouse model led to inflammation-associated cancer, highlighting activation of cancer-promoting genes and pathways that create a premalignant tissue microenvironment. However, this mechanism was not associated with  $\beta$ -catenin hyperactivation<sup>40</sup>. These findings collectively reveal the complex, cell-type-specific roles of MCC in regulating Wnt signaling pathways, indicating its dual functionality in both physiological and pathological processes across different cellular contexts.

### ***Interaction with CEP131 and Autophagy***

One of the significant findings from the study is the interaction between MCC and CEP131, a protein known to be involved in the organization of microtubules and the microtubule-organizing center (MTOC), critical elements in cell migration and polarity<sup>48</sup>. Our data suggest that PDZRN3 ubiquitination of MCC is required for MCC interaction with CEP131 and for their recruitment to phagosome via the anchorage protein p62. The association of MCC with CEP131 suggests a mechanism by which MCC could influence microtubule dynamics and cellular polarity—critical factors in directional migration during angiogenesis. In polarized ECs, CEP131-mediated organization of the MTOC influences the Golgi apparatus and the positioning of the nucleus, which aligns with the direction of movement. Further our study provided evidence that MCC can regulate the stability and levels of CEP131 via an autophagy-dependent mechanism in ECs. This finding is significant, as autophagy is known to play a critical role in cellular remodeling and stress response, processes that are fundamental during angiogenesis<sup>49</sup>. By influencing CEP131 levels, we propose that MCC indirectly affects the stability and function of the centrosome and associated satellite structures. The precise regulation of CEP131 is required for maintaining the integrity of centriolar satellite as alterations in CEP131 levels can lead to centrosome amplification, unstable cell migration, which can contribute to tumorigenesis and vascular diseases<sup>50,51</sup>. Disruptions in centrosome integrity in ECs have also been shown to impair polarized migration and angiogenic sprouting<sup>17,18</sup>. It was reported that the levels of centriolar satellite's elements could be regulated by autophagy<sup>38</sup>. The satellite organizer PCM1 regulates the

centrosome's structural composition and function through its interaction with autophagy-related gene (ATG) 8 family proteins also known GABARAP family proteins<sup>52</sup>. Accordingly, autophagy deficiency results in accumulation of large abnormal centriolar satellites and a resultant dysregulation of centrosome composition<sup>38</sup>. Because of the central role of autophagy in the stability of centriolar proteins, a more detailed mechanistic study regarding the role of MCC on the recruitment of CEP131 in phagosome would be warranted in the future.

### ***Implications for Vascular Development***

In the context of angiogenesis, EC polarity is essential for directed cell migration and proper tissue alignment, playing a critical role in angiogenesis<sup>53,54</sup>. We have demonstrated that MCC is a partner of the non-canonical PCP pathway, suggesting a regulatory mechanism where MCC is essential for the spatial orientation and migration of ECs during angiogenic processes. Specifically, our experiments show depletion of *Mcc* in ECs significantly disrupts retinal angiogenesis by postnatal day 6. This disruption is evidenced by decreased radial growth and vascular density, increased vascular regression, and reduced proliferation of EdU+ ECs. In our experiments, endothelial-specific depletion of *Mcc* leads to notable disruptions in EC polarity and alignment, particularly affecting the migration direction during angiogenic sprouting. The majority of ECs at the vascular front are not engaged in a perpendicular axis. Quantification of endothelial polarity using the angle of the EC's axial polarity vector revealed a reduced polarity index. These findings align with other models where impairing Wnt secretion specifically in ECs regulates EC polarity and vascular patterning<sup>55-57</sup>. Impairing the endothelial secretion of autocrine Wnt factors or specifically depleting *Mcc* in ECs demonstrates that the Wnt PCP pathway is vital for establishing front-rear polarity in ECs.

### ***Shear Stress and Vascular Remodeling***

Previous studies have shown that shear stress influences endothelial behavior and vascular architecture in mouse<sup>6,58,59</sup>. It is proposed that during vascular plexus development an endothelium-dependent shear stress set point causes blood vessel stabilization thereby establishing homeostasis. However, abnormal high flow rates would lead to increased blood vessel regression<sup>60,61</sup>. Shear stress is recognized as a key regulator of endothelial PCP signaling, influencing the organization of microtubules and actin to align ECs with the direction of flow<sup>54,62,63</sup>. Here, we show evidence that the loss of *Mcc* increases EC susceptibility to shear stress, leading to enhanced vascular regression. On a cellular level, MCC loss results in a significant upregulation of known shear stress-regulated transcription factor (TFs) genes as KLF2 in ECs

exposed to laminar flow expression. KLF2 plays a pivotal role in shear stress-mediated remodeling of the actin cytoskeleton and the formation of shear fibers with a concomitant repression of JNK signaling<sup>64</sup>. These steps are crucial for maintaining the firm attachment of ECs to endure mechanical forces in blood vessels. This aligns with our findings, as we observed that the loss of *MCC* significantly enhances shear stress-induced EC alignment with a reduced phosphorylated c-jun levels in ECs. These results suggest that the loss of *MCC* may enhance the effects of shear-induced KLF2 activation while disrupting PCP signaling, thereby influencing endothelial morphology. *In vivo* experiments further support these findings. Lowering blood pressure using captopril rescued the excessive remodeling process in *Mcc<sup>IECKO</sup>* mutants. Decreased blood pressure restored vascular density around major vessels in *Mcc<sup>IECKO</sup>* mutants but not defects in EC polarity at the migration front, suggesting that polarization is independent of blood pressure. As expected in control mice, lowering shear stress induces an increase of oriented tip cell, confirming that the formation of new sprouts is initiated in these yet unperfused areas<sup>65</sup>. This highlights the dual role of non-canonical Wnt pathway in both the structural adaptation of ECs and their mechano-sensory functions, essential for proper vascular development and remodeling. It is notable that depletion of non-canonical Wnt, as Wnt5a and Wnt11, in ECs exposed to flow stress, resulted in a mild phenotype and did not fully replicate the strong retinal phenotypes observed with *Mcc* deficiency<sup>56</sup>. We cannot exclude the possibility that endothelial activation of PCP signaling may require Wnt or other ligands from different cellular sources. This necessity could be attributed to the close interactions between vascular endothelial cells and surrounding neurons and glia, facilitating coordinated vascular growth and remodeling. Such interactions likely ensure the proper regulation and integration of signals essential for vascular development and homeostasis<sup>66</sup>.

This finding underscores MCC's importance in modulating PCP signaling, essential for the spatial orientation and directed migration of ECs during angiogenesis. By demonstrating that *Mcc* depletion disrupts endothelial polarity, this study provides a molecular basis for understanding endothelial cell alignment and movement in vascular development. These findings link MCC to the control of centrosome stability and function, which are crucial for the polarized migration of ECs.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors thank Dr [Maija R J Kohonen-Corish](#) (Garvan Institute of Medical Research, Sydney, New South Wales, Australia) for providing the MCC floxed mouse; Dr C. Franco ( Instituto de

Medicina Molecular, Universidade de Lisboa, Lisbon, Portugal) for providing mouse GNrep mouse; Dr. Wolfgang Giese Integrative Vascular Biology Lab, Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin (MDC), Berlin, Germany) for providing the basis of Polarity JaM for automated polarity analysis; Dr A. Dubrac for mouse retina single-cell RNA sequencing analysis. We thank Sylvain Grolleau, and Maxime David for their animal technical help and Christelle Boullé for administrative assistance. This work benefited from equipment and services from the iGenSeq (RNA sequencing) and iCONICS (RNAseq analysis) core facilities at the ICM (Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, Paris, France) and from *Plateforme Proteom'IC* core facilities (MS/MS analysis) at the *Institut Cochin*, Paris, France). Artwork was partially created with [BioRender.com](https://www.biorender.com).

## **FUNDING**

This project is supported by a grant overseen by the French National Research Agency (ANR) as part of the “Investment for the Future Programme” ANR-18-RHUS-0002 and by the Precision and Global Vascular Brain Health Institute (VBHI) funded by the France 2030 IHU3 initiative. The project also received funding from the French National Research Agency (ANR) through the SHIVA project. VD received a fellowship from NSFA.

## **AUTHOR CONTRIBUTION**

VD performed most of the experiments, analyzed the data, and contributed to experimental design. BJ contributed to experimental design and biochemical experiments. JV performed BioID experiments. CP analyzed the data, and contributed to experimental design. MM and RB contributed to experiments. TC, CD designed the study, discussed, conceptualized data and wrote the manuscript.

## **ETHICS DECLARATIONS**

Competing interests

All authors declare no competing interests.

## BIBLIOGRAPHY

1. Carmeliet, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* **438**, 932–936 (2005).
2. Adams, R. H. & Alitalo, K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 464–478 (2007).
3. Eilken, H. M. & Adams, R. H. Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis. *Current Opinion in Cell Biology* **22**, 617–625 (2010).
4. Hahn, C. & Schwartz, M. A. Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 53–62 (2009).
5. Gebala, V., Collins, R., Geudens, I., Phng, L.-K. & Gerhardt, H. Blood flow drives lumen formation by inverse membrane blebbing during angiogenesis in vivo. *Nat Cell Biol* **18**, 443–450 (2016).
6. Franco, C. A. *et al.* Dynamic Endothelial Cell Rearrangements Drive Developmental Vessel Regression. *PLoS Biol* **13**, e1002125 (2015).
7. Aw, W. Y. & Devenport, D. Planar cell polarity: global inputs establishing cellular asymmetry. *Current Opinion in Cell Biology* **44**, 110–116 (2017).
8. Wang, Y. & Nathans, J. Tissue/planar cell polarity in vertebrates: new insights and new questions. *Development* **134**, 647–658 (2007).
9. Goodrich, L. V. & Strutt, D. Principles of planar polarity in animal development. *Development* **138**, 1877–1892 (2011).
10. Zallen, J. A. Planar Polarity and Tissue Morphogenesis. *Cell* **129**, 1051–1063 (2007).
11. He, F. *et al.* Wnt5a regulates directional cell migration and cell proliferation via Ror2-mediated noncanonical pathway in mammalian palate development. *Development* **135**, 3871–3879 (2008).
12. Tatin, F. *et al.* Planar Cell Polarity Protein Celsr1 Regulates Endothelial Adherens Junctions and Directed Cell Rearrangements during Valve Morphogenesis. *Developmental Cell* **26**, 31–44 (2013).
13. Sewduth, R. *et al.* Endothelial PDZRN3, controls vascular permeability through Wnt/PCP signaling and the PKC zeta dependent polarity complex. *Archives of Cardiovascular Diseases Supplements* **9**, 177–178 (2017).
14. Sewduth, R. N. *et al.* The ubiquitin ligase PDZRN3 is required for vascular morphogenesis through Wnt/planar cell polarity signalling. *Nat Commun* **5**, 4832 (2014).
15. Guillabert-Gourgues, A. *et al.* Kif26b controls endothelial cell polarity through the Dishevelled/Daam1-dependent planar cell polarity–signaling pathway. *MBoC* **27**, 941–953 (2016).
16. Hao, H. *et al.* Golgi-associated microtubules are fast cargo tracks and required for persistent cell migration. *EMBO Reports* **21**, e48385 (2020).
17. Kushner, E. J. *et al.* Excess centrosomes disrupt endothelial cell migration via centrosome scattering. *Journal of Cell Biology* **206**, 257–272 (2014).
18. Kushner, E. J., Ferro, L. S., Yu, Z. & Bautch, V. L. Excess centrosomes perturb dynamic endothelial cell repolarization during blood vessel formation. *MBoC* **27**, 1911–1920 (2016).
19. Sewduth, R. N. *et al.* The ubiquitin ligase PDZRN3 is required for vascular morphogenesis through Wnt/planar cell polarity signalling. *Nature communications* **5**, 4832 (2014).

20. Sewduth, R. N. *et al.* PDZRN3 destabilizes endothelial cell-cell junctions through a PKCzeta-containing polarity complex to increase vascular permeability. *Science signaling* **10**, (2017).
21. Gueniot, F. *et al.* Targeting *Pdzrn3* maintains adult blood-brain barrier and central nervous system homeostasis. *J Cereb Blood Flow Metab* 0271678X2110489 (2021) doi:10.1177/0271678X211048981.
22. Varnaité, R. & MacNeill, S. A. Meet the neighbors: Mapping local protein interactomes by proximity-dependent labeling with BioID. *Proteomics* **16**, 2503–2518 (2016).
23. Mishra, A. *et al.* Gene-mapping study of extremes of cerebral small vessel disease reveals TRIM47 as a strong candidate. *Brain* awab432 (2022) doi:10.1093/brain/awab432.
24. He, L. *et al.* Single-cell RNA sequencing of mouse brain and lung vascular and vessel-associated cell types. *Sci Data* **5**, 180160 (2018).
25. Vanlandewijck, M. *et al.* A molecular atlas of cell types and zonation in the brain vasculature. *Nature* **554**, 475–480 (2018).
26. Brash, J. T. *et al.* The BulkECexplorer compiles endothelial bulk transcriptomes to predict functional versus leaky transcription. *Nat Cardiovasc Res* (2024) doi:10.1038/s44161-024-00436-w.
27. Zarkada, G. *et al.* Specialized endothelial tip cells guide neuroretina vascularization and blood-retina-barrier formation. *Dev Cell* **56**, 2237–2251.e6 (2021).
28. Olson, D. J. & Gibo, D. M. Antisensewnt-5a Mimicswnt-1-Mediated C57MG Mammary Epithelial Cell Transformation. *Experimental Cell Research* **241**, 134–141 (1998).
29. Topol, L. *et al.* Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent  $\beta$ -catenin degradation. *The Journal of Cell Biology* **162**, 899–908 (2003).
30. Sato, A., Yamamoto, H., Sakane, H., Koyama, H. & Kikuchi, A. Wnt5a regulates distinct signalling pathways by binding to Frizzled2. *EMBO J* **29**, 41–54 (2010).
31. Korinek, V. *et al.* Constitutive Transcriptional Activation by a  $\beta$ -Catenin-Tcf Complex in APC<sup>-/-</sup> Colon Carcinoma. *Science* **275**, 1784–1787 (1997).
32. Giese, W. *et al.* Polarity-JaM: An image analysis toolbox for cell polarity, junction and morphology quantification. Preprint at <https://doi.org/10.1101/2024.01.24.577027> (2024).
33. Levesque, M. J. & Nerem, R. M. The Elongation and Orientation of Cultured Endothelial Cells in Response to Shear Stress. *Journal of Biomechanical Engineering* **107**, 341–347 (1985).
34. Tomaz, L. B. *et al.* MCC is a centrosomal protein that relocalizes to non-centrosomal apical sites during intestinal cell differentiation. *Journal of Cell Science* **135**, jcs259272 (2022).
35. Liu, X.-H. *et al.* CEP131 indicates poor prognosis and promotes cell proliferation and migration in hepatocellular carcinoma. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **90**, 1–8 (2017).
36. Holdgaard, S. G. *et al.* Selective autophagy maintains centrosome integrity and accurate mitosis by turnover of centriolar satellites. *Nat Commun* **10**, 4176 (2019).
37. Brasch, M. E. *et al.* Nuclear position relative to the Golgi body and nuclear orientation are differentially responsive indicators of cell polarized motility. *PLoS ONE* **14**, e0211408 (2019).
38. Currey, N. *et al.* Mouse Model of Mutated in Colorectal Cancer Gene Deletion Reveals Novel Pathways in Inflammation and Cancer. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* **7**, 819–839 (2019).

39. Sørensen, I., Adams, R. H. & Gossler, A. DLL1-mediated Notch activation regulates endothelial identity in mouse fetal arteries. *Blood* **113**, 5680–5688 (2009).
40. Barbacena, P. *et al.* Competition for endothelial cell polarity drives vascular morphogenesis in the mouse retina. *Developmental Cell* **57**, 2321–2333.e9 (2022).
41. Lu, X. *et al.* PTK7/CCK-4 is a novel regulator of planar cell polarity in vertebrates. *Nature* **430**, 93–98 (2004).
42. Semënov, M. V. *et al.* Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6. *Current Biology* **11**, 951–961 (2001).
43. Young, T. *et al.* The PDZ domain protein Mcc is a novel effector of non-canonical Wnt signaling during convergence and extension in zebrafish. *Development* **141**, 3505–3516 (2014).
44. Fukuyama, R. *et al.* Mutated in colorectal cancer, a putative tumor suppressor for serrated colorectal cancer, selectively represses beta-catenin-dependent transcription. *Oncogene* **27**, 6044–6055 (2008).
45. Lim, L. *et al.* MicroRNA-494 within an oncogenic microRNA megacluster regulates G<sub>1</sub>/S transition in liver tumorigenesis through suppression of mutated in colorectal cancer. *Hepatology* **59**, 202–215 (2014).
46. Pangon, L. *et al.* The PDZ-binding motif of MCC is phosphorylated at position –1 and controls lamellipodia formation in colon epithelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1823**, 1058–1067 (2012).
47. Tollenaere, M. A. X., Mailand, N. & Bekker-Jensen, S. Centriolar satellites: key mediators of centrosome functions. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 11–23 (2015).
48. Wirawan, E., Berghe, T. V., Lippens, S., Agostinis, P. & Vandenabeele, P. Autophagy: for better or for worse. *Cell Res* **22**, 43–61 (2012).
49. Li, X. *et al.* USP9X regulates centrosome duplication and promotes breast carcinogenesis. *Nat Commun* **8**, 14866 (2017).
50. Kim, D. H. *et al.* Cep131 overexpression promotes centrosome amplification and colon cancer progression by regulating Plk4 stability. *Cell Death Dis* **10**, 570 (2019).
51. Joachim, J. & Tooze, S. A. Centrosome to autophagosome signaling: Specific GABARAP regulation by centriolar satellites. *Autophagy* **13**, 2113–2114 (2017).
52. Geudens, I. & Gerhardt, H. Coordinating cell behaviour during blood vessel formation. *Development* **138**, 4569–4583 (2011).
53. Lee, C. Y. & Bautch, V. L. Ups and Downs of Guided Vessel Sprouting: The Role of Polarity. *Physiology* **26**, 326–333 (2011).
54. Rosa, A. *et al.* WASp controls oriented migration of endothelial cells to achieve functional vascular patterning. *Development* **149**, dev200195 (2022).
55. Franco, C. A. *et al.* Non-canonical Wnt signalling modulates the endothelial shear stress flow sensor in vascular remodelling. *eLife* **5**, e07727 (2016).
56. Carvalho, J. R. *et al.* Non-canonical Wnt signaling regulates junctional mechanocoupling during angiogenic collective cell migration. *eLife* **8**, e45853 (2019).
57. Barbacena, P. *et al.* GNrep mouse: A reporter mouse for front–rear cell polarity. *genesis* **57**, (2019).

58. Simmers, M. B., Pryor, A. W. & Blackman, B. R. Arterial shear stress regulates endothelial cell-directed migration, polarity, and morphology in confluent monolayers. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **293**, H1937–H1946 (2007).
59. Sugden, W. W. *et al.* Endoglin controls blood vessel diameter through endothelial cell shape changes in response to haemodynamic cues. *Nat Cell Biol* **19**, 653–665 (2017).
60. McCue, S. *et al.* Shear Stress Regulates Forward and Reverse Planar Cell Polarity of Vascular Endothelium In Vivo and In Vitro. *Circulation Research* **98**, 939–946 (2006).
61. Tzima, E. *et al.* A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature* **437**, 426–431 (2005).
62. Boon, R. A. *et al.* KLF2-induced actin shear fibers control both alignment to flow and JNK signaling in vascular endothelium. *Blood* **115**, 2533–2542 (2010).
63. Ghaffari, S., Leask, R. L. & Jones, E. A. V. Flow dynamics control the location of sprouting and direct elongation during developmental angiogenesis. *Development* dev.128058 (2015) doi:10.1242/dev.128058.
64. Moran, E. P. *et al.* Neurovascular cross talk in diabetic retinopathy: Pathophysiological roles and therapeutic implications. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **311**, H738–H749 (2016).
65. Wang, Y. *et al.* Ephrin-B2 controls VEGF-induced angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature* **465**, 483–486 (2010).
66. Stuart, T. *et al.* Comprehensive Integration of Single-Cell Data. *Cell* **177**, 1888-1902.e21 (2019).
67. Denu, R. A. *et al.* Polo-like kinase 4 maintains centriolar satellite integrity by phosphorylation of centrosomal protein 131 (CEP131). *J Biol Chem* **294**, 6531–6549 (2019).
68. Asano, Y. & Horn, E. Chemotaxis and Migration Tool 2.0. (2013).
69. Stringer, C., Wang, T., Michaelos, M. & Pachitariu, M. Cellpose: a generalist algorithm for cellular segmentation. *Nat Methods* **18**, 100–106 (2021).

## Methods

### Mouse models

This scientific study was carried out on murine models bred according to the European Directive 2010/63/UE on the protection of animals used for scientific purposes. It was approved by the local Animal Care and Use Committee of Bordeaux University. Murine model of endothelial deletion of *Mcc* (*Mcc*<sup>IECKO</sup>), maintained under C57BL6/J background, was designed by crossing *Cdh5*(PAC)-CreERT2 mice (Wang et al., 2010) and *Mcc*<sup>ff</sup> mice. To study endothelial polarity in our model, we crossed GNrep mice with *Cdh5*(PAC) Cre<sup>ERT2</sup> *Mcc*<sup>ff</sup>. GNrep Cre<sup>+</sup> Control mice were generated by crossing GNrep mice with *Cdh5*(PAC) Cre<sup>ERT2</sup> *Mcc*<sup>f/+</sup>.

Tails of pups were genotyped by PCR using the following primers: 5'- CCC AAA CTC ATG TGT GTT GTT CC 3' and 5'- CCT TCC CTT TCT TCC TGT GAT TAG C 3' (*Mcc*<sup>ff</sup>), 5'- TAA AGA TAT CTC ACG TAC TGA CGG TG-3' and 5'- TCT CTG ACC AGA GTC ATC CTT AGC-3' (*Cdh5*(PAC)CreERT2) and 5'- CCC GTA ATG CAG AAG AAG AC-3' and 5'- GCA GAT CTT CTG CGA GGA CC-3' (GNrep).

Cre recombinase relocalization to the nucleus was induced by intraperitoneal injection of 1mg/mL Tamoxifen (Sigma, T5648) diluted in corn oil (Sigma-Aldrich, #C8267-500ML) at P3, P4 and P5 for a sacrifice at P6. Mice were euthanized by decapitation unless specified otherwise. Mice treated with Captopril (Sigma, C4042) were injected intraperitoneally at P3, P4 and P5 with a solution at 0,2 µg/g.

### Staining of mice retina

Mice retinas were harvested and fixed for 20 minutes with 4% paraformaldehyde (diluted from Euromedex, EM-15710). After dissection, retinas were permeabilized and saturated for 2 hours at RT with a buffer containing PBS, 5% BSA (Merck, 10735086001), 0.5% Triton (Fisher, 11498696) and 0.5mM CaCl<sub>2</sub>. They were then incubated overnight at 4°C under agitation with primary antibody solution. We used anti-CD31 (BMA, T-2001, 1:200) or Isolectin B4 FITC-conjugate (Sigma, I2895-1MG, 250µg/mL) for staining blood vessels, anti-Collagen IV (Abcam, ab19808, 1:400) for staining extracellular matrix and anti-ERG (Abcam, ab92513, 1:200) for staining endothelial nuclei. The next morning, retinas were washed 3 times for 5 minutes with PBS and incubated for 3 hours at RT under agitation with the appropriate secondary antibodies. Retinas were then washed thrice 5 minutes with PBS before being mounted on glass slides with Fluoromount-G mounting medium (Southern Biotech, 0100-01). Images were acquired by Z-stacked tiles-scan using Zeiss Confocal LSM 700 equipped with Zen Software.

### **Characterization of retinal vascular plexus perfusion**

Mice were injected retro-orbitally with 2mg of sulfo-NHS Biotin (Fisher, 11851185), resuspended in 20 $\mu$ L of NaCl, 5min before sacrificing. Retinas were treated as previously described. Concomitantly with IB4 staining, retinas were incubated with Streptavidin Alexa Fluor conjugated (Invitrogen, S21374) for labelling biotin which fixes the luminal wall of perfused blood vessels.

### **Retinal endothelial proliferation**

Proliferation of endothelial cells in the retina was studied using EdU revelation kit (Invitrogen, 10063724). Mice were injected intraperitoneally with EdU (Invitrogen, A10044) 4 hours before sacrifice. Retinas were harvested, fixed and permeabilized as previously described. They were washed for 30 minutes with PBS 3% BSA before revealing EdU following the manufacturer's protocol. Retinas were incubated with IB4 FITC conjugated and anti-ERG antibodies after EdU revelation as described previously. Proliferative endothelial cells were counted by identifying EdU<sup>+</sup>/ERG<sup>+</sup> nuclei. Proliferation was quantified at the sprouting front.

### **Quantification of retinal vascular plexus parameters**

Retinal vascularization corresponds to the ratio between vascularized and total retina area. Vascular density around arteries and veins was quantified by surfacing blood vessel labelling area inside a ROI. The ROI around arteries and veins were delimited in comparable zones, in the intermediary region between optic nerve and sprouting front. Sprouting front density was measured in a ROI delimiting the first 350 $\mu$ m of a petal. The labelling surface has been related to the ROI area. For each mouse, 3 arteries, veins and sprouting front were measured. These quantifications were made with ImageJ software. The number of sprouting was manually counted by pointing all the sprouting at the vascular front edge for 2 petals for each mouse. Vascular regression was quantified by counting manually the number of COLIV<sup>+</sup>/IB4<sup>-</sup> segments. Six photos per retina were taken.

### **Quantification of endothelial polarity in mouse retina**

Polarity in mouse retina was quantified thanks to GNrep mouse model. 100 polarity angles were manually calculated per mouse thanks to the direction of blood flow in both arteries and veins and to the position of the golgi apparatus. At the sprouting front, the polarity angle was calculated in more than 100 cells per mouse thanks to the direction of sprouting (CD31 labelling), which represents the VEGF gradient sensing, and the position of the golgi apparatus. Angles were classified between 3 classes: "front" (0°- 45° and 315° - 360°), "side (45° - 135° and 225° - 315°) and "rear" (135° - 225°). Polarity index were calculated according to following formula, established by Claudio Franco's team.

$$\sqrt{\left(\frac{1}{N} \sum_1^N \cos \alpha\right)^2 + \left(\frac{1}{N} \sum_1^N \sin \alpha\right)^2}$$

### **Mouse lung endothelial cells extraction**

Lung endothelial cells were isolated from a single lobe with Miltenyi's Lung Dissociation Kit (Miltenyi, 130-095-927). Mice were euthanized by an overdose of pentobarbital injected intraperitoneally (120 mg/kg). Mice were then perfused with NaCl in the apex to exsanguinate them. Lungs were totally minced before being transferred in Miltenyi C-tubes (Miltenyi, 130-096-334) in an enzyme mix prepared as detailed in the manufacturer's guidance. Lungs were then digested with the 37C\_M\_LDK\_1 program of the GentleMACS™ Octo Dissociator with Heaters (Miltenyi, 130-096-427). Digested lungs were filtered with a 70µ Smart Cell Strainer (Miltenyi, 130-110-916). Filtrates were then centrifugated for 6 minutes at 500g and pellets were resuspended in 100µL of PBS 2mM EDTA (Euromedex, EU0084-A) + 0.5% BSA and incubated for 45 minutes under rotation at 4°C with anti-CD31 magnetic beads (Miltenyi, 130-097-418). Endothelial cells were then eluates on LS-columns (Miltenyi, 130-042-401) as specified in the manufacturers' guidance. Pellets obtained after elution are ready to be processed for RNA extraction.

### **Cell culture, transfection, transduction and treatments**

Human Brain Microvascular Endothelial Cells (HBMEC, AlphaBio Regen, ALEH02) and Human Umbelical Veins (HUVEC, Lonza, C2517A) were cultivated in endothelial basal medium-2 (EBM-2, Lonza, CC-3156) supplemented with EGM-2 bullet kit (Lonza, CC-3162). Cells from passage 3-7 were used. Cells were transfected 24 hours after seeding, when 70% of confluence is reached, with small interference RNA (siRNA) at a final concentration of 30nM using Interferin (Polypus, 201000003) as the transfection agent following the manufacturer's recommendation. siRNA targeting *MCC* (5'- GGG AGG AAG AUG AGU ACU Ctt-3' and 5'- GAG GUA CUC AUC UUC CUC CCtg-3' and *CEP131* (5'- GUU GAG AUG CCC ACG GCU Att-3' and 5'- UAG CCG UGG GCA UCU CAA Ctt-3') were used. HUVECs were also transduced with Lentivirus, produced by the Bordeaux vectorology platform Vect'UB, at a rate of 10 MOI. Transduction was potentialized with 5µg/mL of protamin sulfate (Sigma, P4505). HEK and HeLa were cultivated respectively in RPMI 1640 (Gibco, 11875-093) and high-glucose DMEM (Gibco, 11965-092) both supplemented with 10% SVF (Gibco, A52067-01) and 1% L-Glutamine (Gibco, 25030-081). They were transfected with plasmids 24h hours after seeding, when 70% of confluence is reached, using Jet Prime (Polypus, 101000015) diluted in Jet Prime buffer (Polypus, 201000003) as the transfection agent following the manufacturer's guidance. Cells were transfected with *MCC*-Flag<sup>29</sup>, *CEP131*-Flag or *CEP131*-GFP (Denu et al., 2019), Ub-HA (Addgene, 17608), p62-mCherry (Addgene, 187986) and *Pdzrn3*-

V5<sup>14</sup> plasmids inserted in the lentiviral plasmid pRRLsin.MND.MCS.WPRE (VECT'UB). Canonical and non-canonical Wnt pathway were stimulated using respectively 100ng/ $\mu$ L recombinant human Wnt-3a (Biotechne, 5036-WN-010) and Wnt-5a (Biotechne, 645-WN-010) for 1 hour, unless specified. Autophagy was inhibited by treated cells with 160nM Bafilomycin (Sigma, 3739614) for 4 hours after 4 hours of in HBSS for starvation unless specified.

### ***In vitro immunostaining***

Endothelial cells were fixed with 8% paraformaldehyde diluted volume by volume with culture medium. Cells were incubated for 30 minutes at 37°C then washed with PBS. For HEK, they were fixed for 10 minutes at RT with 10% formaline (Diapath, F0043). Cells were permeabilized with a solution of PBS-Triton 0.5% for 5 minutes and then saturated for at least 30 minutes with a solution of PBS donkey serum (Interchim, UP77719A K) 5% at RT. Cells were incubated overnight at 4°C with primary antibodies diluted in the blocking solution (anti- $\beta$ -Tubulin, Sigma - T5168, 1:400; anti-Flag, Cell Signaling – 2368, 1:400; anti-LAMP2, Santa-Cruz - SC-19991, 1:200 ; anti-MCC, BD Biosciences – 610740, 1:200 ; anti-Pericentrin, Abcam - ab4448, 1:400 ; anti-VE cadherin, Santa-Cruz - sc-9989, 1:400; Rhodamine-Phalloïdine, Invitrogen - R415, 1:400; anti-V5, Invitrogen – 46-0705, 1:400). Next morning, cells were washed thrice with PBS for 5 minutes before being incubated with the appropriate secondary antibodies for 2 hours at RT. Cells were finally mounted under glass slices with Dapi-Fluoromount-G (Southern Biotech, #0100-20). Images were analyzed with Zen blue (version 3.5, Zeiss) and Imaris (Bitplane v9.7.2).

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

Proteins were extracted from cells by lysis with RIPA supplemented with a cocktail of anti-proteases and anti-phosphates (aprotinine, Euromedex, A162-B, 2  $\mu$ g/mL; leupeptine, Euromedex, SP-04-2217, 10  $\mu$ g/mL; AEBESF, Euromedex, 50985-A, 0.5 mM; orthovanadate, Sigma-Aldrich, SB0869-A, 1mM; okadaic acid, Sigma-Aldrich, 0-900, 1nM). Cells were collected with a cell scrapper and put on ice for 45 minutes for lysis. Lysates were then centrifugated at maximum speed for 10 minutes and supernatants collected for quantification. Protein quantification was determined using the Pierce™ BCA Protein Assay (ThermoScientific, # 23225) according to the manufacturer's guidance. For western blotting, lysates were diluted with 5X Laemmli buffer and heated 10 minutes at 98°C before being loaded and separated in 7 or 9% polyacrylamid gels, depending on proteins of interest, along with 3 $\mu$ L of protein ladder (Euromedex, 06P-0111). Proteins were then transferred on PVDF membranes for 90 minutes. After transfer, membranes were blocked in PBS-Triton 0.5% and 5% milk solution for at least 30 minutes. Membranes were then incubated overnight at 4°C on agitation with primary antibodies diluted in blocking solution (anti- $\beta$ -Tubulin, Sigma, T5168, 1:30 000; anti-c-jun, Cell Signaling, 9165S ,

1:500; antiCEP85, Bethyl, A303-325A-T, 1:500; anti CEP131, Bethyl, A301-415A, 1:500; anti-Flag, Cell Signaling – 2368, 1:1000; anti-Flotillin-2, Santa Cruz, sc-28320, 1:1000; anti-LAMP2, Santa Cruz, SC-19991, 1:500; anti-MCC, Santa-Cruz, sc-398216, 1:500; anti-p62, Cell Signaling – 5114, 1:1000; anti p-c-jun, Cell Signaling, 9261S, 1:500; anti-V5, Invitrogen – 46-0705, 1:1000). Next morning, membranes were washed with PBS-Triton 0.5% and then incubated with the appropriate secondary antibodies for 3 hours at RT under agitation. Membranes were revealed with Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences).

### ***Immunoprecipitation***

ECs and HEKs were seeded in 6-well plates. They were scrapped on ice in 200 µL of lysis buffer (Tris pH 8 50mM, 1% NP40 (Euromedex, UN3500-A) et NaCl 150mM. Three wells were pooled for each conditions. The following of lysis and protein quantification is performed as described above. 250 µg of proteins were incubated for 3 hours at 4°C under rotation with 1µg of antibody (anti-MCC, Santac-Cruz – sc-398216; anti-mono and polyubiquitin, Bio-Rad – MCA6035; anti-V5 antibody, Invitrogen – 46-0705) and then overnight with with Pierce™ Protein A/G Magnetic Agarose (ThermoFisher, 78609). Beads with co-immunoprecipitated proteins were captured thanks to a magnetic bench and the throughput is discarded. Beads were then washed with the lysis buffer. Elution was performed with 50µL of 2.5X Laemmli buffer and eluates were boiled for 10 minutes at 98°C and. They were ready to be processed by western blotting.

### ***Biold samples preparation***

Biold protocol was used to find new interacting partners of proteins of interest. The sequence of *PDZRN3 TRIM47* and *MCC* genes were inserted in pcDNA3 V5 TurboID NES (Addgene, 107169). This plasmid encodes for the turbo biotin ligase BirA\* with a cytosolic addressing peptides and our genes of interest were inserted in the plasmid so that BirA\* is fused at the N-terminal region. HBMECs were seeded in 2 P100 Petri dishes per conditions. 2 days after transduction, HBMECs were cultivated with cell culture medium supplemented with 50µM of biotin (Sigma-Aldrich, B4501) for 3 hours. Cells were then scrapped in 750µL of lysis buffer (50mM Tris pH 8, 150mM NaCl, 0.1% SDS (Euromedex, EU0660-B), 0.5% NaDoc (Fisher, 302-95-4), 1% Triton) supplemented with anti-proteases and anti-phosphatases cocktail and mechanically lysed for 25s at 30 Hz with a Tissue Lyser (Qiagen) with inox beads. After protein quantification, 500mg of proteins were incubated overnight with 50µL of magnetic streptavidin beads (Pierce, #88816). Next morning, biotinylated proteins captured by streptavidin beads were separated from non-biotinylated proteins with a magnetic bench. Magnetic beads were washed twice with wash buffer (150mM Tris pH 8, 500mM NaCl, 1% SDS, 3% NaDoc, 2% Triton) and then twice with a second

wash buffer (50mM Tris pH8) for discarding Triton residues. Biotinylated proteins were eluted with 150µL of elution buffer (Tris pH8 50mM + 2% SDS) and heated for 10 minutes at 98°C.

### **LC-MS/MS analysis and measurements**

Samples eluted from Streptavidin beads were subjected to 1D SDS-PAGE and excised after colloidal blue staining (BioID). Peptide sample preparation and LC-MS/MS analysis were performed in collaboration with the proteome platform of the Functional genomic center of Bordeaux (CGFB). Briefly, the excised gel pieces were destained, reduced with DTT and alkylated iodoacetamide. Excess reagents were washed out and Trypsin in-gel digestion will be performed. Tryptic peptides were extracted from gel plugs, dried and resuspended in 2% acetonitrile with 0.05% trifluoroacetic acid (TFA). The LC-MS/MS measurements of peptide solutions were carried out on Q-Exactive mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific). Samples were injected on a C18 precolumn (Acclaim PepMap™) and further separated on a 75 µm ID x 15 cm nanoviper C18 reversed phase column (Acclaim PepMap RSLC) with gradient from 4% to 40% ACN in 0.1% formic acid for 120min min at a flow rate of 300 nL/min. Full MS scans were acquired in the Orbitrap mass analyzer over m/z 300–2000 range.

### **LC-MS/MS data analysis**

All LC-MS/MS were analyzed with Proteome Discoverer 1.4. The data were combined and peptides and proteins were searched using Mascot from database against a non-redundant UniProtKB database with *Homo sapiens* taxonomy restriction. Quantification were performed using MaxQuant and differential expression analysis were performed using one-way ANOVA within the two-experimental group (treated/ control). Proteins with p value < 0.05 satisfying a fold change (treated/control) greater than 2 or less than 0.5 will be considered differentially regulated considering n=3 per group as a number of biological replicates analysed.

### **RNA extraction, cDNA synthesis and RT-qPCR**

Cells are lysed with 400µL of TRI-REAGENT (MRC, TR 118) and RNA are extracted using Direct-zol RNA Microprep (Ozyme, ZR2063) following the manufacturer's protocol. RNA concentration was quantified using Spark® multimode microplate reader (Tecan). cDNA were synthesized by retro-transcription based on 500ng of RNA for each samples using Moloney Murine leukemia virus reverse transcriptase (Promega, M1701). Amplification for RT-qPCR is performed with thermocycler Quant Studio 3 (Thermo Fisher) using GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, A6002). Relative expression levels of genes of interest were normalized with the expression levels of housekeeping genes such as p0 for *in vitro* studies and *Pecam1* for *in vivo* studies. *In vitro* results are represented by three independent experiments and each conditions were studied in

triplicates. For *in vivo* studies, each point was performed in triplicates and represent an animal. Primers used for qPCR analysis are provided in supplemental table 1.

**Table 1: qPCR primers listing**

Target	Sens	Anti-sens
hAxi2	TGC TCT GTT TTG TCT TAAAGG TCT TGA	ACA GAT CAT CCC ATC CAA CAC A
hCEP131	GTC CTG AGT GAA AAG TGC GAG G	GCT TTC TCG GTG GCG CTC ATT A
hKLF2	ACT CAC ACC TGC AGC TAC GC	TGC AGT GGT AGG GCT TCT CA
hLEF1	GGAAGC TTG TTG AAAACC CAG	GCT CTT GCA GTA GAC GAAAG
hMCC	GAG GTG GAAACA GAA CGG CTG A	GCT CAT CCT CTC GGC ATT GCT T
mMcc	GGC TCG GAAATC AGT AGC ATC G	GAT GGC AGA TCC GTG TGA GTA G
P0	GCG ACC TGG AAG TCC AAC T	CCA TCA GCA CCA CAG CCT TC
mPecam1	AGG GGA CCA GCT GCA CAT TAG G	AGG CCG CTT CTC TTG ACC ACT T

### **Parallel plate flow model**

For analysing endothelial migration with the flow, HBMECs were seeded in parallel capillaries perfused by culture medium. We used ibidi-treated  $\mu$ -Slide VI 0.1 (Ibidi, 80666) multi-parallel plates. 4 hours after seeding, unidirectional and constant laminar flow was perfused thanks to peristaltic pump (Gilson, F155006) in capillaries at 11 dynes/cm<sup>2</sup> for 4 hours. This device was maintained under a Axio-observer (Zeiss) video microscope in a cell-culture chamber. Phase contrast photos of each capillary were taken each 15 minutes and endothelial migration was tracked thanks to ImageJ and Chemotaxis software (Asano & Horn, 2013). In case of knock-down experiments, culture under flow condition was performed 48 hours after transfection.

### **Orbital flow model**

HUVECs were plated in 6-well plates on glass slices coated with 0.1% gelatin (Gibco, 14190-144) and exposed to shear stress for 48 hours using an orbital shaker (VWR, 444-2906) at 110 rpm,

corresponding to 3,5 dynes/cm<sup>2</sup>. For protein or RNA extraction, cells were not seeded on glass slices and only peripheral cells were harvested. For immunostaining analysis, only cells in the same region were studied. Immunostaining, protein and RNA extraction are performed as described before.

### ***In vitro polarity quantification***

Orbital flow-cultured HUVECs were processed for junctions and centrosome immunostaining with respectively anti-VE cadherin and anti-Pericentrin antibodies as described previously. Confocal images were taken with LSM 700 microscope (Zeiss), at a rate of 5 images per conditions. Photos were processed by PolarityJam software<sup>37</sup> for calculating polarity angles, polarity index and cell eccentricity. Briefly, PolarityJam takes a parameters file, encoded by user, as a reference for determining which channel correspond to nucleus, membrane and polarity organelle. This file also determines the segmentation algorithm for individualizing each cell. In this case, we use the Cyto algorithm. This file also defines thresholds for cell, nucleus and polarity organelle size as well as the direction of flow. This file is available on PolarityJam website: <https://polarityjam.readthedocs.io/en/latest/>. Then we made PolarityJam processing images of the same condition in bulk and it return a spreadsheet with all parameters calculated for each cell in each image. There is also a spreadsheet with all data of the bulk processing that is generated. PolarityJam also create ready to present figures representing polarity and eccentricity calculations. Finally, HUVECs treated with a siRNA display a very different shape, more elongated. Therefore the Cyto segmentation algorithm is unable to individualize cells correctly. As recommended by PolarityJam creators, we used CellPose (Stringer et al., 2021) program to process to siMCC HUVECs segmentation. Manual segmentation was used with Cell Pose which create a new file related to the processed image. PolarityJam uses automatically this file for segmentation instead off the Cyto algorithm.

### ***Migration breach assay***

Endothelial migration was addressed using breach assay. Cells were seeded in Culture-Insert 2 Well in  $\mu$ -Dish 35 mm (Ibidi, 80206) at 30 000 cells/chamber 24h after siRNA transfection. Next day, cells are starved overnight (EBM-2, 1% FBS, 0.25% BSA). Next morning, the culture insert is removed and 50ng/mL of VEGF-A (Shenendoah, #100-44) are added in the culture medium for triggering endothelial migration. A phase-contrast tile photo of each breach is taken with Axio-observer (Zeiss) at T0 and T12 hours. Breach closure is quantified by measuring the area of the breach at T0 and T12. The closure is calculated thanks to the following formula:  $(T12-T0)/T0$ . Data are represented by a mean of 3 independent experiments, each performed in triplicates.

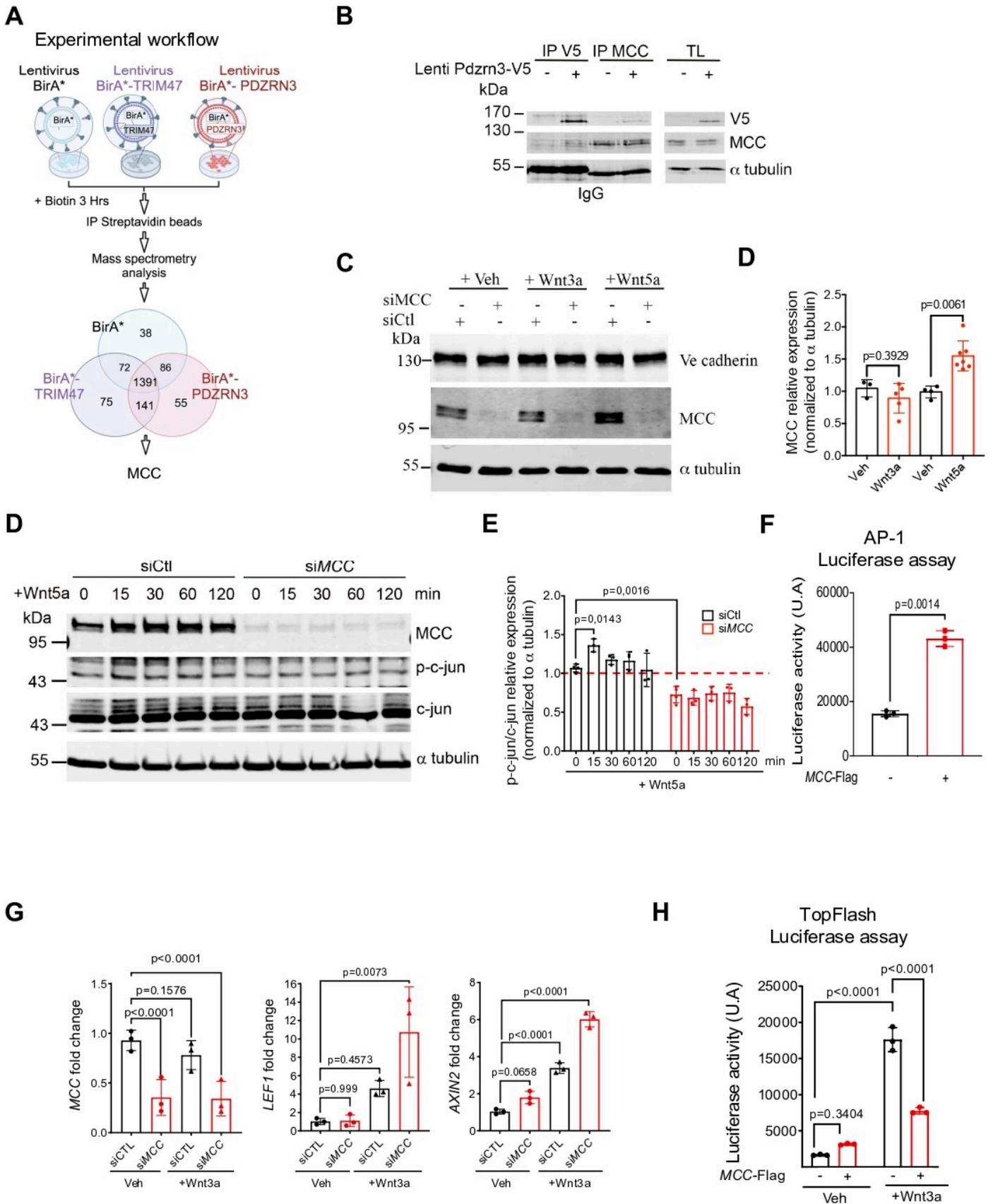
**Top-luciferase and AP1-luciferase reporter system**

Transactivation of TopFlash and AP1-Luc plasmids were performed in HeLa cells. Cells were seeded in 24-well plates and transfected at 70% of confluency with 0.2µG of 8XTOPflash reporter (Nusse Lab) or AP1-LUC and with 0.05µG of MCC-flag plasmid. Empty MND plasmid was added to reach a quantity of 0.4µg of plasmid. 2 days after transfection, cells were lysed for 30 minutes under agitation with a passive lysis buffer (Promega, #E194A). 10µL of lysates were transferred in 96-well plates in triplicates for each well and completed with 50µL of luciferase substrate (Promega, E1501). Each condition was repeated thrice. Luminescence is read with Spark® multimode microplate reader (Tecan). HeLa were treated with Wnt-3a or vehicle overnight before lysis.

