

N° d'ordre : 4713

THÈSE

Présentée à

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX I

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES de la VIE et de la SANTÉ

Par **Sylvaine GUÉRIT**

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOPATHOLOGIE

Rôles des facteurs angiogéniques dans le système nerveux central

Soutenue le 18 décembre 2012

Après avis de

Mr Gilles FORTIN
Mr Gilles PAGES

Rapporteur
Rapporteur

Devant la commission d'examen formée de :

Mr Pascal BRANCHEREAU
Mr Jean-Jacques FEIGE
Mr Gilles FORTIN
Mr Gilles PAGES
Mr Andréas BIKFALVI

Pr, Univ. Bordeaux 1
DR, INSERM, Grenoble
DR, CNRS, Gif sur Yvette
DR, CNRS, Nice
Pr, Univ. Bordeaux 1

Président
Examineur
Rapporteur
Rapporteur
Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Bien évidemment, je remercie le Pr. Andréas BIKFALVI de m'avoir choisie pour cette thèse. Ces 4 années furent enrichissantes scientifiquement et personnellement avec ce projet neurosciences/développement qui a pris son temps pour mûrir, à l'image des vins de cette région. Vous avez écouté malgré tout mes idées et points de vue et cela est appréciable. Soyez en remercié.

Un grand merci aussi au Pr. Pascal BRANCHEREAU, mon chef du 4^{ème} étage, qui m'a co-encadré lors de cette thèse. Grâce à vous, j'ai pu entrouvrir les portes du vaste monde des neurosciences et me former au patch clamp. Vous avez toujours été disponible pour faire des manip (parfois tard le soir) et répondre à mes nombreuses questions sur les réseaux neuraux. Encore une fois je vous en remercie.

Je tiens à remercier les membres de mon jury qui ont accepté d'évaluer le travail produit lors de cette thèse : Mr Jean-Jacques FEIGE, Mr Gilles FORTIN et Mr Gilles PAGES.

Un an avant de commencer cette thèse, je me promenais déjà dans les couloirs du laboratoire U1029 (U920 à l'époque...) pour mon stage de master 2 sous la direction du Pr. Michel MOENNER. Le stress dû aux enjeux de cette 2^{ème} année de master en vue de la thèse a été atténué grâce à votre disponibilité, votre écoute, vos conseils et votre aide pour le stage et la préparation du concours. Durant les 4 ans de thèse qui ont suivi, vous êtes resté disponible et vous m'avez donné l'opportunité de continuer à travailler sur le projet IRE1. De tout ceci, je vous suis extrêmement reconnaissante.

Cette thèse ne serait pas aussi aboutie aujourd'hui sans l'aide de plusieurs personnes au sein de mes 2 laboratoires.

Anne-Émilie, merci pour la culture organotypique et les marquages du VEGF et de ses récepteurs. Sans toi, je pense que j'y serais encore sans voir la ligne d'arrivée. Certes, tout n'a pas fonctionné du premier coup mais la persévérance a fini par payer. Merci William pour les nombreux génotypages avec des résultats défiant parfois les lois de Mendel. On peut dire qu'à

certain moments ce fut la « cre » et la bannière... Les génotypages nous amènent aux souris et donc un grand merci à Raphaël et au reste de l'équipe de l'animalerie B3, pour la production des souris cre/lox et les implantations orthotopiques. Merci Céline pour ton implication dans le projet IRE1. Tu es passée avec brio des extractions ARN sur les baies de raisin à la culture cellulaire et aux perfusions de souris. C'est un réel plaisir de partager la paillasse avec toi. Merci Sophie (North) pour la relecture du manuscrit, les TP de biocell et l'aide apportée pour le concours.

Je n'oublie pas mes camarades de la salle d'électrophysio du 4^{ème} étage. Elodie, ne te stresse pas pour l'année à venir : tout va rouler comme sur des roulettes et tu te réveilleras un matin et la soutenance sera passée et tous tes papiers acceptés. J'ai passé un excellent congrès à la Nouvelle Orléans et grâce à toi j'ai découvert le 'catfish'. Ce fut un moment, comment dire ... mémorable. Bonne continuation à Anna, à Claire, à ses frères de manip Oussama et Sébastien, à Blaise, au 'crayfishmen' Julien, Pascal, Daniel et Jean-Paul. Merci à Françoise pour les commandes de souris et au personnel de l'animalerie du 3^{ème} étage pour s'en être occupé. Une petite pensée pour la machine à laver... Amis neuroscientifiques : n'oubliez pas que du point de vue du neurone, le vaisseau c'est la vie !!!... Saluez-le de ma part la prochaine fois que vous en verrez un...

Chers collègues rédacteurs en chef !... Que de temps passé devant nos ordinateurs dans ce petit bout de bureau... Prisca, tu as fait le chemin inverse au mien en passant des neurosciences à la cancéro. Je dois dire que j'ai KIF(é) ces années à tes cotés. Avant de partir vers de nouveaux horizons, n'hésite pas à venir observer celui qui s'offre à nous depuis ma terrasse panoramique... Yann tu es bien sûr invité aussi. Arnaud, tu fais des supers giga Blot, des clonages en tous sens, des implantations et des aliquotes de Dox en série, de la biblio de dingue et juste à la fin tu as craqué et tu nous as révélé LA faille : le découpage de marque-pages... Bon tu as de la chance : comme ce n'est pas l'activité principale des chercheurs je ne me fais pas de soucis pour la suite. Virginie et Oui-Oui, ça va bientôt être à votre tour d'être promus au rang de rédacteur en chef. N'oubliez pas d'envoyer le carton d'invitation pour la soutenance. Nadège ne t'inquiète pas on garde le contact et vive la culture cellulaire !.. Babou, je crois qu'avec les collègues on va faire un 'case report' sur le régime spécial sucre et on sera tous co-premier auteurs : trop top ! Les moments de détente (pizza-ciné, pique-nique, belote, restos et le bowling) furent très agréables et vont me manquer.

Merci aux autres membres du labo. Fred et Annie et maintenant Karine, merci pour les commandes et autres ordres de mission. Merci à Clotilde et Patrick pour les nombreuses discussions scientifiques ainsi que Sophie et Martin. Bonne continuation à Maylis, Fabienne, Jessica, Géraldine et Cathy et vive la belote ! Je n'oublie pas ceux qui sont passés au labo pendant ces 5 ans : Nathalie Allain-Courtois, Mélanie, Greg, Natalia, Olexander, et les nombreux stagiaires...

La vie du thésard ne se limite pas à son labo. Je souhaite plein de bonnes choses à mes collègues de l'association 2d2b. Un immense merci à Catherine qui fait un travail formidable à l'Ecole Doctorale avec Delphine et maintenant Nathalie. Nous avons passé de sacrés moments à préparer les journées de l'ED à Arcachon

Avoir un équilibre dans sa vie est primordial et je tiens donc à remercier mes parents, mon frère, le reste de ma famille et tous mes amis qui se reconnaîtront et qui sont très chers à mon cœur.

Avant propos

Cette thèse s'articule en deux parties qui ont pour point commun les relations entre les vaisseaux et le système nerveux central.

La première partie est axée sur les interactions entre les systèmes vasculaire et nerveux dans la moelle épinière de souris lors du développement embryonnaire. Ce projet a été supervisé par le Pr. Andréas BIKFALVI (INSERM U1029) et a fait l'objet d'une collaboration avec un second laboratoire de l'Université Bordeaux1 avec le co-encadrement du Pr. Pascal BRANCHEREAU (CNRS UMR5287).

La seconde partie porte sur le développement du glioblastome (cancer du système nerveux). Ce travail fait suite à mon stage de master 2 que j'ai réalisé en 2008 sous la direction du Pr. Michel MOENNER (INSERM U1029). Une partie des données obtenues lors de ce stage ont été intégrées dans un article publié en 2010 dans le journal PNAS. Lors de cette thèse, nous avons approfondi l'étude des altérations du tissu présent autour de la tumeur. Ce travail a été effectué sous la direction du Pr. Andréas BIKFALVI et du Pr. Michel MOENNER. Certains mécanismes, comme l'angiogenèse, auront été décrits dans l'introduction de la première partie et ne seront donc pas présentés à nouveau.

SOMMAIRE

ABBREVIATIONS.....	5
---------------------------	----------

PROJET n°1 : Angiogenèse et système nerveux central lors du développement embryonnaire	11
---	-----------

I) La moelle épinière et son développement.....	11
--	-----------

1-1) La moelle épinière adulte.....	11
-------------------------------------	----

1-1-1) Anatomie.	11
-----------------------	----

1-1-2) Les motoneurones.....	14
------------------------------	----

1-1-3) Les interneurones.	14
--------------------------------	----

1-1-4) Les cellules gliales.....	15
----------------------------------	----

1-1-5) Les vaisseaux sanguins.....	16
------------------------------------	----

1-2) Ontogenèse de la moelle épinière.....	17
--	----

1-2-1) Formation du tube neural et domaines progéniteurs.	17
--	----

1-2-2) Mise en place des différentes populations cellulaires nerveuses.	20
--	----

1-2-3) Mise en place des activités dans le réseau moteur.....	23
---	----

II) Les vaisseaux : anatomie, formation et facteurs régulateurs.	26
--	-----------

2-1) Anatomie vasculaire et formation de nouveaux vaisseaux.....	26
--	----

2-2) Famille du VEGF et des récepteurs associés.....	31
--	----

2-2-1) Le Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGFA ou VEGF).....	31
---	----

2-2-2) Les autres ligands de la famille du VEGF.....	34
--	----

2-2-3) Les récepteurs des ligands de la famille du VEGF.....	36
--	----

2-2-3-a) Les récepteurs à activité Tyrosine Kinase (VEGFRs).	36
---	----

2-2-3-b) Les neuropilines (NRPs).	40
--	----

2-2-3) Modulation du signal induit.	41
--	----

III) Quand les réseaux vasculaires et nerveux communiquent.....	43
--	-----------

3-1) Approches <i>in vitro</i>	45
---------------------------------------	----

3-2) Approches <i>in vivo</i>	46
--------------------------------------	----

3-3) VEGF et pathologies.....	46
-------------------------------	----

3-3-1) Effets bénéfiques du VEGF.	46
--	----

3-3-2) Effets délétères du VEGF.	48
MATÉRIEL ET MÉTHODES	53
1) Génotypage.	53
2) Prélèvement des tissus.	54
3) Culture organotypique.	56
4) Immunohistologie.	57
5) Acquisition des images en microscopie confocale.	59
6) Analyse des images et quantifications.	59
7) Electrophysiologie.	60
7-1) Principe de l'électrophysiologie.	60
7-2) Protocoles expérimentaux.....	62
7-2-1) Etudes en courant imposé : protocoles de courbes I/V.	65
7-2-2) Etudes en voltage imposé : analyse de l'activité synaptique.	65
8) Analyses statistiques.	68
RÉSULTATS ET DISCUSSION	71
1) Mise en place du réseau vasculaire dans la moelle épinière.	71
2) Effet du VEGF sur l'activité du réseau neuronal au stade E15,5 du développement embryonnaire.	78
2-1) Rôle du VEGF sur les caractéristiques intrinsèques des motoneurones (MNs).....	78
2-2) Rôle du VEGF sur la libération spontanée de GABA et de glycine dans la proximité immédiate des motoneurones (MNs) au stade E15,5.	83
3) Fenêtre d'action du VEGF sur les évènements miniatures GABAergiques et glycinergiques lors de la vie embryonnaire.	89
3-1) Stade E13,5 du développement embryonnaire.	89
3-2) Stade E17,5 du développement embryonnaire.	91
3-3) Fenêtre temporelle pour l'action de VEGF sur les évènements miniatures GABA/glycine.	93

4) Mécanisme d'action du VEGF : étude au stade E15,5 de développement embryonnaire.....	96
4-1) Localisation des différents récepteurs.	96
4-2) Etude par électrophysiologie de l'implication des récepteurs à activité Tyrosine Kinase (VEGFRs).	98
4-3) Etude par électrophysiologie de l'implication des neuropilines (NRPs).	102
5) Rôle chronique du VEGF sur l'ontogénèse de la moelle épinière.....	106
5-1) Culture organotypique.	106
5-2) Stratégie cre/lox.	109
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	115
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	121

PROJET n°2 : Développement du glioblastome : angiogenèse et microenvironnement de la tumeur.	135
INTRODUCTION.....	137
ARTICLE 1	145
ARTICLE 2 (en préparation).	161
Matériels et méthodes.....	163
Résultats.....	165
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	173

ABBREVIATIONS

ACSF: Artificial CerebroSpinal Fluid (liquide cérébrospinal artificiel)

AHP: After HyperPolarisation

ATF6: Activating Transcription Tactor-6

BGN: Biglycan

BHE: Barrière Hémato-Encéphalique

BiP: Binding immunoglobulin Protein

BMP: Bone Morphogenic Protein

CD31 ou PECAM1: Cluster of Differentiation 31 ou Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1

Cm: Capacitance membranaire

CPG: Central Pattern Generator

DN: Dominant Négatif

FGF: Fibroblast Growth Factor

FNC: Fibronectine

GABA: Acide Gamma AminoButyrique

GABAR: Récepteur du GABA

GDF: Growth Differentiation Factor

GFAP: Glial Fibrillary Acidic Protein

GluR: Récepteur du Glutamate

GlyR: Récepteur de la Glycine

GRD: Ganglion de la Racine Dorsale

GSC: Ganglion Supérieur Cervical

HGF: Hepatocyte Growth Factor

HIF1alpha: Hypoxia Inducible Factor 1 alpha

HSPG: Heparan Sulfate ProteoGlycan

IGF: Insuline Growth Factor

IL: Interleukine

INs: Interneurones

IRE1: Inositol-Requiring Enzyme 1

JNK: c-Jun amino-terminal Kinase

KCC2: Potassium (K) Chloride (C) transporter 2
MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase
ME: Moelle Epinière
MMP: Matrix MetalloProteinase
MNs: Motoneurones
NG2: Neuron-Glial antigen 2
NKCC1: Sodium (N) Potassium (K) Chloride (C) transporter 1
NRP: Neuropiline
PA: Potentiel d'Action
PDGF: Platelet Derived Growth Factor
PERK: Proteine kinase RNA-like ER Kinase
PFA: ParaFormAldéhyde
PI3K: PhosphatidyInositol type3 Kinase
PLCgamma: PhosphoLipase C gamma
PIGF: Placental Growth Factor
PLXN: Plexine
pMN: domaine progéniteur des motoneurones
RE: Reticulum Endoplasmique
Rm: Resistance de membrane
SEMA: Sémaphorine
Shh: Sonic hedgehog
SLA: Sclérose Latérale Amyotrophique
SNC: Système Nerveux Central
SNP: Système Nerveux Périphérique
SOD1: SuperOxyde Dismutase 1
SPARC: Secreted Protein, Acidic and Rich in Cystein
TenC: Tenascine C
TGFβ: Transforming Growth Factor β
TSP1: Thrombospondine 1
TTX: Tetrodotoxine
UPR: Unfolded Protein Response
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR1 (ou Flt1): Récepteur au VEGF de type 1 (ou Fms-like tyrosine kinase 1)

VEGFR2 (ou KDR ou FLk1): Récepteur au VEGF de type 2 (ou Kinase insert Domain Receptor ou Fetal liver kinase 1)

VEGFR3 (ou Flt4): Récepteur au VEGF de type 3 (ou Fms-like tyrosine kinase 4)

VIM: Vimentine

XPB1: X-box Binding Protein 1

**PROJET n°1 : Angiogenèse et système
nerveux central lors du développement
embryonnaire**

PROJET n°1 : Angiogenèse et système nerveux central lors du développement embryonnaire

I) La moelle épinière et son développement.

L'ensemble du tissu nerveux se divise en 2 parties : le système nerveux central (SNC) et le système nerveux périphérique (SNP). Le SNC est formé des hémisphères cérébraux, du tronc cérébral, du bulbe rachidien et du cervelet ainsi que de la moelle épinière (ME). Le SNP est constitué du système nerveux sensoriel et du système nerveux autonome et a pour rôle de transmettre l'information entre le reste de l'organisme et le SNC.

1-1) La moelle épinière adulte.

1-1-1) Anatomie.

La moelle épinière est un relais entre les différents organes et le cerveau. Ainsi, elle va transmettre les informations sensorielles provenant de la périphérie, mais aussi les informations nécessaires à la motricité et au tonus musculaire. Elle est responsable du contrôle du système moteur autonome, de la régulation de l'activité des organes internes et des activités rythmiques telles que la marche ou la nage.

La moelle épinière est un long élément cylindrique d'environ 50 cm de longueur chez l'Homme logé dans la colonne vertébrale avec des renflements dans ses parties lombaire et cervicale (Fig. 1A). Comme le cerveau, elle est entourée de plusieurs couches de tissu protecteur que sont les méninges : dure-mère, arachnoïde et pie-mère (de l'extérieur vers l'intérieur). Elle est divisée en plusieurs parties : cervicale, thoracique, lombaire, sacrée et coccygienne. La segmentation de la ME en 31 éléments est visible grâce aux paires de nerfs spinaux qui sortent entre les vertèbres de chaque côté de la ME pour innervier différents organes.

Chaque segment présente une organisation typique. Les nerfs spinaux sont mixtes puisqu'ils regroupent l'ensemble des fibres issues des racines dorsales (véhiculant les informations sensorielles) et des racines ventrales (transportant les informations motrices). Il est à noter que la racine dorsale présente un renflement, appelé ganglion de la racine dorsale (GRD), où se logent les corps cellulaires de neurones sensoriels. La racine ventrale ne

contient que des fibres motrices qui correspondent aux axones des motoneurones (MNs) dont les corps cellulaires sont logés dans la partie ventrale de la ME (Fig. 1B).

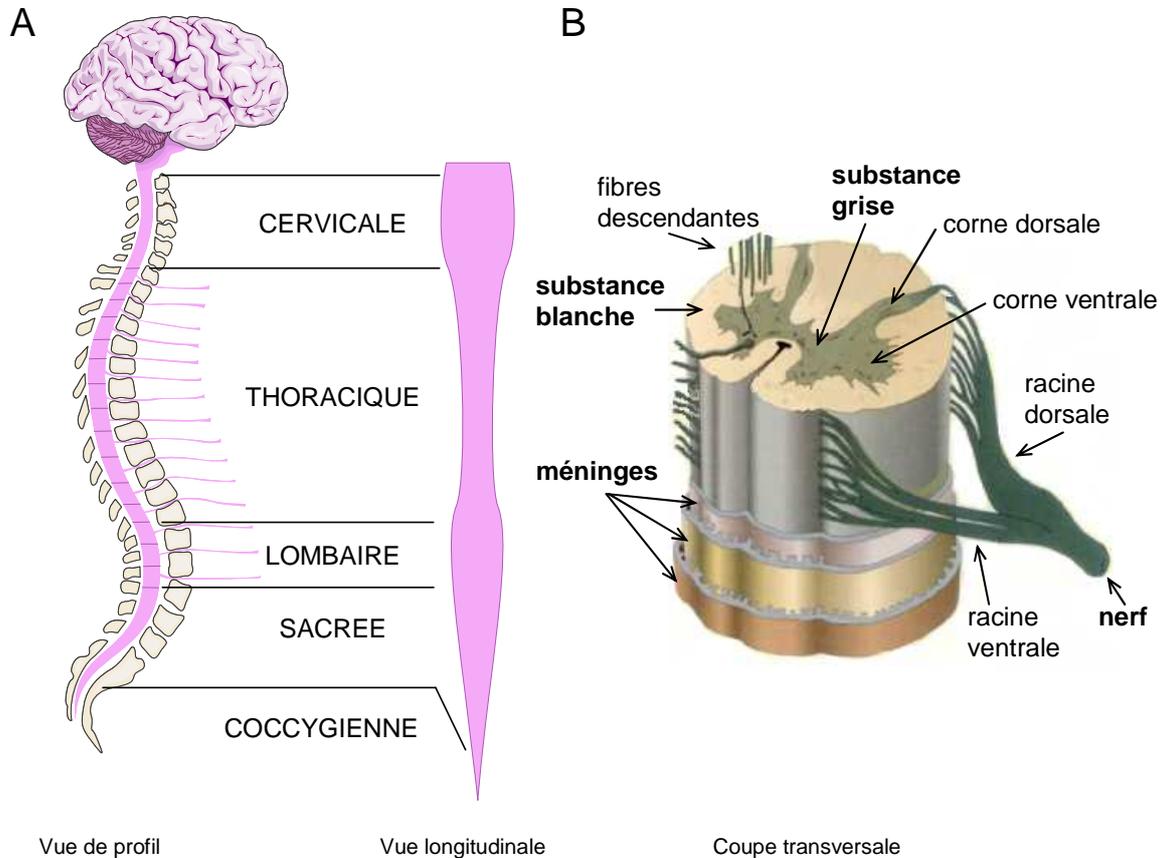


Fig. 1: Anatomie de la moelle épinière. La moelle épinière se loge dans la colonne vertébrale et se présente sous la forme d'un tube présentant des renflements en parties cervicale et lombaire (*Image Servier Medical Art*) (A). Elle présente une organisation typique bien visible en coupe transversale: les corps cellulaires des cellules nerveuses sont regroupés dans le centre de la moelle épinière et composent la substance grise (B). Les cornes dorsales reçoivent les informations sensorielles et les cornes ventrales sont le point de départ des informations motrices qui passent dans les nerfs. La substance blanche est composée de fibres myélinisées ascendantes, descendantes ou propriospinales. La moelle épinière est protégée par 3 couches de méninges (de l'intérieur vers l'extérieur : pie-mère, arachnoïde et dure-mère) (*modifié d'après <http://lecerveau.mcgill.ca/>*).

En coupe transversale, la ME est divisée en 2 zones bien visibles. Tout d'abord, la **substance blanche** est située sur la partie plus externe (Fig. 1B). Elle est constituée majoritairement d'axones entourés d'une gaine de myéline. Elle permet le passage de l'information entre segments de la moelle épinière ou alors vers le cerveau. Il y a les voies ascendantes sensorielles et descendantes issues du tronc cérébral ou du cortex moteur. La substance blanche est divisée en zones ou colonnes selon les fibres qu'elle comporte : dorsale (uniquement fibres ascendantes), latérale et ventrale (fibres ascendantes et descendantes) (Fig. 2A).

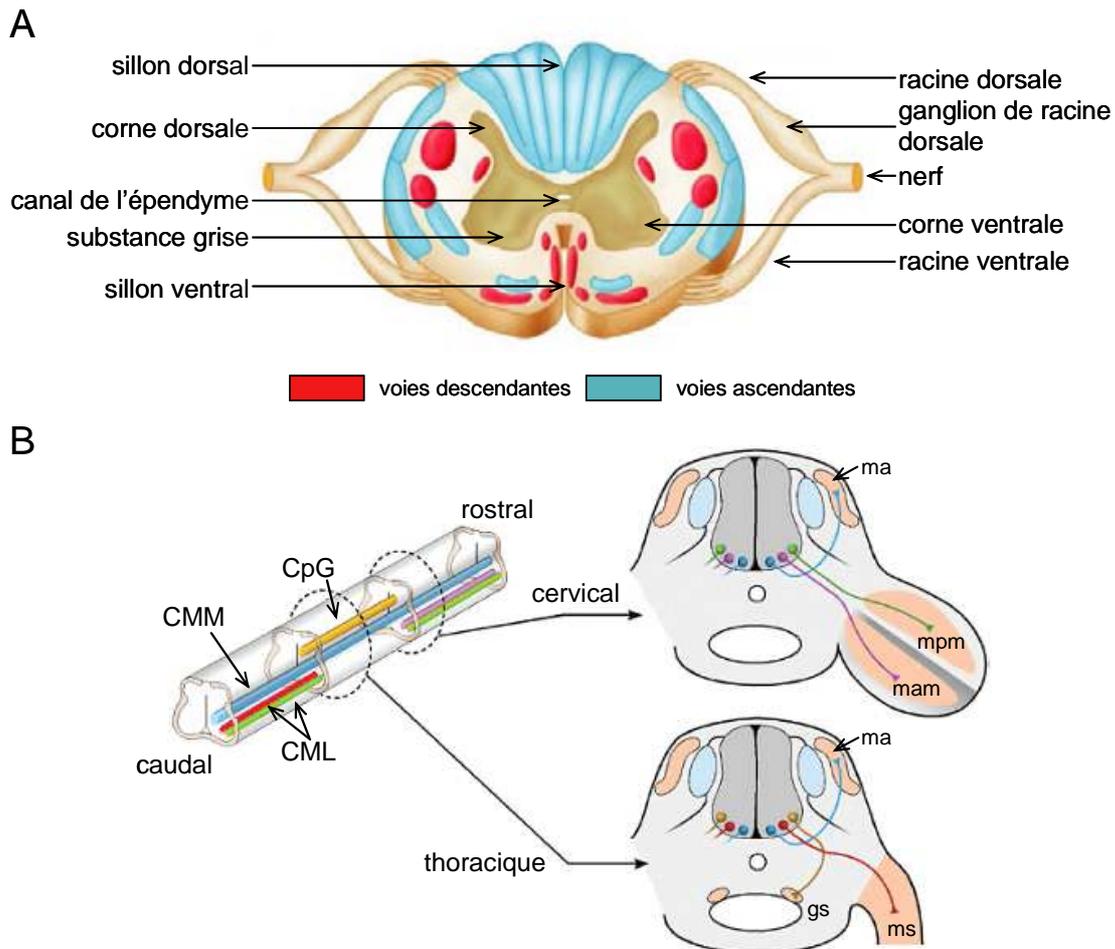


Fig. 2: Organisation fonctionnelle de la moelle épinière. Les fibres ascendantes et descendantes sont organisées en faisceaux dans la substance blanche, représenté ici chez l'Homme (A) (modifié d'après: www.profelis.org/webpages-cn/lectures/neuroanatomy). Les motoneurones organisés en colonnes sur tout le long de la moelle épinière, forment des groupes qui innervent différents muscles selon leur localisation dans la moelle épinière. Les colonnes motrices latérales (CML) innervent les muscles postérieurs et antérieurs des membres (mpm et mam) et les muscles squelettiques (ms). Les colonnes motrices médianes (CMM) innervent les muscles axiaux (ma) et les motoneurones de la colonne motrice pré-ganglionnaire (CpG) innervent les ganglions sympathiques (gs) (B) (modifié d'après Bonanomi et Pfaff 2010).

Située à l'intérieur de la ME, la **substance grise** est, quant à elle, formée par l'ensemble des corps cellulaires des différentes populations neuronales. En forme de H, elle comprend de chaque côté 1 corne dorsale (lieu de réception des informations sensorielles) et 1 corne ventrale (lieu d'intégration des informations périphériques et centrales et de départ des informations motrices). La substance grise entoure le canal de l'épendyme dans lequel circule du liquide céphalo-rachidien (Fig. 2A).

Plusieurs types cellulaires sont présents dans la moelle épinière.

1-1-2) Les motoneurones.

Les motoneurones (MNs) ont leur corps cellulaire dans la corne ventrale de la ME. Comme leur nom le laisse supposer, leurs axones (contenus dans les nerfs) innervent les muscles et donc régulent leur état de contraction et donc *in fine* le tonus musculaire et les mouvements. Plusieurs catégories de MNs sont décrites (Kanning et al., 2010).

Les **MNalpha**, catégorie la plus représentée, innervent les muscles squelettiques responsables de la motricité du corps. La jonction entre le nerf et la fibre musculaire forme une structure bien définie appelée plaque motrice où les MNs libèrent de l'acétylcholine au niveau des terminaisons axonales. Dans la corne ventrale de la moelle épinière, leurs corps cellulaires sont organisés en groupes selon les muscles innervés. Ainsi, les noyaux les plus ventraux vont innerver les muscles axiaux (tronc). Les plus latéraux, quant à eux, innervent les muscles dorsaux des membres. Enfin, les noyaux intermédiaires vont innerver les muscles ventraux des membres et ceux de la ceinture abdominale (Fig. 2B) (Bonanomi and Pfaff, 2010). L'activité des MNalpha peut être modulée directement par les fibres des neurones sensoriels sans intégration centrale : c'est le cas du réflexe myotatique (contraction réflexe d'un muscle en réponse à son propre étirement).

Les **MNgamma** sont de plus petite taille ($193\mu\text{m}^2$ au lieu de $601\mu\text{m}^2$ pour les MNalpha, (Friese et al., 2009) et disséminés entre les MNalpha. Ils régulent l'activité tonique des muscles en innervant les fibres intrafusales (fibres musculaires modifiées en organe sensoriel) qui renseignent sur l'état et la vitesse de contraction des muscles (Kanning et al., 2010).

Enfin, les **MNviscéraux** vont, comme leur nom l'indique, innerver les ganglions autonomes projetant vers le muscle cardiaque et les muscles lisses des organes internes.

Il est à noter que tous les MNs ne sont pas exclusivement situés dans la moelle épinière et sont aussi présents dans le tronc cérébral. Leurs axones forment les nerfs viscéraux (trijumeaux, facial, ...) et somatiques dont les nerfs oculomoteurs III, IV et VI (innervant les paupières et les muscles permettant le mouvement de l'œil) et hypoglosse XII (innervant la langue).

1-1-3) Les interneurones.

Les interneurones (INs) sont des neurones situés entre 2 neurones et sont essentiels à la transmission de l'information en permettant son intégration et sa modulation. Ils peuvent être classés selon leur type de projection axonale. Les **interneurones commissuraux**

envoient leurs axones du côté controlatéral de la ME. Ils ont un rôle essentiel pour la coordination droite/gauche des activités motrices. Les **interneurones intersegmentaires** relaient l'information vers les segments antérieurs ou postérieurs. Une fois activés par les voies sensorielles ou descendantes, les INs libèrent des neurotransmetteurs au niveau des synapses neuro-neuroniques qu'ils forment entre eux ou avec les MNs. C'est l'intégration par les MNs de l'ensemble des données fournies par les INs qui aboutit à une modulation fine de la contraction musculaire nécessaire à la production de mouvements précis et coordonnés.

Les interneurones peuvent aussi être classés en plusieurs populations selon le **neurotransmetteur** libéré. Chez l'adulte, la libération de glutamate par les INs du même nom a des effets excitateurs. Les effets inhibiteurs sont dus à la libération de GABA et/ou de Glycine.

L'activité des INs (et des MNs) peut être modifiée par l'information descendant des centres supra-spinaux et en particulier provenant des neurones pré-moteurs du tronc cérébral et du cortex. Dans la ME, les MNs et les INs forment des circuits possédant des activités rythmiques ce qui permet la coordination des muscles et ce même en absence de stimulus sensoriel : ce sont les **CPG** (« central pattern generators » traduit en français par générateurs de patrons centraux). Ces centres génèrent des activités rythmiques pour le tonus musculaire mais aussi des patrons d'activité contrôlant la contraction en alternance gauche/droite et muscles fléchisseurs/extenseurs (Kiehn, 2011). Disposés tout le long de la ME, ils ont des cibles différentes selon leur localisation : membres supérieurs contrôlés par les CPG de la ME cervicale et membres inférieurs contrôlés par les CPG thoraciques et lombaires.

1-1-4) Les cellules gliales.

A l'origine, les cellules gliales étaient surtout décrites en tant que support des cellules nerveuses à l'image de la glue d'où le nom de glie. Plusieurs types cellulaires sont décrits : les astrocytes et les oligodendrocytes dérivés de l'épithélium neural et la microglie issue de la lignée hématopoïétique (Hewett, 2009).

Les **astrocytes** (exprimant la Glial Fibrillary Acidic Protein ou GFAP) apportent un support structural aux neurones et assurent l'homéostasie hydrique. Ils participent également activement à la signalisation en régulant l'homéostasie calcique, la production de certains neuropeptides mais aussi en modulant la transmission synaptique par la capture rapide du

glutamate libéré dans la fente synaptique (Blackburn et al., 2009 ; Rowitch and Kriegstein, 2010 ; Hewett, 2009).

Les **oligodendrocytes** forment la gaine de myéline mais sont aussi responsables du regroupement des canaux sodiques voltage dépendant via la sécrétion de facteurs (Dupree et al., 2004) qui sont 2 éléments essentiels pour la conduction saltatoire de l'activité nerveuse le long des axones des MNs. Ils sont aussi importants pour le transport axonal et peuvent avoir un rôle protecteur en sécrétant des facteurs neurotrophiques (Insulin Growth Factor IGF, ...) (McTigue and Tripathi, 2008, Rowitch and Kriegstein, 2010).

La **microglie** est l'ensemble de cellules provenant du système immunitaire. Ce sont de petites cellules mobiles ayant une fonction phagocytaire, et qui libèrent aussi des cytokines pour activer le recrutement de leucocytes. La microglie peut aussi moduler le réseau neuronal lui-même en augmentant la prolifération et la différenciation des progéniteurs neuronaux au cours du développement et en remodelant les synapses (Harry and Kraft, 2012). Récemment, il a été montré que la microglie module directement la libération spontanée de neurotransmetteurs excitateurs en association avec les astrocytes (Pascual et al., 2012).

1-1-5) Les vaisseaux sanguins.

Comme le reste du tissu nerveux, la moelle épinière est richement vascularisée. A l'image de la métamérisation de la moelle épinière, le réseau vasculaire est lui aussi segmenté. Le sang est acheminé autour de la moelle épinière par 2 artères spinales postérieures et par 1 artère antérieure. Des vaisseaux collatéraux se développent pour former un cercle péri-médullaire d'où partent des branchements qui se divisent avant d'irriguer l'intérieur de la ME. Le tiers dorsal de la moelle épinière est irrigué par les artères postérieures, le reste de la moelle étant irrigué par les subdivisions de l'artère antérieure. Les racines des nerfs sont elles aussi irriguées par un réseau issu de la division des branches spinales de l'artère segmentaire (Fig. 3).

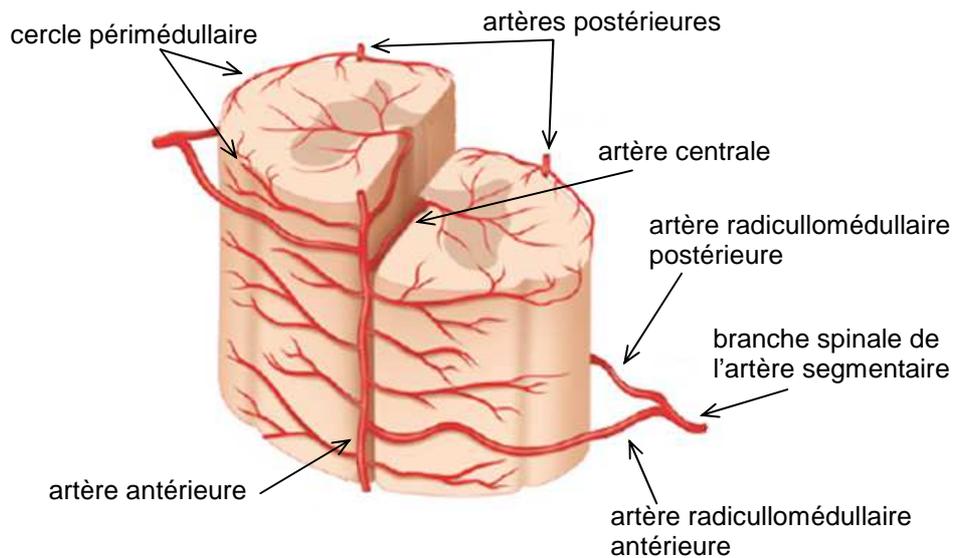


Fig. 3: Réseau artériel de la moelle épinière humaine. Des collatérales se forment depuis les 2 artères postérieures et l'artère antérieure pour former un cercle autour de la moelle. Des ramifications en émanent pour irriguer l'intérieur de la moelle. Le réseau veineux présente le même type de ramifications à ceci près qu'il présente 1 veine médiane et 2 veines latérales de chaque côté de la moelle (*modifié d'après Santillan 2012*).

Le réseau veineux présente quelques différences avec le réseau artériel. En effet, les veines du réseau péri-médullaire sont connectées à 3 vaisseaux collecteurs de chaque côté de la moelle épinière : 2 veines latérales et 1 veine médiane qui se logent dans les sillons. Ces vaisseaux rejoignent les veines des racines pour finalement se jeter dans la veine cave supérieure (Santillan et al., 2012). Les différents types cellulaires formant les vaisseaux sont décrits dans la seconde partie de cette introduction.

Tous ces circuits peuvent fonctionner de façon adéquate uniquement grâce à une mise en place régulée de façon très précise lors de la vie embryonnaire.

1-2) Ontogenèse de la moelle épinière.

1-2-1) Formation du tube neural et domaines progéniteurs.

La mise en place du SNC est un processus long qui se déroule depuis des stades précoces de la vie embryonnaire et se prolonge après la naissance. Il peut se diviser en deux étapes successives. Tout d'abord, une structure va se former avec la prolifération et la migration de populations cellulaires. Ensuite, cette structure nouvellement formée est modifiée pour s'organiser progressivement en réseau et acquérir peu à peu ses propriétés adultes.

Au début de la vie embryonnaire, une partie de l'ectoderme dorsal va former la plaque neurale qui va progressivement s'incurver pour obtenir la gouttière neurale. Les replis de cette gouttière vont fusionner formant ainsi le tube neural qui va donner par la suite les différentes structures de SNC (encéphale et ME) (Fig. 4). L'ensemble de ces processus est appelé **neurulation** (Gammill and Bronner-Fraser, 2003).

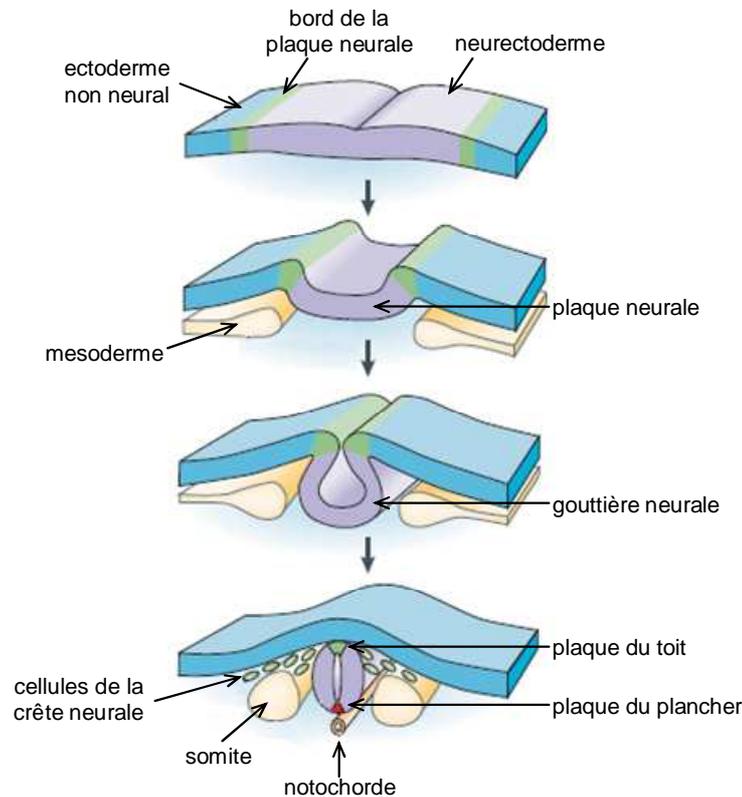


Fig. 4: Neurulation ou formation du tube neural lors du développement embryonnaire. Dérivé de l'ectoderme, le neurectoderme (ou plaque neurale) va se plisser et s'invaginer donnant la gouttière neurale dont les bords vont fusionner pour former le tube neural que l'on peut orienter selon l'axe ventro-dorsal avec la plaque du plancher et la plaque du toit respectivement. Ces 2 structures (et la notochorde) sont responsables de la sécrétion dans le milieu de facteurs qui vont permettre la maturation du tissu nerveux (*modifié d'après Gammill 2003*).

Des signaux inductifs majeurs (ou morphogènes) vont permettre la formation de différentes structures. Sonic hedgehog (Shh) libéré par la notochorde et la plaque du plancher est essentiel pour la formation des MNs du côté ventral de la ME. A l'inverse, les Bone Morphogenic Proteins (BMPs) et Wnt sécrétés par la plaque du toit exercent un rôle répresseur sur Shh (Fig. 4). La présence selon un gradient de concentration et les combinaisons de ces morphogènes est critique pour l'apparition des différents types cellulaires selon un axe dorso-ventral au sein de la ME (Gammill and Bronner-Fraser, 2003, Lee and Pfaff, 2001, Briscoe and Novitch, 2008, Ulloa and Marti, 2010) (Fig. 5).

L'organisation de la moelle épinière selon un axe rostro-caudal est due à la présence de facteurs de la famille des Ephrines (Arber, 2012).

De nombreuses cellules pluripotentes sont présentes dans la zone ventriculaire sur toute la hauteur du tube neural autour du futur canal central. Dans la zone ventrale de la future ME, ces cellules sont regroupées en plusieurs domaines selon les gènes communs exprimés : ce sont les **domaines progéniteurs** (Fig. 5). Au stade E11,5 de la vie embryonnaire de la souris (11,5 jours après accouplement), 5 domaines (p0, p1, p2, pMN et p3) sont décrits et vont donner naissance à différents types cellulaires. Ces domaines progéniteurs sont le lieu de divisions et de différenciations cellulaires. Les neurones post-mitotiques vont alors quitter ces domaines progéniteurs et migrer vers leur localisation finale. Chaque population cellulaire exprime des facteurs de transcription qui lui sont propres et nécessaires à la synthèse spécifique de protéines signes de leur différenciation en type cellulaire défini et définitif (Islet, Hb9, Sim, Gata, ...) (Lee and Pfaff, 2001).

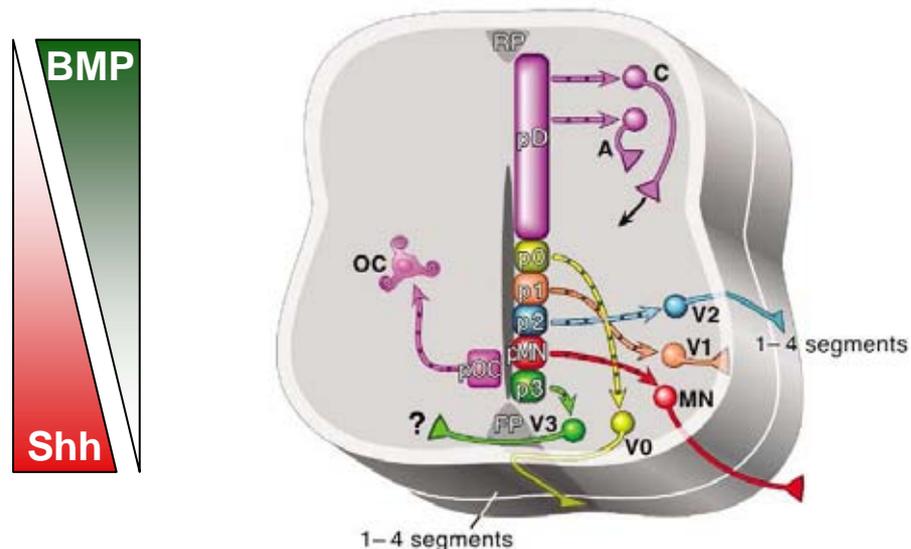


Fig. 5: Gradients d'expression des facteurs de transcription et zones progénitrices. La maturation du tube neural est sous la dépendance des gradients de facteurs de transcription Shh et BMPs sécrétés par la plaque du plancher (Floor Plate, FP) et la plaque du toit (Roof Plate, RP) respectivement. La combinaison de ces facteurs permet la formation de domaines progéniteurs à proximité du canal central (p0 à p3, pD et pMN). Les différents types de neurones constituant la moelle épinière sont issus de la division des cellules puis de leur migration depuis ces domaines: interneurons IN0-3 et INdorsaux (C et A) depuis les domaines p0-3 et pD respectivement, motoneurons depuis pMN et oligodendrocytes depuis pOD (*Adapté d'après Lee et Pfaff 2001*).

Les interneurons V0 (issus de **p0**) apparaissent entre les stades E10 et E13,5 chez la souris. Ils forment la population des interneurons commissuraux qui projettent sur un à quatre segments rostraux (vers le cerveau). Leur absence est caractérisée par un déficit de la

coordination ou de l'alternance gauche/droite. La libération de neurotransmetteurs est inhibitrice pour la majeure partie d'entre eux.

Les interneurons issus de **p1** (cellules de Renshaw, INs inhibiteurs Ia, INs proprioceptifs) se développent entre les stades E8,5 et E12,5 chez la souris. Leurs axones sont courts et dans le même coté de la moelle épinière (projections ipsilatérales). Les contacts sont souvent monosynaptiques avec les MNs ce qui fait qu'ils sont impliqués dans la fréquence des bouffées locomotrices sans toutefois contribuer aux patrons locomoteurs. Initialement GABAergiques, ils libèrent de la glycine chez l'adulte.

Les interneurons issus de **p2** sont partagés en 2 catégories : V2a et V2b. Les INs V2a sont excitateurs (glutamatergiques) et sont impliqués dans la stabilisation et la précision du patron locomoteur sans en être toutefois à l'origine. Ils ont aussi des connexions avec les INs V0 et font donc partie des circuits nécessaires à l'alternance droite/gauche. Les INs V2b (GABA/glycinergiques) participent à la coordination de l'activité motrice au sein de la ME via des projections inhibitrices sur 1 à 4 segments en direction rostrale et caudale.

Les interneurons **V3** jouent un rôle dans la précision et la régularité des patrons de décharge moteurs via leurs projections contralatérales en libérant du glutamate.

Le domaine **pMN** passe d'une différenciation neuronale en une différenciation gliale au stade E12,5 chez la souris et génère donc des motoneurons puis des oligodendrocytes (Zhou and Anderson, 2002).

1-2-2) Mise en place des différentes populations cellulaires nerveuses.

La mise en place des différentes populations est progressive au cours du développement et a été étudiée chez plusieurs organismes : poulet, rat, souris. Nous focaliserons ici notre attention sur le modèle murin puisque c'est celui-ci qui a été utilisé expérimentalement lors de ce travail de thèse.

En ce qui concerne les **motoneurons**, ils se localisent dans les cornes ventrales de la substance grise et au fur et à mesure de l'avancée de la vie embryonnaire, des groupes s'organisent formant des colonnes sur toute la hauteur de la ME (Fig. 6 et 2B). A ce jour, il

n'est pas possible de discriminer les futurs MNs alpha et gamma à des stades très précoces faute de marqueur spécifique à chaque population (Kanning et al., 2010).

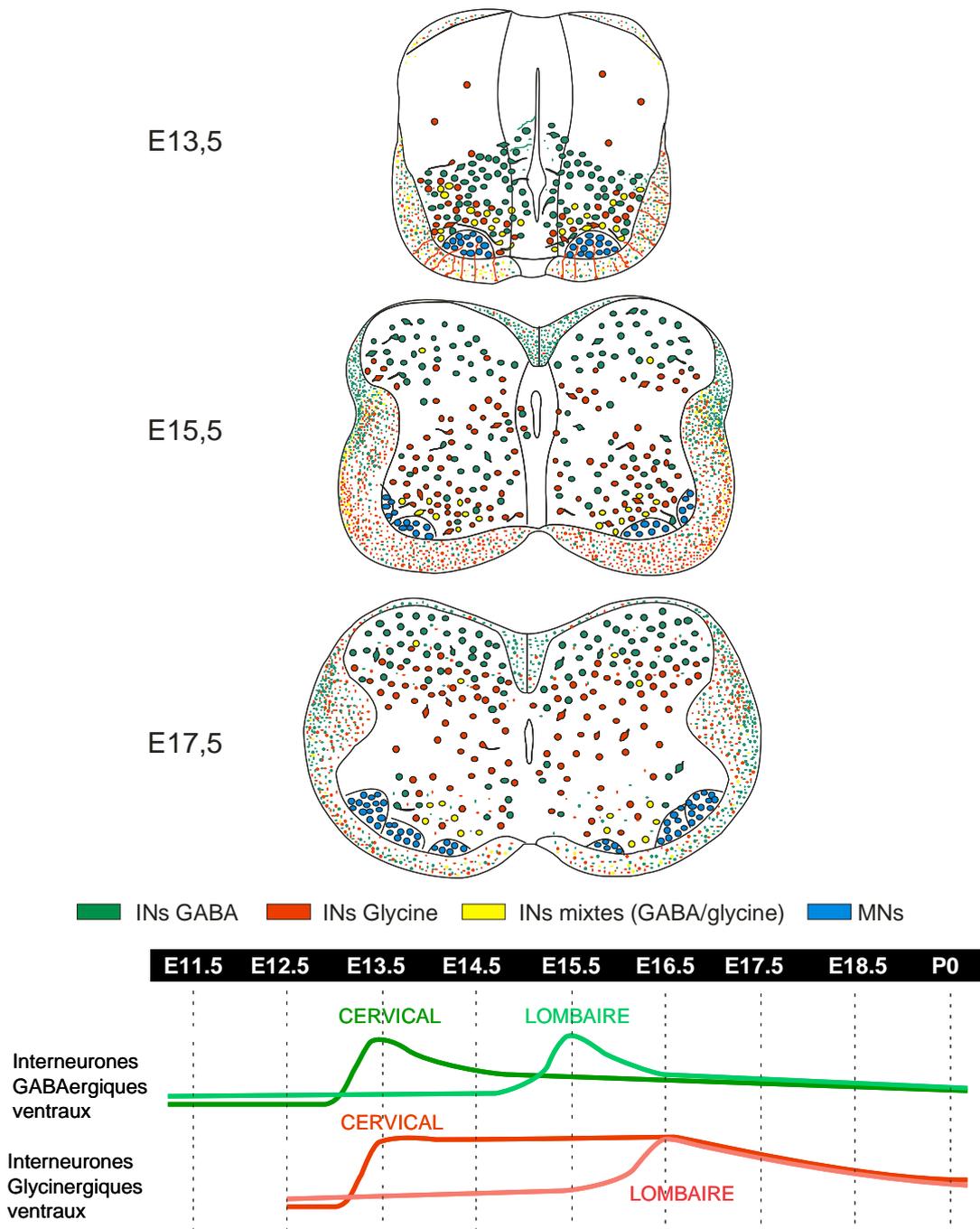


Fig. 6: Mise en place des INs GABA, glycine et des MNs dans la moelle épinière de souris lors de l'embryogenèse. Les corps cellulaires des différentes populations s'organisent progressivement dans la future substance grise à l'intérieur de la moelle avec les MNs situés exclusivement dans la partie ventrale. Les corps cellulaires des INs libérant du GABA et/ou de la glycine sont présents dans la partie ventrale au début du développement puis migrent vers la partie dorsale où ils acquièrent leur position finale. Autour de la substance grise centrale, les fibres s'organisent pour former la substance blanche. La maturation se fait aussi selon un axe rostro-caudal avec l'apparition des premiers INs dans la zone cervicale (*D'après Thèse AE-ALLAIN*).

Dans le cas des **interneurones**, le processus peut se décomposer en plusieurs étapes. Par des marquages immunohistochimiques sur des coupes transversales de moelles épinières de souris à différents stades de développement, il a été montré que les corps cellulaires des interneurones sont présents dans la partie ventrale de la substance grise pour les stades les plus précoces puis vont être progressivement détectés dans la partie dorsale qui est leur localisation finale (Fig. 6) (Allain et al., 2006). Au niveau de la moelle épinière lombaire, les interneurones libérant du GABA sont les premiers à être détectés au stade E12,5 et sont suivis par les interneurones glycinergiques un jour plus tard. Il est à noter que certains interneurones sont immunoréactifs pour ces deux neurotransmetteurs : ils sont dits mixtes (Allain et al., 2006, Jonas et al., 1998). En fin de vie embryonnaire, les corps cellulaires des interneurones libérant du GABA occupent les couches dorsales les plus superficielles alors que ceux libérant de la glycine sont plus en profondeur dans les cornes dorsales ce qui pourrait indiquer des implications différentes dans transmission de l'influx nerveux. Parallèlement à cette **maturation ventro-dorsale**, les interneurones se mettent aussi en place selon un **axe rostro-caudal**. Ainsi, il est observé un pic d'intensité des INs GABA/glycine à E13,5 au niveau cervical alors que dans la zone lombaire, il observé au stade E15,5 pour les INs GABA et E16,5 pour les INs glycine.

Pour l'instant, seule la disposition des corps cellulaires a été évoquée. Toutefois, la mise en place des différentes **extensions dendritiques et axonales** ne peut être due au hasard et est donc finement régulée par des molécules de guidage telles que les sémaphorines. Celles-ci se fixent sur les neuropilines et les plexines ce qui induit un signal de répulsion ou d'attraction sur les cônes de croissances des axones. La sémaphorine3A (SEMA3A) se lie préférentiellement à la neuropiline 1 (NRP1) alors que SEMA3F se lie à NRP2 (récepteurs présentés plus en détail dans la partie suivante). De même NRP1 est plus souvent associé avec la plexine A4 (PLXNA4) et NRP2 avec PLXNA3. L'attraction ou la répulsion des axones est la conséquence d'associations spécifiques entre les sémaphorines, les neuropilines et les plexines et de leur localisation dans le tissu (Schwarz and Ruhrberg, 2010). La surexpression ou la suppression de NRP1 provoquent des défauts de projection des nerfs (Kitsukawa et al., 1997; Kitsukawa et al., 1995). Ces effets sont dus à la liaison des sémaphorines (SEMA3A ou 3C) sur NRP1 car la mutation sur ce récepteur de leur site de fixation conduit des projections anormales des neurones sensoriels dans les moelles épinières d'embryons (E14,5, (Gu et al., 2003). D'autres facteurs sont nécessaires à la bonne projection des axones avec notamment les intégrines présentes dans la membrane et leurs interactions avec des composants de la

matrice extracellulaire tels que le Collagène IV, la laminine, la fibronectine, les tenascines C et R. Le système des éphrines et leurs récepteurs, ainsi que les netrines sont impliqués eux aussi dans le développement et la régénération tissulaire suite à des traumatismes (McCormick and Leipzig, 2012).

Si de nombreux facteurs trophiques sont impliqués dans la mise en place du réseau, l'activité électrique qui s'y propage est partie prenante dans les processus de développement de la moelle épinière.

1-2-3) Mise en place des activités dans le réseau moteur.

De même que les populations cellulaires se mettent progressivement en place dans la moelle épinière, la libération de neurotransmetteurs et les activités du réseau apparaissent peu à peu dans les réseaux moteurs. Dès le stade E10,5, des activités sont détectées sous forme de bouffées de potentiels d'action dans le rhombencéphale d'où partent plusieurs nerfs dont le nerf vague et le nerf facial (Abadie et al., 2000). Ces résultats ont aussi été trouvés chez les embryons de poulet pour des stades équivalents avec un décalage de 1 ou 2 jours (Fortin et al., 1999). Dans la moelle épinière de souris, des **activités rythmiques spontanées** se propagent dans le réseau très précocement et ce avant l'apparition des synapses chimiques. Ce sont des bouffées qui sont dues à des mouvements calciques. Elles favorisent l'extension des neurites au niveau des cônes de croissance. Suite à la formation des synapses chimiques, les activités spontanées sont régulées notamment dans leur synchronie. L'enregistrement électrophysiologique de racines ventrales a permis de montrer que les premières activités sont régulières, synchrones et apparaissent dès le stade E11,5. Au stade E14,5, des bouffées courtes (de 3 à 4 secondes) cohabitent avec des bouffées plus longues (10 à 20 secondes). Au stade E15,5, ces activités spontanées disparaissent pour revenir au stade E17,5 mais ont un phénotype plus irrégulier, erratique (Fig.7) (Branchereau et al., 2002).

La mise en place des **activités de type locomoteur** (induites par la présence de sérotonine) est elle aussi progressive et se déroule en 3 étapes. Tout d'abord, aux stades E11,5 et E13,5 les activités mesurées sur les paires de racines sont synchrones entre les cotés droit et gauche. Ensuite, au stade E14,5 ces activités deviennent irrégulières et asynchrones. Enfin, au stade E17,5, l'alternance stricte entre les racines ipsi- et contra-latérales est observée (Fig. 7) ce qui permet une bonne coordination gauche/droite dans les mouvements (Branchereau et al., 2000; Yvert et al., 2004).

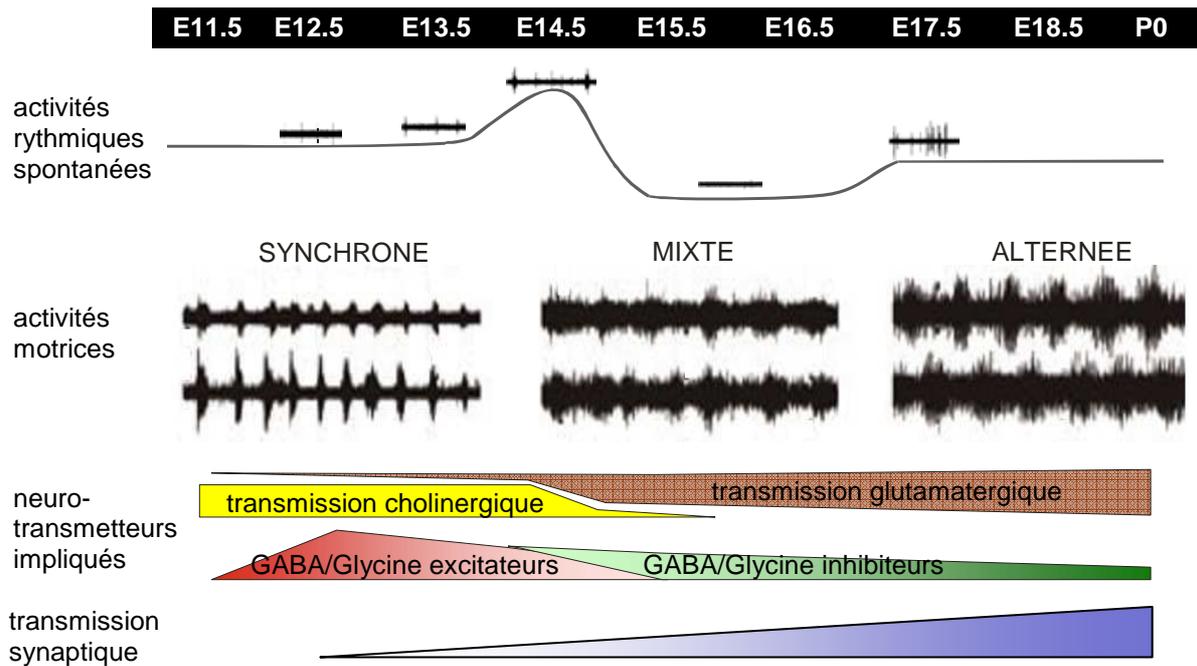


Fig. 7: Mise en place des activités dans la moelle épinière de souris lors de la vie embryonnaire. La moelle épinière est le siège d'activités rythmiques spontanées dès le stade E11,5. Elles sont alors lentes et se propagent le long de la moelle. Les activités de type locomoteur qui sont synchrones au début du développement deviennent progressivement alternées. La transmission synaptique se met elle aussi progressivement en place avec une transmission GABA et Glycinergique qui est initialement excitatrice puis qui bascule vers des effets inhibiteurs vers la fin de la vie embryonnaire alors que les activités liées à la libération de glutamate sont de plus en plus présentes (D'après Allain 2010).