**Statistical analysis**

Statistical analysis were all performed with GraphPad Prism7 software. We considered a statistical test significative when p-value is lower than 0.05. P-values are indicated on graphics and the corresponding statistical test is mentioned in the legend as well as the number of replicates. The significance of a replicate is explained in the protocol section of the corresponding experiment. Two groups of biological samples were compared using unpaired non-parametric Mann-Witney test, as the normality of our samples was not confirmed. To compare more than two groups, we used Sidak's multiple comparison test. Finally, One-way ANOVA was used to compare if a group of samples characterized by more than one parameter (multiple time points, angle classifications, etc.) are significantly different.

Figure 1



**Figure 1: MCC is a new actor of endothelial Wnt-non canonical signalling**

**(A)** Experimental workflow for MCC interaction partners using BioID: following lentiviral transduction of BirA either fused to MCC, or TRIM47 or alone, HBMEC were treated during 3 Hrs with biotin and subsequently immunoprecipitated. Protein samples were sequenced using tandem mass spectrometry. Resulting protein protein interactions (PPI) were presented as venn diagram indicating the PPI overlap.

**(B)** HBMEC were infected with either lentivirus coding for PDZRN3-V5 (+) or control (-). MCC or V5 immunoprecipitation (IP) was performed on cell lysates. Lysates were analysed by immunoblotting with antibodies specific to indicated proteins.

**(C)** Lysates from HUVECs depleted for *MCC* for 48h and treated either with vehicle (Veh), or 100ng/ $\mu$ L of human recombinant Wnt3a or Wnt5a for 1h were analysed by immunoblotting with antibodies specific to indicated proteins.

**(D)** Densitometric quantification of MCC levels relative to  $\alpha$  tubulin represented in B (mean  $\pm$  SD, n=3, Mann-Whitney's test).

**(E)** Lysates from siCTL or siMCC, treated with vehicle or 100ng/ $\mu$ L of Wnt-5a for indicated time were analysed by immunoblotting with antibodies specific to indicated proteins.

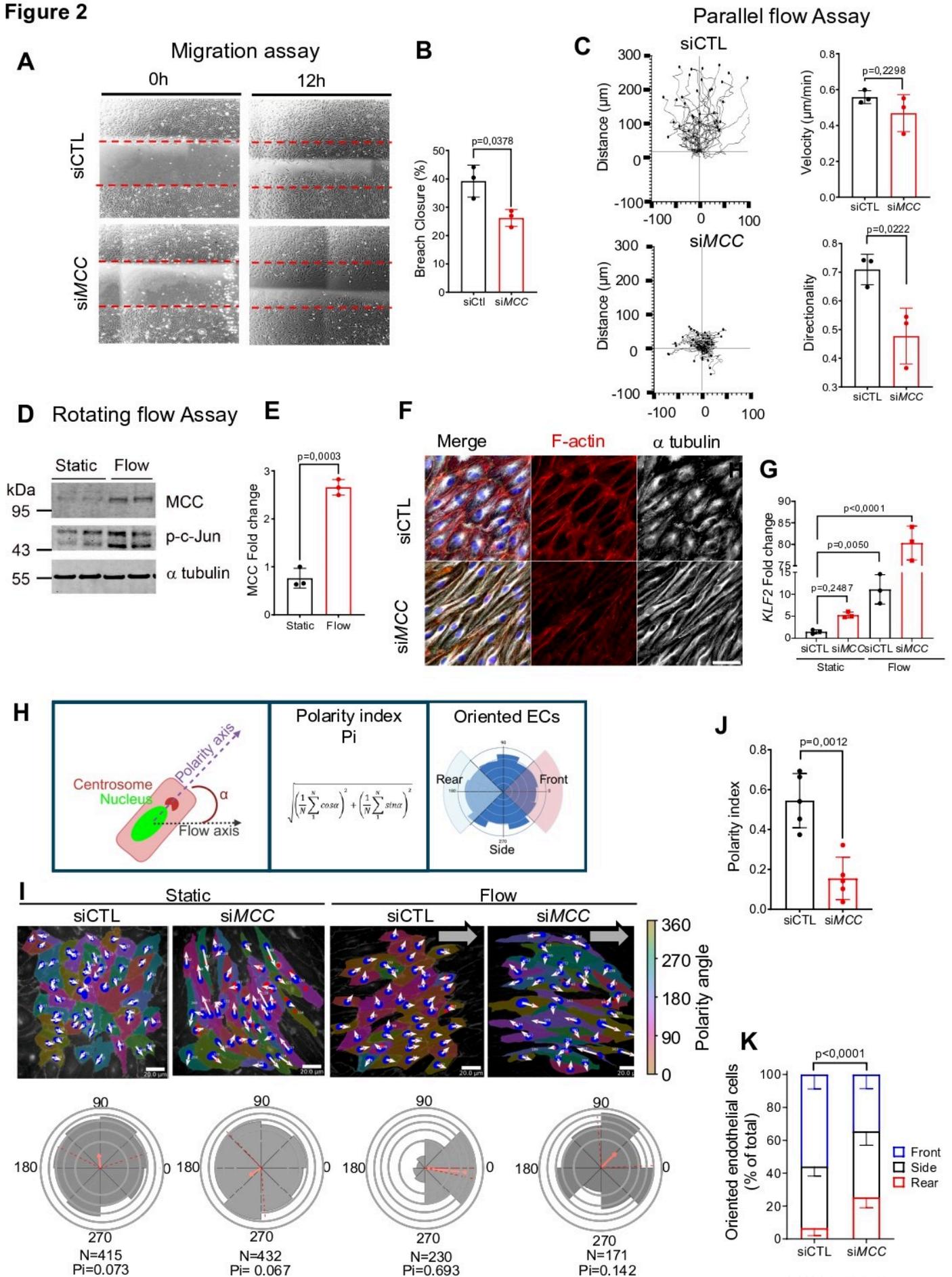
**(F)** Densitometric quantification of p-c-Jun/c-Jun ratio relative to  $\alpha$  tubulin levels represented in E. (mean  $\pm$  SD, n=3 independent experiments, Ordinary one-way ANOVA).

**(G)** HeLa cells were transfected with AP1-luciferase with control plasmid or with both AP1-luciferase and *MCC-Flag* plasmid. Cell lysates luminescence in presence of luciferase substrate was quantified. Data represent means  $\pm$  SD. N=3 experiments. P-values obtained with Mann-Whitney's test.

**(H)** The RNA expression levels of *MCC*, *LEF1* and *AXIN2* were assessed by qPCR in siCTL and siMCC HUVECs treated with 100ng/ $\mu$ L Wnt3a for 1hr. (mean  $\pm$  SD, n=3, fold change using *P0* as housekeeping gene for normalization, Sidak's multiple comparisons test).

**(I)** HeLa cells were transfected with TopFlash and control plasmid or with both TopFlash and *MCC-Flag* plasmids and treated 48h later with vehicle or Wnt3a (100 ng/ $\mu$ l) overnight. Cell lysates luminescence in presence of luciferase substrate was quantified. Data represent means  $\pm$  SD. N=3 experiments. P-values obtained with Sidak's multiple comparison test.

Figure 2



**Figure 2: MCC depletion impairs non-canonical Wnt endothelial functions**

**(A)** Representative phase-contrast images of siCTL and siMCC ECs at t=0 and 12h after removing the chamber. The red dotted lines highlight the unclosed wound area.

**(B)** Quantification of breach closure. (mean  $\pm$  SD, n=3 independent experiments, Mann-Whitney's test).

**(C)** Representative trajectory plot of siCTL and siMCC ECs exposed to laminar flow 11 dynes/cm<sup>2</sup> during 4 hrs by time-lapse imaging of ECs. Cell tracks were determined by cell nuclei position to quantify velocity and directionality index. (mean  $\pm$  SD, n=3 independent experiments with 30 cells analysed per experiments, Mann-Whitney's test).

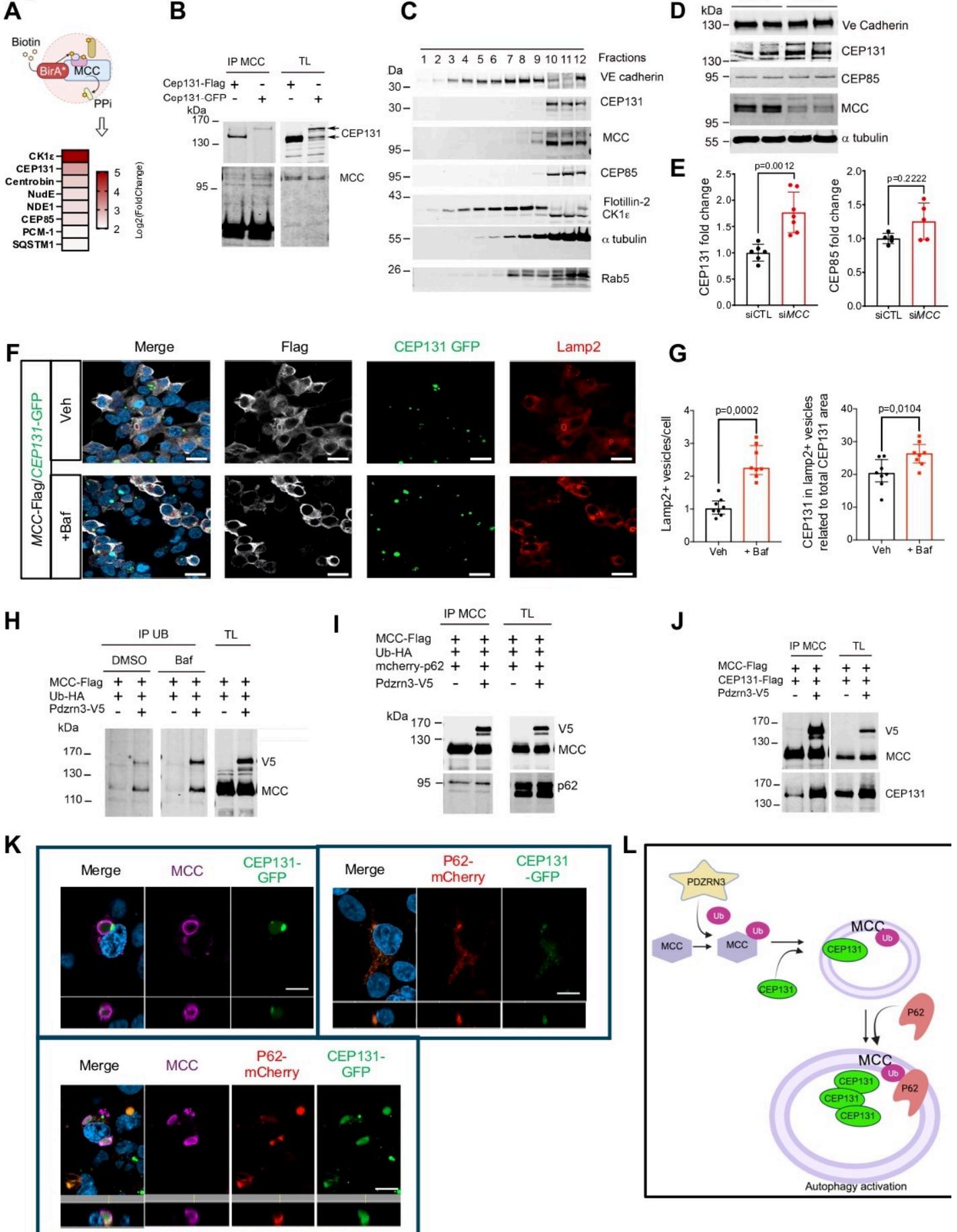
**(D-G)** siCTL and siMCC HUVECs were cultivated under static or orbital flow condition at 3.5 dynes/cm<sup>2</sup> for 48h. **(D)** Cell lysates analysis by immunoblotting with antibodies specific to indicated proteins. **(E)** Densitometric quantification of MCC levels relative to  $\beta$  tubulin represented in D (mean  $\pm$  SD, n=3, Mann-Whitney's test). **(F)** Representative confocal images revealing cytoskeleton organisation after cell labelling with antibody against phalloidin (F-actin, red) and anti  $\beta$  tubulin (white). Nuclei were stained with Dapi (blue), Scale bar =50 $\mu$ m. **(G)** Quantification of KLF2 expression levels by qPCR. (mean  $\pm$  SD, n=3, fold change using P0 as housekeeping gene for normalization, Sidak's multiple comparison test).

**(H)** schema for the index polarity calculation: the polarity angle ( $\theta$ ) was measured using Polarity JaM software and calculated based on the flow axis and the nucleus-centrosome axis. The polarity index (Pi) was determined using the specified formula. The oriented ECs were categorized into front, side, and rear groups. **(I)** Representative images of the axial polarization pattern of ECs under static and flow conditions, scale bar =50 $\mu$ m. Polarity angles of ECs were plotted on rose plots along with the corresponding cell number (N) and Pi.

**(J)** Polarity index quantification of siCTL and siMCC treated ECs. (mean  $\pm$  SD, n=5 independents experiments. Mann-Whitney's test).

**(K)** Quantification of oriented ECs (mean  $\pm$  SD, n=5 independents experiments, Sidak's multiple comparison test).

Figure 3



**Figure 3: MCC ubiquitination favours its interaction with the centrosomal protein CEP131 for regulating its protein level through autophagy**

**(A)** BioID strategy for finding new interacting partners of MCC.

**(B)** 293HEK were transfected with plasmids coding for CEP131 either fused with Flag or GFP tag. MCC immunoprecipitation (IP) was performed on cell lysates. Lysates were analysed by immunoblotting with antibodies specific to indicated proteins.

**(C)** HUVEC lysates were fractionated into 12 fractions by ultracentrifugation. Each fraction was analysed by Western blotting with the indicated antibodies.

**(D)** Lysates of siCTL or siMCC HUVECs were analysed by Western blotting with the indicated antibodies and **(E)** CEP131 and CEP85 relative expression to  $\alpha$  tubulin were quantified (mean  $\pm$  SD. Mann-Whitney's test).

**(F)** Confocal images of 293HEK co-transfected with plasmids coding for CEP131-GFP and MCC-Flag treated with 150 $\mu$ M of bafilomycin (Baf) or vehicle (Veh) for 4h. MCC (white) and LAMP2 (red) immunostaining show localization of CEP131 (green) in Lamp2<sup>+</sup>/MCC<sup>+</sup> vesicles. Scale bar =10 $\mu$ m.

**(G)** Quantification of Lamp2<sup>+</sup> vesicles number and quantification of CEP131 fluorescence area in MCC<sup>+</sup>/Lamp2<sup>+</sup> vesicles reported to total CEP131 fluorescence (mean  $\pm$  SD, n=8 independents experiments, Student's test).

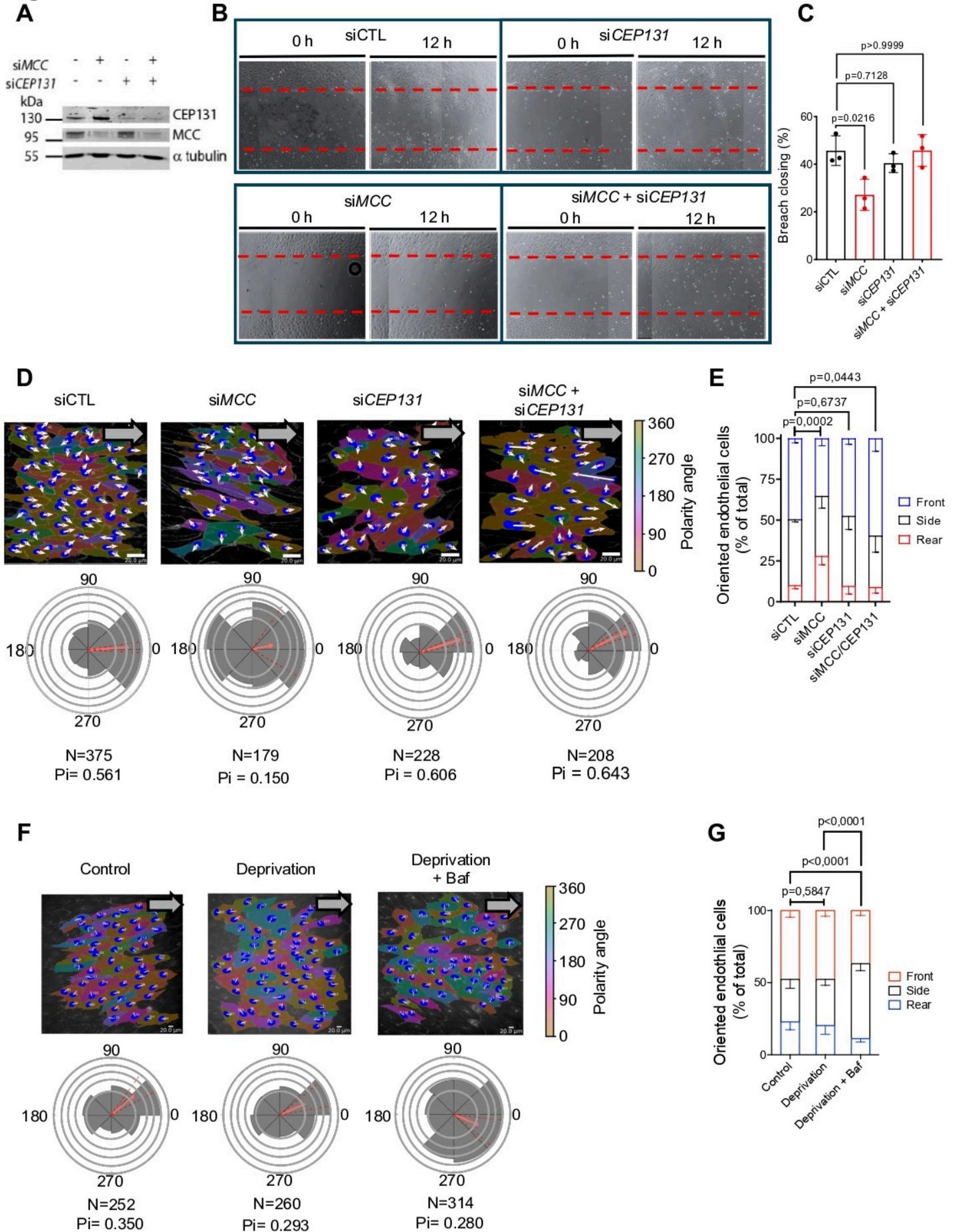
**(H)** 293HEK were transfected with plasmids coding for MCC-Flag, Ubiquitine-HA and PDZRN3-V5 and treated with Baf or vehicle (DMSO) for 4h. Ubiquitine (Ub) immunoprecipitation (IP) was performed on cell lysates. Lysates were analysed by immunoblotting with antibodies specific to indicated proteins.

MCC immunoprecipitation (IP) was performed on cell lysates from **(I)** 293HEK were transfected with plasmids coding for MCC-Flag, Ubiquitine-HA, p62-mcherry and PDZRN3-V5, or **(J)** transfected with plasmids coding for MCC-Flag, CEP131-Flag and PDZRN3-V5. Lysates were analysed by immunoblotting with antibodies specific to indicated proteins

**(K)** colocalization of MCC, CEP131-GFP and p62-mcherry in large MCC<sup>+</sup> vesicles. Scale bar =10 $\mu$ m.

**(L)** Schematic diagram of autophagy induction by MCC in ECs: ubiquitination of MCC by PDZRN3 induced recruitment of CEP131 in vesicle along with P62 to induce its degradation via autophagy

Figure 4



**Figure 4: Restoring a low level of CEP131 in endothelial cells, that are depleted of MCC, improves their migration and corrects polarity defects.**

**(A)** Lysates of ECs transfected with siCTL, siMCC, siCEP131 or siMCC+siCEP131 were analysed by Western blotting 48h post-siRNA treatment with the indicated antibodies.

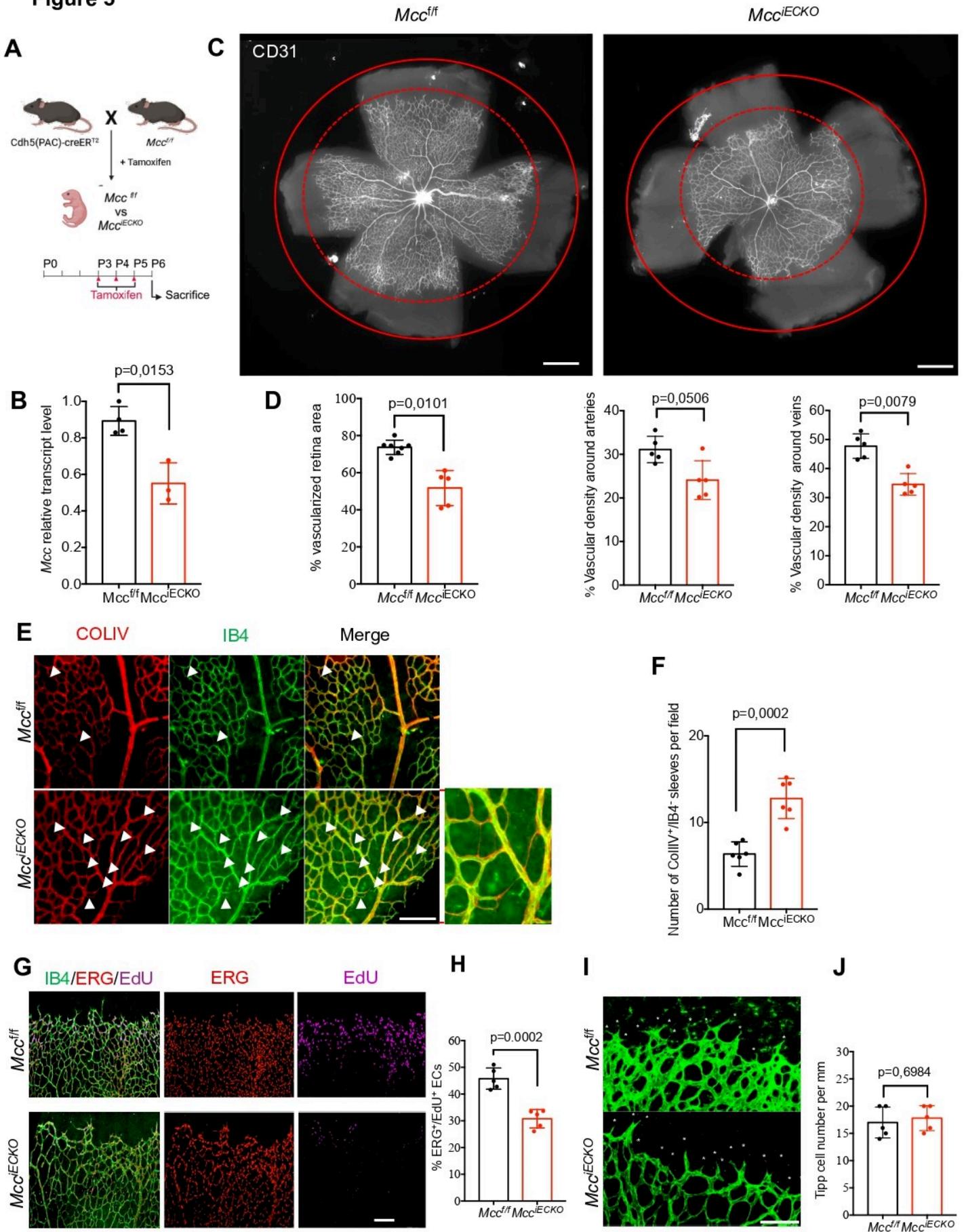
**(B)** Representative phase-contrast images of siCTL, siMCC, siCEP131 and siMCC + siCEP131 HUVECs at t=0 and 12h after removal of the chamber. The red dotted lines highlight the unclosed wound area.

**(C)** Quantification of breach closure. (mean  $\pm$  SD, n=3 independent experiments, Sidak's multiple comparison test).

**(D-F)** siCTL, siMCC, siCEP131 or siMCC+ siCEP131 HUVEC were exposed to 3.5 dynes/cm<sup>2</sup> orbital shear stress for 48h. **(D)** Representative images show Nuclei-Golgi polarity within each single cell (scale bar =50 $\mu$ m). Rose plots of nuclei-Golgi polarization are presented. Grey arrows indicate flow direction. **(E)** Quantification of oriented ECs (mean  $\pm$  SD, n=3 independent experiments, 2way ANOVA).

**(F)** Representative images show Nuclei-Golgi polarity within each single cell under control, deprivation or Baf (4h) (scale bar =50 $\mu$ m). Rose plots of nuclei-Golgi polarization are presented. Grey arrows indicate flow direction. **(G)** Quantification of oriented ECs (mean  $\pm$  SD, n=3 independent experiments, 2way ANOVA).

Figure 5



**Figure 5: Endothelial deletion of *Mcc* impairs P6 mouse retinal vascular development**

**(A)** *Mcc* endothelial deletion strategy in mouse.

**(B)** qPCR analysis of isolated Lung ECs at P6 show *Mcc* expression level in *Mcc*<sup>f/f</sup> and *Mcc*<sup>iECKO</sup>. (mean ± SD. *Mcc*<sup>f/f</sup>, n=4, *Mcc*<sup>iECKO</sup> n=3, Mann-Whitney's test).

**(C)** Whole mount CD31-stained retinas at P6. Red circles show radial expansion of the vascular plexus. Scale bar =500µm.

**(D)** Quantification of vascularized retinal area and of vascular density around arteries and veins in *Mcc*<sup>f/f</sup> and *Mcc*<sup>iECKO</sup> mice. (mean ± SD; *Mcc*<sup>f/f</sup>, n=7; si*Mcc*<sup>iECKO</sup>, n=5; Mann-Whitney's test).

**(E)** Representative images of Isolectin B4 (IB4) and anti-collagen IV (ColIV) staining are shown. To the right of the panel, a higher magnification image of IB4 and ColIV staining is displayed. Empty collagen sleeves are indicated with arrows. Scale bar =100µm.

**(F)** Quantification of number of COLIV<sup>+</sup>/IB4<sup>-</sup> regressing segments. (mean ± SD. n=6, Mann-Whitney's test).

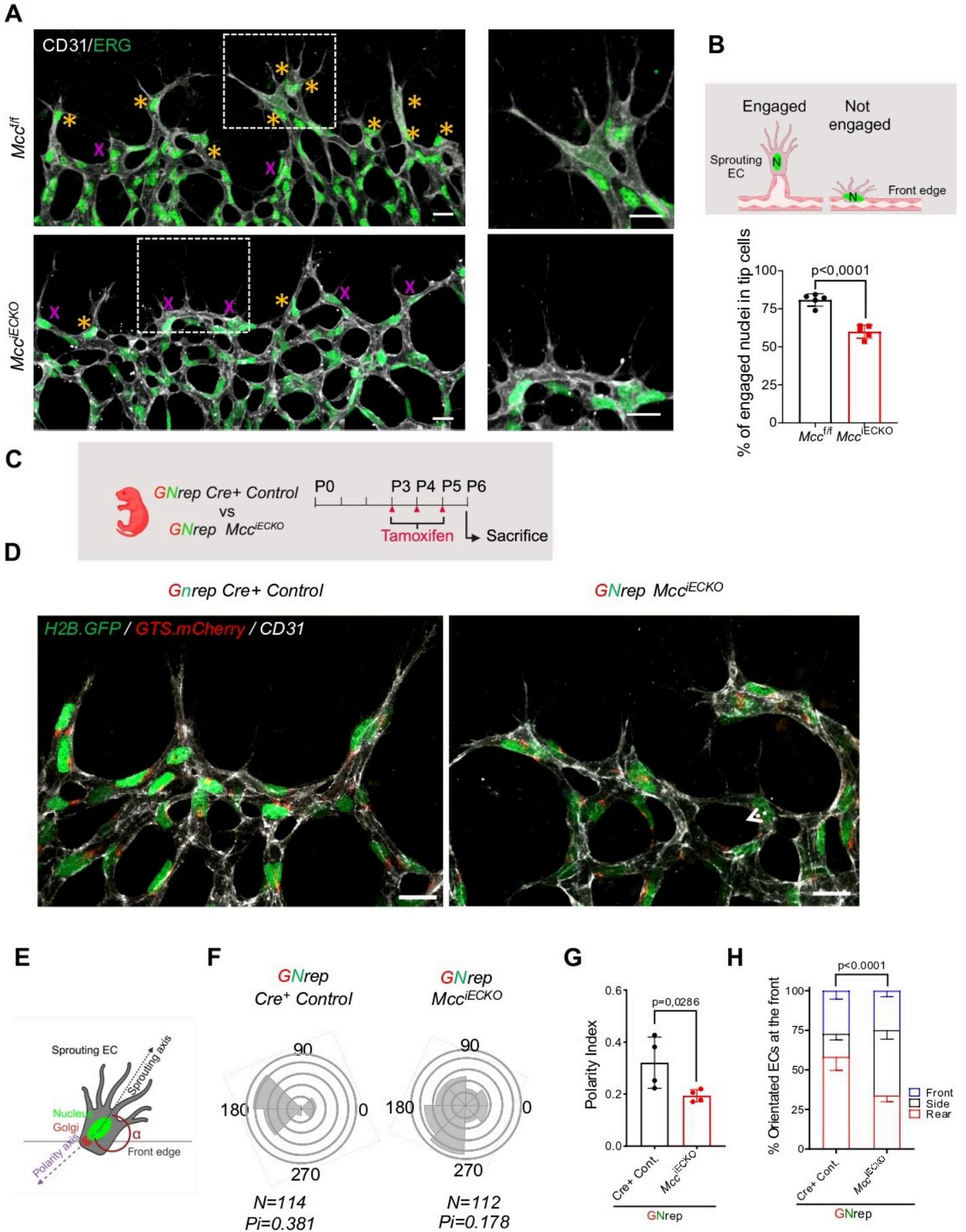
**(G)** Representative images show EC proliferating at the retinal sprouting front from *Mcc*<sup>f/f</sup> and *Mcc*<sup>iECKO</sup> mice injected with EdU. Blood vessels are stained with IB4 (green), endothelial nuclei with the anti-ERG antibody (red), and proliferating cells are detected using the EdU revelation kit (magenta). Scale bar = 200µm.

**(H)** Quantification of Erg<sup>+</sup>/EdU<sup>+</sup> nuclei. (mean ± SD. *Mcc*<sup>f/f</sup>, n=3, *Mcc*<sup>iECKO</sup>, n=3; Student's test).

**(I)** Confocal images of IB4 labelled tip cells in the retinal vasculature. White stars labelled tip cells. Scale bar = 100µm.

**(J)** Quantification of the number of distal sprouts /mm. (mean ± SD. *Mcc*<sup>f/f</sup>, n =5, *Mcc*<sup>iECKO</sup>, n =5. P-values obtained with Mann-Whitney's test).

Figure 6



**Figure 6: Deletion of *Mcc* in endothelial cells disrupts polarity at the retinal sprouting front at P6**

Quantification of engaged nuclei in tip cells was performed

**(A)** Representative images of the sprouting front in *Mcc<sup>fl/fl</sup>* and *Mcc<sup>IECKO</sup>* retina are provided, with endothelial nuclei stained with anti-ERG (green) and blood vessels with anti-CD31 (white). To the right of the panel, a higher magnification image of CD31 and ERG labelling is displayed. Engaged nuclei are marked with yellow stars, and non-engaged nuclei with magenta crosses. Scale bars = 20  $\mu$ m.

**(B)** A schematic representation shows an engaged and a non-engaged nucleus at the sprouting front. The proportion of engaged cells at the sprouting front was quantified (mean  $\pm$  SD. *Mcc<sup>fl/fl</sup>*, n=5; *Mcc<sup>IECKO</sup>*, n=5, Mann-Whitney test).

**(C)** Strategy for using GNrep endothelial polarity reporter system in *Mcc<sup>IECKO</sup>* mouse model.

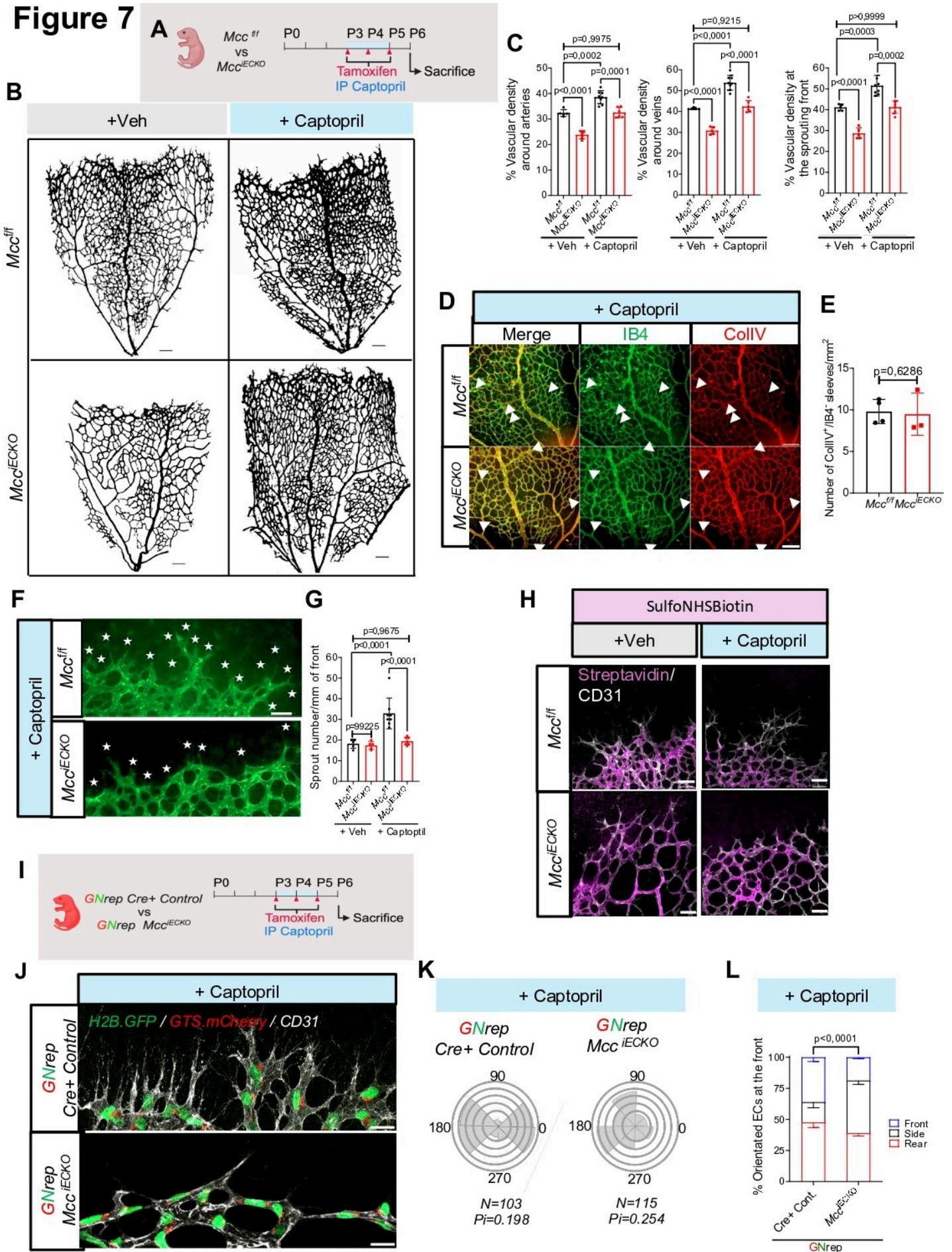
**(D)** Confocal images of the sprouting front in P6 *Mcc<sup>fl/fl</sup>* and *Mcc<sup>IECKO</sup>* mice. Endothelial nuclei are shown in green, and the Golgi apparatus in red using the GNrep system. Blood vessels are stained with an anti-CD31 antibody (white). Scale bars = 20  $\mu$ m)

**(E)** schematic representation illustrates the calculation of edge polarity at the sprouting front. The polarity angle was quantified based on the sprouting direction and the position of the Golgi apparatus in the cell.

**(F)** Representative polarity angles were plotted on a rose plot, showing the associated number of cells and the polarity index.

**(G)** Polarity index quantification and **(H)** Polarity angles were classified into rear, side, and front categories. (mean  $\pm$  SD. *Mcc<sup>fl/fl</sup>*, n=4; *Mcc<sup>IECKO</sup>*, n=4. two-way ANOVA).

Figure 7



**Figure 7: Captopril treatment restores abnormal regression rate in  $Mcc^{iECKO}$  mice but not polarity defects in sprouting front at P6**

$Mcc^{ff}$  and  $Mcc^{iECKO}$  mice were treated with captopril and retina vascular development was analysed at P6 **(A)** Strategy for captopril treatment of  $Mcc^{ff}$  and  $Mcc^{iECKO}$  mice.

**(B)** Mask of CD31 stained blood vessels of  $Mcc^{ff}$  and  $Mcc^{iECKO}$  mice treated with vehicle or Captopril. Scale bars = 100 $\mu$  and **(C)** quantification of vascular density around arteries and veins and at the sprouting front (means  $\pm$  SD; Vehicle-treated mice:  $Mcc^{ff}$ , n=5,  $Mcc^{iECKO}$ , n=5, Captopril-treated mice:  $Mcc^{ff}$ , n=8,  $Mcc^{iECKO}$ , n=7; Sidak's multiple comparison test).

**(D)** Vascular pruning process of  $Mcc^{ff}$  and  $Mcc^{iECKO}$  mice retina, treated with Captopril. Blood vessels were stained with IB4 (green) and CollIV (red). Scale bar = 100 $\mu$ m. **(E)** Quantification of CollIV<sup>+</sup>/IB4<sup>-</sup> segments. (mean  $\pm$  SD; Captopril-treated mice:  $Mcc^{ff}$ , n=4,  $Mcc^{iECKO}$ , n=3. Mann-Whitney's test).

**(F)** Confocal images of the sprout front and **(G)** Quantification of the number of tip cells/mm. (means  $\pm$  SD; Vehicle-treated mice:  $Mcc^{ff}$ , n=5,  $Mcc^{iECKO}$ , n=5, Captopril-treated mice:  $Mcc^{ff}$ , n=8,  $Mcc^{iECKO}$ , n=7; Sidak's multiple comparison test). White stars labelled tip cells.

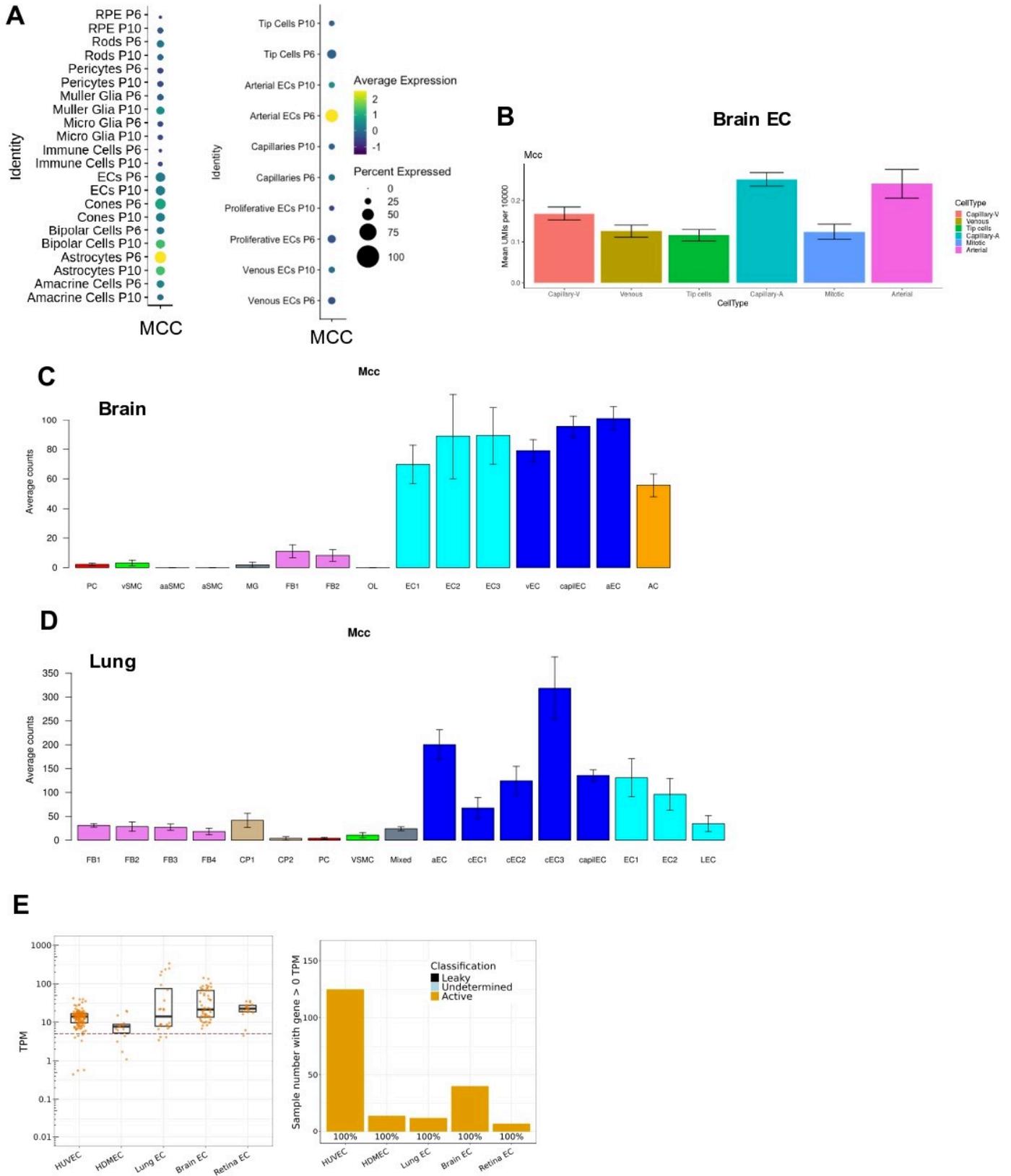
**(H)** Representative images of retinal front of SulfoNHSBiotin injected  $Mcc^{ff}$  and  $Mcc^{iECKO}$  mice, treated with vehicle or captopril. Blood vessels were stained with IB4 (white) and perfused vessels filled with biotin, revealed with streptavidin (magenta). Scale bar = 50 $\mu$ m.

**(I)** Strategy for captopril treatment of GNrep Cre<sup>+</sup> control and GNrep  $Mcc^{iECKO}$  mice.

**(J)** Confocal images of GNrep  $Mcc^{iECKO}$  Captopril-treated mice sprouting front. Endothelial nuclei (green) and golgi apparatus (red) were revealed. Blood vessels were stained with anti-CD31 antibody (white). Scale bar = 20 $\mu$ m.

**(K)** Polarity index quantification and **(L)** Polarity angles were classified into rear, side, and front categories. (mean  $\pm$  SD; Captopril-treated mice: GNrep Cre<sup>+</sup> control, n=4, GNrep  $Mcc^{iECKO}$ , n=4. 2way-ANOVA).

Figure S1



**Figure S1: Analysis of MCC expression in various mouse tissue and endothelial cell models**

*Mcc* expression level in blood-brain barrier **(A)** and lung cell clusters **(B)** using the following sc-RNA seq database: <http://betsholtzlab.org/VascularSingleCells/database.html>.

**(C)** *Mcc* expression level and frequency of *Mcc* expression in various endothelial cell types using BulkECexplorer tool.

**(D)** Dot plot expression level and frequency of expression of *Mcc* in P6 and P10 mouse retina cell clusters and retinal endothelial cells.

**(E)** *Mcc* expression level in P7 isolated brain endothelial cells using the following sc-RNA seq database: <https://markfsabbagh.shinyapps.io/vectrdb/>.

Figure S2

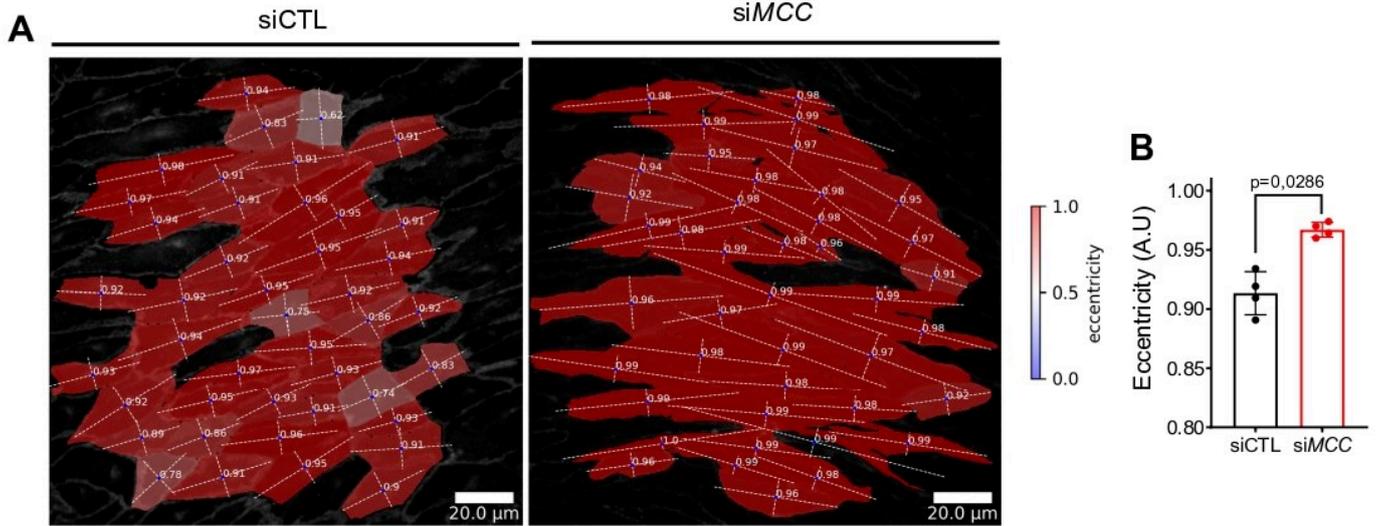


Figure S3

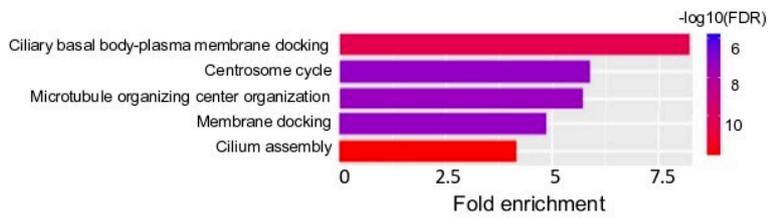
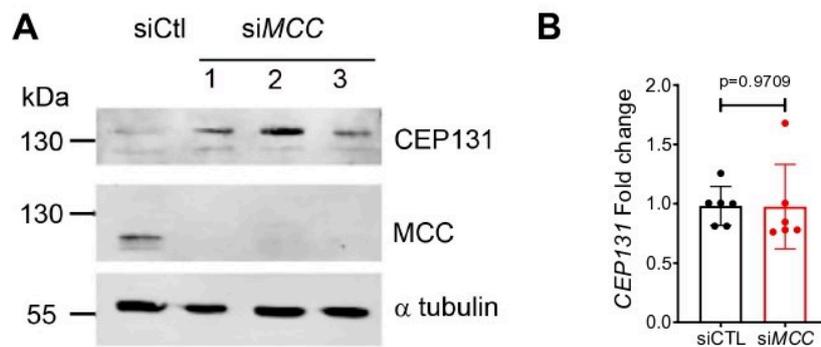


Figure S4



**Figure S2: MCC deletion elongates HUVECs cultivated under orbital flow condition**

**(A)** HUVECs were cultivated under orbital flow condition at 3.5 dynes/cm<sup>2</sup> for 48h, one day post-siRNA transfection. Adherens junctions were labelled with anti-VE Cadherin. Cell eccentricity was measured thanks to PolarityJam software. Representative images are presented (scale bar=20µm).

**(B)** Quantification of mean cell eccentricity. Data represent means ± SD. N=4 experiments. P-values obtained with Mann-Whitney's test.

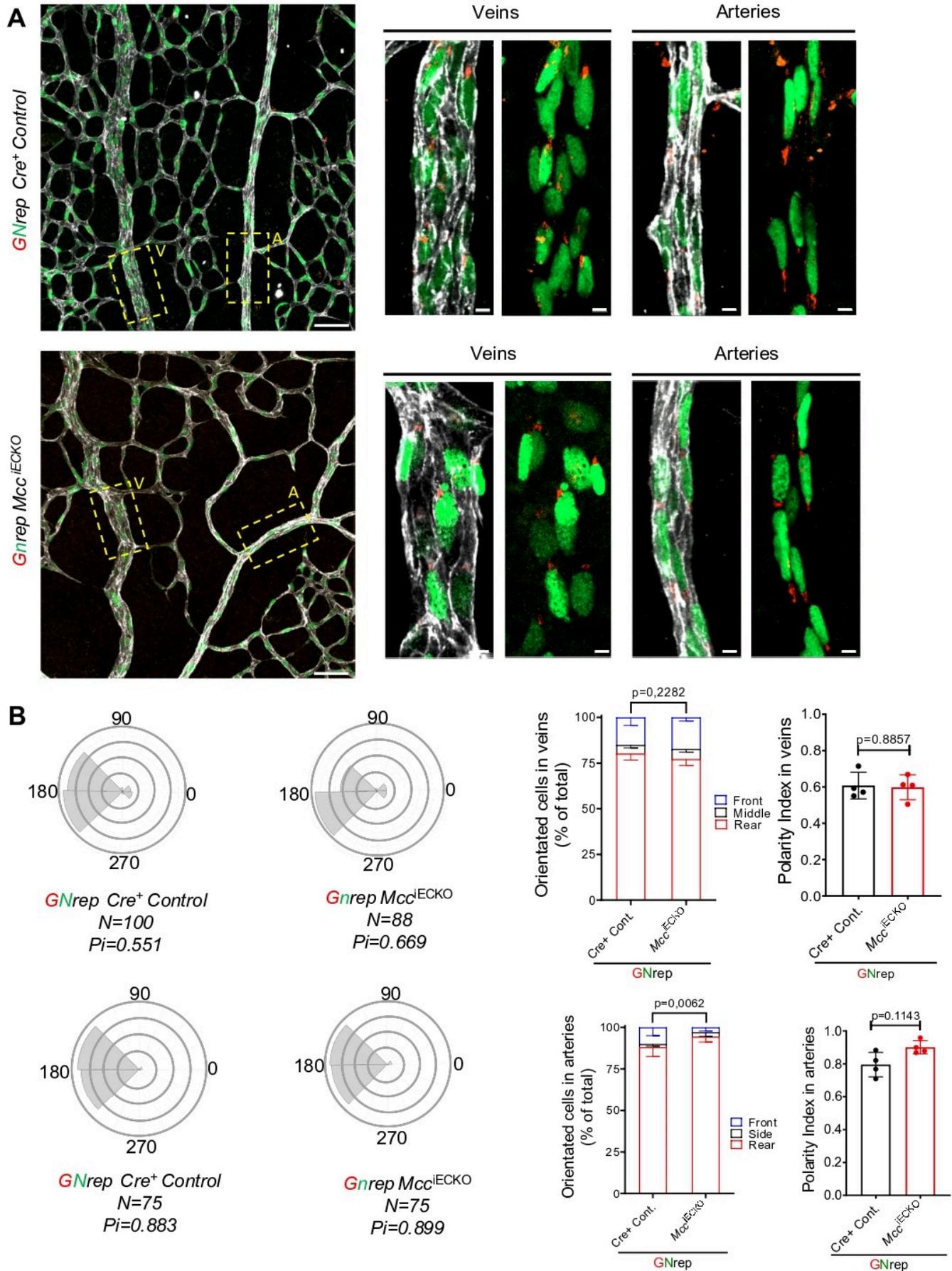
**Figure S3: Gene ontology analysis** revealed that the top 5 biological process represented by MCC PPI found with BioID are highly related to centrosome, tubulin cytoskeleton and cilium organization.

**Figure S4: MCC deletion increases CEP131 protein level but not transcriptional level**

**(A)** HUVECs were transfected with siCTL or with 3 different siMCC. Cell lysates were analysed 48h post-siRNA transfection by Western blotting using the indicated antibodies.

**(B)** HUVECs were transfected with siCTL or siMCC and RNA were extracted 48h post-siRNA transfection. CEP131 expression level were quantified by qPCR relatively to P0. Data represent means ± SD. N=6 experiments. P-values obtained with Mann-Whitney's test.

Figure S5



**Figure S5: Endothelial polarity is not disrupted in main arterial and veinous trunks in *Mcc* knock-out mice**

**(A)** Confocal images of a P6 *Mcc<sup>fl/fl</sup>* and *Mcc<sup>iECKO</sup>* mice retinal artery and vein. Endothelial nuclei (green) and Golgi apparatus (red) were revealed thanks to GNRep system. Blood vessels were stained with anti-CD31 antibody (white). Scale bars = 20µm.

**(B)** Polarity angles were graphed in roseplot with the associated number of cells and polarity index. Polarity angles classification between rear, side and front categories. Data represent means ± SD. *Mcc<sup>fl/fl</sup>*, n=4, *Mcc<sup>iECKO</sup>*, n =4. P-values obtained with 2way-ANOVA.

## Chapitre 2 : Expérimentations complémentaires sur le rôle de MCC dans l'organisation polaire du réseau vasculaire

### I- Matériel et méthode complémentaire

#### a. Immunomarquage *in toto* de l'aorte

Pour quantifier la polarité des cellules endothéliales d'aorte, celle-ci est prélevée sur la souris et débarrassée du gras qui l'entoure. Une fois nettoyée, elle est fixée 30min dans du PFA 4% puis stockée dans du PBS. Une section de la partie thoracique d'environ 0.5mm est prélevée et ouverte longitudinalement. Les aortes sont ensuite perméabilisées et saturées avec un tampon 10X (PBS 1X, Donkey Serum 10%, Triton 0,5%, Na-Doc 0,01%) pendant 1h à 4°C sur roue. Elles sont ensuite incubées sur la nuit avec les anticorps primaires dans la solution de saturation au 5X. Le lendemain, elles sont lavées trois fois au PBS pendant 10min puis elles incubent avec les anticorps secondaires 2h à température ambiante. Pour terminer, les aortes sont de nouveau lavées comme expliqué précédemment et incubées pendant 30min dans une solution de Hoescht 33342 à une concentration de 1µg/mL (Invitrogen, #H1399). Elles sont lavées une dernière fois puis montées entre lame et lamelle avec un milieu de montage Fluoromount-G sans Dapi. L'appareil de Golgi est marqué avec un anticorps dirigé contre Golph4 (Abcam, #ab28049). La polarité est calculée grâce à la position du Golgi et à la direction du flux, connue grâce au sens de l'aorte.

#### b. Test *in vitro* de la perméabilité

Pour évaluer la perméabilité d'une monocouche endothéliale *in vitro*, nous avons eu recours à la culture de cellules sur Transwell 0.1µm (Falcon, # 353104). Les cellules sontensemencées dans des plaques 12 puits à J0 et transfectées à J1 avec des siRNA. A J2, les cellules sontensemencées dans les Transwells, qui ont été préalablement saturés à la gélatine 0.1%, à une densité de 30 000 cellules/puits. Une heure après l'ensemencement, les Transwells sont placés dans les puits de plaque 12 puits contenant le milieu de culture endothélial. A J4, le milieu dans les Transwells sont changés pour une solution contenant trois fluorochromes de taille et de longueur d'onde d'émission différentes : Lucifer Yellow 0.45 KD (Invitrogen, # L453), Texas Red 3 KD (Invitrogen, #D3329) et TMR 20 KD (Sigma-Aldrich, # 737666). Le milieu sous les Transwells est prélevé en triplicata à T0, T15min, T30min et T60min et du milieu y est

rajouté après le prélèvement. La fluorescence est lue avec le Spark® multimode microplate reader (Tecan) a une longueur d'onde de 525nm, 625nm et 550nm pour respectivement le Lucifer Yellow, le Texas red et le TMR. Chaque condition est effectuée en tripliqua.

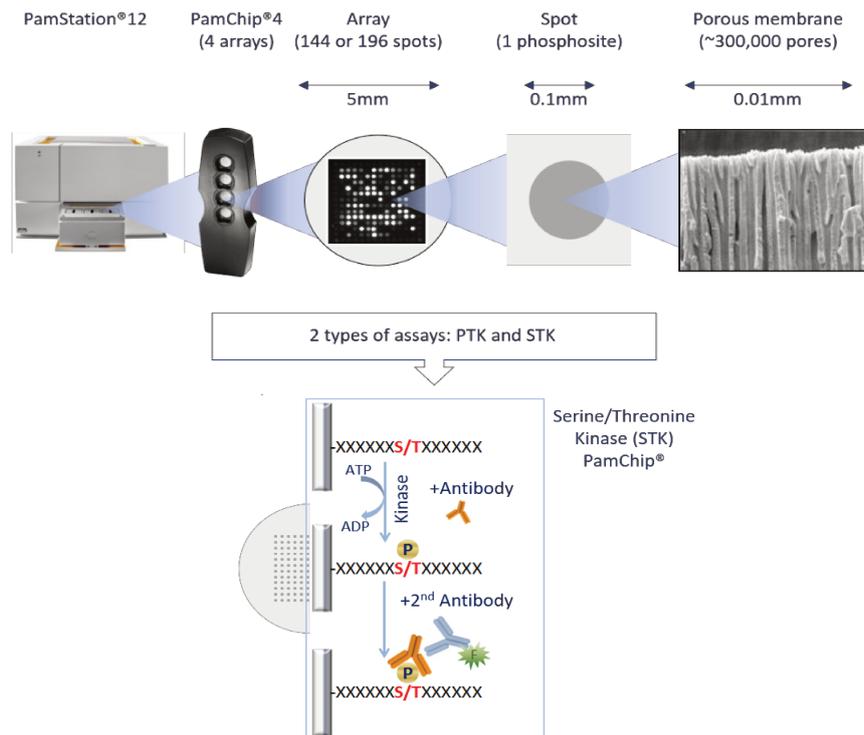
### c. Test *in vitro* de la prolifération

La prolifération des cellules endothéliales *in vitro* a été étudiée par une méthode de comptage et une méthode d'analyse de l'activité mitochondriale : le test MTT. Pour la première méthode, les cellules sont transfectées en suspension avec les siCTL ou siMCC dans 4mL de milieu de transfection. Les cellules sont incubées 6h à 37°C avec une agitation toutes les 15min pendant les deux premières heures puis toutes les 30min pour la fin de l'incubation. Les cellules sont ensuiteensemencées dans des plaques 24 puits. Un premier comptage à lieu 4h après l'ensemencement. Ensuite, toutes les 24h, pendant 3j, les cellules sont comptées.

Pour le test MTT, les cellules sontensemencées à raison de 7500 cellules/puits dans une plaque 96 puits. Le lendemain, elles sont transfectées avec les siCTL et siMCC. 48h après la transfection, on ajoute, dans le milieu de culture 50µg de MTT et les cellules sont incubées 4h à 37°C. 150µL de DMSO sont ensuite ajoutés par puits pour dissoudre les cristaux de formazan et la plaque est mise à agiter pendant 15min. L'absorbance est ensuite lue à 590nm.

### d. Test d'activité kinase

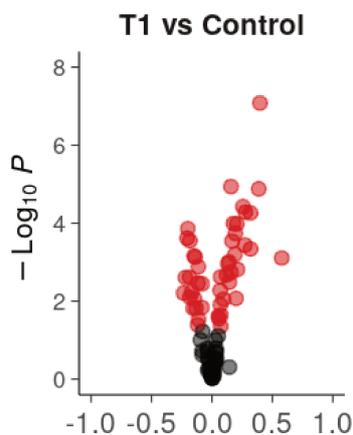
Afin d'aller plus loin dans les mécanismes moléculaires liés à MCC, nous avons réalisé un test d'activité kinase. L'objectif était de comparer ces activités entre la condition siCTL et la condition siMCC. Les cellules endothéliales ont étéensemencées en plaque 6 puits et transfectées le lendemain avec les siRNA. Deux jours après la transfection, les cellules sont lysées avec un tampon de lyse M-Per Mammalian Protein Extraction Reagent (ThermoScientific, #78501). Les lysats sont ensuite analysés sur une PamChip® (Pamgene). Plus précisément, les lysats sont chargés dans les puits de la puce. Ces puits sont recouverts de peptides cibles d'un large panel de Serine/Thréonine kinases. La puce est ensuite incubée dans la PamStation® 12 et de l'ATP est ajouté aux lysats. La PamStation va chauffer les échantillons afin d'activer l'activité des kinases, qui, en présence d'ATP, vont phosphoryler les peptides cibles. Les différentes phosphorylations vont ensuite être incubées avec des anticorps fluorescents qui leur sont spécifiques. La fluorescence est ensuite révélée et quantifiée (**Figure 48**).



**Figure 48: Schéma de la technologie PamChip**

(Adapté des rapports d'expérimentation envoyés par PamGene)

Pamgene réalise ensuite une analyse statistique, par un test de Student, pour vérifier si de manière générale il y a une différence significative dans la quantité de peptides phosphorylés entre les deux conditions. Dans notre cas, les échantillons siCTL et siMCC présentant un nombre significativement différent de peptides phosphorylés (Figure 49), l'analyse statistique peut se poursuivre avec la deuxième étape. Cette deuxième partie de l'analyse consiste en l'évaluation des kinases qui sont différemment activées à l'aide de bases de données de site consensus de phosphorylation liés à une kinase. Deux scores sont alors calculés. Le premier, appelé la statistique kinase, évalue la différence dans l'activité d'une kinase. S'il est inférieur à 0, l'activité kinase est réduite et inversement si le score est supérieur à 0. Un score de spécificité est ensuite calculé. Celui-ci évalue la probabilité qu'un peptide soit bien phosphorylé par une kinase donnée. La conjugaison de ces



**Figure 49: Volcano plot des peptides phosphorylés différentiellement entre condition contrôle et siMCC**

deux coefficients donne un Kinase Score final. S'il est supérieur à 1.3, il est considéré que l'activité de la kinase associée est significativement dérégulée.

## II- Etude complémentaire

Afin d'affiner notre compréhension du rôle de MCC dans le développement vasculaire, nous avons réalisé plusieurs expérimentations complémentaires. Nous voulions adresser le rôle de MCC dans d'autres organes, dans d'autres conditions au cours du développement rétinien et dans d'autres fonctions endothéliales que la polarité et la migration.

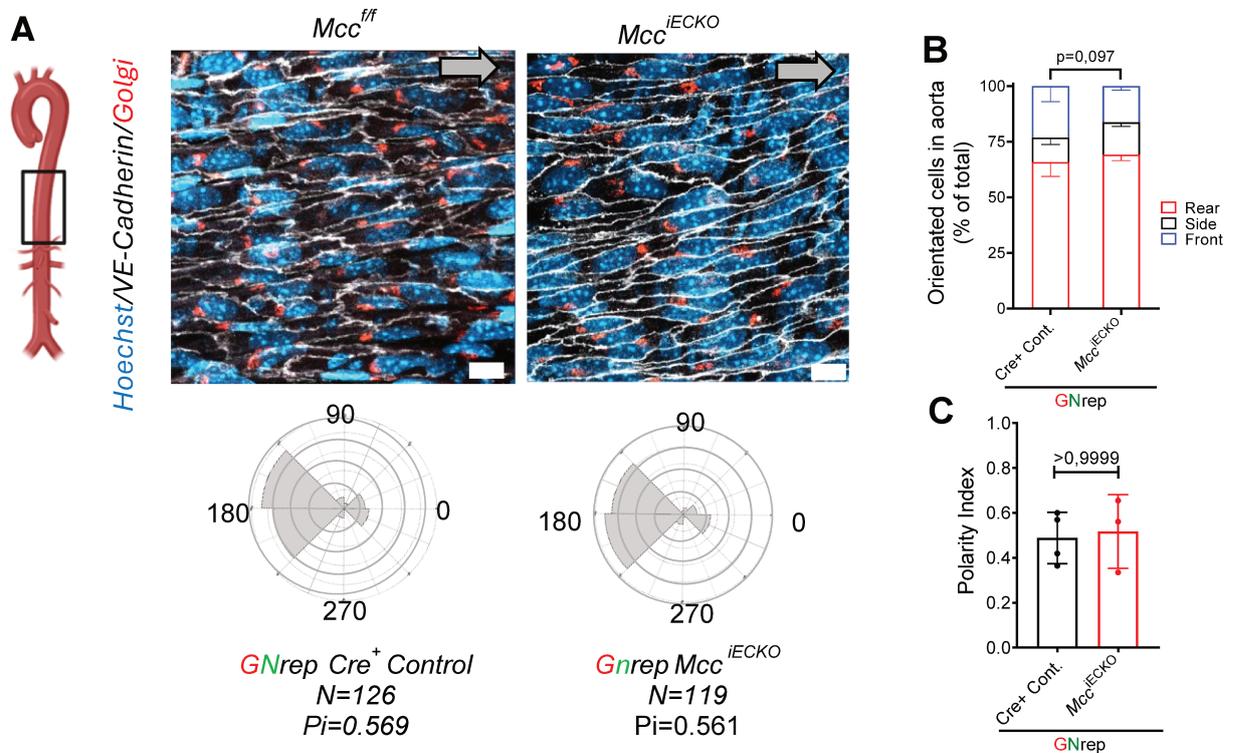
### a. Etude de la polarité dans l'aorte murine à P6

Pour commencer, parallèlement à l'étude de la polarité des cellules endothéliales de la rétine, nous avons prélevé les aortes des souris GNrep afin de quantifier la polarité endothéliale au niveau de la région thoracique. L'objectif était de vérifier si un autre lit vasculaire, simple à étudier car lui aussi en deux dimensions, présentait des défauts de polarité. Dans la région descendante de l'aorte, le flux est laminaire et les cellules endothéliales sont allongées parallèlement au flux et polarisées à l'inverse de celui-ci (Rogers et al., 1985). Au contraire, au niveau de la crosse, où le flux est turbulent, les cellules sont plus rondes et mal polarisées (Hahn & Schwartz, 2009). Nous avons donc choisi d'étudier l'aorte descendante. Tout comme dans les artères rétiniennes, l'angle de polarité a été calculé selon la position du Golgi et la direction du flux. Les angles de polarité ont été classés selon les catégories avant (front), côté (side), et arrière (rear) et l'index de polarité a été calculé avec la formule détaillée dans le chapitre 1.

Comme attendu, les souris contrôles présentent un tapis endothélial polarisé à environ 70% contre le flux (Figure 50). Les souris  $Mcc^{iECKO}$  n'ont cependant pas de défauts de polarité au niveau de l'aorte thoracique puisque le profil de classification des angles de polarité est très similaire à celui de souris contrôles. Nous constatons une très légère augmentation du nombre de cellules non polarisées mais cette différence n'est pas significative (Figure 50.b). De plus, il n'y a pas de différences significatives entre les index de polarité des deux génotypes (Figure 50.c).

Nous avons constaté dans les veines et les artères rétiniennes qu'il n'y avait pas non plus d'augmentation du nombre de cellules non polarisées chez les souris  $Mcc^{iECKO}$ . Le résultat découvert dans l'aorte nous conforte dans l'idée qu'une fois le lit vasculaire au contact du flux sanguin, il semblerait que la délétion de *Mcc* n'ait plus d'effet délétère sur la polarisation

endothéliale. La raison de cette absence de phénotype reste à élucider. Nous supposons que sous condition de flux, *Mcc* soit redirigé vers une autre fonction, notamment la sensibilisation des cellules endothéliales au flux, potentiellement en aval de *Wnt5a* et *Wnt11* (Franco et al., 2016), d'où l'augmentation de la régression vasculaire observée chez les souris *Mcc*<sup>iECKO</sup>.



**Figure 50: La polarité endothéliale aortique n'est pas affectée par la délétion de *Mcc* chez la souris à P6**

a. Image confocale représentative de l'aorte thoracique de souris *G*Nrep Cre<sup>+</sup> contrôles et *Mcc*<sup>iECKO</sup> âgées de 6 jours. Le Golgi est révélé grâce au système rapporteur *G*Nrep (rouge), le noyau des cellules par le Hoechst (bleu) et les jonctions adhérentes avec un anti-VE-cadhérine (blanc). Les flèches grises représentent la direction du flux. Echelle = 10µm. Calcul représentatif des angles de polarité sous forme de roseplot, associé au nombre de cellules et aux index de polarité correspondants.

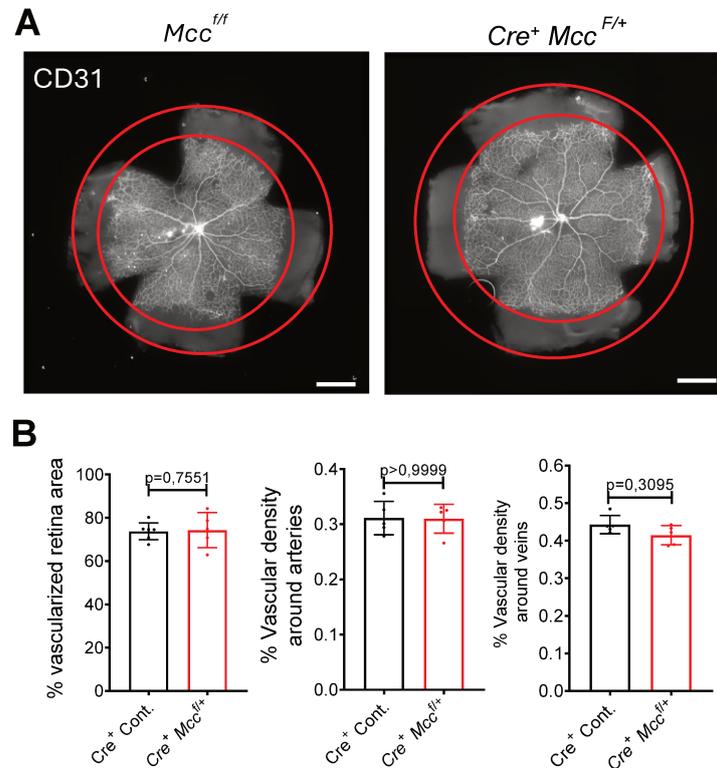
b. Classification des angles de polarité selon les classes arrière, côté et avant. Les données sont représentées sous forme de moyenne ± DS. Cre<sup>+</sup> Cont. =4, si*Mcc*<sup>iECKO</sup>=3. La p-value est obtenue par 2way-ANOVA.

c. Moyenne de l'index de polarité. Les données sont représentées sous forme de moyenne ± DS. Cre<sup>+</sup> Cont. =4, *Mcc*<sup>iECKO</sup>=3. La p-value est obtenue par un test de Mann-Whitney.

## b. Etude de l'architecture vasculaire et de la polarité au front de migration chez les souris hétérozygotes

En parallèle de l'étude réalisée sur les souris *Mcc*<sup>ff</sup> et *Mcc*<sup>iECKO</sup>, nous avons caractérisé l'effet d'une délétion hétérozygote de *Mcc* chez la souris à P6 sur le développement vasculaire (Cre<sup>+</sup> *Mcc*<sup>f/+</sup>). Nous avons réalisé une étude similaire à celle présentée dans le chapitre 1. Tout

d'abord, les souris  $Cre^+ Mcc^{f/+}$  ne présentent pas de retard de vascularisation ni de défaut de densité vasculaire (**Figure 51**).

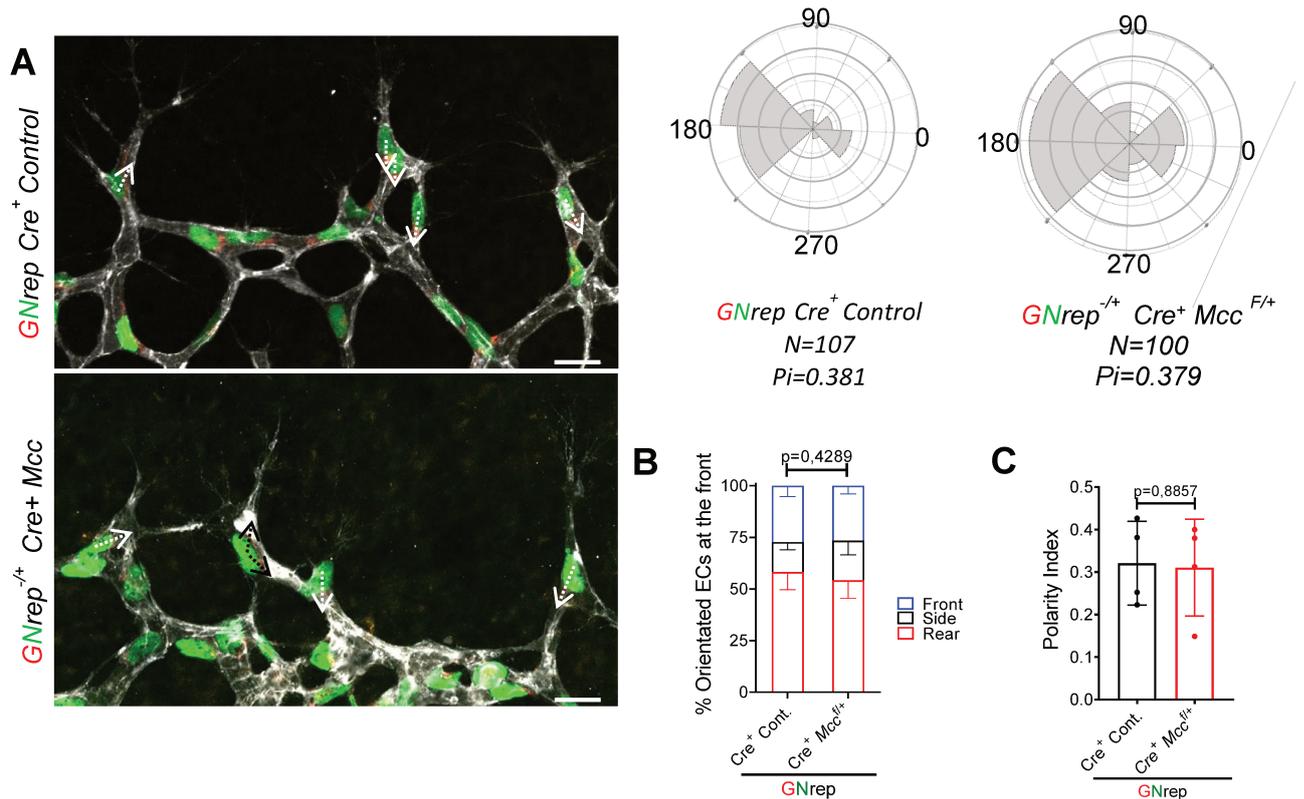


**Figure 51: La délétion hétérozygote de *Mcc* dans la cellule endothéliale n'entraîne pas de défaut de vascularisation dans la rétine à P6**

a. Imagerie confocale de rétines marquées avec un anti-CD31. Les cercles rouges représentent l'expansion radiale. Echelle=500µm.

b. Quantification du pourcentage d'air de vascularisation de la rétine et de la densité vasculaire (aire du marquage anti-CD31 rapportée à l'aire totale d'une région d'intérêt) autour des veines et des artères. Les données sont représentées sous forme de moyenne ± DS.  $Mcc^{f/f}=7$ ,  $Cre^+ Mcc^{f/+}=5$ . La p-value est obtenue par le test de Mann-Whitney.

Pour terminer cette étude, nous avons également quantifié la polarisation des cellules endothéliales au niveau du front de migration chez les souris  $Cre^+ Mcc^{f/+}$ . En utilisant la même méthode que celle réalisée précédemment, nous avons observé une polarisation identique entre les souris contrôles et les souris  $Cre^+ Mcc^{f/+}$ . En effet, la proportion de cellules polarisées à l'arrière était également de plus de 50% pour à peine 20% de cellules non polarisées (**Figure 51**). En considérant ces résultats, nous avons conclu que la délétion hétérozygote de *Mcc* n'était suffisante ni pour engendrer les défauts vasculaires observés chez la souris  $Mcc^{iECKO}$ , ni un phénotype intermédiaire.



**Figure 52: La délétion hétérozygote de *Mcc* dans la cellule endothéliale n'entraîne pas de défaut de polarisation au niveau du front de migration rétinien à P6**

a. Imagerie confocale du front de migration rétinien de souris GNrep Cre<sup>+</sup> Cont. et Cdh5 Cre<sup>+</sup>; Mcc<sup>F/+</sup> à P6. Les noyaux (vert) et Golgi (rouge) des cellules endothéliales sont révélés grâce au système rapporteur GNrep et les vaisseaux sanguins sont marqués avec un anti-CD31 (blanc). Echelle=20µm. Calcul représentatif des angles de polarité sous forme de roseplot, associé au nombre de cellules et aux index de polarité correspondants.

b. Classification des angles de polarité selon les classes arrière, côté et avant. Les données sont représentées sous forme de moyenne ± DS. Cre<sup>+</sup> Cont.=4, Cre<sup>+</sup> Mcc<sup>F/+</sup>=4. La p-value est obtenue par 2way-ANOVA.

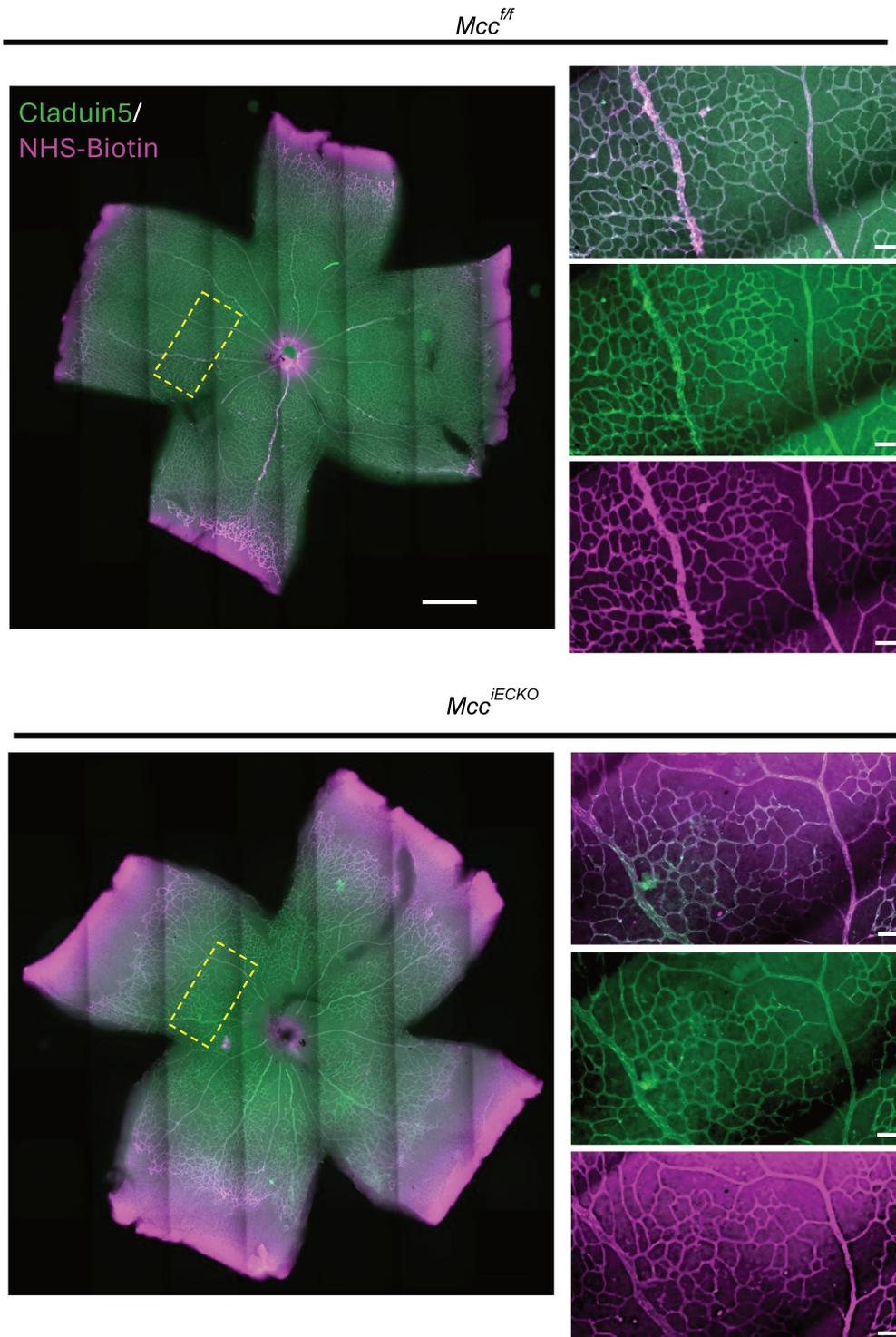
c. Moyenne de l'index de polarité. Les données sont représentées sous forme de moyenne ± DS. Cre<sup>+</sup> Cont.=4, Cre<sup>+</sup> Mcc<sup>F/+</sup>=4. La p-value est obtenue par un test de Mann-Whitney.

### c. Etude de l'impact de la délétion endothéliale de *Mcc* sur la perméabilité du réseau vasculaire rétinien

Le réseau vasculaire rétinien fonctionne comme une barrière, d'où son nom de barrière hémato-rétinienne. Pour protéger le parenchyme, les vaisseaux sanguins présentent des propriétés imperméables, notamment par une forte expression de protéines de jonction comme la Claudine5. Une étude ayant montré le rôle de MCC dans le maintien de l'intégrité de jonctions dans les cellules épithéliales (Benthani et al., 2018), nous nous sommes demandés si les souris Mcc<sup>iECKO</sup> présentaient des micro saignements au niveau de la BRB et

Chapitre 2 : Expérimentations complémentaires sur le rôle de MCC dans l'organisation polaire du réseau vasculaire

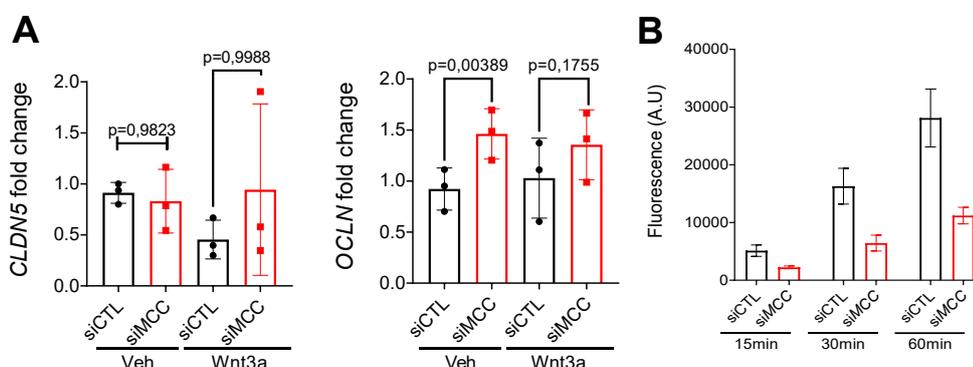
une perte d'intégrité de celle-ci. Afin de répondre à cette question, les souris ont été injectées en rétro-orbitaire avec de la NHS-biotin (2mg par souris) et sacrifiées 15 minutes après l'injection. La biotine a été révélée à l'aide de streptavidine couplée Alexa-Fluor 647. Les rétines ont également été marquées avec un anticorps anti-Claudine5 couplé Alexa Fluor 488 (Invitrogen, #435288) afin de vérifier l'intégrité des jonctions serrées.



**Figure 53: La délétion endothéliale de *Mcc* ne déstabilise pas la barrière hémato-rétinienne de souris à P6**

Imagerie confocale de rétines de souris *Mcc<sup>ff</sup>* et *Mcc<sup>iECKO</sup>* âgées de 6 jours injectées avec de la NHS-biotin. Les jonctions serrées sont immunomarquées avec un anti-Claudin5 Alexa Fluor 488 (vert) et la biotine révélée avec de la streptavidine Alexa Fluor 647 (magenta). Echelle=500µm et 50µm sur les zooms.

Sur les rétines des souris *Mcc<sup>iECKO</sup>*, nous ne constatons pas de diminution du marquage Claudine5. De plus, la biotine se concentre dans les vaisseaux et nous n'observons pas de diffusion autour de ceux-ci (**Figure 53**). Ces résultats semblent indiquer une absence d'augmentation de la perméabilité de la BRB chez les souris *Mcc<sup>iECKO</sup>*. Ils sont d'ailleurs en accord avec quelques données *in vitro* que nous avons obtenues. En effet, nous avons quantifié les niveaux de transcrits *CLDN5* et *OCCL* dans des cellules endothéliales transfectées avec un siCTL ou siMCC et traitées avec ou sans Wnt3a. Ces résultats ne montrent pas de diminution de l'expression de ces protéines des jonction serrées lorsque les cellules sont déplétées en MCC. Une augmentation du taux d'expression de *OCCLN* est même constatée dans les cellules siMCC versus siCTL (**Figure 54.a**). De plus, les expériences de perméabilité par culture sur Transwell ne révèlent pas de diminution de la perméabilité. Au contraire, il semblerait que le tapis endothélial soit davantage imperméable lorsque MCC est délété (**Figure 54.b**).



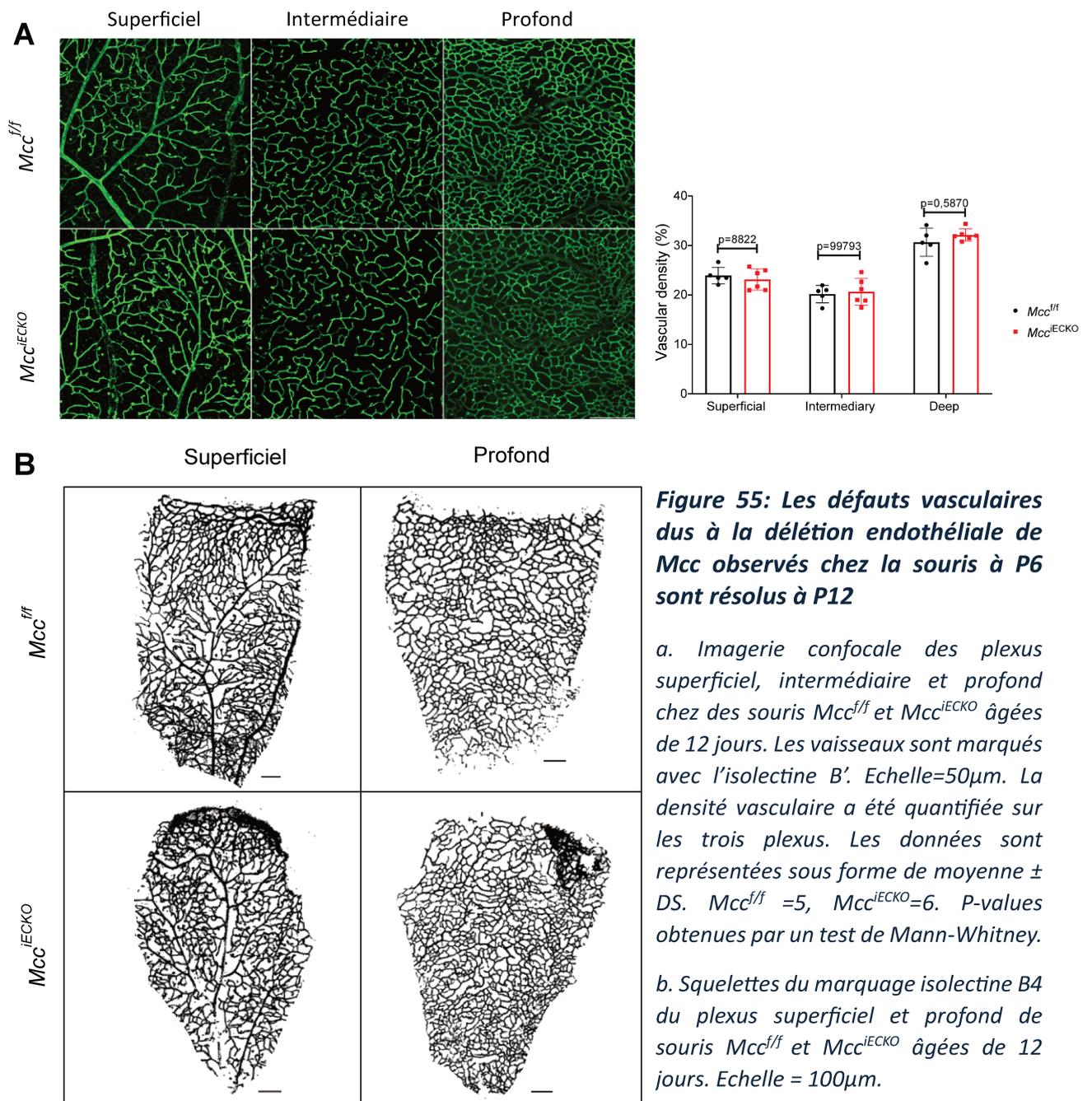
**Figure 54: La délétion de MCC ne diminue pas la perméabilité des cellules endothéliales in vitro**

a. Les cellules endothéliales ont été transfectées avec un siCTL ou un siMCC puis traitées avec ou sans Wnt3a. Les ARN ont été extraits 48h après la transfection. Après rétro-transcription, les cDNA ont été analysés par qPCR. Les niveaux d'expression sont normalisés selon l'expression de *PO*. Les données sont représentées sous forme de moyenne ± DS. N=3 expériences. Les p-values sont obtenues avec un test de comparaison multiple de Sidak.

b. Expérimentation représentative de la quantification de la fluorescence du Texas Red 3KD sous les Transwells où sont cultivées des cellules endothéliales transfectées avec un siCTL ou un siMCC. Les mêmes résultats ont été obtenus sur trois expérimentations indépendantes et également avec le Lucifer Yellow 0.45 KD et le TMR 20 KD.

### d. Etude de l'impact de la délétion endothéliale de Mcc à un âge plus avancé

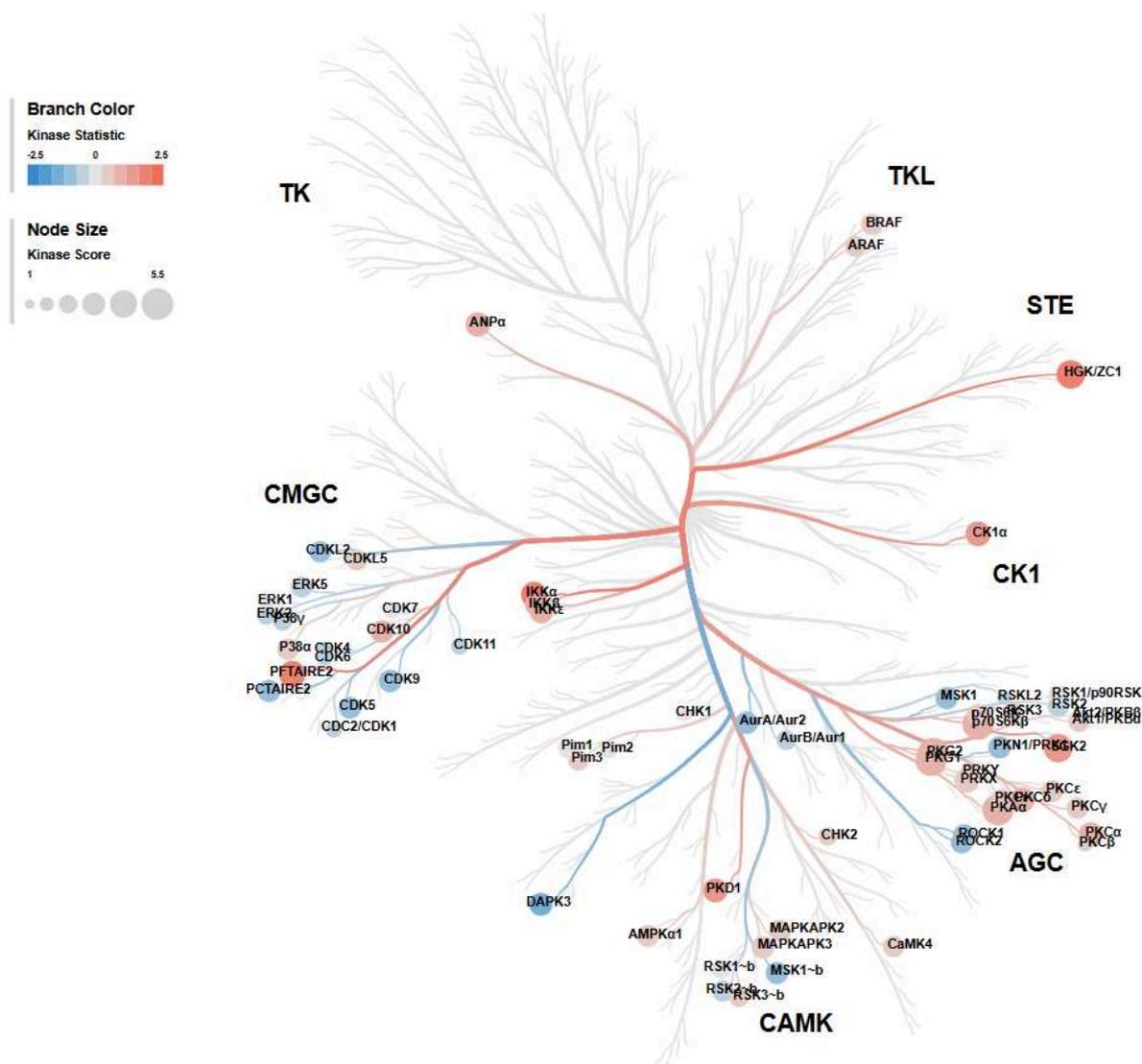
Lorsque l'on constate les défauts de développement vasculaire observés chez la souris  $Mcc^{iECKO}$  à P6, il est légitime de se demander si de tels défauts impactent la suite du développement post-natal rétinien. A P12, le développement du plexus profond est achevé et le plexus intermédiaire a commencé à se former. Par imagerie confocale en Z, nous avons pu séparer les trois plexus afin de quantifier la densité vasculaire. Nous n'avons pas constaté de différences significatives dans la vascularisation de ces trois plexus entre les deux génotypes (Figure 55).