Les activités électriques spontanées sont dues à une **transmission synaptique** qui est majoritairement excitatrice dans les stades précoces du développement embryonnaire. Il a été démontré que la libération de GABA et de glycine a des effets excitateurs au début de leur signalisation (E13,5) puis s'opère un basculement vers des effets inhibiteurs (E17,5) tels qu'ils sont connus dans un système adulte (Fig. 7) (Sibilla and Ballerini, 2009). En effet, au cours du développement, la répartition des ions de part et d'autre de la membrane plasmique n'est pas identique à celle observée chez l'adulte. Ainsi, l'ouverture des récepteurs canaux au GABA et à la glycine permet toujours le passage des ions chlorure mais dans le sens inverse d'où les effets excitateurs au lieu d'inhibiteurs.

Les transmissions GABAergiques et glycinergiques ne sont pas les seules présentes dans la ME. En effet, il a été observé des activités cholinergiques (excitatrices) qui sont présentes dès le début de l'apparition des activités nerveuse (Myers et al., 2005). Cette transmission diminue à partir du stade E14,5. C'est à ce moment que les activités glutamatergiques excitatrices apparaissent pour devenir prépondérantes et prendre le relais

des activités GABA/glycinergiques dont la bascule vers des effets inhibiteurs se met progressivement en œuvre.

Le GABA peut se fixer sur 2 types de récepteurs : les récepteurs canaux de type A (ou GABA_AR) qui laissent passer les ions chlorure (récepteurs ionotropiques) et les récepteurs de type B ou GABA_BR qui, par l'intermédiaire de protéines G (récepteurs métabotropiques), sont reliés à des canaux laissant passer les ions calcium et potassium. Récemment les GABA_C ont été décrits dans la rétine et certaines structures du SNC. Ils laissent passer les ions chlorure mais sont encore assez mal étudiés à l'heure actuelle (Allain et al., 2011). Dans le cadre de cette thèse, ce sont les **GABA_AR** qui nous intéressent. Les récepteurs activables sont formés par l'association de 5 sous-unités issues de la combinaison des 16 éléments décrits à ce jour ($\alpha 1-6$, $\beta 1-3$, $\gamma 1-3$, δ , ϵ , θ et π). L'assemblage le plus fréquent chez l'adulte est composé de 2α , 2β et 1γ . Chacune des sous-unités est une protéine avec 4 domaines transmembranaires, le second permettant la formation du canal. Le ligand se fixe sur la sous-unité de type alpha alors que la sous-unité gamma permet la localisation au niveau du bouton post-synaptique via sa fixation à la gephyrin. A l'image de ce qui est décrit pour les INs, les transcrits des différentes sous-unités apparaissent selon un axe ventro-dorsal. Ces éléments sont aussi présents chez l'adulte à l'exception de la sous-unité $\alpha 3$ dont l'expression s'estompe avec le temps (Allain et al., 2011).

Les récepteurs glycinergiques (**GlyRs**) permettent eux aussi le passage des ions chlorure. Il est assez largement convenu qu'à des stades précoces ils sont formés par l'association de 5 sous-unités $\alpha 2$ et vont progressivement être remplacés par des récepteurs de forme hétéromérique ($\alpha 1$ ou $\alpha 3$ associés avec β) (Le-Corronc et al., 2011).

Les récepteurs glutamatergiques sont divisés en 2 grands groupes : ionotropiques (iGluRs : AMPA et kaïnate) et métabotropiques (mGluRs : NMDA). Les récepteurs **NMDA** laissent passer les ions calcium et potassium. Leur activation dépend de la fixation du glutamate mais aussi du potentiel de membrane (une dépolarisation entraîne le déplacement des ions magnésium constitutivement inhibiteurs). Ces récepteurs sont recrutés pour les réponses à long terme au glutamate et sont impliqués dans les phénomènes d'excitotoxicité. Les récepteurs **AMPA et kaïnate** laissent passer les ions potassium et sodium et sont responsables de la transmission excitatrice rapide. Ils sont composés par l'association de 4

sous unités (GluA1-4 pour AMPA et GluK1-5 pour kaïnate) (Gielen, 2010, Kumar and Mayer, 2012).

Parallèlement à sa mise en place, le tissu spinal doit être vascularisé. Des vaisseaux se forment progressivement selon des mécanismes précis qui sont l'objet de la partie suivante.

II) Les vaisseaux : anatomie, formation et facteurs régulateurs.

2-1) Anatomie vasculaire et formation de nouveaux vaisseaux.

A l'image du système nerveux avec les circuits moteurs et sensoriels, le système vasculaire présente des voies efférentes qui apportent du sang oxygéné et des nutriments aux tissus via les artères et des voies afférentes, les veines, qui repartent de ces mêmes tissus en transportant du sang riche en dioxyde de carbone et déchets métaboliques. Leurs parois sont composées de plusieurs éléments dont la présence varie selon la taille du vaisseau considéré. Les cellules endothéliales, entourées de tissu conjonctif vers l'extérieur du vaisseau, forment une simple couche de cellules qui tapisse la lumière du vaisseau (tunique intima). Les capillaires, qui sont les vaisseaux de diamètre le plus petit, sont formés uniquement de cette couche protégée par la lame basale ce qui facilite les échanges entre le sang et le tissu. Pour les vaisseaux de calibre plus important, la couche de cellules endothéliales est recouverte d'un 'mur' de cellules musculaires qui vont protéger le vaisseau et jouer sur sa contraction ou dilatation (tunique média). Contrairement aux cellules endothéliales, les cellules murales peuvent être superposées sur plusieurs couches avec la présence de fibres de collagène et d'élastine. Elles vont permettre au vaisseau d'être plus ou moins contracté. Les vaisseaux de très gros calibre ont aussi une couche de tissu conjonctif qui permet l'ancrage dans le tissu environnant (tunique externe) (Fig. 8).

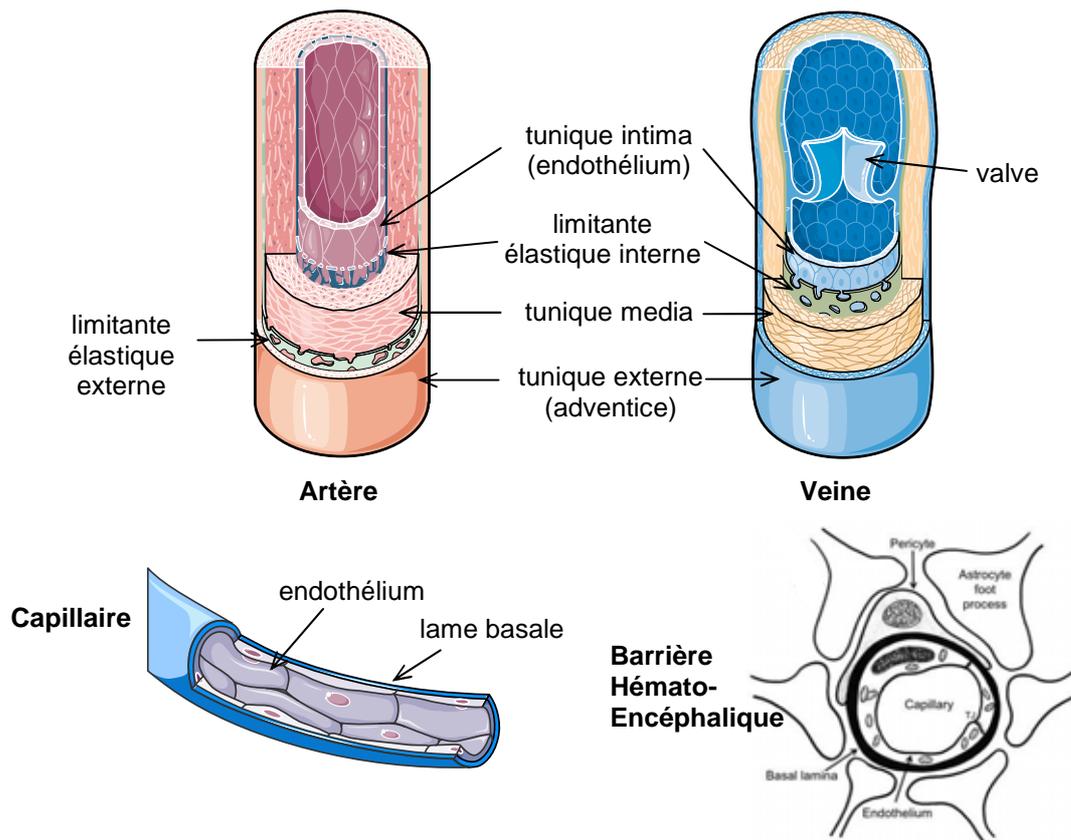


Fig. 8: Anatomie des vaisseaux sanguins et de la Barrière Hémato-Encéphalique. Tous les vaisseaux sanguins sont composés au minimum d'une couche de cellules endothéliales (endothélium). Selon le calibre du vaisseau, cette couche sera recouverte de couches successives plus ou moins élastiques permettant de moduler leur diamètre. Les capillaires étant le lieu d'échanges entre le sang et les tissus, leur paroi ne comporte que la couche de cellules endothéliales (*Images Servier Medical Art*). Dans le système nerveux, les échanges se font au travers de la barrière hémato-encéphalique afin de mieux les maîtriser. Elle est composée des cellules endothéliales scellées entre elles par des jonctions serrées (tight junction, TJ), de la lame basale, des péricytes et des astrocytes (*Bartanusz 2011*).

Dans le système nerveux central, la communication entre le sang et le tissu se fait via une structure spécifique : la **Barrière Hémato-Encéphalique**. Alors que dans les autres organes les transferts se font entre les cellules endothéliales ou au travers de leur paroi, la fragilité des cellules nerveuses nécessite une diffusion contrôlée des éléments échangés. Quatre éléments forment cette structure : les cellules endothéliales, la lame basale, les péricytes et les astrocytes (Fig. 8). Cette barrière se distingue par l'absence de fenestrations, la présence de jonctions serrées entre les cellules endothéliales formant une ceinture infranchissable sinon au travers de celles-ci. Pour atteindre les neurones, les éléments dans le sang doivent passer au travers des cellules endothéliales, de la lame basale, parfois des péricytes, et sont captés au niveau des terminaisons des astrocytes qui entourent les capillaires ('astrocyte foot process' en anglais). La présence de glycogène a été décrite dans la ME (alors

que ce dépôt n'est pas observé dans le cerveau). Par ailleurs, la perméabilité est un peu plus importante (Interferon α et γ) au niveau de la ME ceci étant probablement dû à une diminution de l'expression des protéines formant les jonctions entre les cellules (Bartanusz et al., 2011).

Deux mécanismes sont décrits pour la formation des vaisseaux. La **vasculogenèse** est le premier processus qui permet d'obtenir des vaisseaux lors du développement embryonnaire. Des précurseurs endothéliaux (angioblastes issus du mésoderme) vont se regrouper en îlots pour ensuite former progressivement un réseau primitif composé de capillaires plutôt instables (Risau and Flamme, 1995). Ce phénomène est essentiel dans les premiers instants de la vie embryonnaire mais est aussi présent chez l'adulte.

Une fois ce premier réseau formé, celui-ci va évoluer, se développer, coloniser tout l'organisme, se stabiliser et se spécialiser progressivement (artère/veine).

La formation de nouveaux vaisseaux à partir du réseau pré-existant est nommée **angiogenèse**. Deux grands mécanismes ont été décrits : par bourgeonnement ou par intussusception. L'**angiogenèse intussusceptive** se déroule en plusieurs étapes. Dans le réseau de capillaires déjà formé, des cellules endothéliales de bords opposés d'un vaisseau vont entrer en contact. Les jonctions cellulaires vont se réorganiser et des cloisons vont ainsi se former progressivement à l'intérieur du capillaire. Au niveau de cette zone de jonction, la surface extérieure du vaisseau va former une gouttière dans laquelle les péricytes vont se loger et peu à peu fenestrer les cloisons formées par les cellules endothéliales. Les 2 capillaires vont finalement être séparés et être maturés par le recrutement de cellules murales. (Djonov et al., 2000, Styp-Rekowska et al., 2011). L'intussusception est plus rapide et plus économe en énergie que le second mode d'angiogenèse car il s'agit d'un réarrangement du réseau des capillaires et non de la formation *de novo* d'une nouvelle branche du réseau.

L'**angiogenèse par bourgeonnement** se déroule en plusieurs étapes (Bouis et al., 2006). Les cellules trop éloignées des vaisseaux, et donc ayant des apports insuffisants en oxygène et nutriments, vont sécréter dans le milieu extracellulaire des signaux pro-angiogéniques. Ce message va être perçu par une cellule endothéliale d'un capillaire voisin ce qui va provoquer de nombreux changements intra et extracellulaires (Fig. 9b). Cette cellule va se désolidariser de ses voisines en perdant les jonctions cellule/cellule, acquérir un phénotype invasif et motile et sécréter des facteurs permettant la dégradation de la matrice extracellulaire environnante : ces cellules sont appelées « tip cells ». Elles ont des filopodes qui sont des

capteurs du signal pro-angiogénique pour les guider vers la zone à irriguer (en suivant le gradient de concentration des facteurs pro-angiogéniques). Derrière les « tip cells », d'autres cellules endothéliales (« stalk cells ») la suivent en proliférant et migrant, formant ainsi le début d'un nouveau vaisseau tout en gardant le contact avec le vaisseau originel (Fig. 9c). Lorsque la « tip cell » rencontre un autre vaisseau (ou une autre « tip cell ») elle perd ses caractéristiques motiles, des jonctions vont s'établir et le tube nouvellement formé peut laisser passer le flux sanguin (Herbert and Stainier, 2011).

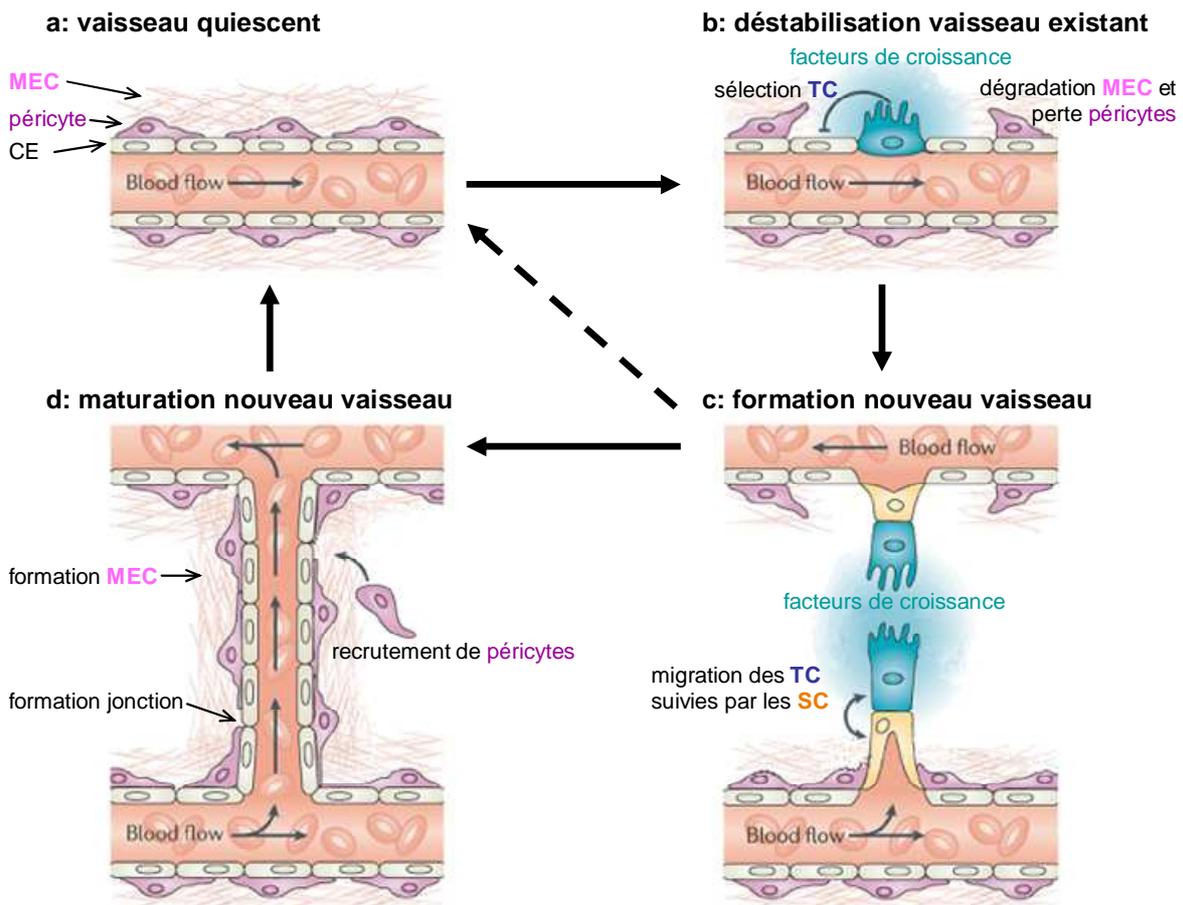


Fig. 9: Etapes de l'angiogénèse par bourgeonnement. La présence d'un signal pro-angiogénique déstabilise un capillaire existant (b). Une cellule endothéliale va se spécialiser et migrer vers ce signal ("tip cell" en bleu) en entraînant d'autres cellules endothéliales à sa suite ("stalk cell", en jaune) (c). Lorsque la jonction est établie entre les nouveaux vaisseaux celui-ci est stabilisé par la formation de jonctions serrées et le recrutement de péricytes ainsi que la formation de matrice extracellulaire afin que le sang puisse passer dans ce nouveau vaisseau (d). L'absence de stabilisation entraîne la régression du vaisseau néo-formé et donc le retour au réseau vasculaire quiescent originel (flèche en pointillés). CE: cellule endothéliale, MEC: matrice extracellulaire, SC: 'stalk cell', TC: 'tip cell' (modifié d'après Herbert 2012).

A ce stade plusieurs devenir sont possibles. Si le signal pro-angiogénique est encore présent en quantité importante, une nouvelle branche se forme. L'autre possibilité est que ce signal soit de nouveau à son niveau basal. Pour perdurer, le vaisseau doit être stabilisé sinon il

va régresser puis disparaître. La stabilisation de vaisseaux passe par la sécrétion de la membrane basale et le recrutement de cellules murales autour de celui-ci (péricytes ou cellules musculaires lisses) (Fig. 9d). Les cellules endothéliales formant le vaisseaux stabilisé sont quiescentes, alignées à l'image d'un pavage et sont parfois appelées 'phalanx cells' (De Smet et al., 2009).

Chacune de ces étapes est sous la dépendance de facteurs multiples. La modification de leur équilibre en faveur des facteurs pro ou anti-angiogéniques permet respectivement l'augmentation ou la régression du réseau vasculaire. Le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF ou facteur de croissance de l'endothélium vasculaire) est le facteur pro-angiogénique majeur et essentiel aussi bien dans la vasculogénèse que dans l'angiogénèse. Il permet l'activation des « tip cells », la prolifération et la migration des cellules endothéliales pour former le nouveau vaisseau (Bouis et al., 2006). La spécialisation en « tip cell » et « stalk cell » est liée à la voie Notch/dll4. L'orientation et la migration des « tip cells » sont assurées par de nombreuses molécules de guidage (neuropilines, netrines et récepteurs associés, Slit et leurs récepteurs Robo, ...). La stabilisation des vaisseaux est sous la dépendance du système Angiopoietin/Tie et du Platelet Derived Growth Factor B, PDGFB (prolifération et migration des péricytes) (Rossant and Howard, 2002). Le flux sanguin a aussi une importance sur la stabilisation des vaisseaux car en absence de circulation sanguine, les vaisseaux régressent (Styp-Rekowska et al., 2011). L'acquisition du phénotype artériel ou veineux est liée à l'expression de facteurs du système ephrin/Eph (éphrine B2 dans les artères et EhpB4 dans les veines) et du système Notch (Rossant and Howard, 2002, Bouis et al., 2006). D'autres protéines sont associées à l'angiogénèse en modulant l'expression des acteurs principaux comme le VEGF par exemple (Fibroblast Growth Factor FGF, Hepatocyte Growth Factor HGF, ...) (Bouis et al., 2006).

Pour former les nouveaux vaisseaux, les cellules endothéliales doivent se déplacer dans le tissu. De ce fait, tous les facteurs permettant la dégradation, ou le maintien, de la matrice extracellulaire qui forme la lame basale sont importants (protéases, intégrines, ...) pour la formation de néo-vaisseaux (Ghajar et al., 2008). De plus, la dégradation de la matrice permet la libération dans le milieu de facteurs de croissances comme le VEGF, FGF entre autres et favorise donc la formation de nouveaux vaisseaux (Belotti et al., 2011).

Lors de ce travail de thèse nous avons focalisé notre attention sur le système VEGF.

2-2) Famille du VEGF et des récepteurs associés.

Le système VEGF/VEGFR comprend plusieurs ligands et plusieurs récepteurs. A ce jour, du côté des ligands, les VEGF-A, -B, -C, -D, -E et -F et les Placental Growth Factors 1 à 4 (PIGFs) ont été décrits, avec pour certains d'entre eux des épissages alternatifs et des clivages protéiques aboutissant à la production de plusieurs isoformes pour un même membre. Les récepteurs sont classés en deux catégories : les récepteurs à activité tyrosine kinase (ou VEGFRs) et les neuropilines (NRPs). Les ligands et les récepteurs ont des homologies plus ou moins importantes qui sont développées dans les paragraphes suivants.

2-2-1) Le Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGFA ou VEGF).

Le VEGFA est la forme la plus connue de cette famille et est l'objet de cette étude. Ce facteur est par ailleurs souvent abrégé sous le nom de VEGF. L'ARN messager qui résulte de la transcription subit des épissages alternatifs et la protéine peut aussi être clivée. C'est ainsi que plusieurs isoformes du VEGFA humain ont été décrites à ce jour : VEGFA111, 121, 145, 148, 162, 165, 183, 189 et 206. Ces isoformes sont nommées ainsi par rapport au nombre d'acides aminés qu'elles comprennent. Selon les variants d'épissage et de clivage, ce facteur est une glycoprotéine de 34 à 46kDa. L'exon 1 (avec 4 acides aminés de l'exon 2) correspond à la séquence signal qui sera clivée par la suite pour la sécrétion. Les exons 2 à 5 sont présents dans toutes les isoformes et permettent de coder pour les sites de fixation aux récepteurs. Les exons 6 et 7 sont le lieu d'épissages alternatifs qui vont aboutir à la formation des différentes isoformes (Fig. 10). Ces exons codent pour des séquences d'acides aminés basiques qui confèrent les propriétés de fixation aux héparanes sulfates responsables de la rétention des formes les plus longues (189 et 206) dans la matrice extracellulaire proche de la cellule sécrétrice. A contrario, la forme de 121 acides aminés, qui ne contient pas ces sites est la plus diffusible. La formation de gradient de concentration de facteurs pro-angiogéniques est essentielle pour la formation des nouveaux vaisseaux. Or, si les facteurs angiogéniques restent dans la proximité immédiate des cellules qui le sécrètent ou au contraire diffusent librement dans tout le tissu, ce gradient ne peut pas s'établir. En combinaison de la disponibilité et de la diffusion des différentes isoformes du VEGF, il est admis que c'est la forme 165 qui a les effets pro-angiogéniques les plus marqués (Takahashi and Shibuya, 2005).

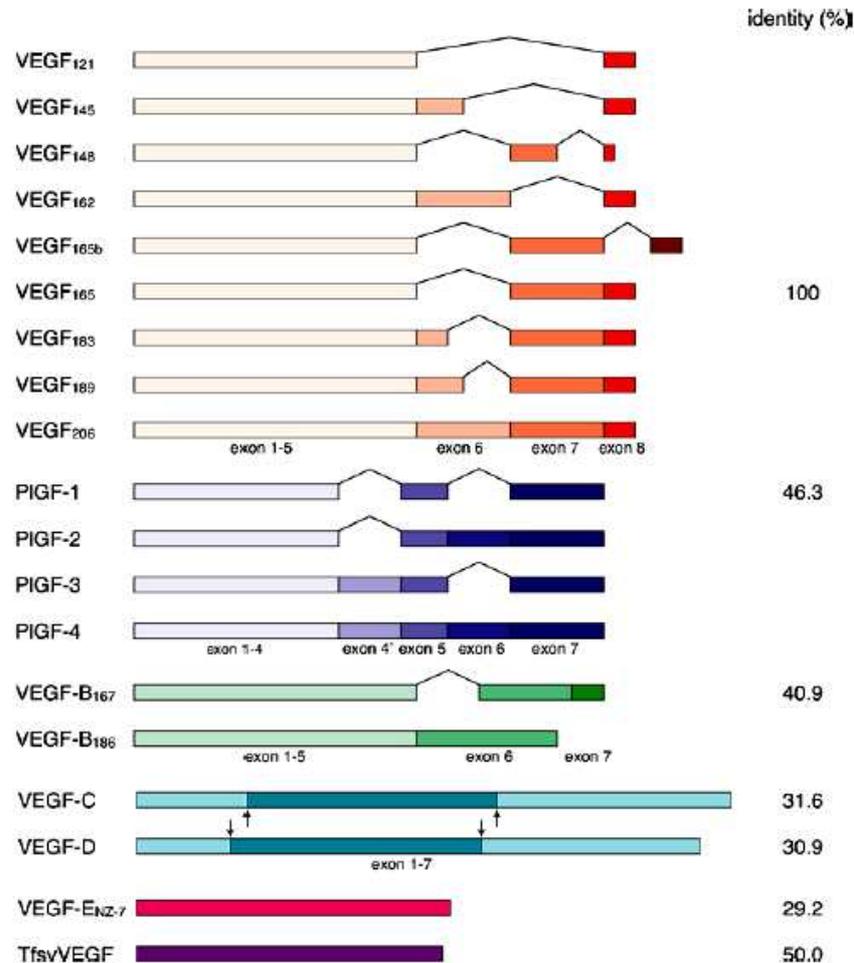


Fig. 10: Les ligands de la famille du VEGF. Les différents ligands de la famille du VEGF présentent des analogies exprimées en pourcentage par rapport au VEGF-A₁₆₅. Il est à noter que seul le VEGF₁₆₅ est présenté avec les formes a et b mais les variants d'épissage de l'exon 8 (forme b) sont retrouvés pour toutes les formes du VEGF(A). Les VEGFC et D sont sécrétés sous forme de preprotéines et sont clivés pour être actifs (site de clivage indiqués par les flèches). Les VEGF-F (TfsvVEGF) présentent des différences selon le serpent dont ils sont issus (*D'après Takahashi et Shibuya, 2005*).

Toutes ces isoformes peuvent être séparées en 2 groupes : VEGF_{xxx^a} et VEGF_{xxx^b} suite à l'épissage alternatif de l'exon 8 modifiant les 6 derniers acides aminés de la partie C-terminale. Ces formes xxx^b ne sont pas encore très connues à ce jour car techniquement peu souvent distinguées des formes xxx^a (Grunewald et al., 2010, Lodomery et al., 2007). Cependant, il semblerait que leur affinité pour les récepteurs soit identique mais avec des effets plutôt anti-angiogéniques (Woolard et al., 2004, Konopatskaya et al., 2006).

Le VEGFA peut se fixer sur plusieurs récepteurs avec une activité tyrosine kinase : le VEGFR1 et le VEGFR2. Il peut aussi se fixer sur les neuropilines 1 et 2 (Takahashi 2005).

Pour étudier l'influence de ce facteur sur le développement de l'organisme dans sa globalité, des modèles de souris génétiquement modifiées ont été mis en place avec des phénotypes sévères pour la plupart des conditions. Deux études concomitantes ont montré en 1996 que la délétion de toutes les isoformes dans tout l'organisme est létale *in utero* car les embryons ne dépassent pas le stade E10,5 (Carmeliet et al., 1996) ou E11 (Ferrara et al., 1996). Par ailleurs, il est à noter que la délétion d'un seul allèle est suffisante pour aboutir à ce phénotype : il y a **haploinsuffisance**. Les embryons présentent de nombreuses anomalies : vaisseaux moins développés, immatures et non connectés au cœur (Carmeliet et al., 1996). Plusieurs organes ont un développement retardé : cerveau, bourgeons des membres, cœur, aorte dorsale (Ferrara et al., 1996). Dans ces 2 études, la vascularisation du sac embryonnaire est affectée avec l'absence de gros vaisseaux collecteurs et un réseau désorganisé de petits vaisseaux.

Afin de déterminer l'importance et le rôle de façon plus précise des différentes isoformes, des souris ont été génétiquement modifiées pour n'exprimer que l'une d'entre elles. Ces études ont permis de démontrer que la présence ou l'absence de chacune des isoformes est associée à un phénotype particulier. La moitié des souris exprimant que la **forme 120** du VEGF meurt dès la naissance. Bien que les 50% restants soient de même poids à la naissance que les animaux sauvages de la même portée, les souris vont végéter, devenir léthargiques et mourir avant 14 jours. Si d'autres organes sont atteints, le cœur semble être le plus affecté par l'absence des isoformes les plus longues du VEGF (Carmeliet et al., 1999). Les souris exprimant uniquement la **forme 188** du VEGFA, présentent une altération dans le développement artériel au niveau de la rétine ainsi que des malformations osseuses. Toutefois, la croissance des veines ne semble pas affectée (Ruhrberg et al., 2002, Maes et al., 2004). Les souris exprimant uniquement le **VEGF164** (équivalent murin du VEGF165 humain) se développent sans pathologie apparente confirmant ainsi l'hypothèse du rôle essentiel et majeur de la forme 165 du VEGF (Maes et al., 2004).

Le blocage de l'expression du VEGF (système inductible) chez la souris nouvellement née n'aboutit pas forcément à la mort des individus concernés mais il est observé une perte de poids (globale et de chaque organe) (Gerber et al., 1999). Ces effets sont observés majoritairement chez les jeunes animaux alors que l'angiogenèse est encore très présente. En effet, plusieurs approches ciblant le VEGF ou les récepteurs montrent une régression du réseau vasculaire (plus marquée dans le pancréas et la thyroïde), qui est réversible après l'arrêt du traitement (Kamba et al., 2006).

Des études se sont aussi intéressées aux conséquences d'un excès de VEGF. Jusqu'au stade E12,5, les embryons qui surexpriment ce facteur se développent normalement mais meurent dans les 2 jours suivants (E14,5). Des anomalies morphologiques sont observées au niveau du cœur (Miquerol et al., 2000).

L'absence ou l'excès de VEGF est donc létal lors de la vie embryonnaire, ce qui nécessite une **régulation** très fine de ce facteur.

Plusieurs mécanismes permettent de moduler l'expression du VEGFA. L'hypoxie est un inducteur majeur. En effet, un apport insuffisant en oxygène est synonyme d'éloignement des vaisseaux et va aboutir à un déplacement de la balance au profit des facteurs pro-angiogéniques. L'hypoxie entraîne un défaut d'hydroxylation de HIF1alpha. Ce facteur n'étant plus dirigé vers la machinerie de dégradation, il va pouvoir jouer son rôle de facteur de transcription en permettant l'expression accrue de nombreuses protéines dont le VEGF. D'autres stimuli sont capables de modifier l'expression du VEGF comme des facteurs de croissance, les œstrogènes, la TSH (Thyroid Stimulating Hormone) entre autres (Takahashi and Shibuya, 2005). La fixation de ces facteurs sur leurs récepteurs induit l'activation de voies telles que PI3K/AKT et Ras/Raf/MEK/ERK et donc le recrutement de facteurs de transcription (tels que sp1/AP-1/STAT3...) qui vont moduler l'expression du VEGF en se fixant sur le promoteur du gène (Essafi-Benkhadir et al., 2010, Pages and Pouyssegur, 2005). La stabilisation de son ARNm aux extrémités 5' et 3' est aussi un mode de régulation important (Levy et al., 1996, Dibbens et al., 1999, Coles et al., 2004).

Les modifications post-traductionnelles permettent de réguler le VEGF à l'image du clivage des formes les plus longues par diverses enzymes : plasmine (Houck et al., 1992), (Plouet et al., 1997), urokinase (Plouet et al., 1997) métalloprotéinases matricielles (MMPs, (Lee et al., 2005). De ce fait ces formes les plus longues retenues initialement dans la matrice extracellulaire peuvent aussi jouer un rôle dans l'angiogenèse après leur clivage.

2-2-2) Les autres ligands de la famille du VEGF.

- Le Vascular Endothelial Growth Factor B (VEGFB).

Le VEGFB a plusieurs formes (167 et 186) consécutives à l'épissage alternatif de son ARNm. Il présente une homologie moyenne de 41% avec le VEGFA (Fig. 10). Ce facteur est détecté dès le stade E8,5 dans les myocytes et le myotome (Aase et al., 1999). Il est retrouvé

dans les cellules musculaires lisses entourant les cellules endothéliales des vaisseaux, dans les muscles (squelettiques, cœur sauf endocarde) mais aussi dans les os en développement, le tissu adipeux brun et d'autres organes tel le pancréas. Quelle que soit la technique utilisée, aucun marquage n'est observé dans les cellules endothéliales des vaisseaux les plus larges aux capillaires. Ce profil d'expression laisse à penser que le VEGFB agit de façon paracrine puisque le VEGFR1, qui fixe ce facteur, est présent sur les cellules endothéliales. L'étude du VEGFB par une approche de délétion de gène chez la souris a abouti à des résultats plus ou moins similaires selon les publications, notamment sur le cœur et son fonctionnement (Bellomo et al., 2000, Aase et al., 2001, Karpanen et al., 2008, Li et al., 2008).

- Les Vascular Endothelial Growth Factors C et D (VEGFC et D).

Ces 2 membres se ressemblent et sont assez éloignés des autres ligands de cette famille de part leur faible homologie avec le VEGFA (environ 30%), due à leurs parties N et C terminales originales comparées aux autres facteurs. Ils sont synthétisés sous forme de preproteines et doivent subir deux clivages pour activer le VEGFR3 et le VEGFR2. Le VEGFC est aussi capable de se lier à la NRP2. Ces facteurs sont assez peu étudiés mais ils ont été démontrés comme primordiaux dans la formation des vaisseaux lymphatiques (ou lymphangiogenèse) (Haiko et al., 2008).

- Les Vascular Endothelial Growth Factors E (VEGFE).

Les VEGFE sont produits par une famille de virus (orf para-poxvirus) qui affecte les chèvres et les moutons. Ils présentent 25 à 35% d'homologie avec le VEGFA mais ne possèdent pas de site de fixation à l'héparine. Ils se fixent tous sur le VEGFR2, parfois sur les NRPs mais ne sont pas connus pour interagir avec les VEGFR1 et 3 (Grunewald et al., 2010, Takahashi and Shibuya, 2005).

- Les Vascular Endothelial Growth Factors F (VEGFF).

Plusieurs autres facteurs ressemblant au VEGF ont été regroupés sous le nom de VEGFF. Leur caractéristique commune est d'avoir été isolés à partir de venin de serpents. Leur affinité avec les différents récepteurs varie selon le serpent et ces facteurs sont décrits comme aggravant l'envenimation provoquant des hémorragies (Grunewald et al., 2010, Takahashi and Shibuya, 2005).

- Les Placental Growth Factors 1 à 4 (PlGF1 à 4).

Ces facteurs tiennent leur nom du fait que la première forme du PlGF a été initialement décrite dans le placenta. Depuis, il a été montré que leur expression n'est pas exclusive à cette structure puisque des transcrits ont été détectés notamment dans le cœur, les poumons, la glande thyroïdienne et les muscles squelettiques. Tout comme le VEGFA, des variants d'épissage ont été mis à jour. Le PlGF1 (PlGF131) est la forme la plus courte qui se lie au VEGFR1 mais ne se fixe pas à l'héparine. Le PlGF2 (PlGF152) par contre peut se fixer à l'héparine, aux NRP1 et 2 et au VEGFR1. Le PlGF3 (PlGF203), bien que plus long, ne peut pas se fixer à l'héparine car la séquence codant pour ce domaine n'est pas conservée après l'épissage. Le PlGF4 (PlGF224) est similaire au PlGF3 mais possède en plus ce domaine de fixation à l'héparine (commun au PlGF2) (Takahashi and Shibuya, 2005).

2-2-3) Les récepteurs des ligands de la famille du VEGF.

Les ligands (VEGFs et PlGFs) forment des homo- ou hétéro-dimères qui vont se fixer sur les récepteurs pour les activer. Ces récepteurs peuvent être classés en plusieurs catégories : les récepteurs au VEGF de type Tyrosine Kinase (VEGFRs) et les Neuropilines (NRPs).

2-2-3-a) Les récepteurs à activité Tyrosine Kinase (VEGFRs).

Les VEGFRs sont au nombre de 3 : VEGFR1 (autrement connu sous le nom de Flt1), VEGFR2 (ou KDR ou Flk1) et VEGFR3 (ou Flt4). Ce sont des glycoprotéines transmembranaires et, à l'instar de leurs ligands, ils ont des points communs. Ainsi, chaque monomère de ces récepteurs possède 7 domaines extracellulaires de type ImmunoglobulinG-like (Fig. 11). Le domaine 1 régule la fixation des ligands (VEGFs et PlGFs) sur les domaines 2 et 3. Le domaine 4 permet la dimérisation des récepteurs. Les VEGFRs ont un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire avec une activité kinase. L'activation des récepteurs nécessite leur dimérisation pour leur auto-transphosphorylation permettant le recrutement de partenaires pour l'activation des différentes voies de signalisation. Cependant, il est à noter quelques différences entre ces récepteurs. En effet, il a été observé des formes solubles du VEGFR1 correspondant à sa partie extracellulaire. De plus, le VEGFR3 possède des ponts disulfures dans le 5^{ème} domaine IgG like contrairement aux 2 autres récepteurs (Takahashi and Shibuya, 2005). Le détail des résidus composant chaque récepteur a été résumé dans (Roskoski, 2008).

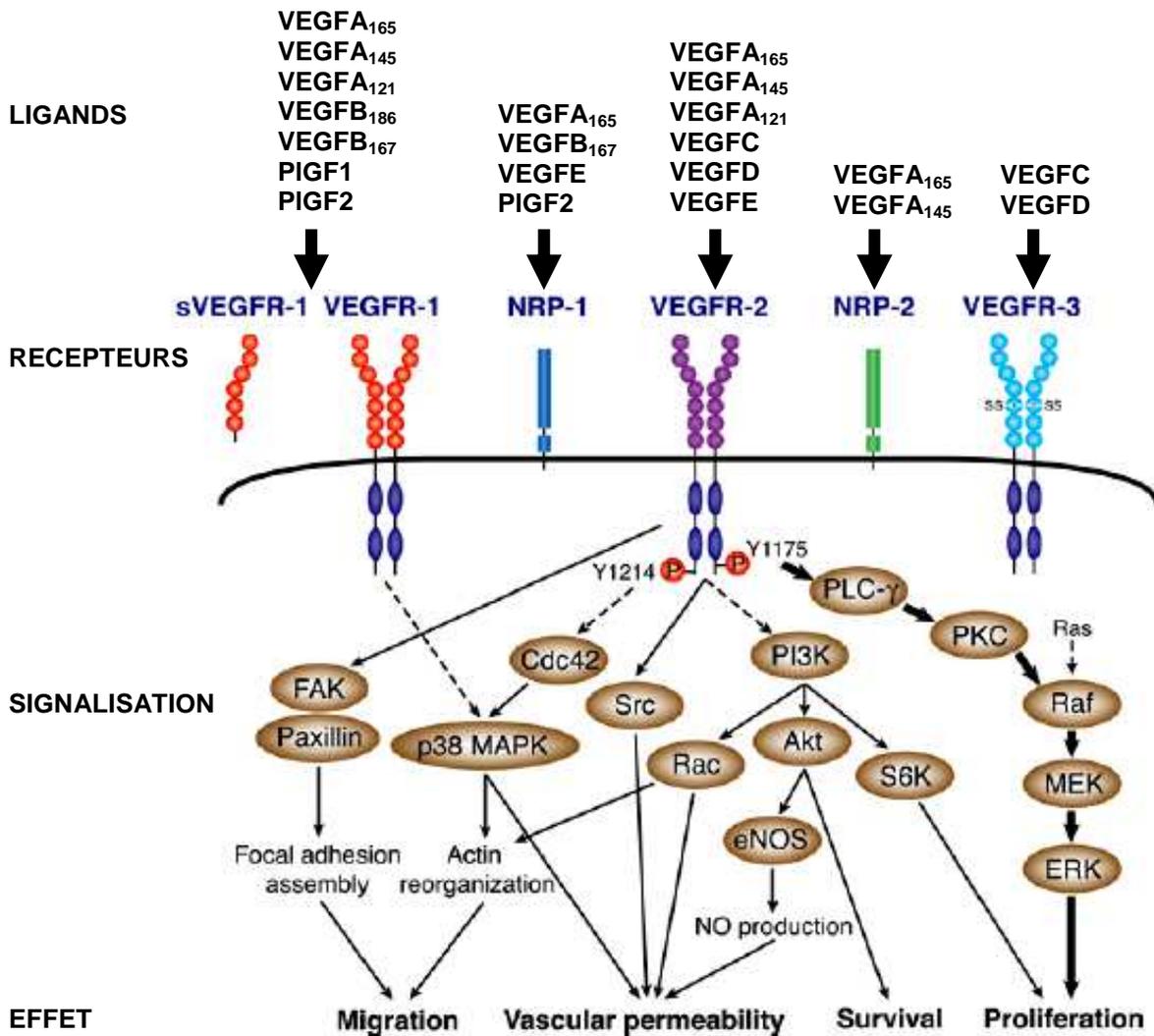


Fig. 11: Récepteurs de la famille du VEGF et voies de signalisation. Plusieurs types de récepteurs peuvent lier de différentes façons les nombreux ligands de la famille du VEGF. Les VEGFRs ont une activité kinase qui permet l'activation de voies multiples ayant des effets variés. Les neuropilines (NRPs) ne sont pas décrites pour avoir une signalisation cytoplasmique propre et sont le plus souvent considérées comme des co-récepteurs des VEGFRs. (D'après Takahashi 2005 et Zacchary 2005).

- Le Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 (VEGFR1 ou Flt1).

Le VEGFR1, ou Flt1 (Fms-like tyrosine kinase 1), est une glycoprotéine de 180kDa formée par une séquence de 1338 acides aminés chez l'Homme. La particularité de ce récepteur est qu'il a été trouvé une forme soluble qui correspond à la grande majorité de sa partie extracellulaire (Kendall et al., 1996). Ce récepteur fixe le VEGFA mais aussi le VEGFB et les PlGF1 et 2 (Fig. 11). Le VEGFR1 a une disposition classique dans sa partie extracellulaire. Cependant, juste après le domaine transmembranaire, il possède un domaine, dit juxta-membranaire, qui est un motif répresseur pour sa phosphorylation. Cet élément explique le faible taux de phosphorylation détecté malgré la forte affinité du VEGF pour le

VEGFR1 (Gille et al., 2000). Plusieurs résidus tyrosine peuvent être phosphorylés sur la partie intracellulaire : Y794, Y1169, Y1213, Y1242, Y1327 et Y1333 (Ito et al., 1998). Ils permettent le recrutement et l'activation de voies dépendantes de la phospholipase C gamma (PLCgamma), de NCK, de SHP2, de la sous-unité adaptatrice p38 de la PI3K entre autres (Takahashi and Shibuya, 2005, Olsson et al., 2006, Grunewald et al., 2010).

Tout comme pour les ligands, l'utilisation de souris génétiquement modifiées a permis de déterminer l'importance de ce récepteur dans l'angiogenèse à l'échelle de l'organisme entier. La délétion globale du VEGFR1 est létale dès le stade E8,5 de la vie embryonnaire pour les animaux homozygotes alors que les hétérozygotes sont viables et fertiles. Des cellules endothéliales sont présentes dans le réseau vasculaire primitif. Le VEGFR1 a donc un rôle dans l'organisation des vaisseaux mais n'est pas impliqué dans la différenciation des précurseurs endothéliaux (Fong et al., 1995). Dans un premier temps, le rôle de VEGFR1 a été restreint à une fonction indirecte de régulation de la croissance endothéliale et de l'assemblage vasculaire en stockant du VEGF pour le VEGFR2. En effet, les animaux exprimant uniquement les parties extracellulaires et transmembranaires du VEGFR1 (délétion de la partie intracellulaire) sont viables et fertiles avec un réseau vasculaire apparemment normal (poumons, cerveau, aorte dorsale) (Hiratsuka et al., 1998). Il semble toutefois nécessaire que le récepteur soit ancré à la membrane car la moitié des souris exprimant uniquement la forme soluble de VEGFR1 meurt dans les mêmes délais que celles ne l'exprimant pas du tout (Hiratsuka et al., 2005). Depuis, des études plus récentes montrent que le VEGFR1 joue un rôle direct dans la formation des vaisseaux et qu'il est un inducteur de l'angiogenèse tumorale (Hiratsuka 2001, revue Cao, 2009, Kearney et al., 2004) et de l'activation des macrophages (Murakami et al., 2006).

- Le Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 (VEGFR2 ou Flk1 ou KDR).

Le VEGFR2, ou Flk1 (Fetal liver kinase 1) ou KDR (Kinase insert Domain Receptor), est une glycoprotéine de 200kDa. Elle est exprimée de façon très prononcée dans les cellules de la lignée hématopoïétique, mais aussi dans de nombreux types cellulaires (cellules nerveuses, rétine). A l'exception du VEGFB, toutes les formes du VEGF peuvent se lier à ce récepteur (Fig. 11). De nombreux sites de phosphorylation ont été décrits : tyrosines Y951, Y1054, Y1059, Y1175 et Y1214, ... Le recrutement de divers adaptateurs (PLCgamma, Shb, p38, ...) induit l'activation de nombreuses voies de signalisation (PI3K, MAPK, PKC, ...)

impliquant le VEGFR2 dans la survie, la prolifération et la migration de cellules endothéliales (étapes clés de l'angiogenèse), ainsi que dans la perméabilité vasculaire (Olsson et al., 2006). La régulation de l'activité du VEGFR2 peut se faire via sa déphosphorylation directement par des phosphatases (Vieira et al., 2010) ou alors via son internalisation (puis sa déphosphorylation) dans des vésicules d'endocytose (Horowitz and Seerapu, 2012).

Le VEGFR2 est extrêmement important pour le développement embryonnaire. En effet, la délétion de ce récepteur est létale entre les stades E8,5 et E9,5 pour les souris homozygotes alors que les hétérozygotes se développent sans présenter d'anomalies (Shalaby et al., 1995). La délétion du VEGFR2 provoque l'absence de vaisseaux dans l'embryon et dans le sac embryonnaire. De même, aucune cellule de la lignée hématopoïétique n'est retrouvée. Le VEGFR2 est donc absolument nécessaire à la vasculogenèse et à l'angiogenèse. Des études plus fines ont montré que la mutation de la seule tyrosine 1175 (substitution par une phénylalanine en position 1173 chez la souris) aboutit au même phénotype létal *in utero* rendant ce site essentiel dans la signalisation de ce récepteur (recrutement de la voie PLCgamma) pour la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques et dans l'organisation des vaisseaux (Sakurai et al., 2005).

- Le Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3 (VEGFR3 ou Flt4).

Le VEGFR3, ou Flt4 (Fms-like tyrosine kinase 4), est une glycoprotéine de 195kDa (Cebe-Suarez et al., 2006). Son activation est consécutive à la fixation des VEGFC et D. Ce récepteur à un rôle prépondérant dans la lymphangiogenèse. La transduction du signal reste encore à explorer mais 5 sites de phosphorylation ont d'ores et déjà été identifiés (Dixelius et al., 2003). L'absence de ce récepteur est létale dès la vie embryonnaire (E12) suite à des défauts de vascularisation (Dumont et al., 1998). L'angiogenèse est toujours possible (présence des vaisseaux intersomitiques) mais le VEGFR3 est important pour le remodelage des vaisseaux primairement formés.

Ces récepteurs à activité tyrosine kinase ne sont pas les seuls à pouvoir lier les ligands de la famille du VEGF. En effet, ces derniers peuvent aussi se fixer sur les neuropilines (NRPs).

2-2-3-b) Les neuropilines (NRPs).

En 1998, Shay Soker et ses collègues ont identifié un autre récepteur du VEGF : la neuropiline 1 (NRP1). C'est une glycoprotéine de 130kDa qui comprend un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et une partie cytoplasmique relativement courte de 44 acides aminés (Schwarz and Ruhrberg, 2010). Une seconde neuropiline (NRP2) a été mise à jour et présente 44% d'homologie avec NRP1 (Chen et al., 1997). La partie extracellulaire est composée d'un domaine qui permet la dimérisation et l'interaction avec les autres récepteurs à la surface de la cellule et de 4 domaines essentiels pour la fixation des ligands. De part leur domaine cytoplasmique court, les neuropilines sont le plus souvent définies par un rôle de co-récepteurs avec les VEGFRs ou les plexines (signalisation des sémaphorines) comme cela est décrit dans le paragraphe 2-3 suivant. Considéré dans un premier temps comme non essentiel car sa délétion ne modifiait pas la signalisation induite par SEMA3A (autre ligand de NRP1, Nakamura et al., 1998), le domaine cytoplasmique est directement impliqué, après liaison du VEGF sur la NRP1, dans la migration des cellules endothéliales avec 3 acides aminés cruciaux en C-terminal (Wang 2006). Ce domaine peut recruter la synectine avec un rôle dans l'internalisation des récepteurs (Cai and Reed, 1999) mais il a été montré plus récemment que l'adaptateur c-Abl (protéine tyrosine kinase cytoplasmique) peut aussi se lier à NRP1 et avoir des conséquences sur la croissance tumorale (Yaqoob et al., 2012).

Hormis la forme 121, tous les variants d'épissage du VEGFA peuvent se lier aux neuropilines. Leur liaison à NRP1 est due aux séquences peptidiques codées par les exons 7 et 8a alors que la liaison à la NRP2 est due à celles codées par les exons 6 et 8a. Ces différences expliquent pourquoi le VEGFA165 et SEMA3A se fixent préférentiellement sur NRP1 alors que NRP2 lie aussi bien les VEGFA165 et 145 que SEMA3F.

La surexpression de **NRP1** est létale entre les stades E12,5 et E15,5 de développement embryonnaire avec des malformations vasculaires (dilatation des vaisseaux, nombre de capillaires plus important, zones hémorragiques). Les nerfs sont eux aussi désorganisés et leurs prolongements altérés (Kitsukawa et al., 1995). La suppression de NRP1 est elle aussi létale (E13,5) avec la formation d'un réseau vasculaire retardée et incomplète (Kawasaki et al., 1999). Le système nerveux est lui aussi touché dans sa vascularisation (Gerhardt et al., 2004) et les projections des nerfs (Kitsukawa et al., 1997). Les perturbations observées en absence ou excès d'expression de NRP1 confèrent à ce récepteur un rôle de régulateur dans

l'angiogenèse mais aussi dans la mise en place des nerfs. Il est à noter que les VEGFs et les sémaphorines ne se fixent pas sur les mêmes domaines extracellulaires avec pour conséquence une ségrégation des effets observés probablement due au contexte tissulaire et au recrutement de co-récepteurs spécifiques à chaque ligand (plexines, VEGFRs, ...). La suppression de l'expression de NRP1 uniquement dans les cellules endothéliales induit uniquement des défauts vasculaires. A l'inverse, l'inactivation sur NRP1 du site de fixation de la sémaphorine a des conséquences strictement neuronales (Gu et al., 2003, Vieira et al., 2007).

Peu de données sont publiées sur **NRP2**, néanmoins des études montrent que le KO est viable malgré des altérations sévères de son réseau lymphatique (Yuan et al., 2002). Le double KO (NRP1 et NRP2) est létal au stade E8,5 ce qui est un phénotype plus sévère que les KO isolés pour chacune des protéines (Takashima et al., 2002). Ces résultats montrent que ces 2 récepteurs sont nécessaires à la vasculogenèse et à l'angiogenèse et que leurs effets ne se compensent que partiellement. La mécanistique précise des voies activées et leur rôle d'adaptateur reste encore largement à élucider (Neufeld et al., 2002).

2-2-3) Modulation du signal induit.

Les récepteurs de type Tyrosine Kinase (VEGFRs) doivent être associés en dimères pour activer des voies de signalisation. Ils peuvent être sous forme homomérique ou hétéromérique (Fig. 12). La phosphorylation de VEGFR2 a été décrite comme réduite par l'association avec le VEGFR1 (Rahimi et al., 2000, Roberts et al., 2004) mais d'autres études ont montré des effets potentialisateurs de VEGFR1 sur l'activation de VEGFR2 (Carmeliet et al., 2001, Autiero et al., 2003).

De même, des co-récepteurs peuvent être recrutés avec ces dimères à l'image des NRPs, héparanes sulfates protéoglycanes (HSPG, l'héparine étant une forme particulière des HSPGs), VE-Cadhérine, ... (Cebe-Suarez et al., 2006). Ces différents recrutements et associations de co-récepteurs sont importants pour la modulation des voies induites suite à la fixation du ligand (Vieira et al., 2010). Par exemple, la NRP1 augmente la phosphorylation de VEGFR2 et donc potentialise la migration des cellules endothéliales (Zachary, 2011).

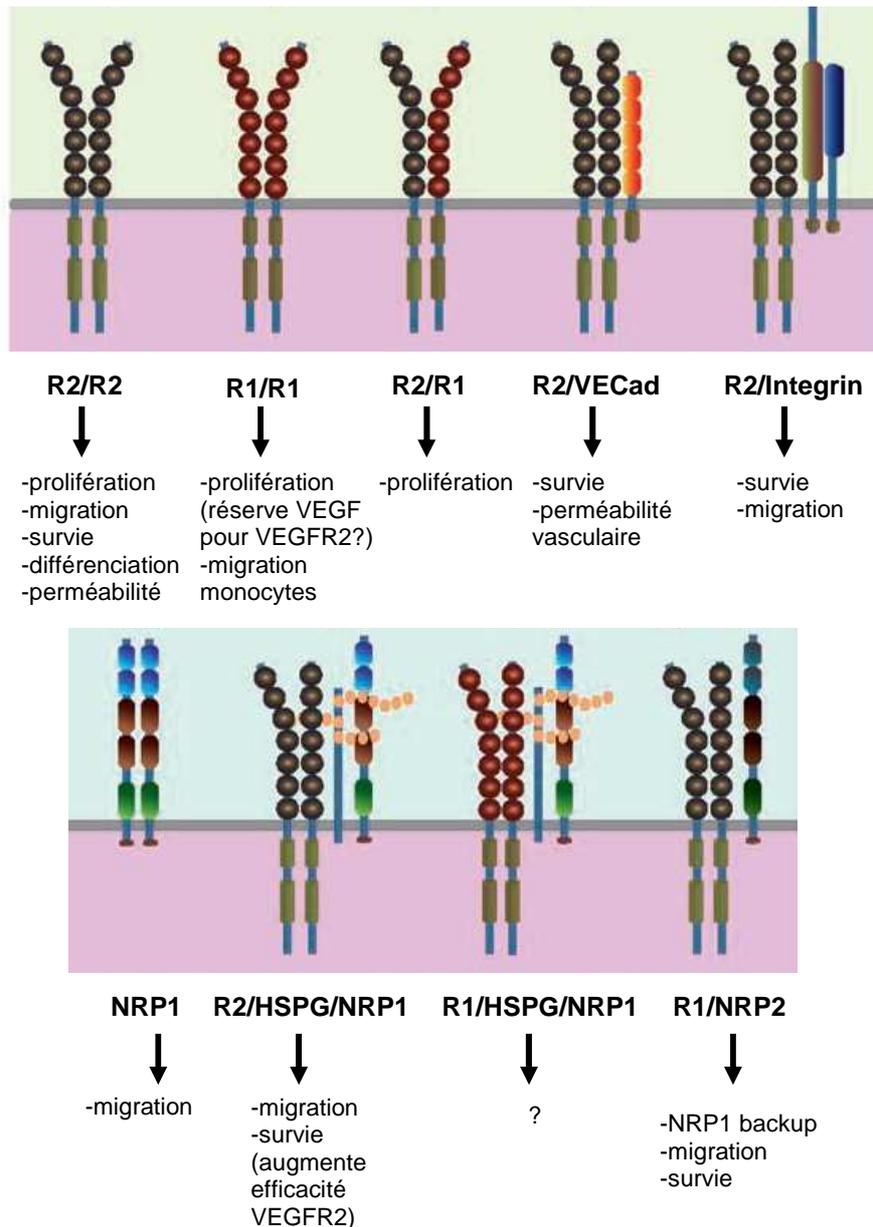


Fig. 12: Interactions récepteurs et co-récepteurs dans la signalisation du VEGF. Plusieurs associations de récepteurs peuvent se produire avec un large éventail d'effets qui ne sont pas tous encore décrits à ce jour. Les effets présentés ici sont ceux observés sur l'angiogenèse et donc les cellules endothéliales sauf indications contraires. *R2*: VEGFR2; *R1*: VEGFR1; *NRP1*: neuropiline 1; *NRP2*: neuropiline 2; *VECad*: VE-cadherin; *HSPG*: Heparan sulfate ProteoGlycan (modifié d'après Vieira 2010).

De plus, certains ligands peuvent entrer en compétition pour des récepteurs (PIGF et VEGF sur le VEGFR1) ce qui contribue aussi au recrutement des différentes voies de signalisations, probablement en lien avec des changements de conformation ou de recrutement de co-récepteurs (Eriksson et al., 2002, Mac Gabhann and Popel, 2004, Autiero et al., 2003). Ces différentes associations peuvent moduler la cinétique, l'amplitude ou la nature de la réponse induite.

Il est à noter que les neuropilines sont capables de s'associer avec de nombreux partenaires autres que les VEGFRs et qui sont décrits dans les processus angiogéniques mais aussi dans la croissance axonale, le système immunitaire, la progression tumorale, ... (Koch, 2012; Pellet-Many et al., 2008). Dans des modèles tumoraux, la NRP1 peut s'associer avec d'autres récepteurs possédant une activité de type tyrosine kinase : au PDGF (Evans et al., 2011; Pellet-Many et al., 2011), à l'HGF (Hu et al., 2007), ou au ligand lui-même comme le Transforming Growth Factor β , TGF β (Cao et al., 2010, Glinka et al., 2011). Les NRP1 et NRP2 peuvent aussi se lier aux intégrines avec des modifications de l'adhésion des cellules endothéliales avec certains composants de la matrice extracellulaire (Parker et al., 2012). Bien sur, les neuropilines s'associent avec les plexines pour transmettre le signal d'attraction ou de répulsion axonale induit par la fixation des sémaphorines (Schwarz and Ruhrberg, 2010).

A l'image des neuropilines, l'hypothèse a été émise selon laquelle des facteurs impliqués dans la régulation du système vasculaire pouvaient avoir un rôle direct dans le système nerveux et inversement. Nous nous intéresserons plus particulièrement ici aux facteurs angiogéniques et leurs effets sur le système nerveux.

III) Quand les réseaux vasculaires et nerveux communiquent...

Les réseaux vasculaires et nerveux présentent de nombreuses analogies : nombreux branchements, présence dans tout l'organisme, systèmes afférents et efférents (veineux/artériel et sensoriel/moteur). Ils sont aussi souvent alignés à l'image de la description faite par Andréas VESALIUS au 16^{ème} siècle sur les principaux vaisseaux (Fig. 13A) et les nerfs (Fig. 13B). Ce parallélisme a aussi été mis en évidence à un niveau microscopique dans la peau d'embryon de souris avec la détection des arborisations vasculaires et nerveuses en proche apposition (Fig. 13C).

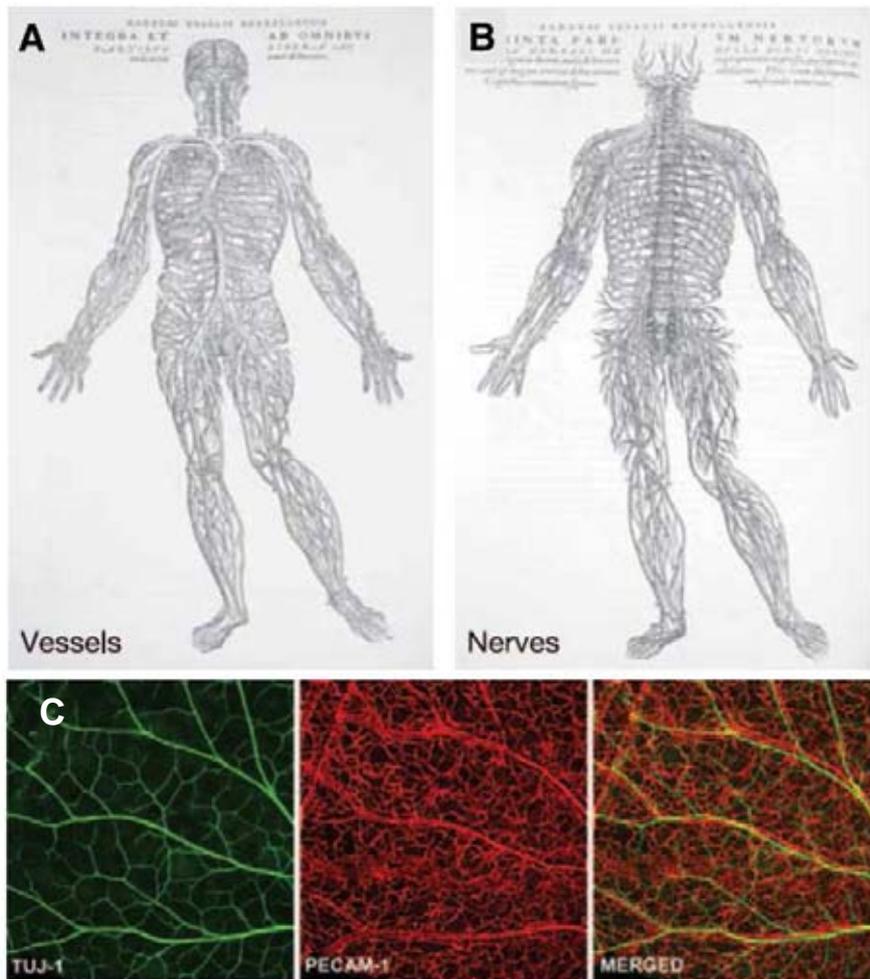


Fig. 13: Parallélisme des réseaux vasculaire et nerveux. Le parallélisme entre les principaux vaisseaux (A) et nerfs (B) a été décrit dès le 16^{ème} siècle par A. VESALIUS pour les principaux vaisseaux et les nerfs. (Ruiz de Almodovar, 2009). Depuis, les techniques modernes de marquage ont permis de montrer que les nerfs (TUJ-1, vert) et les vaisseaux (PECAM-1 rouge) sont aussi alignés dans la peau d'embryon de souris (C) (Larrivee et al., 2009).

De plus, certains facteurs régulent la mise en place des 2 réseaux à l'image de NRPs mais ce ne sont pas des cas isolés. Certains auteurs vont jusqu'à donner un nom à ces facteurs jouant un rôle dans les systèmes vasculaire et nerveux : les « angioneurines » (Zacchigna et al., 2008). La protéine pour laquelle ce concept est le plus étudié est certainement le VEGFA. Son rôle en tant que facteur neurotrophique a été mis en évidence aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*.

Le VEGF a été détecté dès 1996 dans la moelle épinière par hybridation *in situ* dans la substance grise (Lagercrantz et al., 1996). Ce facteur a aussi été détecté dans les ganglions des racines dorsales (GRD) et les ganglions supérieurs cervicaux (GSC). Alors que le marquage reste identique pour les GSC, l'expression du VEGF se restreint peu à peu aux cellules ayant

des corps cellulaires de petite taille 12 jours après la naissance dans les GRD. L'expression du VEGFR2 a elle aussi été évaluée par immunohistologie et le nombre de cellules où il est détecté décroît progressivement après la naissance dans les 2 ganglions étudiés (Sondell et al., 2000).

L'influence du VEGF au sein du système nerveux a été étudiée grâce à plusieurs approches.

3-1) Approches *in vitro*.

Plusieurs conséquences ont été décrites suite à l'ajout de VEGF dans le milieu de croissance de primocultures ou de lignées.

Comme cela est reporté dans la revue écrite par I. Zachary (2005), le VEGF augmente la **survie** et/ou la **prolifération** de certaines de ces cellules (progéniteurs ou astrocytes ou neurones différenciés). Les publications s'accordent sur l'activation de la voie anti-apoptotique PI3K (passant par Akt/PKB) dans les mécanismes de survie. La voie de signalisation induite lors du rôle prolifératif du VEGF n'est pas encore clairement déterminée. Il semblerait toutefois que plusieurs récepteurs soient impliqués (Zachary, 2005).

En plus de ce rôle sur des cellules en culture, le VEGF augmente la survie mais aussi la croissance des neurites dans des cultures de tranches de cortex, de substance noire et des ganglions de racines dorsales (Sondell et al., 2000, Cheng et al., 2004).

Par ailleurs, en complément de ces données obtenues en conditions basales, des études ont été menées avec des conditions de culture plus drastiques. Il a alors été montré que le VEGF exerce un rôle protecteur en cas de déprivation sérique (absence de sérum donc de nombreux facteurs de croissance dans le milieu de culture), d'hypoxie ou d'excitotoxicité liée au glutamate (récepteurs NMDA). Ces effets passent par le VEGFR2 mais les voies activées en aval sont encore discutées et varient selon le type de culture utilisé (Ogunshola et al., 2002, Jin et al., 2002; Jin et al., 2000, Kutcher et al., 2004, Sondell et al., 2000).

Ces approches de culture nous donnent une assez bonne vision des mécanismes d'action du VEGF en termes de prolifération, de survie ou de croissance axonale, mais des études ont aussi été menées à un niveau plus intégré.

3-2) Approches *in vivo*.

Chez des souris dont l'expression du VEGF est éteinte dans les progéniteurs neuraux (nestinCre x VEGF^{lox/lox}), le réseau vasculaire est anastomosé dans le cerveau ce qui a pour conséquence finale la mort des cellules composant le système nerveux (Haigh et al., 2003). De même, le VEGF sécrété par les nerfs est essentiel pour leur alignement avec les artères dans la peau (Mukouyama et al., 2005). Des données montrent aussi l'importance du VEGF dans des zones très précises du cerveau qui sont très vascularisées que sont les niches (Schanzer et al., 2004, Zachary, 2005). Le VEGF a été décrit comme agent protecteur en cas d'excitotoxicité par le glutamate sur les motoneurones (Tovar and Tapia, 2010).

Outre son rôle sur la prolifération et la survie des cellules du tissu nerveux, le VEGF peut aussi moduler le fonctionnement du réseau adulte. Il augmente la fréquence des activités synaptiques excitatrices (glutamatergiques) sur des cellules d'hippocampe sans en modifier l'amplitude après 1h d'application (1ng/mL, effet maximal après 12h de perfusion) (Huang et al., 2010). Une autre étude a montré que le VEGF augmente l'influx calcique dans les cellules granulaires du cervelet via l'adressage accru de récepteurs NMDA à la membrane (Meissirel et al., 2011).

Ces études présentées ont été menées jusque ici sur des modèles sains mais le VEGF, ou son absence, ont été décrits dans certaines pathologies.

3-3) VEGF et pathologies.

3-3-1) Effets bénéfiques du VEGF.

Suite à des **lésions ou des ischémies cérébrales**, l'expression du VEGF et de ses récepteurs est augmentée. Ceci est nécessaire à la néo-vascularisation de la zone atteinte et à sa reperfusion. En effet, lors d'un traumatisme, les vaisseaux sont détruits et doivent être reformés pour que le tissu nerveux ait des apports suffisants en oxygène et nutriments pour se réparer (Oudega, 2012). En plus de cette constatation, il a été montré que l'inhibition du VEGF augmente la taille de l'infarctus et retarde la réparation du tissu lésé. Y Wang et ses collègues ont montré que la taille de l'infarctus cérébral, suite à une occlusion de l'artère cérébrale moyenne, est diminuée chez les souris surexprimant de manière constitutive le

VEGF dans le cerveau (Wang et al., 2007a), promoteur de la 'neuron specific enolase', construction décrite dans (Wang et al., 2005). Les performances au test de comportement sont également augmentées (marche sur cylindre). La réparation du tissu passe par une prolifération des progéniteurs dans la zone subventriculaire et une augmentation de la migration des neurones matures dans la zone lésée (Wang et al., 2007a).

Le VEGF est aussi cité dans des pathologies neuro-dégénératives. C'est le cas de la **Sclérose Latérale Amyotrophique** (SLA). Cette maladie est caractérisée par une perte progressive des motoneurons aboutissant à une paralysie progressive de tout l'organisme qui est fatale. Dans des modèles de souris ou de rat exprimant la SuperOxyde Dismutase 1 (SOD1) mutée (mutation présente dans 20% des formes familiales de cette maladie), l'apport de VEGF par de multiples stratégies (injection intra-musculaire, intrapéritonéale ou intraventriculaire cérébrale) se traduit par un retard dans l'apparition de la maladie ainsi que dans sa progression (Zheng et al., 2004, Azzouz et al., 2004, Storkebaum et al., 2005). Ce rôle a également été confirmé avec un bénéfice de survie en croisant des souris exprimant la SOD1 mutée avec des souris surexprimant le VEGF (Wang et al., 2007b). Si les données obtenues sur les modèles de rongeurs semblent converger dans le même sens, cela n'est pas aussi clair pour les travaux menés sur des prélèvements humains. En effet, si certaines études montrent une variation des taux du VEGF dans le sérum, le plasma ou alors le liquide cébrospinal, d'autres ne confirment pas ces résultats (Sathasivam, 2008). Cependant, l'analyse de l'expression du VEGF et de ses récepteurs dans des tissus montre une diminution de l'expression de ce facteur et du VEGFR2 chez les patients atteint de SLA (Brockington et al., 2006).

En 2001, B. Oosthuyse et ses collaborateurs ont supprimé chez la souris l'élément HRE dans le promoteur du gène du VEGF permettant sa **régulation par l'hypoxie**. Ils ont alors découvert que la régulation du VEGF lors d'une carence en oxygène est altérée et ce principalement dans le tissu nerveux. Ces souris présentent des altérations motrices chez l'adulte (test de suspension par la queue, de retournement, perte de mobilité, ...) apparentées à celles observées dans les modèles plus classiques de la SLA (Oosthuyse et al., 2001). Le croisement de ces souris avec celles exprimant la SOD1 mutée conduit à une apparition plus précoce des symptômes de la maladie et donc une survie qui est diminuée (Lambrechts et al., 2003).

Le VEGF diminue la fréquence des événements synaptiques sur des tranches d'hippocampe de rat dans un modèle d'**épilepsie** (McCloskey et al., 2005). De même, des études menées sur des échantillons humains ont montré que la barrière hémato-encéphalique (BHE) est altérée et que l'expression du VEGF est augmentée chez les patients atteints d'épilepsie dans le lobe temporal (Rigau et al., 2007). La perturbation de la barrière hémato-encéphalique a été étudiée chez le rat (culture de tranches d'hippocampe) et les résultats montrent que le VEGF et le VEGFR2 sont impliqués dans le remodelage vasculaire suite à l'épilepsie et que la voie scr en aval de ce récepteur est une cible thérapeutique potentielle dans cette pathologie (Morin-Brureau et al., 2011).

3-3-2) Effets délétères du VEGF.

Si le déficit de VEGF s'avère dommageable dans certaines pathologies, l'excès de ce facteur peut être tout aussi délétère. En effet, la perméabilité vasculaire est alors augmentée. Or, la **rupture de la barrière hémato-encéphalique** peut avoir des effets irrémédiables comme dans le cas d'œdèmes (Lee et al., 2009). La combinaison de traitements utilisant le VEGF avec d'autres facteurs permettant de stabiliser les vaisseaux (angiopoïétine 1 ou le PDGFBB, par exemple) est bénéfique notamment en prévenant les oedèmes développés en présence d'un excès de VEGF (Oudega, 2012).

Dans le cas des **glioblastomes**, les cellules au centre de la tumeur sont en ischémie et vont sécréter du VEGF. La néo-vascularisation de la tumeur lui permet de s'accroître (Jain et al., 2007).

Sans que l'on sache à ce jour s'il s'agit d'une cause ou d'une conséquence, des altérations du réseau vasculaire ont été mises en évidence dans la démence vasculaire et la **maladie d'Alzheimer**. Dans le cas de cette dernière pathologie, le VEGF a été détecté au niveau des dépôts beta amyloïde, leur abondance étant corrélée à la sévérité de la pathologie (Lambrechts and Carmeliet, 2006, Zachary, 2005).

L'ensemble des études menées *in vitro* et *in vivo* nous permet d'entrevoir un peu mieux le rôle du VEGF sur le système nerveux mais cela soulève aussi plusieurs questions : Si le VEGF a des effets sur le tissu nerveux adulte, sa présence ne pourrait-elle pas affecter ce même tissu lors de son ontogenèse ? En effet, son développement nécessite sa vascularisation et donc la présence dans la matrice extracellulaire de VEGF. Dans ces conditions, ce dernier agit-il sur la mise en place des différentes populations neuronales ? Ou alors affecte-t-il l'activité du réseau et si oui dans quelle mesure ? Nous avons voulu apporter quelques éléments de réponse en utilisant un modèle bien connu dans le laboratoire collaborant à ce projet de thèse : la moelle épinière de la souris lors de la seconde moitié de la vie embryonnaire.

Cette partie du travail de thèse s'est déclinée en deux axes :

- Nous avons voulu déterminer l'état du réseau vasculaire et du système VEGF et récepteurs associés dans la moelle épinière de souris afin de compléter les données existant dans la littérature.

- Nous avons ensuite cherché à savoir si le VEGF a un rôle sur l'activité des réseaux moteurs et si oui sur quelle(s) composante(s). Nous avons développé nos travaux sur les effets à court terme du VEGF (application et neutralisation de ce facteur ou des récepteurs sur des temps de 10 minutes) et entamé une étude sur les effets à plus long terme de l'absence de ce facteur sur les réseaux moteurs spinaux.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Lors de ce projet de thèse, nous avons travaillé avec des embryons et des nouveau-nés de souris de souche **OF1** fournies par Charles River Laboratories France (Les Oncins, 69210 St Germain sur l'Arbresle). Nous avons aussi utilisé des **souris Hb9-eGFP** surexprimant la Green Fluorescent Protein (GFP) dans les motoneurones (MNs) via l'insertion de sa séquence codante après une copie du promoteur Hb9, facteur de transcription essentiel pour la différenciation des MNs (Arber et al., 1999). Des travaux ont également été menés sur des souris issues du croisement de 2 lignées : **Islet1Cre** (donnée par le Dr. Alessandra Pierani, Equipe Génétique et Développement du Cortex Cérébral, INSTITUT JACQUES-MONOD, CNRS UMR 7592, Université Paris Diderot) et **VEGF^{lox/lox}** (donnée par le Dr. Jody J. Haigh, Vascular Cell Biology Unit, Department for Molecular Biomedical Research, VIB, Ghent, Belgique). Contrairement aux souris de souche OF1, les lignées Hb9-eGFP, Islet1Cre et VEGF^{lox/lox} sont produites dans l'animalerie mutualisée de l'Université Bordeaux 1 sous la direction de Raphaël PINEAU.

1) Génotypage.

Les souris Hb9GFP sont hétérozygotes ce qui nécessite le génotypage des mâles reproducteurs. Pour cela, les bouts de queue sont prélevés et lysés avant de réaliser l'amplification par PCR. Les amorces utilisées sont listées dans le tableau I. Seuls les échantillons provenant d'animaux porteurs du gène de la GFP sous contrôle du promoteur Hb9 présenteront un fragment de 600 paires de bases (pb).

Tableau I: Séquences des amorces utilisées pour les génotypes et taille des fragments amplifiés.

Génotypage	Amorces	Taille fragment (pb)
Hb9-eGFP	sens GCTGTTACCCGGGGTGGTGC anti sens TCCAGCAGGACCATGTGATC	sauvage : pas de fragment muté : 600
IsletCre	sens GTCCAATTTACTGACCGTACACC anti sens GTTATTCGGATCATCAGCTACACC	sauvage : pas de fragment muté : 700
VEGF ^{lox/lox}	muVEGF419.F : CCTGGCCCTCAAGTACACCTT muVEGF567.R : TCCGTACGACGCATTTCTAG	sauvage : 100 muté : 148

Les souris issues du croisement entre les lignées Islet1cre et VEGF^{lox/lox} sont elles aussi hétérozygotes. Le génotypage des parents de la génération F1 et de tous les embryons étudiés en génération F2 est donc nécessaire. Les animaux portant le gène de la Cre

recombinase sont identifiés par la présence d'un amplicon de 700pb. Pour le VEGF^{lox/lox}, c'est la taille du fragment amplifié qui permet de déterminer si l'animal est porteur de l'allèle sauvage (100pb) ou muté (148pb). L'association des résultats des 2 génotypages nous permet d'obtenir 4 profils : sauvage (wt), porteur de la cre recombinase uniquement (neg cre), porteur uniquement de VEGF^{lox/lox} (neg lox) ou alors porteur des 2 (Islet1Cre et VEGF^{lox/lox}, appelé mut). Cette dernière catégorie peut être subdivisée en 2 parties : les animaux ayant les 2 allèles mutés pour le VEGF (homozygotes) ou ceux ayant un allèle sauvage et un allèle muté (hétérozygotes). Le seul moyen de les distinguer est d'analyser la présence ou non de VEGF dans les MNs de ces animaux par immunohistochimie en comarquant le VEGF et les MNs (Calcitonin Gene-Related Peptide, CGRP).

2) Prélèvement des tissus.

La **gestation** des souris utilisées dure 19 jours. Le début de la gestation correspond au jour où un bouchon vaginal est observé. Il n'est pas possible de déterminer l'heure précise de l'accouplement car celui-ci a lieu durant la nuit. Cette incertitude est prise en compte dans la détermination des dates d'accouplement par une approximation de 0,5 jour. Dans le cadre de notre étude, des embryons ont été utilisés entre les 11^{ème} et 17^{ème} jours de vie embryonnaire (stades E11,5, E13,5, E15,5 et E17,5). Des observations ont aussi été faites le jour de la naissance (stade P0 pour « post-natal day » 0).

Chaque **stade de développement embryonnaire** présente des caractéristiques précises qui sont présentées dans la figure 14 (adapté du EMAP : eMouse Atlas Project¹). Compte tenu de l'imprécision sur l'heure d'accouplement, il arrive que certains embryons présentent des phénotypes intermédiaires. Cela a été pris en compte dans les différents protocoles étant donné que des changements majeurs s'opèrent en peu de temps ce qui peut expliquer certaines difficultés à obtenir des groupes homogènes de données. Par exemple, pour une étude au stade E15,5, des embryons ayant une morphologie proche de E14,5 ou E16,5 seront exclus des analyses.

¹ <http://www.emouseatlas.org/emap/home.html>

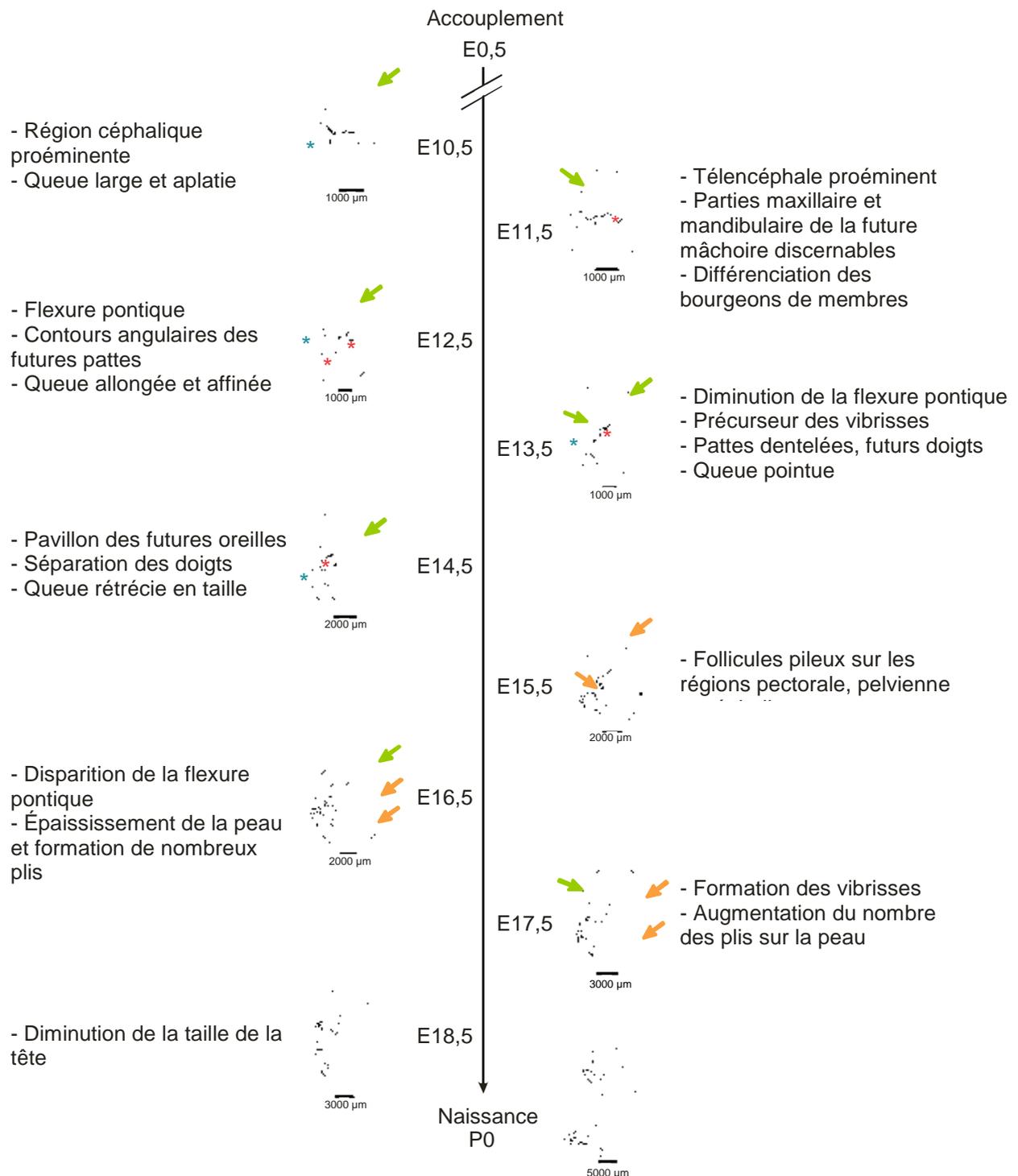


Fig. 14: Modifications morphologiques au cours de la seconde partie du développement embryonnaire de la souris. Les détails anatomiques des embryons nous permettent de déterminer le stade de développement de l'embryon (*D'après thèse A-E Allain*).

La souris gestante est sacrifiée par dislocation cervicale et les cornes utérines sont prélevées par laparotomie. Le muscle utérin est coupé et les sacs amniotiques sont ouverts afin d'en isoler les embryons. Ceux-ci sont rincés dans du PBS ou du liquide physiologique selon le protocole pour lequel ils seront utilisés (culture organotypique/immunohistologie ou

électrophysiologie respectivement). **Pour prélever la moelle épinière**, les animaux sont décapités au niveau de la flexure pontique et la queue est coupée. Ils sont ensuite fixés au moyen de minuties dans une boîte de Pétri recouverte de Sylgard® (polymère de silicone, Dow Corning Michigan USA). Jusqu'au stade E15,5 la dissection se fait en décubitus ventral. La moelle est délicatement séparée des tissus adjacents grâce à des pinces fines. Pour les stades plus avancés, elle se fait en décubitus dorsal. L'ensemble des viscères est enlevé puis les vertèbres sont coupées avec des ciseaux fins pour finalement sortir la moelle de la future colonne vertébrale. La moelle se présente sous la forme d'un long tube avec des parties plus renflées qui permettent de délimiter les zones lombaire et cervicale (Fig. 1A). A partir de cette étape la dissection peut prendre plusieurs directions selon le protocole expérimental.

3) Culture organotypique.

Pour cette technique, toutes les manipulations depuis le prélèvement jusqu'à la fixation des tissus se font en conditions d'asepsie sous une hotte à flux laminaire avec du matériel préalablement stérilisé.

Les moelles épinières sont prélevées sur des embryons au stade E11,5, ouvertes en leur partie dorsale et fixées dans des boîtes stériles (35mm de diamètre, BD Falcon) tapissées d'un fond de Sylgard® contenant 300µL de milieu de culture. Ce dernier est constitué de milieu de base et ¼ de Matrigel™ (ref 354234, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). Le milieu de base est composé de 50% DMEM (D5796, Sigma, St. Louis, MO) complété avec 25% HBSS (H9269, Sigma), 15% eau stérile (W3500, Sigma), 10% sérum de cheval (H1270, Sigma), 0,002% peroxyde d'hydrogène (H₂O₂, H1009, Sigma), 0,03% L-glutamine (G7513, Sigma), et 0,03% pénicilline–streptomycine (10000U/10000µg; P0781, Sigma). Outre les apports en facteurs de croissance, le Matrigel™ permet à la moelle de garder sa structure par la formation d'un gel via des composants tels que la laminine ou le collagène de type IV. Tous les jours, du milieu de culture (sans Matrigel™) est ajouté sur les moelles pour qu'elles puissent se développer. Les boîtes de cultures sont déposées dans un incubateur à 37°C, 6-8% CO₂ avec une atmosphère saturée en humidité. Pour le traitement des moelles, du VEGF (50ng/mL, Peprotech, ref 100-20) ou de l'anticorps neutralisant ce facteur (B20, Genentech, 5µg/mL) sont rajoutés au milieu. Les conditions contrôles sont obtenues en omettant ces 2 facteurs dans le milieu de culture.

Au bout de 4 jours de culture, le milieu est délicatement enlevé. Les moelles épinières sont rincées plusieurs fois avec du PBS froid avant d'être fixées 2 heures à température ambiante avec du ParaFormaldéhyde 4% (PFA). Une fois relavées au PBS, les moelles épinières sont prêtes pour les marquages immunohistochimiques.

4) Immunohistologie.

Des marquages immunohistologiques ont été effectués sur des moelles entières ouvertes (fraîches ou provenant de culture organotypique) ou sur des coupes transversales (moelles épinières congelées).

Dans le cas des **moelles ouvertes**, une fois séparée du reste de l'embryon, la moelle est fixée et ouverte avec des pinces fines le long du sillon dorsal. Ainsi la préparation est moins épaisse et la partie ventrale plus accessible. Après la dissection, le tissu est fixé pendant 2 heures à température ambiante avec du PFA 4%, puis rincé plusieurs fois avec du PBS avant de démarrer l'incubation avec les anticorps primaires.

Dans les cas des **coupes transversales**, les moelles ne sont pas ouvertes mais directement fixées après dissection selon le même protocole. Après cette étape, les moelles sont cryoprotégées par des bains successifs de sucrose 15% puis 30% (4°C, 24h pour chaque étape). La partie lombaire de la moelle, aisément reconnaissable par son renflement, est isolée et incluse dans une capsule (Gelatin capsule, size 000, ref 70101, Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, USA) contenant une résine (OCT Compound, ref 4583, Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, Pays-Bas) qui durcit au contact de l'isopentane refroidi à l'azote liquide (-196°C). Des coupes de 25µm d'épaisseur sont effectuées au moyen d'un cryostat (CM3050 S, Leica Microsystem, Nanterre, France) et collées sur des lames gélatinées. Une fois séchées à température ambiante, les lames avec les coupes sont conservées à -20°C en attendant la réalisation des marquages. Pour être gélatinées, les lames sont immergées 10min dans une solution de gélatine 2% et d'alun de chrome 0,1%, égouttées et mises à sécher pendant 48h dans une étuve à 40°C.

Les **immunomarquages** sont réalisés de la manière suivante : les moelles entières fixées et rincées ou les coupes transversales réhydratées sont incubées avec la solution d'anticorps primaires (tableau II) dilués dans du PBST : BSA (0,2%) sérum de cheval (10%) Triton X100 (1%). Après 12h minimum à 4°C, les préparations sont rincées avec du PBS (3 fois 5min) puis incubées 2h à température ambiante à l'obscurité avec la solution d'anticorps

secondaires correspondants aux anticorps primaires (tableau II). Les moelles et coupes sont ensuite rincées dans du PBS (3 fois 5min) pour être finalement montées entre lame et lamelle avec du Fluoromount G (FP-483331, Interchim). Après polymérisation du milieu de montage, les marquages peuvent être observés au microscope confocal.

La provenance des Anticorps primaires est indiquée dans le tableau II. Les anticorps secondaires ont été achetés chez Jackson Immunoresearch. Ils sont produits chez la chèvre sauf dans le cas des co-marquages avec la NRP1 ou le VEGFR2 où ils sont alors produits chez l'âne. Ils sont couplés avec des sondes fluorescentes alexa 488 (FITC, vert), alexa 546 (TRITC, rouge) et alexa 647 (Cy5, rouge lointain, couleur restituée bleue).

Tableau II : Liste des anticorps utilisés en marquages immunohistochimiques. Les anticorps primaires sont dilués dans du PBS contenant du Triton (1%), de la BSA (0,2%) et du sérum de cheval (10%). L'incubation se fait à 4°C en chambre humide pendant au moins 12h. Les anticorps secondaires sont dilués au 1/500^{ème} dans la même solution et incubés pendant 2h à température ambiante, en chambre humide et à l'obscurité. *Ac sec* = anticorps secondaire, *INs* = interneurones, *MNs* = motoneurones.

Anticorps primaire	dilution	Ac sec	Cible étudiée
CD31 (PECAM-1), 553370, BD Biosciences	1/100	anti rat	cellules endothéliales et donc vaisseaux
GABA, A2052, Sigma	1/200	anti lapin	INs GABA
Glycine, IG1001, ImmunoSolution, Jesmond New South Wales, Australia	1/3000	anti rat	INs glycine
Islet 1a, 39.4D5, DSH Bank, Iowa	1/100	anti souris	MNs (noyaux)
Islet 2b, 40.2D6, DSH Bank, Iowa	1/500	anti souris	MNs (noyaux)
NeuN, MAB377, Millipore	1/500	anti souris	neurones (noyaux)
NG2, AB5320, Chemicon International	1/200	anti lapin	péricytes (et précurseurs oligodendrocytaires)
NRP1, AF566, R&D System	1/100	anti chèvre	neuropiline 1
B20, Genentech	1/500	anti rat	VEGF
VEGFR1, MAB4711, R&D System	1/100	anti rat	VEGFR1
VEGFR2, AF644, R&D System	1/40	anti chèvre	VEGFR2
mF4-31C1, ImClone	1/500	anti rat	VEGFR2

Afin de vérifier la spécificité du marquage VEGF observé sur les moelles entières, des contrôles ont été effectués en parallèle sur des moelles d'embryons de la même portée. Celles-ci ont été mises à incuber avec une solution contenant l'anticorps primaire (B20, 1/500, Genentech) et du VEGF₁₆₄ murin concentré à 1µg/mL (Peprotech, ref 450-32). Aucun marquage n'a alors été observé notamment dans la zone ventrale de la moelle épinière (Fig. 15).

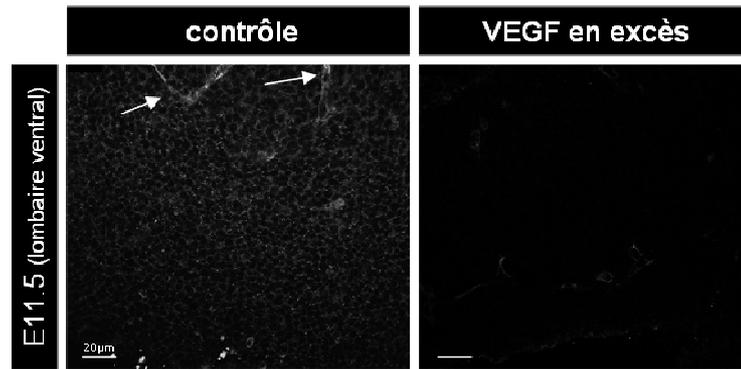


Fig. 15: Vérification de la spécificité du B20 en marquage immunohistochimique. Le B20 a été utilisé en anticorps primaire dilué au 1/500^{ème}. Nous pouvons observer un marquage ponctiforme dans le tissu nerveux et sur les vaisseaux (*flèches*) (partie gauche). Pour vérifier sa spécificité, du VEGF₁₆₄ murin (450-32, Peprotech), a été ajouté au mélange d'anticorps primaires afin de saturer les sites de liaison de l'anticorps (partie droite). Dans ces conditions nous n'avons plus de marquage. Les acquisitions ont été effectuées dans la partie lombaire ventrale de moelles épinières ouvertes (zone des motoneurones).

5) Acquisition des images en microscopie confocale.

Les acquisitions ont été effectuées avec un **microscope confocal** BX51 Olympus Fluoview 500 équipé de 3 lasers : argon (pour marquages FITC, alexa 488), hélium néon vert (pour marquages TRITC, alexa 546) et hélium néon rouge (pour marquages Cy5, alexa 647). Des coupes optiques sériées (ou stacks) ont été réalisées avec des épaisseurs différentes selon l'objectif utilisé (1,2µm à l'objectif x10 ; 0,6µm à x20, 0,3µm à x40 et x60). Les quantifications effectuées et les images présentées ont été faites sur une seule coupe optique et non une projection sauf indication contraire. Le nombre d'animaux est indiqué pour chaque stade et caractère étudié dans la partie résultat.

6) Analyse des images et quantifications.

L'analyse des images a été effectuée avec le logiciel ImageJ (Wayne Rasband, Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA).

Nous avons quantifié la **surface des vaisseaux** sur les coupes transversales de moelle épinière. Les coupes confocales avec le marquage CD31 ont été transformées en image 8Bit. Puis les moelles épinières ont été détournées afin de ne prendre en compte que le tissu sur les images analysées. Ensuite, les pixels ont été quantifiés et le ratio de la surface des pixels sur la surface totale de l'objet a été calculé. Ainsi, nous obtenons la proportion relative de la surface des vaisseaux pour chaque coupe de moelle épinière.

La mise en place du réseau vasculaire a aussi été évaluée par le **dénombrement des points de branchements**. Chaque séparation d'un vaisseau en 2 branches a été détectée manuellement et tous les points de branchements ont été comptés pour chaque coupe transversale de moelle. Pour les stades les plus tardifs, la totalité de la coupe dépasse le champ d'acquisition. Plusieurs images ont alors été prises puis fusionnées avant d'effectuer le dénombrement des points de branchement. Les résultats obtenus pour chaque stade ont été compilés et ensuite comparés.

Nous avons aussi procédé à la **quantification des marquages** du VEGF et de ses récepteurs, du GABA et de la Glycine. Sur des images prises aux objectifs x40 ou x60, l'intensité des pixels a été mesurée sur des zones de taille identique entre les différentes images. Le bruit de fond a été ôté à cette valeur. Ainsi, en effectuant plusieurs mesures par coupe ou moelle entière sur plusieurs échantillons par condition, l'intensité du signal détectée a pu être moyennée et comparée entre les conditions étudiées.

7) Electrophysiologie.

7-1) Principe de l'électrophysiologie.

La membrane d'une cellule peut être considérée comme une barrière étanche (double couche phospholipidique) qui sépare les compartiments intra et extracellulaires et dans laquelle sont enchâssées des protéines (canaux par exemple). En absence de stimulation, les ions vont se répartir de façon asymétrique de part et d'autre de la membrane. Cette répartition peut être définie pour chaque ion par son potentiel d'équilibre. Cette distribution des ions, due à des pompes telles que la Na/K/ATPase, fait que les cellules ont l'intérieur chargé négativement par rapport au liquide extracellulaire dans lequel elles baignent. Lorsque qu'un canal s'ouvre (laissant par exemple passer les ions chlorure), les ions vont se déplacer selon 2 facteurs : le gradient de concentration (représentant la répartition des ions concernés de part et d'autre de la membrane) et le gradient électrique (représentant la répartition globale des charges) (Fig. 16). Une fois que les mouvements ioniques se produisent, des pompes, utilisant le plus souvent de l'énergie (hydrolyse d'ATP), vont recapter (ou extruder) les ions qui sont sortis (ou entrés) pour rétablir la répartition observée au repos. Ainsi, lors de la prochaine ouverture de canal, le même mouvement d'ions pourra se produire. Chez l'adulte, le potentiel de repos de la membrane est de -70mV. Chez l'embryon, des variations du potentiel membranaire des MNs ont été mesurées précédemment au laboratoire. Ainsi au stade E13,5, il

est de -55mV puis de -60mV au stade E15,5 pour être de -70mV au stade E17,5 (Delpy et al., 2008).

Si le potentiel de membrane est très proche du potentiel d'équilibre de l'ion, les mouvements de l'ion concerné sont faibles et dans les 2 directions ce qui fait que le flux net est nul. Si le potentiel de la membrane est inférieur au potentiel d'équilibre d'un ion, lors de l'ouverture d'un canal laissant passer cet ion (fixation d'un ligand sur un récepteur) il se produira une dépolarisation afin d'atteindre le potentiel d'équilibre de l'ion. S'il s'agit d'un anion (chargé négativement) alors ce dernier sortira de la cellule et s'il s'agit d'un cation (chargé positivement) alors il rentrera dans la cellule. Si le potentiel de membrane est supérieur au potentiel d'équilibre de l'ion alors ces mouvements sont inversés.

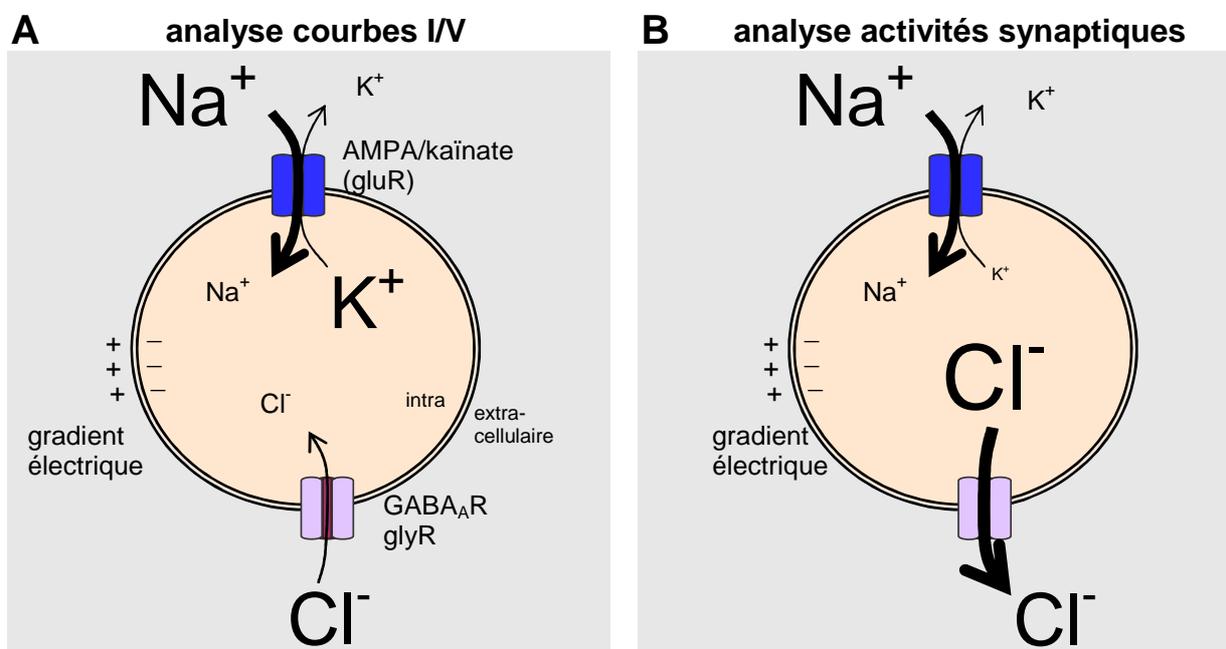


Fig. 16: Répartition et mouvements des ions lors de nos conditions expérimentales. La combinaison des milieux extracellulaire $\text{K}^+4,5\text{mM}$ et intracellulaire Kgluconate pour l'analyse des courbes I/V et les pompes présentes à la membrane provoque la répartition des ions observés en A. Selon les gradients de concentration des ions et le gradient électrique, l'ouverture des récepteurs canaux provoque principalement l'entrée d'ions sodium et chlorure dans la cellule. Pour l'analyse des activités synaptiques, la combinaison des milieux extracellulaire K^+6mM et intracellulaire chlorure de césium permet la sortie d'ions chlorure de la cellule et l'entrée d'ions sodium lors de l'activation des récepteurs au GABA/glycine (GABA_AR/GlyR) et au glutamate (GluR) (B).

Les ions étant chargés d'un point de vue électrique, chacun de leurs mouvements induit un déplacement de charges et le courant créé peut s'enregistrer. C'est le **principe de l'électrophysiologie**. Les systèmes expérimentaux nous permettent d'imposer un potentiel de

membrane (en millivolt, mV) à la cellule enregistrée et de mesurer les variations des courants ioniques (en pico-ampère, pA) et inversement.

D'après la loi d'Ohm, nous savons que l'intensité (I), la résistance (R) et le potentiel (V) sont liés par la relation suivante : $V=RI$. Appliquant le courant (I) et mesurant le potentiel de membrane (V), nous pouvons déterminer si la résistance membranaire varie selon le traitement appliqué. Lorsque l'intensité (I) du courant imposé est suffisamment grande, nous pouvons observer un ou plusieurs potentiels d'action (PA) dont les caractéristiques seront comparées entre les différents traitements. Ces données sont obtenues lorsque nous effectuons les **protocoles de 'courbes I/V'** (paragraphe 7-2-1).

La fixation de neurotransmetteurs sur leurs récepteurs canaux permet leur ouverture et donc le passage des ions. Lorsque nous imposons le potentiel de membrane, nous pouvons mesurer ces courants ioniques. C'est ainsi que nous pouvons procéder à l'**analyse de l'activité synaptique** (paragraphe 7-2-2).

Si les expériences d'électrophysiologie nous permettent de mesurer les mouvements d'ions ou des variations de potentiel de membrane, elles peuvent aussi nous renseigner sur les **caractéristiques de la membrane** de la cellule enregistrée. D'un point de vue électrique, la membrane plasmique peut-être considérée comme une succession de résistances (protéines) et de condensateurs (phospholipides). L'association de toutes ces portions nous donne la résistance de membrane (R_m) et la capacitance membranaire (C_m). La résistance permet d'appréhender la difficulté qu'à un courant à passer à travers un conducteur. Dans le cas de la membrane plasmique, les variations de la R_m sont synonymes d'ouverture (diminution de sa valeur) ou de fermeture de canaux (augmentation de la valeur de R_m). La C_m nous donne une indication sur la taille de la cellule (pour une proportion équivalente de protéines enchâssées dans la double couche phospholipidique).

7-2) Protocoles expérimentaux.

Le début du protocole de dissection pour l'électrophysiologie est similaire à celui décrit précédemment. Une fois la moelle sortie de la future colonne vertébrale, elle est ouverte dans sa partie dorsale. Les méninges sont ensuite retirées. La moelle est déposée et maintenue par un filet dans la chambre d'enregistrement dans la **configuration dite de « livre ouvert »** :

la face ventrale vers le haut permettant ainsi un accès relativement aisé aux motoneurones (Fig. 17A). Les MNs enregistrés au cours de cette thèse appartiennent à la colonne médiane (Fig. 17B) distinguée dans la zone lombaire avec les corps cellulaires caractéristiques en forme de poire (Fig. 17C1 et C2). Du liquide physiologique chauffé (30°C) et bullé (95% O₂, 5% CO₂) est continuellement perfusé tout au long de l'expérience.

Les **pipettes de patch** sont faites à partir de tubes en verre (GC150TF-10, 1,5mm diamètre externe, 1,17mm diamètre interne, Harvard Apparatus, France) au moyen d'une étireuse verticale à deux temps (PP-830, Narishige, Japon). Une fois remplies de liquide intracellulaire filtré, elles sont fixées sur le holder et sous contrôle visuel (microscope Axioskop2, FS Plus équipé d'une caméra AxioCam MRm, Carl Zeiss, Göttingen, Allemagne) sont approchées de la moelle épinière au moyen de micromanipulateurs motorisés (SM-5, Luigs et Neumann, Ratingen, Allemagne). La résistance des pipettes est comprise entre 2 et 5MΩ. Une pression positive est appliquée afin qu'elles ne se bouchent pas lorsqu'elles entrent dans le tissu. Lorsqu'elle est à proximité du MN, une légère aspiration est effectuée afin que la membrane du neurone choisi se colle à la pipette. La résistance (Seal) est alors comprise entre 1 et 16 GOhm. Une fois la membrane collée de façon stable, une aspiration brève est effectuée afin de casser la membrane du MN collé à la pointe de la pipette. Ainsi, le milieu compris dans la pipette est en communication directe avec l'intérieur de la cellule : c'est la **configuration cellule entière** ('whole cell'). Une fois la cellule stabilisée, les valeurs de capacitance, de résistance membranaire et d'accès (zone de jonction entre la pipette et la membrane cellulaire) sont relevées. Bien que chaque cellule de chaque expérience soit d'une moelle épinière différente, les valeurs de capacitance et de résistance membranaire ne sont pas significativement différentes d'un groupe de traitement à l'autre. Ensuite, les différents protocoles expérimentaux peuvent être appliqués.

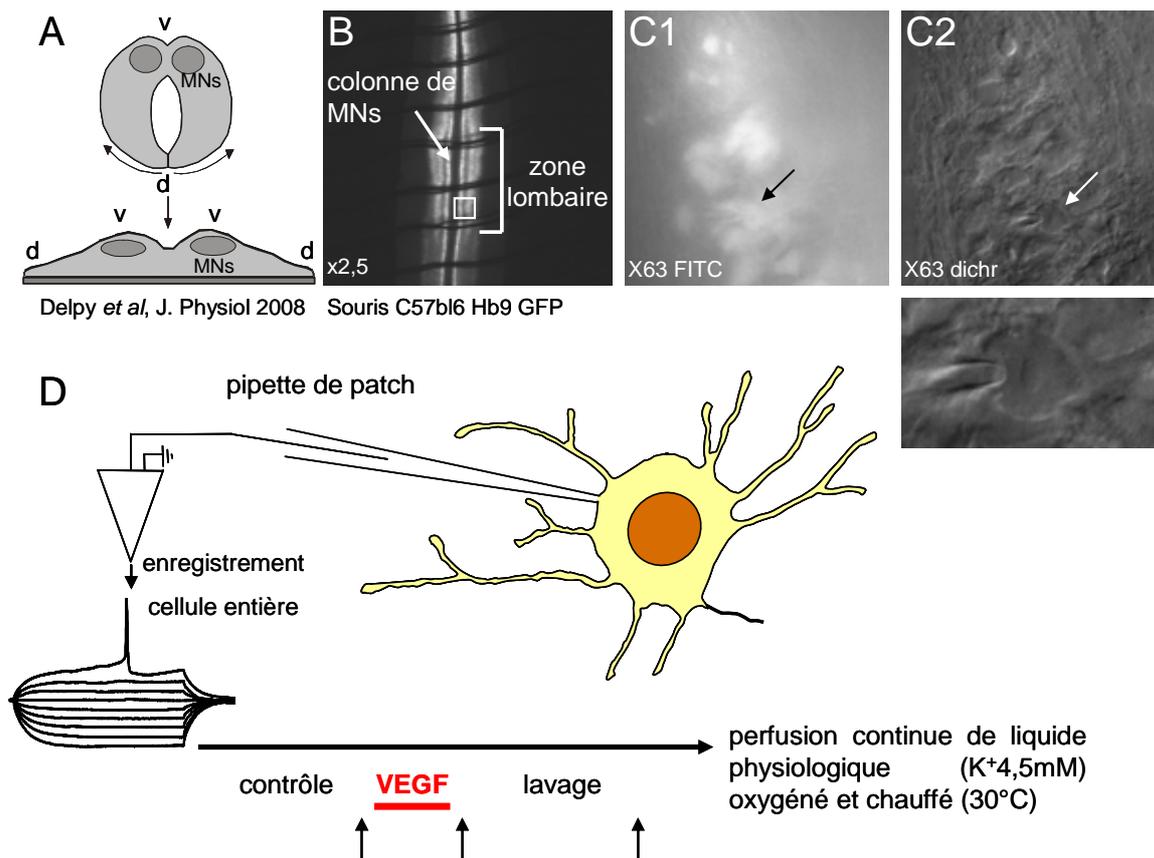


Fig. 17: Représentation schématique du protocole expérimental pour l'analyse des capacités intrinsèques des MNs enregistrés. Après avoir sorti délicatement la moelle de l'embryon, celle-ci est ouverte en sa partie dorsale (d), déminéagée et disposée dans la chambre d'enregistrement en configuration 'livre ouvert' (A). Les MNs sont ainsi accessibles et facilement reconnaissables car organisés en colonne dans la partie ventrale (v) de la moelle (B). Sous contrôle visuel, la pipette de patch est approchée au plus près du MN que l'on veut enregistrer (C1 et C2). Les MNs sont patchés en configuration cellule entière ('whole cell') avec du liquide intracellulaire comprenant du K gluconate (D). Les expériences se font en courant imposé et les variations de potentiel de membrane sont enregistrées. Après une période de contrôle (20-30min), du VEGF (50ng/mL, Peprotech) est ajouté au liquide physiologique perfusé ($K^+4,5mM$) pour une application aiguë (10min). Les protocoles de courbe IV indiqués par des flèches sont réalisés juste avant et à la fin du traitement ainsi qu'en fin de lavage (20-30min après la fin du traitement). Ce protocole est appliqué quel que soit le facteur perfusé.

Quel que soit le paramètre étudié, pour chaque cellule une période de contrôle est effectuée pendant 20 à 30 minutes avant d'**appliquer le traitement**. Après ce dernier, nous observons une période de lavage (Fig. 17D et 18). Nous disposons donc des données basales de la cellule, de leur évolution selon le traitement appliqué et de leur retour aux conditions contrôle une fois le traitement achevé. Les données de capacitance et des résistances sont reprises en fin d'expérience pour vérifier l'intégrité de la cellule.

Les courants et voltages imposés sont contrôlés par le logiciel Multiclamp (Molecular Devices, California, USA). Les données sont filtrées en bande passante 2kHz et acquises à

une fréquence de 10kHz. Elles sont amplifiées par Axon Multiclamp 700B et numérisées par le convertisseur Digidata 1322A (Molecular Devices, California, USA). L'ensemble des protocoles appliqués est géré par le logiciel d'acquisition Clampex 10 (Molecular Devices, California, USA).

7-2-1) Etudes en courant imposé : protocoles de courbes I/V.

Pour les protocoles de courbes courant/voltage (I/V), le milieu extracellulaire est composé des éléments suivants en mM : NaCl 113 ; KCl 4,5 ; CaCl₂, 2H₂O 2 ; MgCl₂, 6H₂O 1 ; NaHCO₃ 25 ; NaH₂PO₄, H₂O 1 et D-Glucose 11. Son nom est simplifié par K⁺ 4,5mM. Le milieu intracellulaire contient du potassium gluconate en mM : K gluconate 130 ; NaCl 5 ; CaCl₂, 2H₂O 1 ; HEPES 10 ; ATP Mg²⁺ 2 et EGTA 10. L'ATP et l'EGTA sont ajoutés extemporanément aux aliquotes de milieu fraîchement décongelées après stockage à -20°C. Le pH est ajusté avec du KOH 1M pour être voisin de 7,4. Avec ces milieux intra- et extracellulaires, le potentiel de jonction est de 14mV. Il faut donc par conséquent soustraire cette valeur à toutes celles calculées ou mesurées lors des expériences pour le potentiel de membrane afin d'avoir sa valeur réelle. Par exemple pour une valeur de potentiel membranaire mesurée par le logiciel de -60mV, la valeur réelle est de -74mV.

Les mesures se font en configuration 'current-clamp' (courant imposé) et donc les variations de potentiel de membrane sont enregistrées. Selon les cellules, il peut être appliqué un courant (Holding) pour compenser les légers changements de polarisation de la cellule au cours de l'expérience. Les données présentées tiennent compte de cet ajustement. Toutefois, les cellules ayant de trop fortes variations de potentiel de membrane sont exclues des analyses. Les protocoles de courbes IV sont réalisés juste avant et à la fin du traitement ainsi qu'en fin de lavage (Fig. 17D). Nous appliquons des valeurs croissantes de courant de -120pA à +60pA par paliers de 15pA et nous mesurons les variations de potentiel suite à ces stimulations. Les courbes IV générées sont reconstruites avec le logiciel Clampfit et les résultats obtenus sont analysés et comparés avec le logiciel GraphPad Prism.

7-2-2) Etudes en voltage imposé : analyse de l'activité synaptique.

Pour l'analyse des événements synaptiques, le milieu extracellulaire est le même que celui décrit précédemment à ceci près qu'il est plus concentré en ions potassium K⁺ 6mM.

Ceci nous permet d'avoir une fréquence plus élevée d'activité synaptique et donc facilite les analyses. Pour avoir une même osmolarité, la concentration en NaCl a été ajustée à 111,5mM. Cette fois-ci, les mesures sont faites en configuration 'voltage clamp' (potentiel imposé) et les variations de courant sont enregistrées. Le potentiel imposé diffère selon le stade pour reproduire les conditions physiologiques de maturation progressive du réseau décrites précédemment par le laboratoire (Delpy et al., 2008). Ainsi, pour les stades E13,5 ; E15,5 et E17,5 les potentiels imposés sont respectivement de -55 ; -60 et -70mV. Le milieu intracellulaire contient (en mM) du CsCl 130 ; MgCl₂, 6H₂O 4 ; HEPES 10 ; ATP2Na⁺ 4 et EGTA 10. Tout comme le milieu K gluconate, l'ATP et l'EGTA sont ajoutés le jour même au reste de la solution. Le pH est ajusté aux alentours de 7,4 avec du CsOH 1M. Le potentiel de jonction est de 3,4mV lors de ces conditions expérimentales. Le milieu CsCl permet de mieux discriminer les évènements synaptiques GABA/glycinergiques. En effet, il contient une concentration élevée en ions chlorure et, dans ces conditions expérimentales, le potentiel d'équilibre de ces ions est alors proche de zéro (2,9mV). L'ouverture de récepteurs laissant passer ces ions va permettre leur sortie de l'intérieur de la cellule vers l'extérieur. Pour compenser cette sortie d'anions, le logiciel va commander l'injection de courant négatif. Nous allons donc observer des évènements négatifs et d'amplitude importante.

Nous avons choisi de focaliser notre attention sur la **libération spontanée de GABA et de glycine** à proximité du motoneurone enregistré (Fig. 18). Pour cela, nous avons ajouté de la Tetrodotoxine (TTX, Latoxan ref L85 03) à 200nM final qui inhibe les canaux sodiques voltage dépendants (ouverts au début des potentiels d'action, PA). La propagation des PA est donc bloquée dans toute la moelle épinière isolant artificiellement le motoneurone enregistré et son voisinage immédiat du reste du réseau spinal. Nous visualisons ainsi les évènements miniatures dus à la libération spontanée de neurotransmetteurs. En théorie, l'évènement ayant l'amplitude la plus faible nous donne la quantité minimale de neurotransmetteur libéré ou 'quanta'. Cependant, il est très fréquent que ces quantum ne soient pas détectables car ils sont d'amplitude équivalente aux variations basales. Pour distinguer les activités synaptiques GABA/glycine des celles liées à la libération de glutamate, il est nécessaire d'utiliser des inhibiteurs spécifiques. Ainsi, du CNQX (ref 1045, Tocris) est ajouté dans le liquide physiologique pour une concentration finale de 1µM. C'est un inhibiteur des récepteurs AMPA/kainate au glutamate. Nous n'avons pas utilisé d'inhibiteur à plus large spectre ou une combinaison avec un inhibiteur des récepteurs NMDA car il est considéré que compte tenu du stade de développement et des conditions expérimentales ces activités ont des effets nuls. En

effet, l'ouverture des récepteurs NMDA est dépendante du voltage. Or, le seuil d'activation de ce récepteur est supérieur à celui imposé tout au long de notre protocole expérimental. C'est pour cela que nous n'avons pas ajouté d'inhibiteurs des récepteurs NMDA dans le liquide physiologique.