Ces résultats ont été observés à la fois chez des souris ayant reçu une seule série d'injections tamoxifène de P3 à P5 ou deux séries d'injections de P3 à P5 et de P9 à P11. Ce n'est donc pas une question de pression de délétion. Il semblerait donc que les défauts vasculaires observés à P6 chez les souris *Mcc*<sup>iECKO</sup> sont résolus à P12 pour une raison encore inconnue. De plus, MCC ne semble pas être un acteur majeur du développement des plexus profond et intermédiaire. Il est cependant difficile d'émettre une hypothèse car cet événement du développement rétinien est mal caractérisé. Les ligands non-canoniques Wnt5a et Wnt11 sécrétés par les cellules myéloïdes ont été décrits comme impliqués dans la régulation de la formation de ces plexus profonds en contrôlant le niveau d'angiogenèse via l'inhibiteur du VEGF, Flt1 (Stefater et al., 2011). Bien que nous soupçonnions MCC d'être en aval de Wnt-5a, il ne semble pas que ce soit le cas dans ce mécanisme au vu de l'absence de phénotype chez les souris *Mcc*<sup>iECKO</sup>. Enfin, l'utilisation du modèle GNrep pourrait être pertinente pour étudier la polarité des vaisseaux plongeants à un âge intermédiaire entre 6 et 12 jours. Cependant, tout reste à faire puisque ce processus n'a pas été décrit dans un contexte physiologique. Certaines études ont cependant montré que la délétion de protéines de polarité comme ATP6AP2 (Patel et al., 2022) ou PDZRN3 (Sewduth et al., 2014) pouvait déréguler la plongée des vaisseaux vers les plexus profonds mais aucun mécanisme de polarité n'a été réellement décrit. Il faudrait donc, dans un premier temps, décrire le rôle de polarité dans la plongée des vaisseaux vers les couches profondes, quels en sont les stimuli et ensuite étudier l'impact de la délétion de *Mcc* sur ce phénomène.

#### e. La délétion de MCC affecte l'activité des kinases liées au cycle cellulaire

Pour caractériser le rôle signalétique de MCC au sein de la cellule endothéliale, en plus du séquençage ARN, nous avons utilisé la technologie PamChip® afin d'évaluer l'activité des sérine/thréonine kinases lorsque *MCC* est délété. Grâce à l'analyse statistique de PamGene, nous pouvons représenter les résultats sous la forme d'un coral plot.



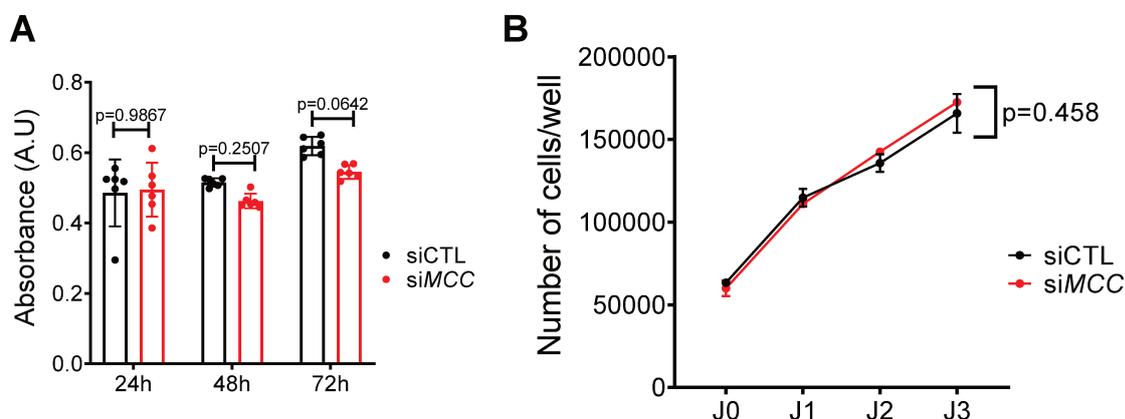
**Figure 56: Coral plot de l'activité des kinases de cellules endothéliales transfectées avec un siMCC**

Les kinases sont regroupées selon plusieurs familles. La couleur représente le niveau de diminution (bleu) ou d'augmentation (rouge) de l'activité kinase. La taille des nœuds du coral plot représente le kinase score, donc la probabilité que le peptide différenciellement phosphorylé soit bien une cible de la kinase associée. Plus le nœud est gros, plus le score est haut, plus la probabilité d'erreur est faible.

Ce résultat révèle une certaine diminution de l'activité de kinases liée au cycle cellulaire. En effet, la voie des MAPK semble fortement affectée avec une diminution de l'activité de ERK1/2. De plus, un certain nombre de CDK ont également une activité diminuée (CDK1, CDK2L, CDK4, CDK5, CDK6, CDK9 et CDK11). La délétion de MCC est associée, nous l'avons démontré, à une forte augmentation de l'expression de KLF2. Ce dernier est connu comme un inhibiteur de la prolifération notamment en diminuant l'expression des récepteurs VEGFR1 et 2 (Dekker et al., 2006; Sangwung et al., 2017) qui activent eux-mêmes des voies de prolifération telle que celle des MAPK (Malekan et al., 2024; S. Wang et al., 2008). Il est donc

possible que l'augmentation de l'expression de KLF2 agisse sur les voies de prolifération des cellules endothéliales. De plus, il semblerait que la délétion de *Mcc* sensibilise les cellules endothéliales au flux dans la rétine. Il serait très intéressant de savoir si KLF2 est surexprimé dans les cellules endothéliales des souris *Mcc*<sup>IECKO</sup> et si certaines de ces cibles sont diminuées (comme VEGFR1 et FEGFR2), ce qui donnerait un début de réponse à l'effet sur la prolifération observée chez nos souris mutantes.

Nous avons donc voulu confirmer *in vitro* que la délétion de *MCC* inhibait la prolifération des cellules endothéliales en culture. Nous avons réalisé un test MTT et un comptage cellulaire sur plusieurs jours de culture afin de qualifier la prolifération des cellules endothéliales déplétées en *MCC*. De manière très étonnante, aucun défaut de prolifération n'est constaté ni avec le test MTT, ni avec le comptage (Figure 57). Il n'est pas exclu que la baisse de l'activité des kinases des voies de prolifération ne soit pas suffisante pour entraîner un retard de prolifération visible avec ces tests. Les différents temps de ces tests étant espacés de 24h, le recours à une cinétique plus rapprochée (2, 6, 12 et 24h) serait peut-être plus approprié.



**Figure 57: La délétion de MCC ne ralentit pas la prolifération des cellules endothéliales en culture**

a. Les cellules endothéliales ont été transfectées avec un siCTL et un siMCC et l'activité mitochondriale a été quantifiée 24h, 48h et 72h après la transfection. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  DS. P-values obtenues par un test de Mann-Whitney.

b. Les cellules endothéliales ont étéensemencées à 50 000 cellules par puits 24h le jour de la transfection et le nombre de cellules a été quantifié à J0, J1, J2 et J3. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  DS. N=3 expériences. P-values obtenues par une 2Way ANOVA..

Enfin, l'objectif de ce test d'activité kinase était de qualifier l'activité de kinases de la voie Wnt. Les cibles premières étaient bien sûr les isoformes de CK1. Malheureusement, seul l'isoforme CK1 $\alpha$  n'est détectable par ce test, les autres isoformes souffrant d'un manque de

connaissances quant aux séquences consensus qu'ils ciblent pour phosphorylation. Mais de manière intéressante, l'activité de CK1 $\alpha$  est augmentée. Or, CK1 $\alpha$  est notamment impliquée dans la phosphorylation du corécepteur LRP5/6 dans l'initiation du signal de la voie canonique Wnt (Del Valle-Pérez et al., 2011). Nous avons démontré que la délétion de MCC augmentait l'activité de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine et l'augmentation de l'activité de CK1 $\alpha$  est donc cohérente avec ces données. Enfin, l'activité des kinases ROCK1/2 est diminuée. Ces kinases régulent la dynamique du cytosquelette d'actine pour favoriser la migration endothéliale entre autres. Elles sont notamment activées par les petites GTPases Rho comme CDC42 (Noma et al., 2012). Nous avons observé une structure anormale du cytosquelette d'actine dans les cellules siMCC. Nous pouvons supposer que ce défaut d'actine soit lié à une baisse d'activité de ROCK1/2. L'activité de GTPases, comme Cdc42, pourrait être testée par des tests de précipitations de la forme active, possibles grâce à l'utilisation de kits déjà utilisés au laboratoire (Cytoskeleton, #BK034).

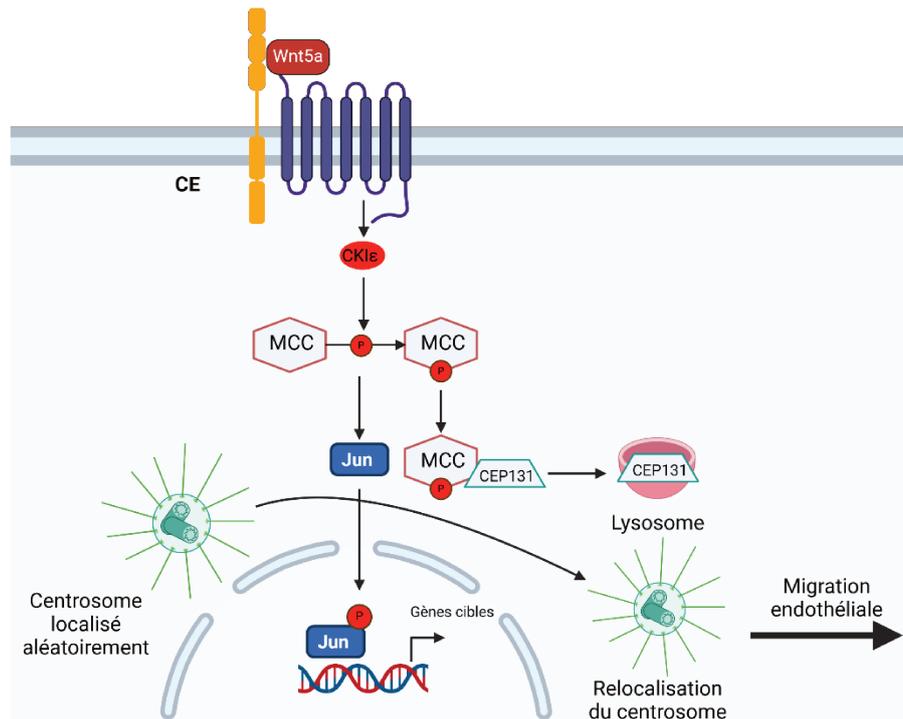
### III- Conclusions

Ces résultats complémentaires nous confortent dans l'idée d'un rôle fin de MCC entre régulation de la polarité des cellules du front de migration et contrôle de la sensibilisation des cellules endothéliales au flux, régulations perturbées uniquement avec une délétion homozygote de *Mcc*. Bien que nous ne sachions pas encore s'il joue un rôle d'orientation dans les vaisseaux plongeant, *a priori*, MCC ne régulerait la migration qu'au niveau du plexus primaire puisque les plexus profonds se développent correctement malgré la délétion de *Mcc*. Ensuite, dans les lits vasculaires soumis au flux, comme les veines et les artères de la rétine ou l'aorte, soit MCC ne joue plus de rôle dans la polarité endothéliale soit le flux prend le dessus dans le contrôle de celle-ci. A ce moment, MCC maintiendrait la balance de sensibilisation des cellules endothéliales au flux pour qu'elles ne surréagissent pas à celui-ci. Notamment, par un mécanisme encore inconnu, MCC maintiendrait un niveau d'expression basal de KLF2. La délétion de MCC augmenterait l'expression de KLF2 qui diminuerait la prolifération endothéliale par une répression des kinases activant le cycle cellulaire. Enfin, MCC n'a aucun effet sur l'intégrité jonctionnelle du réseau vasculaire.

# **CONCLUSIONS & PERSPECTIVES**

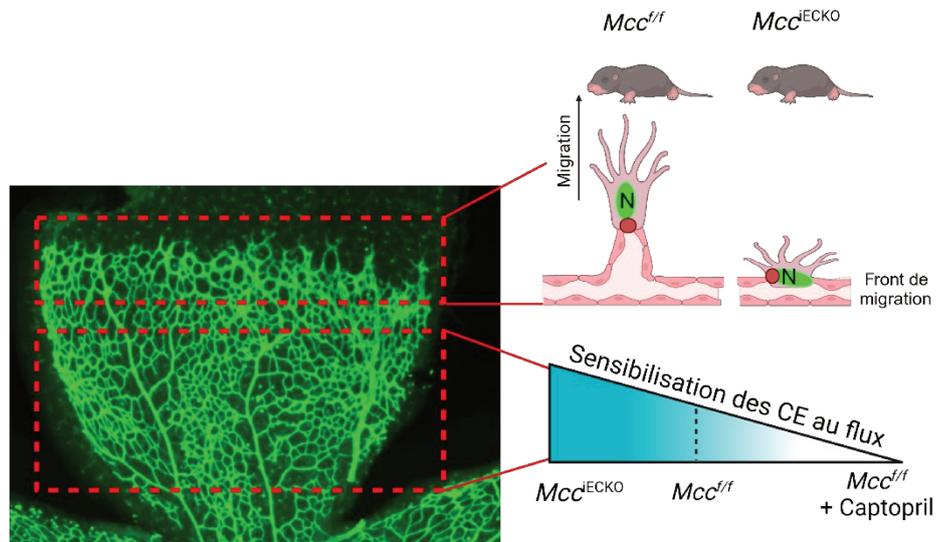
## I- Résumé des résultats obtenus

Pour conclure, ce projet a permis de mettre en évidence MCC comme un nouvel acteur central de la voie Wnt/PCP endothéliale, comme étant le chaînon manquant reliant cette voie à la polarité. En effet, nous avons démontré pour la première fois que la voie Wnt/PCP dirigeait la polarité par un autre mécanisme que la régulation de la dynamique du cytosquelette : la régulation du centrosome lui-même. C'est en garantissant le fonctionnement de cette organelle que MCC promeut la polarité et la migration endothéliale.



**Figure 58: Schéma bilan du rôle de MCC dans la polarité endothéliale**

Ensuite, nous avons démontré que MCC était un acteur clef du développement post-natal de la rétine murine. En effet, sa délétion spécifique dans l'endothélium murin entraîne un défaut de polarité au niveau du front de migration de la rétine à P6, perturbant la migration des tip cells. Dans la zone flux-dépendant, la délétion de *Mcc* augmente le phénomène de régression, réduisant la densité vasculaire. Nous supposons que le rôle de MCC est double dans le développement vasculaire : un rôle de polarisation des cellules du front afin de favoriser leur migration et un rôle flux-dépendant de régulation de la sensibilité des cellules endothéliales au flux.



**Figure 59: Schéma bilan du rôle de MCC dans le développement post-natal du réseau vasculaire rétinien**

## II- Limites & perspectives

Comme toute étude, tout modèle, ce travail présente quelques limites, notamment dans l'étude de CEP131 dans la rétine de la souris. En effet, nous supposons que MCC régule la polarité au front de migration, mais nous n'avons pas encore la preuve que c'est bien par le contrôle du niveau protéique de CEP131 et donc par la stabilisation du centrosome. En effet, nous ne savons pas si CEP131 est surexprimé dans les cellules endothéliales des souris *Mcc<sup>iECKO</sup>*. Répondre à cette question est fastidieux car comme beaucoup de protéines CEP, CEP131 est régulé de manière post-traductionnelle, rendant les analyses par qPCR peu pertinentes. De plus, le manque d'outils pour étudier CEP131 *in vivo* (anticorps, modèles murins) ne facilite pas ce travail. Il serait cependant très intéressant de s'assurer que CEP131 soit bien augmenté chez les souris *Mcc<sup>iECKO</sup>*. Cela permettrait de développer un modèle murin *Mcc<sup>iECKO</sup>* délété pour CEP131, soit par injection de lentivirus shCep131, soit par la construction d'un modèle murin *Cep131<sup>f/f</sup>*, qui malheureusement n'existe pas.

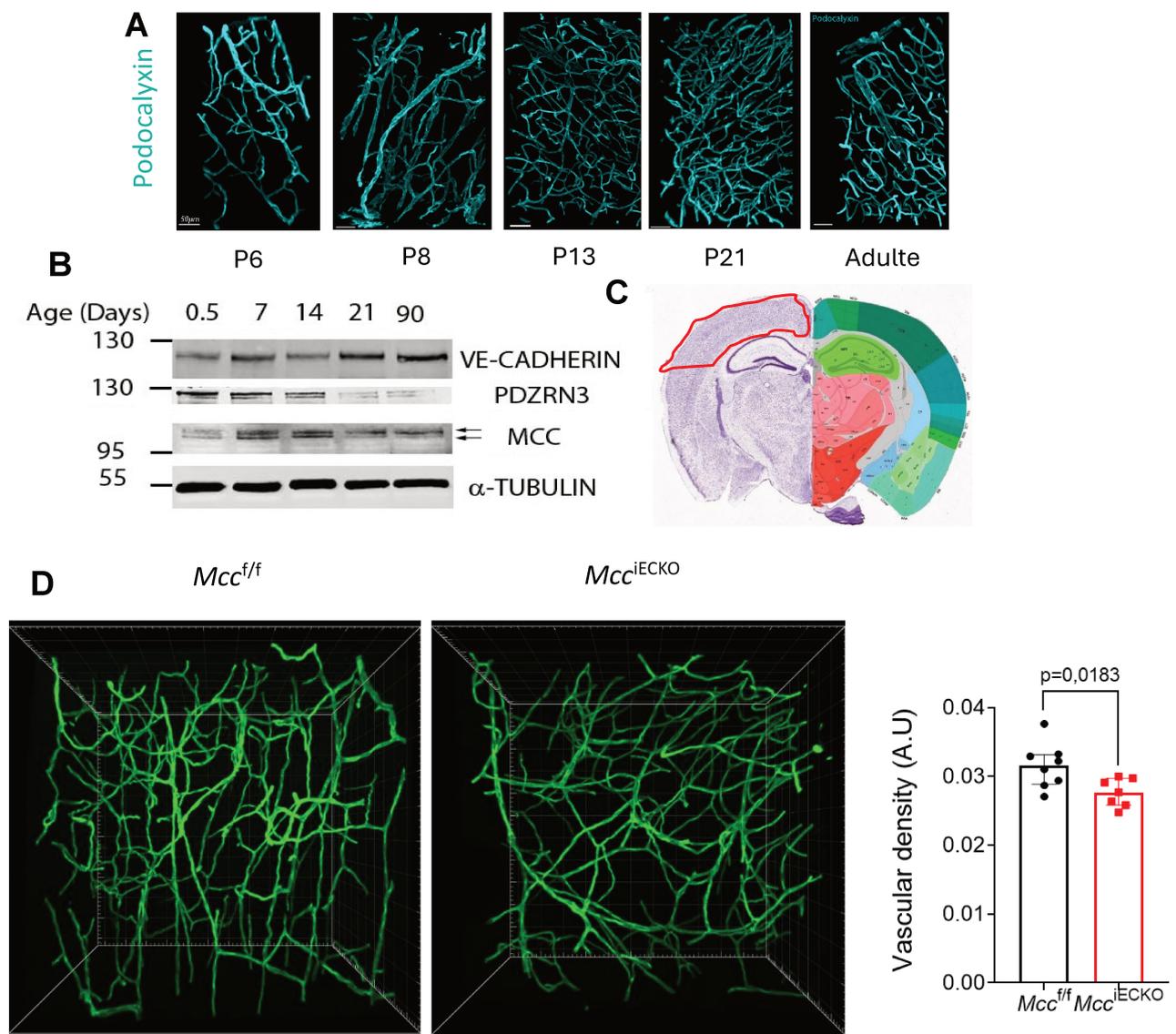
Par les données de séquençage en cellules uniques, nous savons que MCC présente des profils d'expression différents selon le type de cellules endothéliales. Selon les données de l'équipe d'Alexandre Dubrac, MCC est fortement exprimé dans les artères à P6. Cette expression diminuerait à P10. De même, l'expression de MCC diminue dans les tip cells entre P6 et P10. Au contraire, dans les capillaires et les veines, l'expression de MCC semble plus faible dès P6 et ne varie pas à P10. L'expression différentielle de MCC selon le type de cellules

endothéliales et l'âge suggère donc des fonctions propres à certains types de cellules et stades de développement. Notre étude aborde ces questions sans pour autant pouvoir les valider définitivement. Nous montrons, en effet, un rôle dual de MCC entre zone flux dépendante et zone flux-indépendante et entre le stade P6 et le stade P12. Il serait très intéressant de pouvoir comparer les profils transcriptomiques des souris contrôles et  $Mcc^{iECKO}$  entre les différents types de cellules endothéliales et les différents stades de développement. Un séquençage ARN de cellules endothéliales de rétine de souris contrôles et  $Mcc^{iECKO}$  âgées de 6 jours est actuellement en cours. Cependant, il ne s'agit pas d'un séquençage en cellules uniques, nous ne pourrions répondre que partiellement à cette problématique. L'objectif de ce séquençage est de regarder l'expression des gènes de la voie Wnt, de réponse au flux, de prolifération et d'identité artérioveineuse.

Enfin, notre projet n'adresse pas la question physiopathologique. Or, il pourrait être intéressant d'étudier la vascularisation au cours d'événements pathologiques comme l'OIR (Oxygen-induced retinopathy). Pour ce faire, des souris âgées de 6 jours sont entretenues dans une atmosphère riche en oxygène (75%) pendant une semaine. Une vaso-oblitération s'ensuit avec la formation des structures anormales appelées « tufts ». De nouveau entretenues dans une atmosphère à taux d'oxygène normal, une angiogenèse réparatrice a lieu avec résorption des « tufts » et revascularisation des zones avasculaires. C'est ce processus qu'il est intéressant d'étudier et nous pourrions comparer la revascularisation des souris contrôles et  $Mcc^{iECKO}$ . Au vu de nos résultats, nous pouvons espérer observer une revascularisation retardée chez les souris déficientes en  $Mcc$  traduite par une surface des zones avasculaires plus importantes. Nous pouvons également espérer voir un retard dans la résorption des tufts chez les souris  $Mcc^{iECKO}$ .

Quoi qu'il en soit, ce projet a révélé MCC comme un acteur important du développement vasculaire. Nous espérons pouvoir ouvrir notre étude de MCC dans cet événement à d'autres organes. Les fonctions neurologiques et synaptiques du parenchyme cérébral sont notamment garanties par une protection assurée par la BHE. De nombreuses études, récentes, démontrent qu'une déstabilisation de cette barrière est impliquée dans la physiopathologie de la démence cérébrale (voir Introduction). Ainsi, nous nous demandons, au vu des résultats dans la rétine, si MCC est également impliqué dans le développement de la BHE. Des résultats préliminaires obtenus au cours de ce travail de thèse montre que MCC est modulé au cours du développement post-natal de la BHE. En effet, après la naissance de la

souris, le réseau vasculaire cérébral se densifie jusqu'à P21 puis subit un remodelage avec une régression vasculaire (**Figure 60.a**). Des analyses par Western blot de lysats de vaisseaux isolés de la BHE montrent un changement dans le profil de MCC entre P5 et P21. Le niveau d'expression de MCC serait plus important entre P7 et P14. Il est aussi intéressant de noter qu'à partir de P21, seule la forme phosphorylée de MCC est détectée (**Figure 60.b**). Ce changement dans le profil d'expression de MCC est d'ailleurs corrélé avec un écroulement du niveau de PDZRN3, le partenaire de la voie Wnt/PCP interagissant avec MCC. De plus, nous avons quantifié la densité vasculaire, au niveau du cortex pariétal, de coupes frontales épaisses et transparentisées de cerveau de souris contrôles et  $Mcc^{iECKO}$  (**Figure 60.c**). Nous constatons une baisse de la densité vasculaire chez les mutants  $Mcc^{iECKO}$  (**Figure 60.d**).



**Figure 60: MCC, un acteur potentiel du développement de la BHE**

a. Imagerie confocale de la BHE au niveau de  $1\text{mm}^3$  de cortex pariétal dans des coupes transparisées de cerveau de souris à différents âges. Les vaisseaux sanguins sont marqués avec un anti-Podocalyxin. Echelle =  $50\mu\text{m}$ .

b. Les vaisseaux de la BHE ont été isolés du cerveau de souris à différents âges et les lysats ont été analysés par western blot avec les anticorps indiqués.

c. Représentation par Mouse Brain Atlas de la région pariétale du cerveau de souris étudiée en transparisation.

d. Imagerie confocale de la BHE au niveau de  $1\text{mm}^3$  de cortex pariétal dans des coupes transparisées de cerveau de souris à P6. Les vaisseaux sanguins sont marqués avec un anti-Podocalyxin. Une graduation =  $10\mu\text{m}$ . Six images ont été quantifiées par souris.  $Mcc^{f/f}=8$ ,  $Mcc^{iECKO}=7$ . Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  DS. P-values obtenues par un test de Mann-Whitney.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Acharya, B. R., Fang, J. S., Jeffery, E. D., Chavkin, N. W., Genet, G., Vasavada, H., Nelson, E. A., Sheynkman, G. M., Humphries, M. J., & Hirschi, K. K. (2023). Connexin 37 sequestering of activated-ERK in the cytoplasm promotes p27-mediated endothelial cell cycle arrest. *Life Science Alliance*, 6(8), e202201685. <https://doi.org/10.26508/lsa.202201685>
- Aird, W. C. (2012). Endothelial cell heterogeneity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(1), a006429. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006429>
- Alarcon-Martinez, L., Yemisci, M., & Dalkara, T. (2021). Pericyte morphology and function. *Histology and Histopathology*, 36(6), 633-643. <https://doi.org/10.14670/HH-18-314>
- Andre, P., Song, H., Kim, W., Kispert, A., & Yang, Y. (2015). Wnt5a and Wnt11 regulate mammalian anterior-posterior axis elongation. *Development (Cambridge, England)*, 142(8), 1516-1527. <https://doi.org/10.1242/dev.119065>
- Andreone, B. J., Chow, B. W., Tata, A., Lacoste, B., Ben-Zvi, A., Bullock, K., Deik, A. A., Ginty, D. D., Clish, C. B., & Gu, C. (2017). Blood-Brain Barrier Permeability Is Regulated by Lipid Transport-Dependent Suppression of Caveolae-Mediated Transcytosis. *Neuron*, 94(3), 581-594.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.03.043>
- Angulo-Urarte, A., van der Wal, T., & Huveneers, S. (2020). Cell-cell junctions as sensors and transducers of mechanical forces. *Biochimica Et Biophysica Acta. Biomembranes*, 1862(9), 183316. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183316>
- Armulik, A., Genové, G., Mäe, M., Nisancioglu, M. H., Wallgard, E., Niaudet, C., He, L., Norlin, J., Lindblom, P., Strittmatter, K., Johansson, B. R., & Betsholtz, C. (2010). Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature*, 468(7323), 557-561. <https://doi.org/10.1038/nature09522>
- Arnaud, C., Sebbagh, M., Nola, S., Audebert, S., Bidaut, G., Hermant, A., Gayet, O., Dusetti, N. J., Ollendorff, V., Santoni, M.-J., Borg, J.-P., & Lécine, P. (2009). MCC, a new interacting protein for Scrib, is required for cell migration in epithelial cells. *FEBS Letters*, 583(14), 2326-2332. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.06.034>
- Aspalter, I. M., Gordon, E., Dubrac, A., Ragab, A., Narloch, J., Vizán, P., Geudens, I., Collins, R. T., Franco, C. A., Abrahams, C. L., Thurston, G., Fruttiger, M., Rosewell, I., Eichmann, A., & Gerhardt, H. (2015). Alk1 and Alk5 inhibition by Nrp1 controls vascular sprouting downstream of Notch. *Nature Communications*, 6, 7264. <https://doi.org/10.1038/ncomms8264>
- Baish, J. W., Stylianopoulos, T., Lanning, R. M., Kamoun, W. S., Fukumura, D., Munn, L. L., & Jain, R. K. (2011). Scaling rules for diffusive drug delivery in tumor and normal tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(5), 1799-1803. <https://doi.org/10.1073/pnas.1018154108>
- Bänziger, C., Soldini, D., Schütt, C., Zipperlen, P., Hausmann, G., & Basler, K. (2006). Wntless, a conserved membrane protein dedicated to the secretion of Wnt proteins from signaling cells. *Cell*, 125(3), 509-522. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.049>
- Barbacena, P., Dominguez-Cejudo, M., Fonseca, C. G., Gómez-González, M., Faure, L. M., Zarkada, G., Pena, A., Pezzarossa, A., Ramalho, D., Giarratano, Y., Ouarné, M., Barata, D., Fortunato, I. C., Misikova, L. H., Mauldin, I., Carvalho, Y., Trepát, X., Roca-Cusachs, P., Eichmann,

- A., ... Franco, C. A. (2022). Competition for endothelial cell polarity drives vascular morphogenesis in the mouse retina. *Developmental Cell*, 57(19), 2321-2333.e9. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2022.09.002>
- Bats, M.-L., Peghaire, C., Delobel, V., Dufourcq, P., Couffinhal, T., & Duplâa, C. (2022). Wnt/frizzled Signaling in Endothelium : A Major Player in Blood-Retinal- and Blood-Brain-Barrier Integrity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 12(4), a041219. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a041219>
- Beitia, G. J., Rutherford, T. J., Freund, S. M. V., Pelham, H. R., Bienz, M., & Gammons, M. V. (2021). Regulation of Dishevelled DEP domain swapping by conserved phosphorylation sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(26), e2103258118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2103258118>
- Benard, V., Bohl, B. P., & Bokoch, G. M. (1999). Characterization of rac and cdc42 activation in chemoattractant-stimulated human neutrophils using a novel assay for active GTPases. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(19), 13198-13204. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.19.13198>
- Benedito, R., Roca, C., Sørensen, I., Adams, S., Gossler, A., Fruttiger, M., & Adams, R. H. (2009). The notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis. *Cell*, 137(6), 1124-1135. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.025>
- Benedito, R., Rocha, S. F., Woeste, M., Zamykal, M., Radtke, F., Casanovas, O., Duarte, A., Pytowski, B., & Adams, R. H. (2012). Notch-dependent VEGFR3 upregulation allows angiogenesis without VEGF-VEGFR2 signalling. *Nature*, 484(7392), 110-114. <https://doi.org/10.1038/nature10908>
- Benthani, F. A., Herrmann, D., Tran, P. N., Pangon, L., Lucas, M. C., Allam, A. H., Currey, N., Al-Sohaily, S., Giry-Laterriere, M., Warusavitarne, J., Timpson, P., & Kohonen-Corish, M. R. J. (2018). « MCC » protein interacts with E-cadherin and  $\beta$ -catenin strengthening cell-cell adhesion of HCT116 colon cancer cells. *Oncogene*, 37(5), 663-672. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.362>
- Bentley, K., Gerhardt, H., & bates, P. A. (2008). Agent-based simulation of notch-mediated tip cell selection in angiogenic sprout initialisation—PubMed. *J Theor Biol*, 250(1), 25-36. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2007.09.015>
- Ben-Zvi, A., Lacoste, B., Kur, E., Andreone, B. J., Mayshar, Y., Yan, H., & Gu, C. (2014). Mfsd2a is critical for the formation and function of the blood-brain barrier. *Nature*, 509(7501), 507-511. <https://doi.org/10.1038/nature13324>
- Berger, W., van de Pol, D., Warburg, M., Gal, A., Bleeker-Wagemakers, L., de Silva, H., Meindl, A., Meitinger, T., Cremers, F., & Ropers, H. H. (1992). Mutations in the candidate gene for Norrie disease. *Human Molecular Genetics*, 1(7), 461-465. <https://doi.org/10.1093/hmg/1.7.461>
- Bilic, J., Huang, Y.-L., Davidson, G., Zimmermann, T., Cruciat, C.-M., Bienz, M., & Niehrs, C. (2007). Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation. *Science (New York, N.Y.)*, 316(5831), 1619-1622. <https://doi.org/10.1126/science.1137065>
- Borggreffe, T., & Oswald, F. (2009). The Notch signaling pathway : Transcriptional regulation at Notch target genes. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 66(10), 1631-1646. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-8668-7>
- Bougaran, P., Bats, M. L., Delobel, V., Rubin, S., Vaurs, J., Couffinhal, T., Duplâa, C., & Dufourcq, P. (2023). ROR2/PCP a New Pathway Controlling Endothelial Cell Polarity Under Flow Conditions.

- Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 43(7), 1199-1218. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.123.319106>
- Boyé, K., Geraldo, L. H., Furtado, J., Pibouin-Fragner, L., Poulet, M., Kim, D., Nelson, B., Xu, Y., Jacob, L., Maissa, N., Agalliu, D., Claesson-Welsh, L., Ackerman, S. L., & Eichmann, A. (2022). Endothelial Unc5B controls blood-brain barrier integrity. *Nature Communications*, 13(1), 1169. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28785-9>
- Bryja, V., Schulte, G., Rawal, N., Grahn, A., & Arenas, E. (2007). Wnt-5a induces Dishevelled phosphorylation and dopaminergic differentiation via a CK1-dependent mechanism. *Journal of Cell Science*, 120(Pt 4), 586-595. <https://doi.org/10.1242/jcs.03368>
- Buglak, D. B., Kushner, E. J., Marvin, A. P., Davis, K. L., & Bautch, V. L. (2020). Excess centrosomes disrupt vascular lumenization and endothelial cell adherens junctions. *Angiogenesis*, 23(4), 567-575. <https://doi.org/10.1007/s10456-020-09737-7>
- Bundgaard, M., & Abbott, N. J. (2008). All vertebrates started out with a glial blood-brain barrier 4-500 million years ago. *Glia*, 56(7), 699-708. <https://doi.org/10.1002/glia.20642>
- Butler, M. T., & Wallingford, J. B. (2017). Planar cell polarity in development and disease. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 18(6), 375-388. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.11>
- Cancer Genome Atlas Network. (2012). Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*, 487(7407), 330-337. <https://doi.org/10.1038/nature11252>
- Carvalho, J. R., Fortunato, I. C., Fonseca, C. G., Pezzarossa, A., Barbacena, P., Dominguez-Cejudo, M. A., Vasconcelos, F. F., Santos, N. C., Carvalho, F. A., & Franco, C. A. (2019). Non-canonical Wnt signaling regulates junctional mechanocoupling during angiogenic collective cell migration. *eLife*, 8, e45853. <https://doi.org/10.7554/eLife.45853>
- Cavallo, R. A., Cox, R. T., Moline, M. M., Roose, J., Polevoy, G. A., Clevers, H., Peifer, M., & Bejsovec, A. (1998). Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature*, 395(6702), 604-608. <https://doi.org/10.1038/26982>
- Chavkin, N. W., Genet, G., Poulet, M., Jeffery, E. D., Marziano, C., Genet, N., Vasavada, H., Nelson, E. A., Acharya, B. R., Kour, A., Aragon, J., McDonnell, S. P., Huba, M., Sheynkman, G. M., Walsh, K., & Hirschi, K. K. (2022). Endothelial cell cycle state determines propensity for arterial-venous fate. *Nature Communications*, 13(1), 5891. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33324-7>
- Chen, J., Stahl, A., Krah, N. M., Seaward, M. R., Joyal, J.-S., Juan, A. M., Hatton, C. J., Aderman, C. M., Dennison, R. J., Willett, K. L., Sapieha, P., & Smith, L. E. H. (2012). Retinal expression of Wnt-pathway mediated genes in low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (Lrp5) knockout mice. *PLoS One*, 7(1), e30203. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030203>
- Chen, Q., Jiang, L., Li, C., Hu, D., Bu, J., Cai, D., & Du, J. (2012). Haemodynamics-driven developmental pruning of brain vasculature in zebrafish. *PLoS Biology*, 10(8), e1001374. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001374>
- Chen, W.-S., Antic, D., Matis, M., Logan, C. Y., Povelones, M., Anderson, G. A., Nusse, R., & Axelrod, J. D. (2008a). Asymmetric homotypic interactions of the atypical cadherin Flamingo mediate intercellular polarity signaling. *Cell*, 133(6), 1093-1105. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.04.048>
- Chen, W.-S., Antic, D., Matis, M., Logan, C. Y., Povelones, M., Anderson, G. A., Nusse, R., & Axelrod, J. D. (2008b). Asymmetric homotypic interactions of the atypical cadherin flamingo

- mediate intercellular polarity signaling. *Cell*, 133(6), 1093-1105. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.04.048>
- Cheslow, L., & Alvarez, J. I. (2016). Glial-endothelial crosstalk regulates blood-brain barrier function. *Current Opinion in Pharmacology*, 26, 39-46. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2015.09.010>
- Cho, C., Smallwood, P. M., & Nathans, J. (2017). Reck and Gpr124 Are Essential Receptor Cofactors for Wnt7a/Wnt7b-Specific Signaling in Mammalian CNS Angiogenesis and Blood-Brain Barrier Regulation. *Neuron*, 95(5), 1056-1073.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.07.031>
- Cirone, P., Lin, S., Griesbach, H. L., Zhang, Y., Slusarski, D. C., & Crews, C. M. (2008). A role for planar cell polarity signaling in angiogenesis. *Angiogenesis*, 11(4), 347-360. <https://doi.org/10.1007/s10456-008-9116-2>
- Coan, D. E., Wechezak, A. R., Viggers, R. F., & Sauvage, L. R. (1993). Effect of shear stress upon localization of the Golgi apparatus and microtubule organizing center in isolated cultured endothelial cells. *Journal of Cell Science*, 104 ( Pt 4), 1145-1153. <https://doi.org/10.1242/jcs.104.4.1145>
- Collins, C., Guilluy, C., Welch, C., O'Brien, E. T., Hahn, K., Superfine, R., Burrridge, K., & Tzima, E. (2012). Localized Tensional Forces on PECAM-1 Elicit a Global Mechanotransduction Response via the Integrin-RhoA Pathway. *Current Biology*, 22(22), 2087-2094. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.08.051>
- Conway, D. E., Breckenridge, M. T., Hinde, E., Gratton, E., Chen, C. S., & Schwartz, M. A. (2013). Fluid shear stress on endothelial cells modulates mechanical tension across VE-cadherin and PECAM-1. *Current Biology: CB*, 23(11), 1024-1030. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.04.049>
- Coomber, B. L. (1993). Centrosome reorientation in regenerating endothelial monolayers requires bFGF. *Journal of Cellular Biochemistry*, 52(3), 289-296. <https://doi.org/10.1002/jcb.240520305>
- Coon, B. G., Baeyens, N., Han, J., Budatha, M., Ross, T. D., Fang, J. S., Yun, S., Thomas, J.-L., & Schwartz, M. A. (2015). Intramembrane binding of VE-cadherin to VEGFR2 and VEGFR3 assembles the endothelial mechanosensory complex. *The Journal of Cell Biology*, 208(7), 975-986. <https://doi.org/10.1083/jcb.201408103>
- Corada, M., Morini, M. F., & Dejana, E. (2014). Signaling pathways in the specification of arteries and veins. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 34(11), 2372-2377. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.303218>
- Corada, M., Orsenigo, F., Morini, M. F., Pitulescu, M. E., Bhat, G., Nyqvist, D., Breviario, F., Conti, V., Briot, A., Iruela-Arispe, M. L., Adams, R. H., & Dejana, E. (2013). Sox17 is indispensable for acquisition and maintenance of arterial identity. *Nature Communications*, 4, 2609. <https://doi.org/10.1038/ncomms3609>
- Cunha-Ferreira, I., Bento, I., Pimenta-Marques, A., Jana, S. C., Lince-Faria, M., Duarte, P., Borrego-Pinto, J., Gilberto, S., Amado, T., Brito, D., Rodrigues-Martins, A., Debski, J., Dzhindzhev, N., & Bettencourt-Dias, M. (2013). Regulation of autophosphorylation controls PLK4 self-destruction and centriole number. *Current Biology: CB*, 23(22), 2245-2254. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.09.037>
- Currey, N., Jahan, Z., Caldon, C. E., Tran, P. N., Benthani, F., De Lacavalerie, P., Roden, D. L., Gloss, B. S., Campos, C., Bean, E. G., Bullman, A., Reibe-Pal, S., Dinger, M. E., Febbraio, M. A., Clarke, S. J., Dahlstrom, J. E., & Kohonen-Corish, M. R. J. (2019). Mouse Model of Mutated in Colorectal

Cancer Gene Deletion Reveals Novel Pathways in Inflammation and Cancer. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 7(4), 819-839. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2019.01.009>

Curto, J., Del Valle-Pérez, B., Villarroel, A., Fuertes, G., Vinyoles, M., Peña, R., García de Herreros, A., & Duñach, M. (2018). CK1 $\epsilon$  and p120-catenin control Ror2 function in noncanonical Wnt signaling. *Molecular Oncology*, 12(5), 611-629. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12184>

Daneman, R., Agalliu, D., Zhou, L., Kuhnert, F., Kuo, C. J., & Barres, B. A. (2009). Wnt/beta-catenin signaling is required for CNS, but not non-CNS, angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(2), 641-646. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805165106>

Das, H., Kumar, A., Lin, Z., Patino, W. D., Hwang, P. M., Feinberg, M. W., Majumder, P. K., & Jain, M. K. (2006). Kruppel-like factor 2 (KLF2) regulates proinflammatory activation of monocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(17), 6653-6658. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508235103>

Das, S., Yu, S., Sakamori, R., Stypulkowski, E., & Gao, N. (2012). Wntless in Wnt secretion : Molecular, cellular and genetic aspects. *Frontiers in Biology*, 7(6), 587-593. <https://doi.org/10.1007/s11515-012-1200-8>

Davidson, G., Wu, W., Shen, J., Bilic, J., Fenger, U., Stanek, P., Glinka, A., & Niehrs, C. (2005). Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature*, 438(7069), 867-872. <https://doi.org/10.1038/nature04170>

Davis, M. J., Earley, S., Li, Y.-S., & Chien. (2023). Vascular mechanotransduction. *Physiol Rev*, 103(2), 1247-1421. <https://doi.org/10.1152/physrev.00053.2021>

De Bock, K., Georgiadou, M., Schoors, S., Kuchnio, A., Wong, B. W., Cantelmo, A. R., Quaegebeur, A., Ghesquière, B., Cauwenberghs, S., Eelen, G., Phng, L.-K., Betz, I., Tembuyser, B., Brepoels, K., Welti, J., Geudens, I., Segura, I., Cruys, B., Bifari, F., ... Carmeliet, P. (2013). Role of PFKFB3-driven glycolysis in vessel sprouting. *Cell*, 154(3), 651-663. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.037>

Dekker, R. J., Boon, R. A., Rondaij, M. G., Kragt, A., Volger, O. L., Elderkamp, Y. W., Meijers, J. C. M., Voorberg, J., Pannekoek, H., & Horrevoets, A. J. G. (2006). KLF2 provokes a gene expression pattern that establishes functional quiescent differentiation of the endothelium. *Blood*, 107(11), 4354-4363. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-08-3465>

Dekker, R. J., van Soest, S., Fontijn, R. D., Salamanca, S., de Groot, P. G., VanBavel, E., Pannekoek, H., & Horrevoets, A. J. G. (2002). Prolonged fluid shear stress induces a distinct set of endothelial cell genes, most specifically lung Kruppel-like factor (KLF2). *Blood*, 100(5), 1689-1698. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-01-0046>

Del Valle-Pérez, B., Arqués, O., Vinyoles, M., de Herreros, A. G., & Duñach, M. (2011). Coordinated action of CK1 isoforms in canonical Wnt signaling. *Molecular and Cellular Biology*, 31(14), 2877-2888. <https://doi.org/10.1128/MCB.01466-10>

Denu, R. A., Sass, M. M., Johnson, J. M., Potts, G. K., Choudhary, A., Coon, J. J., & Burkard, M. E. (2019). Polo-like kinase 4 maintains centriolar satellite integrity by phosphorylation of centrosomal protein 131 (CEP131). *The Journal of Biological Chemistry*, 294(16), 6531-6549. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004867>

Devenport, D. (2014). The cell biology of planar cell polarity. *The Journal of Cell Biology*, 207(2), 171-179. <https://doi.org/10.1083/jcb.201408039>