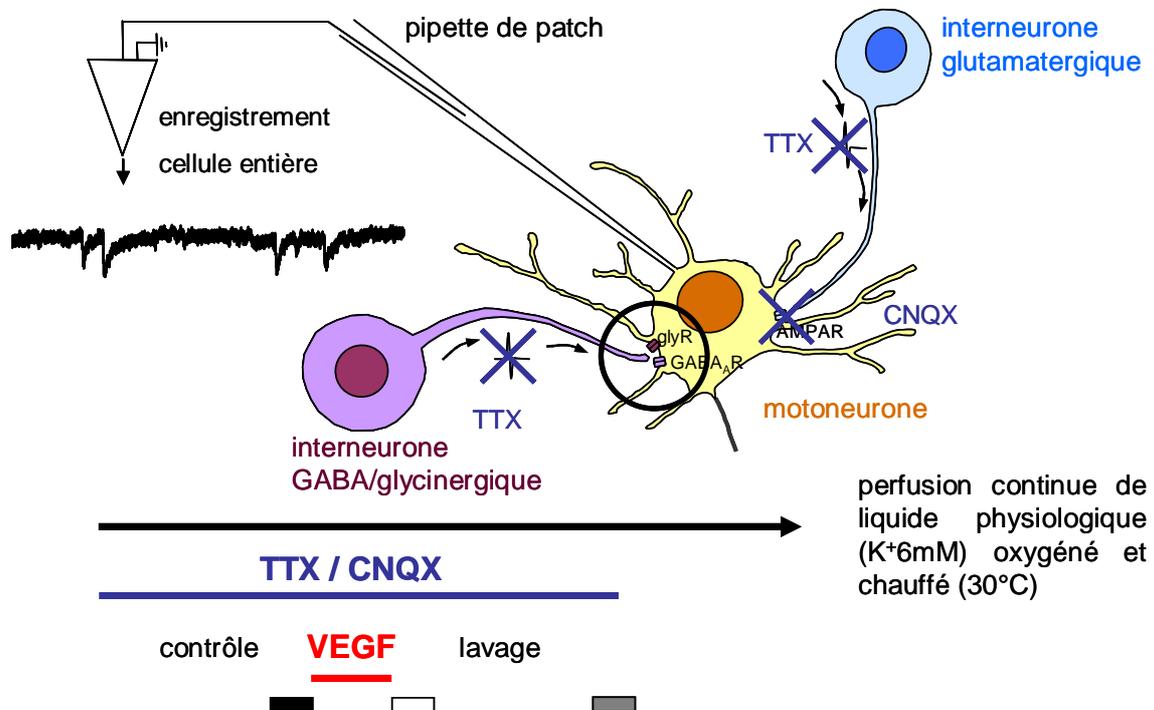


Fig. 19: Représentation schématique du protocole expérimental pour la détection des événements miniatures GABA/Glycinergeriques. Les MNs sont patchés en configuration cellule entière avec du liquide intracellulaire comprenant du chlorure de césium. Le voltage imposé (-55, -60 ou -70mV) est adapté aux valeurs de potentiel de membrane propres à chaque stade de développement (E13,5, E15,5 ou E17,5 respectivement, Delpy et al, 2008) et les variations de courant sont enregistrées. De la Tetrodotoxine (TTX, 200nM, inhibiteur des canaux sodiques voltage dépendant ouverts au début des potentiels d'action) et du CNQX (1 μ M, inhibiteur des récepteurs au glutamate de type AMPA/Kainate) sont ajoutés dans le liquide extracellulaire perfusé (K⁺6mM) afin de ne détecter que les événements miniatures liés à la libération spontanée de GABA et de glycine au niveau des MNs enregistrés. Après une période de contrôle (20-30min), du VEGF (50ng/mL, Peprotech) est ajouté au liquide perfusé pour une application aiguë (10min). L'analyse de l'activité synaptique se fait sur des périodes de 4min, indiquées par de rectangles, juste avant et à la fin du traitement ainsi qu'en fin de lavage (20-30min après la fin du traitement). Ce protocole est appliqué quel que soit le produit appliqué.

Tous les événements synaptiques sont analysés sur des périodes de 4 minutes juste avant et à la fin du traitement ainsi qu'en fin de lavage (Fig. 18). Cet intervalle nous permet d'avoir une quantité suffisante d'évènements à analyser pour tous les stades étudiés lors de cette thèse. Ils sont détectés avec le logiciel MiniAnalysis (Synptosoft, Fort Lee NJ, USA) et leurs périodes et amplitudes sont comparées par le test de Kolmogorov Smirnov du logiciel.

Les graphiques et analyses statistiques concernant les données obtenues pour l'ensemble des cellules ayant subi le même traitement ont été réalisés avec le logiciel GraphPad Prism.

8) Analyses statistiques.

Les données sont exprimées en moyenne \pm écart type de la moyenne ('standard error of the mean' ou sem). Les indications concernant le nombre d'échantillons (n) et le seuil de significativité (p) sont indiquées sur chaque graphique ou tableau de résultats.

Compte tenu de la taille des échantillons, les tests statistiques utilisés sont non paramétriques.

Dans le cadre d'étude de comparaison de plusieurs stades ou de traitements sur des moelles épinières différentes, les données comparées sont indépendantes les unes des autres. Dans ces conditions, les tests de Mann & Whitney ou de Kruskal & Wallis (suivi du post test de Dunn) permettent respectivement de comparer 2 ou alors plus de 2 séries de données.

Dans le cadre des expériences électrophysiologiques, les comparaisons se font entre une condition contrôle et une condition traitement (et condition lavage) pour une même cellule ou groupe de cellules. Les données sont dites appariées (ou non indépendantes). Dans ce cas, les tests de Wilcoxon ou de Friedman (suivi du post test de Dunn) permettent respectivement de comparer 2 ou alors plus de 2 séries de données.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

RÉSULTATS ET DISCUSSION

1) Mise en place du réseau vasculaire dans la moelle épinière.

Le premier objectif de ce travail de thèse a été d'appréhender la mise en place du réseau vasculaire dans la moelle épinière lors de la seconde partie du développement embryonnaire. En effet, jusqu'à ce jour, les données fournies dans la littérature ne se rapportent qu'à des stades ponctuels (stade E10,5 pour Nakao et al., 1988, stade E10,5 pour Hogan et al., 2004, stades E9,7 à E10,5 pour Nagase et al., 2005, stades E11,5 à E14,5 pour Rigato et al., 2011).

Nous avons focalisé notre attention sur la partie lombaire de la moelle épinière d'embryons de souris. Nous avons choisi 4 stades de développement embryonnaire (E11,5 ; E13,5 ; E15,5 et E17,5) complétés par des échantillons au jour de la naissance (P0).

Pour **visualiser les vaisseaux** nous avons effectué des immunohistomarquages CD31 (Cluster of Differentiation 31), marqueur des cellules endothéliales qui forment la première couche de vaisseaux, sur des coupes transversales de moelles épinières de souris de la lignée OF1 (Fig. 20).

Au premier stade de notre champ d'investigation (E11,5), les vaisseaux forment un cercle péri-médullaire (indiqué par la flèche). Quelques vaisseaux sont visibles à l'intérieur de la moelle et sont disposés parallèlement au canal central (positionné par la ligne en pointillés). Ces observations sont similaires à celles observées dès 1988 par T. NAKAO et ses collègues sur le stade E10,5 mais aussi par C. Rigatto et ses collaborateurs (2011) avec la détection du facteur Von Willebrand (autre marqueur endothélial).

Pour les stades suivants, les vaisseaux sont toujours présents autour de la moelle mais ils sont de plus en plus nombreux à l'intérieur de celle-ci et colonisent peu à peu tout l'espace (Fig. 20). Au stade P0, nous pouvons distinguer des vaisseaux de diamètre plus important logés dans les sillons ventraux et dorsaux. Nous n'avons pas utilisé de marqueurs spécifiques des artères ou des veines mais d'après les descriptions anatomiques chez l'adulte (Fig. 3), nous pouvons supposer qu'il s'agit des veines médianes antérieures et postérieures.

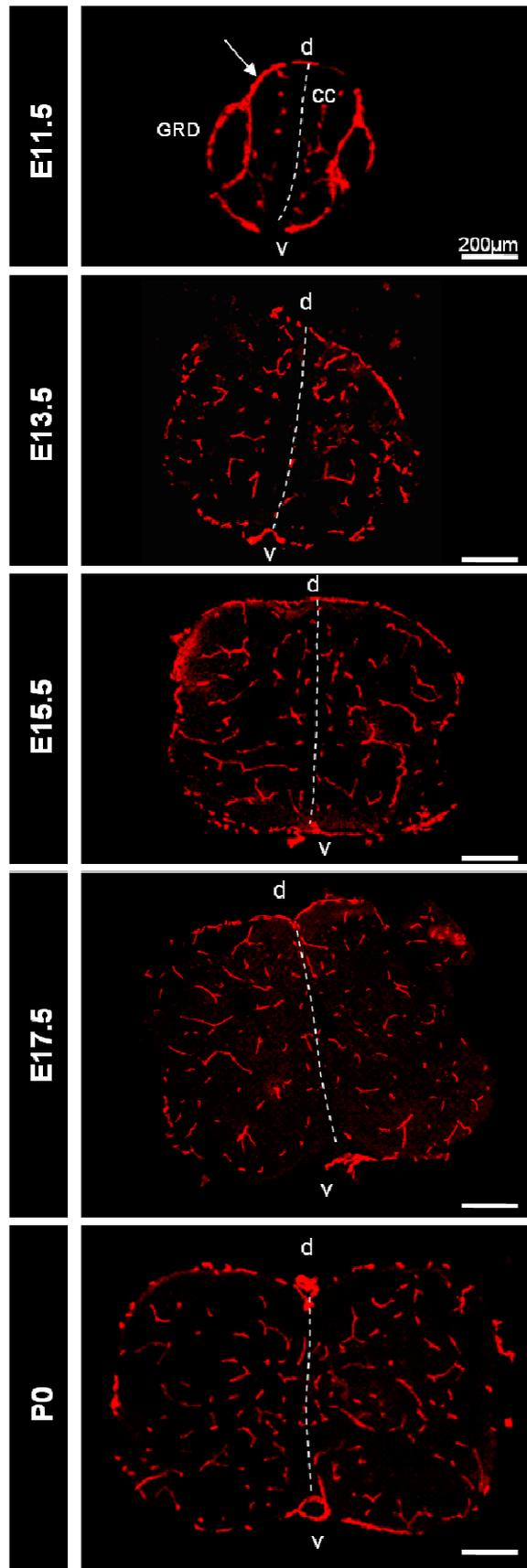


Fig. 20: Vascularisation de la moelle épinière au cours du développement embryonnaire de la souris. L'immunodétection de CD31 nous permet de distinguer les cellules endothéliales et donc la vascularisation de la moelle épinière lors de la vie embryonnaire (E11,5 à E17,5) et le jour de la naissance (P0). Les vaisseaux sont présents à la fois autour (flèche) et à l'intérieur de la moelle épinière. *d*: dorsal; *v*: ventral, *ligne pointillés*: canal central (*cc*), *GRD*: ganglion de racine dorsale

Afin d'appréhender le développement du réseau vasculaire, plusieurs critères ont été évalués. Le rapport entre la **surface des vaisseaux** et la surface totale de la moelle épinière a été calculé. Excepté pour le stade E11,5, celui-ci reste constant au cours du développement embryonnaire (test de Kruskal et Wallis, $p < 0,0001$) (Fig. 21A).

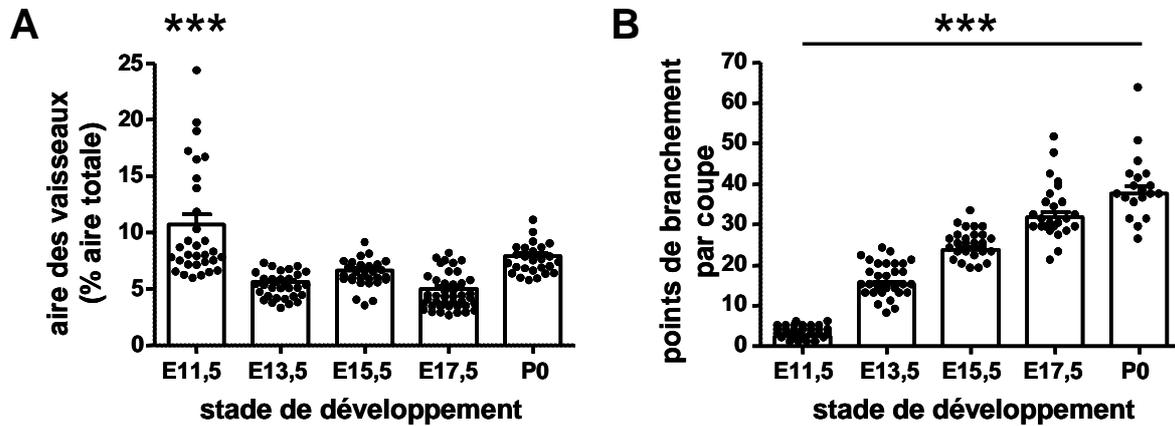


Fig. 21: Complexification progressive du réseau vasculaire spinal. L'aire des vaisseaux reste stable au cours du développement à l'exception du stade E11,5 (test de Kruskal et Wallis, $p < 0,0001$) (A). Les points de branchement augmentent au cours du développement indiquant une complexification progressive du réseau vasculaire (test de Kruskal et Wallis, $p < 0,0001$) (B). Les quantifications sont obtenues à partir des marquages CD31 sur les coupes transversales de moelles épinières de souris de souche OF1.

Les **points de branchement** ont aussi été dénombrés sur l'ensemble des coupes de moelle épinière (Fig. 21B). Très peu nombreux voire absents de certaines coupes au stade E11,5, leur nombre augmente de façon linéaire au cours du développement embryonnaire (test de Kruskal et Wallis, $p < 0,0001$). Ceci est synonyme d'une complexification progressive du réseau vasculaire dans la moelle épinière tout au long de la seconde partie de la vie embryonnaire.

Afin de persister, les vaisseaux nouvellement formés doivent être stabilisés et notamment par des péricytes. Pour les distinguer, nous avons réalisé un double marquage des vaisseaux (CD31) avec NG2 (Neuron-Glial antigen 2 ou chondroitin sulfate, un des marqueurs péricytaire). Alors que nous avons démontré une complexification progressive du réseau vasculaire, nous avons aussi pu constater que sa maturation n'est pas uniforme. En effet, au stade E11,5 seuls les vaisseaux intraspinaux de la partie ventrale de la moelle sont entourés de cellules positives pour NG2 (Fig. 22). Nous avons donc ici un gradient ventro-dorsal pour la maturation des vaisseaux. Pour les stades suivants, le marquage NG2 est

présent à tous les points de branchement des vaisseaux mais aussi sur certaines branches du réseau vasculaire.

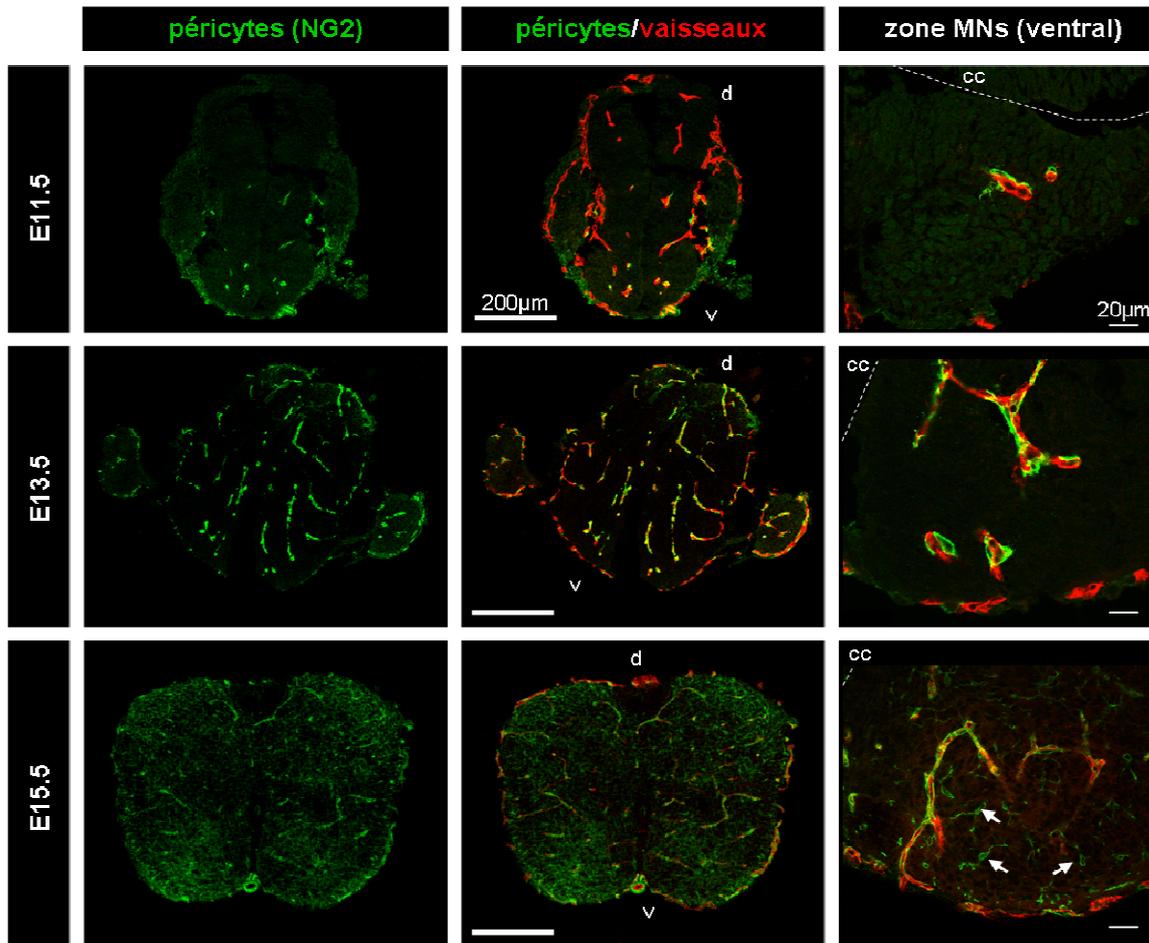


Fig. 22: Maturation du réseau vasculaire. Le double marquage des vaisseaux (CD31, rouge) et des péricytes (NG2, vert) montre une maturation progressive du réseau vasculaire selon un axe ventro-dorsal avec l'apparition des premiers péricytes autour des capillaires dans la partie ventrale au stade E11,5. Aux stades suivants, les péricytes sont présents dans toute la moelle épinière autour des capillaires. Au stade E15,5, les cellules positives pour NG2 qui n'entourent pas les vaisseaux sont des précurseurs oligodendrocytaires (colonne de droite, *flèche*). *d*: dorsal, *v*:ventral, *cc*: canal central (*ligne pointillée*).

Certaines cellules éloignées des vaisseaux présentent une immunoréactivité pour NG2 à partir du stade E15,5 et surtout à E17,5 (Fig. 22). Cela peut s'expliquer par le fait que NG2 est aussi exprimé par les précurseurs oligodendrocytaires et que c'est à partir de ce stade qu'ils apparaissent dans cette zone de la moelle épinière (Ligon et al., 2006).

En colonisant ainsi progressivement tout le tissu nerveux, les vaisseaux envahissent la zone des MNs. Pour évaluer leurs localisations respectives au cours de la vie embryonnaire nous avons effectué un marquage CD31 sur des coupes de moelles épinières provenant

d'embryons de souris surexprimant la GFP dans les MNs Hb9. Les vaisseaux suivent le même développement que celui décrit précédemment sur les souris de souche OF1, à savoir une complexification progressive du réseau à l'intérieur de la ME au cours du développement. La mise en place des MNs se fait elle aussi progressivement. En effet, leurs corps cellulaires sont regroupés dans une même zone de la corne ventrale au stade E11,5 puis peu à peu des sous populations se forment. Ces groupes vont permettre à terme de former les différentes colonnes des MNs sur toute la hauteur de la moelle épinière mature (Fig. 23 et Jessell, 2000). Dans ce contexte, les vaisseaux et les MNs qui sont éloignés au stade E11,5 vont être de plus en plus proches et entremêlés (Fig. 23).

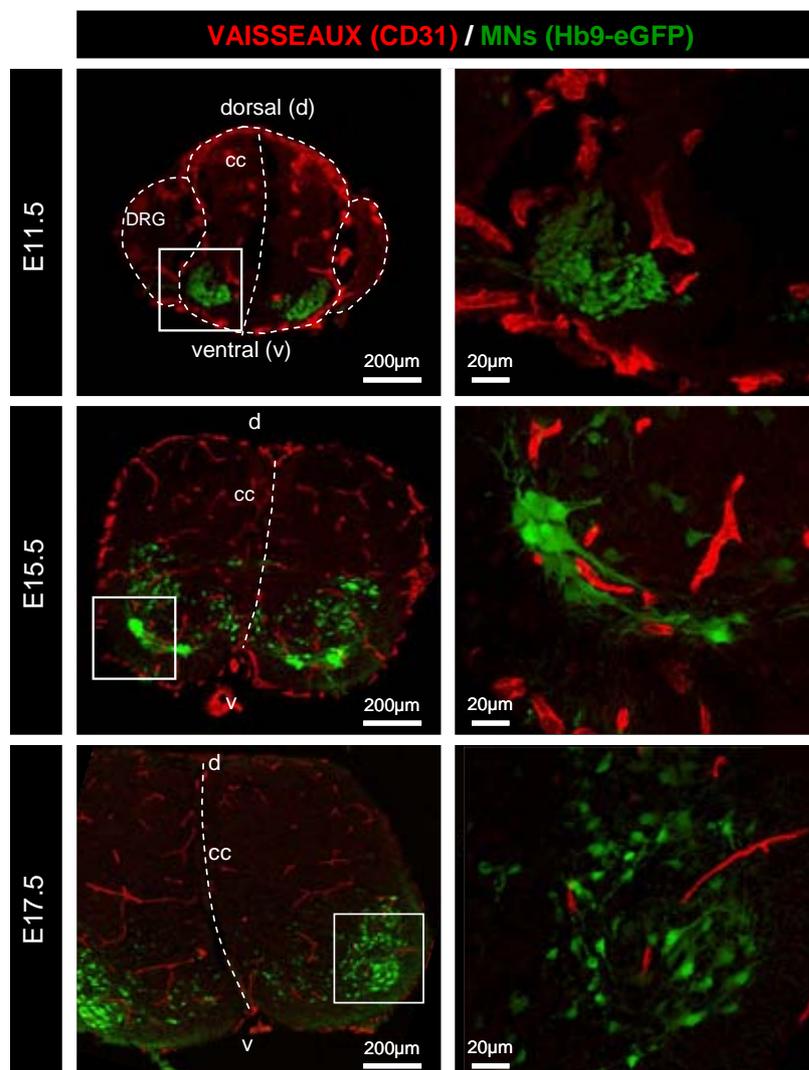


Fig. 23: Relation entre les vaisseaux et les motoneurones lors du développement embryonnaire. Le marquage des vaisseaux (CD31 rouge), sur des coupes transversales de moelles épinières de souris sur-exprimant la GFP dans les MNs (vert) nous permet de constater l'enchevêtrement progressif des vaisseaux avec les MNs au cours de la vie embryonnaire (*projections de 5 coupes confocales*).

Le processus de formation de nouveaux vaisseaux à partir du réseau existant (ou angiogenèse) est le résultat de la sécrétion de plusieurs facteurs dans le milieu dont un majeur : le VEGF. Sa présence a été démontrée à des stades ponctuels chez l'embryon (hybridation *in situ* au stade E11,5 chez le rat, (Ruiz de Almodovar et al., 2011). Nous avons donc cherché à détecter sa présence par marquage immunohistochimique dans la moelle épinière, et notamment dans la zone des MNs, au cours du développement embryonnaire.

Sa localisation diffère selon le stade considéré. En effet, aux stades E11,5 à E15,5 ce facteur est présent de façon ubiquitaire et diffuse dans le tissu (Fig. 24A). Aux stades plus tardifs (E17, 5 et P0) nous avons un profil d'expression plutôt ciblé à quelques cellules qui sont des interneurons GABA ou Glycine mais peuvent aussi être de MNs.

Bien que son profil d'expression évolue au cours du temps, la quantification globale du signal dans la zone ventrale de la partie lombaire reste stable au cours du temps (Kruskall & Wallis, $p=0,5372$) (Fig. 24B).

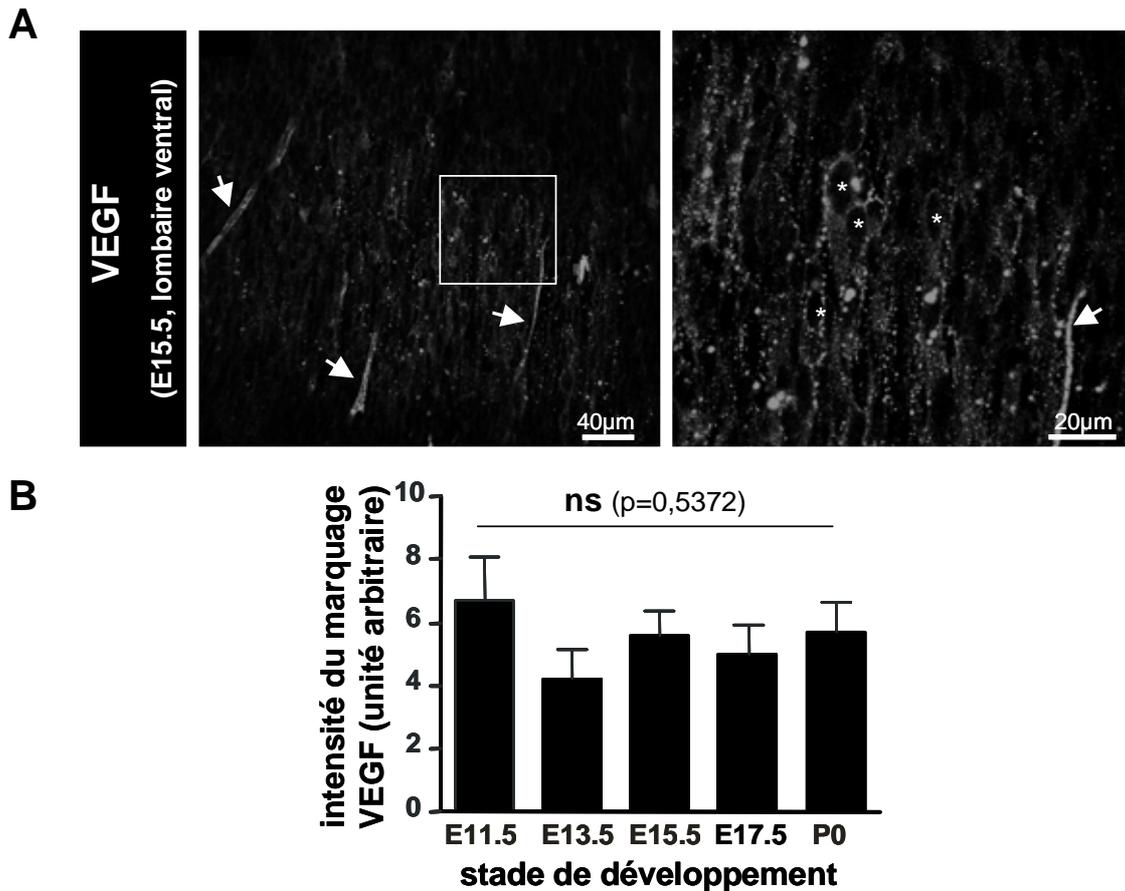


Fig. 24: Détection du VEGF dans la moelle épinière au cours du développement embryonnaire. Le VEGF a été détecté par immunohistochimie (A, stade E15.5, B20 Genentech) et le signal a été quantifié à tous les stades dans la zone ventrale des MNs de la partie lombaire. Nous n'observons pas de modification significative dans l'intensité mesurée (test de Kruskal & Wallis, $n=6$ pour chaque condition, $p=0,5372$) (B). Les flèches pointent les vaisseaux et les astérisques marquent les neurones.

Nos résultats sont similaires à ceux obtenus dans d'autres études qui démontrent la présence de VEGF dans la zone ventrale de la moelle épinière à plusieurs stades de la vie embryonnaire. En effet, les transcrits et la protéine sont détectés dans la zone des motoneurones au stade E9,5 (Hogan et al., 2004) et E10,5 (Nagase et al., 2005) et E11,5 (Ruiz de Almodovar et al., 2011). Il est aussi détecté dans les ganglions des racines dorsales (Ruiz de Almodovar et al., 2011; Sondell et al., 2000).

La détection du VEGF dans le tissu nerveux est en accord avec le décours temporel de la néo-vascularisation de la moelle épinière décrit précédemment. En effet, aux stades plus précoces, la formation de nouveaux vaisseaux est nécessaire et de ce fait la sécrétion accrue de VEGF dans le tissu est corrélée. A des stades plus tardifs, le tissu étant vascularisé dans sa globalité, la formation de nouveaux vaisseaux est plus ponctuelle ce qui est cohérent avec les marquages cellulaires plus sporadiques observés.

Nous avons donc mis en évidence la formation progressive et continue du réseau vasculaire dans la moelle épinière au cours de la seconde partie de la vie embryonnaire. Nous avons aussi démontré que du VEGF est sécrété dans le tissu au cours du développement. Nous nous sommes donc posé la question du rôle direct du VEGF sécrété sur l'activité du réseau neuronal adjacent.

2) Effet du VEGF sur l'activité du réseau neuronal au stade E15,5 du développement embryonnaire.

2-1) Rôle du VEGF sur les caractéristiques intrinsèques des motoneurones (MNs).

Nous avons commencé notre étude en nous focalisant sur le stade E15,5 du développement embryonnaire. En effet, celui-ci est le point central de notre fenêtre d'observation (de E11,5 à P0). D'autre part, bien qu'encore immature le réseau est suffisamment développé pour que des activités synaptiques aient lieu.

Nous avons voulu d'abord savoir si le VEGF a un effet direct sur les motoneurones. Pour cela nous avons réalisé des expériences d'électrophysiologie en enregistrant les MNs en configuration cellule entière (ou 'whole cell'). Nous avons supposé que le VEGF pouvait modifier la capacité des MNs à recevoir ou transmettre l'information nerveuse. Nous avons utilisé une concentration de 50ng/mL qui a montré des effets prolifératifs les plus importants sur des cultures de cellules endothéliales. Nous avons donc réalisé des courbes I/V (Fig. 25A). Leur analyse se déroule en 2 étapes.

Dans un premier temps, nous nous intéressons à la partie inférieure de la courbe (sans déclenchement de potentiel d'action). Pour chaque valeur de courant imposé nous notons la valeur de potentiel de membrane obtenue (fig. 24A). Nous pouvons ainsi tracer la courbe $V=fct(I)$ (Fig. 25B). La pente de la droite nous donne une indication sur la **résistance de membrane** (loi d'Ohm : $V=RI$). La valeur de potentiel (V en mV) pour un courant nul (I en pA) nous donne le **potentiel membranaire de repos** de la cellule. Nous voyons que la présence de VEGF exogène dans le liquide physiologique ne change pas la pente de la droite

(Fig. 25B). La résistance reste donc inchangée. Dans ces conditions expérimentales, le VEGF ne modifie pas la conductance membranaire. Ces résultats sont confirmés lorsque les données de 8 cellules sont regroupées (Fig. 25C).

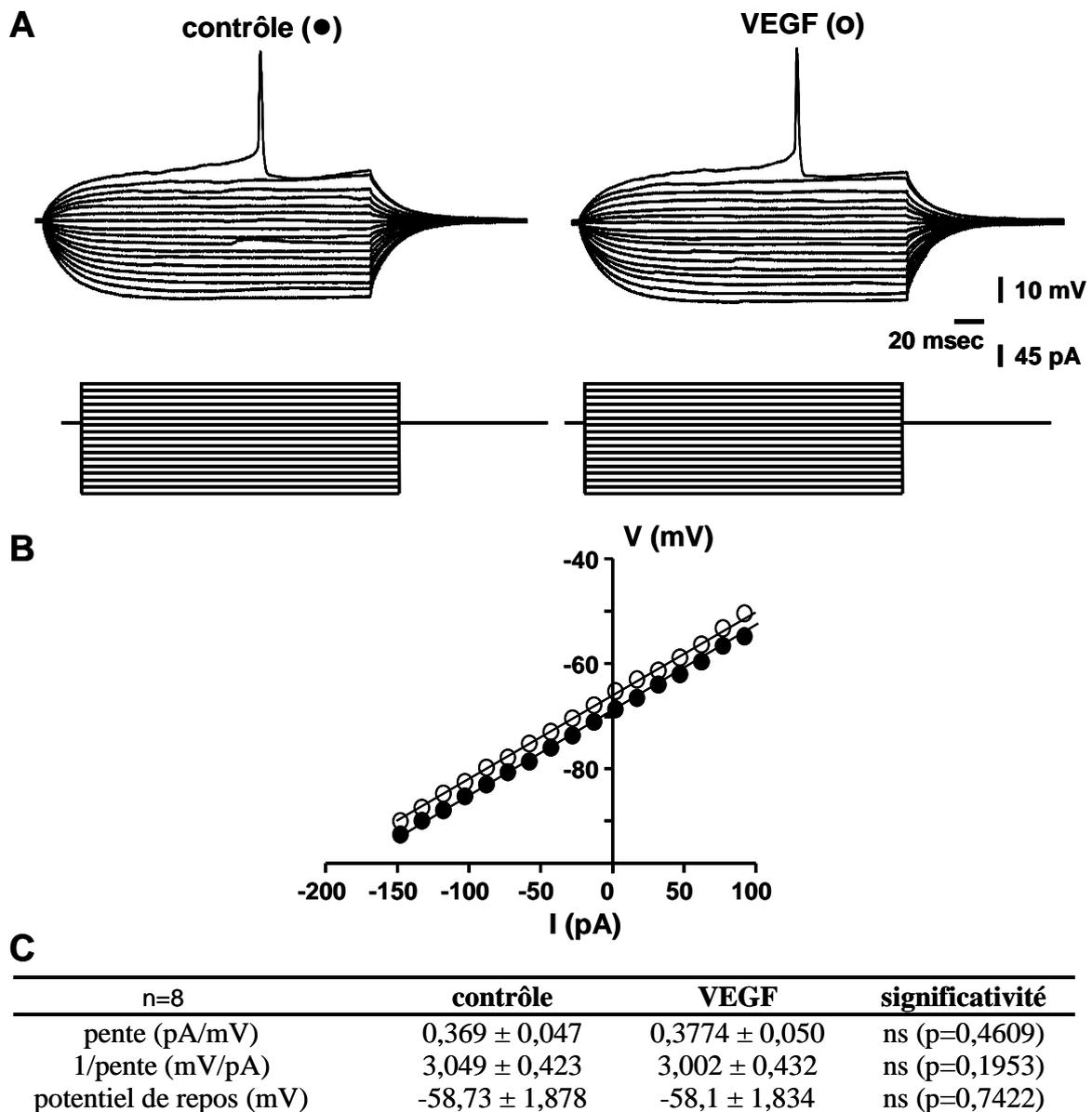


Fig. 25: Etude des effets du VEGF sur les caractéristiques intrinsèques des motoneurones: courbes $V=fct(I)$. La partie A représente les variations de potentiel observées suite aux variations de courant imposées en conditions contrôle (à droite) et VEGF (à gauche). La reconstruction de droites $v=fct(I)$ (B) permet de déterminer les variations de R_m dues au traitement appliqué (C). Les données ont été obtenues sur 8 cellules de 8 moelles épinières différentes traitées pendant 10min avec du VEGF (50ng/mL, Peptotech). Aucune différence n'est observée en présence de VEGF (test de Wilcoxon).

La seconde partie de l'analyse de ces courbes I/V concerne l'excitabilité des MNs à travers l'analyse des **potentiels d'actions (PA)** qui apparaissent pour des valeurs de courant imposé positives. Plusieurs critères sont alors considérés : le seuil de stimulation du courant

injecté pour lequel les cellules vont déclencher un PA (seuil d'excitabilité), la valeur du potentiel de membrane lors de son déclenchement (seuil de déclenchement), l'amplitude du PA. Un PA peut aussi être caractérisé par sa durée à mi-hauteur, son temps de montée et de descente. Le retour de la membrane à son potentiel de repos est aussi considéré et l'amplitude de l'AHP (After HyperPolarisation) a été étudiée (Fig. 26A). Quel que soit le critère considéré, aucun d'entre eux ne varie de façon significative en présence de VEGF pour l'ensemble des cellules analysées (tableau Fig. 26B).

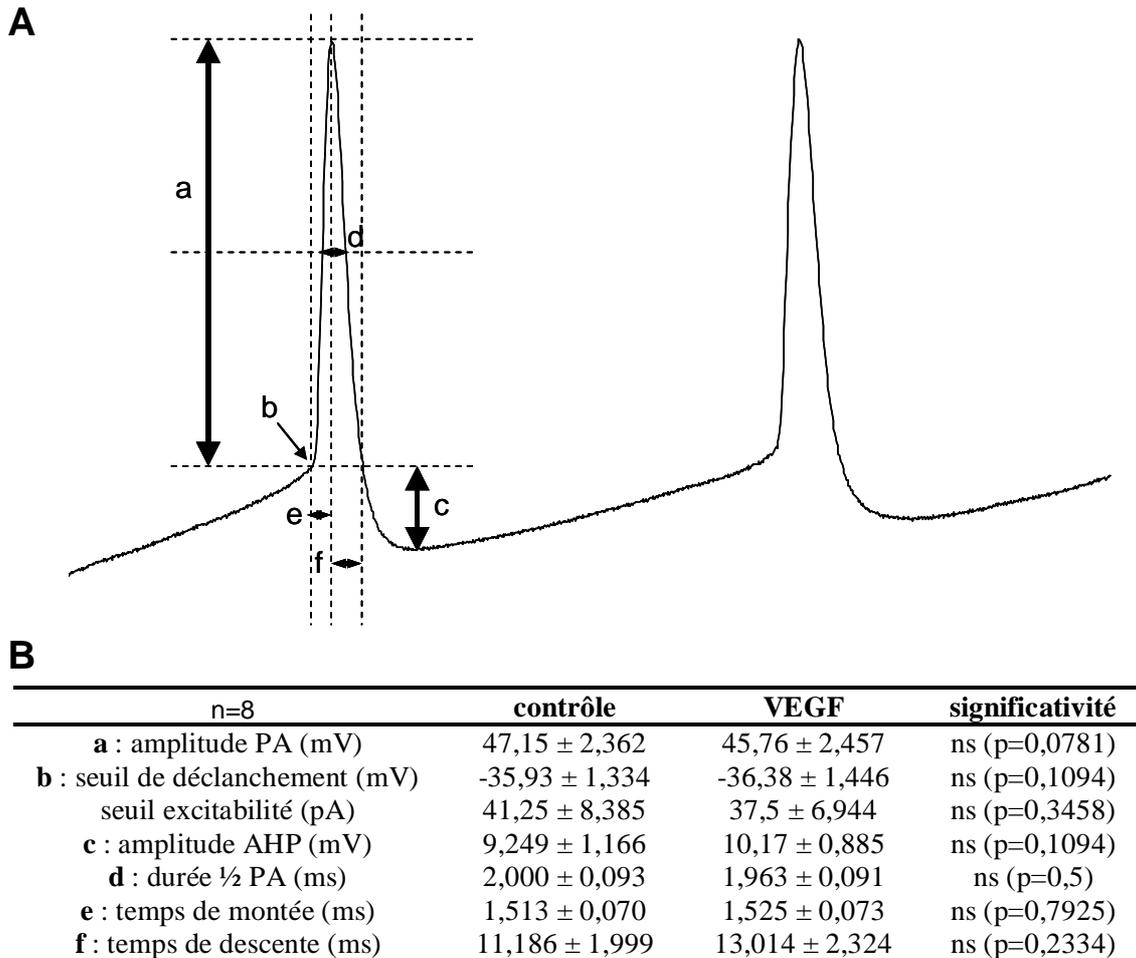


Fig. 26: Etude des effets du VEGF sur l'excitabilité et les caractéristiques intrinsèques des Potentiels d'Action déclenchés (PA). La partie A schématise les différentes caractéristiques listées dans le tableau (B). Les données ont été obtenues sur 8 cellules de 8 moelles épinières différentes traitées pendant 10min avec du VEGF (50ng/mL). Aucune différence significative n'est observée lors du traitement pour tous les critères étudiés (test de Wilcoxon).

Nous avons donc montré que dans nos conditions expérimentales, l'application de VEGF exogène ou le blocage du facteur endogène n'est d'aucun effet sur les capacités intrinsèques du MN (résistance de membrane, excitabilité, ...). D'autres publications démontrent aussi que le VEGF (200ng/mL, 30 à 60min) ne modifie pas la conductance ou la

résistance de membrane des neurones pyramidaux CA1 de l'hippocampe (McCloskey et al., 2005) ou des motoneurons du nerf hypoglosse (McCloskey et al., 2008). Dans ces publications ce sont les activités synaptiques évoquées qui sont altérées par le VEGF. Or, lors de certaines de nos expériences, il nous est apparu que l'activité synaptique était modifiée par l'application de VEGF exogène.

Dans nos conditions expérimentales, nous avons discriminé les activités synaptiques liées à la libération de GABA et de glycine de celles dues à la présence de glutamate. Les événements GABA/glycinergiques sont dirigés vers le haut (ou événements sortants), et ceux liés au glutamate sont dirigés vers le bas (ou entrants). Nous avons donc pu quantifier séparément ces 2 populations d'activités synaptiques.

L'application de VEGF exogène ne modifie pas l'amplitude des activités synaptiques liées à la libération de GABA/Glycine ou de glutamate ($p=0,4724$ et $p=0,9394$ respectivement, Fig. 27B). De même, nous n'observons pas de fluctuation du courant injecté dans le MN, ce qui confirme que le VEGF n'a pas d'effet sur son potentiel de membrane lui-même.

La période entre les événements glutamatergiques semble augmentée par l'application de VEGF exogène mais cette variation n'est pas statistiquement significative sur les 16 cellules concernées (test de Friedman, $p=0,9394$). A l'inverse, nous observons une diminution significative de la période des activités GABA/glycine lors de ce même traitement (VEGF : $-25,07 \pm 9,28\%$, lavage $+29,58 \pm 30,34\%$, test de Friedman, $p=0,0468$). L'amplitude de ces mêmes événements reste stable tout au long des traitements (contrôle $14,46 \pm 0,81\text{pA}$, VEGF : $14,3 \pm 1,01\text{pA}$ et lavage $13,39 \pm 0,85\text{pA}$, test de Friedman, $p=0,4724$) (Fig. 27B).

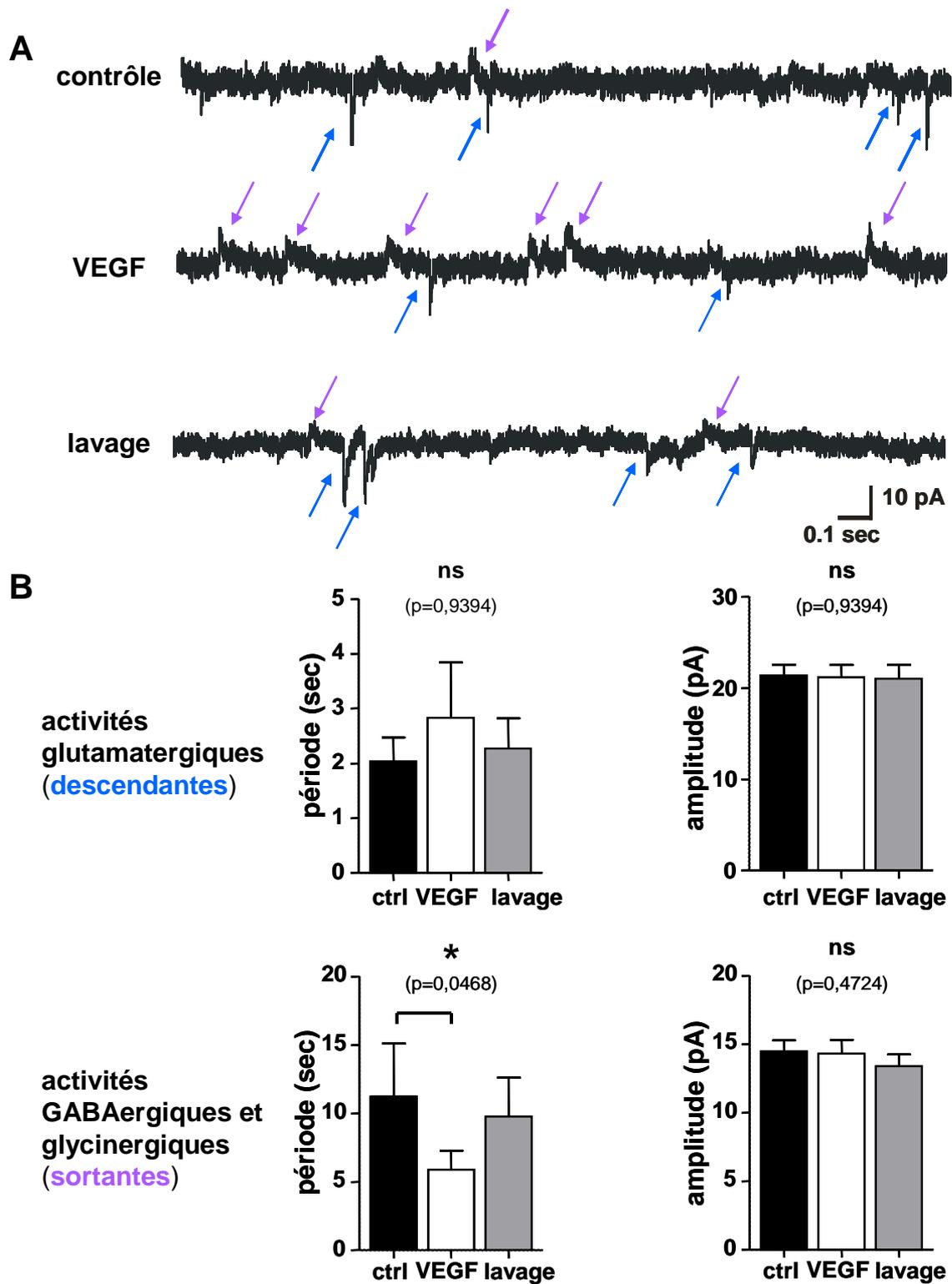


Fig. 27: Évolution des activités synaptiques en présence de VEGF au stade E15.5. Le potentiel de membrane des cellules est imposé à -50mV pour séparer les activités synaptiques glutamatergiques (vers le bas) et GABA/glycinergiques (vers le haut) (A). Seule la période est modulée par l'application de VEGF avec une différence plus marquée et significative pour les activités synaptiques liées à la libération de GABA et de glycine (B). $n=16$ MNs de 16 embryons de 11 portées (test de Friedman).

Nous observons que le VEGF module la libération de neurotransmetteurs à proximité du MN enregistré, et plus particulièrement de GABA et de glycine. Cependant, l'effet du VEGF que nous avons observé peut-être dû à un rôle local ou alors sur tout le réseau. En effet, nous n'avons aucun inhibiteur dans le milieu extracellulaire susceptible de bloquer la transmission de l'influx nerveux dans tout le réseau. Nous avons pu parfois observer des potentiels d'action déclenchés en absence de stimulation de notre part, bien que le stade E15,5 soit connu pour être assez silencieux en terme de propagation d'activité spontanée. Le réseau neuronal fonctionne donc, c'est-à-dire est capable de transmettre des messages qui, s'ils ne déclenchent pas de PA au niveau du MN enregistré, peuvent tout de même modifier la libération de neurotransmetteurs dans son environnement proche ainsi que dans le reste du réseau.

Pour la suite de projet, nous avons choisi de focaliser notre attention sur les activités synaptiques affectées par l'application de VEGF exogène, à savoir les activités GABA/glycinergiques.

2-2) Rôle du VEGF sur la libération spontanée de GABA et de glycine dans la proximité immédiate des motoneurons (MNs) au stade E15,5.

Les cellules de tous les traitements effectués à E15,5 pour étudier les activités GABA/glycinergiques (n=160) ont des capacités de membrane et des résistances membranaires équivalentes qui sont en moyenne de $64,44 \pm 0,92\text{pF}$ et $384 \pm 11,35\text{M}\Omega$ respectivement.

Nous avons donc adapté notre protocole expérimental afin d'étudier plus en profondeur les activités GABA/Glycinergiques. Afin de nous affranchir de l'effet du réseau et des activités liées à la libération de glutamate nous avons ajouté de la TTX et du CNQX dans le milieu extracellulaire (cf. matériel et méthodes, paragraphe 7-2-2).

Comme décrit dans le matériel et méthodes, nous comparons la période et l'amplitude de ces événements en conditions contrôle et en condition traitement. Dans la Fig. 28A sont reportées des portions de tracés obtenus en condition contrôle (à gauche) et VEGF (à droite, 50ng/mL) pour une **cellule représentative** de ce traitement. Chaque déflexion vers le bas correspond à un événement synaptique. Tous sont détectés sur des périodes de 4 minutes et

peuvent être ensuite comparés selon les conditions. Les événements observés sont en théorie de plusieurs types : GABA seuls (assez lents), Glycine seuls (très brefs) ou mixtes (retour en 2 phases) ces 2 neurotransmetteurs pouvant être libérés de façon simultanée par le même interneurone. La majorité des événements détectés à ce stade sont mixtes (et il est donc difficile de savoir sur quelle composante joue le VEGF sans utiliser d'inhibiteurs spécifiques à chaque neurotransmetteur).

La période correspond au temps entre 2 événements synaptiques. Pour cette cellule représentative, nous observons une diminution de la période qui passe d'une valeur moyenne de $3,17 \pm 0,3s$ en control à $1,8 \pm 0,2s$ en traitement VEGF (test de Kolmogorov Smirnov $p < 0,0001$). Nous n'observons pas de changement dans l'amplitude de ces mêmes événements, car elle passe de $38,97 \pm 4,15pA$ à $38,89 \pm 4,24pA$ (test de Kolmogorov Smirnov $p = 0,2361$) (Fig. 28B).

Nous avons reproduit l'expérience et l'ensemble des résultats a été regroupé pour 11 cellules (11 embryons de 9 portées différentes) (Fig. 28C). La **période moyenne** des activités synaptiques est donc de $3,35 \pm 0,6s$ en conditions contrôle, de $2,64 \pm 0,63s$ en présence de VEGF et de $3,47 \pm 0,98s$ lors du lavage. Nous avons donc une diminution moyenne de $24,06 \pm 9,192\%$ lors du traitement et une légère augmentation de $2,59 \pm 16,58\%$ lors du lavage (Fig. 28D). Ces variations sont significatives lors de l'application de VEGF ($p = 0,0377$, test de Friedman suivi par le post test de Dunns). Nous pouvons dire que la fréquence (inverse de la période) des activités synaptiques GABAergiques et glycinergiques est augmentée en présence de VEGF exogène.

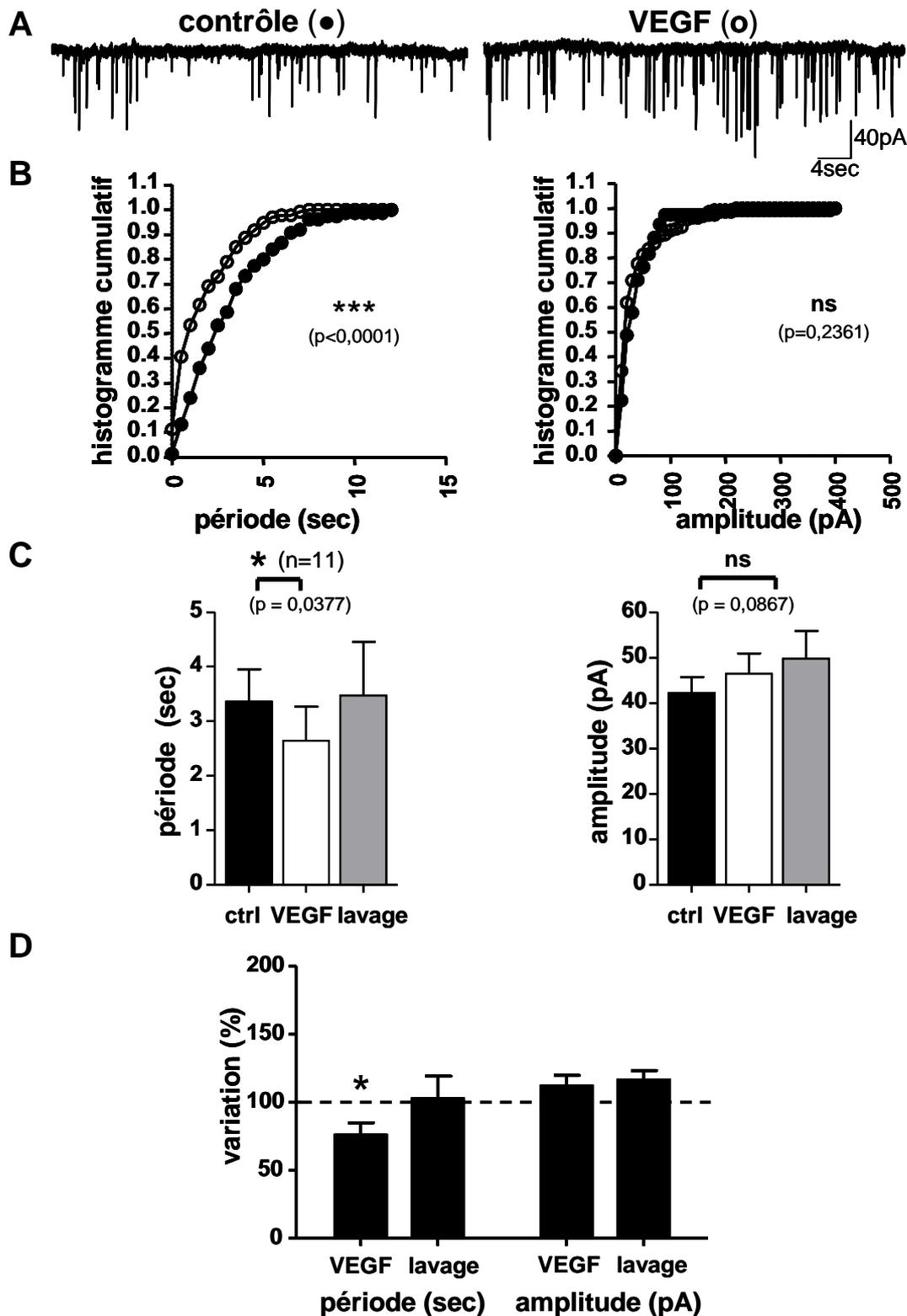


Fig. 28: Modulation de la fréquence des évènements miniatures GABA/glycinergiques par le VEGF au stade E15,5. La partie (A) montre les traces obtenues en conditions contrôle et VEGF (50ng/mL, 10min) pour une cellule représentative. Chaque trait vers le bas correspond à 1 évènement synaptique. Tous les évènements détectés sur des zones d'analyse de 4min par condition sont comparés pour leurs périodes et amplitudes (B). Les données obtenues pour 11 cellules ont été compilées et exprimées en valeurs brutes (C, moy±sem) ou en pourcentage de changement relatif aux données 'contrôle' propres à chaque cellule (D). En présence de VEGF, la période entre les évènements miniatures GABA/glycinergiques est diminuée puis revient à des valeurs équivalentes au 'contrôle' lors du lavage (test de Friedman).

Contrairement à la période, l'amplitude n'est pas significativement modifiée par la présence de VEGF exogène ($p=0,0867$, test de Friedman). En effet, elle ne varie que de $11,8 \pm 7,887\%$ lors de l'application de VEGF et de $16,52 \pm 6,76\%$ lors du lavage (Fig. 28D). L'**amplitude moyenne** des évènements miniatures GABA/glycine est donc de $42,17 \pm 3,51\text{pA}$ en conditions contrôle, de $46,46 \pm 4,44\text{pA}$ en présence de VEGF et de $49,74 \pm 6,15\text{pA}$ lors du lavage (Fig. 28C).

Les valeurs obtenues pour la période et l'amplitude lors du lavage sont voisines de celles obtenues lors des conditions 'contrôle'. Afin de simplifier la présentation des résultats, à partir de ce paragraphe nous ne ferons état que des données obtenues en conditions contrôle et traitement mais pas de celles obtenues lors du lavage. Le test statistique utilisé alors est celui de Wilcoxon. Dans le cas de l'application de VEGF, nous retrouvons la diminution de la période ($p=0,0322$) sans modification de l'amplitude ($p=0,1748$).

Afin de s'assurer que le résultat observé n'est pas la conséquence d'artéfacts, nous avons reproduit cette expérience dans les mêmes conditions à l'exception du VEGF qui a cette fois-ci été omis (Artificial CerebroSpinal Fluid, ACSF) (Fig. 29). Dans ces conditions, les variations de la période ($-7,248 \pm 7,596\%$) que nous observons sont dues uniquement aux fluctuations basales de l'activité synaptique ($p=0,8438$). De même, l'amplitude reste stable au cours du temps ($+4,692 \pm 7,261\%$, $p=0,6406$).

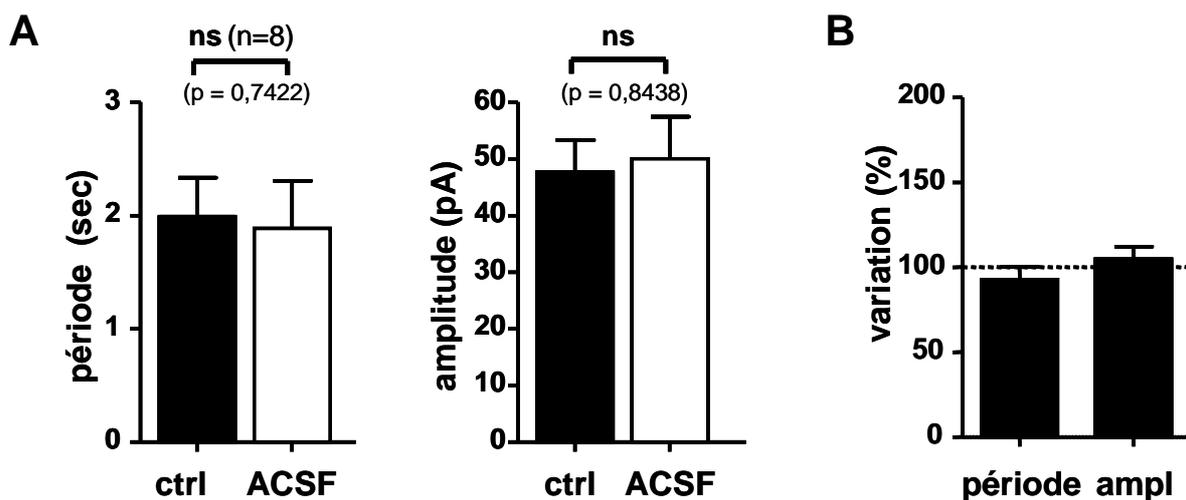


Fig. 29: Vérification de la stabilité des évènements miniatures GABA et glycinergiques au stade E15,5. Tous les évènements détectés sur des zones d'analyse de 4min par condition sont comparés pour leurs périodes et amplitudes en absence de traitement (ACSF). Les données obtenues pour 8 cellules ont été compilées et exprimées en valeurs brutes (A, moy±sem) ou en pourcentage de changement relatif aux données 'contrôle' propres à chaque cellule (B). Aucune différence significative n'est observée au cours du temps (test de Wilcoxon).

Nous avons donc bien une diminution de la période des évènements GABAergiques et glycinergiques par l'apport de VEGF exogène. Après avoir répondu à cette première question, nous avons voulu savoir si le facteur endogène, que nous avons détecté par immunohistochimie, a un rôle dans des conditions physiologiques. Pour cela, nous avons choisi une stratégie de blocage par anticorps neutralisant. Nous avons utilisé l'anticorps B20 provenant de Genentech, qui est décrit pour être spécifique du VEGF murin. Nous l'avons donc perfusé avec une concentration de 5µg/mL qui est conforme à celle décrite dans la littérature pour bloquer le VEGF (Liang et al., 2006).

Nous avons préalablement vérifié l'efficacité de cet anticorps à cette concentration par culture organotypique. Des marquages CD31 ont été effectués sur des moelles épinières maintenues en culture pendant 4 jours en présence de 5µg/mL d'anticorps ou non (condition contrôle). Nous avons pu constater qu'en présence de B20 nous ne détectons aucun vaisseau contrairement aux moelles épinières contrôle (Fig. 30). Ceci est dû au blocage du VEGF endogène, inhibant ainsi le maintien et le développement du réseau vasculaire préexistant à E11,5 lors de la dissection.

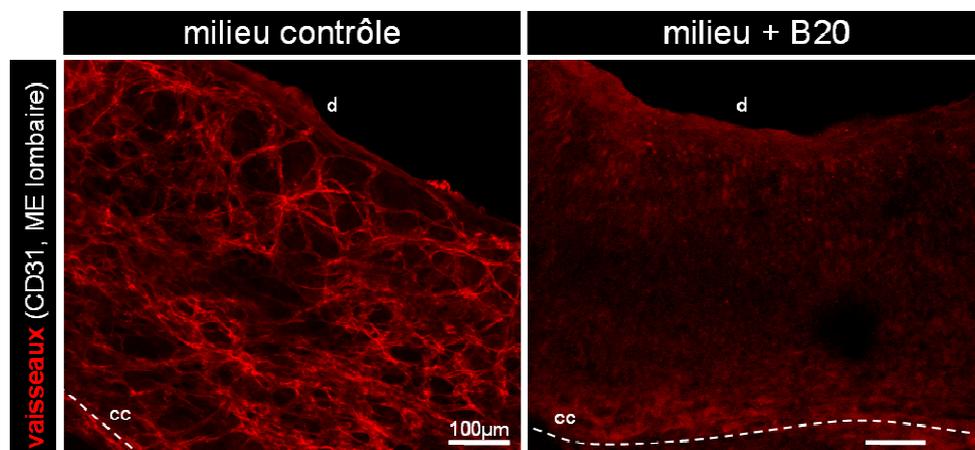


Fig. 30: Vérification de l'effet neutralisant de l'anticorps B20 sur la vascularisation de moelle épinière d'embryons de souris. Des moelles épinières prélevées au stade E11,5 ont été mises en culture pendant 4 jours avec du milieu complet supplémenté ou non avec l'anticorps neutralisant le VEGF murin (B20, Genentech, 5µg/mL). Des immunomarquages CD31 (cellules endothéliales) ont été réalisés. Les images prises ici dans la zone lombaire montrent les vaisseaux ne se développent pas lorsque le VEGF est bloqué par l'anticorps contrairement aux conditions contrôle. *d*: dorsal, *cc*: canal central (ligne pointillée).

La figure 31A présente des portions de tracés obtenus en électrophysiologie pour une cellule représentative en conditions contrôle (à gauche) et traitement par le B20 (à droite). Lors du **blocage du VEGF endogène**, nous avons une augmentation de la période entre les

évènements miniatures GABA/Glycinergiques passant de $1,46 \pm 0,1s$ lors du contrôle à $2,24 \pm 0,2s$ en condition traitement (test de Kolmogorov Smirnov, $p=0,011$). L'amplitude de ces mêmes évènements n'est pas affectée, étant de $46,87 \pm 1,86pA$ lors du contrôle et de $49,07 \pm 2,43pA$ sous B20 (test de Kolmogorov Smirnov, $p=0,1689$) (Fig. 31B).

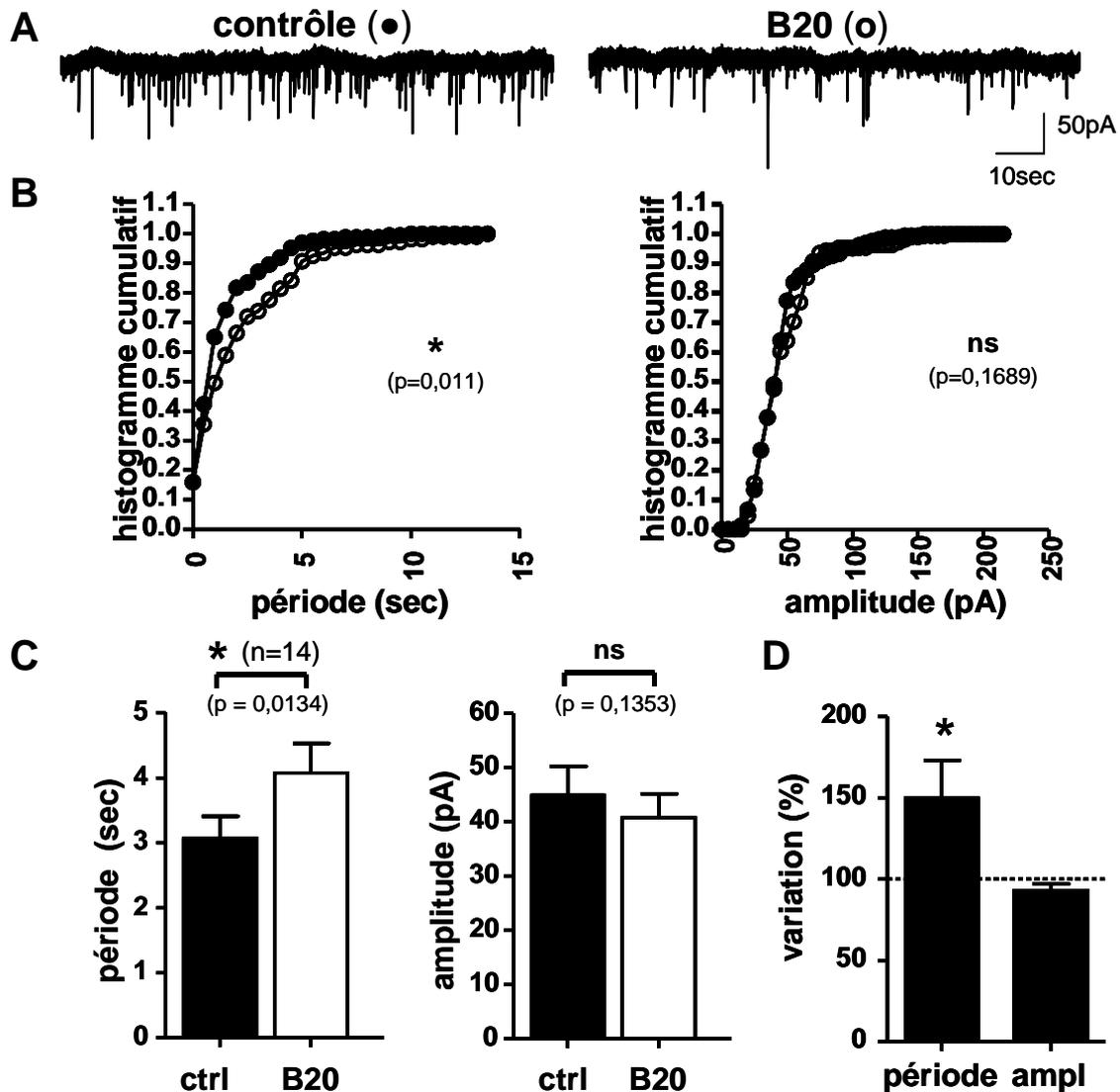


Fig. 31: Modulation de la fréquence des évènements miniatures GABA/glycinergiques suite à l'inhibition du VEGF endogène au stade E15,5. La partie (A) montre les traces obtenues en conditions contrôle et lors du blocage du VEGF (B20, Genentech, 5µg/mL, 10min) pour une cellule représentative. Tous les évènements détectés sur des zones d'analyse de 4min par condition sont comparés pour leur période et leur amplitude (B). Les données obtenues pour 14 cellules ont été compilées et exprimées en valeurs brutes (C, moy±sem) ou en pourcentage de changement relatif aux données 'contrôle' propres à chaque cellule (D). En présence de B20, la période entre les évènements miniatures GABA/glycinergiques est augmentée (test de Wilcoxon).

En combinant les résultats obtenus sur 14 cellules (14 ME sur 9 portées) nous confirmons ces premières observations (Fig. 31C). La période est augmentée en moyenne de $49,74 \pm 23,15\%$ (test de Wilcoxon, $p=0,0134$) passant ainsi de $3,07 \pm 0,34s$ à $4,07 \pm 0,46s$.

L'amplitude de ces activités ne varie pas de façon significative en passant de $44,89 \pm 5,41\text{pA}$ à $40,76 \pm 4,45\text{pA}$ soit une diminution de $6,995 \pm 4,137\%$ (test de Wilcoxon, $p=0,1353$).

Ces résultats sont très importants car le blocage du facteur endogène par le B20 se traduit par un **effet miroir** à ce qui est observé lors de l'apport de VEGF exogène. Cela renforce notre hypothèse de travail selon laquelle le VEGF agit directement sur le réseau neuronal et ce dans des conditions physiologiques (en absence d'apport exogène de VEGF).

Par ailleurs, la modulation de la fréquence des activités synaptiques sans altération de leur amplitude signifie que le VEGF agit au niveau **pré-synaptique** sur les terminaisons GABAergiques et/ou Glycinerigiques.

Ayant démontré le rôle du VEGF au stade E15,5 sur la libération spontanée de GABA et de Glycine au niveau des MNs spinaux, nous avons voulu savoir si cet effet est présent tout au long du développement embryonnaire ou seulement de façon ponctuelle. Nous avons donc complété notre étude par les stades E13,5 et E17,5 qui encadrent le stade E15,5 que nous avons étudié jusqu'à présent.

3) Fenêtre d'action du VEGF sur les événements miniatures GABAergiques et glycinergiques lors de la vie embryonnaire.

3-1) Stade E13,5 du développement embryonnaire.

Tous les MNs étudiés à ce stade ($n=30$) ont une capacitance membranaire moyenne de $33,52 \pm 0,67\text{pF}$ et une résistance de membrane de $1163 \pm 65,6\text{M}\Omega$.

Au stade E13,5 les activités synaptiques viennent juste de se mettre en place (Scain et al., 2010). De ce fait, leur fréquence est assez faible ($0,14 \pm 0,03\text{Hz}$ à E13,5 au lieu de $0,39 \pm 0,02\text{Hz}$ pour E15,5) mais elle est néanmoins suffisante pour étudier l'effet du VEGF. Nous avons constaté que sur les 12 cellules traitées avec le **VEGF**, la période entre les événements miniatures GABA et Glycine est diminuée en moyenne de $14,82 \pm 6,24\%$ ($p=0,0425$) passant de $11,24 \pm 1,56\text{s}$ à $9,22 \pm 1,16\text{s}$ (Fig. 32A). L'amplitude est statistiquement inchangée malgré une variation de $12,99\% \pm 7,444$ ($p=0,1099$). Nous retrouvons donc pour le stade E13,5 les mêmes effets induits par le VEGF qu'au stade E15,5.

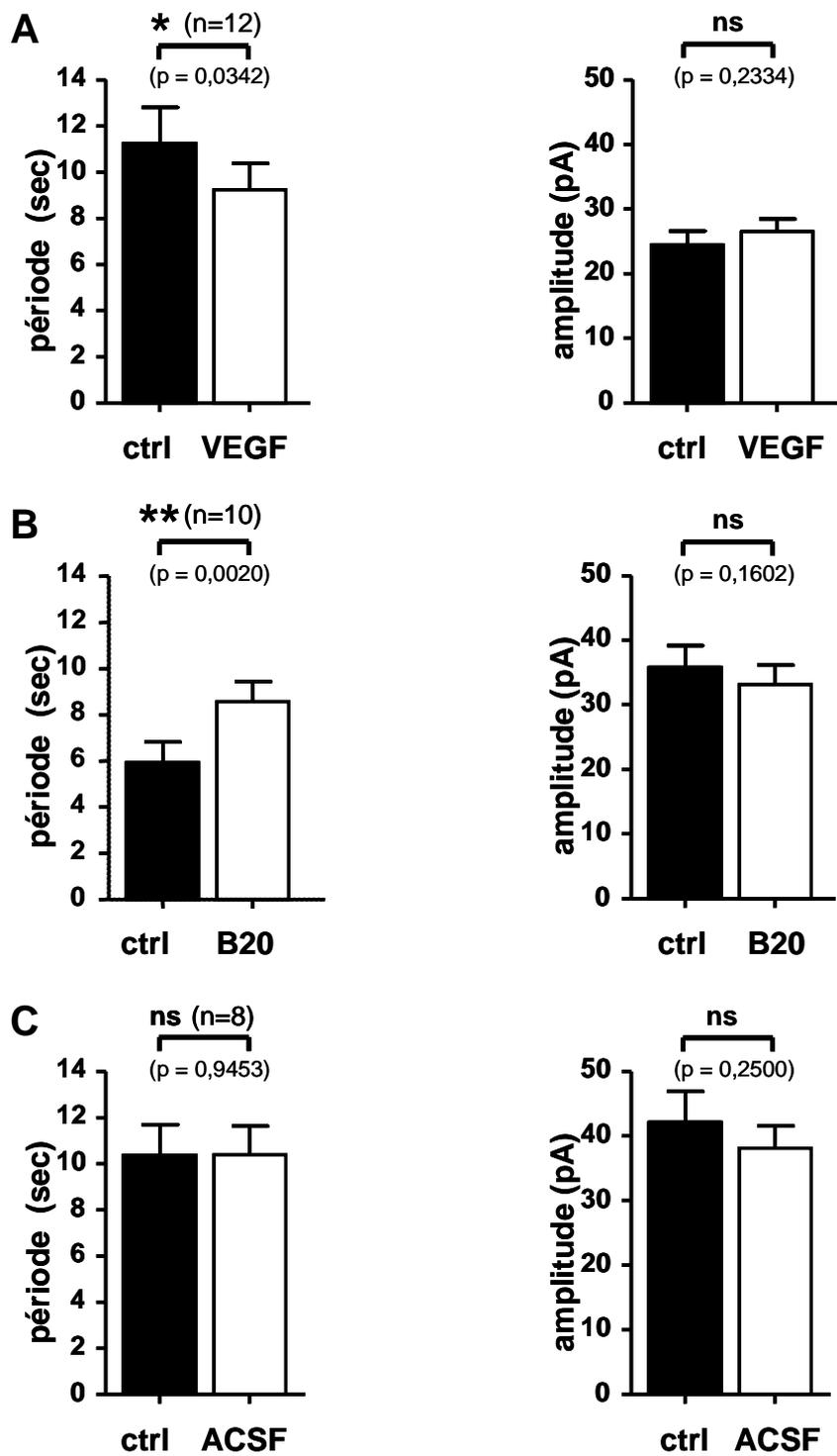


Fig. 32: Modulation de la fréquence des événements miniatures GABA/glycinergiques par le VEGF au stade E13,5. La perfusion de VEGF (Peprotech, 50ng/mL, 10min) diminue la période des activités synaptiques liées à la libération spontanée de GABA et de glycine sans en modifier l'amplitude (A). L'ajout d'anticorps neutralisant du VEGF murin (B20, Genentech, 5µg/mL) dans le liquide physiologique augmente la période sans affecter l'amplitude de ces mêmes événements (B). En conditions contrôle l'activité reste stable (C) (test de Wilcoxon, n indiqué pour chaque condition).

Lorsque nous appliquons l'anticorps neutralisant (**B20**), nous observons une augmentation importante de la période entre les activités miniatures GABA et Glycine de $60,84 \pm 17,83\%$ ($p=0,0020$) qui passe de $5,92 \pm 0,91s$ en condition contrôle à $8,57 \pm 0,87s$ lors du blocage du VEGF endogène (Fig. 32B). L'amplitude reste stable ($-6,619 \pm 4,177\%$, $p=0,1934$) et elle est de $37,44 \pm 2,61pA$ en traitement contrôle et $34,79 \pm 2,64pA$ lors du traitement par le B20.

Aucune modification de la période ou de l'amplitude des activités GABA/glycinergiques n'est constatée en absence de VEGF ou d'anticorps bloquant (**ACSF**) puisqu'elles ne varient respectivement que de $+0,52 \pm 8,06\%$ ($p=0,9453$) et $-6,02 \pm 7,46\%$ ($p=0,25$) (Fig. 32C).

Nous confirmons à E13,5 l'observation effectuée à E15,5, à savoir un effet miroir sur la fréquence des évènements miniatures GABAergiques et glycinergiques en présence de VEGF exogène ou lorsque le facteur endogène est neutralisé.

3-2) Stade E17,5 du développement embryonnaire.

Tous les MNs analysés à ce stade ($n=29$) ont une capacitance membranaire moyenne de $103 \pm 3,96pF$ et une résistance de membrane de $140,1 \pm 9,52MOhm$.

Au stade E17,5, les activités synaptiques sont plus développées et donc plus fréquentes ($0,81 \pm 0,14Hz$ à E17,5 au lieu de $0,39 \pm 0,02Hz$ pour E15,5). Ceci a pu poser parfois des problèmes de détection (chevauchement des évènements), les cellules extrêmement actives étant éliminées lors de l'analyse.

L'ajout de **VEGF** dans le liquide physiologique perfusé ne modifie pas significativement ($+3,455 \pm 7,005\%$, $p=0,6523$) la période entre les activités GABA/Glycine qui est de $2,78 \pm 0,60s$ en contrôle et de $2,98 \pm 0,70s$ lors de l'application du VEGF. L'amplitude est stable ($+7,26 \pm 7,772\%$, $p=0,4961$) passant de $47,62 \pm 5,64pA$ en contrôle à $49,54 \pm 4,87pA$ en condition VEGF (Fig. 33A).

De même, la perfusion de **B20** ne change pas la période ($-0,5454 \pm 14,87\%$, $p=0,2412$) qui est en moyenne de $2,27 \pm 0,54s$ en contrôle et $2,03 \pm 0,46s$ lors de l'application de

l'anticorps bloquant. L'amplitude des événements miniatures GABA/glycine est stable ($-0,7855 \pm 6,279\%$, $p=0,1040$) étant de $52,4 \pm 3,34\text{pA}$ en condition contrôle et $52,61 \pm 5,48\text{pA}$ sous B20 (Fig. 33B).

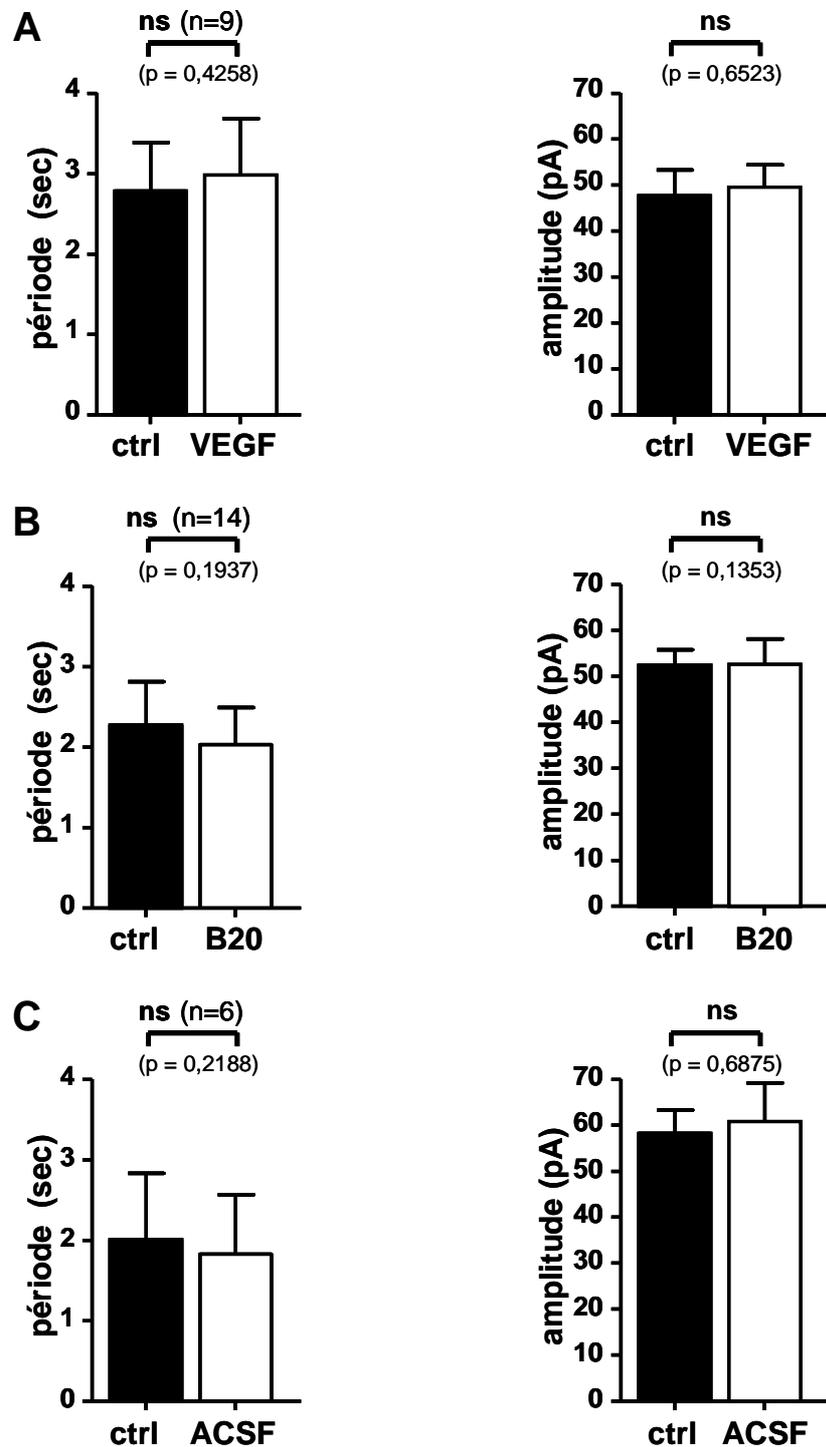


Fig. 33: Absence de modulation des événements miniatures GABA/glycinergiques par le VEGF au stade E17,5. La perfusion de VEGF (A) (Peprotech, 50ng/mL, 10min) ou d'anticorps neutralisant de ce facteur (B) (B20, Genentech, 5 $\mu\text{g/mL}$, 10min) ne modifie ni l'amplitude ni la période des activités synaptiques liées à la libération spontanée de GABA et de glycine. En conditions contrôle l'activité reste stable (C) (n indiqué à chaque condition, test de Wilcoxon).

Aucune variation significative de la période ($+2,24 \pm 17,44\%$, $p=0,4375$) n'est observée en absence de VEGF ou de B20 (ACSF) car elle est de $2,01 \pm 0,82s$ en contrôle et de $1,83 \pm 0,73s$ lors du traitement 'ACSF'. L'amplitude est elle aussi inchangée ($+3,38 \pm 10,06\%$, $p=0,6875$) avec pour valeur moyenne $58,22 \pm 5,08pA$ (contrôle) et $60,77 \pm 8,39pA$ (ACSF) (Fig. 33C).

Nous ne retrouvons donc pas pour ce stade de développement les effets du VEGF observés aux stades E13,5 et E15,5 de vie embryonnaire.

3-3) Fenêtre temporelle pour l'action de VEGF sur les évènements miniatures GABA/glycine.

Nous avons mis en évidence une fenêtre temporelle dans les effets du VEGF sur la libération spontanée de GABA et de glycine à proximité du MN enregistré. En effet, l'application de VEGF exogène diminue la période entre ces évènements aux stades E13,5 et E15,5. Le blocage du facteur endogène par une stratégie d'anticorps neutralisant aboutit à des effets opposés à ces mêmes stades. Ces effets ne sont pas retrouvés au stade périnatal E17,5 (Fig. 34). De plus, la modification de la période sans changement de l'amplitude des évènements étudiés nous permet de conclure que le VEGF agit (directement ou non) au niveau pré-synaptique. Ces résultats sont analogues à ceux trouvés en 2010 par Y. Huang et ses collaborateurs sur des primo-cultures d'hippocampe de rat. La perfusion de VEGF (1ng/mL) pendant 1 ou 12h augmente la fréquence sans modification de leur amplitude des activités synaptiques excitatrices (glutamatergiques dans ce système) enregistrées dans les cellules CA1 de l'hippocampe. De plus, leurs expériences sont menées elles aussi en présence de TTX ce qui leur permet eux aussi d'observer la libération spontanée de neurotransmetteur sans influence de l'activité se propageant dans le reste du réseau.

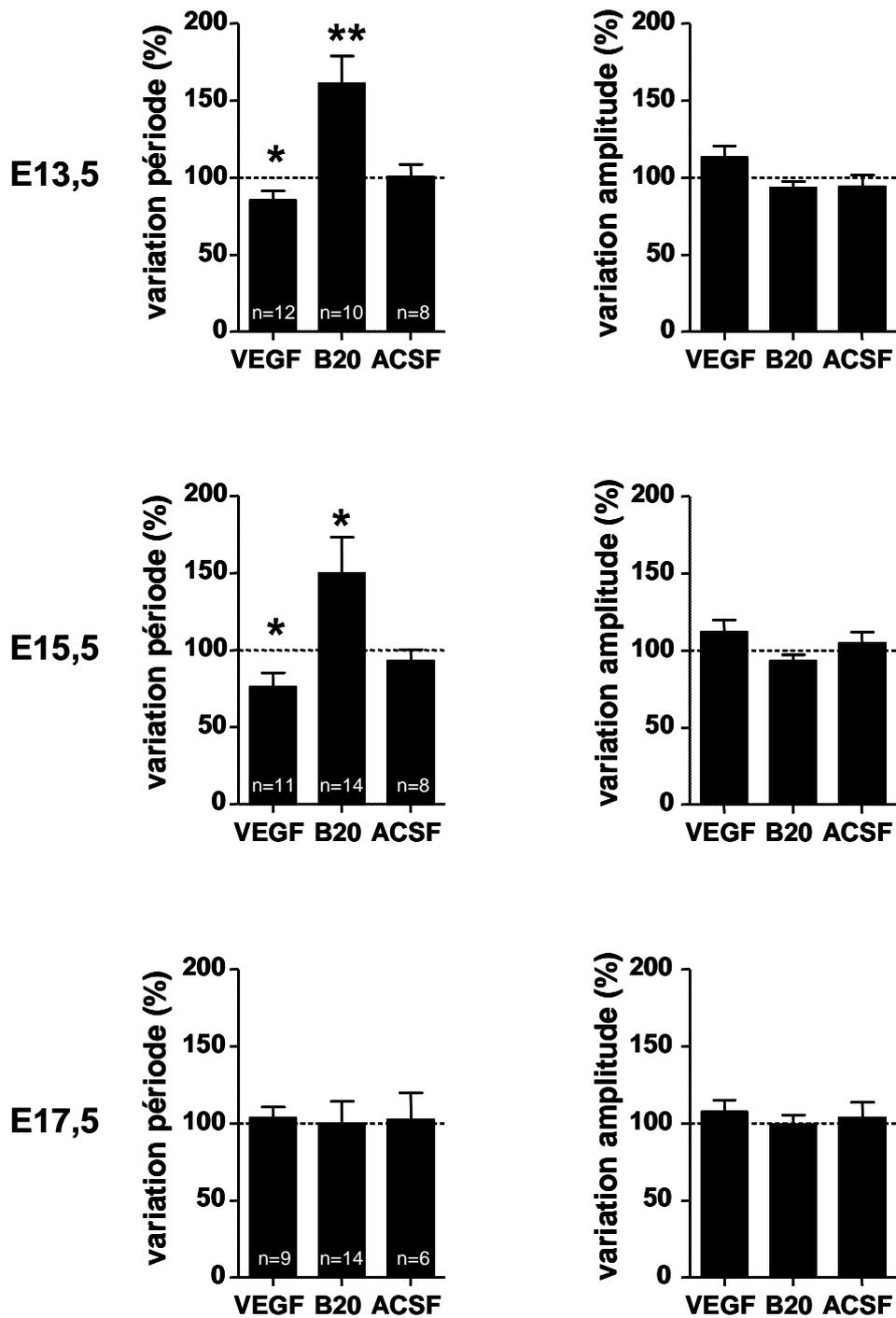


Fig. 34: Modulation de la période des évènements miniatures GABA/glycinergiques par le VEGF au début de la mise en place de ces activités. Les valeurs sont exprimées en pourcentage de variation par rapport au contrôle propre à chaque cellule (moy ± sem). La période des évènements miniatures est affectée par le VEGF uniquement aux stades E13,5 et E15,5 de la vie embryonnaire. L'amplitude reste stable quel que soit le traitement ou le stade de développement (test de Wilcoxon, * pour $p < 0,05$ et ** pour $p < 0,01$).

Nous avons détecté le VEGF dans la zone des motoneurones à tous les stades embryonnaires de notre étude (Fig. 24B), en accord avec des données publiées sur des stades plus ponctuels (E9,5 pour (Hogan et al., 2004), E10, 5 pour (Nagase et al., 2005) ou E11,5

(Ruiz de Almodovar et al., 2011). Nous avons aussi montré que la vascularisation de la moelle épinière est progressive et que de nouveaux vaisseaux se forment du stade E11,5 au jour de la naissance (Fig. 20 et 21). La sécrétion de VEGF et la formation de vaisseaux dans la zone ventrale de la moelle épinière lombaire sont 2 phénomènes présents tout au long de notre fenêtre d'étude (E11,5 à P0). Or, les effets modulateurs du VEGF sont observés uniquement aux stades E13,5 et E15,5 et non au stade périnatal E17,5. Cette observation offre de nouvelles perspectives.

En effet, au début du développement embryonnaire, la libération de GABA et de glycine a des effets excitateurs sur les MNs spinaux alors que chez l'adulte ils sont inhibiteurs (Branchereau et al., 2002), (Sibilla and Ballerini, 2009). Cette stimulation du système permet la propagation d'activités spontanées qui sont importantes pour le développement même de ce tissu. De façon assez intéressante, l'effet modulateur du VEGF coïncide avec cette période. Si tous les mécanismes des effets excitateurs du GABA et de la Glycine ne sont pas encore connus à ce jour, les pompes NKCC1 et KCC2 sont partie prenante de ce phénomène (Delpy et al., 2008) et article en préparation). Ces deux transporteurs sont responsables de la répartition des ions chlorure (entre autres) de part et d'autre de la membrane plasmique. Au début du développement embryonnaire, l'activité de NKCC1 prime sur KCC2 et donc les ions chlorure sont plus concentrés à l'intérieur de la cellule. Lors de l'ouverture des canaux activés par le GABA ou la glycine, les ions chlorure vont sortir de la cellule ayant pour conséquence une dépolarisation de la cellule et donc des effets excitateurs. En fin de vie embryonnaire, l'activité de KCC2 est plus importante que celle de NKCC1 et donc les ions chlorure sont plus concentrés à l'extérieur de la cellule donc les mouvements d'ions sont entrants et donc inhibiteurs. Les mécanismes de régulation à l'origine de cette activité séquentielle de KCC2 et surtout NKCC1 sont encore assez peu élucidés mais ils ont lieu en même temps que les effets modulateurs du VEGF. Bien sur, le VEGF a un effet ici pré-synaptique sur les INs GABA/glycinergiques et NKCC1 et KCC2 ont un rôle post-synaptique dans la répartition des ions chlorures de part et d'autre de la membrane des MNs. Il est donc possible que certains mécanismes soient communs à ces deux phénomènes.

Après avoir déterminé que le VEGF module la libération de GABA et de glycine lors du début de la mise en place des activités synaptique dans la moelle épinière d'embryons de souris, se pose la question du récepteur impliqué dans ce phénomène. Comme cela a été décrit dans l'introduction, le VEGF peut se fixer sur les VEGFR1/2/3 et les NRP1 et 2. Nous avons

donc cherché à déterminer la localisation de ces récepteurs dans le tissu spinal et leur implication dans les effets du VEGF sur l'activité synaptique.

4) Mécanisme d'action du VEGF : étude au stade E15,5 de développement embryonnaire.

4-1) Localisation des différents récepteurs.

Pour tenter discriminer la voie de signalisation impliquée, nous avons commencé par faire le point sur la présence dans la moelle épinière des récepteurs connus pour le VEGF.

Nous avons réalisé des immunomarquages sur des moelles épinières entières ouvertes de souris de souche OF1 à différents stades embryonnaires (Fig. 35). Les images présentées ici sont celles obtenues au stade E15,5.

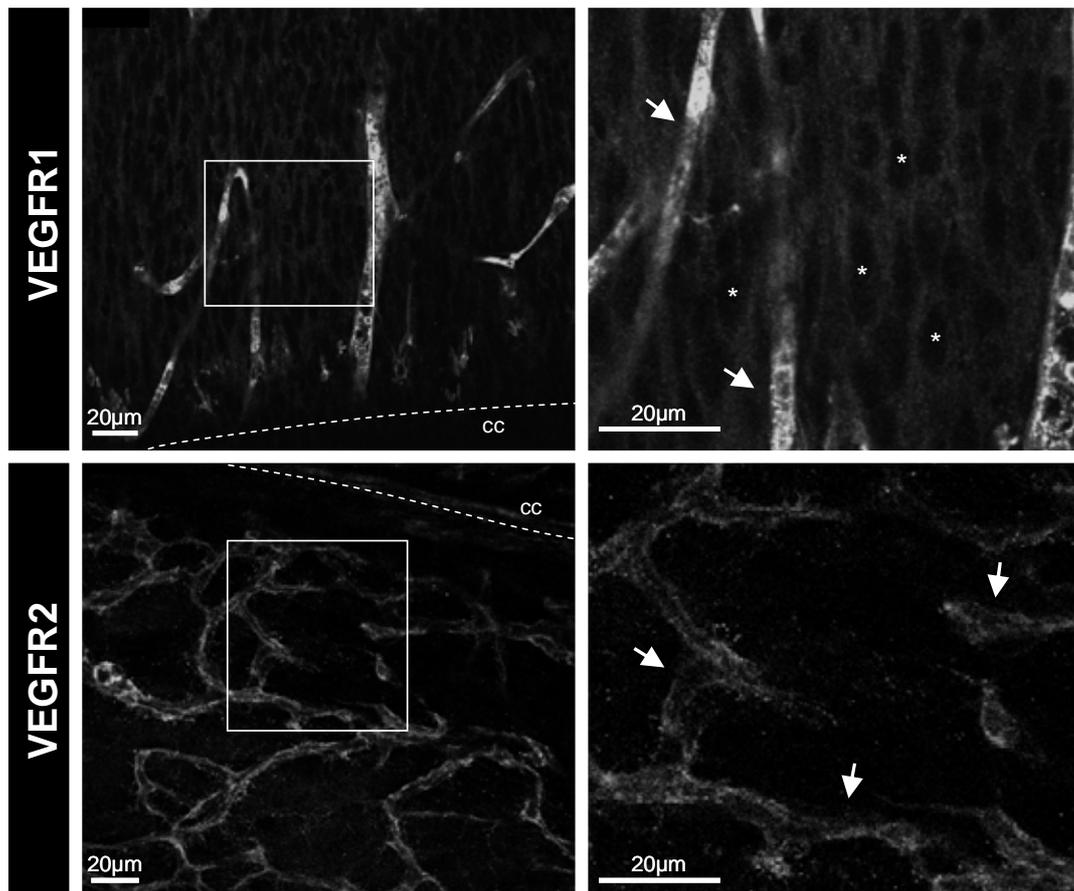


Fig. 35: Détection des récepteurs du VEGF dans la moelle épinière au stade E15,5 de développement embryonnaire. Le VEGFR1 (MAB4711, R&D System) est détecté sur les vaisseaux mais aussi autour des cellules neuronales. Le VEGFR2 (AF644, R&D System) est détecté uniquement sur les vaisseaux. Les flèches pointent les vaisseaux et les astérisques marquent les neurones. cc: canal central (ligne pointillée).

Le VEGFR1 est détecté dans les vaisseaux mais aussi dans le neuropile (tissu nerveux). Alors que son marquage est ubiquitaire et ponctiforme aux stades les plus précoces de cette étude, il est localisé à certaines cellules en fin de vie embryonnaire tout comme le VEGF.

Les VEGFR2 est détecté uniquement dans les vaisseaux sanguins et ce quel que soit le stade considéré. Ces résultats ont été confirmés par l'utilisation de 2 anticorps primaires différents. Ils sont aussi en accord avec des observations précédemment faites au stade E10,5 où les VEGFR2 est détecté sur des structures vasculaires (Nagase et al., 2005). D'autres publications, utilisant des anticorps différents, montrent que le VEGFR2 est présent dans les cellules formant les racines dorsales des ganglions (Kutcher et al., 2004) ou les MNs spinaux chez le rat adulte (Tovar and Tapia, 2010).

Le VEGFR3 semble lui aussi exprimé dans une certaine partie des cellules endothéliales sans toutefois être présent sur la totalité des vaisseaux (non montré).

La neuropiline 1 (NRP1) est quant à elle détectée dans l'ensemble de la moelle épinière. Son expression a été démontrée au stade E12,5 dans la zone des motoneurones (Kitsukawa et al., 1995) et dans les cellules formant de racines dorsales des ganglions (Kutcher et al., 2004).

La neuropiline 2 est exprimée dans la zone des motoneurones durant la vie embryonnaire et spécialement au stade E15,5 où sont faites les études de la signalisation (Chen et al., 1997).

Tous les récepteurs du VEGF sont détectés dans la moelle épinière lors des stades embryonnaires étudiés. Potentiellement, le VEGF peut se fixer sur l'un ou l'autre d'entre eux et moduler ainsi les activités synaptiques GABAergiques et glycinergiques. Nous pouvons aussi supposer que certains d'entre eux peuvent être associés en hétéromères car détectés dans les mêmes structures : VEGFR1/2/3 dans les vaisseaux et VEGFR1 et NRP1/2 dans le neuropile.

Après ces observations sur la localisation des récepteurs du VEGF, nous avons utilisé l'électrophysiologie pour répondre à la question de la voie impliquée dans les effets de ce facteur sur l'activité synaptique.

4-2) Etude par électrophysiologie de l'implication des récepteurs à activité Tyrosine Kinase (VEGFRs).

Comme nous avons démontré un effet du facteur endogène en utilisant le B20, nous avons fait des séries d'expériences en utilisant les inhibiteurs sans ajout de VEGF exogène afin de rester le plus proche possible des conditions physiologiques.

Nous avons commencé par étudier les récepteurs ayant une fonction tyrosine kinase (VEGFRs) en neutralisant leur activité par des inhibiteurs chimiques.

Le PTK787, ou Vatalanib, est un inhibiteur non spécifique des VEGFR1 et VEGFR2 (IC_{50} VEGFR1=77nM, IC_{50} VEGFR2=37nM, Wood et al., 2000). Conformément aux données de la littérature nous l'avons utilisé à une concentration de 1 μ M et perfusé pendant 10min. Nous n'observons pas de changements significatifs de la période ($+1,838 \pm 6,78\%$, $p=0,8553$) ou de l'amplitude ($+1,238 \pm 4,387\%$, $p=1,0000$) pour les 14 cellules de ce groupe (Fig. 36).

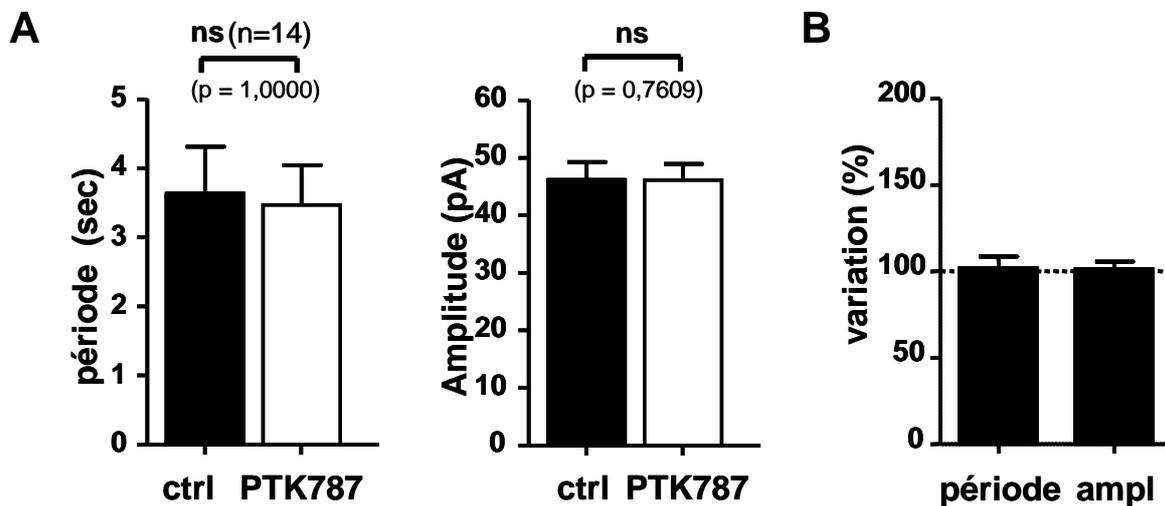


Fig. 36: Absence d'effet sur les événements synaptiques GABA/Glycinergiques suite à l'inhibition de VEGFR1 et VEGFR2 par le PTK787 au stade E15,5. Tous les événements détectés sur des zones d'analyse de 4min sont comparés pour leurs périodes et amplitudes lors du blocage de VEGFR1 et VEGFR2 par un inhibiteur chimique (PTK787 ou Vatalanib, Tocris, 1 μ M, 10min). Les données obtenues pour 14 cellules ont été compilées et exprimées en valeurs brutes (A, moy \pm sem) ou en pourcentage de changement relatif aux données 'contrôle' propres à chaque cellule (B). Aucune différence significative n'est observée pour la période ou l'amplitude lors du traitement par l'inhibiteur (test de Wilcoxon).

Plusieurs conclusions peuvent être avancées : soit le VEGFR1 et VEGFR2 ne sont ni l'un ni l'autre impliqués dans les effets du VEGF observés, soit leurs effets sont opposés et donc s'annulent. En effet, les IC₅₀ décrits pour cet inhibiteur sont très proches. Il est donc difficile de discriminer les 2 voies avec le PTK787.

Nous avons donc perfusé sur 13 autres moelles épinières le ZM323881 qui est décrit pour être un inhibiteur spécifique du VEGFR2 à la concentration de 10nM (IC₅₀ VEGFR1 > 50µM, IC₅₀ VEGFR2 2nM, Whittles et al., 2002 et Huang et al., 2010). Nous n'avons pas observé de modification de la période (+3,609 ± 8,211, p=0,6355) ou de l'amplitude (6,495 ± 3,724, p=0,1099) des événements miniatures GABA/glycine en présence de cet inhibiteur (Fig. 37).

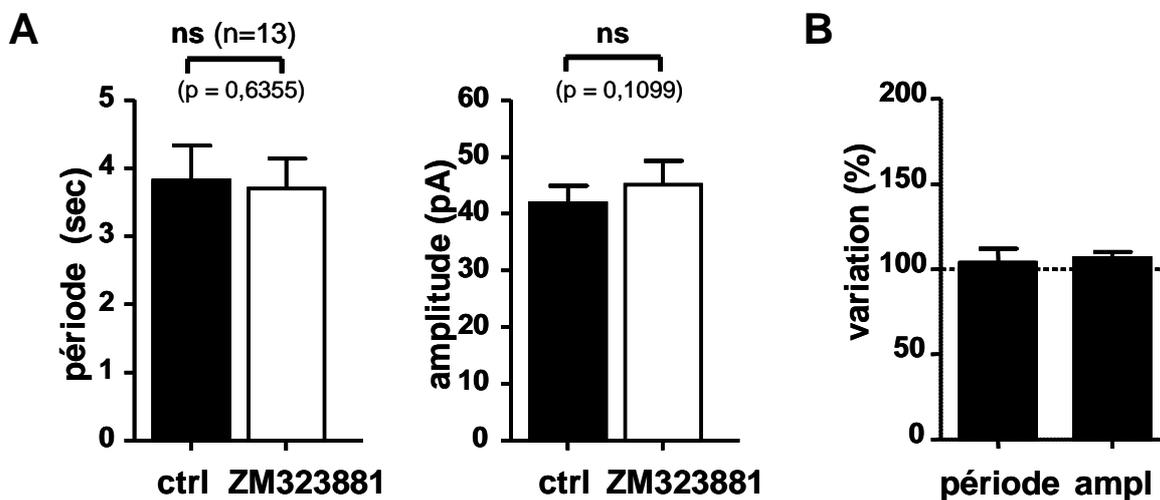


Fig. 37: Absence d'effet sur les événements synaptiques GABA/Glycinergiques suite à l'inhibition de VEGFR2 par le ZM323881 au stade E15,5. Tous les événements détectés sur des zones d'analyse de 4min par condition sont comparés pour leurs périodes et amplitudes lors du blocage de VEGFR2 par un inhibiteur chimique (ZM323881, Tocris 10nM, 10min). Les données obtenues pour 13 cellules ont été compilées et exprimées en valeurs brutes (A, moy±sem) ou en pourcentage de changement relatif aux données 'contrôle' propres à chaque cellule (B). Aucune différence significative n'est observée pour la période ou l'amplitude lors du traitement par l'inhibiteur (test de Wilcoxon).

Par cette approche nous pouvons donc exclure le VEGFR2 dans les effets observés pour le VEGF et nous pouvons aussi infirmer l'hypothèse selon laquelle R1 et R2 auraient des effets opposés. Toutefois, les inhibiteurs de tyrosine kinase peuvent aussi avoir des effets sur d'autres cibles que celle(s) pour la(les)quelle(s) ils ont été décrits (VEGFR3, PDGFR, ...). Nous avons donc complété notre étude en utilisant des anticorps provenant de ImClone (Eli Lilly and Company, New York) produits chez le rat neutralisant spécifiquement les récepteurs murins du VEGF (Wang et al., 2004).

Pour bloquer le **VEGFR1**, nous avons utilisé l'anticorps MF1 (Fig. 38). Sur les 13 cellules incluses dans l'analyse nous n'observons pas de changement significatif de la période ($+4,384 \pm 6,912\%$, $p=0,6848$) ni de l'amplitude ($+1,248 \pm 3,526\%$, $p=0,7354$) des événements miniatures GABA/glycinergiques.

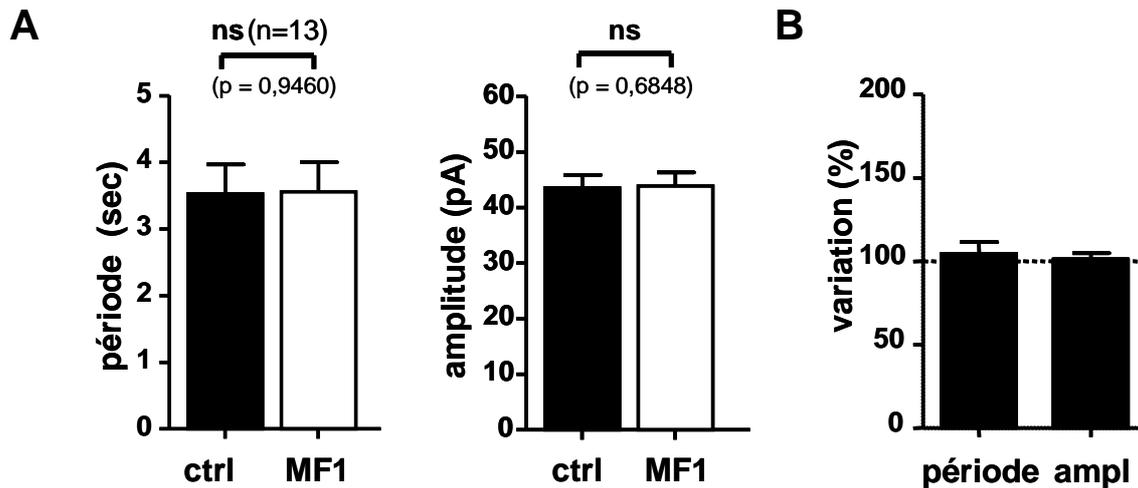


Fig. 38: Absence d'effet de l'inhibition de VEGFR1 par l'anticorps bloquant MF1 sur les événements synaptiques GABA/Glycinergiques au stade E15,5. Tous les événements détectés sur des zones d'analyse de 4min sont comparés pour leurs périodes et amplitudes lors du blocage du VEGFR1 par anticorps neutralisant (MF1, ImClone, 50 μ g/mL, 10min). Les données obtenues pour 13 cellules ont été compilées et exprimées en valeurs brutes (A, moy \pm sem) ou en pourcentage de changement relatif aux données 'contrôle' propres à chaque cellule (B). Aucune différence significative n'est observée pour la période ou l'amplitude lors du traitement (test de Wilcoxon).

Pour bloquer le **VEGFR2**, nous avons utilisé le DC101. Sur les 13 cellules que compte l'analyse, nous n'observons pas ici non plus de modification des deux critères étudiés (Fig. 39). Ainsi, les fluctuations de la période ($+6,733 \pm 8,658\%$, $p=0,4143$) sont le résultat de variations basales de l'activité synaptique. L'amplitude reste elle aussi inchangée ($+16,16 \pm 8,361\%$, $p=0,1099$).

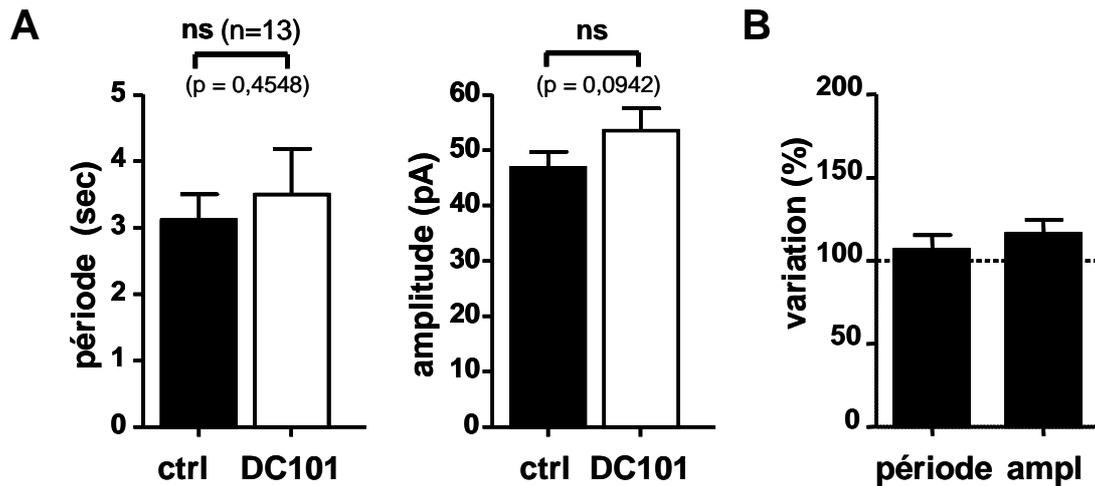


Fig. 39: Absence d'effet de l'inhibition de VEGFR2 par l'anticorps bloquant DC101 sur les événements synaptiques GABA/Glycinergergiques au stade E15,5. Tous les événements détectés sur des zones d'analyse de 4min sont comparés pour leurs périodes et amplitudes lors du blocage du VEGFR2 par anticorps neutralisant (DC101, ImClone, 50 μ g/mL, 10min). Les données obtenues pour 13 cellules ont été compilées et exprimées en valeurs brutes (A, moy \pm sem) ou en pourcentage de changement relatif aux données 'contrôle' propres à chaque cellule (B). Aucune différence significative n'est observée pour la période ou l'amplitude lors du traitement (test de Wilcoxon).

Avec ces 2 anticorps, nous confirmons les observations faites avec les inhibiteurs chimiques : le VEGFR1 et le VEGFR2 ne sont pas impliqués dans la modulation par le VEGF des événements miniatures liés à la libération spontanée de GABA et de glycine à proximité des MNs. Ce dernier résultat s'éloigne un peu des études dans lesquelles il a été démontré un rôle de ce facteur sur l'activité du réseau nerveux. En effet, l'application de VEGF exogène (1ng/mL, 1 ou 12h) sur des cultures de cellules d'hippocampe augmente la fréquence des activités synaptiques excitatrices (glutamatergiques dans ce système) sans en modifier l'amplitude. Ces résultats sont analogues à ceux que nous avons obtenus. Toutefois, l'augmentation de la fréquence des activités excitatrices en présence de VEGF est inhibée en présence de ZM323881, ce que nous n'observons pas dans notre système expérimental (Huang et al., 2010). Dans une autre étude portant sur l'activité des récepteurs NMDA (récepteurs au glutamate), le VEGFR2 s'associe avec des sous unités des récepteurs NMDA. En réponse au VEGF, les courants calciques sont augmentés dans les cellules granulaires du cervelet. Cet effet est annulé lorsqu'un anticorps dirigé contre le VEGFR2 ou du PTK787 (3 μ M) sont appliqués (Meissirel et al., 2011).

Cependant le VEGFR1 et le VEGFR2 ne sont pas les seuls récepteurs du VEGF et nous avons continué nos investigations sur le troisième récepteur avec une activité tyrosine kinase, le VEGFR3, que nous avons inhibé avec l'anticorps bloquant mF4-31C1 provenant lui

aussi d'ImClone (Fig. 40). Pour les 13 cellules de ce groupe, aucune différence significative n'est constatée pour la période ($+15,28 \pm 14,17\%$, $p=0,6848$) ou l'amplitude ($-7,159 \pm 4,325\%$, $p=0,1465$) des événements miniatures GABA et Glycine lorsque le VEGFR3 est bloqué.

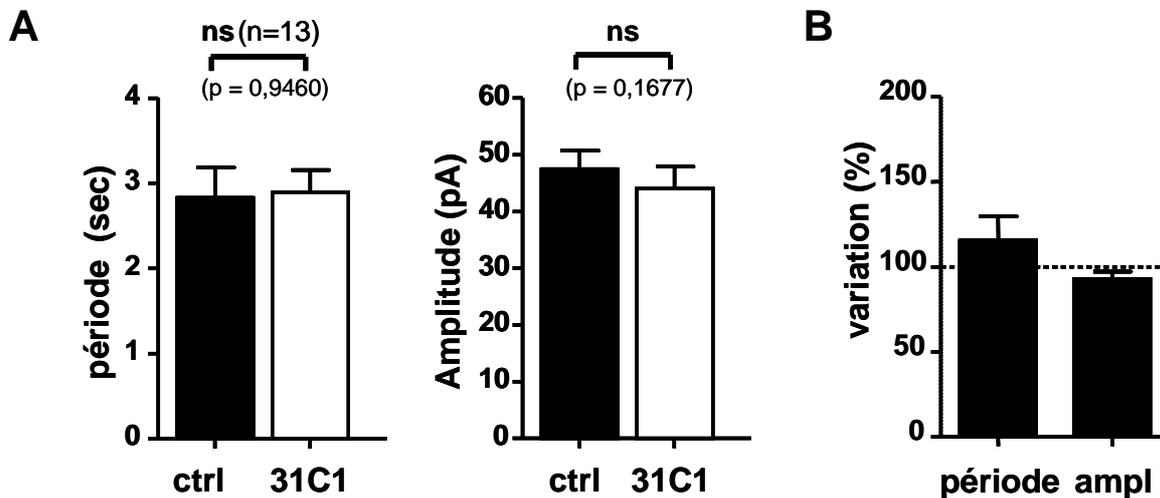


Fig. 40: Absence d'effet sur les événements synaptiques GABA/Glycinergiques suite à l'inhibition de VEGFR3 par l'anticorps bloquant mF4-31C1 au stade E15,5. Tous les événements détectés sur des zones d'analyse de 4min sont comparés pour leurs périodes et amplitudes lors du blocage du VEGFR3 par anticorps neutralisant (mF4-31C1, ImClone, 50 μ g/mL, 10min). Les données obtenues pour 13 cellules ont été compilées et exprimées en valeurs brutes (A, moy \pm sem) ou en pourcentage de changement relatif aux données 'contrôle' propres à chaque cellule (B). Aucune différence significative n'est observée pour la période ou l'amplitude lors du traitement par l'anticorps (test de Wilcoxon).

Au vu de ces résultats, cette famille de récepteurs tyrosine kinase ne semble pas être impliquée dans les effets du VEGF sur la libération spontanée de GABA et de glycine à proximité du MN enregistré. Nous nous sommes tournés vers une autre catégorie de récepteurs de ce facteur dont la présence a elle aussi été détectée par immunohistomarquage : les neuropilines.

4-3) Etude par électrophysiologie de l'implication des neuropilines (NRPs).

Utilisant la même stratégie d'anticorps neutralisants, nous avons étudié les membres de la seconde famille des récepteurs du VEGF : les neuropilines.

Cette fois-ci les anticorps proviennent de Genentech. Leur spécificité est remarquable car leur activité de neutralisation est ciblée sur le site de liaison du VEGF au NRPs et n'affecte pas la liaison des sémaphorines sur ces mêmes récepteurs contrairement à d'autres anticorps présents sur le marché (Pan et al., 2007).

Le blocage de la **NRP2** par l'anticorps NRP2b ne conduit à aucune modification des activités synaptiques GABA/glycinergiques (Fig. 41). La période entre les événements reste inchangée : $+5,207 \pm 11,55\%$ (test de Wilcoxon, $p=0,7002$). Il en est de même pour l'amplitude : $+21,03 \pm 12,37\%$ (test de Wilcoxon, $p=0,0830$).