- Doddaballapur, A., Michalik, K. M., Manavski, Y., Lucas, T., Houtkooper, R. H., You, X., Chen, W., Zeiher, A. M., Potente, M., Dimmeler, S., & Boon, R. A. (2015). Lamellar shear stress inhibits endothelial cell metabolism via KLF2-mediated repression of PFKFB3. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 35(1), 137-145. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304277>
- Dorrell, M. I., Aguilar, E., & Friedlander, M. (2002). Retinal vascular development is mediated by endothelial filopodia, a preexisting astrocytic template and specific R-cadherin adhesion. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 43(11), 3500-3510.
- Dorrell, M. I., & Friedlander, M. (2006). Mechanisms of endothelial cell guidance and vascular patterning in the developing mouse retina. *Progress in Retinal and Eye Research*, 25(3), 277-295. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2006.01.001>
- Dow, L. E., Kauffman, J. S., Caddy, J., Zarbalis, K., Peterson, A. S., Jane, S. M., Russell, S. M., & Humbert, P. O. (2007). The tumour-suppressor Scribble dictates cell polarity during directed epithelial migration: Regulation of Rho GTPase recruitment to the leading edge. *Oncogene*, 26(16), 2272-2282. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210016>
- Doxsey, S., McCollum, D., & Theurkauf, W. (2005). Centrosomes in cellular regulation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21, 411-434. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.122303.120418>
- Dubrac, A., Genet, G., Ola, R., Zhang, F., Pibouin-Fragner, L., Han, J., Zhang, J., Thomas, J.-L., Chedotal, A., Schwartz, M. A., & Eichmann, A. (2016). Targeting NCK-Mediated Endothelial Cell Front-Rear Polarity Inhibits Neovascularization. *Circulation*, 133(4), 409-421. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.017537>
- Dufourcq, P., Descamps, B., Tojais, N. F., Leroux, L., Oses, P., Daret, D., Moreau, C., Lamazière, J.-M. D., Couffinhal, T., & Dupl aa, C. (2008). Secreted frizzled-related protein-1 enhances mesenchymal stem cell function in angiogenesis and contributes to neovessel maturation. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 26(11), 2991-3001. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0372>
- Dumas, S. J., García-Caballero, M., & Carmeliet, P. (2020). Metabolic Signatures of Distinct Endothelial Phenotypes. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 31(8), 580-595. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2020.05.009>
- Eerola, I., Boon, L. M., Mulliken, J. B., Burrows, P. E., Dompmartin, A., Watanabe, S., Vanwijck, R., & Vikkula, M. (2003). Capillary malformation-arteriovenous malformation, a new clinical and genetic disorder caused by RASA1 mutations. *American Journal of Human Genetics*, 73(6), 1240-1249. <https://doi.org/10.1086/379793>
- Eisa-Beygi, S., Benslimane, F. M., El-Rass, S., Prabhudesai, S., Abdelrasoul, M. K. A., Simpson, P. M., Yalcin, H. C., Burrows, P. E., & Ramchandran, R. (2018). Characterization of Endothelial Cilia Distribution During Cerebral-Vascular Development in Zebrafish ( *Danio rerio*). *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 38(12), 2806-2818. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.311231>
- Eubelen, M., Bostaille, N., Cabochette, P., Gauquier, A., Tebabi, P., Dumitru, A. C., Koehler, M., Gut, P., Alsteens, D., Stainier, D. Y. R., Garcia-Pino, A., & Vanhollebeke, B. (2018). A molecular mechanism for Wnt ligand-specific signaling. *Science (New York, N.Y.)*, 361(6403), eaat1178. <https://doi.org/10.1126/science.aat1178>
- Ezan, J., Leroux, L., Barandon, L., Dufourcq, P., Jaspard-Vinassa, B., Moreau, C., Alli eres, C., Daret, D., Couffinhal, T., & Dupl aa, C. (2004). FrzA/sFRP-1, a secreted antagonist of the Wnt-Frizzled

- pathway, controls vascular cell proliferation in vitro and in vivo. *Cardiovascular Research*, 63, 731-738. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.05.006>
- Fang, J. S., Coon, B. G., Gillis, N., Chen, Z., Qiu, J., Chittenden, T. W., Burt, J. M., Schwartz, M. A., & Hirschi, K. K. (2017). Shear-induced Notch-Cx37-p27 axis arrests endothelial cell cycle to enable arterial specification. *Nature Communications*, 8(1), 2149. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01742-7>
- Ferrara, N. (2001). Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 280(6), C1358-1366. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.280.6.C1358>
- Fledderus, J. O., van Thienen, J. V., Boon, R. A., Dekker, R. J., Rohlena, J., Volger, O. L., Bijmens, A.-P. J. J., Daemen, M. J. A. P., Kuiper, J., van Berkel, T. J. C., Pannekoek, H., & Horrevoets, A. J. G. (2007). Prolonged shear stress and KLF2 suppress constitutive proinflammatory transcription through inhibition of ATF2. *Blood*, 109(10), 4249-4257. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-07-036020>
- Fleming, I., Fisslthaler, B., Dixit, M., & Busse, R. (2005). Role of PECAM-1 in the shear-stress-induced activation of Akt and the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in endothelial cells. *Journal of Cell Science*, 118(18), 4103-4111. <https://doi.org/10.1242/jcs.02541>
- Fonseca, C. G., Barbacena, P., & Franco, C. A. (2020). Endothelial cells on the move : Dynamics in vascular morphogenesis and disease. *Vascular Biology (Bristol, England)*, 2(1), H29-H43. <https://doi.org/10.1530/VB-20-0007>
- Franco, C. A., Jones, M. L., Bernabeu, M. O., Geudens, I., Mathivet, T., Rosa, A., Lopes, F. M., Lima, A. P., Ragab, A., Collins, R. T., Phng, L.-K., Coveney, P. V., & Gerhardt, H. (2015). Dynamic endothelial cell rearrangements drive developmental vessel regression. *PLoS Biology*, 13(4), e1002125. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002125>
- Franco, C. A., Jones, M. L., Bernabeu, M. O., Vion, A.-C., Barbacena, P., Fan, J., Mathivet, T., Fonseca, C. G., Ragab, A., Yamaguchi, T. P., Coveney, P. V., Lang, R. A., & Gerhardt, H. (2016). Non-canonical Wnt signalling modulates the endothelial shear stress flow sensor in vascular remodelling. *eLife*, 5, e07727. <https://doi.org/10.7554/eLife.07727>
- Fukuyama, R., Nicolaita, R., Ng, K. P., Obusez, E., Sanchez, J., Kalady, M., Aung, P. P., Casey, G., & Sizemore, N. (2008). Mutated in colorectal cancer, a putative tumor suppressor for serrated colorectal cancer, selectively represses beta-catenin-dependent transcription. *Oncogene*, 27(46), 6044-6055. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.204>
- Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., Jeltsch, M., Mitchell, C., Alitalo, K., Shima, D., & Betsholtz, C. (2003). VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *The Journal of Cell Biology*, 161(6), 1163-1177. <https://doi.org/10.1083/jcb.200302047>
- Goel, S., Wong, A. H.-K., & Jain, R. K. (2012). Vascular normalization as a therapeutic strategy for malignant and nonmalignant disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(3), a006486. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006486>
- Gonzalez-Avila, G., Sommer, B., Mendoza-Posada, D. A., Ramos, C., Garcia-Hernandez, A. A., & Falfan-Valencia, R. (2019). Matrix metalloproteinases participation in the metastatic process and their diagnostic and therapeutic applications in cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 137, 57-83. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2019.02.010>

- Goodrich, L. V., & Strutt, D. (2011). Principles of planar polarity in animal development. *Development (Cambridge, England)*, 138(10), 1877-1892. <https://doi.org/10.1242/dev.054080>
- Gordon, M. D., & Nusse, R. (2006). Wnt signaling : Multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(32), 22429-22433. <https://doi.org/10.1074/jbc.R600015200>
- Gotlieb, A. I., Subrahmanyam, L., & Kalnins, V. I. (1983). Microtubule-organizing centers and cell migration : Effect of inhibition of migration and microtubule disruption in endothelial cells. *The Journal of Cell Biology*, 96(5), 1266-1272. <https://doi.org/10.1083/jcb.96.5.1266>
- Grumolato, L., Liu, G., Mong, P., Mudbhary, R., Biswas, R., Arroyave, R., Vijayakumar, S., Economides, A. N., & Aaronson, S. A. (2010). Canonical and noncanonical Wnts use a common mechanism to activate completely unrelated coreceptors. *Genes & Development*, 24(22), 2517-2530. <https://doi.org/10.1101/gad.1957710>
- Gueniot, F., Rubin, S., Bougaran, P., Abelanet, A., Morel, J. L., Bontempi, B., Proust, C., Dufourcq, P., Couffinhal, T., & Duplâa, C. (2022). Targeting Pdzrn3 maintains adult blood-brain barrier and central nervous system homeostasis. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 42(4), 613-629. <https://doi.org/10.1177/0271678X211048981>
- Guérit, S., Fidan, E., Macas, J., Czapalla, C. J., Figueiredo, R., Vijikumar, A., Yalcin, B. H., Thom, S., Winter, P., Gerhardt, H., Devraj, K., & Liebner, S. (2021). Astrocyte-derived Wnt growth factors are required for endothelial blood-brain barrier maintenance. *Progress in Neurobiology*, 199, 101937. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2020.101937>
- Habas, R., Dawid, I. B., & He, X. (2003). Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation. *Genes & Development*, 17(2), 295-309. <https://doi.org/10.1101/gad.1022203>
- Habas, R., Kato, Y., & He, X. (2001). Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel Formin homology protein Daam1. *Cell*, 107(7), 843-854. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00614-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00614-6)
- Hahn, C., & Schwartz, M. A. (2009). Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 10(1), 53-62. <https://doi.org/10.1038/nrm2596>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer : The next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- He, W., Lu, Q., Sherchan, P., Huang, L., Hu, X., Zhang, J. H., Dai, H., & Tang, J. (2021). Activation of Frizzled-7 attenuates blood-brain barrier disruption through Dvl/β-catenin/WISP1 signaling pathway after intracerebral hemorrhage in mice. *Fluids and Barriers of the CNS*, 18(1), 44. <https://doi.org/10.1186/s12987-021-00278-9>
- Heinonen, K. M., Vanegas, J. R., Lew, D., Krosel, J., & Perreault, C. (2011). Wnt4 enhances murine hematopoietic progenitor cell expansion through a planar cell polarity-like pathway. *PloS One*, 6(4), e19279. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019279>
- Hellström, M., Phng, L.-K., Hofmann, J. J., Wallgard, E., Coultas, L., Lindblom, P., Alva, J., Nilsson, A.-K., Karlsson, L., Gaiano, N., Yoon, K., Rossant, J., Iruela-Arispe, M. L., Kalén, M., Gerhardt, H., & Betsholtz, C. (2007). Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature*, 445(7129), 776-780. <https://doi.org/10.1038/nature05571>

- Herwig, L., Blum, Y., Krudewig, A., Ellertsdottir, E., Lenard, A., Belting, H.-G., & Affolter, M. (2011). Distinct cellular mechanisms of blood vessel fusion in the zebrafish embryo. *Current Biology: CB*, 21(22), 1942-1948. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.10.016>
- Hikita, T., Mirzapourshafiyi, F., Barbacena, P., Riddell, M., Pasha, A., Li, M., Kawamura, T., Brandes, R. P., Hirose, T., Ohno, S., Gerhardt, H., Matsuda, M., Franco, C. A., & Nakayama, M. (2018). PAR-3 controls endothelial planar polarity and vascular inflammation under laminar flow. *EMBO Reports*, 19(9), e45253. <https://doi.org/10.15252/embr.201745253>
- Holdgaard, S. G., Cianfanelli, V., Pupo, E., Lambrughi, M., Lubas, M., Nielsen, J. C., Eibes, S., Maiani, E., Harder, L. M., Wesch, N., Foged, M. M., Maeda, K., Nazio, F., de la Ballina, L. R., Dötsch, V., Brech, A., Frankel, L. B., Jäättelä, M., Locatelli, F., ... Cecconi, F. (2019). Selective autophagy maintains centrosome integrity and accurate mitosis by turnover of centriolar satellites. *Nature Communications*, 10(1), 4176. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12094-9>
- Hori, A., Barnouin, K., Snijders, A. P., & Toda, T. (2016). A non-canonical function of Plk4 in centriolar satellite integrity and ciliogenesis through PCM1 phosphorylation. *EMBO Reports*, 17(3), 326-337. <https://doi.org/10.15252/embr.201541432>
- Hotchkiss, K. A., Ashton, A. W., Mahmood, R., Russell, R. G., Sparano, J. A., & Schwartz, E. L. (2002). Inhibition of endothelial cell function in vitro and angiogenesis in vivo by docetaxel (Taxotere): Association with impaired repositioning of the microtubule organizing center. *Molecular Cancer Therapeutics*, 1(13), 1191-1200.
- Hu, W., Mahavadi, S., Huang, J., Li, F., & Murthy, K. S. (2006). Characterization of S1P1 and S1P2 receptor function in smooth muscle by receptor silencing and receptor protection. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 291(4), G605-610. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00147.2006>
- Huang, H., Vandekeere, S., Kalucka, J., Bierhansl, L., Zecchin, A., Brüning, U., Visnagri, A., Yuldasheva, N., Goveia, J., Cruys, B., Brepoels, K., Wyns, S., Rayport, S., Ghesquière, B., Vinckier, S., Schoonjans, L., Cubbon, R., Dewerchin, M., Eelen, G., & Carmeliet, P. (2017). Role of glutamine and interlinked asparagine metabolism in vessel formation. *The EMBO Journal*, 36(16), 2334-2352. <https://doi.org/10.15252/embj.201695518>
- Huarcaya Najarro, E., Huang, J., Jacobo, A., Quiruz, L. A., Grillet, N., & Cheng, A. G. (2020). Dual regulation of planar polarization by secreted Wnts and Vangl2 in the developing mouse cochlea. *Development*, 147(19). <https://doi.org/10.1242/dev.191981>
- Huber, J. D., Egleton, R. D., & Davis, T. P. (2001). Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. *Trends in Neurosciences*, 24(12), 719-725. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(00\)02004-x](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(00)02004-x)
- Iruela-Arispe, M. L., & Davis, G. E. (2009). Cellular and molecular mechanisms of vascular lumen formation. *Developmental Cell*, 16(2), 222-231. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.01.013>
- Ito, M., & Yoshioka, M. (1999). Regression of the hyaloid vessels and pupillary membrane of the mouse. *Anatomy and Embryology*, 200(4), 403-411. <https://doi.org/10.1007/s004290050289>
- Iturria-Medina, Y., Sotero, R. C., Toussaint, P. J., Mateos-Pérez, J. M., Evans, A. C., & Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. (2016). Early role of vascular dysregulation on late-onset Alzheimer's disease based on multifactorial data-driven analysis. *Nature Communications*, 7, 11934. <https://doi.org/10.1038/ncomms11934>

- Janda, C. Y., Waghray, D., Levin, A. M., Thomas, C., & Garcia, K. C. (2012). Structural basis of Wnt recognition by Frizzled. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6090), 59-64. <https://doi.org/10.1126/science.1222879>
- Jensen, L. D., Hot, B., Ramsköld, D., Germano, R. F. V., Yokota, C., Giatrellis, S., Lauschke, V. M., Hubmacher, D., Li, M. X., Hupe, M., Arnold, T. D., Sandberg, R., Frisén, J., Trusohamn, M., Martowicz, A., Wisniewska-Kruk, J., Nyqvist, D., Adams, R. H., Apte, S. S., ... Kele, J. (2019). Disruption of the Extracellular Matrix Progressively Impairs Central Nervous System Vascular Maturation Downstream of  $\beta$ -Catenin Signaling. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 39(7), 1432-1447. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.312388>
- Junge, H. J., Yang, S., Burton, J. B., Paes, K., Shu, X., French, D. M., Costa, M., Rice, D. S., & Ye, W. (2009). TSPAN12 regulates retinal vascular development by promoting Norrin- but not Wnt-induced FZD4/beta-catenin signaling. *Cell*, 139(2), 299-311. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.048>
- Kalluri, R. (2003). Basement membranes : Structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nature Reviews. Cancer*, 3(6), 422-433. <https://doi.org/10.1038/nrc1094>
- Kania, K. D., Wijesuriya, H. C., Hladky, S. B., & Barrand, M. A. (2011). Beta amyloid effects on expression of multidrug efflux transporters in brain endothelial cells. *Brain Research*, 1418, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.08.044>
- Kato, M., Patel, M. S., Lévassieur, R., Lobov, I., Chang, B. H.-J., Glass, D. A., Hartmann, C., Li, L., Hwang, T.-H., Brayton, C. F., Lang, R. A., Karsenty, G., & Chan, L. (2002). Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *The Journal of Cell Biology*, 157(2), 303-314. <https://doi.org/10.1083/jcb.200201089>
- Kelly, L. K., Wu, J., Yanfeng, W. A., & Mlodzik, M. (2016). Frizzled-Induced Van Gogh Phosphorylation by CK1 $\epsilon$  Promotes Asymmetric Localization of Core PCP Factors in Drosophila. *Cell Reports*, 16(2), 344-356. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.06.010>
- Ki, S. M., Kim, J. H., Won, S. Y., Oh, S. J., Lee, I. Y., Bae, Y., Chung, K. W., Choi, B., Park, B., Choi, E., & Lee, J. E. (2020). CEP41-mediated ciliary tubulin glutamylation drives angiogenesis through AURKA-dependent deciliation. *EMBO reports*, 21(2), e48290. <https://doi.org/10.15252/embr.201948290>
- Kim, B., Li, J., Jang, C., & Arany, Z. (2017). Glutamine fuels proliferation but not migration of endothelial cells. *The EMBO Journal*, 36(16), 2321-2333. <https://doi.org/10.15252/emboj.201796436>
- Kim, D. H., Ahn, J. S., Han, H. J., Kim, H.-M., Hwang, J., Lee, K. H., Cha-Molstad, H., Ryoo, I.-J., Jang, J.-H., Ko, S.-K., Yang, J. O., Lee, H. G., Lee, S., Song, E. J., Kim, J. Y., Huh, Y. H., Kwon, Y. T., Soung, N.-K., & Kim, B. Y. (2019). Cep131 overexpression promotes centrosome amplification and colon cancer progression by regulating Plk4 stability. *Cell Death & Disease*, 10(8), 570. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1778-8>
- Kinzler, K. W., Nilbert, M. C., Vogelstein, B., Bryan, T. M., Levy, D. B., Smith, K. J., Preisinger, A. C., Hamilton, S. R., Hedge, P., & Markham, A. (1991). Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers. *Science (New York, N.Y.)*, 251(4999), 1366-1370. <https://doi.org/10.1126/science.1848370>
- Kohonen-Corish, M. R. J., Sigglekow, N. D., Susanto, J., Chapuis, P. H., Bokey, E. L., Dent, O. F., Chan, C., Lin, B. P. C., Seng, T. J., Laird, P. W., Young, J., Leggett, B. A., Jass, J. R., & Sutherland, R.

- L. (2007). Promoter methylation of the mutated in colorectal cancer gene is a frequent early event in colorectal cancer. *Oncogene*, 26(30), 4435-4441. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210210>
- Konopelski Snavelly, S. E., Susman, M. W., Kunz, R. C., Tan, J., Srinivasan, S., Cohen, M. D., Okada, K., Lamb, H., Choi, S. S., Karuna, E. P., Scales, M. K., Gygi, S. P., Greenberg, M. E., & Ho, H.-Y. H. (2021). Proteomic analysis identifies the E3 ubiquitin ligase Pdzrn3 as a regulatory target of Wnt5a-Ror signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(25), e2104944118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2104944118>
- Koo, Y., Barry, D. M., Xu, K., Tanigaki, K., Davis, G. E., Mineo, C., & Cleaver, O. (2016). Rasip1 is essential to blood vessel stability and angiogenic blood vessel growth. *Angiogenesis*, 19(2), 173-190. <https://doi.org/10.1007/s10456-016-9498-5>
- Korn, C., Scholz, B., Hu, J., Srivastava, K., Wojtarowicz, J., Arnsperger, T., Adams, R. H., Boutros, M., Augustin, H. G., & Augustin, I. (2014). Endothelial cell-derived non-canonical Wnt ligands control vascular pruning in angiogenesis. *Development (Cambridge, England)*, 141(8), 1757-1766. <https://doi.org/10.1242/dev.104422>
- Kushner, E. J., Ferro, L. S., Yu, Z., & Bautch, V. L. (2016). Excess centrosomes perturb dynamic endothelial cell repolarization during blood vessel formation. *Molecular Biology of the Cell*, 27(12), 1911-1920. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-09-0645>
- Kusumbe, A. P., Ramasamy, S. K., & Adams, R. H. (2014). Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone. *Nature*, 507(7492), 323-328. <https://doi.org/10.1038/nature13145>
- Lacey, K. R., Jackson, P. K., & Stearns, T. (1999). Cyclin-dependent kinase control of centrosome duplication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(6), 2817-2822. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.6.2817>
- Lai, M. B., Zhang, C., Shi, J., Johnson, V., Khandan, L., McVey, J., Klymkowsky, M. W., Chen, Z., & Junge, H. J. (2017). TSPAN12 Is a Norrin Co-receptor that Amplifies Frizzled4 Ligand Selectivity and Signaling. *Cell Reports*, 19(13), 2809-2822. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.06.004>
- Laviña, B., Castro, M., Niaudet, C., Cruys, B., Álvarez-Aznar, A., Carmeliet, P., Bentley, K., Brakebusch, C., Betsholtz, C., & Gaengel, K. (2018). Defective endothelial cell migration in the absence of Cdc42 leads to capillary-venous malformations. *Development (Cambridge, England)*, 145(13), dev161182. <https://doi.org/10.1242/dev.161182>
- Lee, H.-W., Shin, J. H., & Simons, M. (2022). Flow goes forward and cells step backward : Endothelial migration. *Experimental & Molecular Medicine*, 54(6), 711-719. <https://doi.org/10.1038/s12276-022-00785-1>
- Lee, H.-W., Xu, Y., He, L., Choi, W., Gonzalez, D., Jin, S.-W., & Simons, M. (2021). Role of Venous Endothelial Cells in Developmental and Pathologic Angiogenesis. *Circulation*, 144(16), 1308-1322. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.121.054071>
- Lee, J. E., Silhavy, J. L., Zaki, M. S., Schroth, J., Bielas, S. L., Marsh, S. E., Olvera, J., Brancati, F., Iannicelli, M., Ikegami, K., Schlossman, A. M., Merriman, B., Attié-Bitach, T., Logan, C. V., Glass, I. A., Cluckey, A., Louie, C. M., Lee, J. H., Raynes, H. R., ... Gleeson, J. G. (2012). CEP41 is mutated in Joubert syndrome and is required for tubulin glutamylation at the cilium. *Nature Genetics*, 44(2), 193-199. <https://doi.org/10.1038/ng.1078>

- Lee, J. S. H., Chang, melissa I., Tseng, Y., & Wirtz, D. (2005). Cdc42 mediates nucleus movement and MTOC polarization in Swiss 3T3 fibroblasts under mechanical shear stress—PubMed. *Mol Biol Cell*, 16(2), 871-880. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-12-0910>
- Lee, K., Agrawal, V., Kim, K., Kim, J., Park, H., Lee, S., Kim, Y.-M., Suh, Y.-G., & Kwon, Y.-G. (2014). Combined effect of vascular-leakage-blocker Sac-1004 and antiangiogenic drug sunitinib on tumor angiogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 450(4), 1320-1326. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.06.139>
- Lengfeld, J. E., Lutz, S. E., Smith, J. R., Diaconu, C., Scott, C., Kofman, S. B., Choi, C., Walsh, C. M., Raine, C. S., Agalliu, I., & Agalliu, D. (2017). Endothelial Wnt/ $\beta$ -catenin signaling reduces immune cell infiltration in multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(7), E1168-E1177. <https://doi.org/10.1073/pnas.1609905114>
- Li, X., Kumar, A., & Carmeliet, P. (2019). Metabolic Pathways Fueling the Endothelial Cell Drive. *Annual Review of Physiology*, 81, 483-503. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020518-114731>
- Liebner, S., Corada, M., Bangsow, T., Babbage, J., Taddei, A., Czupalla, C. J., Reis, M., Felici, A., Wolburg, H., Fruttiger, M., Taketo, M. M., von Melchner, H., Plate, K. H., Gerhardt, H., & Dejana, E. (2008). Wnt/beta-catenin signaling controls development of the blood-brain barrier. *The Journal of Cell Biology*, 183(3), 409-417. <https://doi.org/10.1083/jcb.200806024>
- Lim, J. C., Kania, K. D., Wijesuriya, H., Chawla, S., Sethi, J. K., Pulaski, L., Romero, I. A., Couraud, P. O., Weksler, B. B., Hladky, S. B., & Barrand, M. A. (2008). Activation of beta-catenin signalling by GSK-3 inhibition increases p-glycoprotein expression in brain endothelial cells. *Journal of Neurochemistry*, 106(4), 1855-1865. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05537.x>
- Lim, L., Balakrishnan, A., Huskey, N., Jones, K. D., Jodari, M., Ng, R., Song, G., Riordan, J., Anderton, B., Cheung, S.-T., Willenbring, H., Dupuy, A., Chen, X., Brown, D., Chang, A. N., & Goga, A. (2014). MicroRNA-494 within an oncogenic microRNA megacluster regulates G1/S transition in liver tumorigenesis through suppression of mutated in colorectal cancer. *Hepatology*, 59(1), 202-215. <https://doi.org/10.1002/hep.26662>
- Lim, R. G., Quan, C., Reyes-Ortiz, A. M., Lutz, S. E., Kedaigle, A. J., Gipson, T. A., Wu, J., Vatine, G. D., Stocksdale, J., Casale, M. S., Svendsen, C. N., Fraenkel, E., Housman, D. E., Agalliu, D., & Thompson, L. M. (2017). Huntington's Disease iPSC-Derived Brain Microvascular Endothelial Cells Reveal WNT-Mediated Angiogenic and Blood-Brain Barrier Deficits. *Cell Reports*, 19(7), 1365-1377. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.04.021>
- Limaye, N., Kangas, J., Mendola, A., Godfraind, C., Schlögel, M. J., Helaers, R., Eklund, L., Boon, L. M., & Vikkula, M. (2015). Somatic Activating PIK3CA Mutations Cause Venous Malformation. *American Journal of Human Genetics*, 97(6), 914-921. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.11.011>
- Liu, L., Wan, W., Xia, S., Kalionis, B., & Li, Y. (2014). Dysfunctional Wnt/ $\beta$ -catenin signaling contributes to blood-brain barrier breakdown in Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*, 75, 19-25. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2014.05.004>
- Liu, X.-H., Yang, Y.-F., Fang, H.-Y., Wang, X.-H., Zhang, M.-F., & Wu, D.-C. (2017). CEP131 indicates poor prognosis and promotes cell proliferation and migration in hepatocellular carcinoma. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 90, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2017.07.001>
- Lobov, I. B., Rao, S., Carroll, T. J., Vallance, J. E., Ito, M., Ondr, J. K., Kurup, S., Glass, D. A., Patel, M. S., Shu, W., Morrissey, E. E., McMahon, A. P., Karsenty, G., & Lang, R. A. (2005). WNT7b mediates

- macrophage-induced programmed cell death in patterning of the vasculature. *Nature*, 437(7057), 417-421. <https://doi.org/10.1038/nature03928>
- Luxton, G. W. G., & Gundersen, G. G. (2011). Orientation and function of the nuclear-centrosomal axis during cell migration. *Current Opinion in Cell Biology*, 23(5), 579-588. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2011.08.001>
- Malekan, M., Haass, N. K., Rokni, G. R., Gholizadeh, N., Ebrahimzadeh, M. A., & Kazeminejad, A. (2024). VEGF/VEGFR axis and its signaling in melanoma : Current knowledge toward therapeutic targeting agents and future perspectives. *Life Sciences*, 345, 122563. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2024.122563>
- Manoranjan, B., & Provias, J. P. (2022).  $\beta$ -Catenin marks proliferating endothelial cells in glioblastoma. *Journal of Clinical Neuroscience: Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, 98, 203-206. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2022.02.018>
- Martowicz, A., Trusohamn, M., Jensen, N., Wisniewska-Kruk, J., Corada, M., Ning, F. C., Kele, J., Dejana, E., & Nyqvist, D. (2019). Endothelial  $\beta$ -Catenin Signaling Supports Postnatal Brain and Retinal Angiogenesis by Promoting Sprouting, Tip Cell Formation, and VEGFR (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor) 2 Expression. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 39(11), 2273-2288. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.312749>
- Matsumine, A., Senda, T., Baeg, G. H., Roy, B. C., Nakamura, Y., Noda, M., Toyoshima, K., & Akiyama, T. (1996). MCC, a cytoplasmic protein that blocks cell cycle progression from the G0/G1 to S phase. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(17), 10341-10346. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.17.10341>
- Mattila, P. K., & Lappalainen, P. (2008). Filopodia : Molecular architecture and cellular functions. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9(6), 446-454. <https://doi.org/10.1038/nrm2406>
- Minshall, R. D., Sessa, W. C., Stan, R. V., Anderson, R. G. W., & Malik, A. B. (2003). Caveolin regulation of endothelial function. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 285(6), L1179-1183. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00242.2003>
- Mishra, A., Reynolds, J. P., Chen, Y., Gourine, A. V., Rusakov, D. A., & Attwell, D. (2016). Astrocytes mediate neurovascular signaling to capillary pericytes but not to arterioles. *Nature Neuroscience*, 19(12), 1619-1627. <https://doi.org/10.1038/nn.4428>
- Mitchell, C. A., Risau, W., & Drexler, H. C. (1998). Regression of vessels in the tunica vasculosa lentis is initiated by coordinated endothelial apoptosis : A role for vascular endothelial growth factor as a survival factor for endothelium. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 213(3), 322-333. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(199811\)213:3<322::AID-AJA8>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(199811)213:3<322::AID-AJA8>3.0.CO;2-E)
- Montcouquiol, M., Rachel, R. A., Lanford, P. J., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., & Kelley, M. W. (2003). Identification of Vangl2 and Scrb1 as planar polarity genes in mammals. *Nature*, 423(6936), 173-177. <https://doi.org/10.1038/nature01618>
- Mooradian, A. D., Chung, H. C., & Shah, G. N. (1997). GLUT-1 expression in the cerebra of patients with Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 18(5), 469-474. [https://doi.org/10.1016/s0197-4580\(97\)00111-5](https://doi.org/10.1016/s0197-4580(97)00111-5)
- Morgan, J. T., Pfeiffer, E. R., Thirkill, T. L., Kumar, P., Peng, G., Fridolfsson, H. N., Douglas, G. C., Starr, D. A., & Barakat, A. I. (2011). Nesprin-3 regulates endothelial cell morphology, perinuclear

- cytoskeletal architecture, and flow-induced polarization. *Molecular Biology of the Cell*, 22(22), 4324-4334. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-04-0287>
- Mort, R. L., Ford, M. J., Sakaue-Sawano, A., Lindstrom, N. O., Casadio, A., Douglas, A. T., Keighren, M. A., Hohenstein, P., Miyawaki, A., & Jackson, I. J. (2014). Fucci2a : A bicistronic cell cycle reporter that allows Cre mediated tissue specific expression in mice. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 13(17), 2681-2696. <https://doi.org/10.4161/15384101.2015.945381>
- Moya, I. M., Umans, L., Maas, E., Pereira, P. N. G., Beets, K., Francis, A., Sents, W., Robertson, E. J., Mummery, C. L., Huylebroeck, D., & Zwijsen, A. (2012). Stalk cell phenotype depends on integration of Notch and Smad1/5 signaling cascades. *Developmental Cell*, 22(3), 501-514. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.01.007>
- Mühleder, S., Fernández-Chacón, M., Garcia-Gonzalez, I., & Benedito, R. (2021). Endothelial sprouting, proliferation, or senescence : Tipping the balance from physiology to pathology. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 78(4), 1329-1354. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03664-y>
- Mukherjee, N., Dasgupta, H., Bhattacharya, R., Pal, D., Roy, R., Islam, S., Alam, N., Biswas, J., Roy, A., Roychoudhury, S., & Panda, C. K. (2016). Frequent inactivation of MCC/CTNNBIP1 and overexpression of phospho-beta-catenin(Y654) are associated with breast carcinoma : Clinical and prognostic significance. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1862(9), 1472-1484. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.05.009>
- Nerem, R. M., Levesque, M. J., & Cornhill, J. F. (1981). Vascular endothelial morphology as an indicator of the pattern of blood flow. *Journal of Biomechanical Engineering*, 103(3), 172-176. <https://doi.org/10.1115/1.3138275>
- Niehrs, C. (2006). Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. *Oncogene*, 25(57), 7469-7481. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210054>
- Nirwane, A., Kang, M., Adithan, A., Maharaj, V., Nguyen, F., Santaella Aguilar, E., Nasrollahi, A., & Yao, Y. (2024). Endothelial and mural laminin- $\alpha$ 5 contributes to neurovascular integrity maintenance. *Fluids and Barriers of the CNS*, 21(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s12987-024-00521-z>
- Nishisho, I., Nakamura, Y., Miyoshi, Y., Miki, Y., Ando, H., Horii, A., Koyama, K., Utsunomiya, J., Baba, S., & Hedge, P. (1991). Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science (New York, N.Y.)*, 253(5020), 665-669. <https://doi.org/10.1126/science.1651563>
- Nola, S., Sebbagh, M., Marchetto, S., Osmani, N., Nourry, C., Audebert, S., Navarro, C., Rachel, R., Montcouquiol, M., Sans, N., Etienne-Manneville, S., Borg, J.-P., & Santoni, M.-J. (2008). Scrib regulates PAK activity during the cell migration process. *Human Molecular Genetics*, 17(22), 3552-3565. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn248>
- Noma, K., Kihara, Y., & Higashi, Y. (2012). Striking crosstalk of ROCK signaling with endothelial function. *Journal of Cardiology*, 60(1), 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.jjcc.2012.03.005>
- Nusse, R., & Clevers, H. (2017). Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell*, 169(6), 985-999. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.016>
- Oakley, B. R., Paolillo, V., & Zheng, Y. (2015).  $\gamma$ -Tubulin complexes in microtubule nucleation and beyond. *Molecular Biology of the Cell*, 26(17), 2957-2962. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-11-1514>

- Olesen, S. P., Clapham, D. E., & Davies, P. F. (1988). Haemodynamic shear stress activates a K<sup>+</sup> current in vascular endothelial cells. *Nature*, 331(6152), 168-170. <https://doi.org/10.1038/331168a0>
- Ouarné, M., Pena, A., & Franco, C. A. (2021). From remodeling to quiescence : The transformation of the vascular network. *Cells & Development*, 168, 203735. <https://doi.org/10.1016/j.cdev.2021.203735>
- Pangon, L., Mladenova, D., Watkins, L., Van Kralingen, C., Currey, N., Al-Sohaily, S., Lecine, P., Borg, J.-P., & Kohonen-Corish, M. R. J. (2015). MCC inhibits beta-catenin transcriptional activity by sequestering DBC1 in the cytoplasm. *International Journal of Cancer*, 136(1), 55-64. <https://doi.org/10.1002/ijc.28967>
- Pangon, L., Sigglekow, N. D., Larance, M., Al-Sohaily, S., Mladenova, D. N., Selinger, C. I., Musgrove, E. A., & Kohonen-Corish, M. R. J. (2010). The « Mutated in Colorectal Cancer » Protein Is a Novel Target of the UV-Induced DNA Damage Checkpoint. *Genes & Cancer*, 1(9), 917-926. <https://doi.org/10.1177/1947601910388937>
- Pangon, L., Van Kralingen, C., Abas, M., Daly, R. J., Musgrove, E. A., & Kohonen-Corish, M. R. J. (2012). The PDZ-binding motif of MCC is phosphorylated at position -1 and controls lamellipodia formation in colon epithelial cells—PubMed. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1823(6), 1058-1067. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.03.011>
- Parmar, K. M., Larman, H. B., Dai, G., Zhang, Y., Wang, E. T., Moorthy, S. N., Kratz, J. R., Lin, Z., Jain, M. K., Gimbrone, M. A., & García-Cardena, G. (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>
- Pasut, A., Becker, L. M., Cuyper, A., & Carmeliet, P. (2021). Endothelial cell plasticity at the single-cell level. *Angiogenesis*, 24(2), 311-326. <https://doi.org/10.1007/s10456-021-09797-3>
- Patel, N. R., K C, R., Blanks, A., Li, Y., Prieto, M. C., & Meadows, S. M. (2022). Endothelial cell polarity and extracellular matrix composition require functional ATP6AP2 during developmental and pathological angiogenesis. *JCI Insight*, 7(19). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.154379>
- Peghaire, C., Bats, M. L., Sewduth, R., Jeanningros, S., Jaspard, B., Couffignal, T., Duplâa, C., & Dufourcq, P. (2016). Fzd7 (Frizzled-7) Expressed by Endothelial Cells Controls Blood Vessel Formation Through Wnt/ $\beta$ -Catenin Canonical Signaling. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 36(12), 2369-2380. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.307926>
- Pelton, J. C., Wright, C. E., Leitges, M., & Bautch, V. L. (2014). Multiple endothelial cells constitute the tip of developing blood vessels and polarize to promote lumen formation. *Development (Cambridge, England)*, 141(21), 4121-4126. <https://doi.org/10.1242/dev.110296>
- Phoenix, T. N., Patmore, D. M., Boop, S., Boulos, N., Jacus, M. O., Patel, Y. T., Roussel, M. F., Finkelstein, D., Goumnerova, L., Perreault, S., Wadhwa, E., Cho, Y.-J., Stewart, C. F., & Gilbertson, R. J. (2016). Medulloblastoma Genotype Dictates Blood Brain Barrier Phenotype. *Cancer Cell*, 29(4), 508-522. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.03.002>
- Poché, R. A., Hsu, C.-W., McElwee, M. L., Burns, A. R., & Dickinson, M. E. (2015). Macrophages engulf endothelial cell membrane particles preceding pupillary membrane capillary regression. *Developmental Biology*, 403(1), 30-42. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2015.03.017>
- Pontes-Quero, S., Fernández-Chacón, M., Luo, W., Lunella, F. F., Casquero-Garcia, V., Garcia-Gonzalez, I., Hermoso, A., Rocha, S. F., Bansal, M., & Bedito, R. (2019). High mitogenic

- stimulation arrests angiogenesis. *Nature Communications*, 10(1), 2016. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09875-7>
- Potente, M., Gerhardt, H., & Carmeliet, P. (2011). Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*, 146(6), 873-887. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.039>
- Potente, M., & Mäkinen, T. (2017). Vascular heterogeneity and specialization in development and disease—PubMed. *Nat rev Mol cell Biol*, 18(8), 477-494. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.36>
- Ramachandran, I., Thavathiru, E., Ramalingam, S., Natarajan, G., Mills, W. K., Benbrook, D. M., Zuna, R., Lightfoot, S., Reis, A., Anant, S., & Queimado, L. (2012). Wnt inhibitory factor 1 induces apoptosis and inhibits cervical cancer growth, invasion and angiogenesis in vivo. *Oncogene*, 31(22), 2725-2737. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.455>
- Rao, T. P., & Kühl, M. (2010a). An updated overview on wnt signal- ing pathways : A prelude for more. *Circulation research*, 106(12), 1798-1806.
- Rao, T. P., & Kühl, M. (2010b). An updated overview on Wnt signaling pathways : A prelude for more. *Circulation Research*, 106(12), 1798-1806. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.219840>
- Reis, M., Czupalla, C. J., Ziegler, N., Devraj, K., Zinke, J., Seidel, S., Heck, R., Thom, S., Macas, J., Bockamp, E., Fruttiger, M., Taketo, M. M., Dimmeler, S., Plate, K. H., & Liebner, S. (2012). Endothelial Wnt/ $\beta$ -catenin signaling inhibits glioma angiogenesis and normalizes tumor blood vessels by inducing PDGF-B expression. *The Journal of Experimental Medicine*, 209(9), 1611-1627. <https://doi.org/10.1084/jem.20111580>
- Reischauer, S., Stone, O. A., Villasenor, A., Chi, N., Jin, S.-W., Martin, M., Lee, M. T., Fukuda, N., Marass, M., Witty, A., Fiddes, I., Kuo, T., Chung, W.-S., Salek, S., Lerrigo, R., Alsiö, J., Luo, S., Tworus, D., Augustine, S. M., ... Stainier, D. Y. R. (2016). Cloche is a bHLH-PAS transcription factor that drives haemato-vascular specification. *Nature*, 535(7611), 294-298. <https://doi.org/10.1038/nature18614>
- Ricard, N., Ciais, D., Levet, S., Subileau, M., Mallet, C., Zimmers, T. A., Lee, S.-J., Bidart, M., Feige, J.-J., & Bailly, S. (2012). BMP9 and BMP10 are critical for postnatal retinal vascular remodeling. *Blood*, 119(25), 6162-6171. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-407593>
- Richter, M., Gottanka, J., May, C. A., Welge-Lüssen, U., Berger, W., & Lütjen-Drecoll, E. (1998). Retinal vasculature changes in Norrie disease mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 39(12), 2450-2457.
- Richter, T., Floetenmeyer, M., Ferguson, C., Galea, J., Goh, J., Lindsay, M. R., Morgan, G. P., Marsh, B. J., & Parton, R. G. (2008). High-resolution 3D quantitative analysis of caveolar ultrastructure and caveola-cytoskeleton interactions. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 9(6), 893-909. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00733.x>
- Rizzo, V., Morton, C., DePaola, N., Schnitzer, J. E., & Davies, P. F. (2003). Recruitment of endothelial caveolae into mechanotransduction pathways by flow conditioning in vitro. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 285(4), H1720-1729. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00344.2002>
- Rogers, K. A., McKee, N. H., & Kalnins, V. I. (1985). Preferential orientation of centrioles toward the heart in endothelial cells of major blood vessels is reestablished after reversal of a segment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(10), 3272-3276. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.10.3272>

- Rohlenova, K., Goveia, J., García-Caballero, M., Subramanian, A., Kalucka, J., Treps, L., Falkenberg, K. D., de Rooij, L. P. M. H., Zheng, Y., Lin, L., Sokol, L., Teuwen, L.-A., Geldhof, V., Taverna, F., Pircher, A., Conradi, L.-C., Khan, S., Stegen, S., Panovska, D., ... Carmeliet, P. (2020). Single-Cell RNA Sequencing Maps Endothelial Metabolic Plasticity in Pathological Angiogenesis. *Cell Metabolism*, 31(4), 862-877.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.03.009>
- Sabbagh, M. F., Heng, J. S., Luo, C., Castanon, R. G., Nery, J. R., Rattner, A., Goff, L. A., Ecker, J. R., & Nathans, J. (2018). Transcriptional and epigenomic landscapes of CNS and non-CNS vascular endothelial cells—PubMed. *eLife*, 6(7). <https://doi.org/10.7554/eLife.36187>
- Sabbagh, M. F., & Nathans, J. (2020). A genome-wide view of the de-differentiation of central nervous system endothelial cells in culture. *eLife*, 9, e51276. <https://doi.org/10.7554/eLife.51276>
- Sakanaka, C., Weiss, J. B., & Williams, L. T. (1998). Bridging of beta-catenin and glycogen synthase kinase-3beta by axin and inhibition of beta-catenin-mediated transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(6), 3020-3023. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.3020>
- Sangwung, P., Zhou, G., Nayak, L., Chan, E. R., Kumar, S., Kang, D.-W., Zhang, R., Liao, X., Lu, Y., Sugi, K., Fujioka, H., Shi, H., Lapping, S. D., Ghosh, C. C., Higgins, S. J., Parikh, S. M., Jo, H., & Jain, M. K. (2017). KLF2 and KLF4 control endothelial identity and vascular integrity. *JCI Insight*, 2(4), e91700. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.91700>
- Schevenels, G., Cabochette, P., America, M., Vandenborne, A., De Grande, L., Guenther, S., He, L., Dieu, M., Christou, B., Vermeersch, M., Germano, R. F. V., Perez-Morga, D., Renard, P., Martin, M., Vanlandewijck, M., Betsholtz, C., & Vanhollebeke, B. (2024). A brain-specific angiogenic mechanism enabled by tip cell specialization. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07283-6>
- Schmoranzler, J., Fawcett, J. P., Segura, M., Tan, S., Vallee, R. B., Pawson, T., & Gundersen, G. G. (2009). Par3 and dynein associate to regulate local microtubule dynamics and centrosome orientation during migration. *Current Biology: CB*, 19(13), 1065-1074. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.05.065>
- Schoors, S., De Bock, K., Cantelmo, A. R., Georgiadou, M., Ghesquière, B., Cauwenberghs, S., Kuchnio, A., Wong, B. W., Quaegebeur, A., Goveia, J., Bifari, F., Wang, X., Blanco, R., Tembuysen, B., Cornelissen, I., Bouché, A., Vinckier, S., Diaz-Moralli, S., Gerhardt, H., ... Carmeliet, P. (2014). Partial and transient reduction of glycolysis by PFKFB3 blockade reduces pathological angiogenesis. *Cell Metabolism*, 19(1), 37-48. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.11.008>
- Seifert, J. R. K., & Mlodzik, M. (2007). Frizzled/PCP signalling : A conserved mechanism regulating cell polarity and directed motility. *Nature Reviews. Genetics*, 8(2), 126-138. <https://doi.org/10.1038/nrg2042>
- Senda, T., Matsumine, A., Yanai, H., & Akiyama, T. (1999). Localization of MCC (mutated in colorectal cancer) in various tissues of mice and its involvement in cell differentiation. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 47(9), 1149-1158. <https://doi.org/10.1177/002215549904700907>
- Sengillo, J. D., Winkler, E. A., Walker, C. T., Sullivan, J. S., Johnson, M., & Zlokovic, B. V. (2013). Deficiency in mural vascular cells coincides with blood-brain barrier disruption in Alzheimer's disease. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 23(3), 303-310. <https://doi.org/10.1111/bpa.12004>
- Serra, H., Chivite, I., Angulo-Urarte, A., Soler, A., Sutherland, J. D., Arruabarrena-Aristorena, A., Ragab, A., Lim, R., Malumbres, M., Fruttiger, M., Potente, M., Serrano, M., Fabra, À., Viñals, F.,

- Casanovas, O., Pandolfi, P. P., Bigas, A., Carracedo, A., Gerhardt, H., & Graupera, M. (2015). PTEN mediates Notch-dependent stalk cell arrest in angiogenesis. *Nature Communications*, 6, 7935. <https://doi.org/10.1038/ncomms8935>
- Sewduth, R. N., Jaspard-Vinassa, B., Peghaire, C., Guillabert, A., Franzl, N., Larrieu-Lahargue, F., Moreau, C., Fruttiger, M., Dufourcq, P., Couffinhal, T., & Duplâa, C. (2014a). The ubiquitin ligase PDZRN3 is required for vascular morphogenesis through Wnt/planar cell polarity signalling. *Nature Communications*, 5, 4832. <https://doi.org/10.1038/ncomms5832>
- Sewduth, R. N., Jaspard-Vinassa, B., Peghaire, C., Guillabert, A., Franzl, N., Larrieu-Lahargue, F., Moreau, C., Fruttiger, M., Dufourcq, P., Couffinhal, T., & Duplâa, C. (2014b). The ubiquitin ligase PDZRN3 is required for vascular morphogenesis through Wnt/planar cell polarity signalling. *Nature Communications*, 8(5). <https://doi.org/10.1038/ncomms5832>
- Sewduth, R. N., Kovacic, H., Jaspard-Vinassa, B., Jecko, V., Wavasseur, T., Fritsch, N., Pernot, M., Jeaningros, S., Roux, E., Dufourcq, P., Couffinhal, T., & Duplâa, C. (2017). PDZRN3 destabilizes endothelial cell-cell junctions through a PKC -containing polarity complex to increase vascular permeability. *Science Signaling*, 10(464), eaag3209. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aag3209>
- Shi, X., Liu, M., Li, D., Wang, J., Aneja, R., & Zhou, J. (2012). Cep70 contributes to angiogenesis by modulating microtubule rearrangement and stimulating cell polarization and migration. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 11(8), 1554-1563. <https://doi.org/10.4161/cc.19954>
- Sigglekow, N. D., Pangon, L., Brummer, T., Molloy, M., Hawkins, N. J., Ward, R. L., Musgrove, E. A., & Kohonen-Corish, M. R. J. (2012). Mutated in colorectal cancer protein modulates the NF B pathway. *Anticancer Research*, 32(1), 73-79.
- Simons, M., Gordon, E., & Claesson-Welsh, L. (2016). Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 17(10), 611-625. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.87>
- Simons, M., & Mlodzik, M. (2008). Planar cell polarity signaling : From fly development to human disease. *Annual Review of Genetics*, 42, 517-540. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.42.110807.091432>
- Sissaoui, S., Yu, J., Yan, A., Li, R., Yukselen, O., Kucukural, A., Zhu, L. J., & Lawson, N. D. (2020). Genomic Characterization of Endothelial Enhancers Reveals a Multifunctional Role for NR2F2 in Regulation of Arteriovenous Gene Expression. *Circulation Research*, 126(7), 875-888. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.316075>
- Sonmez, U. M., Cheng, Y.-W., Watkins, S. C., Roman, B. L., & Davidson, L. A. (2020). Endothelial cell polarization and orientation to flow in a novel microfluidic multimodal shear stress generator. *Lab on a Chip*, 20(23), 4373-4390. <https://doi.org/10.1039/d0lc00738b>
- Srisuttee, R., Koh, S. S., Kim, S. J., Malilas, W., Boonying, W., Cho, I.-R., Jhun, B. H., Ito, M., Horio, Y., Seto, E., Oh, S., & Chung, Y.-H. (2012). Hepatitis B virus X (HBX) protein upregulates  -catenin in a human hepatic cell line by sequestering SIRT1 deacetylase. *Oncology Reports*, 28(1), 276-282. <https://doi.org/10.3892/or.2012.1798>
- Stahl, A., Connor, K. M., Sapiieha, P., Chen, J., Dennison, R. J., Krah, N. M., Seaward, M. R., Willett, K. L., Aderman, C. M., Guerin, K. I., Hua, J., L fqvist, C., Hellström, A., & Smith, L. E. H. (2010). The mouse retina as an angiogenesis model. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51(6), 2813-2826. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-5176>