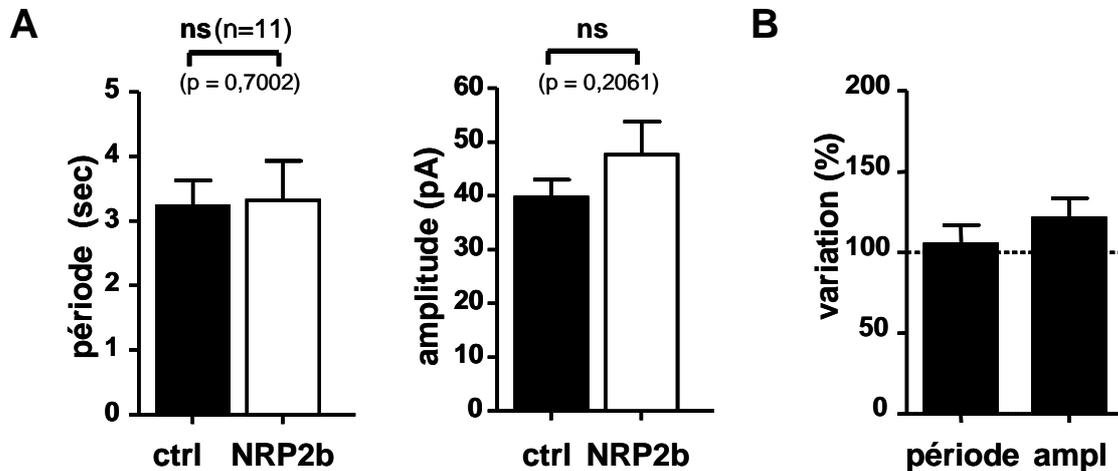


Fig. 41: Absence d'effet sur les événements synaptiques GABA/Glycinergiques suite à l'inhibition de NRP2 par l'anticorps bloquant NRP2b au stade E15,5. Tous les événements détectés sur des zones d'analyse de 4min sont comparés pour leurs périodes et amplitudes lors du blocage de NRP2 par anticorps neutralisant (NRP2b, Genentech, 25 μ g/mL, 10min). Les données obtenues pour 11 cellules ont été compilées et exprimées en valeurs brutes (A, moy \pm sem) ou en pourcentage de changement relatif aux données 'contrôle' propres à chaque cellule (B). Aucune différence significative n'est observée pour la période ou l'amplitude lors du traitement par l'anticorps (test de Wilcoxon).

En utilisant l'anticorps **NRP1b** nous observons que la diminution de la période entre les événements ($-17,65 \pm 11,84\%$) n'est pas significative passant de $3,42 \pm 0,6s$ en conditions contrôle à $2,45 \pm 0,3s$ lors du traitement ($p=0,1094$). L'amplitude reste, quant à elle, inchangée ($+11,97 \pm 8,04\%$, $p=0,0830$). (Fig. 42).

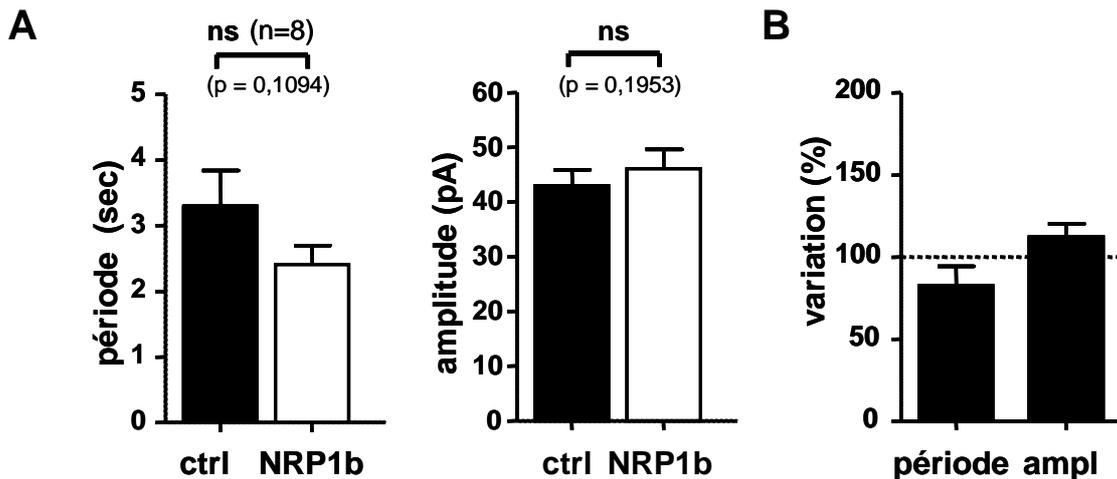


Fig. 42: Implication de NRP1 sur la modulation par le VEGF des événements miniatures GABA et glycinergiques au stade E15,5. Tous les événements détectés sur des zones d'analyse de 4min sont comparés pour leurs périodes et amplitudes lors du blocage de NRP1 par anticorps neutralisant (NRP1b, Genentech, 25 μ g/mL, 10min). Les données obtenues pour 8 cellules ont été compilées et exprimées en valeurs brutes (A, moy \pm sem) ou en pourcentage de changement relatif aux données 'contrôle' propres à chaque cellule (B). Malgré la tendance observée pour la période, aucune différence significative n'est observée pour la période ou l'amplitude lors du traitement par l'anticorps (test de Wilcoxon).

Nous avons ici un nombre relativement faible d'échantillon (8) ce qui peut expliquer que la tendance à la diminution pour la période des événements observés ne soit pas significative.

Si nous supposons que NRP1 est le récepteur impliqué, nous aurions donc ici des effets similaires à ceux observés lorsque le VEGF exogène est appliqué. Ce résultat peut paraître surprenant car nous pouvons logiquement nous attendre à retrouver des effets identiques à ceux obtenus en bloquant le facteur endogène par le B20. Nous pouvons considérer la NRP1 comme une réserve de VEGF. Ainsi, le blocage de son site de fixation pour le VEGF aboutirait à la présence accrue de ce facteur dans le milieu extracellulaire et donc augmenterait la fréquence des événements GABA/glycinergiques. Ce raisonnement peut être mis en parallèle avec ce qui a été publié sur le VEGFR1 au début de sa caractérisation (Hiratsuka et al., 1998). En effet, le dogme admis était que, du fait de sa forte affinité pour le VEGF mais faible activation, ce récepteur servait de réservoir pour le VEGFR2 dont l'affinité avec ce facteur est plus faible mais son activation est plus importante. Depuis, la signalisation par le VEGFR1 a été décrite comme essentielle à certains processus notamment par son association avec d'autres récepteurs (VEGFRs ou NRPs) (Cao, 2009). Ainsi plutôt que d'assigner NRP1 à un rôle de réservoir, nous pouvons aussi supposer que la fixation du VEGF

induit un changement de sa conformation et/ou son association avec des récepteurs différents (VEGFRs, plexines, ...). L'hétéromérisation entre VEGFR1 et VEGFR2 offre un éventail plus large dans les voies activées (Carmeliet et al., 2001). Il est connu pour le VEGFR1 que le recrutement de ligands différents (VEGF ou PlGF) se traduit par un changement de conformation, de phosphorylation et donc d'activation de voie en aval (Autiero et al., 2003). Nous pouvons donc supposer que la fixation du VEGF et non des sémaphorines sur NRP1 change les voies de signalisation induites par le recrutement de corécepteurs distincts. De plus, nous menons cette étude lors du développement embryonnaire et des associations de récepteurs pourraient se faire uniquement à ces stades précoces. Cette hypothèse peut être mise en parallèle avec l'exemple des récepteurs glycinergiques qui sont formés par l'association de sous unités $\alpha 2$ chez l'embryon alors que cette combinaison n'est pas retrouvée chez l'adulte (Le-Corronc et al., 2011).

A la fin de cette partie du travail de thèse nous pouvons conclure que le VEGF module la libération de GABA et de Glycine dans la proximité immédiate des MNs spinaux qui ont été enregistrés. Cet effet passe probablement par la liaison de ce facteur sur la NRP1 détectée dans tout le tissu neuronal. En l'état actuel de nos recherches, nous ne pouvons que supposer que le VEGF se lie sur les NRP1 présentes aux terminaisons synaptiques des interneurons GABA et ou glycine. Le seul moyen de s'en assurer est d'inhiber l'effet du VEGF en supprimant l'expression de ces récepteurs dans les interneurons. Toutefois, cette stratégie semble difficile à mettre en œuvre car de part leur double implication dans la signalisation du VEGF mais aussi des sémaphorines, les effets hors cible sont à prévoir (défaut de projections axonales notamment) (Neufeld et al., 2002).

Un autre aspect des données obtenues dans cette partie de projet est que ces résultats sont obtenus alors que le VEGF, ou son blocage, ne sont effectués que pendant 10min. Or, ce temps d'application ne permet pas des modifications majeures dans la structure du réseau vasculaire (augmentation ou diminution du nombre des vaisseaux). C'est pour cela que nous pouvons supposer que le VEGF agit directement sur le réseau neuronal sans être une conséquence indirecte d'un remodelage vasculaire majeur.

De façon intéressante, la modulation des activités GABA/glycine par le VEGF est observée alors que la libération de ces 2 neurotransmetteurs dans le tissu nerveux se traduit

par une réponse excitatrice. Malheureusement, l'état actuel de nos recherches ne nous permet pas de déterminer s'il s'agit d'une cause, d'une conséquence ou d'une coïncidence.

5) Rôle chronique du VEGF sur l'ontogénèse de la moelle épinière.

Après ces observations sur les effets à court terme du VEGF, nous avons voulu nous pencher sur les effets à long terme et notamment les conséquences de l'absence chronique du VEGF dans la mise en place des réseaux vasculaires et neuronaux dans la moelle épinière embryonnaire de souris.

Nous disposons pour répondre à cette question de 2 approches. La première est la culture organotypique de moelles épinières. La seconde est le croisement de lignées de souris $Islet^{Cre}$ et $VEGF^{lox/lox}$ ayant pour objectif d'éteindre l'expression du VEGF dans la plus grande partie des MNs.

5-1) Culture organotypique.

Nous avons mis en culture pendant 4 jours des moelles épinières prélevées sur des embryons âgés de 11,5 jours. Nous avons constitué plusieurs lots de moelles épinières : celles traitées avec du VEGF, celles traitées avec le B20 et celles cultivées sans ajout spécifique dans le milieu de culture correspondant au groupe contrôle. Les concentrations utilisées sont identiques aux expériences électrophysiologiques : VEGF à 50ng/mL et B20 à 5µg/mL.

Le marquage CD31 nous permet de vérifier l'**intégrité du réseau vasculaire** en conditions contrôle, VEGF et B20 (neutralisation du VEGF endogène) dans le bulbe rachidien et la zone lombaire de la moelle épinière (Fig. 43).

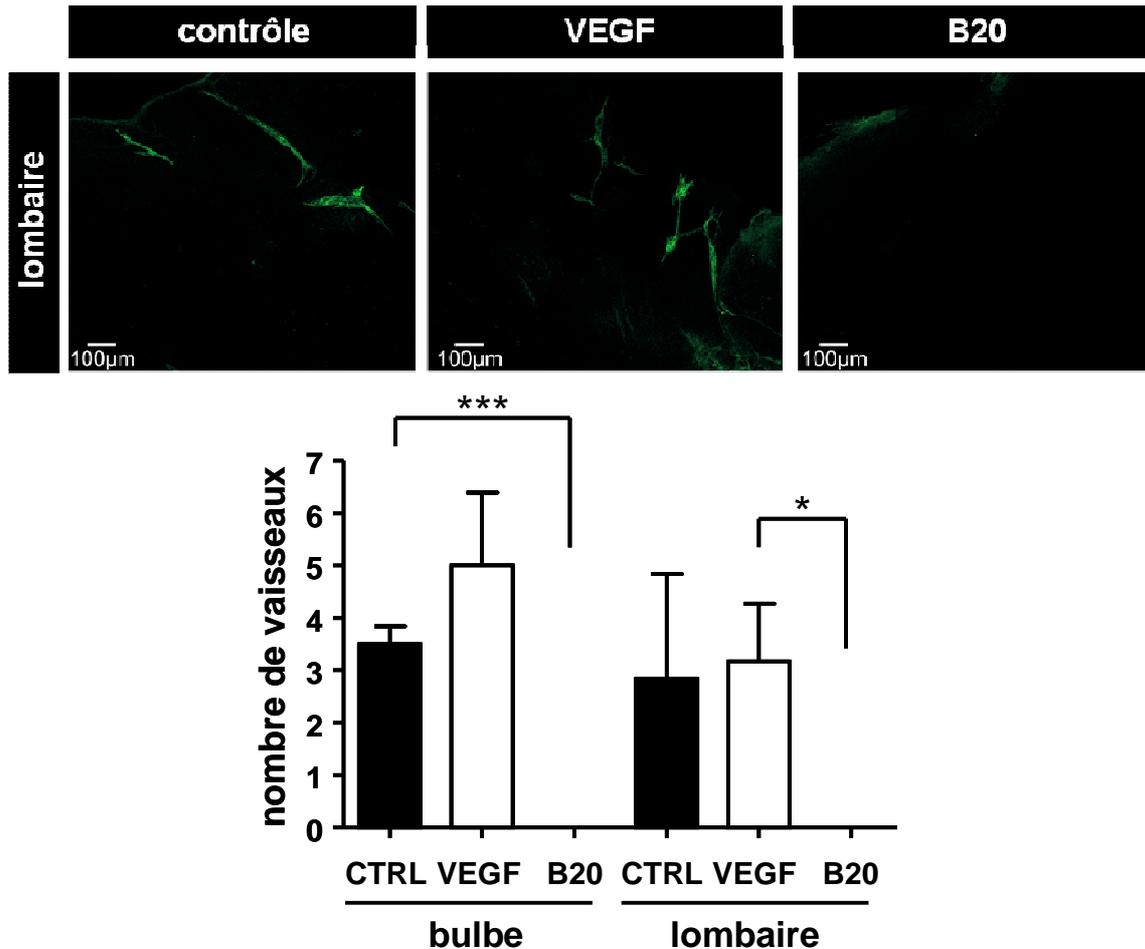


Fig. 43: Évolution du réseau vasculaire dans les moelles épinières cultivées en présence ou en absence de VEGF. Les ME ont été extraites d'embryons E11,5 et mises en culture pendant 4 jours avec du milieu complet ('contrôle'), supplémenté en VEGF (50ng/mL) ou avec l'anticorps neutralisant ce facteur (B20, 5µg/mL). Les vaisseaux ont été marqués (CD31) et quantifiés dans le bulbe rachidien et la ME lombaire. En absence de VEGF, le développement du réseau vasculaire est inhibé dans les moelles épinières mises en culture (n=6 pour chaque condition, test de Kruskal et Wallis).

Ensuite, la **mise en place du réseau neuronal** a été évaluée en quantifiant l'intensité globale des marquages du GABA et de la glycine dans la partie ventrale de la moelle épinière lombaire. Le nombre des cellules immunoréactives pour le GABA et la glycine a été comparé suivant les conditions expérimentales (Fig. 44).

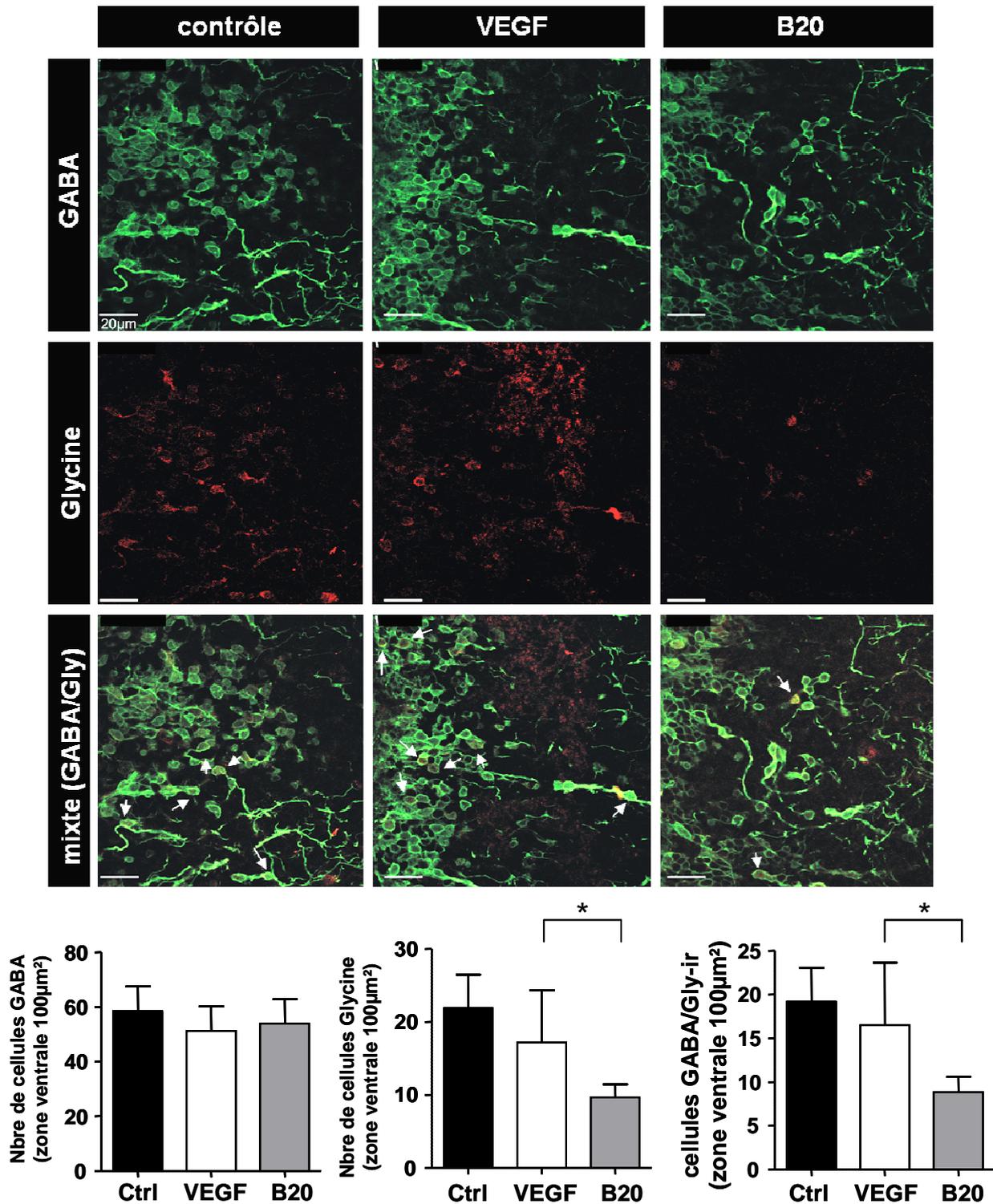


Fig. 44: Évolution des populations GABA/glycinergiques dans les moelles épinières cultivées en présence ou en absence de VEGF. Les ME ont été extraites d'embryons E11,5 et mises en culture pendant 4 jours avec du milieu complet ('contrôle'), supplémenté en VEGF (50ng/mL) ou avec l'anticorps neutralisant ce facteur (B20, 5μg/mL). Le GABA et la Glycine ont été marqués par immunohistochimie et les interneurons ont été quantifiés dans la zone lombaire ventrale de la moelle épinière. Le blocage du VEGF entraîne une diminution du nombre de cellules glycinergiques et mixtes (n=6 pour chaque condition, test de Kruskal et Wallis). Les flèches indiquent les interneurons co-marqués pour le GABA et la glycine (INs mixtes).

Aucune différence significative n'est observée (ME lombaire) entre les 3 conditions de culture pour le **GABA**. Dans la zone lombaire ventrale, nous observons une diminution du nombre de cellules marquées pour la **glycine** lorsque le VEGF endogène est bloqué (Fig. 44). Les cellules immunoréactives pour le GABA et la glycine (INs **mixtes**) sont elles aussi présentes en moins grand nombre dans la zone lombaire des ME traitées par le B20.

Cette technique de culture, qui nous a donné ces informations importantes, a cependant ses limites. La plus importante est que le blocage du VEGF est global dans toute la moelle épinière et donc le réseau vasculaire est de ce fait absent (Fig. 43). Nous ne pouvons donc pas conclure si les résultats observés sont dus à l'absence de VEGF ou alors à l'absence de réseau vasculaire. En d'autres termes, ce que nous observons est-il une conséquence directe ou indirecte de l'absence du VEGF ? Pour répondre avec plus de précision à cette question nous avons opté pour une approche utilisant des animaux génétiquement modifiés.

5-2) Stratégie cre/lox.

La Cre recombinase est une enzyme qui reconnaît et permet la recombinaison entre 2 sites LoxP. Ce système est utilisé pour supprimer une partie ou la totalité d'un gène. D'un côté, des séquences LoxP sont introduites dans le gène du VEGF chez des souris (Gerber et al., 1999). Dans une autre lignée de souris, la séquence codant pour la Cre a été placée en aval du promoteur de Islet qui est un facteur de transcription présent dans une grande majorité des MNs lors du développement embryonnaire (Srinivas et al., 2001). En croisant des souris de la lignée Islet^{Cre} et de la lignée VEGF^{lox/lox} nous voulons éteindre l'expression du VEGF dans les MNs. Ce facteur sera toujours produit par les autres cellules composant la moelle épinière (et notamment par les interneurons, astrocytes, ...). Nous espérons donc que le réseau vasculaire sera toujours présent dans le tissu spinal et que l'absence de VEGF sécrété par les MNs aura une influence sur la libération spontanée de GABA et de glycine dans leur voisinage proche et/ou sur la mise en place de ces populations neuronales.

Nous avons travaillé avec des embryons de génération F2. Compte tenu du temps imparti en cette fin de thèse nous avons focalisé notre attention sur le stade E15,5. Tout d'abord, nous avons prélevé les moelles épinières pour faire des marquages immunohistochimiques. Dans un premier temps, nous avons cherché à évaluer l'impact de

l'absence de sécrétion du VEGF par les MNs sur la **mise en place du réseau vasculaire**. Nous avons donc réalisé un triple marquage : CD31 (vaisseaux), NG2 (péricytes) et Islet (majorité des MNs). Nous avons procédé ensuite à plusieurs quantifications (Fig. 45).

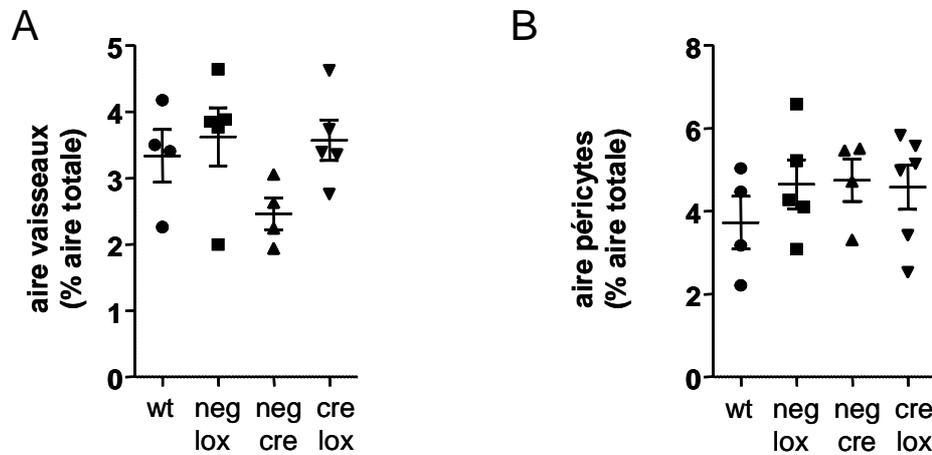


Fig. 45: Ontogénie du système vasculaire dans les moelles épinières d'embryons issus de croisement de souches IsletCre et VEGF^{lox/lox} au stade E15,5 de développement embryonnaire. Les données obtenues jusqu'à présent sur 2 animaux par génotype ne montrent aucune variation significative de la surface des vaisseaux (A, p=0,1145) ou des péricytes (B, p=0,5528) dans les moelles épinières d'embryons et ce quel que soit leur génotype (test de Kruskal et Wallis). *wt*: sauvage; *neg lox*: porteur uniquement de VEGF^{lox}; *neg cre*: porteur de la Cre uniquement.

Nous n'observons pas ici de perturbation du réseau vasculaire que ce soit pour l'aire des vaisseaux (test de Kruskal et Wallis, p=0,1145, Fig. 45A) ou pour le recouvrement par les péricytes (test de Kruskal et Wallis, p=0,5528, Fig. 45B). Nous pouvons donc supposer que l'absence de sécrétion de VEGF par les MNs est compensée par les autres cellules présentes dans ce tissu (interneurones, cellules gliales, ...). Cette étude doit être complétée par d'autres échantillons car nous ne comparons pour le moment que 2 coupes pour 2 moelles épinières à chaque condition.

Les données obtenues en culture organotypique montrent que la population glycinergique est diminuée en absence de VEGF. Nous pourrions aussi avoir une altération dès la mise en place des INs GABA/glycine suite à l'absence de VEGF sécrété par les MNs. Nous réaliserons donc le triple marquage suivant : GABA, Glycine et NeuN (autre marqueur des noyaux des MNs) et nous quantifierons les corps cellulaires révélés par les marquages. Nous réaliserons aussi des enregistrements par électrophysiologie des événements miniatures GABA/glycinergiques sur les MNs spinaux. Nous espérons observer un retard dans la mise en place des populations GABA/Glycinergiques ainsi qu'une fréquence plus faible des activités

miniatures GABAergiques et glycinergiques chez les animaux n'exprimant pas le VEGF dans les MNs.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Au cours de ce travail de thèse, nous avons pu évaluer la mise en place progressive du réseau vasculaire dans la moelle épinière lors de la seconde partie de la vie embryonnaire de la souris. Nous avons constaté que le réseau se complexifie progressivement, colonisant peu à peu tout le tissu spinal. De ce fait, neurones et vaisseaux sont en contact étroit à l'image des motoneurones dans la zone ventrale de la moelle épinière. Le processus angiogénique est sous la dépendance d'un facteur majeur, le VEGF, que nous avons détecté à tous les stades de l'étude au niveau des vaisseaux mais aussi dans les réseaux moteurs (interneurones GABA, interneurones glycine ou motoneurones).

Nous avons supposé que ce facteur pro-angiogénique pouvait avoir aussi un rôle direct sur le réseau moteur lors de son développement. Utilisant des approches par électrophysiologie, nous avons pu déterminer que le VEGF n'exerce pas d'effet sur les caractéristiques intrinsèques des MNs (conductance, excitabilité), mais qu'il module la fréquence des activités synaptiques qu'ils reçoivent. Nous avons focalisé notre attention sur les activités liées à la libération spontanée de GABA et de glycine à proximité des MNs enregistrés. Nous avons constaté que l'apport de VEGF exogène, ou l'inhibition du facteur endogène, sur des temps courts (10min) :

(1) module la période (i.e. la fréquence) des événements miniatures GABA/glycinergiques sans en modifier l'amplitude (effets pré-synaptiques).

(2) ces effets s'opèrent uniquement dans une fenêtre du développement précoce (E13,5 et E15,5).

(3) ces effets semblent être reliés à la présence de NRP1 (Fig. 45).

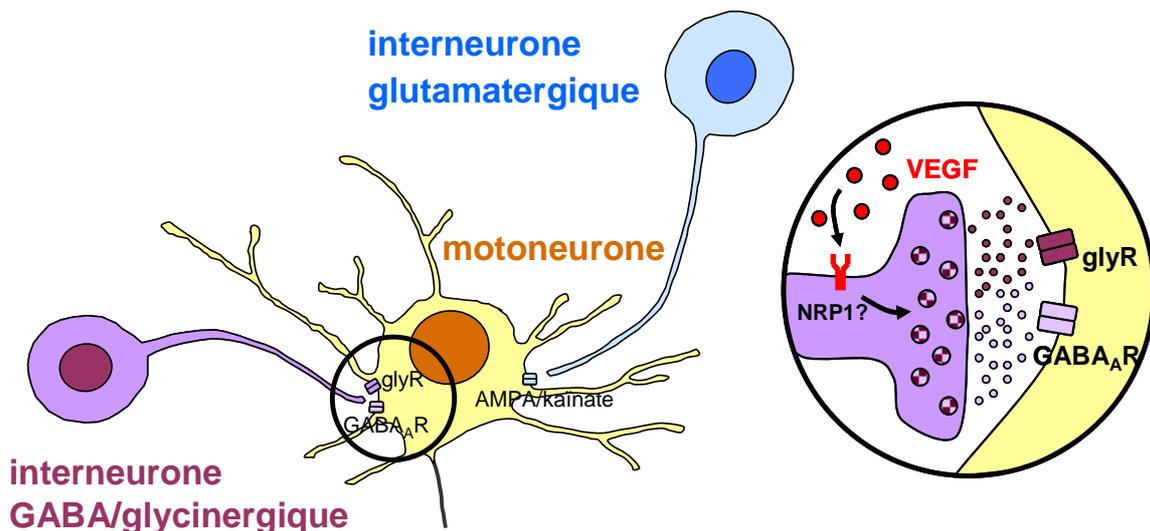
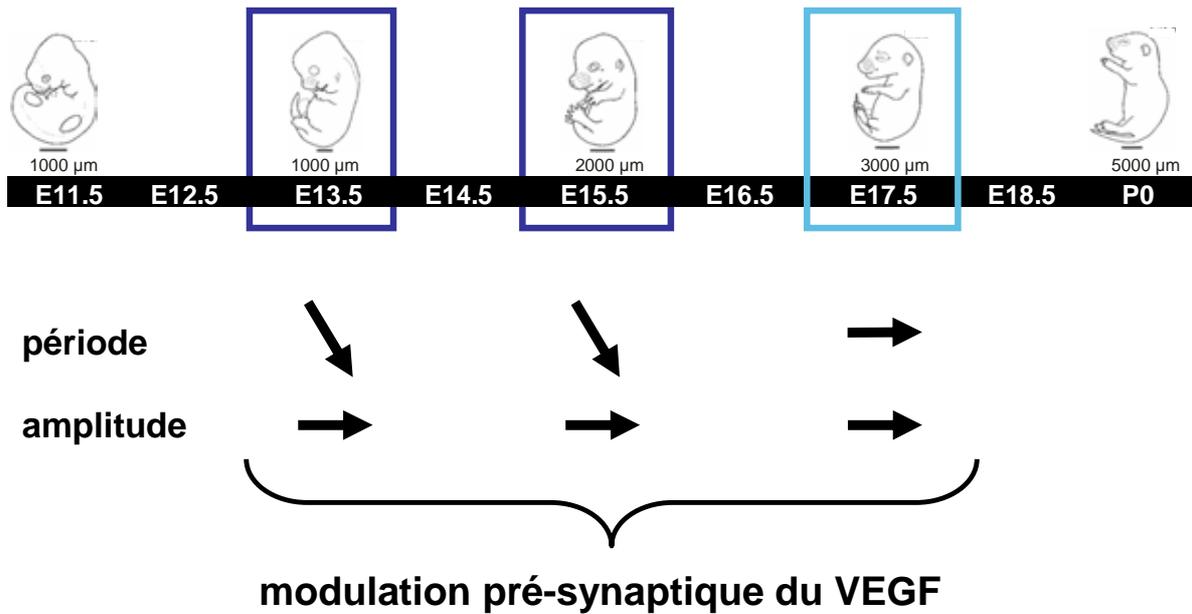


Fig. 45: Bilan des effets du VEGF sur le réseau moteur spinal lors du développement embryonnaire de la souris. Le VEGF module la libération spontanée de GABA et de glycine à proximité des MNs dans une fenêtre temporelle courte de la vie embryonnaire (E13,5 et E15,5). Ces effets impliquent probablement NRP1 peut-être en collaboration avec d'autres récepteurs qui restent à déterminer.

Nous avons aussi entamé des études sur les effets chroniques de l'absence de VEGF dans les réseaux moteurs. En utilisant le modèle de la culture organotypique, nous avons observé que le blocage pendant 4 jours du VEGF endogène par l'anticorps B20 a pour conséquences la destruction du réseau vasculaire et la diminution drastique du nombre de cellules glycinergiques dans les moelles épinières mises en culture. Au moment de la

rédaction de ce manuscrit, nous ne disposons pas de suffisamment de données pour conclure quant au rôle de l'absence de sécrétion de VEGF par les MNs (utilisation de stratégie cre/lox) sur la mise en place des réseaux vasculaire et nerveux et de l'activité des réseaux moteurs. Nous espérons observer des modifications structurelles (nombre de cellules) et fonctionnelles (fréquence des activités synaptiques) tout en ayant un réseau vasculaire identique comparé aux animaux contrôles.

En conclusion, ce travail ouvre de nouvelles perspectives sur le rôle du VEGF en tant que facteur modulant la mise en place et l'activité du réseau moteur spinal (activités synaptiques GABAergiques et glycinergiques), et ce dès la vie embryonnaire, alors que la plupart des études sur le rôle du VEGF sur le système nerveux sont menées chez l'adulte ou alors sur des cultures (Lambrechts and Carmeliet, 2006; Rosenstein et al., 2010; Zachary, 2005).

Par ailleurs, ce travail ouvre de nouvelles perspectives. Nous nous sommes intéressés ici uniquement aux activités GABA/glycinergiques mais il serait judicieux d'évaluer le rôle du VEGF sur les activités glutamatergiques classiquement placées en opposition aux activités GABA/glycinergiques chez l'adulte. Nous pouvons nous attendre à des effets décalés dans le temps. En effet, les modifications d'activité que nous avons observées ont lieu alors que la libération de GABA et de glycine a des effets dépolarisant sur la membrane post-synaptique (excitateur). Or, nous n'avons pas observé de différences significatives sur la fréquence des activités synaptiques liées à la libération de glutamate lors de nos expériences préliminaires (stade E15,5). Le VEGF peut avoir pour rôle de potentialiser les activités excitatrices uniquement liées au GABA et à la glycine. Nous pouvons aussi supposer que le VEGF(A) ne module que ces activités GABA/glycine et que celles liées à la libération de glutamate pourraient être modulées par d'autres ligands de la famille du VEGF (VEGFB, VEGFC, PlGFs...). En effet, il a été montré que 2 formes du FGF peuvent moduler chacune spécifiquement les activités synaptiques (excitatrices pour FGF22 et inhibitrices pour FGF7) (Terauchi et al., 2010).

Même si le VEGF agit ici en tant que modulateur et non générateur de l'activité synaptique, son rôle peut être important dans la construction du réseau puisque les activités GABAergiques sont un facteur important dans la formation des projections axonales, ... (Sernagor et al., 2010). Nous pouvons donc supposer que l'altération de la sécrétion du VEGF et du réseau vasculaire dans la moelle épinière pourrait être un élément sinon essentiel au moins aggravant dans le développement de pathologies caractérisées par la dégénération plus ou moins précoce des motoneurones.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aase, K., Lymboussaki, A., Kaipainen, A., Olofsson, B., Alitalo, K., and Eriksson, U. (1999). Localization of VEGF-B in the mouse embryo suggests a paracrine role of the growth factor in the developing vasculature. *Dev Dyn* 215, 12-25.
- Aase, K., von Euler, G., Li, X., Ponten, A., Thoren, P., Cao, R., Cao, Y., Olofsson, B., Gebre-Medhin, S., Pekny, M., *et al.* (2001). Vascular endothelial growth factor-B-deficient mice display an atrial conduction defect. *Circulation* 104, 358-364.
- Abadie, V., Champagnat, J., and Fortin, G. (2000). Branchiomotor activities in mouse embryo. *Neuroreport* 11, 141-145.
- Allain, A. E., Bairi, A., Meyrand, P., and Branchereau, P. (2006). Expression of the glycinergic system during the course of embryonic development in the mouse spinal cord and its co-localization with GABA immunoreactivity. *The Journal of comparative neurology* 496, 832-846.
- Allain, A. E., Le Corronc, H., Delpy, A., Cazenave, W., Meyrand, P., Legendre, P., and Branchereau, P. (2011). Maturation of the GABAergic transmission in normal and pathologic motoneurons. *Neural plasticity* 2011, 905624.
- Arber, S. (2012). Motor circuits in action: specification, connectivity, and function. *Neuron* 74, 975-989.
- Arber, S., Han, B., Mendelsohn, M., Smith, M., Jessell, T. M., and Sockanathan, S. (1999). Requirement for the homeobox gene Hb9 in the consolidation of motor neuron identity. *Neuron* 23, 659-674.
- Autiero, M., Waltenberger, J., Communi, D., Kranz, A., Moons, L., Lambrechts, D., Kroll, J., Plaisance, S., De Mol, M., Bono, F., *et al.* (2003). Role of PIGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nature medicine* 9, 936-943.
- Azzouz, M., Ralph, G. S., Storkebaum, E., Walmsley, L. E., Mitrophanous, K. A., Kingsman, S. M., Carmeliet, P., and Mazarakis, N. D. (2004). VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model. *Nature* 429, 413-417.
- Bartanusz, V., Jezova, D., Alajajian, B., and Digicaylioglu, M. (2011). The blood-spinal cord barrier: morphology and clinical implications. *Annals of neurology* 70, 194-206.
- Bellomo, D., Headrick, J. P., Silins, G. U., Paterson, C. A., Thomas, P. S., Gartside, M., Mould, A., Cahill, M. M., Tonks, I. D., Grimmond, S. M., *et al.* (2000). Mice lacking the vascular endothelial growth factor-B gene (*Vegfb*) have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature, and impaired recovery from cardiac ischemia. *Circulation research* 86, E29-35.
- Belotti, D., Foglieni, C., Resovi, A., Giavazzi, R., and Taraboletti, G. (2011). Targeting angiogenesis with compounds from the extracellular matrix. *The international journal of biochemistry & cell biology* 43, 1674-1685.
- Blackburn, D., Sargsyan, S., Monk, P. N., and Shaw, P. J. (2009). Astrocyte function and role in motor neuron disease: a future therapeutic target? *Glia* 57, 1251-1264.
- Bononomi, D., and Pfaff, S. L. (2010). Motor axon pathfinding. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2, a001735.
- Bouis, D., Kusumanto, Y., Meijer, C., Mulder, N. H., and Hospers, G. A. (2006). A review on pro- and anti-angiogenic factors as targets of clinical intervention. *Pharmacol Res* 53, 89-103.

- Branchereau, P., Chapron, J., and Meyrand, P. (2002). Descending 5-hydroxytryptamine raphe inputs repress the expression of serotonergic neurons and slow the maturation of inhibitory systems in mouse embryonic spinal cord. *J Neurosci* 22, 2598-2606.
- Branchereau, P., Morin, D., Bonnot, A., Ballion, B., Chapron, J., and Viala, D. (2000). Development of lumbar rhythmic networks: from embryonic to neonate locomotor-like patterns in the mouse. *Brain research bulletin* 53, 711-718.
- Briscoe, J., and Novitsch, B. G. (2008). Regulatory pathways linking progenitor patterning, cell fates and neurogenesis in the ventral neural tube. *Philosophical transactions of the Royal Society of London* 363, 57-70.
- Brockington, A., Wharton, S. B., Fernando, M., Gelsthorpe, C. H., Baxter, L., Ince, P. G., Lewis, C. E., and Shaw, P. J. (2006). Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the central nervous system in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 65, 26-36.
- Cai, H., and Reed, R. R. (1999). Cloning and characterization of neuropilin-1-interacting protein: a PSD-95/Dlg/ZO-1 domain-containing protein that interacts with the cytoplasmic domain of neuropilin-1. *J Neurosci* 19, 6519-6527.
- Cao, S., Yaqoob, U., Das, A., Shergill, U., Jagavelu, K., Huebert, R. C., Routray, C., Abdelmoneim, S., Vasdev, M., Leof, E., *et al.* (2010). Neuropilin-1 promotes cirrhosis of the rodent and human liver by enhancing PDGF/TGF-beta signaling in hepatic stellate cells. *The Journal of clinical investigation* 120, 2379-2394.
- Cao, Y. (2009). Positive and negative modulation of angiogenesis by VEGFR1 ligands. *Science signaling* 2, re1.
- Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoeck, A., Harpal, K., Eberhardt, C., *et al.* (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380, 435-439.
- Carmeliet, P., Moons, L., Luttun, A., Vincenti, V., Compernelle, V., De Mol, M., Wu, Y., Bono, F., Devy, L., Beck, H., *et al.* (2001). Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nature medicine* 7, 575-583.
- Carmeliet, P., Ng, Y. S., Nuyens, D., Theilmeier, G., Brusselmans, K., Cornelissen, I., Ehler, E., Kakkar, V. V., Stalmans, I., Mattot, V., *et al.* (1999). Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Nature medicine* 5, 495-502.
- Cebe-Suarez, S., Zehnder-Fjallman, A., and Ballmer-Hofer, K. (2006). The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. *Cell Mol Life Sci* 63, 601-615.
- Chen, H., Chedotal, A., He, Z., Goodman, C. S., and Tessier-Lavigne, M. (1997). Neuropilin-2, a novel member of the neuropilin family, is a high affinity receptor for the semaphorins Sema E and Sema IV but not Sema III. *Neuron* 19, 547-559.
- Cheng, L., Jia, H., Lohr, M., Bagherzadeh, A., Holmes, D. I., Selwood, D., and Zachary, I. (2004). Anti-chemorepulsive effects of vascular endothelial growth factor and placental growth factor-2 in dorsal root ganglion neurons are mediated via neuropilin-1 and cyclooxygenase-derived prostanoid production. *The Journal of biological chemistry* 279, 30654-30661.
- Coles, L. S., Bartley, M. A., Bert, A., Hunter, J., Polyak, S., Diamond, P., Vadas, M. A., and Goodall, G. J. (2004). A multi-protein complex containing cold shock domain (Y-box) and polypyrimidine tract binding proteins forms on the vascular endothelial growth factor mRNA. Potential role in mRNA stabilization. *European journal of biochemistry / FEBS* 271, 648-660.

- De Smet, F., Segura, I., De Bock, K., Hohensinner, P. J., and Carmeliet, P. (2009). Mechanisms of vessel branching: filopodia on endothelial tip cells lead the way. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 29, 639-649.
- Delpy, A., Allain, A. E., Meyrand, P., and Branchereau, P. (2008). NKCC1 cotransporter inactivation underlies embryonic development of chloride-mediated inhibition in mouse spinal motoneuron. *The Journal of physiology* 586, 1059-1075.
- Dibbens, J. A., Miller, D. L., Damert, A., Risau, W., Vadas, M. A., and Goodall, G. J. (1999). Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor mRNA stability requires the cooperation of multiple RNA elements. *Molecular biology of the cell* 10, 907-919.
- Dixelius, J., Makinen, T., Wirzenius, M., Karkkainen, M. J., Wernstedt, C., Alitalo, K., and Claesson-Welsh, L. (2003). Ligand-induced vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) heterodimerization with VEGFR-2 in primary lymphatic endothelial cells regulates tyrosine phosphorylation sites. *The Journal of biological chemistry* 278, 40973-40979.
- Djonov, V., Schmid, M., Tschanz, S. A., and Burri, P. H. (2000). Intussusceptive angiogenesis: its role in embryonic vascular network formation. *Circulation research* 86, 286-292.
- Dumont, D. J., Jussila, L., Taipale, J., Lymboussaki, A., Mustonen, T., Pajusola, K., Breitman, M., and Alitalo, K. (1998). Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science (New York, NY)* 282, 946-949.
- Dupree, J. L., Mason, J. L., Marcus, J. R., Stull, M., Levinson, R., Matsushima, G. K., and Popko, B. (2004). Oligodendrocytes assist in the maintenance of sodium channel clusters independent of the myelin sheath. *Neuron glia biology* 1, 179-192.
- Eriksson, A., Cao, R., Pawliuk, R., Berg, S. M., Tsang, M., Zhou, D., Fleet, C., Tritsarlis, K., Dissing, S., Leboulch, P., and Cao, Y. (2002). Placenta growth factor-1 antagonizes VEGF-induced angiogenesis and tumor growth by the formation of functionally inactive PlGF-1/VEGF heterodimers. *Cancer cell* 1, 99-108.
- Essafi-Benkhadir, K., Pouyssegur, J., and Pages, G. (2010). Implication of the ERK pathway on the post-transcriptional regulation of VEGF mRNA stability. *Methods in molecular biology* 661, 451-469.
- Evans, I. M., Yamaji, M., Britton, G., Pellet-Many, C., Lockie, C., Zachary, I. C., and Frankel, P. (2011). Neuropilin-1 signaling through p130Cas tyrosine phosphorylation is essential for growth factor-dependent migration of glioma and endothelial cells. *Molecular and cellular biology* 31, 1174-1185.
- Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O'Shea, K. S., Powell-Braxton, L., Hillan, K. J., and Moore, M. W. (1996). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380, 439-442.
- Fong, G. H., Rossant, J., Gertsenstein, M., and Breitman, M. L. (1995). Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 376, 66-70.
- Fortin, G., Jungbluth, S., Lumsden, A., and Champagnat, J. (1999). Segmental specification of GABAergic inhibition during development of hindbrain neural networks. *Nature neuroscience* 2, 873-877.
- Friese, A., Kaltschmidt, J. A., Ladle, D. R., Sigrist, M., Jessell, T. M., and Arber, S. (2009). Gamma and alpha motor neurons distinguished by expression of transcription factor Err3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 13588-13593.
- Gammill, L. S., and Bronner-Fraser, M. (2003). Neural crest specification: migrating into genomics. *Nature reviews* 4, 795-805.

- Gerber, H. P., Hillan, K. J., Ryan, A. M., Kowalski, J., Keller, G. A., Rangell, L., Wright, B. D., Radtke, F., Aguet, M., and Ferrara, N. (1999). VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development (Cambridge, England)* *126*, 1149-1159.
- Gerhardt, H., Ruhrberg, C., Abramsson, A., Fujisawa, H., Shima, D., and Betsholtz, C. (2004). Neuropilin-1 is required for endothelial tip cell guidance in the developing central nervous system. *Dev Dyn* *231*, 503-509.
- Ghajar, C. M., George, S. C., and Putnam, A. J. (2008). Matrix metalloproteinase control of capillary morphogenesis. *Critical reviews in eukaryotic gene expression* *18*, 251-278.
- Gielen, M. (2010). [Molecular operation of ionotropic glutamate receptors: proteins that mediate the excitatory synaptic neurotransmission]. *Med Sci (Paris)* *26*, 65-72.
- Gille, H., Kowalski, J., Yu, L., Chen, H., Pisabarro, M. T., Davis-Smyth, T., and Ferrara, N. (2000). A repressor sequence in the juxtamembrane domain of Flt-1 (VEGFR-1) constitutively inhibits vascular endothelial growth factor-dependent phosphatidylinositol 3'-kinase activation and endothelial cell migration. *The EMBO journal* *19*, 4064-4073.
- Glinka, Y., Stoilova, S., Mohammed, N., and Prud'homme, G. J. (2011). Neuropilin-1 exerts co-receptor function for TGF-beta-1 on the membrane of cancer cells and enhances responses to both latent and active TGF-beta. *Carcinogenesis* *32*, 613-621.
- Grunewald, F. S., Prota, A. E., Giese, A., and Ballmer-Hofer, K. (2010). Structure-function analysis of VEGF receptor activation and the role of coreceptors in angiogenic signaling. *Biochimica et biophysica acta* *1804*, 567-580.
- Gu, C., Rodriguez, E. R., Reimert, D. V., Shu, T., Fritsch, B., Richards, L. J., Kolodkin, A. L., and Ginty, D. D. (2003). Neuropilin-1 conveys semaphorin and VEGF signaling during neural and cardiovascular development. *Developmental cell* *5*, 45-57.
- Haigh, J. J., Morelli, P. I., Gerhardt, H., Haigh, K., Tsien, J., Damert, A., Miquerol, L., Muhlner, U., Klein, R., Ferrara, N., *et al.* (2003). Cortical and retinal defects caused by dosage-dependent reductions in VEGF-A paracrine signaling. *Developmental biology* *262*, 225-241.
- Haiko, P., Makinen, T., Keskitalo, S., Taipale, J., Karkkainen, M. J., Baldwin, M. E., Stacker, S. A., Achen, M. G., and Alitalo, K. (2008). Deletion of vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) and VEGF-D is not equivalent to VEGF receptor 3 deletion in mouse embryos. *Molecular and cellular biology* *28*, 4843-4850.
- Harry, G. J., and Kraft, A. D. (2012). Microglia in the developing brain: a potential target with lifetime effects. *Neurotoxicology* *33*, 191-206.
- Herbert, S. P., and Stainier, D. Y. (2011). Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* *12*, 551-564.
- Hewett, J. A. (2009). Determinants of regional and local diversity within the astroglial lineage of the normal central nervous system. *Journal of neurochemistry* *110*, 1717-1736.
- Hiratsuka, S., Minowa, O., Kuno, J., Noda, T., and Shibuya, M. (1998). Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *95*, 9349-9354.
- Hiratsuka, S., Nakao, K., Nakamura, K., Katsuki, M., Maru, Y., and Shibuya, M. (2005). Membrane fixation of vascular endothelial growth factor receptor 1 ligand-binding domain is important for vasculogenesis and angiogenesis in mice. *Molecular and cellular biology* *25*, 346-354.
- Hogan, K. A., Ambler, C. A., Chapman, D. L., and Bautch, V. L. (2004). The neural tube patterns vessels developmentally using the VEGF signaling pathway. *Development (Cambridge, England)* *131*, 1503-1513.
- Horowitz, A., and Seerapu, H. R. (2012). Regulation of VEGF signaling by membrane traffic. *Cellular signalling* *24*, 1810-1820.

- Houck, K. A., Leung, D. W., Rowland, A. M., Winer, J., and Ferrara, N. (1992). Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *The Journal of biological chemistry* 267, 26031-26037.
- Hu, B., Guo, P., Bar-Joseph, I., Imanishi, Y., Jarzynka, M. J., Bogler, O., Mikkelsen, T., Hirose, T., Nishikawa, R., and Cheng, S. Y. (2007). Neuropilin-1 promotes human glioma progression through potentiating the activity of the HGF/SF autocrine pathway. *Oncogene* 26, 5577-5586.
- Huang, Y. F., Yang, C. H., Huang, C. C., Tai, M. H., and Hsu, K. S. (2010). Pharmacological and genetic accumulation of hypoxia-inducible factor-1alpha enhances excitatory synaptic transmission in hippocampal neurons through the production of vascular endothelial growth factor. *J Neurosci* 30, 6080-6093.
- Ito, N., Wernstedt, C., Engstrom, U., and Claesson-Welsh, L. (1998). Identification of vascular endothelial growth factor receptor-1 tyrosine phosphorylation sites and binding of SH2 domain-containing molecules. *The Journal of biological chemistry* 273, 23410-23418.
- Jain, R. K., di Tomaso, E., Duda, D. G., Loeffler, J. S., Sorensen, A. G., and Batchelor, T. T. (2007). Angiogenesis in brain tumours. *Nature reviews* 8, 610-622.
- Jessell, T. M. (2000). Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet* 1, 20-29.
- Jin, K., Zhu, Y., Sun, Y., Mao, X. O., Xie, L., and Greenberg, D. A. (2002). Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 11946-11950.
- Jin, K. L., Mao, X. O., and Greenberg, D. A. (2000). Vascular endothelial growth factor: direct neuroprotective effect in in vitro ischemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 10242-10247.
- Jonas, P., Bischofberger, J., and Sandkuhler, J. (1998). Corelease of two fast neurotransmitters at a central synapse. *Science (New York, NY)* 281, 419-424.
- Kamba, T., Tam, B. Y., Hashizume, H., Haskell, A., Sennino, B., Mancuso, M. R., Norberg, S. M., O'Brien, S. M., Davis, R. B., Gowen, L. C., *et al.* (2006). VEGF-dependent plasticity of fenestrated capillaries in the normal adult microvasculature. *American journal of physiology* 290, H560-576.
- Kanning, K. C., Kaplan, A., and Henderson, C. E. (2010). Motor neuron diversity in development and disease. *Annual review of neuroscience* 33, 409-440.
- Karpanen, T., Bry, M., Ollila, H. M., Seppanen-Laakso, T., Liimatta, E., Leskinen, H., Kivela, R., Helkamaa, T., Merentie, M., Jeltsch, M., *et al.* (2008). Overexpression of vascular endothelial growth factor-B in mouse heart alters cardiac lipid metabolism and induces myocardial hypertrophy. *Circulation research* 103, 1018-1026.
- Kawasaki, T., Kitsukawa, T., Bekku, Y., Matsuda, Y., Sanbo, M., Yagi, T., and Fujisawa, H. (1999). A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development (Cambridge, England)* 126, 4895-4902.
- Kearney, J. B., Kappas, N. C., Ellerstrom, C., DiPaola, F. W., and Bautch, V. L. (2004). The VEGF receptor flt-1 (VEGFR-1) is a positive modulator of vascular sprout formation and branching morphogenesis. *Blood* 103, 4527-4535.
- Kendall, R. L., Wang, G., and Thomas, K. A. (1996). Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochemical and biophysical research communications* 226, 324-328.
- Kiehn, O. (2011). Development and functional organization of spinal locomotor circuits. *Current opinion in neurobiology* 21, 100-109.

- Kitsukawa, T., Shimizu, M., Sanbo, M., Hirata, T., Taniguchi, M., Bekku, Y., Yagi, T., and Fujisawa, H. (1997). Neuropilin-semaphorin III/D-mediated chemorepulsive signals play a crucial role in peripheral nerve projection in mice. *Neuron* *19*, 995-1005.
- Kitsukawa, T., Shimono, A., Kawakami, A., Kondoh, H., and Fujisawa, H. (1995). Overexpression of a membrane protein, neuropilin, in chimeric mice causes anomalies in the cardiovascular system, nervous system and limbs. *Development (Cambridge, England)* *121*, 4309-4318.
- Koch, S. (2012). Neuropilin signalling in angiogenesis. *Biochemical Society transactions* *40*, 20-25.
- Konopatskaya, O., Churchill, A. J., Harper, S. J., Bates, D. O., and Gardiner, T. A. (2006). VEGF165b, an endogenous C-terminal splice variant of VEGF, inhibits retinal neovascularization in mice. *Molecular vision* *12*, 626-632.
- Kumar, J., and Mayer, M. L. (2012). Functional Insights from Glutamate Receptor Ion Channel Structures. *Annual review of physiology*.
- Kutcher, M. E., Klagsbrun, M., and Mamluk, R. (2004). VEGF is required for the maintenance of dorsal root ganglia blood vessels but not neurons during development. *Faseb J* *18*, 1952-1954.
- Ladomery, M. R., Harper, S. J., and Bates, D. O. (2007). Alternative splicing in angiogenesis: the vascular endothelial growth factor paradigm. *Cancer letters* *249*, 133-142.
- Lagercrantz, J., Larsson, C., Grimmond, S., Fredriksson, M., Weber, G., and Piehl, F. (1996). Expression of the VEGF-related factor gene in pre- and postnatal mouse. *Biochemical and biophysical research communications* *220*, 147-152.
- Lambrechts, D., and Carmeliet, P. (2006). VEGF at the neurovascular interface: therapeutic implications for motor neuron disease. *Biochimica et biophysica acta* *1762*, 1109-1121.
- Lambrechts, D., Storkebaum, E., Morimoto, M., Del-Favero, J., Desmet, F., Marklund, S. L., Wyns, S., Thijs, V., Andersson, J., van Marion, I., *et al.* (2003). VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nature genetics* *34*, 383-394.
- Larrivee, B., Freitas, C., Suchting, S., Brunet, I., and Eichmann, A. (2009). Guidance of vascular development: lessons from the nervous system. *Circulation research* *104*, 428-441.
- Le-Corrone, H., Rigo, J. M., Branchereau, P., and Legendre, P. (2011). GABA(A) receptor and glycine receptor activation by paracrine/autocrine release of endogenous agonists: more than a simple communication pathway. *Molecular neurobiology* *44*, 28-52.
- Lee, H. S., Han, J., Bai, H. J., and Kim, K. W. (2009). Brain angiogenesis in developmental and pathological processes: regulation, molecular and cellular communication at the neurovascular interface. *The FEBS journal* *276*, 4622-4635.
- Lee, S., Jilani, S. M., Nikolova, G. V., Carpizo, D., and Iruela-Arispe, M. L. (2005). Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors. *The Journal of cell biology* *169*, 681-691.
- Lee, S. K., and Pfaff, S. L. (2001). Transcriptional networks regulating neuronal identity in the developing spinal cord. *Nature neuroscience* *4 Suppl*, 1183-1191.
- Levy, A. P., Levy, N. S., and Goldberg, M. A. (1996). Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia. *The Journal of biological chemistry* *271*, 2746-2753.
- Li, X., Tjwa, M., Van Hove, I., Enholm, B., Neven, E., Paavonen, K., Jeltsch, M., Juan, T. D., Sievers, R. E., Chorianopoulos, E., *et al.* (2008). Reevaluation of the role of VEGF-B suggests a restricted role in the revascularization of the ischemic myocardium. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* *28*, 1614-1620.