- Stefater, J. A., Lewkowich, I., Rao, S., Mariggi, G., Carpenter, A. C., Burr, A. R., Fan, J., Ajima, R., Molkentin, J. D., Williams, B. O., Wills-Karp, M., Pollard, J. W., Yamaguchi, T., Ferrara, N., Gerhardt, H., & Lang, R. A. (2011). Regulation of angiogenesis by a non-canonical Wnt-Flt1 pathway in myeloid cells. *Nature*, *474*(7352), 511-515. <https://doi.org/10.1038/nature10085>
- Struhl, G., Casal, J., & Lawrence, P. A. (2012). Dissecting the molecular bridges that mediate the function of Frizzled in planar cell polarity. *Development (Cambridge, England)*, *139*(19), 3665-3674. <https://doi.org/10.1242/dev.083550>
- Sweeney, M. D., Zhao, Z., Montagne, A., Nelson, A. R., & Zlokovic, B. V. (2019). Blood-Brain Barrier : From Physiology to Disease and Back. *Physiological Reviews*, *99*(1), 21-78. <https://doi.org/10.1152/physrev.00050.2017>
- Tanaka, K., Joshi, D., Timalina, S., & Schwartz, M. A. (2021). Early events in endothelial flow sensing. *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)*, *78*(6), 217-231. <https://doi.org/10.1002/cm.21652>
- Taylor, S. M., Nevis, K. R., Park, H. L., Rogers, G. C., Rogers, S. L., Cook, J. G., & Bautch, V. L. (2010). Angiogenic factor signaling regulates centrosome duplication in endothelial cells of developing blood vessels. *Blood*, *116*(16), 3108-3117. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-01-266197>
- Tomaz, L. B., Liu, B. A., Meroshini M, null, Ong, S. L. M., Tan, E. K., Tolwinski, N. S., Williams, C. S., Gingras, A.-C., Leushacke, M., & Dunn, N. R. (2022). MCC is a centrosomal protein that relocalizes to non-centrosomal apical sites during intestinal cell differentiation. *Journal of Cell Science*, *135*(21), jcs259272. <https://doi.org/10.1242/jcs.259272>
- Tran, K. A., Zhang, X., Predescu, D., Huang, X., Machado, R. F., Göthert, J. R., Malik, A. B., Valyi-Nagy, T., & Zhao, Y.-Y. (2016). Endothelial  $\beta$ -Catenin Signaling Is Required for Maintaining Adult Blood-Brain Barrier Integrity and Central Nervous System Homeostasis. *Circulation*, *133*(2), 177-186. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.015982>
- Trimm, E., & Red-Horse, K. (2023). Vascular endothelial cell development and diversity. *Nature Reviews Cardiology*, *20*(3), 197-210. <https://doi.org/10.1038/s41569-022-00770-1>
- Tzima, E., Irani-Tehrani, M., Kiosses, W. B., Dejana, E., Schultz, D. A., Engelhardt, B., Cao, G., DeLisser, H., & Schwartz, M. A. (2005). A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature*, *437*(7057), 426-431. <https://doi.org/10.1038/nature03952>
- Udan, R. S., Vadakkan, T. J., & Dickinson, M. E. (2013). Dynamic responses of endothelial cells to changes in blood flow during vascular remodeling of the mouse yolk sac. *Development (Cambridge, England)*, *140*(19), 4041-4050. <https://doi.org/10.1242/dev.096255>
- Uzbekov, R., Kireyev, I., & Prigent, C. (2002). Centrosome separation : Respective role of microtubules and actin filaments. *Biology of the Cell*, *94*(4-5), 275-288. [https://doi.org/10.1016/s0248-4900\(02\)01202-9](https://doi.org/10.1016/s0248-4900(02)01202-9)
- Vaish, V., & Sanyal, S. N. (2012). Role of Sulindac and Celecoxib in the regulation of angiogenesis during the early neoplasm of colon : Exploring PI3-K/PTEN/Akt pathway to the canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, *66*(5), 354-367. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2012.01.004>
- Vallon, M., Yuki, K., Nguyen, T. D., Chang, J., Yuan, J., Siepe, D., Miao, Y., Essler, M., Noda, M., Garcia, K. C., & Kuo, C. J. (2018). A RECK-WNT7 Receptor-Ligand Interaction Enables Isoform-Specific Regulation of Wnt Bioavailability. *Cell Reports*, *25*(2), 339-349.e9. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.09.045>

- Van der Heiden, K., Hierck, B. P., Krams, R., de Crom, R., Cheng, C., Baiker, M., Pourquie, M. J. B. M., Alkemade, F. E., DeRuiter, M. C., Gittenberger-de Groot, A. C., & Poelmann, R. E. (2008). Endothelial primary cilia in areas of disturbed flow are at the base of atherosclerosis. *Atherosclerosis*, *196*(2), 542-550. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2007.05.030>
- van Horssen, R., Janssen, E., Peters, W., van de Pasch, L., Lindert, M. M. T., van Dommelen, M. M. T., Linssen, P. C., Hagen, T. L. M. T., Fransen, J. A. M., & Wieringa, B. (2009). Modulation of cell motility by spatial repositioning of enzymatic ATP/ADP exchange capacity. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*(3), 1620-1627. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806974200>
- Vanlandewijck, M., He, L., Mäe, M. A., Andrae, J., Ando, K., Del Gaudio, F., Nahar, K., Lebouvier, T., Laviña, B., Gouveia, L., Sun, Y., Raschperger, E., Räsänen, M., Zarb, Y., Mochizuki, N., Keller, A., Lendahl, U., & Betsholtz, C. (2018). A molecular atlas of cell types and zonation in the brain vasculature. *Nature*, *554*(7693), 475-480. <https://doi.org/10.1038/nature25739>
- van Thienen, J. V., Fledderus, J. O., Dekker, R. J., Rohlena, J., van Ijzendoorn, G. A., Kootstra, N. A., Pannekoek, H., & Horrevoets, A. J. G. (2006). Shear stress sustains atheroprotective endothelial KLF2 expression more potently than statins through mRNA stabilization. *Cardiovascular Research*, *72*(2), 231-240. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.07.008>
- Verkhatsky, A., & Pivoriūnas, A. (2023). Astroglia support, regulate and reinforce brain barriers. *Neurobiology of Disease*, *179*, 106054. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2023.106054>
- Viallard, C., & Larrivé, B. (2017). Tumor angiogenesis and vascular normalization : Alternative therapeutic targets. *Angiogenesis*, *20*(4), 409-426. <https://doi.org/10.1007/s10456-017-9562-9>
- Vion, A.-C., Perovic, T., Petit, C., Hollfinger, I., Bartels-Klein, E., Frampton, E., Gordon, E., Claesson-Welsh, L., & Gerhardt, H. (2020). Endothelial Cell Orientation and Polarity Are Controlled by Shear Stress and VEGF Through Distinct Signaling Pathways. *Frontiers in Physiology*, *11*, 623769. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.623769>
- Vizán, P., Sánchez-Tena, S., Alcarraz-Vizán, G., Soler, M., Messeguer, R., Pujol, M. D., Lee, W.-N. P., & Cascante, M. (2009). Characterization of the metabolic changes underlying growth factor angiogenic activation : Identification of new potential therapeutic targets. *Carcinogenesis*, *30*(6), 946-952. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp083>
- Vogeli, KM., Jin, SW., Martin, GR., & Stainier, DY. (2006). A common progenitor for haematopoietic and endothelial lineages in the zebrafish gastrula. *Nature*, *443*, 337-339.
- Walker, N. I., Bennett, R. E., & Kerr, J. F. (1989). Cell death by apoptosis during involution of the lactating breast in mice and rats. *The American Journal of Anatomy*, *185*(1), 19-32. <https://doi.org/10.1002/aja.1001850104>
- Wallingford, J. B. (2012). Planar cell polarity and the developmental control of cell behavior in vertebrate embryos. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *28*, 627-653. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154208>
- Wang, K., Wang, X., Zhao, F., Zhao, Q., Kong, S., Ma, P., Wu, G., Wang, W., & Zhang, X. (2023). Centrosomal Protein CEP135 Regulates the Migration and Angiogenesis of Endothelial Cells in a Microtubule-Dependent Manner. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, *28*(11), 303. <https://doi.org/10.31083/j.fbl2811303>
- Wang, Q., Huang, X., Su, Y., Yin, G., Wang, S., Yu, B., Li, H., Qi, J., Chen, H., Zeng, W., Zhang, K., Verkhatsky, A., Niu, J., & Yi, C. (2022). Activation of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway mitigates blood-brain

- barrier dysfunction in Alzheimer's disease. *Brain: A Journal of Neurology*, 145(12), 4474-4488. <https://doi.org/10.1093/brain/awac236>
- Wang, S., Li, X., Parra, M., Verdin, E., Bassel-Duby, R., & Olson, E. N. (2008). Control of endothelial cell proliferation and migration by VEGF signaling to histone deacetylase 7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(22), 7738-7743. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802857105>
- Wang, Y., Cho, C., Williams, J., Smallwood, P. M., Zhang, C., Junge, H. J., & Nathans, J. (2018). Interplay of the Norrin and Wnt7a/Wnt7b signaling systems in blood-brain barrier and blood-retina barrier development and maintenance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(50), E11827-E11836. <https://doi.org/10.1073/pnas.1813217115>
- Wang, Y., Rattner, A., Zhou, Y., Williams, J., Smallwood, P. M., & Nathans, J. (2012). Norrin/Frizzled4 signaling in retinal vascular development and blood brain barrier plasticity. *Cell*, 151(6), 1332-1344. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.10.042>
- Wang, Z., Liu, C.-H., Huang, S., & Chen, J. (2019). Assessment and Characterization of Hyaloid Vessels in Mice. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 147. <https://doi.org/10.3791/59222>
- Wang, Z., Liu, C.-H., Huang, S., Fu, Z., Tomita, Y., Britton, W. R., Cho, S. S., Chen, C. T., Sun, Y., Ma, J.-X., He, X., & Chen, J. (2020). Wnt signaling activates MFSD2A to suppress vascular endothelial transcytosis and maintain blood-retinal barrier. *Science Advances*, 6(35), eaba7457. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aba7457>
- Watson, E. C., Grant, Z. L., & Coultas, L. (2017). Endothelial cell apoptosis in angiogenesis and vessel regression. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 74(24), 4387-4403. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2577-y>
- Watson, E. C., Koenig, M. N., Grant, Z. L., Whitehead, L., Trounson, E., Dewson, G., & Coultas, L. (2016). Apoptosis regulates endothelial cell number and capillary vessel diameter but not vessel regression during retinal angiogenesis. *Development (Cambridge, England)*, 143(16), 2973-2982. <https://doi.org/10.1242/dev.137513>
- Weiner, O. D. (2002). Regulation of cell polarity during eukaryotic chemotaxis : The chemotactic compass. *Current Opinion in Cell Biology*, 14(2), 196-202. [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(02\)00310-1](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(02)00310-1)
- Wheatley, D. N., Wang, A. M., & Strugnell, G. E. (1996). Expression of primary cilia in mammalian cells. *Cell Biology International*, 20(1), 73-81. <https://doi.org/10.1006/cbir.1996.0011>
- Willert, K., Brown, J. D., Danenberg, E., Duncan, A. W., Weissman, I. L., Reya, T., Yates, J. R., & Nusse, R. (2003). Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*, 423(6938), 448-452. <https://doi.org/10.1038/nature01611>
- Wolburg, H., & Lippoldt, A. (2002). Tight junctions of the blood-brain barrier : Development, composition and regulation. *Vascular Pharmacology*, 38(6), 323-337. [https://doi.org/10.1016/s1537-1891\(02\)00200-8](https://doi.org/10.1016/s1537-1891(02)00200-8)
- Wu, J., & Mlodzik, M. (2009). A quest for the mechanism regulating global planar cell polarity of tissues. *Trends in Cell Biology*, 19(7), 295-305. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2009.04.003>
- Wu, J., Roman, A.-C., Carvajal-Gonzalez, J. M., & Mlodzik, M. (2013). Wg and Wnt4 provide long-range directional input to planar cell polarity orientation in Drosophila. *Nature Cell Biology*, 15(9), 1045-1055. <https://doi.org/10.1038/ncb2806>

- Wu, Z., Chen, H., Zhang, Y., Wang, Y., Wang, Q., Augière, C., Hou, Y., Fu, Y., Peng, Y., Durand, B., & Wei, Q. (2024). Cep131-Cep162 and Cby-Fam92 complexes cooperatively maintain Cep290 at the basal body and contribute to ciliogenesis initiation. *PLoS Biology*, *22*(3), e3002330. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002330>
- Xing, Y., Clements, W. K., Kimelman, D., & Xu, W. (2003). Crystal structure of a beta-catenin/axin complex suggests a mechanism for the beta-catenin destruction complex. *Genes & Development*, *17*(22), 2753-2764. <https://doi.org/10.1101/gad.1142603>
- Xu, C., Hasan, S. S., Schmidt, I., Rocha, S. F., Pitulescu, M. E., Bussmann, J., Meyen, D., Raz, E., Adams, R. H., & Siekmann, A. F. (2014). Arteries are formed by vein-derived endothelial tip cells. *Nature Communications*, *5*, 5758. <https://doi.org/10.1038/ncomms6758>
- Xu, Q., Wang, Y., Dabdoub, A., Smallwood, P. M., Williams, J., Woods, C., Kelley, M. W., Jiang, L., Tasman, W., Zhang, K., & Nathans, J. (2004). Vascular development in the retina and inner ear : Control by Norrin and Frizzled-4, a high-affinity ligand-receptor pair. *Cell*, *116*(6), 883-895. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00216-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00216-8)
- Yang, A. C., Stevens, M. Y., Chen, M. B., Lee, D. P., Stähli, D., Gate, D., Contrepolis, K., Chen, W., Iram, T., Zhang, L., Vest, R. T., Chaney, A., Lehallier, B., Olsson, N., du Bois, H., Hsieh, R., Cropper, H. C., Berdnik, D., Li, L., ... Wyss-Coray, T. (2020). Physiological blood-brain transport is impaired with age by a shift in transcytosis. *Nature*, *583*(7816), 425-430. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2453-z>
- Yasuda, N., Sekine, H., Bise, R., Okano, T., & Shimizu, T. (2016). Tracing behavior of endothelial cells promotes vascular network formation. *Microvascular Research*, *105*, 125-131. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2015.12.005>
- Ye, X., Wang, Y., Cahill, H., Yu, M., Badea, T. C., Smallwood, P. M., Peachey, N. S., & Nathans, J. (2009). Norrin, frizzled-4, and Lrp5 signaling in endothelial cells controls a genetic program for retinal vascularization. *Cell*, *139*(2), 285-298. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.047>
- Yost, C., Torres, M., Miller, J. R., Huang, E., Kimelman, D., & Moon, R. T. (1996). The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes & Development*, *10*(12), 1443-1454. <https://doi.org/10.1101/gad.10.12.1443>
- Young, T., Poobalan, Y., Kim Tan, E., Tao, S., Ong, S., Whener, P., Schwenty-Lara, J., Yan Lim, C., Sadasivam, A., Lovatt, M., Wang, S. T., Ali, Y., Borchers, A., Sampath, K., & Dunn, N. R. (2014). The PDZ domain protein Mcc is a novel effector of non-canonical Wnt signaling during convergence and extension in zebrafish. *Development*, *141*(18), 3505-3516. <https://doi.org/10.1242/dev.114033>
- Zallen, J. A. (2007). Planar polarity and tissue morphogenesis. *Cell*, *129*(6), 1051-1063. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.050>
- Zarkada, G., Howard, J. P., Xiao, X., Park, H., Bizou, M., Leclerc, S., Künzel, S. E., Boisseau, B., Li, J., Cagnone, G., Joyal, J. S., Andelfinger, G., Eichmann, A., & Dubrac, A. (2021). Specialized endothelial tip cells guide neuroretina vascularization and blood-retina-barrier formation. *Developmental Cell*, *56*(15), 2237-2251.e6. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.06.021>
- Zhao, Z., Nelson, A. R., Betsholtz, C., & Zlokovic, B. V. (2015). Establishment and Dysfunction of the Blood-Brain Barrier. *Cell*, *163*(5), 1064-1078. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.067>

Zhou, Y., Wang, Y., Tischfield, M., Williams, J., Smallwood, P. M., Rattner, A., Taketo, M. M., & Nathans, J. (2014). Canonical WNT signaling components in vascular development and barrier formation. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(9), 3825-3846. <https://doi.org/10.1172/JCI76431>

Zhu, N., Wei, M., Yuan, L., He, X., Chen, C., Ji, A., & Zhang, G. (2022). Claudin-5 relieves cognitive decline in Alzheimer's disease mice through suppression of inhibitory GABAergic neurotransmission. *Aging*, 14(8), 3554-3568. <https://doi.org/10.18632/aging.204029>

Zuercher, J., Fritzsche, M., Feil, S., Mohn, L., & Berger, W. (2012). Norrin stimulates cell proliferation in the superficial retinal vascular plexus and is pivotal for the recruitment of mural cells. *Human Molecular Genetics*, 21(12), 2619-2630. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds087>

## LISTE DES PUBLICATIONS

Bougaran, P., Bats, M. L., **Delobel, V.**, Rubin, S., Vaurs, J., Couffinhal, T., Duplâa, C., & Dufourcq, P. (2023). ROR2/PCP a New Pathway Controlling Endothelial Cell Polarity Under Flow Conditions. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 43(7), 1199-1218. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.123.319106>

Abelanet, A., Camoin, M., Rubin, S., Bougaran, P., **Delobel, V.**, Pernot, M., Forfar, I., Guilbeau-Frugier, C., Gal s, C., Bats, M. L., Renault, M.-A., Dufourcq, P., Couffinhal, T., & Duplâa, C. (2022). Increased Capillary Permeability in Heart Induces Diastolic Dysfunction Independently of Inflammation, Fibrosis, or Cardiomyocyte Dysfunction. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 42(6), 745-763. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.121.317319>

Bats, M.-L., Peghaire, C., **Delobel, V.**, Dufourcq, P., Couffinhal, T., & Duplâa, C. (2022). Wnt/frizzled Signaling in Endothelium : A Major Player in Blood-Retinal- and Blood-Brain-Barrier Integrity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 12(4), a041219. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a041219>

# Wnt/frizzled Signaling in Endothelium: A Major Player in Blood-Retinal- and Blood-Brain-Barrier Integrity

Marie-Lise Bats,<sup>1,2,4</sup> Claire Peghaire,<sup>1,4</sup> Valentin Delobel,<sup>1</sup> Pascale Dufourcq,<sup>1</sup>  
Thierry Couffignal,<sup>1,3</sup> and Cécile Duplaa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Univ. Bordeaux, Inserm, UMR1034, Biology of Cardiovascular Diseases, F-33600 Pessac, France

<sup>2</sup>Department of Biochemistry, Pellegrin Hospital, University Hospital of Bordeaux, 33076 Bordeaux Cedex, France

<sup>3</sup>Centre d'exploration, de prévention et de traitement de l'athérosclérose (CEPTA), CHU Bordeaux, 33000 Bordeaux, France

Correspondence: cecile.duplaa@inserm.fr

The Wnt/frizzled signaling pathway is one of the major regulators of endothelial biology, controlling key cellular activities. Many secreted Wnt ligands have been identified and can initiate diverse signaling via binding to a complex set of Frizzled (Fzd) transmembrane receptors and coreceptors. Roughly, Wnt signaling is subdivided into two pathways: the canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway whose main downstream effector is the transcriptional coactivator  $\beta$ -catenin, and the noncanonical Wnt signaling pathway, which is subdivided into the Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  pathway and the planar cell polarity pathway. Here, we will focus on its cross talk with other angiogenic pathways and on its role in blood-retinal- and blood-brain-barrier formation and its maintenance in a differentiated state. We will unravel how retinal vascular pathologies and neurovascular degenerative diseases result from disruption of the Wnt pathway related to vascular instability, and highlight current research into therapeutic options.

The Wnt signaling pathway is one of the main regulators of endothelial biology. In mammals, 19 different Wnt secreted ligands have been identified to date (Nusse and Clevers 2017); they can initiate distinct signaling upon binding at the cell surface to a combination of multiple transmembrane receptors of the Frizzled (Fzd) family (10 in humans and mice), and low-density lipoprotein receptor-related proteins 5/6 (LRP5/6) coreceptors (Gordon and Nusse 2006). Wnt proteins are highly hydro-

phobic and posttranslationally modified with lipids by the membrane-bound *O*-acyltransferase porcupine (PORCN), restricting their diffusion in the aqueous environment primarily toward neighboring cells (Willert et al. 2003; Takada et al. 2006). Studies of their crystal structures show that its lipid tail is required for Wnt interaction within the Fzd extracellular cysteine-rich domain (Janda et al. 2012). Wnt secretion relies on the conserved multipass transmembrane and putative sorting receptor Wntless

<sup>4</sup>These authors contributed equally to this work.

Editors: Diane R. Bielenberg and Patricia A. D'Amore

Additional Perspectives on Angiogenesis: Biology and Pathology available at [www.perspectivesinmedicine.org](http://www.perspectivesinmedicine.org)

Copyright © 2022 Cold Spring Harbor Laboratory Press; all rights reserved; doi: 10.1101/cshperspect.a041219

Cite this article as *Cold Spring Harb Perspect Med* 2022;12:a041219



M.-L. Bats et al.

(Wls, also known as Evi/ Sprinter), which shuttles Wnt proteins from the Golgi to the plasma membrane (Bänziger et al. 2006).

On a molecular level, two types of Wnt signaling pathways have been described: the canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway, which functions to stabilize and induce nuclear translocation of  $\beta$ -catenin, and the noncanonical Wnt signaling pathway, apparently  $\beta$ -catenin independent, which is subdivided into the Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  pathway and the planar cell polarity (PCP) pathway (Gordon and Nusse 2006; Rao and Kühl 2010). Although the Wnt pathways have been separated into two branches for simplicity, the canonical and noncanonical pathways overlap on several levels. It has been shown that the noncanonical Wnt signaling may inhibit the canonical Wnt pathway in receptor- and ligand-dependent manners or reciprocally (Grumolato et al. 2010). The cytoplasmic scaffold protein Dishevelled (Dvl) is then activated and acts as a hub for the transduction of distinct Wnt pathways through different domains (Beitia et al. 2021).

Previous studies have shown that endothelial cells (ECs) express high levels of distinct Fzd receptors, LRP5/6, and Wnt factors (Goodwin et al. 2006). However, the mechanisms underlying the variety of outcomes triggered by Wnt in vascular homeostasis is still under debate. The canonical  $\beta$ -catenin-mediated pathway is the most well-characterized, whereas mechanisms of the downstream noncanonical pathways in vascular development and stabilization are just beginning to be elucidated.

In this paper, we have included a limited discussion on the role of Wnt/Fzd signaling in EC in the development of the blood-retina and blood-brain-barriers (BRB and BBB, respectively) and its involvement in the pathogenesis of retinal and neurodegenerative diseases.

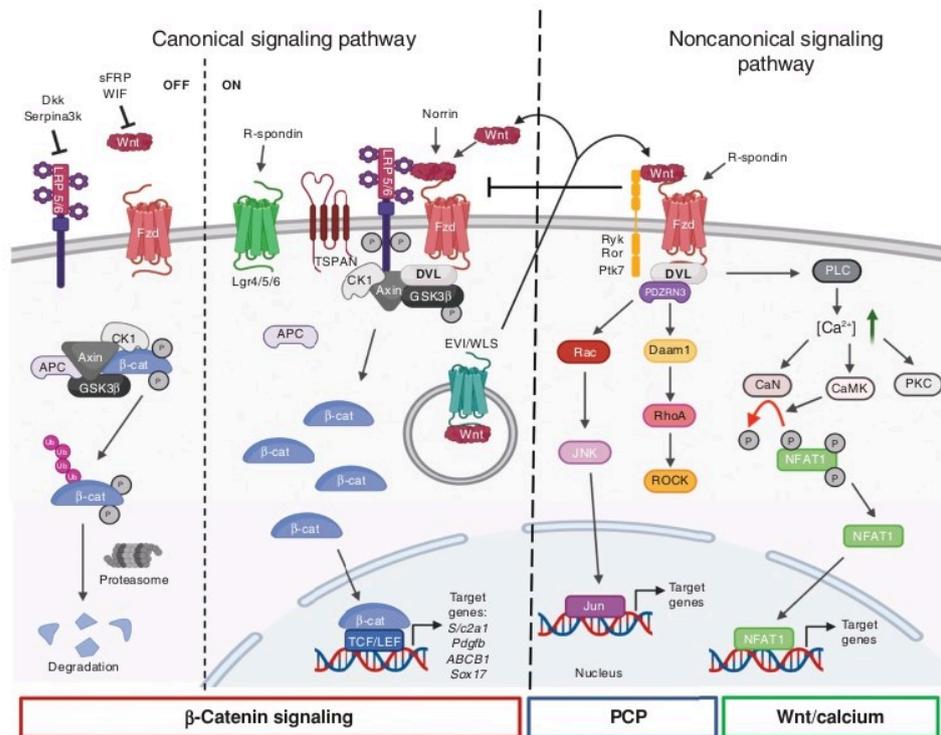
## Wnt SIGNALING PATHWAYS

### Canonical Wnt Signaling

Wnt canonical signaling has been reported to be required for the complex regulation of new vessel development, mainly for angiogenesis of the

BRB and BBB differentiation and maturation (Liebner et al. 2008; Daneman et al. 2009).  $\beta$ -Catenin is reported as the central player of the canonical Wnt pathway. In the presence of Wnt ligands, Wnt/Fzd forms a ternary complex with the coreceptor LRP5/6, which in turn triggers LRP5/6 phosphorylation by casein kinase 1 $\gamma$  (CK1 $\gamma$ ). This signaling cascade results in the formation of large signalosomes with the recruitment of Dvl and Axin proteins (Davidson et al. 2005; Zeng et al. 2005), which are endocytosed (Bilić et al. 2007; Schwarz-Romond et al. 2007). This mechanism leads to disruption of the destruction complex, halting degradation of the Wnt signaling transducer  $\beta$ -catenin in the cytoplasm and ultimately induces its translocation to the nucleus.  $\beta$ -Catenin is then associated with the lymphoid enhancer factor (Lef)/T-cell factor (TCF) transcription factors and other cofactors, resulting in the expression of target genes, such as *Cldn5* (coding for claudin-5) (Liebner et al. 2008), *Slc2a1* (coding for GLUT1) (Daneman et al. 2009), *Pdgfb* (coding for platelet-derived growth factor B [PDGF-B]) (Reis et al. 2012), and *ABCB1* (coding for the efflux transporters of the blood-brain-barrier P-glycoprotein [P-gp]) expression (Lim et al. 2008; Kania et al. 2011). Without Wnt stimulation, cytoplasmic  $\beta$ -catenin is targeted to a complex with the glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), CK1 $\gamma$ , and the tumor suppressor adenomatous polyposis coli (APC) complex linked to the scaffolding protein Axin that induces phosphorylation of  $\beta$ -catenin by GSK3 $\beta$  and its rapid proteasomal degradation (Sakanaka et al. 1998). Target genes are repressed in the absence of nuclear  $\beta$ -catenin (Fig. 1; Cavallo et al. 1998).

Evidence that several inhibitors are present during angiogenesis has further increased the complexity of this pathway. Secreted Fzd-related proteins (sFRP members) (Dufourcq et al. 2008) and Wnt inhibitory factor 1 (WIF-1) (Ramachandran et al. 2012) can directly bind and sequester Wnt ligands, and thereby block Wnt signaling output. For example, sFRP1 (FzdA) expression impairs EC proliferation as a result of reduced expression of cyclin E and cdk2 activity and subsequently reduces neovascularization in a model of mouse hindlimb ischemia (Ezan 2004).



**Figure 1.** Schematic representation of the canonical and noncanonical Wnt signaling pathways. (*Left*) Canonical signaling pathway or Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. In the OFF state, Wnt ligands do not bind to Frizzled (Fzd) receptors. Thus, cytoplasmic  $\beta$ -catenin binds to its destruction complex formed by glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), Axin, adenomatous polyposis coli (APC), and casein kinase 1 (CK1), which induces  $\beta$ -catenin phosphorylation (P), thereby targeting it for degradation by the ubiquitin (Ub) proteasome system. Inhibitors of Wnt ligands (secreted Frizzled-related protein [sFRP] or Wnt inhibitory factor [WIF]) or of coreceptors low-density lipoprotein (LDL) receptor-related protein (LRP5/6) (Dickkopf [Dkk] and serine protease inhibitor [Serpina3K]) contribute to blocking of Wnt signaling. In the ON state, Wnt ligands bind to the receptor complex consisting of Fzd and LRP5/6, which then recruits the Dishevelled (DVL) protein to the plasma membrane. The  $\beta$ -catenin destruction complex is recruited to the membrane, which prevents phosphorylation and degradation of  $\beta$ -catenin. This protein can then accumulate in the cytoplasm and translocate to the nucleus to form a complex with the transcription factors T-cell factor (TCF)/lymphoid enhancer factor (LEF) and stimulate the transcription of Wnt/ $\beta$ -catenin target genes. Wnt secretion is a fine process controlled by the evenness interrupted (EVI)/Wntless (WLS) protein. Other coreceptors (tetraspanin [TSPAN] and leucine-rich repeat containing [Lgr4/5/6]) and ligands (Norrin and R-spondin) can activate or enhance the Wnt signaling pathways. (*Right*) Noncanonical signaling pathways. Activation of these pathways involve binding of Wnt ligands to the receptor complex formed by Fzd and other key coreceptors (related to tyrosine [Y] kinase [Ryk], receptor tyrosine kinase-like orphan receptor [Ror], protein tyrosine kinase 7 [Ptk7]). Depending on Wnt/Fzd interactions and coreceptors, distinct downstream effectors are involved to transduce alternative  $\beta$ -catenin-independent signaling pathways, namely, the planar cell polarity (PCP) signaling and Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  signaling pathways. Activation of the Wnt/PCP pathway leads to the formation of a DVL/Dishevelled-associated activator of morphogenesis 1 (Daam1) complex, which activates the small GTPase RhoA and subsequently Rho-associated protein kinase (ROCK) to regulate actin cytoskeleton. The PCP pathway can also activate the small GTPase Ras-related C3 botulinum toxin substrate (Rac) and then c-Jun amino-terminal kinase (JNK), which then phosphorylates and activates Jun and induces transcription of Jun target genes. The Wnt/calcium pathway involves activation of downstream phospholipase C (PLC), which induces increased release of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels and then activates protein kinase C (PKC) and  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase (CaMK). This last protein can now dephosphorylate the transcription factor nuclear factor of activated T cells (NFAT) leading to its nuclear import and induction of the transcription of its target genes. The calcium pathway can also promote NFAT dephosphorylation and activation through the calcineurin (CaN) axis. R-spondin ligands (more specifically R-spondin3) can also modulate and activate the Wnt/calcium pathway. Created with BioRender.com. ( $\beta$ -cat)  $\beta$ -Catenin, ( $\text{Ca}^{2+}$ ) calcium.

Binding of SFRP2 to Fzd receptors on the surface of tumor ECs activates downstream Wnt signaling, enhancing angiogenesis (van Loon et al. 2021). In contrast to sFRPs, another class of inhibitors, the Dickkopf (DKK) protein family, which includes members of DKK1, 2, 3, and 4, inhibits Wnt signaling by preventing the interaction of Wnts with the coreceptors LRP5/6 (Niehrs 2006) and have been shown to be involved in development or tumoral angiogenic events (Pendás-Franco et al. 2008; Min et al. 2011; Choi et al. 2017). For the reader, other  $\beta$ -catenin-independent Wnt/Lrp6 signaling routes have emerged that add a high level of complexity for Wnt signaling (Acebron and Niehrs 2016). Their roles in vascular biology are still unknown.

### The Wnt Noncanonical Pathway

As alluded to above, depending on Wnt/Fzd interaction and coreceptors, distinct Wnt downstream effectors are involved with transducing alternative  $\beta$ -catenin-independent Wnt signaling pathways, such as the Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  and PCP signaling (Fig. 1). Several groups have reported that noncanonical Wnt signaling regulates EC proliferation and vascular network formation (Masckauchán et al. 2006; Cheng et al. 2008; Descamps et al. 2012). Deletion of the Wnt secretion factor Evi (Evi-ECKO) in mouse ECs, uncovered the role of noncanonical Wnt proteins secreted by EC in vascular network stabilization. Evi-ECKO mice showed reduced retinal and tumoral vascularization. This effect was rescued by noncanonical Wnt5a treatment (Korn et al. 2014).

In the Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  cascade, the binding of Wnts to Fzd receptors leads to activation of DVL and downstream phospholipase C (PLC), which allow the release of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  and activation of  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive enzymes, such as  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase (CaMKII) and protein kinase C (PKC). CaMKII activation dephosphorylates the transcription factor nuclear factor of activated T cells (NFAT) leading to its nuclear import. sFRP2 was reported to activate Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  signaling in ECs to induce angiogenesis (Courtwright et al. 2009). Stefaner et al. (2011,

2013) have shown that macrophages secrete non-noncanonical Wnt proteins to control endothelial sFlt1/VEGFR1 expression through an NFAT-calcineurin axis, to limit retinal vessel branching and wound healing. Another study showed that the Wnt signaling enhancer R-spondin3 (RSPO3), a secreted protein, highly expressed in endothelium, maintains vascular stability during blood retinal development and vascular remodeling via the activation of Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  pathway in ECs (Scholz et al. 2016).

ECs are characterized by distinct forms of polarity, creating morphological and functional asymmetries that are a prerequisite for their functions. At the tissue level, ECs form a planar polarized monolayer, with a directional cell alignment. It was proposed that this polar tissue pattern along a plane axis (orthogonal to the apico/basal axis) was mediated to some extent by the noncanonical Wnt/PCP pathway. At the cellular level, ECs possess an apicobasal polarity that has been extensively studied in the context of endothelial lumen formation (Iruela-Arispe and Davis 2009; Xu and Cleaver 2011; Lammert and Axnick 2012; Pelton et al. 2014). At the molecular level, both forms of polarity appeared to be intertwined.

First observed and dissected in model organisms as yeast, *Caenorhabditis elegans*, and *Drosophila melanogaster*, where it regulates the orientation of hair on wings and facets in eye, PCP is now known to be involved in mammals in a variety of tissue in regulating gastrulation, sensory cell orientation (Montcouquiol et al. 2003; Wang and Nathans 2007), alveologenesis (Zhang et al. 2020), and in cellular processes such as asymmetric cell division and collective cell migration (Wallingford 2012). Fzd receptors and intracellular Dvl are necessary components. A requirement for Wnt as upstream regulators is still controversial (Ewen-Campen et al. 2020; Yu et al. 2020). A key feature of planar polarity, as reported in *Drosophila* studies, is the asymmetrical localization of PCP core proteins (Simons and Mlodzik 2008). The core PCP proteins are conserved in vertebrate species and include Fzd3/6, Celsr1-3 cadherins, Vangl1/2, Prickle1/2, DVL1-3, and Ankrd6. Their localization in an asymmetric manner, at or near the cell

membrane, is thought to create the polarization of cells. These proteins at the membrane would favor interaction with neighboring cells to spread polarization across tissues. Finally, the PCP pathway activates, via the hub DVL, PCP downstream effector proteins, including DAAM1 and small GTPases such as RhoA, and Rac1 to activate Jun amino-terminal kinase (Wu and Mlodzik 2009). The effector proteins control cytoskeletal rearrangements but are not asymmetrically localized within the cell.

In EC, the identification of molecular PCP effectors is still highly challenging. This is partly due to the nature of this signaling pathway, which typically contributes to tissue organization, and to the limited set of suitable tools to study PCP signaling dynamics. Genetic studies have started to add some pieces to this puzzle, specifically related to the PCP effect on vascular formation. Loss of Wnt5a leads to impaired blood vessel development (Cirone et al. 2008), whereas Wnt5a activation induces the noncanonical Par3/PKC complex and thus reinforces brain EC tight junctions (Artus et al. 2014). The Scribble polarity protein was shown to be required for endothelial-directed migration (Michaels et al. 2013). In lymphatic ECs, asymmetric localization of CELSR1 and VANGL2, PCP core proteins, was reported during lymphatic valve formation controlling the stabilization of endothelial adherent junctions (Tatin et al. 2013). However, mechanisms by which PCP signaling elicits context-specific processes is still unclear. The study of PCP is hampered by a lack of clarity and consensus on how to (1) define adequate noncanonical EC properties, (2) analyze the regulation of the effectors, and (3) measure signaling in vascular cells. It appears crucial to identify and assess the activity of downstream signaling events in ECs to understand the role of PCP signaling in tissue formation and maintenance. Using genetic screening, our group has identified an actor in the PCP pathway in ECs, the E3 ubiquitin ligase Pdzn3, and demonstrated its role in vessel network formation (Sewduth et al. 2014). Proteomic screening has shown that Pdzn3 is an effector in Wnt5a/ROR signal transduction (Konopelski Snavely et al. 2021).

## ROLE OF THE Wnt/PCP SIGNALING IN ECs TO ORCHESTRATE VASCULAR DEVELOPMENT

In this work, we review studies in which Wnt proteins were shown to provide polarity cues at the level of the endothelium during angiogenesis. This research has benefited from an increasing body of genetic tools, sophisticated imaging technology, and computational modeling of blood flow.

Laminar shear flow was shown to drive EC elongation and planar polarization with an asymmetric organization of organelles against the flow axis (Rogers et al. 1985; Tzima et al. 2005). Robust analyses demonstrate that EC dynamically sense the blood flow, migrating against the direction of the blood flow to form a stable vascular network. Consequently, vessel segments under low flow constraint are unstable and regress (Franco et al. 2015). Wnt5a and Wnt11 ligands have been reported to participate functionally in the control of the flow-induced EC polarization response (Franco et al. 2016). In this context, noncanonical Wnt signaling modulates the threshold for flow-dependent EC polarization, inducing premature vessel regression, and leading to a decrease in vessel density (Franco et al. 2016).

Noncanonical Wnt ligands coordinate polarized EC behaviors during vascular morphogenesis (Carvalho et al. 2019). Cell polarization entails highly orchestrated intracellular molecular reorganization events mediated by key regulators of polarity. Wnt5a signaling may activate the Rho family small GTPases Cdc42 reinforcing the link between actin cytoskeleton and intercellular junction proteins during angiogenic collective cell migration (Carvalho et al. 2019). Mouse mutants of PCP signaling effectors, such as the ubiquitin ligase Pdzn3 (Sewduth et al. 2014) and the polarity protein PAR3 (Hikita et al. 2018), display similar vascular defects with a destabilization of the polarized mouse retinal vascular network. EC polarization may be achieved by the integration of the Par3/aPKC $\zeta$  polarity protein complex-induced signaling and cytoskeleton rearrangement in ECs (Sewduth et al. 2014, 2017; Hikita et al. 2018).

### CROSS TALK BETWEEN Wnt AND OTHER ANGIOGENIC PATHWAYS

Only a few studies have examined the interplay between the Wnt signaling and other key pathways involved in angiogenesis. One of the most crucial regulators of vascular development is the vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling pathway, which includes VEGF ligands (VEGFA, B, C, and D) and receptors (VEGFR1-3) (Ferrara 2009). In EC, VEGF is a key initiator of angiogenesis and sprouting, and a fine regulator of tip cells selection through activation of VEGFR2 (Ruhberg et al. 2002; Gerhardt et al. 2003; Jakobsson et al. 2010).

An interesting link between the VEGF and Wnt pathways has been described *in vitro* by Skurk and coworkers. The authors propose that the VEGF/PI3-kinase/Akt signaling is downstream of  $\beta$ -catenin and contributes to the pro-angiogenic actions of  $\beta$ -catenin on ECs (Skurk et al. 2005). Subsequently, two studies demonstrated the role of R-spondin (RSPO), a family of secreted proteins that activate Wnt/ $\beta$ -catenin signaling, in regulating developmental vasculogenesis and angiogenesis through the regulation of VEGF (Kazanskaya et al. 2008; Gore et al. 2011). In fact, RSPO3 was identified as a key regulator of VEGF expression via the activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in mouse placenta and in a *Xenopus* model (Kazanskaya et al. 2008). In addition, the RSPO3/Wnt signaling pathway has been shown to promote angiogenesis via VEGFC and VEGFR3 in zebrafish (Gore et al. 2011).

In central nervous system (CNS) microvessels, impaired endothelial  $\beta$ -catenin signaling following  $\beta$ -catenin genetic depletion or overexpression of Axin1, a member of the  $\beta$ -catenin protein degradation complex, led to a decreased expression of VEGFR2 and VEGFR3 (Martowicz et al. 2019). Interestingly, the  $\beta$ -catenin-dependent regulation of VEGFR2 and 3 was tissue-specific and loss of  $\beta$ -catenin did not affect the level of VEGF receptors in lung tissues. Since the transcription factor SOX17 has been identified as a  $\beta$ -catenin target in EC, a positive inducer of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and a promoter of both angiogenesis and VEGFR2 expression in the CNS (Corada et al. 2013, 2019; Zhou et al. 2015), the

authors proposed a model where  $\beta$ -catenin drives VEGFR2 expression via the up-regulation of Sox17 (Martowicz et al. 2019). However, how  $\beta$ -catenin precisely regulates VEGFR2 levels during angiogenesis in the CNS is still poorly understood and could involve multiple partners. DKK1 was reported to act via the VEGFR1 and SDF-1 signaling pathway, independent of the Wnt canonical signaling pathway, to regulate angiogenesis (Choi et al. 2017). Additional studies are needed to identify the possible tissue-specific molecular mechanism by which  $\beta$ -catenin drives endothelial VEGFR2/R3 expression to gain a better understanding of the cross talk between these two pathways in this context.

The Notch signaling pathway is an evolutionarily highly conserved signaling machinery, which has emerged as an essential regulator of multiple steps involved in vascular development and angiogenesis including endothelial sprouting, tip versus stalk cells selection, and arterial specification (Roca and Adams 2007; Mack and Iruela-Arispe 2018). This pathway involves five ligands, namely, Delta-like (Dll)1, Dll3, Dll4, Jagged1, and Jagged2 that interact with four Notch transmembrane receptors (Notch1–Notch4). Activation of the receptors leads to the proteolytic cleavage of the Notch intracellular domain (NICD) and its translocation to the nucleus where it can regulate gene expression through cooperation with recombination signal-binding protein for immunoglobulin  $\kappa$  J (RBPJ) (Guruharsha et al. 2012).

Different studies have demonstrated an interplay between the Notch and the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathways during vascular morphogenesis. Phng et al. reported that the Notch-regulated ankyrin repeat protein (Nrarp), induced by Notch signaling, acts downstream of this pathway to regulate vascular density by controlling stalk cell proliferation and stabilization of new endothelial connections in mouse retina and zebrafish. Nrarp was found to be a negative regulator of Notch signaling by destabilizing NICD, and an activator of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling by binding to lymphoid enhancer factor 1 (Lef1) (Phng et al. 2009). Moreover, in a mouse model overexpressing  $\beta$ -catenin specifically in ECs, treatment with DAPT, an inhibitor of Notch signaling, was able to partially rescue embryonic



vascular defects (Corada et al. 2010). It was shown that in ECs, the transcriptional complex formed by  $\beta$ -catenin/NICD/RBPJ induced by the angiopoietin1/Tie2 axis, drove the expression of Dll4 to enhance Notch signaling and promote vascular quiescence (Zhang et al. 2011). Moreover, the endothelial transcription factor ERG has been shown to directly interact with the  $\beta$ -catenin/NICD/RBPJ complex, to control the fine balance between Dll4 and Jagged1 expression in vitro and in mouse retina to maintain vascular homeostasis (Shah et al. 2017). Similarly, our group reported that mice with EC-specific deletion of *Fzd7* displayed reduced  $\beta$ -catenin and Notch signaling. Notably, impairment of the Notch signaling was rescued in vitro and in vivo by activation of  $\beta$ -catenin signaling (Peghaire et al. 2016).