- Liang, W. C., Wu, X., Peale, F. V., Lee, C. V., Meng, Y. G., Gutierrez, J., Fu, L., Malik, A. K., Gerber, H. P., Ferrara, N., and Fuh, G. (2006). Cross-species vascular endothelial growth factor (VEGF)-blocking antibodies completely inhibit the growth of human tumor xenografts and measure the contribution of stromal VEGF. *The Journal of biological chemistry* *281*, 951-961.
- Ligon, K. L., Kesari, S., Kitada, M., Sun, T., Arnett, H. A., Alberta, J. A., Anderson, D. J., Stiles, C. D., and Rowitch, D. H. (2006). Development of NG2 neural progenitor cells requires Olig gene function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 7853-7858.
- Mac Gabhann, F., and Popel, A. S. (2004). Model of competitive binding of vascular endothelial growth factor and placental growth factor to VEGF receptors on endothelial cells. *American journal of physiology* *286*, H153-164.
- Maes, C., Stockmans, I., Moermans, K., Van Looveren, R., Smets, N., Carmeliet, P., Bouillon, R., and Carmeliet, G. (2004). Soluble VEGF isoforms are essential for establishing epiphyseal vascularization and regulating chondrocyte development and survival. *The Journal of clinical investigation* *113*, 188-199.
- McCloskey, D. P., Croll, S. D., and Scharfman, H. E. (2005). Depression of synaptic transmission by vascular endothelial growth factor in adult rat hippocampus and evidence for increased efficacy after chronic seizures. *J Neurosci* *25*, 8889-8897.
- McCloskey, D. P., Hintz, T. M., and Scharfman, H. E. (2008). Modulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in motor neurons and its electrophysiological effects. *Brain research bulletin* *76*, 36-44.
- McCormick, A. M., and Leipzig, N. D. (2012). Neural regenerative strategies incorporating biomolecular axon guidance signals. *Annals of biomedical engineering* *40*, 578-597.
- McTigue, D. M., and Tripathi, R. B. (2008). The life, death, and replacement of oligodendrocytes in the adult CNS. *Journal of neurochemistry* *107*, 1-19.
- Meissirel, C., Ruiz de Almodovar, C., Knevels, E., Coulon, C., Chounlamountri, N., Segura, I., de Rossi, P., Vinckier, S., Anthonis, K., Deleglise, B., *et al.* (2011). VEGF modulates NMDA receptors activity in cerebellar granule cells through Src-family kinases before synapse formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *108*, 13782-13787.
- Miquerol, L., Langille, B. L., and Nagy, A. (2000). Embryonic development is disrupted by modest increases in vascular endothelial growth factor gene expression. *Development (Cambridge, England)* *127*, 3941-3946.
- Morin-Brureau, M., Lebrun, A., Rousset, M. C., Fagni, L., Bockaert, J., de Bock, F., and Lerner-Natoli, M. (2011). Epileptiform activity induces vascular remodeling and zonula occludens 1 downregulation in organotypic hippocampal cultures: role of VEGF signaling pathways. *J Neurosci* *31*, 10677-10688.
- Mukouyama, Y. S., Gerber, H. P., Ferrara, N., Gu, C., and Anderson, D. J. (2005). Peripheral nerve-derived VEGF promotes arterial differentiation via neuropilin 1-mediated positive feedback. *Development (Cambridge, England)* *132*, 941-952.
- Murakami, M., Iwai, S., Hiratsuka, S., Yamauchi, M., Nakamura, K., Iwakura, Y., and Shibuya, M. (2006). Signaling of vascular endothelial growth factor receptor-1 tyrosine kinase promotes rheumatoid arthritis through activation of monocytes/macrophages. *Blood* *108*, 1849-1856.
- Myers, C. P., Lewcock, J. W., Hanson, M. G., Gosgnach, S., Aimone, J. B., Gage, F. H., Lee, K. F., Landmesser, L. T., and Pfaff, S. L. (2005). Cholinergic input is required during embryonic development to mediate proper assembly of spinal locomotor circuits. *Neuron* *46*, 37-49.

- Nagase, T., Nagase, M., Yoshimura, K., Fujita, T., and Koshima, I. (2005). Angiogenesis within the developing mouse neural tube is dependent on sonic hedgehog signaling: possible roles of motor neurons. *Genes Cells* 10, 595-604.
- Nakamura, F., Tanaka, M., Takahashi, T., Kalb, R. G., and Strittmatter, S. M. (1998). Neuropilin-1 extracellular domains mediate semaphorin D/III-induced growth cone collapse. *Neuron* 21, 1093-1100.
- Nakao, T., Ishizawa, A., and Ogawa, R. (1988). Observations of vascularization in the spinal cord of mouse embryos, with special reference to development of boundary membranes and perivascular spaces. *The Anatomical record* 221, 663-677.
- Neufeld, G., Cohen, T., Shraga, N., Lange, T., Kessler, O., and Herzog, Y. (2002). The neuropilins: multifunctional semaphorin and VEGF receptors that modulate axon guidance and angiogenesis. *Trends in cardiovascular medicine* 12, 13-19.
- Ogunshola, O. O., Antic, A., Donoghue, M. J., Fan, S. Y., Kim, H., Stewart, W. B., Madri, J. A., and Ment, L. R. (2002). Paracrine and autocrine functions of neuronal vascular endothelial growth factor (VEGF) in the central nervous system. *The Journal of biological chemistry* 277, 11410-11415.
- Olsson, A. K., Dimberg, A., Kreuger, J., and Claesson-Welsh, L. (2006). VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 359-371.
- Oosthuysen, B., Moons, L., Storkebaum, E., Beck, H., Nuyens, D., Brusselmans, K., Van Dorpe, J., Hellings, P., Gorselink, M., Heymans, S., *et al.* (2001). Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nature genetics* 28, 131-138.
- Oudega, M. (2012). Molecular and cellular mechanisms underlying the role of blood vessels in spinal cord injury and repair. *Cell and tissue research* 349, 269-288.
- Pages, G., and Pouyssegur, J. (2005). Transcriptional regulation of the Vascular Endothelial Growth Factor gene--a concert of activating factors. *Cardiovascular research* 65, 564-573.
- Pan, Q., Chanthery, Y., Liang, W. C., Stawicki, S., Mak, J., Rathore, N., Tong, R. K., Kowalski, J., Yee, S. F., Pacheco, G., *et al.* (2007). Blocking neuropilin-1 function has an additive effect with anti-VEGF to inhibit tumor growth. *Cancer cell* 11, 53-67.
- Parker, M. W., Guo, H. F., Li, X., Linkugel, A. D., and Vander Kooi, C. W. (2012). Function of the Neuropilin Family as Essential Pleiotropic Cell Surface Receptors. *Biochemistry*.
- Pascual, O., Ben Achour, S., Rostaing, P., Triller, A., and Bessis, A. (2012). Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, E197-205.
- Pellet-Many, C., Frankel, P., Evans, I. M., Herzog, B., Junemann-Ramirez, M., and Zachary, I. C. (2011). Neuropilin-1 mediates PDGF stimulation of vascular smooth muscle cell migration and signalling via p130Cas. *The Biochemical journal* 435, 609-618.
- Pellet-Many, C., Frankel, P., Jia, H., and Zachary, I. (2008). Neuropilins: structure, function and role in disease. *The Biochemical journal* 411, 211-226.
- Plouet, J., Moro, F., Bertagnolli, S., Coldeboeuf, N., Mazarguil, H., Clamens, S., and Bayard, F. (1997). Extracellular cleavage of the vascular endothelial growth factor 189-amino acid form by urokinase is required for its mitogenic effect. *The Journal of biological chemistry* 272, 13390-13396.
- Rahimi, N., Dayanir, V., and Lashkari, K. (2000). Receptor chimeras indicate that the vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) modulates mitogenic activity of VEGFR-2 in endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 275, 16986-16992.
- Rigato, C., Buckinx, R., Le-Corronc, H., Rigo, J. M., and Legendre, P. (2011). Pattern of invasion of the embryonic mouse spinal cord by microglial cells at the time of the onset of functional neuronal networks. *Glia* 59, 675-695.

- Rigau, V., Morin, M., Rousset, M. C., de Bock, F., Lebrun, A., Coubes, P., Picot, M. C., Baldy-Moulinier, M., Bockaert, J., Crespel, A., and Lerner-Natoli, M. (2007). Angiogenesis is associated with blood-brain barrier permeability in temporal lobe epilepsy. *Brain : a journal of neurology* *130*, 1942-1956.
- Risau, W., and Flamme, I. (1995). Vasculogenesis. *Annual review of cell and developmental biology* *11*, 73-91.
- Roberts, D. M., Kearney, J. B., Johnson, J. H., Rosenberg, M. P., Kumar, R., and Bautch, V. L. (2004). The vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor Flt-1 (VEGFR-1) modulates Flk-1 (VEGFR-2) signaling during blood vessel formation. *The American journal of pathology* *164*, 1531-1535.
- Rosenstein, J. M., Krum, J. M., and Ruhrberg, C. (2010). VEGF in the nervous system. *Organogenesis* *6*, 107-114.
- Roskoski, R., Jr. (2008). VEGF receptor protein-tyrosine kinases: structure and regulation. *Biochemical and biophysical research communications* *375*, 287-291.
- Rossant, J., and Howard, L. (2002). Signaling pathways in vascular development. *Annual review of cell and developmental biology* *18*, 541-573.
- Rowitch, D. H., and Kriegstein, A. R. (2010). Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature* *468*, 214-222.
- Ruhrberg, C., Gerhardt, H., Golding, M., Watson, R., Ioannidou, S., Fujisawa, H., Betsholtz, C., and Shima, D. T. (2002). Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis. *Genes & development* *16*, 2684-2698.
- Ruiz de Almodovar, C., Fabre, P. J., Knevels, E., Coulon, C., Segura, I., Haddick, P. C., Aerts, L., Delattin, N., Strasser, G., Oh, W. J., *et al.* (2011). VEGF Mediates Commissural Axon Chemoattraction through Its Receptor Flk1. *Neuron* *70*, 966-978.
- Sakurai, Y., Ohgimoto, K., Kataoka, Y., Yoshida, N., and Shibuya, M. (2005). Essential role of Flk-1 (VEGF receptor 2) tyrosine residue 1173 in vasculogenesis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 1076-1081.
- Santillan, A., Nacarino, V., Greenberg, E., Riina, H. A., Gobin, Y. P., and Patsalides, A. (2012). Vascular anatomy of the spinal cord. *Journal of neurointerventional surgery* *4*, 67-74.
- Sathasivam, S. (2008). VEGF and ALS. *Neuroscience research* *62*, 71-77.
- Scain, A. L., Le Corronc, H., Allain, A. E., Muller, E., Rigo, J. M., Meyrand, P., Branchereau, P., and Legendre, P. (2010). Glycine release from radial cells modulates the spontaneous activity and its propagation during early spinal cord development. *J Neurosci* *30*, 390-403.
- Schanzer, A., Wachs, F. P., Wilhelm, D., Acker, T., Cooper-Kuhn, C., Beck, H., Winkler, J., Aigner, L., Plate, K. H., and Kuhn, H. G. (2004). Direct stimulation of adult neural stem cells in vitro and neurogenesis in vivo by vascular endothelial growth factor. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* *14*, 237-248.
- Schwarz, Q., and Ruhrberg, C. (2010). Neuropilin, you gotta let me know: should I stay or should I go? *Cell adhesion & migration* *4*, 61-66.
- Sernagor, E., Chabrol, F., Bony, G., and Cancedda, L. (2010). GABAergic control of neurite outgrowth and remodeling during development and adult neurogenesis: general rules and differences in diverse systems. *Frontiers in cellular neuroscience* *4*, 11.
- Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T. P., Gertsenstein, M., Wu, X. F., Breitman, M. L., and Schuh, A. C. (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* *376*, 62-66.
- Sibilla, S., and Ballerini, L. (2009). GABAergic and glycinergic interneuron expression during spinal cord development: dynamic interplay between inhibition and excitation in the control of ventral network outputs. *Progress in neurobiology* *89*, 46-60.

- Sondell, M., Sundler, F., and Kanje, M. (2000). Vascular endothelial growth factor is a neurotrophic factor which stimulates axonal outgrowth through the flk-1 receptor. *The European journal of neuroscience* *12*, 4243-4254.
- Srinivas, S., Watanabe, T., Lin, C. S., Williams, C. M., Tanabe, Y., Jessell, T. M., and Costantini, F. (2001). Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. *BMC developmental biology* *1*, 4.
- Storkebaum, E., Lambrechts, D., Dewerchin, M., Moreno-Murciano, M. P., Appelmans, S., Oh, H., Van Damme, P., Rutten, B., Man, W. Y., De Mol, M., *et al.* (2005). Treatment of motoneuron degeneration by intracerebroventricular delivery of VEGF in a rat model of ALS. *Nature neuroscience* *8*, 85-92.
- Styp-Rekowska, B., Hlushchuk, R., Pries, A. R., and Djonov, V. (2011). Intussusceptive angiogenesis: pillars against the blood flow. *Acta physiologica (Oxford, England)* *202*, 213-223.
- Takahashi, H., and Shibuya, M. (2005). The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)* *109*, 227-241.
- Takashima, S., Kitakaze, M., Asakura, M., Asanuma, H., Sanada, S., Tashiro, F., Niwa, H., Miyazaki, J., Hirota, S., Kitamura, Y., *et al.* (2002). Targeting of both mouse neuropilin-1 and neuropilin-2 genes severely impairs developmental yolk sac and embryonic angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *99*, 3657-3662.
- Terauchi, A., Johnson-Venkatesh, E. M., Toth, A. B., Javed, D., Sutton, M. A., and Umemori, H. (2010). Distinct FGFs promote differentiation of excitatory and inhibitory synapses. *Nature* *465*, 783-787.
- Tovar, Y. R. L. B., and Tapia, R. (2010). VEGF protects spinal motor neurons against chronic excitotoxic degeneration in vivo by activation of PI3-K pathway and inhibition of p38MAPK. *Journal of neurochemistry* *115*, 1090-1101.
- Ulloa, F., and Marti, E. (2010). Wnt won the war: antagonistic role of Wnt over Shh controls dorso-ventral patterning of the vertebrate neural tube. *Dev Dyn* *239*, 69-76.
- Vieira, J. M., Ruhrberg, C., and Schwarz, Q. (2010). VEGF receptor signaling in vertebrate development. *Organogenesis* *6*, 97-106.
- Vieira, J. M., Schwarz, Q., and Ruhrberg, C. (2007). Selective requirements for NRP1 ligands during neurovascular patterning. *Development (Cambridge, England)* *134*, 1833-1843.
- Wang, E. S., Teruya-Feldstein, J., Wu, Y., Zhu, Z., Hicklin, D. J., and Moore, M. A. (2004). Targeting autocrine and paracrine VEGF receptor pathways inhibits human lymphoma xenografts in vivo. *Blood* *104*, 2893-2902.
- Wang, Y., Jin, K., Mao, X. O., Xie, L., Banwait, S., Marti, H. H., and Greenberg, D. A. (2007a). VEGF-overexpressing transgenic mice show enhanced post-ischemic neurogenesis and neuromigration. *Journal of neuroscience research* *85*, 740-747.
- Wang, Y., Kilic, E., Kilic, U., Weber, B., Bassetti, C. L., Marti, H. H., and Hermann, D. M. (2005). VEGF overexpression induces post-ischaemic neuroprotection, but facilitates haemodynamic steal phenomena. *Brain : a journal of neurology* *128*, 52-63.
- Wang, Y., Mao, X. O., Xie, L., Banwait, S., Marti, H. H., Greenberg, D. A., and Jin, K. (2007b). Vascular endothelial growth factor overexpression delays neurodegeneration and prolongs survival in amyotrophic lateral sclerosis mice. *J Neurosci* *27*, 304-307.
- Whittles, C. E., Pocock, T. M., Wedge, S. R., Kendrew, J., Hennequin, L. F., Harper, S. J., and Bates, D. O. (2002). ZM323881, a novel inhibitor of vascular endothelial growth factor-receptor-2 tyrosine kinase activity. *Microcirculation* *9*, 513-522.
- Wood, J. M., Bold, G., Buchdunger, E., Cozens, R., Ferrari, S., Frei, J., Hofmann, F., Mestan, J., Mett, H., O'Reilly, T., *et al.* (2000). PTK787/ZK 222584, a novel and potent inhibitor

- of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases, impairs vascular endothelial growth factor-induced responses and tumor growth after oral administration. *Cancer research* 60, 2178-2189.
- Woolard, J., Wang, W. Y., Bevan, H. S., Qiu, Y., Morbidelli, L., Pritchard-Jones, R. O., Cui, T. G., Sugiono, M., Waine, E., Perrin, R., *et al.* (2004). VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer research* 64, 7822-7835.
- Yaqoob, U., Cao, S., Shergill, U., Jagavelu, K., Geng, Z., Yin, M., de Assuncao, T. M., Cao, Y., Szabolcs, A., Thorgeirsson, S., *et al.* (2012). Neuropilin-1 stimulates tumor growth by increasing fibronectin fibril assembly in the tumor microenvironment. *Cancer research* 72, 4047-4059.
- Yuan, L., Moyon, D., Pardanaud, L., Breant, C., Karkkainen, M. J., Alitalo, K., and Eichmann, A. (2002). Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice. *Development (Cambridge, England)* 129, 4797-4806.
- Yvert, B., Branchereau, P., and Meyrand, P. (2004). Multiple spontaneous rhythmic activity patterns generated by the embryonic mouse spinal cord occur within a specific developmental time window. *Journal of neurophysiology* 91, 2101-2109.
- Zacchigna, S., Lambrechts, D., and Carmeliet, P. (2008). Neurovascular signalling defects in neurodegeneration. *Nature reviews* 9, 169-181.
- Zachary, I. (2005). Neuroprotective role of vascular endothelial growth factor: signalling mechanisms, biological function, and therapeutic potential. *Neuro-Signals* 14, 207-221.
- Zachary, I. C. (2011). How neuropilin-1 regulates receptor tyrosine kinase signalling: the knowns and known unknowns. *Biochemical Society transactions* 39, 1583-1591.
- Zheng, C., Nennesmo, I., Fadeel, B., and Henter, J. I. (2004). Vascular endothelial growth factor prolongs survival in a transgenic mouse model of ALS. *Annals of neurology* 56, 564-567.
- Zhou, Q., and Anderson, D. J. (2002). The bHLH transcription factors OLIG2 and OLIG1 couple neuronal and glial subtype specification. *Cell* 109, 61-73.

**PROJET n°2 : Développement du
glioblastome : angiogenèse et
microenvironnement de la tumeur.**

PROJET n°2 : Développement du glioblastome : angiogenèse et microenvironnement de la tumeur.

Comme cela a été écrit dans l'avant propos, le travail présenté dans cette partie du manuscrit fait suite à mon stage de master 2. En parallèle des travaux menés dans le cadre du projet n°1, l'opportunité m'a été donnée de continuer à approfondir l'étude des altérations du tissu autour des tumeurs de notre modèle. Ce travail a d'ors et déjà été intégré pour une partie dans un article publié en 2010 dans le journal PNAS (article 1) et fera aussi l'objet d'une seconde publication (article 2) qui est en cours d'élaboration. Le projet principal de cette thèse étant la partie sur le développement embryonnaire, ce second projet a été volontairement moins détaillé dans ce manuscrit.

INTRODUCTION.

La première partie de cette thèse porte sur les interactions entre les vaisseaux et le système nerveux central lors du développement embryonnaire. Cette seconde partie de mon travail est axée sur le modèle du **glioblastome**. Les gliomes sont des tumeurs cérébrales formées à partir de cellules gliales et sont classées en plusieurs groupes selon leur origine : astrocytomes (dérivés des astrocytes), oligodendrocytomes (dérivés des oligodendrocytes) et oligoastrocytomes (dérivés des astrocytes et des oligodendrocytes). Ces cancers sont aussi classés selon leur malignité : gliomes de bas grade (stades I et II) ou de haut grade (stades III et IV) (classement Organisation Mondiale de la Santé, Louis et al., 2007). Le glioblastome, qui est l'objet de cette étude, est le stade le plus malin de ces cancers (grade IV) avec une survie d'environ 12 mois après le diagnostic (Krex et al., 2007). Ces tumeurs ont un phénotype particulier. En effet, elles sont invasives et très hétérogènes (plusieurs sous populations cancéreuses au sein même de la tumeur) (Louis, 2006). Elles sont aussi caractérisées par une angiogenèse importante, mais les vaisseaux tumoraux sont très déformés (tortueux, dilatés, branchements excessifs et parfois sans issue) ce qui aboutit à la formation d'un réseau vasculaire assez peu efficace en terme de perfusion sanguine (Carmeliet and Jain, 2011).

La formation de nouveaux vaisseaux est un processus qui n'est pas exclusif au glioblastome mais qui peut être trouvé dans la plupart des cancers. Dans les tumeurs solides, les cellules au cœur de la masse tumorale en développement sont de plus en plus éloignées des vaisseaux sanguins et se trouvent progressivement en condition d'**ischémie** (apports insuffisants en oxygène, nutriments, ...). Elles surexpriment alors des signaux pro-angiogéniques pour induire la formation de nouveaux vaisseaux et permettre l'irrigation de la tumeur. Cette néovascularisation rétablit la circulation sanguine dans les zones ischémiques, conduit à l'expansion tumorale et permet éventuellement la dissémination par voie sanguine de métastases. Ces mécanismes associant l'ischémie à l'angiogenèse sont retrouvés dans de nombreux cancers (Ma and Hendershot, 2004). De ce fait, les protéines impliquées dans la réponse tissulaire à l'ischémie ainsi que dans l'angiogenèse tumorale représentent des cibles thérapeutiques intéressantes pour le développement d'anti-tumoraux pharmacologiques.

Des senseurs du stress ischémique activent des voies de transduction à partir du **réticulum endoplasmique** (RE). Ce dernier est impliqué dans la synthèse et la maturation des protéines, lipides et sucres destinés à l'adressage. Lors d'un stress ischémique, des protéines mal conformées sont produites, détectées et séquestrées dans la lumière du RE pour y être re-conformées ou alors sont rétrotransloquées vers le cytosol et dégradées par le protéasome. Une accumulation trop importante de ces protéines conduit à la saturation des systèmes de sauvegarde et au déclenchement d'une réponse adaptative cellulaire qui a pour nom l'**Unfolded Protein Response (UPR)**. Trois senseurs protéiques du stress transmembranaires du RE, ont été décrits : PERK (Proteine kinase RNA-like ER Kinase), ATF6 (Activating Transcription Factor-6) et IRE1 (Inositol-Requiring Enzyme-1). Ces protéines agissent comme des récepteurs avec un domaine luminal capteur du stress, un domaine transmembranaire et un domaine cytosolique transduisant le signal et conduisant à la mise en place de mécanismes de survie cellulaire et/ou d'apoptose (Moenner et al., 2007; Ron and Walter, 2007).

Le projet est centré autour de la protéine **IRE1 α** (forme présente dans tout l'organisme, contrairement à la forme β détectée uniquement dans le tractus digestif). Dans les conditions basales, IRE1 est associée sous forme inactive à la protéine chaperonne BiP (Binding immunoglobulin Protein) qui lui sert de ligand bloquant (Fig. 46). Suite à un stress cellulaire, les protéines mal conformées qui s'accumulent dans le RE et dissocient BiP d'IRE1 (Bertolotti et al., 2000). Ce déplacement de BiP, et vraisemblablement la liaison de séquences hydrophobes des protéines mal conformées sur le domaine luminal d'IRE1, initie la transduction d'un signal cytosolique via les deux activités catalytiques portées par le récepteur : une activité Sérine/Thréonine kinase et une activité endoribonucléasique (RNase) (Ron and Walter, 2007) (Fig.46). Le domaine kinase catalyse la trans-autophosphorylation d'IRE1, conduit à la stabilisation du dimère et à l'activation du domaine RNase qui a plusieurs substrats dont l'un est le pré-ARN messager XBP1 (X-box Binding Protein-1). Chez l'Homme, XBP1 subit un épissage conduisant à la perte d'un intron de 26 bases avec un décalage du cadre de lecture lors de la traduction. La protéine XBP1 obtenue est un facteur de transcription stable aux effets pléiotropes (synthèse de lipides, apoptose, survie cellulaire, ...) (Acosta-Alvear et al., 2007). La forme non épissée de l'ARN d'XBP1 code pour une protéine plus labile et ayant un potentiel répresseur sur la transcription de gènes cibles de l'UPR (Yoshida et al., 2006). En plus de cette activité sur XBP1, le site RNase d'IRE1 dégrade et module de manière post-transcriptionnelle une série d'ARNm incluant le facteur anti-

angiogénique SPARC (Hollien and Weissman, 2006). Le site kinase recrute ses propres voies de signalisation avec, par exemple, son interaction avec TRAF2 et donc joue un rôle dans l'apoptose (Urano et al., 2000). Il interagit aussi avec la procaspase12, et avec des régulateurs de l'apoptose tels BAX et BAK (Gorman et al., 2012). Il est communément admis que dans un premier temps, la réponse induite permet à la cellule de s'adapter pour qu'elle survive au stress. Si le signal de stress persiste, alors des mécanismes favorisant l'apoptose vont se mettre en place (Hetz et al., 2011).

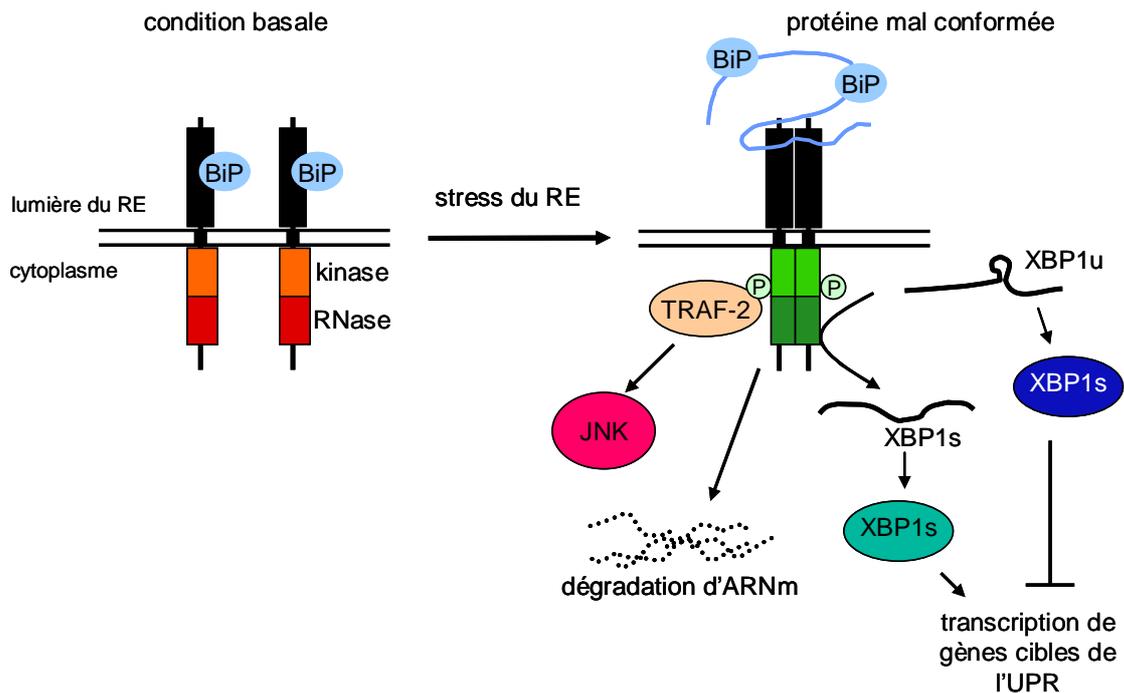


Fig. 46: Activation d'IRE1 lors du stress du réticulum endoplasmique. L'accumulation de protéines mal conformées lors du stress du RE provoque le déplacement de la protéine chaperon BiP et l'activation du récepteur IRE1 par dimérisation et transautophosphorylation. L'activation du domaine RNase permet l'épissage de l'ARNm de XBP1 qui, une fois traduit, agit en tant que facteur de transcription. D'autres ARNm sont dégradés par ce même domaine. Des adaptateurs peuvent se lier sur le domaine kinase et activer ainsi de voies liées à l'apoptose.

L'activation des senseurs de la voie UPR permet aux cellules de s'adapter aux conditions de stress. Or, les cellules cancéreuses subissent ces conditions et donc utilisent ce système. Il est donc important d'étudier le **rôle du réticulum endoplasmique et de ses senseurs de stress dans le développement des cancers** à des fins thérapeutiques. Dans un modèle d'adénocarcinome pancréatique, XBP1 est important pour la formation de nouveaux vaisseaux (Romero-Ramirez et al., 2009). De plus, les facteurs angiogéniques tels que le VEGFA mais aussi des interleukines sont régulés par différents senseurs de l'UPR dans plusieurs types cellulaires (Ghosh et al., 2010; Pereira et al., 2010; Wang et al., 2012).

L'étude du lien entre IRE1 et le glioblastome a fait l'objet de quelques études *in vitro* (Kim et al., 2010 ; Lu et al., 2012, Dejeans et al., 2012). Ce rôle d'IRE1 dans le développement du glioblastome a aussi été précédemment étudié au laboratoire. Pour cela, des cellules U87 dérivées d'un gliome humain (ATCC, HTB-14) transfectées avec un plasmide vide (U87Ctrl) ou avec un plasmide codant pour un dominant négatif d'IRE1 (U87DN) ont été utilisées. L'expression du DN bloque la signalisation dépendante d'IRE1 ce qui permet une approche de sa fonction. Ces cellules ont été implantées dans des cerveaux de souris immunodéficientes RAG2/ γ c et y développent des tumeurs aux phénotypes différents : celles obtenues à partir des cellules U87Ctrl sont massives, aux contours bien délimités et très vascularisées tandis que les tumeurs obtenues à partir des cellules U87DN présentent un phénotype étoilé, peu vascularisé et très invasif. Le facteur pro-angiogénique VEGFA, voit son expression diminuée dans les cellules U87DN par rapport aux cellules U87Ctrl. De plus, la régulation du VEGF est abolie lors de carences en glucose ou en oxygène dans les cellules qui expriment le dominant négatif de IRE1 (Drogat et al., 2007).

A la suite de cette première publication, l'objectif était de poursuivre la caractérisation du phénotype vasculaire des tumeurs formées et de confirmer les résultats obtenus lors de l'analyse transcriptomique pour valider l'hypothèse d'un rôle majeur d'IRE1 dans une modulation globale des gènes de l'angiogenèse. Une partie des résultats obtenus a été intégrée à un article intitulé « *Inositol-requiring enzyme 1a is a key regulator of angiogenesis and invasion in malignant glioma* » publié en 2010 dans le journal PNAS (**Article 1**).

Cette étude montre que dans ce modèle de gliome humain, l'inhibition d'IRE1 est corrélée avec la diminution de l'expression de facteurs pro-angiogéniques majeurs tels que le VEGF-A, l'IL-1 β , IL-6 et IL-8. De plus, de nombreux facteurs anti-angiogéniques voient leur expression augmentée. Ces gènes (SPARC, décorine, thrombospondine-1 et d'autres protéines de la matrice) sont importants pour la différenciation mésenchymateuse et les processus invasifs trouvés dans le glioblastome. Dans deux modèles *in vivo*, il a été démontré dans cette étude que les tumeurs surexprimant un dominant négatif d'IRE1: (1) ont une réduction de l'angiogenèse et de la perfusion sanguine, (2) ont un taux de croissance moindre, et (3) sont des tumeurs plus invasives et migrent autour des vaisseaux sanguins (co-option). Ce changement de phénotype est associé à une augmentation générale de la survie des souris implantées avec des cellules exprimant le dominant négatif d'IRE1. Ce phénotype est

partiellement reversé par la surexpression de l'interleukine 6 (IL-6). En effet, la vascularisation est alors comparable à celle des tumeurs formées par les cellules U87Ctrl mais le profil mésenchymal et l'infiltration typiques des tumeurs formées à partir des cellules U87DN restent présents. La protéine IRE1 a donc été identifiée comme un régulateur clé de la néovascularisation tumorale et du caractère invasif des tumeurs formées.

Lors de ma thèse, nous avons continué à caractériser ces tumeurs en focalisant notre attention sur le tissu situé à proximité des cellules tumorales.

Le développement d'une tumeur ne peut pas se résumer à la prolifération des cellules tumorales. Comme cela a été évoqué dans cette introduction, le détournement du réseau vasculaire du tissu voisin vers la tumeur est une caractéristique de la croissance tumorale. Les cellules endothéliales ne sont pas les seules à être touchées et l'ensemble des cellules qui entourent la tumeur, appelées **cellules stromales**, sont affectées. En conditions physiologiques, les astrocytes sont importants pour la régulation des apports nutritionnels et la régulation de l'homéostasie hydrique et ionique, du flux sanguin dans les capillaires cérébraux... (Sofroniew and Vinters, 2010). Dans le cas d'ischémie, de traumatisme, d'infection les astrocytes vont s'adapter lors d'un processus appelé (astro)gliose ou **réaction astrocytaire**. Sa définition au niveau moléculaire varie selon les auteurs, mais il est communément admis que ce phénomène se traduit par une hypertrophie des astrocytes et l'expression accrue des certains filaments intermédiaires du cytosquelette dont la Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP). Les formes les plus sévères de réaction astrocytaire présentent la formation d'une cicatrice suite à l'accumulation de ces astrocytes (Rivera-Zengotita and Yachnis, 2012). Les modifications observées dépendent de la nature et de la sévérité du traumatisme qu'ils subissent mais aussi du contexte tissulaire dans lequel ils baignent. De nombreux facteurs peuvent induire la réaction astrocytaire : des cytokines et facteurs de croissance (IL6, IL1, TGF β , TNF, ...), le glutamate, l'hypoxie, ... (Sofroniew, 2009). Certains d'entre eux sont décrits dans le glioblastome. Ainsi, le glutamate modifie l'invasion (Lyons et al., 2007) ou la prolifération dans certaines lignées tumorales (Schunemann et al., 2010). Des travaux publiés par le laboratoire montrent que l'interleukine 6 (IL6) est un élément qui permet le développement tumoral (Saidi et al., 2009). Lors de ce projet nous nous sommes plus particulièrement intéressés au TGF β .

Dans les cas de gliomes, l'expression de **TGFβ** est corrélée à la malignité de ce cancer (Bruna et al., 2007; Kawataki et al., 2000). Ce facteur est impliqué à plusieurs niveaux dans le glioblastome. Outre son rôle dans la prolifération des cellules tumorales, il est aussi partie prenante dans les processus d'invasion et de métastase ou d'angiogenèse (Aigner and Bogdahn, 2008). Il est à noter que le TGFβ a un rôle complexe dans le gliome (et les cancers en général). En effet, s'il est décrit en tant que répresseur du développement tumoral dans les tissus sains et les gliomes de bas grade, il agit en tant qu'oncogène dans les stades plus avancés. Cette dualité est dépendante du contexte et du type tumoral (Massague, 2008).

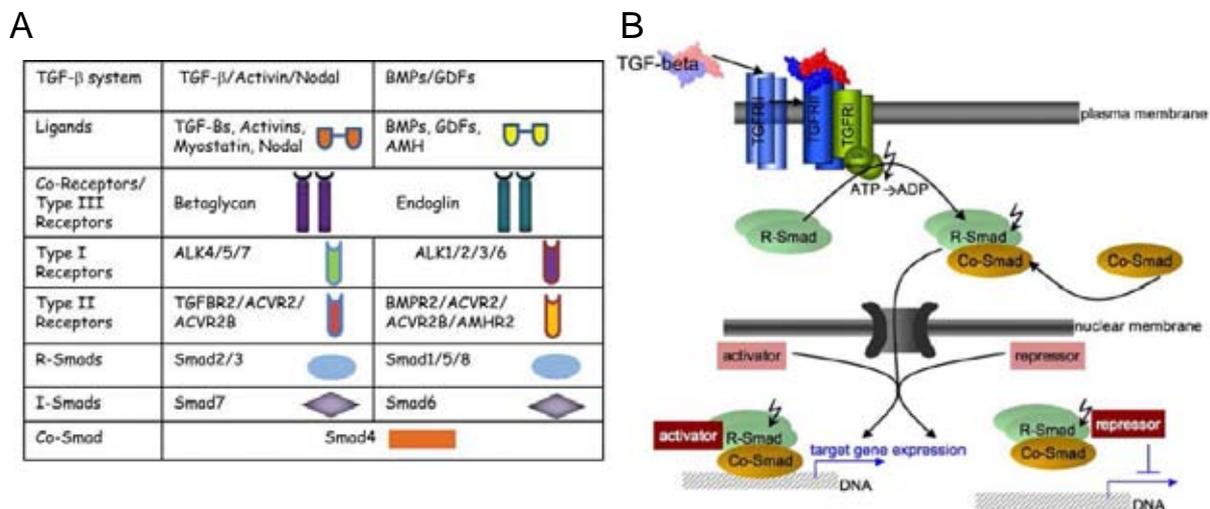


Fig. 47: Système du TGFβ: ligands, récepteurs et signalisation. Les ligands et récepteurs de la famille du TGFβ sont divisés en 2 branches (TGFβ et BMP) (A) (Santibanez et al., 2011). Suite à la fixation de dimères de ligands, les récepteurs de type II phosphorylent les récepteurs de type I ce qui induit la phosphorylation des Smads récepteurs (R-SMAD). Leur association avec SMAD4 permet leur translocation nucléaire où ils jouent un rôle de facteur de transcription (B) (Aigner et al., 2009).

A l'instar de la famille du VEGF présentée dans la première partie, la famille du TGFβ comporte plusieurs ligands et récepteurs que l'on peut séparer en 2 branches (Fig. 47A). La première regroupe les ligands TGFβ1/2/3, les activines, nodal et induit la phosphorylation de SMAD2 et 3 ce qui permet la translocation nucléaire de ces protéines qui vont alors agir comme facteur de transcription. La seconde branche de cette famille regroupe les ligands BMPs, les Growth Differentiation Factors (GDFs) et les hormones mülleriennes. Leur fixation sur leurs récepteurs induit alors la phosphorylation de SMAD1 et 5. Les ligands de la famille du TGFβ doivent être sous forme de dimères pour induire un signal. Plusieurs types de récepteurs (de types I et II) doivent aussi être associés pour la propagation du signal. La fixation des ligands sur un complexe de récepteurs permet la phosphorylation, par les

récepteurs de type II, des récepteurs de type I qui vont alors transmettre le signal (Fig. 47B) (Santibanez et al., 2011). La régulation de la signalisation par le TGF β peut évidemment se dérouler à l'intérieur de la cellule (comme cela a été résumé dans Xu et al., 2012), mais dépend aussi de l'activation de ce facteur. En effet, le TGF β est sécrété sous forme de proprotéine (peptide actif associé au Latency Associated Peptide) qui est séquestrée dans la matrice extracellulaire via la Latent TGF β Binding Protein (LTBP). Ainsi, tout comme pour le VEGF, la matrice extracellulaire permet de constituer une réserve de facteur mobilisable à tout moment (Annes et al., 2003 ; Hyytiainen et al., 2004 ; Oklu and Hesketh, 2000). Plusieurs mécanismes permettent l'activation du TGF β : des protéases qui vont cliver ses 'complexes d'attente' (MMPs, ...), l'acidification du milieu, la présence de dérivés réactifs de l'oxygène, ou la thrombospondine 1 (TSP1) (Annes et al., 2003 ; Hyytiainen et al., 2004 ; Schultz-Cherry and Murphy-Ullrich, 1993).

L'objectif du second article est de montrer que le tissu environnant des tumeurs de notre modèle est altéré aussi bien au niveau cellulaire (réaction astrocytaire) qu'au niveau matriciel. Nous avons focalisé notre attention sur le TGF β dont le rôle a été montré lors des modifications du stroma dans le cadre du cancer. Notre hypothèse de travail est que le TGF β est associé au shift de l'angiogenèse vers l'invasion que nous observons lorsqu'IRE1 est bloqué dans les U87. Pour cela, nous étudierons les altérations du tissu environnant (réaction astrocytaire, expression des composants de la matrice extracellulaire). Nous nous intéresserons aussi à l'activation et le rôle du TGF β lors du blocage d'IRE1 *in vitro* et *in vivo*.

ARTICLE 1

Inositol-requiring enzyme 1 α is a key regulator of angiogenesis and invasion in malignant glioma

Gregor Auf^{a,b,c,1}, Arnaud Jabouille^{a,b,1}, Sylvaine Guérit^{a,b}, Raphaël Pineau^b, Maylis Delugin^{a,b}, Marion Bouchecareilh^{a,b,d}, Noël Magnin^{a,b}, Alexandre Favereaux^{b,e}, Marlène Maitre^f, Timo Gaiser^g, Andreas von Deimling^{g,h}, Marcus Czabanka^c, Peter Vajkoczy^c, Eric Chevet^{b,d}, Andreas Bikfalvi^{a,b}, and Michel Moenner^{a,b,2}

^aInstitut National de la Santé et de la Recherche Médicale U920, F-33400 Talence, France; ^bUniversité de Bordeaux, F-33400 Talence, France; ^cDepartment of Neurosurgery, Charité-Universitätsmedizin, D-10117 Berlin, Germany; ^dAvenir, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U889, F-33076 Bordeaux, France; ^ePathophysiology of Spinal Networks Group, Neurocentre Magendie, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U862, F-33077 Bordeaux, France; ^fNeurocentre Magendie, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U862, F-33077 Bordeaux, France; ^gDepartment of Neuropathology, University of Heidelberg, D-69120 Heidelberg, Germany; and ^hClinical Cooperation Unit Neuropathology, Deutsches Krebsforschungszentrum, D-69120 Heidelberg, Germany

Edited by Napoleone Ferrara, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, and approved July 22, 2010 (received for review December 4, 2009)

Inositol-requiring enzyme 1 (IRE1) is a proximal endoplasmic reticulum (ER) stress sensor and a central mediator of the unfolded protein response. In a human glioma model, inhibition of IRE1 α correlated with down-regulation of prevalent proangiogenic factors such as VEGF-A, IL-1 β , IL-6, and IL-8. Significant up-regulation of antiangiogenic gene transcripts was also apparent. These transcripts encode SPARC, decorin, thrombospondin-1, and other matrix proteins functionally linked to mesenchymal differentiation and glioma invasiveness. In vivo, using both the chick chorio-allantoic membrane assay and a mouse orthotopic brain model, we observed in tumors under-expressing IRE1: (i) reduction of angiogenesis and blood perfusion, (ii) a decreased growth rate, and (iii) extensive invasiveness and blood vessel cooption. This phenotypic change was consistently associated with increased overall survival in glioma-implanted recipient mice. Ectopic expression of IL-6 in IRE1-deficient tumors restored angiogenesis and neutralized vessel cooption but did not reverse the mesenchymal/infiltrative cell phenotype. The ischemia-responsive IRE1 protein is thus identified as a key regulator of tumor neovascularization and invasiveness.

tumor ischemia | unfolded protein response | mesenchymal drift

Malignant gliomas are the most frequent primary brain tumors and represent a major challenge in cancer therapy. These deadly tumors exhibit the classic features of most solid cancers, including high proliferation rate, angiogenesis, and invasiveness (1). Gliomas are characterized by diffuse infiltrative growth in the surrounding brain parenchyma, which precludes complete surgical resection and is responsible for local recurrences. A frequent feature of higher grade gliomas is their presentation of highly and abnormally vascularized lesions, a phenomenon that contributes to clinical malignancy by increasing interstitial fluid pressure, promoting vascular thrombosis followed by necrosis and occasionally inducing intracranial hemorrhages (2–4).

As a consequence of these characteristics, gliomas are not easily accessible to current therapies. Antiangiogenic treatments, in combination with chemotherapy, have proven beneficial for patients suffering from high-grade tumors (5). However, angiogenesis inhibition may also have adverse effects by triggering invasive cell behavior (6, 7). Indeed, inhibition or invalidation of key factors for angiogenesis such as the transcription factor HIF-1 α (8, 9), VEGF-A and its receptor KDR (9–12), VE-cadherin (13) and MMPs (14) enhances tumor invasion and cooption of blood vessels. A transition from invasive/coopting tumors to highly angiogenic tumors, which is a hallmark of glioma progression to glioblastoma, has also been modeled in animals (15). However, the molecular mechanisms underlying these seemingly mutually exclusive behaviors have not been elucidated. Most of the above-mentioned factors are functionally linked to VEGF-A activity (3, 8), which provides a rationale for the molecular analysis of these phenotypic transitions. Expression signatures of invasive (15, 16) and angiogenic

(15, 17, 18) glioma cells and tissues also constitute critical frameworks for a comprehensive approach of these pathologic events. The existence of various invasion and migration mechanisms (19) and redundant signals controlling the angiogenic switch (7) plead for therapeutic targeting of molecular functions acting at key branch points of these processes.

Inositol-requiring enzyme 1 α (IRE1 α , also named ERN1) is an endoplasmic reticulum (ER)-resident transmembrane protein acting as a proximal sensor of the unfolded protein response (UPR). As such, it participates in the early cellular response to the accumulation of misfolded proteins in the ER occurring under both physiological and pathological situations (20, 21). Misfolded proteins in the ER lumen activate two distinct catalytic domains of IRE1, which display serine/threonine trans-autophosphorylation and endoribonuclease (RNase) activities, respectively. IRE1-associated RNase activity is involved in the degradation of a specific subset of mRNA (22) and also initiates the cytosolic splicing of the pre-XBP1 (X-box binding protein 1) mRNA whose mature transcript encodes a transcription factor that stimulates the expression of UPR-specific genes (20, 21). Recently, single mutations in IRE1 α /ERN1 gene were detected in human cancers, and IRE1 was proposed as a major contributor to tumor progression among protein kinases (23). Blockade of IRE1 transduction pathways in experimental tumor models suggests that its activity is linked to the neovascularization process (24).

We now provide evidence that inhibition of IRE1 signaling results in the reduction in the number of functional tumor blood vessels in glioma and in the increase of tumor cell invasion and vessel cooption. The general aspect of these lesions exhibited similarities with the sarcomatous component in gliosarcomas, a rare biphasic variant of glioblastomas. This phenotypic transition correlates with the coordinate modulation of a variety of pro- and anti-angiogenesis factors. Transgene expression of the cytokine IL-6 in IRE1-deficient tumors was sufficient to rescue angiogenesis and also abolished vessel cooption. We propose

Author contributions: G.A., A.J., S.G., and M. Moenner designed research; G.A., A.J., S.G., R.P., M.D., M.B., M. Maitre, T.G., and M. Moenner performed research; A.F., A.v.D., M.C., P.V., E.C., A.B., and M. Moenner contributed new reagents/analytic tools; G.A., A.J., S.G., N.M., T.G., A.v.D., M.C., P.V., A.B., and M. Moenner analyzed data; and A.B. and M. Moenner wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Freely available online through the PNAS open access option.

Data deposition: The data reported in this paper have been deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO) database, www.ncbi.nlm.nih.gov/geo (accession no. GSE22385).

¹G.A. and A.J. contributed equally to this work.

²To whom correspondence should be addressed. E-mail: m.moenner@angio.u-bordeaux1.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.0914072107/-DCSupplemental.

IRE1 as a candidate regulator of angiogenesis and invasion in malignant gliomas in relation to its property to sense ischemia.

Results

IRE1 Inhibition Induces Invasiveness and Prolongs Overall Survival of Glioma-Implanted Mice. Inhibition of IRE1 signaling was associated to the expression of an IRE1 dominant-negative transgene in U87dn cells and was not observed in U87ctrl cells (Fig. S1). Both cell types were engrafted intracranially in mice, and tumor growth was analyzed. Surgical specimens from the U87ctrl tumors were typically homogenous and nodular with a high cellularity, round hyperchromatic nuclei and a sharp demarcation from the surrounding brain parenchyma (Fig. 1A). No significant necrosis or apoptosis was detected. This phenotype is typical for U87 cell-derived tumors (see also Fig. 2). In contrast, U87dn tumors were diffuse, highly infiltrative and revealed a sarcomatous phenotype with densely packed long bundles of spindle cells. Cells had regular shapes, loose cellular extensions characteristics of astrocytes (Fig. 1A), and further exhibited elongated hyperchromatic nuclei with prominent nucleoli. Multifocal spreading of the tumor was

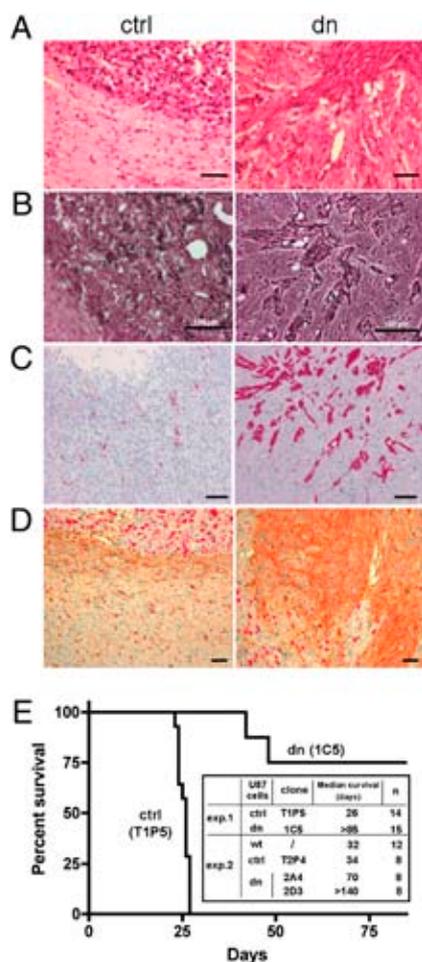


Fig. 1. Histopathology distinguishes two glioma phenotypes after xenotransplantation of U87ctrl and U87dn cells in the mouse brain. IHC labeling was developed on coronal sections at days 26–53 of tumor development. (A) H&E staining. (B) Reticulin fibers staining. (C) Labeling using anti-sm-actin antibodies. (D) Colabeling using anti-Ki-67 (pink color, nuclei) and anti-GFAP (orange color, cytoplasm) antibodies. (Scale bars: 100 μ m.) (E) Kaplan-Meier survival analysis after implantation of U87wt cells, U87ctrl cells (two clones), and U87dn cells (three clones). *n*, number of mice. Results in exp. 1 (curves and *Inset*) and 2 (*Inset* only) are representative of four independent experiments. 1C5 vs. T1P5, $P < 0.0001$; 2A4 or 2D3 vs. wt or T2P4, $P < 0.0001$; T2P4 vs. wt, $P < 0.135$.

evident with the presence of numerous distant satellites. A dense reticulin fiber network was also observed in U87dn tumors by using the Tibor Pap silver impregnation (Fig. 1B), with every cell encased by argyrophilic filament. On the contrary, U87ctrl tumors exhibited a sparse reticulin fiber grid. The mesenchymal marker actin- $\alpha 2$ (sm-actin, ACTA2) was detected in mural cells of vessels in both tumor types and was also highly expressed in U87dn cells themselves, but not in U87ctrl cells (Fig. 1C and Table S1). Finally, the neural stem cell marker nestin was expressed at a higher level in U87dn cells than in U87ctrl cells (Fig. S2A). The general aspect of U87dn tumors closely resemble the sarcomatous portion of gliosarcomas (Fig. S2B; ref. 1).

The proliferation index of tumor cells was determined by using the Ki-67 labeling (Fig. 1D). Growth fraction in U87ctrl tumors was $\approx 37\%$, whereas that of U87dn tumors was $\approx 23\%$, which is in agreement with the measured volumes of the tumors and the fact that U87dn cells grew more slowly than U87ctrl cells in vitro (24). Consistently, U87wt and U87ctrl tumors exhibited much higher amounts of the human housekeeping β_2 -microglobulin (B2M) protein, a marker of tumor load, than U87dn tumors (Fig. S3).

We next evaluated the overall survival of mice intracerebrally engrafted with U87wt, U87ctrl, and U87dn cells. Stable transgene expression was controlled at different time points during the experimentation. Tumors developed in 100% recipient mice, independent of which cell type was implanted. However, mice engrafted with U87wt and U87ctrl cells all died within 36 d, whereas those engrafted with the different U87dn clones exhibited a significant survival extension (Fig. 1E). Markedly, mice implanted with U87 cell clones expressing angiogenic properties and higher proliferation rates (ref. 24; proliferation index, PI; $PI_{T1P5/T2P4} > PI_{2A4} > PI_{1C5} > PI_{2D3}$) had a shorter survival. None of the U87dn tumor analyzed showed any signs of regression or apoptosis/necrosis.

Blockade of IRE1 Promotes Glioma Cell Invasion and Blood Vessel Cooption and Decreases Tumor Vascular Density and Vessel Perfusion.

Invasive U87dn tumors were further distinguished from massive U87wt and U87ctrl tumors by immunofluorescence analysis (Fig. 2). A high number of small satellite tumors were radially disposed around the U87dn primary mass (see arrowheads, Fig. 2Ab), indicating an extensive infiltration into the adjacent brain parenchyma. Migrating U87dn cells were tightly associated to pre-existing blood vessels in the normal tissue (Fig. 2Ad) and were detected on the abluminal site of blood vessels (Fig. 2Ae–g) as girdles of mono- or multilayered cells. In comparison, blood vessels located at the edge of U87ctrl tumors were not colonized by malignant cells (Fig. 2Ac). Thus, U87dn cells coopt and spread alongside preexisting blood vessels in healthy parenchyma. As a consequence, alteration of blood vessel morphology was apparent in regions of close contact with tumor cells (Fig. 2Ae, arrowheads) and the presence of capillary knots covered with U87dn cells nearby the invasive tip was also observed (arrows; see also ref. 25). Consistent with the cooption mechanism, a dense vascular network with numerous dilated and hyperplastic vessels was evident between tumor cell bundles. Sixty days after U87dn cell engrafting, the whole implanted hemispheres showed a widespread distribution of infiltrating tumor cells. The corpus callosum was invaded at a later stage (day ≈ 70), which again suggests that tumors cells preferentially migrate along blood vessels tracks.

The vascularization pattern of the two different tumor types was also strikingly distinct. As shown by CD31 labeling, high vascular density was apparent in U87ctrl tumors, and this vascularization pattern was associated with an intense angiogenesis process as demonstrated by the presence of endoglin, a marker of angiogenic tumor blood vessels (Fig. 2B). This contrasts with the nonangiogenic U87dn tumors in which large tumor areas of high cellular densities were almost completely avascular and devoided of endoglin labeling. In keeping with their invasive behavior in

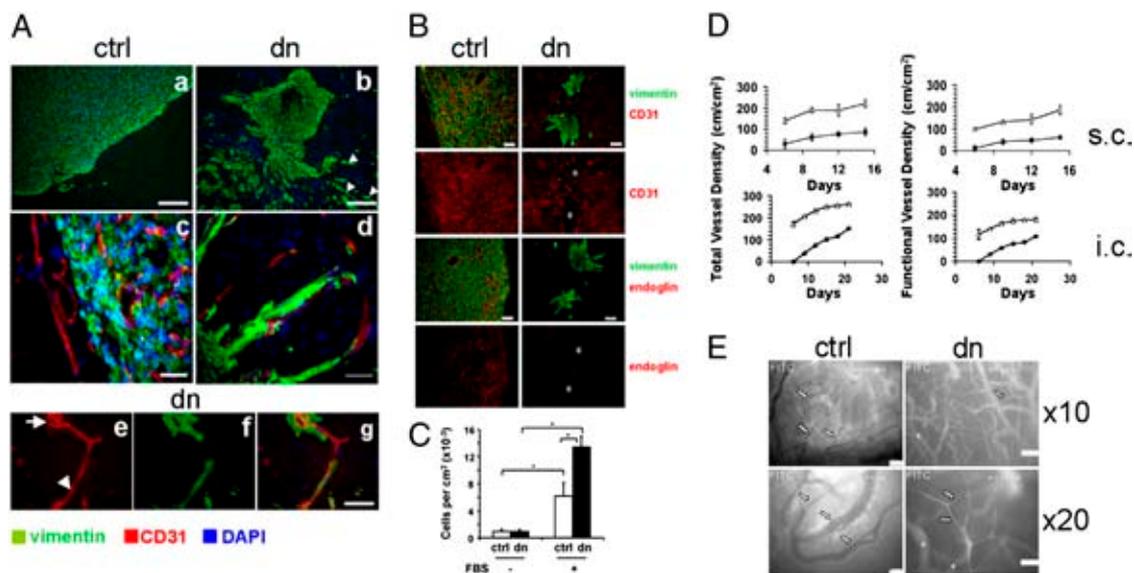


Fig. 2. Analysis of the vascular bed of IRE1-dn tumors using immunofluorescence and IVM. Tumors were allowed to develop for 28–45 d after intracerebral implantation. (A) U87dn cells coopt blood vessels. (a and b) Immunofluorescent labeling using anti-vimentin (tumor cells). (Scale bars: 200 μm .) (c and d) Edges of growing tumors, as depicted by detection of vimentin and of CD31 (endothelial cells). (Scale bars: 50 μm .) (e–g) Detail of U87dn cell invasion alongside blood vessels. (Scale bars: 50 μm .) (B) Labeling of the vascular bed in tumors using anti-CD31 and anti-endoglin (proliferating endothelial cells) antibodies. Asterisks focus on the avascular bulks of U87dn tumors. (Scale bars: 100 μm .) (C) Transwell plate migration assay. U87 cells were allowed to migrate for 3 h with or without 10% FBS. Results are means \pm SD from triplicate of three independent experiments ($*P < 0.01$). (D and E) IVM analyses. (D) Kinetic measurements of total and of functional vessel densities in U87ctrl- (Δ) and U87dn- (\bullet) derived tumors ($n = 4$ in each group) implanted s.c. or intracerebrally (i.c.) in nude mice. Values are means \pm SD (E) Images of i.c. tumor microcirculation. Tumor vascularization (arrows) is predominant in U87ctrl tumors and is reduced in U87dn tumors. Physiologic microvessels (low permeability, bright intravascular fluorescent signal) are readily visualized in U87dn tumors because of the significant reduction of tumor vessels. Physiological and organized angioarchitecture (arterioles, capillaries, and venules) and vessels of constant diameters (stars pointing at physiological cortical microvessels) are observed in dn tumors.

vivo, U87dn cells exhibited a higher ability to migrate in vitro in the presence of serum (Fig. 2C), a $\approx 50\%$ higher migration rate being measured with these cells relative to U87ctrl cells. Interestingly, plasmid-directed expression of IL-6 in tumors subjected to IRE1 blockade overrode vessel cooption and rescued angiogenesis (Fig. S4), again suggesting that these two mechanisms are antagonistic in the glioma model.

We next investigated the functionality of tumor vasculature by intravital microscopy (IVM). Cells were implanted in mice either subcutaneously or intracranially, and tumor growth was observed in the two experimental settings (Fig. 2D and E). In agreement with histological analyses, IVM revealed a significant reduction (40–95%) of the total vascular density in U87dn tumors compared with U87ctrl tumors (Fig. 2D Left). Moreover, the number of functional vessels was also much lower in IRE1dn tumors (Fig. 2D Right). Again, signs of pathological angiogenesis were observed in U87ctrl tumors (Fig. 2E), including a chaotic angio-architecture with vessels (white arrows) of heterogeneous diameters, an increase of microvascular permeability (microvessels appear in dark due to the extravasation of fluorescent dye into the tumor interstitium), and high microvascular densities. In contrast, U87dn tumor vessels could hardly be visualized because of the significant reduction of both total and functional vessels, which demonstrates a low blood perfusion in these tumors.