## Wnt SIGNALING AND EYE VASCULATURE

### Wnt Signaling in the Development of Eye Vasculature

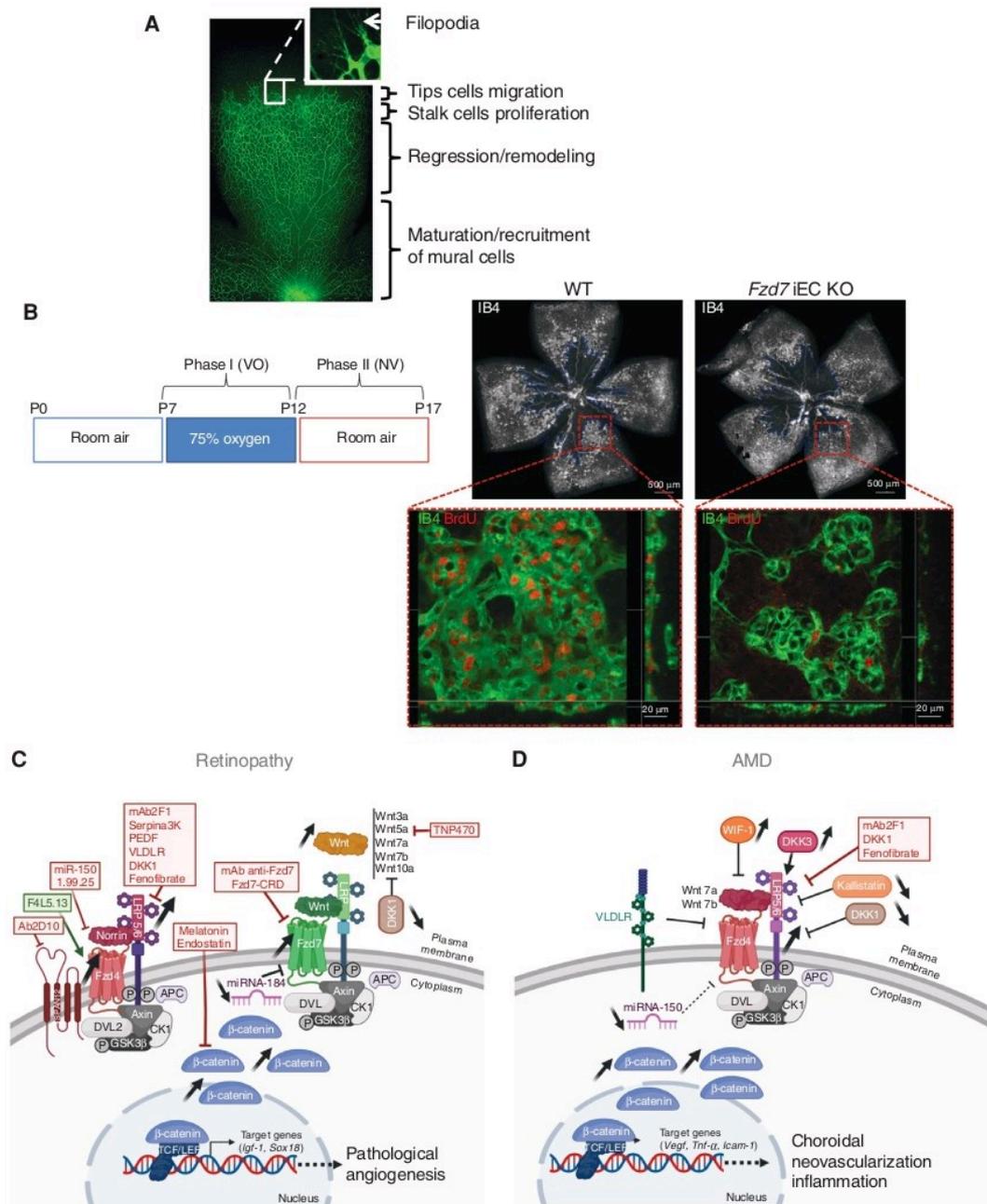
The discovery of a genetic link between Wnt signaling and human retinal vascular defects has fostered studies on the role of Wnt signaling in retinal angiogenesis in mice (Xu et al. 2004). Over time, the vascular system of the mouse retina has been used as a robust model for analyzing the molecular and cellular mechanisms regulating angiogenesis (Stahl et al. 2010).

At birth, the mouse retina is avascular, then vascular networks are formed, following a hierarchical pattern under the control of major angiogenic factor such as VEGF (Gerhardt et al. 2003). Deposition of a basement membrane, recruitment of mural cells and dynamic vessel regression contribute to the shaping and maintenance of a functional BRB (Fig. 2A; Korn and Augustin 2015).

Consistent with human disease, mice deficient for *Ndp* (or *Norrie Disease Protein* gene encoding Norrin), *Fzd4*, or *Tspan12* show major defects in retinal vascularization, including loss of BRB integrity, a delayed regression of hyaloid vasculature and absence of the secondary and tertiary plexus (Richter et al. 1998; Ye et al. 2009; Wang et al. 2012; Lai et al. 2017). *LRP-5*

null mice display vascular defects with a persistent hyaloid vasculature, similar to the Norrin and Frizzled4 mutants (Kato et al. 2002). These studies highlight the importance of Norrin ligand-induced signaling through the FZD4/LRP5/TSPAN12 receptor complex, for the development and maintenance of retinal vasculature (Xu et al. 2004; Junge et al. 2009; Ye et al. 2010; Chen et al. 2011). Stabilization of  $\beta$ -catenin by genetic approaches, or promoted by the ETS transcription factor ERG, rescues these phenotypes (Zhou et al. 2014b; Birdsey et al. 2015). Molecular analyses identified claudin-5 and plasmalemma vesicle-associated protein (PLVAP) as downstream targets of Norrin/FZD4/LRP5 signaling (Chen et al. 2012; Wang et al. 2012; Zhang et al. 2017). Finally, the major facilitator superfamily domain-containing protein 2 (MSFD2A), a membrane transport protein, was recently identified as a transcriptional target of the Norrin/LRP5/ $\beta$ -catenin pathway in governing endothelial transcytosis and inner BRB integrity (Wang et al. 2020).

A number of reports highlight the molecular complexity of Wnt signaling in the regulation of ocular angiogenesis (Liu et al. 2003; Lobov et al. 2005; Yi et al. 2007; Liu and Nathans 2008; Franco et al. 2016; Bats et al. 2020). In the developing eye, hyaloid vessel regression is tightly regulated by *Fzd5* and the macrophage-secreted *Wnt7b* (Lobov et al. 2005; Liu and Nathans 2008). Our group demonstrated that endothelial *Fzd7* drives postnatal retinal angiogenesis via the activation of *Dvl*/ $\beta$ -catenin signaling (Peghaire et al. 2016). Disruption of noncanonical *Wnt5a* and *Wnt11* ligands or the endothelial ubiquitin ligase *PDZRN3*, was associated with premature vessel regression in the mouse retina (Sewduth et al. 2014; Franco et al. 2016). A similar phenotype was observed in murine retinal vessels deficient for the Wnt secretion factor *Evi*, or for endothelial *RSPO3*, an enhancer of *Wnt*/ $Ca^{2+}$  signaling (Korn et al. 2014; Scholz et al. 2016; Carvalho et al. 2019). Additionally, the noncanonical *Wnt5a*/*ROR2*/*PCP* signaling contributes to the regulation of retinal vessel sprouting by coordinating the collective polarity of ECs, a process closely related to cell migration (Korn et al. 2014; Franco et al. 2016; Carvalho et al. 2019).



**Figure 2.** Role of Wnt signaling in vascular eye pathology. (A) Representative image of a whole flat-mounted retina at P7 from WT mouse with vessels stained with isolectin (IB4, green). Unlike in humans, mouse intra-retinal vasculature occurs postnatally to be essentially mature at about 3 weeks postnatal. With a highly regulated patterning in the development of eye vasculature, mice retina provides a useful experimental tool to deciphering angiogenic mechanisms such as vessel sprouting corresponding to tip cells migration and stalk cells proliferation, vessel regression, maturation, and remodeling during postnatal period. (B, left) Experimental studies of retinopathy of prematurity (ROP) and proliferative diabetic retinopathy (DR) are enabled by the oxygen-induced retinopathy (OIR) model, a well-established animal model of ischemia-induced retinal neovascularization (NV). (Legend continues on following page.)

### Wnt Signaling in Human and Murine Retinal Vascular Diseases

In humans, Norrie disease is an X-linked recessive disorder, due to mutations in the *NDP* gene, VI, which causes persistent hyaloid vessels, incomplete retinal vascularization, and pathologic neovessel proliferation, often resulting in blindness from birth (Berger et al. 1992).

Familial exudative vitreoretinopathy (FEVR) is another inherited blinding disorder that shares phenotypic characteristics with Norrie disease (Gilmour 2015). While half of all FEVR pathogenic mutations are found within *FZD4*, *LRP5*, *TSPAN12*, and *NDP*, others affect genes functionally related to the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling: *CTNNB1*, *ILK*, *KIF11*, *JAG1*, and *DLG1* (Xiao et al. 2019; Jia and Ma 2021; Zhang et al. 2021).

Osteoporosis-pseudoglioma syndrome (OPPG) is an autosomal recessive disorder caused by inactivating mutations in *LRP5*, and also leads to persistent primary vitreous vasculature (Gong et al. 2001).

Coats disease is a single-eye condition, predominantly affecting men, that is characterized by microaneurysms, retinal detachments, and lipid exudates (Sen et al. 2019), as a direct consequence of Wnt pathway alterations in *NDP*, *FZD4*, and *RCBTB1* (Black et al. 1999; Robitaille et al. 2011; Wu et al. 2016).

Ischemic retinopathies, including retinopathy of prematurity (ROP) and diabetic retinopathy (DR), are ocular disorders characterized by an initial phase of ischemia, followed by a second phase of abnormal neovascularization that may culminate into retinal detachment

**Figure 2.** (Continued) Neonatal mice are exposed to 75% oxygen from postnatal day 7 (P7) to P12, corresponding to vasobliterative phase (phase I, VO) inducing a central avascular zone (delimited by blue line, image on the right) and returned to room air from P12 to P17 to induce maximum pathologic NV at P17 (phase II). (Right) Representative images showed areas of VO (indicated by blue line) in P17 OIR retinas from WT mice and from *Fzd7* iEC-KO mice. Screenshot of retinal quadrants focus on proliferation (BrdU incorporation, red) in preretinal tufts (IB4 staining, green) at P17 from WT and *Fzd7* iEC-KO OIR mice. Note that *Fzd7* endothelial deletion limits EC proliferation in pathological neovessels. (Panel B from Bats et al. 2020; reprinted, with permission, from John Wiley and Sons © 2019.) Acquired vascular eye disorders include retinopathies (C) and age-related macular degeneration (AMD) (D) in which the involvement of Wnt signaling is fully recognized. (C) Dysregulation of Wnt signaling, with an emphasis on the canonical Wnt/ $\beta$ -catenin pathway, has been widely studied in retinopathies for its implication in the development of pathological angiogenesis. *Fzd4*, *LRP5/6*, and  $\beta$ -catenin are up-regulated either in retinas from diabetic patients or in animal models of retinopathies. Plasma and vitreous fluid levels of DKK1, a Wnt inhibitor, are lower in patients with DR compared to controls. Experimental genetic loss of *Lrp5*, *Dvl2*, or *Fzd4* significantly attenuates NV in OIR. Increased expression of Wnt3a, Wnt5a, Wnt7a, Wnt7b, and Wnt10a but not Norrin is associated with pathologic angiogenesis in retinopathies. The suggested protective effect of Norrin against OIR is mediated by the induction of insulin-like growth factor (IGF-1), a very potent angiogenic molecule. A negative regulator of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling, miR-184, is down-regulated in OIR, while the expression of *Fzd7*, its downstream target, is induced during the NV phase. *Fzd7* endothelial deletion exerts a specific inhibitory effect on pathological angiogenesis after OIR by limiting endothelial cell (EC) proliferation in pathological neovessels. (D) Alteration of Wnt signaling is also associated with abnormal choroidal neovascularization (CNV) and inflammation in AMD. CNV initiation involves activation of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway, which in turn stimulates vascular endothelial growth factor (VEGF) to mediate angiogenesis. AMD patients exhibit high levels of phospho-LRP6 and  $\beta$ -catenin, especially in the endothelium of choroidal tissue, low plasma levels of the endogenous Wnt inhibitors, kallistatin or DKK1, and, on the contrary, high levels of other Wnt modulators, WIF-1 and DKK3, in the aqueous humor. In mouse, *Wnt7a* and *Wnt7b* deletion decrease severity of laser injury-induced CNV. Deficiency for VLDLR, a negative regulator of Wnt pathway, leads to abnormal intraretinal and choroidal NV and inflammation. Finally, laser-induced CNV is promoted by miR-150 deficiency, a negative regulator of *Fzd4* expression. Antiangiogenic strategies targeting Wnt signaling are of real interest in the treatment of retinopathies (C) and AMD (D). Inhibitors and inducers of the Wnt pathway, already tested in angiogenic models of retinopathy and AMD, are shown in red and green, respectively. Their therapeutic potential is detailed in the Therapies for Vascular Diseases section. Created with BioRender.com.

and blindness (Rivera et al. 2017). In humans, mutations on *NDP*, *FZD4*, and *LRP5* genes have been identified as risk factors for developing severe ROP (Drenser 2016). Association between the activation of Fzd4/LRP5-6/ $\beta$ -catenin pathway and pathological angiogenesis has been widely documented in both human DR and experimental models of retinopathy (Wang et al. 2019b). Patients with DR also exhibit low plasma and vitreous fluid levels of the Wnt inhibitor DKK1 (Qiu et al. 2014). In mice, genetic loss of *Lrp5*, *Dvl2*, or *Fzd4* significantly attenuates neovascularization in oxygen-induced retinopathy (OIR) (Chen et al. 2011; Ngo et al. 2016). Inactivation of endothelial Wnt ligands secretion does not impact the vasobliterative phase of OIR (Franco et al. 2016), further suggesting that Wnt signaling contributes preferentially to the neovascular process of the disease. Unlike many Wnt ligands, Norrin is not up-regulated during retinopathy (Chen et al. 2011; Franco et al. 2016; Lee et al. 2017). Its protective effect against OIR may be mediated by the induction of insulin-like growth factor (IGF-1), a highly potent angiogenic molecule (Zeilbeck et al. 2016).

A negative regulator of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling, miR-184, is down-regulated in OIR, whereas *Fzd7*, its downstream target, is induced during neovascularization (Takahashi et al. 2015). Similarly, *Fzd7* endothelial deletion exerts a specific inhibitory effect on ischemia-induced retinal pathological neovascularization and EC proliferation (Fig. 2B; Bats et al. 2020).

Altered Wnt signaling is also associated with the exudative form of age-related macular degeneration (AMD). The development of abnormal VEGF-mediated choroidal neovascularization (CNV), under the activation of canonical Wnt pathway, leads to deterioration in central vision (Zhou et al. 2010). First associated with experimental laser-induced CNV (Hu et al. 2013), high levels of phospho-LRP6 and  $\beta$ -catenin were also identified in the endothelium of human choroidal tissues from AMD patients (Tuo et al. 2015; Lin et al. 2018). Dysregulation of circulating levels of Wnt modulators such as kallistatin, DKK1/3 and WIF-1, correlates with

the severity of CNV in AMD patients (Park et al. 2014; Tuo et al. 2015; Qiu et al. 2017). Mice deficient for *Wnt7a* and *Wnt7b* exhibit decreased CNV severity (Lin et al. 2018), whereas genetic deletion of *Vldlr*, a negative regulator of the Wnt pathway, recapitulates key features of wet AMD (Chen et al. 2007; Hu et al. 2008). Finally, recent studies have identified a novel causal link between dysregulation of the Wnt pathway, circadian rhythms, and extensive metabolic reprogramming in exudative AMD (Vallée et al. 2020). Altered Wnt signaling in retinopathies and AMD is shown in Figure 2C.

### Wnt AND BLOOD-BRAIN-BARRIER (BBB) VASCULATURE

The BBB structure creates a physical interface between blood and brain tissue (Bundgaard and Abbott 2008), contributing to the maintenance of a safe and specific microenvironment for proper synaptic functioning and neuronal connectivity (Zhao et al. 2015). BBB dysfunction and damage are increasingly recognized as potential contributors to the pathogenesis of a number of neurodegenerative diseases and of age-related cognitive decline including Alzheimer's disease (The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative et al. 2016; Nation et al. 2019; Sweeney et al. 2019).

The BBB is characterized by specialized brain microvascular ECs that display unique biological characteristics linked to their barrier function, namely, specialized tight junctions (Huber et al. 2001; Wolburg and Lippoldt 2002), a lack of fenestration, selective nutrient and efflux transporters, low rates of transcytosis (Ben-Zvi et al. 2014; Andreone et al. 2017; Yang et al. 2020), and low expression of leukocyte adhesion protein. The interactions between ECs, mural cells, and glial cells, forming the neurovascular unit (NVU) in the CNS (Abbott et al. 2006), are crucial for the formation and maintenance of the BBB (Armulik et al. 2010; Guérit et al. 2021; Heithoff et al. 2021) and the control of blood flow (Mishra et al. 2016).

The canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling has a major role during development postnatal brain angiogenesis and barrierogenesis (Liebner et al.

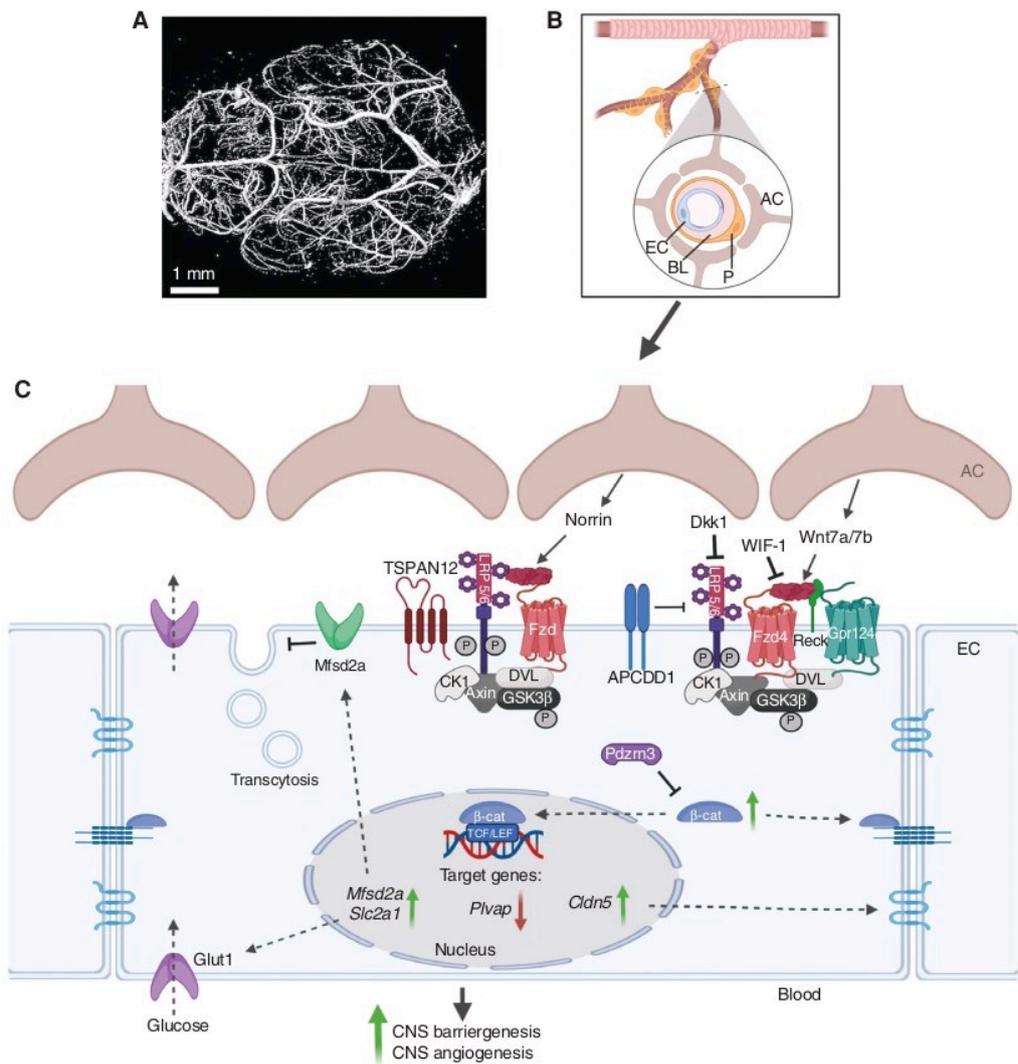
2008; Ye et al. 2009; Wang et al. 2012, 2018; Chang et al. 2017). Consistent with this concept, EC-specific deletion of *Ctnnb1* (gene-encoding  $\beta$ -catenin) leads to embryonic lethality as a result of hemorrhages in the CNS (Daneman et al. 2009). Activation of this pathway requires interaction of the ligands Wnt7a/b to Fzd4 receptors (Liebner et al. 2008; Wang et al. 2018) with the coreceptors LRP5/6 (Zhou et al. 2014b), in concert with the Wnt7-binding glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoprotein Reck (Chandana et al. 2010; Vanhollebeke et al. 2015; Eubelen et al. 2018) and the adhesion G-protein-coupled receptor 124 (encoded by *Gpr124*) (Kuhnert et al. 2010; Anderson et al. 2011; Cullen et al. 2011; Eubelen et al. 2018). The receptor complex Fzd4/LRP5/6/Reck/Gpr124 may confer a functional specificity for transducing the Wnt canonical pathway in brain ECs, forming a “Wnt-decoding module” (Eubelen et al. 2018; Vallon et al. 2018; Cho et al. 2019). In addition to Wnt7a/b, Norrin ligand is also involved in Wnt canonical signal induction in brain ECs (Zhou et al. 2014b; Wang et al. 2018). Norrin requires the presence of the coreceptor Tspan-12 (Junge et al. 2009). Both ligands, Wnt7a/b and Norrin, are produced by the neuroepithelium of the developing CNS, concomitant with vessel formation (Stenman et al. 2008; Ye et al. 2011). Their expression is restricted to specific CNS regions, implying local regulation of Wnt pathways. As a result, their combined depletion during development induces a severe leakage throughout the CNS (Zhou et al. 2014b; Wang et al. 2018).

The canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling plays an essential role in the final differentiation step of brain EC. Its activation up-regulates the expression of genes required to maintain EC barrier features such as *claudin 5* and *Slc2a1* (Glut1) extracellular matrix, whereas *Pvlp*, a component of fenestrated ECs, is repressed (Liebner et al. 2008; Daneman et al. 2009; Zhou et al. 2014b; Jensen et al. 2019). In the adult, understanding the role of endothelial canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in CNS under homeostatic and pathologic conditions remains an active field of research. Different groups report that active Wnt- $\beta$ -catenin signaling is detected in the adult

cerebrovasculature (Zhou et al. 2014b) and is required for maintaining BBB integrity (Tran et al. 2016). Mouse mutants with a conditional deletion of *Wls* in astrocytes (to repress Wnt ligand secretion), display edema and increased vascular tracer leakage in adult brain as well as low Wnt pathway activity in brain EC (Guérit et al. 2020; Wang et al. 2020). It is important to note that the regulation of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway has not been determined in the CNS vasculature. However, Wnt modulators such as APCDD1, are expressed throughout the CNS vasculature (Daneman et al. 2010) and have been involved in the maintenance of the retinal barrier (Mazzoni et al. 2017). Wnt antagonists such as *Wif1* and *Dkk1* were shown to disrupt the endothelial BBB phenotype in cerebral tumors (Fig. 3; Phoenix et al. 2016).

There is increasing evidence that the Wnt canonical pathway is essential to regulating the plasticity of brain ECs. For example, activation of the canonical Wnt pathway in choroid plexus ECs (capillaries that do not present BBB properties) partially promotes the acquisition of the EC barrier phenotype (Benz et al. 2019; Wang et al. 2019a). However, activation of Wnt canonical signaling did not appear to be sufficient to maintain the brain EC differentiated phenotype (Sabbagh and Nathans 2020). These data suggest that the maintenance of BBB properties may require activation of additional extrinsic environmental factors and signaling pathways other than Wnt canonical signaling. This concept is supported by a study reporting that activation of Wnt canonical signaling was not sufficient to induce a BBB-specific transcriptional profile in peripheral lung and liver EC (Munji et al. 2019).

While the canonical Wnt signaling pathway's role during BBB formation has been thoroughly investigated, its role in the pathophysiology of vascular cognitive impairment (VCI) remains to be fully elucidated. Dysregulation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling has been linked to vascular disorders in the CNS such as multiple sclerosis (Lengfeld et al. 2017), Alzheimer disease (Liu et al. 2014), and Huntington disease (Lim et al. 2017). Recently, He et al. evaluated the potential effect of Fzd7 in BBB protection



**Figure 3.** The Wnt signaling pathways in central nervous system (CNS) blood vessels. (A) Mouse brain vasculature was imaged with a high-resolution micro-computed tomography (CT) imaging system (Bruker MicroCT). Scale bar, 1 mm. (B) The blood-brain-barrier (BBB) creates a physical interface between blood and brain tissue. The interactions between endothelial cells (ECs), pericytes (Ps), and astrocytes (ACs) form the neurovascular unit in the CNS and are crucial for the formation and maintenance of the BBB. The BBB is characterized by microvascular ECs, which display unique properties linked to their barrier function, including specialized tight junctions, a lack of fenestration, a selective nutrient and efflux transporters system, and a low rate of transcytosis. (C) The canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling has a major role during CNS barrierogenesis and angiogenesis. Activation of the pathway involves the Norrin ligand produced by astrocytes and the downstream activation of a receptor complex formed by Fzd, LRP5/6, and Tetraspanin12. Alternatively, Wnt ligands (Wnt7a/b) secreted by astrocytes can also bind to the receptor complex consisting of Fzd and LRP5/6, which then recruits the DVL protein to the plasma membrane and induces  $\beta$ -catenin stabilization and its accumulation in the cytoplasm. The ubiquitin ligase PDZRN3 can block this process. Other receptors and coreceptors (probable G-protein-coupled receptor 124 [Gpr124] and reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs [Reck]) can enhance this Wnt-dependent signaling pathway, while the Wnt modulator adenomatosis polyposis coli down-regulated 1 protein (APCDD1) can block it. Inhibitors of Wnt ligands (Wnt inhibitory factor 1 [WIF-1]) or of coreceptors LRP5/6 (Dickkopf [Dkk1]) also contribute to the blocking of Wnt signaling. Stabilized  $\beta$ -catenin can then either contribute to the adherens junction at the plasma membrane or translocate to the nucleus and stimulate the transcription of target genes such as claudin 5 (*Cldn5*), which then contributes to the formation of tight junctions. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling also increases the expression of solute carrier family 2 member 1 (*Slc2a1*), which is a specialized glucose transporter encoding for Glut1 protein and induces the expression of major facilitator superfamily domain-containing protein 2A (*Mfsd2a*), which inhibits transcytosis. Created with BioRender.com. (BL) Basal lamina, (Plvap) plasmalemma vesicle-associated protein.

**Table 1.** Modulators of Wnt signaling pathways as potential innovative therapies for vascular diseases

Name	Type of compound/ molecule	Target	Tested in	Effects on endothelial cells (ECs) and/or angiogenesis	References
F4L5.13	Tetravalent antibody	Induces Fzd4 and LRP5 proximity	In vitro: in cultured EC In vivo: in postnatal vascularization of mouse retina and in OIR mouse models	Triggers $\beta$ -catenin signaling; promotes EC barrier function in vitro; restores retinal angiogenesis and barrier function in vivo; normalizes NV in OIR models	Chidiac et al. 2021
mAbFzd7	Monoclonal antibody	Specifically recognizes Fzd7 extracellular domain to block Fzd7 signaling	In vitro: in cultured EC In vivo: in OIR mouse models	Normalizes pathological NV in OIR models	Bats et al. 2020
Fzd7CRD	Soluble Fzd7 receptor	Traps Wnt molecules to block Fzd7 signaling	In vitro: in cultured EC In vivo: in OIR mouse models	Normalizes pathological NV in OIR models	Bats et al. 2020
1.99.25	Monoclonal antibody	Specifically recognizes Fzd4-CRD	In vitro: in cultured EC In vivo: in postnatal vascularization of mouse retina and in OIR mouse models; in <i>Vldlr</i> <sup>-/-</sup> KO mouse	Antagonizes Norrin- and WNT3A-induced $\beta$ -catenin signaling; disrupts physiological angiogenesis and induces loss of barrier function; inhibits pathological NV in OIR models; inhibits physiological and retinal pathological angiogenesis in <i>Vldlr</i> <sup>-/-</sup> KO mouse	Paes et al. 2011
miR-184	Liposome-based nanoparticles containing a microRNA-184 mimic	Decreases Fzd7 expression and LRP6 phosphorylation	In vivo: in OIR mouse models	Inhibits Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in the retina in OIR mice models	Takahashi et al. 2015
miR-150	MicroRNA-150 mimics	Down-regulates Fzd4 expression	In vitro: in cultured EC In vivo: in OIR mouse models; in CNV mouse models (models of AMD)	Suppresses EC proliferation, migration, and tube formation in vitro; suppresses pathological angiogenesis in OIR models	Liu et al. 2015

Continued

**Table 1.** *Continued*

Name	Type of compound/ molecule	Target	Tested in	Effects on endothelial cells (ECs) and/or angiogenesis	References
Mab2F1	Murine monoclonal antibody	Specifically recognizes E1E2 domain of LRP6	In vitro: in cultured EC In vivo: in rat models of OIR and in streptozotocin-induced diabetes models (models of DR); in CNV (mouse and rat) models	Inhibits $\beta$ -catenin signaling at the Wnt receptor level; inhibits migration and tube formation in vitro; reduces retinal pathological NV in OIR models; reduces retinal vascular leakage and inflammation in OIR and DR models and in <i>Vldlr</i> KO mouse; decreases vascular leakage from CNV lesions and reduces the neovascular area in laser-induced CNV models	Lee et al. 2012; Hu et al. 2013
H1L1	Humanized monoclonal antibody	Specifically recognizes E1E2 domain of LRP6	In vivo: in alkali burn-induced corneal NV rat models	Reduces inflammation and glial stress in corneal NV models	Qiu et al. 2018
Ab 2D10	Antibody	Interacts with human and mouse Tspan12 antigen; blocks interaction between Tspan12 and Fzd4	In vitro: in cultured EC In vivo: in postnatal vascularization of mouse retina; in OIR and <i>Vldlr</i> <sup>-/-</sup> KO mouse	Blocks $\beta$ -catenin signaling; inhibits migration and tube formation in vitro; delays physiological angiogenesis; attenuates retinal pathological NV in retinal vasoproliferative disease	Bucher et al. 2017
Dkk1	Recombinant protein	Binds to LRP5/6	In vivo: in <i>Vldlr</i> <sup>-/-</sup> KO mouse; in OIR mouse models; in streptozotocin-induced DR rat models	Inhibits Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and decreases VEGF in <i>Vldlr</i> <sup>-/-</sup> KO mouse; reduces retinal vascular area and neovascular tufts in OIR mouse models; ameliorates retinal inflammation, vascular leakage, and retinal NV in DR models	Chen et al. 2007, 2009; Tokunaga et al. 2013

*Continued*

Table 1. Continued

Name	Type of compound/ molecule	Target	Tested in	Effects on endothelial cells (ECs) and/or angiogenesis	References
Norrin	Recombinant protein	Activates Wnt/ $\beta$ -catenin signaling	In vitro: in cultured EC In vivo: in OIR models in mouse with ectopic overexpression of Norrin ( $\beta$ B1-Norrin and Rpe65-Norrin); in $Ndp^{y/-}$ mice; in streptozotocin-induced DR rat models	Increases proliferation, migration, and tube formation in vitro; Norrin mutant mice displayed increased physiological angiogenesis and decreased avascular area and pathological NV in OIR models; restores normal retinal angiogenesis in $Ndp^{y/-}$ mice; restores tight junction complex organization and blood-retinal-barrier (BRB) properties	Ohlmann et al. 2005, 2010; Tokunaga et al. 2013; Zeilbeck et al. 2016; Diaz-Coránguez et al. 2020
VLDLR	Nanoparticles containing a plasmid expressing the VLN extracellular domain	Inhibits phosphorylation of LRP6, $\beta$ -catenin accumulation, and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling	In vitro: in cultured EC In vivo: in OIR models, alkali burn-induced corneal NV models, and $Vldlr^{-/-}$ mouse models	Inhibits proliferation, migration, and tube formation in vitro; inhibits abnormal neovascularization (NV) in $Vldlr^{-/-}$ mice, in OIR, and corneal NV mouse models	Wang et al. 2015
Curcumin	Organic compound	Attenuates LRP6 phosphorylation, and inhibits $\beta$ -catenin nuclear accumulation	In vitro: in cultured EC In vivo: in a suture-induced corneal NV model ( $Lrp5^{-/-}$ mice)	Attenuates proliferation and disrupts tube formation in vitro; inhibits corneal NV	Zhang et al. 2017
PEDF	Recombinant protein	Binds to LRP6 at the E1E2 domain; blocks Wnt ligand-induced LRP6-Frizzled receptor dimerization	In vitro: in cultured EC In vivo: in OIR mouse models	Blocks Wnt/ $\beta$ -catenin signaling; inhibits migration and increases apoptosis in vitro; reduces ischemia-induced retinal NV in vivo	Longeras et al. 2012

Continued

**Table 1.** *Continued*

Name	Type of compound/ molecule	Target	Tested in	Effects on endothelial cells (ECs) and/or angiogenesis	References
PEDF-34	Amino terminal 34 PEDF peptide	Binds to LRP6 at the E1E2 domain; blocks Wnt ligand-induced LRP6- Frizzled receptor dimerization	In vivo: in OIR mouse models	Inhibits endothelial progenitor cells mobilization from bone marrow into blood in vascular retinal NV	Park et al. 2011
SERPINA3K	Adenoviral vectors encoding SERPINA3K	Binds to LRP6 at the extracellular domain	In vivo: in OIR models; in rat streptozotocin-induced DR models; in rat suture-induced corneal NV models	Blocks LRP6 dimerization with Fzd receptor in vitro; reduces NV, inflammation, and vascular leakage in OIR models; displays antifibrogenic activity; suppresses corneal NV and inflammation	Zhang et al. 2009, 2010a,b; Zhou et al. 2014a
Lithium	Chemical compound	Inhibits GSK3 $\beta$ ; blocks $\beta$ - catenin degradation	In vitro: in cultured EC In vivo: in <i>Lrp5</i> <sup>-/-</sup> KO mouse; in postnatal vascularization of mouse retina	Activates $\beta$ -catenin signaling; restores tube formation in vitro in LRP5-deficient EC; normalizes deeper layer vessels and ameliorates pathologic glomeruloid vessels in <i>Lrp5</i> <sup>-/-</sup> mice; rescues physiological angiogenesis in mice deleted for Fzd7 in EC	Peghaire et al. 2016; Wang et al. 2016
XAV-939	Chemical compound	Tankyrase 1/2 inhibitor that promotes axin2 stabilization	In vitro: in cultured EC	Promotes $\beta$ -catenin degradation; inhibits $\beta$ -catenin signaling	Huang et al. 2009
Melatonin	Chemical compound	Inhibits Wnt/ $\beta$ -catenin signaling	In vitro: in cultured EC in streptozotocin-induced DR rat models	Inhibits high glucose-induced proliferation, migration, invasion, tube formation, and inflammation in vitro; alleviates BRB disruption	Yan et al. 2021

*Continued*



**Table 1.** *Continued*

Name	Type of compound/ molecule	Target	Tested in	Effects on endothelial cells (ECs) and/or angiogenesis	References
TNP470	Chemical compound	A noncanonical Wnt5a inhibitor	In vitro: in cultured EC In vivo: in postnatal vascularization of mouse retina; in OIR mouse models	Blocks noncanonical Wnt signaling by targeting methionine aminopeptidase-2; increases vessel regression accompanied by decreased EC proliferation in retinal postnatal angiogenesis; decreases pathological NV in OIR models	Korn et al. 2014

(OIR) Oxygen-induced retinopathy, (DR) diabetic retinopathy, (AMD) age-related macular degeneration, (CNV) choroidal neovascularization.



M.-L. Bats et al.

after intracerebral hemorrhage. Frizzled-7 activation attenuates BBB permeability and neurological deficits after intracerebral hemorrhage through Dvl/ $\beta$ -catenin/WNT1-inducible signaling pathway protein 1 (WISP) pathway (He et al. 2021). We have proposed that a reactivation of the Wnt/PCP signals in brain EC during pathological ischemic events, such as stroke, would be deleterious in mouse models (Sewduth et al. 2017). Overexpressing *Pdzrn3* in EC exacerbates BBB hyperpermeability and accelerates cognitive decline and is correlated with decreased claudin5 expression in brain vessels under chronic cerebral hypoperfusion, whereas depletion of *Pdzrn3* is protective for BBB breakdown (Gueniot et al. 2021). Thus, there is great interest in delineating the signaling pathways that regulate the physiological functions of the BBB, and gaining insights into the pathological conditions causing loss or breakdown of the BBB (Fig. 3).

#### THERAPIES FOR VASCULAR DISEASES

A multiplicity of studies has recently highlighted the real potential to modulate different component of the Wnt/signaling pathways to treat vascular diseases, particularly ocular vascular disorders (Foulquier et al. 2018; Wang et al. 2019b). For the purpose of this review focusing on the Wnt/signaling pathways in ECs, only studies showing evidence of therapies' efficacy in ECs or in angiogenesis models, have been selected and shown in Table 1 and Figure 2.

#### CONCLUSION

Taken together, the data point toward a central role of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling during vascular development and homeostasis, where Wnt signaling is a hub integrating other crucial angiogenic intertwined pathways. With the advent of single-cell RNA-sequencing technology and the huge source of available transcriptomic data, one of the next exciting challenges will be to identify the precise combination of Wnt/Fzd partners that interact during physiological or pathological angiogenesis to identify new cell- or tissue-specific pathways.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by grants overseen by the French National Agency (ANR) as part of the "Investissements d'Avenir" Program ANR-18-RHUS-002 and as part of the "ERA-CVD" Program ANR-20-ECVD-0002-01 (ANR ENRICH).

#### REFERENCES

- Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. 2006. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* **7**: 41–53. doi:10.1038/nrn1824
- Acebron SP, Niehrs C. 2016.  $\beta$ -Catenin-independent roles of Wnt/LRP6 signaling. *Trends Cell Biol* **26**: 956–967. doi:10.1016/j.tcb.2016.07.009
- Anderson KD, Pan L, Yang XM, Hughes VC, Walls JR, Dominguez MG, Simmons MV, Burfeind P, Xue Y, Wei Y, et al. 2011. Angiogenic sprouting into neural tissue requires Gpr124, an orphan G protein-coupled receptor. *Proc Natl Acad Sci* **108**: 2807–2812. doi:10.1073/pnas.1019761108
- Andreone BJ, Chow BW, Tata A, Lacoste B, Ben-Zvi A, Bullock K, Deik AA, Ginty DD, Clish CB, Gu C. 2017. Blood-brain barrier permeability is regulated by lipid transport-dependent suppression of caveolae-mediated transcytosis. *Neuron* **94**: 581–594.e5. doi:10.1016/j.neuron.2017.03.043
- Armulik A, Genové G, Mäe M, Nisancioglu MH, Wallgard E, Niaudet C, He L, Norlin J, Lindblom P, Strittmatter K, et al. 2010. Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature* **468**: 557–561. doi:10.1038/nature09522
- Artus C, Glacial F, Ganeshamoorthy K, Ziegler N, Godet M, Guilbert T, Liebner S, Couraud PO. 2014. The Wnt/planar cell polarity signaling pathway contributes to the integrity of tight junctions in brain endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab* **34**: 433–440. doi:10.1038/jcbfm.2013.213
- Bänziger C, Soldini D, Schütt C, Zipperlen P, Hausmann G, Basler K. 2006. Wntless, a conserved membrane protein dedicated to the secretion of wnt proteins from signaling cells. *Cell* **125**: 509–522. doi:10.1016/j.cell.2006.02.049
- Bats ML, Bougaran P, Peghaire C, Gueniot F, Abelanet A, Chan H, Séguy C, Jeanningros S, Jaspard-Vinassa B, Couffignal T, et al. 2020. Therapies targeting Frizzled-7/ $\beta$ -catenin pathway prevent the development of pathological angiogenesis in an ischemic retinopathy model. *FASEB J* **34**: 1288–1303. doi:10.1096/fj.201901886R
- Beitia GJ, Rutherford TJ, Freund SMV, Pelham HR, Bienz M, Gammons MV. 2021. Regulation of Dishevelled DEP domain swapping by conserved phosphorylation sites. *Proc Natl Acad Sci* **118**: e2103258118. doi:10.1073/pnas.2103258118
- Ben F, Wichitnaowarat V, Lehmann M, Germano RF, Mihova D, Macas J, Adams RH, Taketo MM, Plate KH, Guérit S, et al. 2019. Low wnt/ $\beta$ -catenin signaling determines leaky vessels in the subfornical organ and affects water homeostasis in mice. *eLife* **8**: e43818. doi:10.7554/eLife.43818

- Ben-Zvi A, Lacoste B, Kur E, Andreone BJ, Maysar Y, Yan H, Gu C. 2014. Mfsd2a is critical for the formation and function of the blood–brain barrier. *Nature* **509**: 507–511. doi:10.1038/nature13324
- Berger W, Pol D, Warburg M, Gal A, Bleeker-Wagemakers L, De Silva H, Meindl A, Meitinger T, Cremers F, Ropers HH. 1992. Mutations in the candidate gene for Norrie disease. *Hum Mol Genet* **1**: 461–465. doi:10.1093/hmg/1.7.461
- Bilić J, Huang YL, Davidson G, Zimmermann T, Cruciat CM, Bienz M, Niehrs C. 2007. Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes Dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation. *Science* **316**: 1619–1622. doi:10.1126/science.1137065
- Birdsey GM, Shah AV, Dufton N, Reynolds LE, Osuna Almagro L, Yang Y, Aspalter IM, Khan ST, Mason JC, Dejana E, et al. 2015. The endothelial transcription factor ERG promotes vascular stability and growth through Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Dev Cell* **32**: 82–96. doi:10.1016/j.devcel.2014.11.016
- Black GC, Perveen R, Bonshek R, Cahill M, Clayton-Smith J, Lloyd IC, McLeod D. 1999. Coats' disease of the retina (unilateral retinal telangiectasis) caused by somatic mutation in the NDP gene: a role for norrin in retinal angiogenesis. *Hum Mol Genet* **8**: 2031–2035. doi:10.1093/hmg/8.11.2031
- Bucher F, Zhang D, Aguilar E, Sakimoto S, Diaz-Aguilar S, Rosenfeld M, Zha Z, Zhang H, Friedlander M, Yea K. 2017. Antibody-mediated inhibition of Tspan12 ameliorates vasoproliferative retinopathy through suppression of  $\beta$ -catenin signaling. *Circulation* **136**: 180–195.
- Bundgaard M, Abbott NJ. 2008. All vertebrates started out with a glial blood–brain barrier 4–500 million years ago. *Glia* **56**: 699–708. doi:10.1002/glia.20642
- Carvalho JR, Fortunato IC, Fonseca CG, Pezzarossa A, Barbacena P, Dominguez-Cejudo MA, Vasconcelos FF, Santos NC, Carvalho FA, Franco CA. 2019. Non-canonical Wnt signaling regulates junctional mechanocoupling during angiogenic collective cell migration. *eLife* **8**: e45853. doi:10.7554/eLife.45853
- Cavallo RA, Cox RT, Moline MM, Roose J, Polevoy GA, Clevers H, Peifer M, Bejsovec A. 1998. *Drosophila* Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature* **395**: 604–608. doi:10.1038/26982
- Chandana EP, Maeda Y, Ueda A, Kiyonari H, Oshima N, Yamamoto M, Kondo S, Oh J, Takahashi R, Yoshida Y, et al. 2010. Involvement of the Reck tumor suppressor protein in maternal and embryonic vascular remodeling in mice. *BMC Dev Biol* **10**: 84. doi:10.1186/1471-213X-10-84
- Chang J, Mancuso MR, Maier C, Liang X, Yuki K, Yang L, Kwong JW, Wang J, Rao V, Vallon M, et al. 2017. Gpr124 is essential for blood–brain barrier integrity in central nervous system disease. *Nat Med* **23**: 450–460. doi:10.1038/nm.4309
- Chen Y, Hu Y, Lu K, Flannery JG, Ma J. 2007. Very low density lipoprotein receptor, a negative regulator of the wnt signaling pathway and choroidal neovascularization. *J Biol Chem* **282**: 34420–34428. doi:10.1074/jbc.M611289200
- Chen Y, Hu Y, Zhou T, Zhou KK, Mott R, Wu M, Boulton M, Lyons TJ, Gao G, Ma J. 2009. Activation of the Wnt pathway plays a pathogenic role in diabetic retinopathy in humans and animal models. *Am J Pathol* **175**: 2676–2685.
- Chen J, Stahl A, Krah NM, Seaward MR, Dennison RJ, Sapienza P, Hua J, Hatton CJ, Juan AM, Aderman CM, et al. 2011. Wnt signaling mediates pathological vascular growth in proliferative retinopathy. *Circulation* **124**: 1871–1881. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.040337
- Chen J, Stahl A, Krah NM, Seaward MR, Joyal JS, Juan AM, Hatton CJ, Aderman CM, Dennison RJ, Willett KL, et al. 2012. Retinal expression of Wnt-pathway mediated genes in low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (Lrp5) knockout mice. *PLoS ONE* **7**: e30203. doi:10.1371/journal.pone.0030203
- Cheng C, Yeh J, Fan TP, Smith SK, Charnock-Jones DS. 2008. Wnt5a-mediated non-canonical Wnt signalling regulates human endothelial cell proliferation and migration. *Biochem Biophys Res Commun* **365**: 285–290. doi:10.1016/j.bbrc.2007.10.166
- Chidiac R, Abedin M, Macleod G, Yang A, Thibeault PE, Blazer LL, Adams JJ, Zhang L, Roehrich H, Jo H-N, et al. 2021. A Norrin/Wnt surrogate antibody stimulates endothelial cell barrier function and rescues retinopathy. *EMBO Mol Med* **13**: e13977.
- Cho C, Wang Y, Smallwood PM, Williams J, Nathans J. 2019. Molecular determinants in Frizzled, Reck, and Wnt7a for ligand-specific signaling in neurovascular development. *eLife* **8**: e47300. doi:10.7554/eLife.47300
- Choi SH, Kim H, Lee HG, Kim BK, Park JY, Kim DY, Ahn SH, Han KH, Kim SU. 2017. Dickkopf-1 induces angiogenesis via VEGF receptor 2 regulation independent of the Wnt signaling pathway. *Oncotarget* **8**: 58974–58984. doi:10.18632/oncotarget.19769
- Cirone P, Lin S, Griesbach HL, Zhang Y, Slusarski DC, Crews CM. 2008. A role for planar cell polarity signaling in angiogenesis. *Angiogenesis* **11**: 347–360. doi:10.1007/s10456-008-9116-2
- Corada M, Nyqvist D, Orsenigo F, Caprini A, Giampietro C, Taketo MM, Iruela-Arispe ML, Adams RH, Dejana E. 2010. The Wnt/ $\beta$ -catenin pathway modulates vascular remodeling and specification by upregulating Dll4/Notch signaling. *Dev Cell* **18**: 938–949. doi:10.1016/j.devcel.2010.05.006
- Corada M, Orsenigo F, Morini MF, Pitulescu ME, Bhat G, Nyqvist D, Breviario F, Conti V, Briot A, Iruela-Arispe ML, et al. 2013. Sox17 is indispensable for acquisition and maintenance of arterial identity. *Nat Commun* **4**: 2609. doi:10.1038/ncomms3609
- Corada M, Orsenigo F, Bhat GP, Conze LL, Breviario F, Cunha SI, Claesson-Welsh L, Beznoussenko GV, Mironov AA, Bacigaluppi M, et al. 2019. Fine-tuning of Sox17 and canonical wnt coordinates the permeability properties of the blood–brain barrier. *Circ Res* **124**: 511–525. doi:10.1161/CIRCRESAHA.118.313316
- Courtwright A, Siamakpour-Reihani S, Arbiser JL, Banet N, Hilliard E, Fried L, Livasy C, Ketelsen D, Nepal DB, Perou CM, et al. 2009. Secreted Frizzled-related protein 2 stimulates angiogenesis via a calcineurin/NFAT signaling pathway. *Cancer Res* **69**: 4621–4628. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3402



M.-L. Bats et al.

- Cullen M, Elzarrad MK, Seaman S, Zudaire E, Stevens J, Yang MY, Li X, Chaudhary A, Xu L, Hilton MB, et al. 2011. GPR124, an orphan G protein-coupled receptor, is required for CNS-specific vascularization and establishment of the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci* **108**: 5759–5764. doi:10.1073/pnas.1017192108
- Daneman R, Agalliu D, Zhou L, Kuhnert F, Kuo CJ, Barres BA. 2009. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling is required for CNS, but not non-CNS, angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci* **106**: 641–646. doi:10.1073/pnas.0805165106
- Daneman R, Zhou L, Agalliu D, Cahoy JD, Kaushal A, Barres BA. 2010. The mouse blood-brain barrier transcriptome: a new resource for understanding the development and function of brain endothelial cells. *PLoS ONE* **5**: e13741. doi:10.1371/journal.pone.0013741
- Davidson G, Wu W, Shen J, Bilic J, Fenger U, Stanek P, Glinka A, Niehrs C. 2005. Casein kinase 1  $\gamma$  couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature* **438**: 867–872. doi:10.1038/nature04170
- Descamps B, Sewduth R, Ferreira Tojais N, Jaspard B, Reynaud A, Sohet F, Lacolley P, Allières C, Lamazière J-MD, Moreau C, et al. 2012. Frizzled 4 regulates arterial network organization through noncanonical wnt/planar cell polarity signaling. *Circ Res* **110**: 47–58. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.250936
- Diaz-Coránguez M, Lin C-M, Liebner S, Antonetti DA. 2020. Norrin restores blood-retinal barrier properties after vascular endothelial growth factor-induced permeability. *J Biol Chem* **295**: 4647–4660.
- Drenser KA. 2016. Wnt signaling pathway in retinal vascularization. *Eye Brain* **8**: 141–146. doi:10.2147/EB.S94452
- Dufourcq P, Descamps B, Tojais NF, Leroux L, Osés P, Daret D, Moreau C, Lamazière JMD, Couffignal T, Duplâa C. 2008. Secreted Frizzled-related protein-1 enhances mesenchymal stem cell function in angiogenesis and contributes to neovessel maturation. *Stem Cells* **26**: 2991–3001. doi:10.1634/stemcells.2008-0372
- Eubelen M, Bostaille N, Cabochette P, Gauquier A, Tebabi P, Dumitru AC, Koehler M, Gut P, Alsteens D, Stainier DYS, et al. 2018. A molecular mechanism for Wnt ligand-specific signaling. *Science* **361**: eaat1178. doi:10.1126/science.aat1178
- Ewen-Campen B, Comyn T, Vogt E, Perrimon N. 2020. No evidence that wnt ligands are required for planar cell polarity in *Drosophila*. *Cell Rep* **32**: 108121. doi:10.1016/j.celrep.2020.108121
- Ezan J. 2004. Frz/sFRP-1, a secreted antagonist of the Wnt-Frizzled pathway, controls vascular cell proliferation in vitro and in vivo. *Cardiovasc Res* **63**: 731–738. doi:10.1016/j.cardiores.2004.05.006
- Ferrara N. 2009. Vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**: 789–791. doi:10.1161/ATVBAHA.108.179663
- Foulquier S, Daskalopoulos EP, Lluri G, Hermans KCM, Deb A, Blankesteijn WM. 2018. WNT signaling in cardiac and vascular disease. *Pharmacol Rev* **70**: 68–141. doi:10.1124/pr.117.013896
- Franco CA, Jones ML, Bernabeu MO, Geudens I, Mathivet T, Rosa A, Lopes FM, Lima AP, Ragab A, Collins RT, et al. 2015. Dynamic endothelial cell rearrangements drive developmental vessel regression. *PLoS Biol* **13**: e1002125. doi:10.1371/journal.pbio.1002125
- Franco CA, Jones ML, Bernabeu MO, Vion AC, Barbacena P, Fan J, Mathivet T, Fonseca CG, Ragab A, Yamaguchi TP, et al. 2016. Non-canonical Wnt signalling modulates the endothelial shear stress flow sensor in vascular remodeling. *eLife* **5**: e07727. doi:10.7554/eLife.07727
- Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, Jeltsch M, Mitchell C, Alitalo K, Shima D, et al. 2003. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol* **161**: 1163–1177. doi:10.1083/jcb.200302047
- Gilmour DF. 2015. Familial exudative vitreoretinopathy and related retinopathies. *Eye (Lond)* **29**: 1–14. doi:10.1038/eye.2014.70
- Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM, Wang H, Cundy T, Glorieux FH, Lev D, et al. 2001. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell* **107**: 513–523. doi:10.1016/S0092-8674(01)00571-2
- Goodwin AM, Sullivan KM, D'Amore PA. 2006. Cultured endothelial cells display endogenous activation of the canonical Wnt signaling pathway and express multiple ligands, receptors, and secreted modulators of Wnt signaling. *Dev Dyn* **235**: 3110–3120. doi:10.1002/dvdy.20939
- Gordon MD, Nusse R. 2006. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem* **281**: 22429–22433. doi:10.1074/jbc.R600015200
- Gore AV, Swift MR, Cha YR, Lo B, McKinney MC, Li W, Castranova D, Davis A, Mukoyama Y, Weinstein BM. 2011. Rspo1/Wnt signaling promotes angiogenesis via Vegf/Vegfr3. *Development* **138**: 4875–4886. doi:10.1242/dev.068460
- Grumolato L, Liu G, Mong P, Mudbhary R, Biswas R, Arroyave R, Vijayakumar S, Economides AN, Aaronson SA. 2010. Canonical and noncanonical Wnts use a common mechanism to activate completely unrelated coreceptors. *Genes Dev* **24**: 2517–2530. doi:10.1101/gad.1957710
- Gueniot F, Rubin S, Bougaran P, Abelanet A, Morel J, Bon-tempi B, Proust C, Dufourcq P, Couffignal T, Duplâa C. 2021. Targeting *Pdzrn3* maintains adult blood-brain barrier and central nervous system homeostasis. *J Cereb Blood Flow Metab*. doi:10.1177/0271678X211048981
- Guérit S, Fidan E, Macas J, Czupalla CJ, Figueiredo R, Vijikumar A, Yalcin BH, Thom S, Winter P, Gerhardt H, et al. 2020. Astrocyte-derived Wnt growth factors are required for endothelial blood-brain barrier maintenance. *Prog Neurobiol* **199**: 101937.
- Guérit S, Fidan E, Macas J, Czupalla CJ, Figueiredo R, Vijikumar A, Yalcin BH, Thom S, Winter P, Gerhardt H, et al. 2021. Astrocyte-derived Wnt growth factors are required for endothelial blood-brain barrier maintenance. *Prog Neurobiol* **199**: 101937. doi:10.1016/j.pneurobio.2020.101937
- Guruharsha KG, Kankel MW, Artavanis-Tsakonas S. 2012. The Notch signalling system: recent insights into the complexity of a conserved pathway. *Nat Rev Genet* **13**: 654–666. doi:10.1038/nrg3272
- He W, Lu Q, Sherchan P, Huang L, Hu X, Zhang JH, Dai H, Tang J. 2021. Activation of Frizzled-7 attenuates blood-brain barrier disruption through Dvl/ $\beta$ -catenin/WISP1 signaling pathway after intracerebral hemorrhage in mice. *Fluids Barriers CNS* **18**: 44.



- Heithoff BP, George KK, Phares AN, Zuidhoek IA, Munoz-Ballester C, Robel S. 2021. Astrocytes are necessary for blood-brain barrier maintenance in the adult mouse brain. *Glia* **69**: 436–472. doi:10.1002/glia.23908
- Hikita T, Mirzapourshahi F, Barbacena P, Riddell M, Pasha A, Li M, Kawamura T, Brandes RP, Hirose T, Ohno S, et al. 2018. PAR-3 controls endothelial planar polarity and vascular inflammation under laminar flow. *EMBO Rep* **19**: e45253. doi:10.15252/embr.201745253
- Hu W, Jiang A, Liang J, Meng H, Chang B, Gao H, Qiao X. 2008. Expression of VLDLR in the retina and evolution of subretinal neovascularization in the knockout mouse model's retinal angiomas proliferation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **49**: 407–415. doi:10.1167/iovs.07-0870
- Hu Y, Chen Y, Lin M, Lee K, Mott RA, Ma J. 2013. Pathogenic role of the Wnt signaling pathway activation in laser-induced choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **54**: 141–154. doi:10.1167/iovs.12-10281
- Huang S-MA, Mishina YM, Liu S, Cheung A, Stegmeier F, Michaud GA, Charlat O, Wiellette E, Zhang Y, Wiessner S, et al. 2009. Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature* **461**: 614–620.
- Huber JD, Egleton RD, Davis TP. 2001. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. *Trends Neurosci* **24**: 719–725. doi:10.1016/S0166-2236(00)02004-X
- Iruela-Arispe ML, Davis GE. 2009. Cellular and molecular mechanisms of vascular lumen formation. *Dev Cell* **16**: 222–231. doi:10.1016/j.devcel.2009.01.013
- Jakobsson L, Franco CA, Bentley K, Collins RT, Ponsioen B, Aspalter IM, Rosewell I, Busse M, Thurston G, Medvinsky A, et al. 2010. Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting. *Nat Cell Biol* **12**: 943–953. doi:10.1038/ncb2103
- Janda CY, Waghay D, Levin AM, Thomas C, Garcia KC. 2012. Structural basis of wnt recognition by Frizzled. *Science* **337**: 59–64. doi:10.1126/science.1222879
- Jensen LD, Hot B, Ramsköld D, Germano RFV, Yokota C, Giatrellis S, Lauschke VM, Hubmacher D, Li MX, Hupe M, et al. 2019. Disruption of the extracellular matrix progressively impairs central nervous system vascular maturation downstream of  $\beta$ -catenin signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **39**: 1432–1447. doi:10.1161/ATVBAHA.119.312388
- Jia L-Y, Ma K. 2021. Novel Norrie disease gene mutations in Chinese patients with familial exudative vitreoretinopathy. *BMC Ophthalmol* **21**: 84. doi:10.1186/s12886-021-01852-3
- Junge HJ, Yang S, Burton JB, Paes K, Shu X, French DM, Costa M, Rice DS, Ye W. 2009. TSPAN12 regulates retinal vascular development by promoting Norrin- but not wnt-induced FZD4/ $\beta$ -catenin signaling. *Cell* **139**: 299–311. doi:10.1016/j.cell.2009.07.048
- Kania KD, Wijesuriya HC, Hladky SB, Barrand MA. 2011.  $\beta$  Amyloid effects on expression of multidrug efflux transporters in brain endothelial cells. *Brain Res* **1418**: 1–11. doi:10.1016/j.brainres.2011.08.044
- Kato M, Patel MS, Levasseur R, Lobov I, Chang BHJ, Glass DA, Hartmann C, Li L, Hwang TH, Brayton CF, et al. 2002. Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *J Cell Biol* **157**: 303–314. doi:10.1083/jcb.200201089
- Kazanskaya O, Ohkawara B, Heroult M, Wu W, Maltry N, Augustin HG, Niehrs C. 2008. The Wnt signaling regulator R-spondin 3 promotes angioblast and vascular development. *Development* **135**: 3655–3664. doi:10.1242/dev.027284
- Konopelski Snavelly SE, Susman MW, Kunz RC, Tan J, Srinivasan S, Cohen MD, Okada K, Lamb H, Choi SS, Karuna EP, et al. 2021. Proteomic analysis identifies the E3 ubiquitin ligase Pdzrn3 as a regulatory target of Wnt5a-Ror signaling. *Proc Natl Acad Sci* **118**: e2104944118. doi:10.1073/pnas.2104944118
- Korn C, Augustin HG. 2015. Mechanisms of vessel pruning and regression. *Dev Cell* **34**: 5–17. doi:10.1016/j.devcel.2015.06.004
- Korn C, Scholz B, Hu J, Srivastava K, Wojtarowicz J, Arnsperger T, Adams RH, Boutros M, Augustin HG, Augustin I. 2014. Endothelial cell-derived non-canonical Wnt ligands control vascular pruning in angiogenesis. *Development* **141**: 1757–1766. doi:10.1242/dev.104422
- Kuhnert F, Mancuso MR, Shamloo A, Wang HT, Choksi V, Florek M, Su H, Fruttiger M, Young WL, Heilshorn SC, et al. 2010. Essential regulation of CNS angiogenesis by the orphan G protein-coupled receptor GPR124. *Science* **330**: 985–989. doi:10.1126/science.1196554
- Lai MB, Zhang C, Shi J, Johnson V, Khandan L, McVey J, Klymkowsky MW, Chen Z, Junge HJ. 2017. TSPAN12 is a Norrin co-receptor that amplifies Frizzled4 ligand selectivity and signaling. *Cell Rep* **19**: 2809–2822. doi:10.1016/j.celrep.2017.06.004
- Lammert E, Axnick J. 2012. Vascular lumen formation. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**: a006619. doi:10.1101/cshperspect.a006619
- Lee K, Hu Y, Ding L, Chen Y, Takahashi Y, Mott R, Ma J-X. 2012. Therapeutic potential of a monoclonal antibody blocking the Wnt pathway in diabetic retinopathy. *Diabetes* **61**: 2948–2957.
- Lee S, Elaskandrany M, Lau LF, Lazzaro D, Grant MB, Chaqour B. 2017. Interplay between CCN1 and Wnt5a in endothelial cells and pericytes determines the angiogenic outcome in a model of ischemic retinopathy. *Sci Rep* **7**: 1405. doi:10.1038/s41598-017-01585-8
- Lengfeld JE, Lutz SE, Smith JR, Diaconu C, Scott C, Kofman SB, Choi C, Walsh CM, Raine CS, Agalliu I, et al. 2017. Endothelial Wnt/ $\beta$ -catenin signaling reduces immune cell infiltration in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci* **114**: E1168–E1177. doi:10.1073/pnas.1609905114
- Liebner S, Corada M, Bangsow T, Babbage J, Taddei A, Czupalla CJ, Reis M, Felici A, Wolburg H, Fruttiger M, et al. 2008. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling controls development of the blood-brain barrier. *J Cell Biol* **183**: 409–417. doi:10.1083/jcb.200806024
- Lim JC, Kania KD, Wijesuriya H, Chawla S, Sethi JK, Pulaski L, Romero IA, Couraud PO, Weksler BB, Hladky SB, et al. 2008. Activation of  $\beta$ -catenin signalling by GSK-3 inhibition increases p-glycoprotein expression in brain endothelial cells. *J Neurochem* **106**: 1855–1865.
- Lim RG, Quan C, Reyes-Ortiz AM, Lutz SE, Kedaigle AJ, Gipson TA, Wu J, Vatine GD, Stocksdale J, Casale MS, et al. 2017. Huntington's disease iPSC-derived brain microvascular endothelial cells reveal wnt-mediated angiogenic



M.-L. Bats et al.

- and blood-brain barrier deficits. *Cell Rep* **19**: 1365–1377. doi:10.1016/j.celrep.2017.04.021
- Lin JB, Sene A, Wiley LA, Santeford A, Nudleman E, Nakamura R, Lin JB, Moolani HV, Apte RS. 2018. WNT7A/B promote choroidal neovascularization. *Exp Eye Res* **174**: 107–112. doi:10.1016/j.exer.2018.05.033
- Liu C, Nathans J. 2008. An essential role for frizzled 5 in mammalian ocular development. *Development* **135**: 3567–3576. doi:10.1242/dev.028076
- Liu H, Mohamed O, Dufort D, Wallace VA. 2003. Characterization of Wnt signaling components and activation of the Wnt canonical pathway in the murine retina. *Dev Dyn* **227**: 323–334. doi:10.1002/dvdy.10315
- Liu L, Wan W, Xia S, Kalionis B, Li Y. 2014. Dysfunctional Wnt/ $\beta$ -catenin signaling contributes to blood-brain barrier breakdown in Alzheimer's disease. *Neurochem Int* **75**: 19–25. doi:10.1016/j.neuint.2014.05.004
- Liu C-H, Sun Y, Li J, Gong Y, Tian KT, Evans LP, Morss PC, Fredrick TW, Saba NJ, Chen J. 2015. Endothelial microRNA-150 is an intrinsic suppressor of pathologic ocular neovascularization. *Proc Natl Acad Sci* **112**: 12163–12168.
- Lobov IB, Rao S, Carroll TJ, Vallance JE, Ito M, Ondr JK, Kurup S, Glass DA, Patel MS, Shu W, et al. 2005. WNT7b mediates macrophage-induced programmed cell death in patterning of the vasculature. *Nature* **437**: 417–421. doi:10.1038/nature03928
- Longeras R, Farjo K, Ihnat M, Ma J-X. 2012. A PEDF-derived peptide inhibits retinal neovascularization and blocks mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Exp Diabetes Res* **2012**: 518426.
- Mack JJ, Iruela-Arispe ML. 2018. NOTCH regulation of the endothelial cell phenotype. *Curr Opin Hematol* **25**: 212–218. doi:10.1097/MOH.0000000000000425
- Martowicz A, Trusohamn M, Jensen N, Wisniewska-Kruk J, Corada M, Ning FC, Kele J, Dejana E, Nyqvist D. 2019. Endothelial  $\beta$ -catenin signaling supports postnatal brain and retinal angiogenesis by promoting sprouting, tip cell formation, and VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor) 2 expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **39**: 2273–2288. doi:10.1161/ATVBAHA.119.312749
- Masckauchan TNH, Agalliu D, Vorontchikhina M, Ahn A, Parmalee NL, Li CM, Khoo A, Tycko B, Brown AMC, Kitajewski J. 2006. Wnt5a signaling induces proliferation and survival of endothelial cells in vitro and expression of MMP-1 and tie-2. *Mol Biol Cell* **17**: 5163–5172. doi:10.1091/mbc.e06-04-0320
- Mazzoni J, Smith JR, Shahriar S, Cutforth T, Ceja B, Agalliu D. 2017. The wnt inhibitor Apcdd1 coordinates vascular remodeling and barrier maturation of retinal blood vessels. *Neuron* **96**: 1055–1069.e6. doi:10.1016/j.neuron.2017.10.025
- Michaelis UR, Chavakis E, Kruse C, Jungblut B, Kaluza D, Wandzioch K, Manavski Y, Heide H, Santoni MJ, Potente M, et al. 2013. The polarity protein Scrib is essential for directed endothelial cell migration. *Circ Res* **112**: 924–934. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.300592
- Min JK, Park H, Choi HJ, Kim Y, Pyun BJ, Agrawal V, Song BW, Jeon J, Maeng YS, Rho SS, et al. 2011. The WNT antagonist Dickkopf2 promotes angiogenesis in rodent and human endothelial cells. *J Clin Invest* **121**: 1882–1893. doi:10.1172/JCI42556
- Mishra A, Reynolds JP, Chen Y, Gourine AV, Rusakov DA, Attwell D. 2016. Astrocytes mediate neurovascular signaling to capillary pericytes but not to arterioles. *Nat Neurosci* **19**: 1619–1627. doi:10.1038/nn.4428
- Montcouquiol M, Rachel RA, Lanford PJ, Copeland NG, Jenkins NA, Kelley MW. 2003. Identification of Vangl2 and Scrb1 as planar polarity genes in mammals. *Nature* **423**: 173–177. doi:10.1038/nature01618
- Munji RN, Soung AL, Weiner GA, Sohet F, Semple BD, Trivedi A, Gimlin K, Kotoda M, Korai M, Aydin S, et al. 2019. Profiling the mouse brain endothelial transcriptome in health and disease models reveals a core blood-brain barrier dysfunction module. *Nat Neurosci* **22**: 1892–1902. doi:10.1038/s41593-019-0497-x
- Nation DA, Sweeney MD, Montagne A, Sagare AP, D'Orazio LM, Pachicano M, Sepeshband F, Nelson AR, Buennagel DP, Harrington MG, et al. 2019. Blood-brain barrier breakdown is an early biomarker of human cognitive dysfunction. *Nat Med* **25**: 270–276. doi:10.1038/s41591-018-0297-y
- Ngo MH, Borowska-Fielding J, Heathcote G, Nejat S, Kelly ME, McMaster CR, Robitaille JM. 2016. Fzd4 haploinsufficiency delays retinal revascularization in the mouse model of oxygen induced retinopathy. *PLoS ONE* **11**: e0158320. doi:10.1371/journal.pone.0158320
- Niehrs C. 2006. Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. *Oncogene* **25**: 7469–7481. doi:10.1038/sj.onc.1210054
- Nusse R, Clevers H. 2017. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities. *Cell* **169**: 985–999. doi:10.1016/j.cell.2017.05.016
- Ohlmann A, Scholz M, Goldwich A, Chauhan BK, Hudl K, Ohlmann AV, Zrenner E, Berger W, Cvekl A, Seeliger MW, et al. 2005. Ectopic Norrin induces growth of ocular capillaries and restores normal retinal angiogenesis in Norrie disease mutant mice. *J Neurosci* **25**: 1701–1710.
- Ohlmann A, Seitz R, Braunger B, Seitz D, Bösl MR, Tamm ER. 2010. Norrin promotes vascular regrowth after oxygen-induced retinal vessel loss and suppresses retinopathy in mice. *J Neurosci* **30**: 183–193.
- Paes KT, Wang E, Henze K, Vogel P, Read R, Suwanichkul A, Kirkpatrick LL, Potter D, Newhouse MM, Rice DS. 2011. Frizzled 4 is required for retinal angiogenesis and maintenance of the blood-retina barrier. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **52**: 6452–6461.
- Park K, Lee K, Zhang B, Zhou T, He X, Gao G, Murray AR, Ma J-X. 2011. Identification of a novel inhibitor of the canonical Wnt pathway. *Mol Cell Biol* **31**: 3038–3051.
- Park KH, Choi AJ, Yoon J, Lim D, Woo SJ, Park SJ, Kim HC, Chung H. 2014. Wnt modulators in the aqueous humor are associated with outer retinal damage severity in patients with neovascular age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **55**: 5522–5530. doi:10.1167/iovs.14-14566
- Peghaire C, Bats ML, Sewduth R, Jeanningros S, Jaspard B, Couffignal T, Duplâa C, Dufourcq P. 2016. Fzd7 (Frizzled-7) expressed by endothelial cells controls blood vessel formation through Wnt/ $\beta$ -catenin canonical signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **36**: 2369–2380. doi:10.1161/ATVBAHA.116.307926
- Pelton JC, Wright CE, Leitges M, Bautch VL. 2014. Multiple endothelial cells constitute the tip of developing blood



- vessels and polarize to promote lumen formation. *Development* **141**: 4121–4126. doi:10.1242/dev.110296
- Pendás-Franco N, García JM, Peña C, Valle N, Pálmer HG, Heinäniemi M, Carlberg C, Jiménez B, Bonilla F, Muñoz A, et al. 2008. DICKKOPF-4 is induced by TCF/ $\beta$ -catenin and upregulated in human colon cancer, promotes tumour cell invasion and angiogenesis and is repressed by  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Oncogene* **27**: 4467–4477. doi:10.1038/onc.2008.88
- Phng LK, Potente M, Leslie JD, Babbage J, Nyqvist D, Lobov I, Ondr JK, Rao S, Lang RA, Thurston G, et al. 2009. Nrarp coordinates endothelial notch and wnt signaling to control vessel density in angiogenesis. *Dev Cell* **16**: 70–82. doi:10.1016/j.devcel.2008.12.009
- Phoenix TN, Patmore DM, Boop S, Boulos N, Jacus MO, Patel YT, Roussel MF, Finkelstein D, Goumnerova L, Perreault S, et al. 2016. Medulloblastoma genotype dictates blood brain barrier phenotype. *Cancer Cell* **29**: 508–522. doi:10.1016/j.ccell.2016.03.002
- Qiu F, He J, Zhou Y, Bai X, Wu G, Wang X, Liu Z, Chen Y, Ma JX, Liu Z. 2014. Plasma and vitreous fluid levels of Dickkopf-1 in patients with diabetic retinopathy. *Eye (Lond)* **28**: 402–409. doi:10.1038/eye.2013.229
- Qiu F, Liu Z, Zhou Y, He J, Gong S, Bai X, Zeng Y, Liu Z, Ma JX. 2017. Decreased circulating levels of Dickkopf-1 in patients with exudative age-related macular degeneration. *Sci Rep* **7**: 1263. doi:10.1038/s41598-017-01119-2
- Qiu F, Shin Y, Chen D, Cheng R, Chen Q, Zhou K, Larrick JW, Mendelson AR, Ma J-X. 2018. Anti-angiogenic effect of a humanized antibody blocking the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *Microvasc Res* **119**: 29–37.
- Ramachandran I, Thavathiru E, Ramalingam S, Natarajan G, Mills WK, Benbrook DM, Zuna R, Lightfoot S, Reis A, Anant S, et al. 2012. Wnt inhibitory factor 1 induces apoptosis and inhibits cervical cancer growth, invasion and angiogenesis in vivo. *Oncogene* **31**: 2725–2737. doi:10.1038/onc.2011.455
- Rao TP, Kühl M. 2010. An updated overview on wnt signaling pathways: a prelude for more. *Circ Res* **106**: 1798–1806. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.219840
- Reis M, Czupalla CJ, Ziegler N, Devraj K, Zinke J, Seidel S, Heck R, Thom S, Macas J, Bockamp E, et al. 2012. Endothelial Wnt/ $\beta$ -catenin signaling inhibits glioma angiogenesis and normalizes tumor blood vessels by inducing PDGF-B expression. *J Exp Med* **209**: 1611–1627. doi:10.1084/jem.20111580
- Richter M, Gottanka J, May CA, Welge-Lüssen U, Berger W, Lütjen-Drecoll E. 1998. Retinal vasculature changes in Norrie disease mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **39**: 2450–2457.
- Rivera JC, Dabouz R, Noueihed B, Omri S, Tahiri H, Chemtob S. 2017. Ischemic retinopathies: oxidative stress and inflammation. *Oxid Med Cell Longev* **2017**: 3940241. doi:10.1155/2017/3940241
- Robitaille JM, Zheng B, Wallace K, Beis MJ, Tatlidil C, Yang J, Sheidow TG, Siebert L, Levin AV, Lam WC, et al. 2011. The role of Frizzled-4 mutations in familial exudative vitreoretinopathy and Coats disease. *Br J Ophthalmol* **95**: 574–579. doi:10.1136/bjo.2010.190116
- Roca C, Adams RH. 2007. Regulation of vascular morphogenesis by Notch signaling. *Genes Dev* **21**: 2511–2524. doi:10.1101/gad.1589207
- Rogers KA, McKee NH, Kalnins VI. 1985. Preferential orientation of centrioles toward the heart in endothelial cells of major blood vessels is reestablished after reversal of a segment. *Proc Natl Acad Sci* **82**: 3272–3276. doi:10.1073/pnas.82.10.3272
- Ruhrberg C, Gerhardt H, Golding M, Watson R, Ioannidou S, Fujisawa H, Betsholtz C, Shima DT. 2002. Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis. *Genes Dev* **16**: 2684–2698. doi:10.1101/gad.242002
- Sabbagh MF, Nathans J. 2020. A genome-wide view of the de-differentiation of central nervous system endothelial cells in culture. *eLife* **9**: e51276. doi:10.7554/eLife.51276
- Sakanaka C, Weiss JB, Williams LT. 1998. Bridging of  $\beta$ -catenin and glycogen synthase kinase-3 $\beta$  by Axin and inhibition of  $\beta$ -catenin-mediated transcription. *Proc Natl Acad Sci* **95**: 3020–3023. doi:10.1073/pnas.95.6.3020
- Scholz B, Korn C, Wojtarowicz J, Mogler C, Augustin I, Boutros M, Niehrs C, Augustin HG. 2016. Endothelial RSPO3 controls vascular stability and pruning through non-canonical WNT/ $Ca^{2+}$ /NFAT signaling. *Dev Cell* **36**: 79–93. doi:10.1016/j.devcel.2015.12.015
- Schwarz-Romond T, Fiedler M, Shibata N, Butler PJG, Kikuchi A, Higuchi Y, Bienz M. 2007. The DIX domain of Dishevelled confers Wnt signaling by dynamic polymerization. *Nat Struct Mol Biol* **14**: 484–492. doi:10.1038/nsmb1247
- Sen M, Shields CL, Honavar SG, Shields JA. 2019. Coats disease: an overview of classification, management and outcomes. *Indian J Ophthalmol* **67**: 763–771. doi:10.4103/ijo.IJO\_841\_19
- Sewduth RN, Jaspard-Vinassa B, Peghaire C, Guillaibert A, Franzl N, Larrieu-Lahargue F, Moreau C, Fruttiger M, Dufourcq P, Couffinhal T, et al. 2014. The ubiquitin ligase PDZRN3 is required for vascular morphogenesis through Wnt/planar cell polarity signalling. *Nat Commun* **5**: 4832. doi:10.1038/ncomms5832
- Sewduth RN, Kovacic H, Jaspard-Vinassa B, Jecko V, Wavasseur T, Fritsch N, Pernot M, Jeaningros S, Roux E, Dufourcq P, et al. 2017. PDZRN3 destabilizes endothelial cell-cell junctions through a PKC $\zeta$ -containing polarity complex to increase vascular permeability. *Sci Signal* **10**: eaag3209. doi:10.1126/scisignal.aag3209
- Shah AV, Birdsey GM, Peghaire C, Pitulescu ME, Dufton NP, Yang Y, Weinberg I, Osuna Almagro L, Payne I, Mason JC, et al. 2017. The endothelial transcription factor ERG mediates Angiopoietin-1-dependent control of Notch signalling and vascular stability. *Nat Commun* **8**: 16002. doi:10.1038/ncomms16002
- Simons M, Mlodzik M. 2008. Planar cell polarity signaling: from fly development to human disease. *Annu Rev Genet* **42**: 517–540. doi:10.1146/annurev.genet.42.110807.091432
- Skurk C, Maatz H, Rocnik E, Bialik A, Force T, Walsh K. 2005. Glycogen-synthase kinase3 $\beta$ / $\beta$ -catenin axis promotes angiogenesis through activation of vascular endothelial growth factor signaling in endothelial cells. *Circ Res* **96**: 308–318. doi:10.1161/01.RES.0000156273.30274.f7
- Stahl A, Connor KM, Sapieha P, Chen J, Dennison RJ, Krahn NM, Seaward MR, Willett KL, Aderman CM, Guerin KI, et al. 2010. The mouse retina as an angiogenesis model.



- Invest Ophthalmol Vis Sci* **51**: 2813–2826. doi:10.1167/iovs.10-5176
- Stefater JA III, Lewkowich I, Rao S, Mariggi G, Carpenter AC, Burr AR, Fan J, Ajima R, Molkentin JD, Williams BO, et al. 2011. Regulation of angiogenesis by a non-canonical Wnt–Flt1 pathway in myeloid cells. *Nature* **474**: 511–515. doi:10.1038/nature10085
- Stefater JA, Rao S, Bezold K, Aplin AC, Nicosia RF, Pollard JW, Ferrara N, Lang RA. 2013. Macrophage Wnt–Calcineurin–Flt1 signaling regulates mouse wound angiogenesis and repair. *Blood* **121**: 2574–2578. doi:10.1182/blood-2012-06-434621
- Stenman JM, Rajagopal J, Carroll TJ, Ishibashi M, McMahon J, McMahon AP. 2008. Canonical Wnt signaling regulates organ-specific assembly and differentiation of CNS vasculature. *Science* **322**: 1247–1250. doi:10.1126/science.1164594
- Sweeney MD, Zhao Z, Montagne A, Nelson AR, Zlokovic BV. 2019. Blood–brain barrier: from physiology to disease and back. *Physiol Rev* **99**: 21–78. doi:10.1152/physrev.00050.2017
- Takada R, Satomi Y, Kurata T, Ueno N, Norioka S, Kondoh H, Takao T, Takada S. 2006. Monounsaturated fatty acid modification of Wnt protein: its role in Wnt secretion. *Dev Cell* **11**: 791–801. doi:10.1016/j.devcel.2006.10.003
- Takahashi Y, Chen Q, Rajala RVS, Ma JX. 2015. MicroRNA-184 modulates canonical Wnt signaling through the regulation of frizzled-7 expression in the retina with ischemia-induced neovascularization. *FEBS Lett* **589**: 1143–1149. doi:10.1016/j.febslet.2015.03.010
- Tatin F, Taddei A, Weston A, Fuchs E, Devenport D, Tissir F, Makinen T. 2013. Planar cell polarity protein Celsr1 regulates endothelial adherens junctions and directed cell rearrangements during valve morphogenesis. *Dev Cell* **26**: 31–44. doi:10.1016/j.devcel.2013.05.015
- The Alzheimer’s Disease Neuroimaging Initiative; Iturria-Medina Y, Sotero RC, Toussaint PJ, Mateos-Pérez JM, Evans AC. 2016. Early role of vascular dysregulation on late-onset Alzheimer’s disease based on multifactorial data-driven analysis. *Nat Commun* **7**: 11. doi:10.1038/ncomms11934
- Tokunaga CC, Chen Y-H, Dailey W, Cheng M, Drenser KA. 2013. Retinal vascular rescue of oxygen-induced retinopathy in mice by Norrin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **54**: 222–229.
- Tran KA, Zhang X, Predescu D, Huang X, Machado RF, Göthert JR, Malik AB, Valyi-Nagy T, Zhao YY. 2016. Endothelial  $\beta$ -catenin signaling is required for maintaining adult blood–brain barrier integrity and central nervous system homeostasis. *Circulation* **133**: 177–186. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.115.015982
- Tuo J, Wang Y, Cheng R, Li Y, Chen M, Qiu F, Qian H, Shen D, Penalva R, Xu H, et al. 2015. Wnt signaling in age-related macular degeneration: human macular tissue and mouse model. *J Transl Med* **13**: 330. doi:10.1186/s12967-015-0683-x
- Tzima E, Irani-Tehrani M, Kiosses WB, Dejana E, Schultz DA, Engelhardt B, Cao G, DeLisser H, Schwartz MA. 2005. A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature* **437**: 426–431. doi:10.1038/nature03952
- Vallée A, Lecarpentier Y, Vallée R, Guillevin R, Vallée JN. 2020. Circadian rhythms in exudative age-related macular degeneration: the key role of the canonical WNT/ $\beta$ -catenin pathway. *Int J Mol Sci* **21**: 820. doi:10.3390/ijms21030820
- Vallon M, Yuki K, Nguyen TD, Chang J, Yuan J, Siepe D, Miao Y, Essler M, Noda M, Garcia KC, et al. 2018. A RECK–WNT7 receptor–ligand interaction enables isoform-specific regulation of wnt bioavailability. *Cell Rep* **25**: 339–349.e9. doi:10.1016/j.celrep.2018.09.045
- Vanhollebeke B, Stone OA, Bostaille N, Cho C, Zhou Y, Maquet E, Gauquier A, Cabochette P, Fukuhara S, Mochizuki N, et al. 2015. Tip cell-specific requirement for an atypical Gpr124- and Reck-dependent Wnt/ $\beta$ -catenin pathway during brain angiogenesis. *eLife* **4**: e06489. doi:10.7554/eLife.06489
- van Loon K, Huijbers EJM, Griffioen AW. 2021. Secreted frizzled-related protein 2: a key player in noncanonical Wnt signaling and tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* **40**: 191–203. doi:10.1007/s10555-020-09941-3
- Wallingford JB. 2012. Planar cell polarity and the developmental control of cell behavior in vertebrate embryos. *Annu Rev Cell Dev Biol* **28**: 627–653. doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154208
- Wang Y, Nathans J. 2007. Tissue/planar cell polarity in vertebrates: new insights and new questions. *Development* **134**: 647–658. doi:10.1242/dev.02772
- Wang Y, Rattner A, Zhou Y, Williams J, Smallwood PM, Nathans J. 2012. Norrin/Frizzled4 signaling in retinal vascular development and blood brain barrier plasticity. *Cell* **151**: 1332–1344. doi:10.1016/j.cell.2012.10.042
- Wang Z, Cheng R, Lee K, Tyagi P, Ding L, Kompella UB, Chen J, Xu X, Ma J-X. 2015. Nanoparticle-mediated expression of a Wnt pathway inhibitor ameliorates ocular neovascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **35**: 855–864.
- Wang Z, Liu C-H, Sun Y, Gong Y, Favazza TL, Morss PC, Saba NJ, Fredrick TW, He X, Akula JD, et al. 2016. Pharmacologic activation of Wnt signaling by lithium normalizes retinal vasculature in a murine model of familial exudative vitreoretinopathy. *Am J Pathol* **186**: 2588–2600.
- Wang Y, Cho C, Williams J, Smallwood PM, Zhang C, Junge HJ, Nathans J. 2018. Interplay of the Norrin and Wnt7a/Wnt7b signaling systems in blood–brain barrier and blood–retina barrier development and maintenance. *Proc Natl Acad Sci* **115**: E11827–E11836. doi:10.1073/pnas.1813217115
- Wang Y, Sabbagh MF, Gu X, Rattner A, Williams J, Nathans J. 2019a.  $\beta$ -Catenin signaling regulates barrier-specific gene expression in circumventricular organ and ocular vasculatures. *eLife* **8**: e43257. doi:10.7554/eLife.43257
- Wang Z, Liu CH, Huang S, Chen J. 2019b. Wnt signaling in vascular eye diseases. *Prog Retin Eye Res* **70**: 110–133. doi:10.1016/j.preteyeres.2018.11.008
- Wang Z, Liu CH, Huang S, Fu Z, Tomita Y, Britton WR, Cho SS, Chen CT, Sun Y, Ma J, et al. 2020. Wnt signaling activates MFSD2A to suppress vascular endothelial transcytosis and maintain blood–retinal barrier. *Sci Adv* **6**: eaba7457. doi:10.1126/sciadv.aba7457
- Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, Yates JR, Nusse R. 2003. Wnt proteins are

- lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* **423**: 448–452. doi:10.1038/nature01611
- Wolburg H, Lippoldt A. 2002. Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascul Pharmacol* **38**: 323–337. doi:10.1016/S1537-1891(02)00200-8
- Wu J, Mlodzik M. 2009. A quest for the mechanism regulating global planar cell polarity of tissues. *Trends Cell Biol* **19**: 295–305. doi:10.1016/j.tcb.2009.04.003
- Wu JH, Liu JH, Ko YC, Wang CT, Chung YC, Chu KC, Liu TT, Chao HM, Jiang YJ, Chen SJ, et al. 2016. Haploinsufficiency of *RCBTB1* is associated with coats disease and familial exudative vitreoretinopathy. *Hum Mol Genet* **25**: 1637–1647. doi:10.1093/hmg/ddw041
- Xiao H, Tong Y, Zhu Y, Peng M. 2019. Familial exudative vitreoretinopathy-related disease-causing genes and Norrin/ $\beta$ -catenin signal pathway: structure, function, and mutation spectrums. *J Ophthalmol* **2019**: 5782536.
- Xu K, Cleaver O. 2011. Tubulogenesis during blood vessel formation. *Semin Cell Dev Biol* **22**: 993–1004. doi:10.1016/j.semcdb.2011.05.001
- Xu Q, Wang Y, Dabdoub A, Smallwood PM, Williams J, Woods C, Kelley MW, Jiang L, Tasman W, Zhang K, et al. 2004. Vascular development in the retina and inner ear. *Cell* **116**: 883–895. doi:10.1016/S0092-8674(04)00216-8
- Yan M, Wang H, Gu Y, Li X, Tao L, Lu P. 2021. Melatonin exerts protective effects on diabetic retinopathy via inhibition of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway as revealed by quantitative proteomics. *Exp Eye Res* **205**: 108521.
- Yang AC, Stevens MY, Chen MB, Lee DP, Stähli D, Gate D, Contrepolis K, Chen W, Iram T, Zhang L, et al. 2020. Physiological blood-brain transport is impaired with age by a shift in transcytosis. *Nature* **583**: 425–430. doi:10.1038/s41586-020-2453-z
- Ye X, Wang Y, Cahill H, Yu M, Badea TC, Smallwood PM, Peachey NS, Nathans J. 2009. Norrin, frizzled-4, and Lrp5 signaling in endothelial cells controls a genetic program for retinal vascularization. *Cell* **139**: 285–298. doi:10.1016/j.cell.2009.07.047
- Ye X, Wang Y, Nathans J. 2010. The Norrin/Frizzled4 signaling pathway in retinal vascular development and disease. *Trends Mol Med* **16**: 417–425. doi:10.1016/j.molmed.2010.07.003
- Ye X, Smallwood P, Nathans J. 2011. Expression of the Norrie disease gene (*Ndp*) in developing and adult mouse eye, ear, and brain. *Gene Expr Patterns* **11**: 151–155. doi:10.1016/j.gep.2010.10.007
- Yi H, Nakamura REI, Mohamed O, Dufort D, Hackam AS. 2007. Characterization of Wnt signaling during photoreceptor degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48**: 5733–5741. doi:10.1167/iovs.07-0097
- Yu JJS, Maugarny-Calès A, Pelletier S, Alexandre C, Bellaiche Y, Vincent JP, McGough IJ. 2020. Frizzled-dependent planar cell polarity without secreted wnt ligands. *Dev Cell* **54**: 583–592.e5. doi:10.1016/j.devcel.2020.08.004
- Zeilbeck LF, Müller BB, Leopold SA, Senturk B, Langmann T, Tamm ER, Ohlmann A. 2016. Norrin mediates angiogenic properties via the induction of insulin-like growth factor-1. *Exp Eye Res* **145**: 317–326. doi:10.1016/j.exer.2015.12.001
- Zeng X, Tamai K, Doble B, Li S, Huang H, Habas R, Okamura H, Woodgett J, He X. 2005. A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature* **438**: 873–877. doi:10.1038/nature04185
- Zhang B, Hu Y, Ma J. 2009. Anti-inflammatory and antioxidant effects of SERPINA3K in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **50**: 3943–3952.
- Zhang B, Abreu JG, Zhou K, Chen Y, Hu Y, Zhou T, He X, Ma J. 2010a. Blocking the Wnt pathway, a unifying mechanism for an angiogenic inhibitor in the serine proteinase inhibitor family. *Proc Natl Acad Sci* **107**: 6900–6905.
- Zhang B, Zhou KK, Ma J. 2010b. Inhibition of connective tissue growth factor overexpression in diabetic retinopathy by SERPINA3K via blocking the WNT/ $\beta$ -catenin pathway. *Diabetes* **59**: 1809–1816.
- Zhang J, Fukuhara S, Sako K, Takenouchi T, Kitani H, Kume T, Koh GY, Mochizuki N. 2011. Angiopoietin-1/Tie2 signal augments basal Notch signal controlling vascular quiescence by inducing Delta-like 4 expression through AKT-mediated activation of  $\beta$ -catenin. *J Biol Chem* **286**: 8055–8066. doi:10.1074/jbc.M110.192641
- Zhang C, Lai MB, Khandan L, Lee LA, Chen Z, Junge HJ. 2017. Norrin-induced Frizzled4 endocytosis and endolysosomal trafficking control retinal angiogenesis and barrier function. *Nat Commun* **8**: 16050. doi:10.1038/ncomms16050
- Zhang K, Yao E, Lin C, Chou YT, Wong J, Li J, Wolters PJ, Chuang PT. 2020. A mammalian Wnt5a–Ror2–Vangl2 axis controls the cytoskeleton and confers cellular properties required for alveologenesis. *eLife* **9**: e53688. doi:10.7554/eLife.53688
- Zhang S, Li X, Liu W, Zhang X, Huang L, Li S, Yang M, Zhao P, Yang J, Fei P, et al. 2021. Whole-exome sequencing identified *DLG1* as a candidate gene for familial exudative vitreoretinopathy. *Genet Test Mol Biomarkers* **25**: 309–316. doi:10.1089/gtmb.2021.0013
- Zhao Z, Nelson AR, Betsholtz C, Zlokovic BV. 2015. Establishment and dysfunction of the blood–brain barrier. *Cell* **163**: 1064–1078. doi:10.1016/j.cell.2015.10.067
- Zhou T, Hu Y, Chen Y, Zhou KK, Zhang B, Gao G, Ma J. 2010. The pathogenic role of the canonical Wnt pathway in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **51**: 4371–4379. doi:10.1167/iovs.09-4278
- Zhou T, Chen L, Huang C-H, Lin Z, Zong R, Zhu C, Pan F, Ma J-X, Liu Z-G, Zhou Y. 2014a. Serine proteinase inhibitor SERPINA3K suppresses corneal neovascularization via inhibiting Wnt signaling and VEGF. *Invest Ophthalmol Vis Sci* doi:10.1167/jovs.14-14023
- Zhou Y, Wang Y, Tischfield M, Williams J, Smallwood PM, Rattner A, Taketo MM, Nathans J. 2014b. Canonical WNT signaling components in vascular development and barrier formation. *J Clin Invest* **124**: 3825–3846. doi:10.1172/JCI76431
- Zhou Y, Williams J, Smallwood PM, Nathans J. 2015. Sox7, Sox17, and Sox18 cooperatively regulate vascular development in the mouse retina. *PLoS ONE* **10**: e0143650. doi:10.1371/journal.pone.0143650

## LISTE DES CONGRÈS ET PRIX

- **Juillet 2024 (A venir) - Amsterdam:** International Vascular Biology Meeting 2024; Poster.
- **Octobre 2023 – Bordeaux:** 10<sup>ème</sup> Congrès de la Société Française d'Angiogenèse; Poster.
- **Juin 2023 - Biarritz:** Congrès de la Nouvelle Société Française d'Athérosclérose; soutenance de subvention de 4<sup>ème</sup> année de thèse; 9 mois de rallonge accordés.
- **Mai 2023 – Marseille:** Printemps de la Cardiologie; Présentation orale; Young Investigation Award.
- **Mars 2023 – Arras:** Franco-Belgian-British Multinational Meeting on Blood-Brain Interface; Présentation orale.
- **Sept. 2022 – Bari:** 24<sup>th</sup> International Symposium on Signalling Transduction at the Blood-Brain Barriers; Présentation orale.
- **Avril 2022 – Bordeaux:** Journée de l'Ecole doctorale Science de la Vie et de la Santé de l'université de Bordeaux; Poster ; Premier Prix Poster.