In Vitro Modulation of Factors Involved in Neovascularization and Invasion. Comparison of gene and protein expression analysis of U87ctrl and U87dn cells was first examined in culture conditions on the basis of a combination of transcriptomic data, quantitative PCR (qPCR), and ELISA (Table 1, Table S1, and Fig. S5). Inhibition of IRE1 coordinately regulated factors involved in tumor angiogenesis and invasion. U87dn cells exhibited a mesenchymal profile with a higher expression level of genes encoding matrix proteins (Table S1). Besides, proangiogenic cytokines such as IL-

1 β , IL-6, IL-8, and VEGF-A were down-regulated in U87dn cells compared with U87ctrl cells. As a modulator of astrocytoma cell migration, SPARC mRNA expression was ≈ 5 -fold higher in invasive U87dn cells than in noninvasive U87ctrl cells. Similarly, mRNA up-regulation of the connective tissue growth factor (CTGF), MMP-2, tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2, decorin, thrombospondin-1 (THBS1), and perlecan (HSPG2) was also observed in U87dn tumor cells. Comparable modulation of

Table 1. Angiogenesis-related gene and protein expression analyses in glioma cells as determined by qPCR and ELISA

Factor	Gene expression (dn vs. ctrl), fold change	Protein expression (fmol/10 ⁶ cell per day)	
		Dn	Ctrl
IL-1 β	0.040 \pm 0.006	0.6 \pm 0.2	10 \pm 1
IL-6	0.013 \pm 0.005	2.4 \pm 0.4	1120 \pm 160
IL-8	0.002 \pm 0.001	125 \pm 100	3500 \pm 500
VEGF-A	0.27 \pm 0.13	38 \pm 12	95 \pm 17
PLAU	0.20 \pm 0.04	/	/
MMP-2	2.35 \pm 0.24	/	/
CTGF	3.2 \pm 0.5	/	/
SPARC	4.87 \pm 1.16	/	/
TIMP-2	10.9 \pm 1.85	/	/
HSPG2	24.91 \pm 5.94	/	/
decorin	46.85 \pm 0.32	/	/
THBS-1	428 \pm 164	/	/

Comparative gene expression analysis of the proangiogenic (U87ctrl) and proinvasive (U87dn) cells was carried out under normoxia by using qPCR. Cytokine expression rate relative to cell number was determined from cell-conditioned media by ELISA. The regulatory effect of the blockade of IRE1 on cytokines was also apparent in cells grown under hypoxia (ref. 24; Fig. S5). Results are the mean of triplicate experiments \pm SD.

gene expression was obtained by using a second and independent approach by siRNA-mediated knockdown of IRE1 (Fig. S6).

Angiogenic to Invasive Phenotypic Shift in the Chicken Egg Model.

The distinct features of U87ctrl and U87dn tumors were analyzed by using the chicken egg assay (12, 26). Malignant cells were deposited on the surface of the chorio-allantoic membrane (CAM), and tumor progression was observed 4 d after implantation. Striking phenotypic differences were observed between the tumor variants (Fig. 3A), which were scored according to size, degree of invasiveness, and vascularization (Fig. 3B; see criteria in *SI Materials and Methods*). U87wt and U87ctrl tumors were classified as large- to medium-sized ($\geq 90\%$ of tumors), whereas U87dn tumors were small- to medium-sized (≈ 80 and $\approx 20\%$, respectively). In agreement with this observation, expression of the human B2M antigen was nearly 2-fold lower in U87dn tumors than in controls (Fig. S3B). Again, U87wt and U87ctrl tumors appeared well circumscribed, highly vascularized, and noninvasive (Fig. 3A and B), which was confirmed by immunolabeling (Fig. 3C). In contrast, U87dn tumors were devoid of blood vessels and predominantly exhibited a diffuse/invasive aspect with whitish strips arising from tumor masses and spreading along blood and lymphatic vessels inside the CAM (Fig. 3A and C). The overall structure of the chicken membrane appeared disorganized and exhibited abnormal large-sized hyperplastic vessels to which compact tumor nodules (arrows) were closely associated. Such an invasive pattern has been described in this assay by using U87 cells knocked down for VEGF-A and IL-6 (12). Remarkably, avascular U87dn tumors developed without signs of necrosis or apoptosis.

qPCR and ELISA analyses were carried out on tumor tissues at day 4 (Fig. 3D and E). VEGF-A and IL-6 were strongly down-regulated in U87dn tumors both at the mRNA and protein levels. Consistent with *in vitro* data, gene expression of CTGF, MMP-2, TIMP-2, HSPG2, decorin, and SPARC was up-regulated in avascular tumors, whereas that of MMP-1, MMP-9, and PLAU was down-modulated (Fig. 3D and Fig. S7). Similar results were obtained by using U87 cells transfected with IRE1 siRNA (Fig. S6).

Expression of Pro- and Antiangiogenic Factors in the Orthotopic Mouse Brain Model.

Gene expression was also analyzed in implanted mice brains by using laser capture microdissection (LCM) followed by

qPCR (Fig. 4A). CTGF, decorin, SPARC, and THBS-1 mRNAs were consistently up-regulated in U87dn tumors in comparison with U87ctrl tumors, whereas VEGF-A, IL-6, and IL-8 mRNA expression was significantly decreased. The observed variability of these transcripts in different samples may result of the micro-heterogeneity of the tissue zones from which tumor samples were dissected, under the dependence of the local availability of dioxygen and nutrients (27). These results are reinforced by the fact that detected amounts of the corresponding proteins were shifted accordingly (Fig. 4B and C). These data are consistent with those obtained both *in vitro* and in the CAM model.

Discussion

Angiogenesis and invasion are two manifestations of aggressive tumor behavior and depend in part on the adaptation of malignant cell to abnormal tumor microenvironments. Tumor biology is strongly influenced by ischemia, which stimulates specific molecular sensors and signal transduction machineries (28, 29). One such adaptive mechanism is the UPR, whose complex signaling network in eukaryotes regulates the flux of secretory proteins and contributes to the physiological cell response to stress (20, 21, 28). As a central component of the UPR, the IRE1/XBP1 axis is involved in cellular and tissue development and homeostasis (20, 21, 28, 30, 31). It also presents cytoprotective activities allowing adaptive responses of cancer cells to ischemic challenge and is a contributor to tumor resistance to chemotherapeutic drugs (32–34).

In the mouse brain model, blockade of IRE1 modified the mode of glioma expansion by markedly reducing angiogenesis and by promoting tumor cell invasion. Under such condition, glioma cells coopted the host vasculature and gradually infiltrated the brain along blood vessels tracks, disrupting normal tissue architecture and inducing a severe reactive gliosis (Fig. 1D).

A striking increase in survival was observed in animals implanted with invasive IRE1-dn glioma cells. The occurrence of tumor angiogenesis in malignant glioma that express functionally active IRE1 therefore shortened survival in mice, presumably by accelerating malignant growth and inducing a major mass effect. The slower progression of the dominant-negative tumors may also rely upon the intrinsic lower proliferation index of IRE1-dn cells (ref.

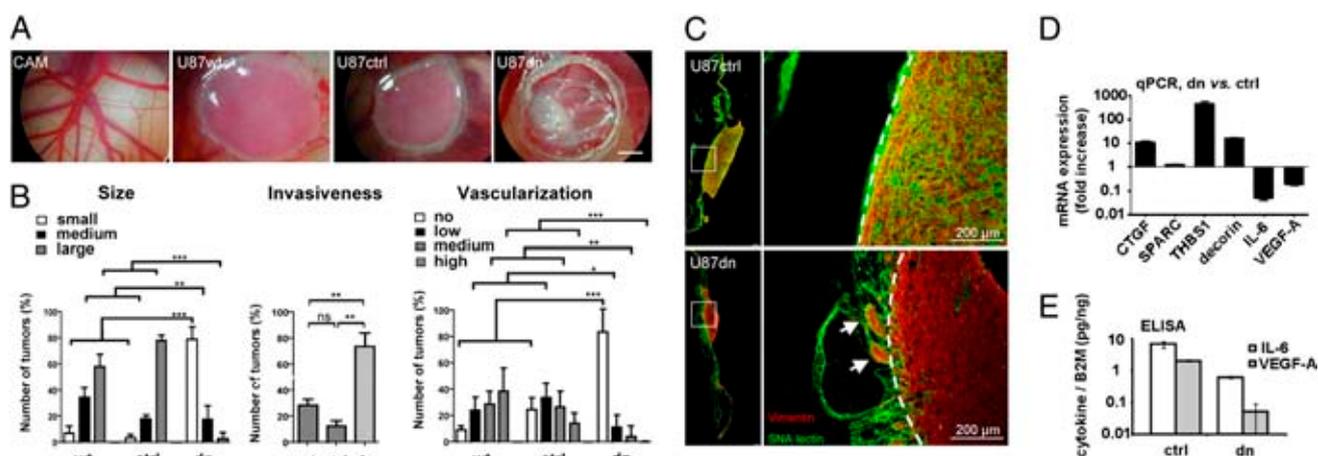


Fig. 3. Angiogenesis vs. invasive phenotypes of U87 cell-derived tumors in the chicken egg model. U87 cells were deposited onto the chicken CAM and tumors were allowed to grow for 4 d. (A) Representative views of the CAM and of U87wt-, U87ctrl-, and U87dn-derived tumors delimited by plastic rings. (Scale bar: 2 mm.) (B) Histogram repartition in percent of the different tumor phenotypes (U87wt, $n = 15$; U87ctrl, $n = 26$; U87dn, $n = 14$) according to criteria defined in *SI Materials and Methods*. *Left*, size of the tumors; *Center*, percentage of invasive tumors; *Right*, degree of tumor vascularization. Results are mean values \pm SD ($*P < 0.01$; $**P < 0.005$; $***P < 0.001$). ns, not significant. (C) Transverse section of U87ctrl and U87dn tumors at day 4. Blood vessels (SNA lectin) and glioma cells (vimentin) were shown. (*Left*) Vertical presentation of CAM and tumor masses. (*Right*) Higher magnifications of boxed area in *Left*. (D) Gene expression analysis. Results are means \pm SD of triplicate measures obtained from at least two independent analyzes ($n \geq 5$ eggs for each condition). (E) Protein expression analyses. Results are expressed as picograms of the cytokines relative to nanograms of human B2M. Data represent mean values \pm SD ($n \geq 5$ eggs for each condition).

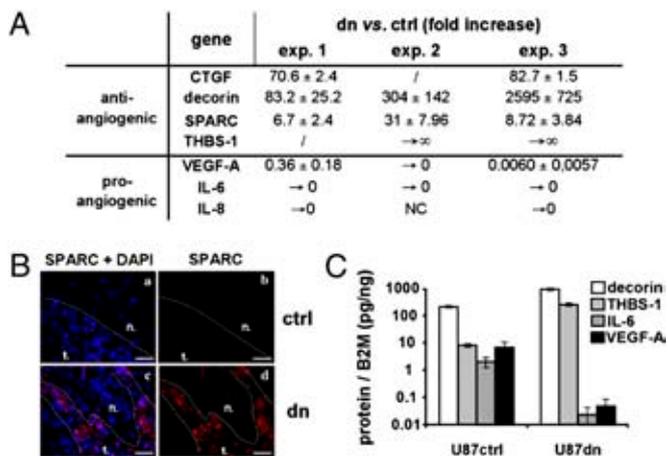


Fig. 4. Gene and protein expression analyses in U87 cell-derived tumors in mice brains. (A) LCM analysis. U87 cells were implanted intracerebrally in mice and brains were removed 4–8 wk after implantation. Comparative gene expression analyses are represented as fold increase and are means ± SD of triplicate experiments. Most values were obtained by using the SYBR Green dye detection procedure, the TaqMan approach being also used for IL-6, IL-8, and VEGF-A. exp., experiments; NC, no change; → 0, No Ct value obtained with U87dn tumors; → ∞, value > 3,000. (B) Immunolabeling of SPARC in U87ctrl- and U87dn- gliomas. DAPI-labeled nuclei are in blue. Dashed lines show borders between tumor (t.) and normal brain (n.) tissues. (Scale bars: 50 μm.) (C) Protein quantification by ELISA. Pooled brain extracts were analyzed (n = 5 for each condition), and results are reported in picograms of cytokines per nanogram of B2M. Data represents means ± SD. ELISA were performed twice with similar results.

24; this work) in relation to their elevated capacity to migrate, because these processes are reported to be antagonistic (35).

The massive/angiogenic and diffuse/avascular phenotypes were mutually exclusive. Such a highly reproducible and stable pattern evokes a compensatory mechanism, whereby invasion manifests in response to the stringent blockade of neovascularization. A similar behavior has been described after inhibition of prominent angiogenic actors (8–13), which also present a significant association with clinical outcome in gliomas. Consistently, impairing IRE1 activity either by using a dominant-negative strategy or by siRNA knockdown led both in vitro and in vivo to the integrated modulation of several pro- and antiangiogenic factors in favor of angiogenesis inhibition. In addition to VEGF-A down-regulation, a multifold decrease of the expression of the potent angiogenic factors IL-1β, IL-6, and IL-8 was observed, therefore reducing possible redundancies and angiogenic relapses after IRE1 blockade. These data suggest that IRE1-dependent signaling is a key regulatory pathway for angiogenesis and tumor progression.

A significant body of evidence also implicates CTGF, the multivalent ECM proteins SPARC, decorin, and THBS1, and the proteolytic enzymes and inhibitors PLAU, MMP-2, and TIMP-2 in invasion and angiogenesis (2, 14, 16, 18, 36). Again, up-regulation of these genes in IRE1-dn tumors was consistent with an enhanced migratory profile. Such a gene expression pattern, in association with the reported tumor phenotypes, is indicative of a mesenchymal drift, a process by which cells lose glial and gain mesenchymal features (37). Remarkably, invasion and cooption can be overridden in U87dn tumors by ectopic expression of IL-6 and induction of angiogenesis. In these conditions, tumor cells still exhibited a mesenchymal phenotype and infiltrative properties.

Several lines of evidence indicate that IRE1 signaling is partially active in cells under basal conditions. This observation agrees with the fact that IRE1 autophosphorylation on serine 724, which is an activation signal of the protein (38), represents in standard conditions ≈60% of the total signal obtained in response to the strong UPR-inducer tunicamycin (Fig. S1). The autophosphorylation

level relates to, but does not correlate with, the splicing of pre-XBP1 mRNA and up-regulation of MIST1 gene expression, which indicates a partial decoupling between IRE1 autophosphorylation event and XBP1 mRNA processing. As a single transmembrane receptor kinase, IRE1 should express a low activity in the absence of its ligands. However, inherent errors in protein biogenesis and folding occur permanently in cells. Indeed, immediate proteasome-dependent protein degradation may represent nearly 30% of the total protein production in normal tissues, and a higher degradation rate is even expected in tumor cells (39). Overexpression of secretory proteins and the increase of gene alteration and mRNA transcription infidelity, which represent common attributes of cancer cells, have predictable consequences on the quality of protein folding (28, 40). Each of these features may therefore contribute to activate at a basal level the IRE1 branch of the UPR by elevating the total fraction of proteins committed to degradation. The blockade of IRE1 activity should therefore impact on tumor cells located either in perfused or in ischemic regions. Noteworthy, IRE1 is activated under severe hypoxia (41) and expression of the cytokines IL-1β, IL-6, and IL-8 (Fig. S5), VEGF-A and CTGF as well as of the matrix proteins THBS1 and MMP-2 and -9 is appropriately modulated under low oxygen (29, 36, 42). Activity of IRE1 is therefore likely to be intensified in an ischemic tumor microenvironment.

Angiogenesis inhibition has emerged as a promising therapy for both newly diagnosed and recurrent tumors. However, antiangiogenesis treatments have limited efficacy in some tumors and may also lead to adverse effects by inducing a highly invasive and metastatic behavior. In line with these results, we observed that a widespread dissemination of glioma cells in brain tissues occurred in response to the suppression of the upstream UPR sensor IRE1 and concomitant inhibition of tumor neovascularization. Such a protumorigenic cell adaptation was also considered in preclinical and clinical studies linking inhibition of glioma angiogenesis to the increase of cancer cells invasion (5–7). Particular attention should also be paid to the potential protooncogenic effects of IRE1 mutations (23) and to the inhibition of IRE1-mediated apoptosis (28) in the development of anti-IRE1 strategies useful for the clinic. Selective pharmacological targeting of IRE1 kinase- or RNase-dependent signaling pathways, instead of the whole IRE1 protein itself, may therefore represent a more appropriate approach for therapy. Such a strategy may present an additional interest by weakening tumor cell responses to conventional chemotherapeutic treatments (32–34). A comprehensive analysis of IRE1-dependent signaling is required for the understanding of the relationship between angiogenesis and invasiveness to better circumvent tumor cell escape to angiogenesis inhibitors.

Materials and Methods

Reagents. Antibodies against the following antigens were used as follows: GFAP, Ki-67, and sm-actin were from DAKO; mouse CD31 and mouse endoglin (B&D Pharmingen); vimentin Ab-2 (Interchim); SPARC (US Biological); nestin (Millipore); phospho-(Ser724)-IRE1 (Abcam); and IRE1 and β-actin (Santa Cruz Biotechnology). Secondary antibodies labeled with FITC, AlexaFluor488, or AlexaFluor546 were from Invitrogen. SNA1-lectin coupled to FITC was from Vector Laboratories. Primers (Table S2) were from Sigma Aldrich.

Cell Culture Experiments. Wild-type U87-MG (U87wt) glioma cells (ATCC; HTB-14), empty plasmid U87 cells (U87ctrl; clones T1P5 and T2P4), U87 IRE1.NCK DN cells (U87dn; clones 1C5, 2A4, and 2D3), and iC6 clones were grown as described (24). Small interfering RNA knockdown experiments and cell migration assay are described in *SI Materials and Methods*.

CAM Assay. Three million U87 cells were deposited in 15 μL of DMEM onto the chicken CAM at day 10 of development (26). At day 4 after implantation, tumors were excised and pooled (n = 5 for each condition) before RNA and protein extraction. Tumor replicates (n ≥ 3) were also cut into 10-μm-thick cryosections before immuno-labeling. Classification of tumor phenotypes was established as reported in *SI Materials and Methods*.

Intracranial Implantations. Implantations of U87 cells were performed in 8–9 wk of age RAG2/ γ_c mice (24). Mice were killed according to defined ethical criteria and were perfused with 4% neutral buffered formalin before brains removal. Brains were kept overnight in sucrose 15% and embedded in tissue-tek O.C.T. for cryosection.

Histopathological and Immunohistochemical Analyses. IHC was performed either on paraffin-embedded sections or on cryosections as reported in *SI Materials and Methods*.

LCM Analyses. Frozen sections (30 μ m) of mouse brains were obtained and were mounted on PEN-membrane 1-mm glass slides. Tissue sections were fixed in ethanol, stained with H&E, dehydrated, and air-dried. LCM was performed by using a PALM MicroBeam microdissection system version 4.0–1206 equipped with a P.A.L.M. RoboSoftware (P.A.L.M. Microlaser Technologies). Four tumors were analyzed for each condition, and five caps were collected for each tumor type. RNA samples with an RNA integrity number greater than 8 were selected after Bioanalyzer validation.

IVM. Intravital-microscopic assessment of tumor microcirculation was performed in nude mice as described (43, 44). Details of the procedure are reported in *SI Materials and Methods*.

RNA and Protein Analyses. RT-PCR, PCR, ELISA, and immunoblotting procedures are described in *SI Materials and Methods*.

Gene Expression Profile. cRNAs from subconfluent U87ctrl and U87dn cells in culture were generated from 10 μ g of total RNA and hybridized to Human U133A 2.0 chips (Affymetrix) at the Affymetrix transcriptome platform (12). Each cell type was used in three separate experiments. Analysis of CEL files was performed by using the Limma package available through Bioconductor (45) with R statistical software and the OneChannelGUI graphical interface (Table S1). Probe set intensities were obtained by means of GCRMA and were selected by using a corrected *P* value threshold of 0.05 and fold change threshold of $|\log_2(\text{fc})| \geq 1$.

ACKNOWLEDGMENTS. We are grateful to D. Jaeger (Department of Neuro-pathology, University of Heidelberg) for assistance in IHC stainings; M. Hagedorn, S. Javerzat, and M. Franco for their contribution to the blind test in the CAM assay; G. Parmaksiz and S. Bayerl for assistance in performing IVM experiments; and N. Platonova and F. Delhaes for help with IL-6 expression analysis. This work was supported by Ministère de l'Éducation Nationale de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, and by grants from the Ligue Nationale Contre le Cancer, Comité de la Gironde (M. Moenner); Association pour la Recherche sur le Cancer Grants 3694 and 1097 (to A.B. and M. Moenner, respectively); Institut National du Cancer (Gliostress) (A.B.); and an IFR66 grant (to E.C. and M. Moenner). The LCM platform at Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U862 was financed by the Fondation pour la Recherche Médicale. G.A. is a postdoctoral fellow of Bonus Qualité Recherche, University Bordeaux 1, and was also supported by the European Consortium for Tumor Angiogenesis Research (Angiotargeting).

- Kleihues P, et al. (2007) Glioblastoma. *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*, eds Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK (Int'l Agency Res Cancer, Lyon, France), pp 33–49.
- Carmeliet P, Jain RK (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407: 249–257.
- Jain RK, et al. (2007) Angiogenesis in brain tumours. *Nat Rev Neurosci* 8:610–622.
- Lee G, Zacest AC, Reilly PL (2003) Recurrent haemorrhage from a malignant brain stem glioma: A review of the mechanisms of tumoural haemorrhage. *J Clin Neurosci* 10:632–634.
- de Groot JF, et al. (2010) Tumor invasion after treatment of glioblastoma with bevacizumab: Radiographic and pathologic correlation in humans and mice. *Neuro-oncol* 12:233–242.
- Lamszus K, Kunkel P, Westphal M (2003) Invasion as limitation to anti-angiogenic glioma therapy. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 88:169–177.
- Loges S, Mazzone M, Hohensinner P, Carmeliet P (2009) Silencing or fueling metastasis with VEGF inhibitors: Antiangiogenesis revisited. *Cancer Cell* 15:167–170.
- Blouw B, et al. (2003) The hypoxic response of tumors is dependent on their microenvironment. *Cancer Cell* 4:133–146.
- Du R, et al. (2008) HIF1 α induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer Cell* 13:206–220.
- Páez-Ribes M, et al. (2009) Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell* 15:220–231.
- Rubenstein JL, et al. (2000) Anti-VEGF antibody treatment of glioblastoma prolongs survival but results in increased vascular cooption. *Neoplasia* 2:306–314.
- Saidi A, et al. (2009) Combined targeting of interleukin-6 and vascular endothelial growth factor potently inhibits glioma growth and invasiveness. *Int J Cancer* 125: 1054–1064.
- Lamszus K, et al. (2005) Inhibition of glioblastoma angiogenesis and invasion by combined treatments directed against vascular endothelial growth factor receptor-2, epidermal growth factor receptor, and vascular endothelial-cadherin. *Clin Cancer Res* 11:4934–4940.
- Du R, et al. (2008) Matrix metalloproteinase-2 regulates vascular patterning and growth affecting tumor cell survival and invasion in GBM. *Neuro-oncol* 10:254–264.
- Sakariassen PO, et al. (2006) Angiogenesis-independent tumor growth mediated by stem-like cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:16466–16471.
- Demuth T, et al. (2008) Glioma cells on the run—the migratory transcriptome of 10 human glioma cell lines. *BMC Genomics* 9:54.
- Almog N, et al. (2009) Transcriptional switch of dormant tumors to fast-growing angiogenic phenotype. *Cancer Res* 69:836–844.
- Godard S, et al. (2003) Classification of human astrocytic gliomas on the basis of gene expression: A correlated group of genes with angiogenic activity emerges as a strong predictor of subtypes. *Cancer Res* 63:6613–6625.
- Friedl P, Wolf K (2003) Tumour-cell invasion and migration: Diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 3:362–374.
- Ron D, Walter P (2007) Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:519–529.
- Schröder M, Kaufman RJ (2005) ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res* 569:29–63.
- Hollien J, et al. (2009) Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. *J Cell Biol* 186:323–331.
- Greenman C, et al. (2007) Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* 446:153–158.
- Drogat B, et al. (2007) IRE1 signaling is essential for ischemia-induced vascular endothelial growth factor-A expression and contributes to angiogenesis and tumor growth in vivo. *Cancer Res* 67:6700–6707.
- Winkler F, et al. (2009) Imaging glioma cell invasion in vivo reveals mechanisms of dissemination and peritumoral angiogenesis. *Glia* 57:1306–1315.
- Hagedorn M, et al. (2005) Accessing key steps of human tumor progression in vivo by using an avian embryo model. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:1643–1648.
- Shweiki D, Neeman M, Itin A, Keshet E (1995) Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: Implications for tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:768–772.
- Ma Y, Hendershot LM (2004) The role of the unfolded protein response in tumour development: Friend or foe? *Nat Rev Cancer* 4:966–977.
- Pugh CW, Ratcliffe PJ (2003) Regulation of angiogenesis by hypoxia: Role of the HIF system. *Nat Med* 9:677–684.
- Acosta-Alvear D, et al. (2007) XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks. *Mol Cell* 27:53–66.
- Iwakoshi NN, Lee AH, Glimcher LH (2003) The X-box binding protein-1 transcription factor is required for plasma cell differentiation and the unfolded protein response. *Immunity* 19:29–38.
- Lee AH, Iwakoshi NN, Anderson KC, Glimcher LH (2003) Proteasome inhibitors disrupt the unfolded protein response in myeloma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:9946–9951.
- Nawrocki ST, et al. (2005) Bortezomib sensitizes pancreatic cancer cells to endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis. *Cancer Res* 65:11658–11666.
- Rahmani M, et al. (2007) The kinase inhibitor sorafenib induces cell death through a process involving induction of endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol* 27:5499–5513.
- Giese A, et al. (1996) Dichotomy of astrocytoma migration and proliferation. *Int J Cancer* 67:275–282.
- Bellail AC, Hunter SB, Brat DJ, Tan C, Van Meir EG (2004) Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion. *Int J Biochem Cell Biol* 36:1046–1069.
- Tso CL, et al. (2006) Primary glioblastomas express mesenchymal stem-like properties. *Mol Cancer Res* 4:607–619.
- Lipson KL, et al. (2006) Regulation of insulin biosynthesis in pancreatic beta cells by an endoplasmic reticulum-resident protein kinase IRE1. *Cell Metab* 4:245–254.
- Schubert U, et al. (2000) Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 404:770–774.
- Brulliard M, et al. (2007) Nonrandom variations in human cancer ESTs indicate that mRNA heterogeneity increases during carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 7522–7527.
- Koumenis C, Wouters BG (2006) “Translating” tumor hypoxia: Unfolded protein response (UPR)-dependent and UPR-independent pathways. *Mol Cancer Res* 4:423–436.
- Bennewith KL, et al. (2009) The role of tumor cell-derived connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in pancreatic tumor growth. *Cancer Res* 69:775–784.
- Czabanka M, Vinci M, Heppner F, Ullrich A, Vajkoczy P (2009) Effects of sunitinib on tumor hemodynamics and delivery of chemotherapy. *Int J Cancer* 124:1293–1300.
- Vajkoczy P, Schilling L, Ullrich A, Schmiedek P, Menger MD (1998) Characterization of angiogenesis and microcirculation of high-grade glioma: An intravital multicolor fluorescence microscopic approach in the athymic nude mouse. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:510–520.
- Gentleman RC, et al. (2004) Bioconductor: Open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 5:R80.

Supporting Information

Auf et al. 10.1073/pnas.0914072107

SI Materials and Methods

Histopathological and Immunohistochemical Analyses. Tissue samples of six mouse brains at different tumor stages were fixed for 16 h in 4% neutral buffered formalin and embedded in paraffin. Four-micrometer-thick coronal sections were immunostained on the Benchmark XT automated stainer (Ventana) by using primary antibodies directed against GFAP, Ki-67, sm-actin, vimentin, or nestin. Antigen–Ab complexes were detected with Enhanced V-Red Detection Kit (Ventana). For double immunohistochemistry, anti-GFAP and anti-nuclear Ki-67 antibodies were detected with I-view DAB kit (Ventana) and with Enhanced V-Red Detection Kit, respectively. The percentage of dividing cells was measured by detection of Ki-67/MIB-1 proliferation antigen. The Tibor Pap silver impregnation was used to reveal reticulin fiber networks. For immunofluorescence analysis, mice were perfused with 4% neutral buffered formalin. CAM tissues were excised and fixed for 5 min in the same buffer. Ten-micrometer sections were cut (LEICA CM1900) and incubated with FITC-SNA1 lectin, or with primary antibodies against vimentin, CD31, endoglin, or SPARC. Fluorescent secondary antibodies were used for labeling. DAPI (Invitrogen) was used to stain nuclei. Imaging was carried out by using a Nikon eclipse E600 microscope.

ELISA. Tumor tissues and cellular extracts were snap-frozen. Proteins were extracted at 4 °C in RIPA buffer with no SDS and containing Sigma protease inhibitors P8340. Protein content was determined by using the BCA protein assay kit (Pierce). The following ELISA kits were used for detection of human proteins: VEGF-A and IL-6 (Diacalone), human β_2 -microglobulin (B2M; Alpha Diagnostic), decorin, and THBS1 (R&D Systems). Values obtained for cytokines and matrix proteins were normalized to B2M because this marker was equally expressed in all U87 cell variants but was detected neither in mouse brain nor in the chicken chorio-allantoic membrane.

Immunoblot. Cells in 15-cm-diameter dishes were lysed at 4 °C with RIPA buffer containing 1 mM Na_3VO_4 , 5 mM NaF, and Sigma protease inhibitors (P8340). IRE1 was immunoprecipitated with anti-IRE1 antibodies bound to Protein A Sepharose beads and resolved by SDS/PAGE (6%). Proteins were then transferred to a nitrocellulose membrane (Amersham), probed with antibodies against IRE1, phospho-(Ser724)-IRE1, or β -actin, and revealed with a secondary antibody coupled to IRDye 800CW by using an Odyssey imager (LiCor).

RT-PCR and qPCR. RNA was extracted and purified by using TRIzol reagent (Invitrogen) or using the RNeasy Plus Micro kit (Qiagen) after microdissection. RNA was quantified by Nanodrop, and quality was assessed by using an Agilent Bioanalyzer. Semi-quantitative PCR and real-time PCR (qPCR) analyses were carried out as reported (1). qPCR were realized in triplicate or tetraplicate by using the SYBR Green dye (ABgene) methodology. RNA was reverse transcribed by using the QuantiTect Rev Transcription Kit (Qiagen). RNA of microdissected tissues was amplified by using the QuantiTect Whole Transcriptome Kit (Qiagen). Relative quantification was normalized to human β -actin and HPRT1 genes. TaqMan gene expression analyses (Applied Biosystems) were carried out in triplicate by following manufacturer's instructions.

Small Interfering RNA (siRNA) Knockdown Experiments. U87 cells were plated at a density of 10^5 cells per well in six-well plates. siRNA against human IRE1 α (5'-GCGUCUUUUACUACGUAUUCU-3') was from Eurofins MWG Operon, and nontargeting siRNA was from Dharmacon. Transfection was performed by using lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) with a final siRNA concentration of 100 nM for 48 h. siRNA-transfected cells were then implanted onto the chicken CAM.

Ectopic Expression of IL-6 in U87dn Cells. Full-length IL-6 human cDNA was amplified from universal human reference cDNA (Stratagene) and cloned in a pcDNA4/Myc-His vector (Invitrogen) by using the BamHI and XhoI restriction sites. For generation of cell lines expressing exogenous IL-6, the IL-6pcDNA4/Myc-His plasmid was stably transfected into U87dn cells by using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). After 2–3 wk of selection with 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Zeocin, single colonies were picked up and expanded. Expanded clones were screened for measure of the expression of IL-6 by using qPCR and ELISA. Four iC6ctrl (empty plasmid) clones and three iC6 (IL-6 expressing plasmid) clones were selected.

Cell Migration Assay. Cells in complete culture medium were seeded at 200,000 cells/cm² on 0.8- μm pore filters disposed in 24-well Transwell units and allowed to settle down for 15 h at 37 °C, 10% CO₂. They were then washed once with DMEM, 0.1% BSA (DMEM/BSA), and cells on the lower face of the porous membrane were removed with a sterile cotton swab. Cells were then induced to migrate in DMEM/BSA for 3 h by filling the lower compartment with the same medium with or without 10% FBS. Staining was performed in 40% acetic acid/30% methanol/0.1% Coomassie blue. Inserts were digitally photographed on the lower side (microscope Nikon Eclipse TE200) (magnification: 10 \times) and total cell numbers were determined by two independent investigators on at least three different fields of 1.3 mm² each by using the NIS-Elements AR 2.30 software. Experiments were realized in duplicate or triplicate. Statistical significance was evaluated by the Mann–Whitney test.

Intravital Fluorescence Video Microscopy. Tumor cells were implanted in two sets of independent experiments, either subcutaneously (s.c., $n = 4$ per group) using the dorsal skinfold chamber model or intracranially (i.c.; $n = 4$ per group) using the chronic cranial window preparation. Intravital fluorescence video microscopy was performed by epi-illumination techniques. Microvessels were visualized by blue-light epi-illumination after i.v. administration through the tail vein of 2% FITC-conjugated dextran (Mw 150,000; Sigma). Functional and total microvascular densities were then assessed (2, 3). For microcirculatory analysis, newly formed tumor microvasculature was divided into two radial (marginal and central) zones. Each zone was evaluated separately (two to four observation fields per zone), resulting in a total of six measurements per animal. Quantitative analysis in the tumor area included the total intratumoral vascular density, defined as the length of all newly formed microvessels, and functional intratumoral vascular density defined as the length of all newly formed red blood cell-perfused microvessels.

Evaluation of Tumor Phenotypes in the CAM Assay. Tumor implantations were realized with U87wt, U87ctrl, and U87dn cell variants, and tumors were allowed to develop for 4 d (biological replicates: U87wt, $n = 15$; U87ctrl, $n = 26$; U87dn, $n = 14$). Photographs of the whole tumors were taken at a 10-fold mag-

nification. Upper views of tumors were subjected to a blind test independently carried out by seven independent researchers experienced in analyzes of tumor-CAM hybrid tissues, of which four are coauthors and three are not. Tumors were classified from a set of 55 photographs according to their size, invasive/diffuse aspect and degree of vascularization (see following criteria). Two sets of experiments were conducted with similar results. Statistical analyses of tumor vascularization and tumor size were performed by using the Kruskal–Wallis test. The invasive aspect was analyzed by using the Mann–Whitney test.

Size of the tumor. Size of the tumor was given as an estimate of the ratio occupied by the tumor area relative to the total surface delineated by the plastic ring. Three groups were considered: small tumors, surface less than one third of the total surface; medium-sized tumors, surface between one third and three fourths of the total surface; and large tumors, surface above three fourths of the total surface.

Invasive/diffuse tumors. Tumors were considered as invasive/diffuse or not. U87-derived tumors all exhibited a solid mass core and may also present smaller satellites around a bigger mass core. A

well-delineated contour of tumor masses was usually apparent, and these tumors were classified as not invasive/diffuse. Tumors may also exhibit compact masses from which emerge whitish extensions whose lengths were equal or above half of the total diameter of the tumor core. Those tumors were herein considered as invasive/diffuse (for example, U87ctrl and U87wt tumors in Fig. 3A are not invasive/diffuse, whereas U87dn tumor is invasive/diffuse).

Tumor vascularization. Tumors were classified in four groups relative to their degree of vascularization:

1. Avascular tumors (no): No apparent blood vessels are at the tumor surface. The tumor is whitish.
2. Poorly vascularized (low): A few blood vessels are seen at the tumor surface. The tumor is mostly whitish.
3. Moderately vascularized (medium): Numerous blood vessels are seen at the tumor surface. The tumor is slightly pink.
4. Highly vascularized (high): The tumor surface is covered with blood vessels, and the tumor is pink.

1. Drogat B, et al. (2007) IRE1 signaling is essential for ischemia-induced vascular endothelial growth factor-A expression and contributes to angiogenesis and tumor growth in vivo. *Cancer Res* 67:6700–6707.
2. Czabanka M, Vinci M, Heppner F, Ullrich A, Vajkoczy P (2009) Effects of sunitinib on tumor hemodynamics and delivery of chemotherapy. *Int J Cancer* 124:1293–1300.
3. Vajkoczy P, Schilling L, Ullrich A, Schmiedek P, Menger MD (1998) Characterization of angiogenesis and microcirculation of high-grade glioma: An intravital multifluo-

rescence microscopic approach in the athymic nude mouse. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:510–520.

4. Lipson KL, et al. (2006) Regulation of insulin biosynthesis in pancreatic beta cells by an endoplasmic reticulum-resident protein kinase IRE1. *Cell Metab* 4:245–254.
5. Acosta-Alvear D, et al. (2007) XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks. *Mol Cell* 27:53–66.

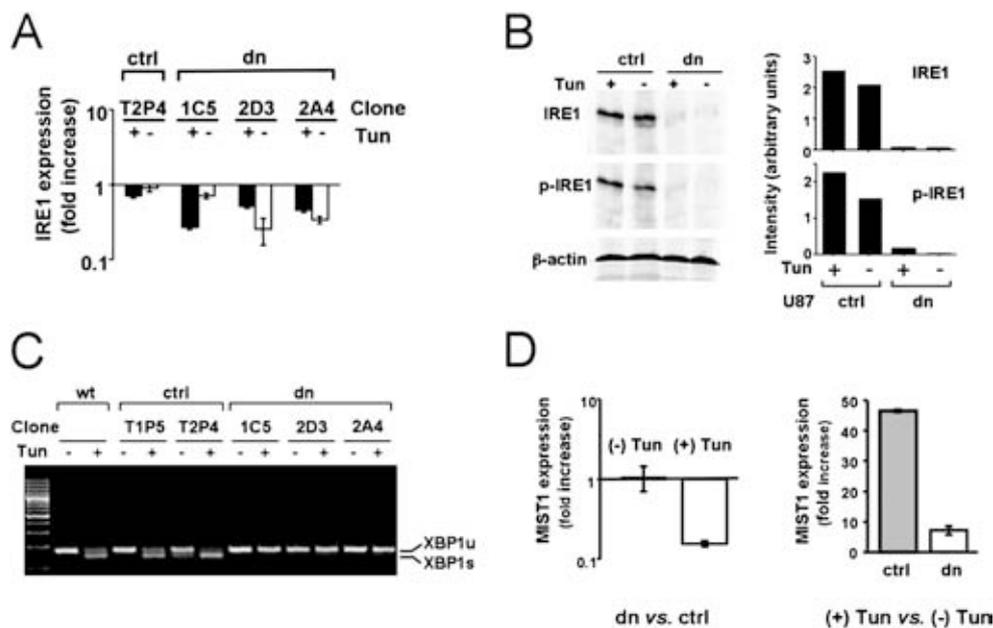


Fig. S1. Inhibition of IRE1 activity in U87dn glioma cells. Subconfluent U87 cells in culture were incubated for 2 or 16 h in complete DMEM medium in the presence or absence of 10 μ g/mL tunicamycin (Tun). (A) Expression of IRE1 mRNA in U87ctrl (T2P4) and U87dn (1C5, 2D3, 2A4) cell clones was determined relative to that of U87ctrl (T1P5) cells after 2 h of incubation by using qPCR. (B) IB analysis of total IRE1 (IRE1) and of phospho-Ser724-IRE1 (p-IRE1) in cells after 2 h of incubation revealed a \approx 110-kDa protein doublet corresponding to the full-length IRE1 protein (Left), upper and lower bands being assigned to p-IRE1 and IRE1, respectively. Histograms (Right) depict densitometric quantifications of IRE1 and p-IRE1 proteins relative to β -actin. Two independent experiments were performed with similar results. (C) XBP1 splicing was measured by RT-PCR in cells after a 2-h incubation in the presence or absence of tunicamycin. PCR products were separated by migration in a 2% agarose gel and were stained with ethidium bromide. XBP1u, unspliced form of the transcript; XBP1s, spliced form of the transcript. (D) qPCR analysis of the differential expression of MIST1 transcripts in U87ctrl and U87dn cells after a 16 h-incubation. qPCR results were expressed as the mean of triplicate experiments \pm SD. Comments: Comparative analyses of IRE1 expression and activity were performed in cells expressing either the IRE1 dominant-negative (U87dn) or the empty plasmid (U87ctrl). qPCR analysis showed that IRE1 mRNA was expressed in all cell variants, although at lower levels in U87dn cells (A). However, IRE1 protein expression was residual in U87dn cells compared with U87ctrl cells (B). In addition, the level of phosphorylation of IRE1 on serine 724, an indicator of its activation (4), was elevated in U87ctrl cells in basal conditions. Incubation with tunicamycin, a potent inducer of the UPR, resulted in a \approx 30% signal increase in these cells. In comparison, phosphorylation was almost undetectable in U87dn cells both in the presence or absence of tunicamycin, indicating that IRE1 was barely functional in the dominant-negative cells. Consistently, tunicamycin-induced endoribonuclease activity of IRE1 was readily detectable in U87ctrl cells but not in U87dn cells, which exhibited a \approx 90% decrease in the XBP1 spliced form (C). In keeping with this result, expression of MIST1, a gene under the transcriptional control of spliced XBP1 (5), was decreased by \approx 85% in U87dn cells under tunicamycin stimulation (D). Thus, inhibition of IRE1 protein expression correlated with the suppression of the IRE1 *trans*-autophosphorylation and of XBP1 mRNA splicing and with the down-regulation of the MIST1 transcript. Overall, these data confirm the extinction of functional IRE1 protein in U87dn cells.

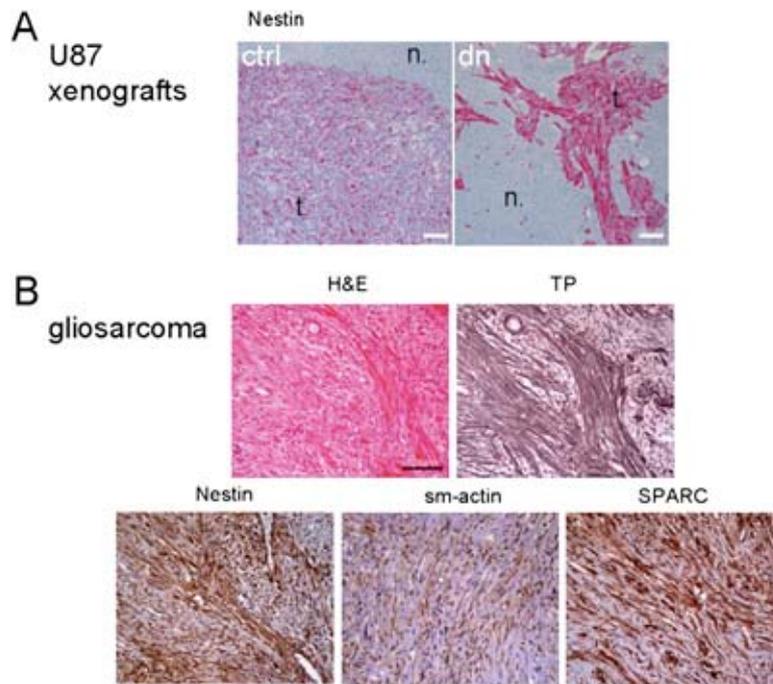


Fig. S2. Immunohistochemical labeling of U87-derived tumors cells and of human gliosarcomas. (A) U87ctrl and U87dn glioma cells were intracerebrally implanted in 8- to 10-wk-old mice, and tumors were analyzed after 4–8 wk of development as reported in Fig. 1. Coronal sections of U87ctrl and U87dn tumor implants were performed and immunostained with anti-nestin antibodies. t.; tumor; n.; normal tissue. (B) IHC labeling of human gliosarcomas. Nine gliosarcomas were analyzed: H&E, hematoxylin/eosin; TP, tibur pap impregnation, reticulin fibers staining; detection of nestin; smooth muscle actin; and SPARC. (Scale bars: 100 μ m.)

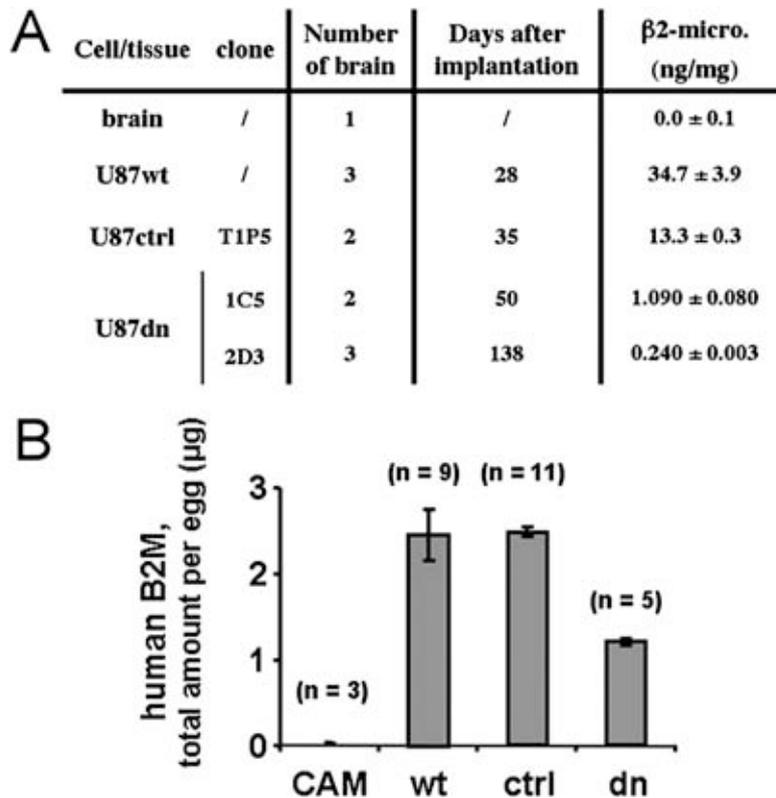


Fig. S3. Analysis of human glioma growth in mouse and chicken xenografts by measure of the human β 2-microglobulin (B2M). U87 tumor cell sublines were implanted intracranially in mice or deposited on the chicken chorio-allantoic membrane (CAM). Tumors were allowed to grow for 4 d in the CAM model or for the indicated times in the mouse brain model. Total brain and tumor/CAM tissues were then removed, pooled before extraction, and the total protein content was quantified by using Bradford protein assay kit and BSA as standard. Human B2M content was quantified by ELISA to compare the relative amounts of U87 cells in each tumor type (*SI Materials and Methods*). (A) Presence of B2M relative to total protein amounts in mice brains implanted with different glioma cell clones. (B) Expression of B2M in the CAM assay was given in micrograms per egg (mean value \pm SD).

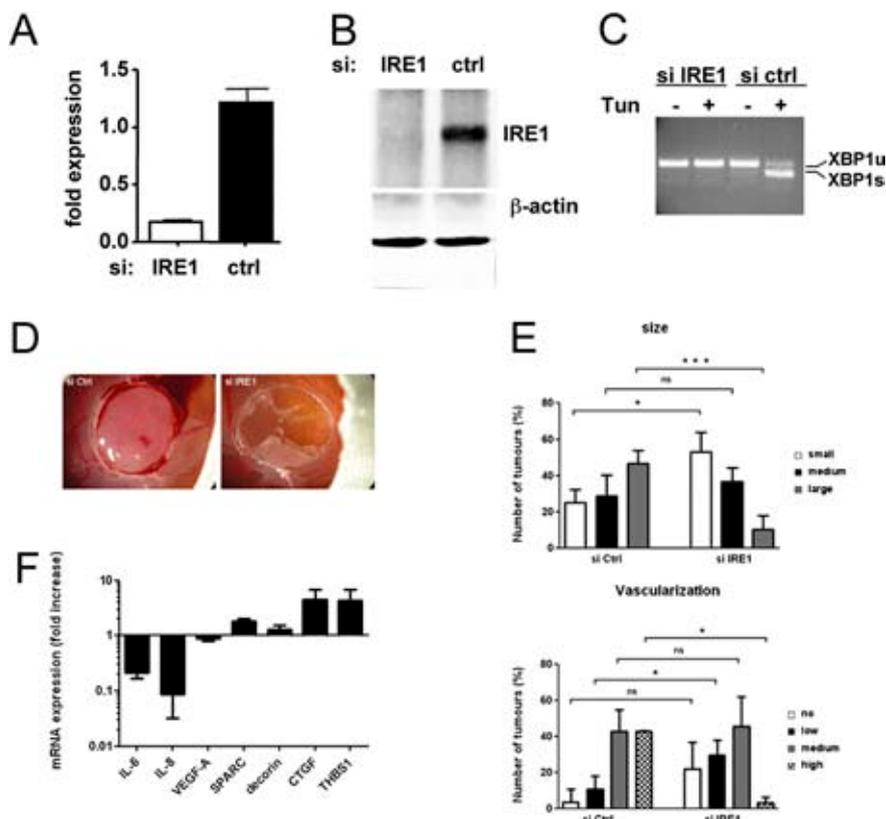


Fig. S6. Small interfering RNA knockdown experiments in vitro and in vivo. (A) Expression of IRE1 mRNA in IRE1 siRNA-transfected (si IRE1) and nontarget siRNA-transfected cells (si ctrl) was determined by qPCR and expressed relative to untransfected U87 cells using HPRT1 as the reference gene. (B) IB analysis of total IRE1 (IRE1) and of the β -actin reference protein. (C) XBP1 splicing in IRE1 siRNA-transfected cells and in nontarget siRNA-transfected cells. After transfection, U87 cells were incubated for 2 h with or without 10 μ g/mL tunicamycin (Tun), and presence of the unspliced (XBP1u) and spliced (XBP1s) forms of XBP1 was determined as in Fig. S1. (D) Representative views of U87.si Ctrl- and U87.si IRE1-derived tumors onto the chicken CAM. (E) Histogram repartition in percent of tumor phenotypes (U87.si Ctrl, $n = 8$; U87.si IRE1, $n = 17$). (Upper) Size of the tumors. (Lower) Degree of tumor vascularization (see criteria in *SI Materials and Methods*). Results are mean values \pm SD ($*P < 0.01$; $**P < 0.005$; $***P < 0.001$) ns, not significant. (F) Gene expression analysis by qPCR. Results are expressed in fold increase of IRE1 siRNA-transfected vs. nontarget siRNA-transfected U87-derived tumors using the HPRT1 reference gene. Values obtained by qPCR are the means \pm SD of triplicate measures.

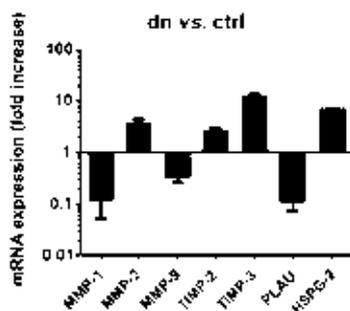


Fig. S7. Gene expression analysis of modulators of glioma angiogenesis and invasiveness in the CAM model. Gene expression analyses of metalloproteinases (MMP-1, MMP-2, and MMP-9), MMPs inhibitors (TIMP-2 and TIMP-3), urokinase plasminogen activator (PLAU), and of the matrix protein HSPG2 were performed. Results are presented relative to the expression of the housekeeping gene HPRT1 and are representative of triplicate measures obtained from at least two independent analyzes (mean value \pm SD, $n \geq 5$ eggs for each conditions).

Table S1. Gene expression profile of U87dn vs. U87ctrl cells in relation to the angiogenesis and invasive processes

No.	AffyID	Symbol	Fold change (log ₂)	P value	No.	AffyID	Symbol	Fold change (log ₂)	P value	No.	AffyID	Symbol	Fold change (log ₂)	P value
1	201110_s_at	THBS1	6.7	0.00744	73	202202_s_at	LAMA4	2.1	0.00990	146	209257_s_at	SMC3	1.0	0.02778
2	201893_x_at	DCN	6.3	0.00009	74	206713_at	NTNG1	2.1	0.00124	147	201559_s_at	CLIC4	1.0	0.01778
3	201109_s_at	THBS1	6.1	0.00067	75	215177_s_at	ITGA6	2.0	0.01334	148	177_at	PLD1	-1.0	0.03296
4	212488_at	COL5A1	6.0	0.00239	76	215016_x_at	DST	2.0	0.00502	149	204656_at	SHB	-1.0	0.04389
5	218995_s_at	EDN1	5.9	0.00009	77	202766_s_at	FBN1	2.0	0.00365	150	205841_at	JAK2	-1.1	0.02701
6	211896_s_at	DCN	5.9	0.00012	78	203628_at	IGF1R	2.0	0.00481	151	201473_at	JUNB	-1.1	0.03179
7	201744_s_at	LUM	5.8	0.01047	79	211926_s_at	MYH9	2.0	0.00113	152	213110_s_at	COL4A5	-1.1	0.01079
8	202274_at	ACTG2	5.7	0.00037	80	205117_at	FGF1	2.0	0.01849	153	212744_at	BS54	-1.1	0.01662
9	211813_x_at	DCN	5.5	0.00009	81	206429_at	F2RL1	2.0	0.04326	154	211000_s_at	IL6ST	-1.2	0.03085
10	212489_at	COL5A1	5.4	0.00102	82	206254_at	EGF	2.0	0.01243	155	205397_x_at	SMAD3	-1.2	0.03418
11	201108_s_at	THBS1	5.4	0.00038	83	212285_s_at	AGRN	1.9	0.00205	156	44783_s_at	HEY1	-1.2	0.04734
12	216379_x_at	CD24	5.2	0.01433	84	218915_at	NF2	1.9	0.01430	157	200733_s_at	PTP4A1	-1.3	0.01417
13	209771_x_at	CD24	5.2	0.02112	85	203767_s_at	STS	1.9	0.04742	158	212647_at	RRAS	-1.3	0.00865
14	202311_s_at	COL1A1	4.7	0.00189	86	204363_at	F3	1.9	0.01064	159	204731_at	TGFBR3	-1.4	0.03449
15	217430_x_at	COL1A1	4.6	0.00009	87	217419_x_at	AGRN	1.8	0.00394	160	204657_s_at	SHB	-1.4	0.00514
16	203325_s_at	COL5A1	4.6	0.00017	88	202800_at	SLC1A3	1.8	0.03982	161	205479_s_at	PLAU	-1.4	0.00464
17	214587_at	COL8A1	4.6	0.00066	89	207543_s_at	P4HA1	1.7	0.02752	162	209716_at	CSF1	-1.4	0.03470
18	211959_at	IGFBP5	4.3	0.00021	90	204136_at	COL7A1	1.7	0.00886	163	218766_s_at	WARS2	-1.5	0.00243
19	266_s_at	CD24	4.2	0.02656	91	203788_s_at	SEMA3C	1.7	0.00987	164	212226_s_at	PPAP2B	-1.5	0.04491
20	202310_s_at	COL1A1	4.2	0.00953	92	213506_at	F2RL1	1.7	0.04136	165	205842_s_at	JAK2	-1.5	0.04269
21	219747_at	C4orf31	4.1	0.00007	93	203769_s_at	STS	1.7	0.00894	166	204863_s_at	IL6ST	-1.5	0.01403
22	204933_s_at	TNFRSF11B	3.9	0.01039	94	208637_x_at	ACTN1	1.6	0.01002	167	202729_s_at	LTBP1	-1.6	0.01972
23	212099_at	RHOB	3.9	0.00008	95	213023_at	UTRN	1.6	0.01481	168	211668_s_at	PLAU	-1.6	0.00839
24	213075_at	OLFML2A	3.8	0.00591	96	215233_at	JMJD6	1.6	0.00441	169	204580_at	MMP12	-1.6	0.02813
25	201655_s_at	HSPG2	3.7	0.00145	97	212667_at	SPARC	1.6	0.01173	170	212230_at	PPAP2B	-1.6	0.00633
26	204932_at	TNFRSF11B	3.7	0.03879	98	202619_s_at	PLOD2	1.6	0.02324	171	218284_at	SMAD3	-1.6	0.00157
27	208651_x_at	CD24	3.6	0.01357	99	221558_s_at	LEF1	1.5	0.00883	172	215723_s_at	PLD1	-1.6	0.00347
28	204967_at	SHROOM2	3.6	0.02166	100	205807_s_at	TUFT1	1.5	0.04455	173	209355_s_at	PPAP2B	-1.6	0.01111
29	201860_s_at	PLAT	3.6	0.00102	101	201125_s_at	ITGB5	1.5	0.01404	174	203665_at	HMOX1	-1.7	0.00641
30	221729_at	COL5A2	3.5	0.00064	102	212240_s_at	PIK3R1	1.5	0.00743	175	209432_s_at	CREB3	-1.7	0.00495
31	221730_at	COL5A2	3.5	0.00100	103	202530_at	MAPK14	1.4	0.01041	176	205402_x_at	PRSS2	-1.8	0.01114
32	209185_s_at	IRS2	3.5	0.01732	104	209212_s_at	KLF5	1.4	0.01387	177	219257_s_at	SHPK1	-1.9	0.01720
33	202368_s_at	TRAM2	3.4	0.00117	105	201528_at	RPA1	1.4	0.02213	178	216331_at	ITGA7	-1.9	0.01500
34	217428_s_at	COL10A1	3.4	0.00047	106	201506_at	TGFBI	1.4	0.02630	179	202241_at	TRIB1	-1.9	0.01190
35	200974_at	ACTA2	3.4	0.00148	107	203184_at	FBN2	1.4	0.00607	180	201042_at	TGM2	-1.9	0.03662
36	215076_s_at	COL3A1	3.4	0.00039	108	200770_s_at	LAMC1	1.4	0.00130	181	219416_at	SCARA3	-1.9	0.00186
37	209121_x_at	NR2F2	3.3	0.00261	109	203440_at	CDH2	1.4	0.00658	182	205398_s_at	SMAD3	-1.9	0.00201
38	220407_s_at	TGFB2	3.2	0.00060	110	203558_at	CUL7	1.4	0.00602	183	202728_s_at	LTBP1	-2.0	0.01563
39	214701_s_at	FN1	3.2	0.03418	111	221031_s_at	APOLD1	1.4	0.00493	184	203603_s_at	ZEB2	-2.0	0.03040
40	204298_s_at	LOX	3.1	0.00009	112	208460_at	GJC1	1.3	0.02486	185	203603_s_at	ZEB2	-2.0	0.03040
41	202935_s_at	SOX9	3.1	0.00829	113	203768_s_at	STS	1.3	0.02045	186	200879_s_at	EPAS1	-2.0	0.01229
42	202765_s_at	FBN1	3.1	0.00261	114	217312_s_at	COL7A1	1.3	0.01846	187	205013_s_at	ADORA2A	-2.0	0.00101
43	202369_s_at	TRAM2	3.1	0.00347	115	211974_x_at	RBPJ	1.3	0.03418	188	204224_s_at	GCH1	-2.3	0.01037
44	202404_s_at	COL1A2	3.1	0.00111	116	205165_at	CELSR3	1.3	0.00552	189	38037_at	HBEGF	-2.4	0.04537
45	209909_s_at	TGFB2	3.0	0.00367	117	209834_at	CHST3	1.3	0.04666	190	221477_s_at	SOD2	-2.5	0.00263
46	205608_s_at	ANGPT1	3.0	0.04987	118	40020_at	CELSR3	1.3	0.00849	191	205659_at	HDAC9	-2.7	0.02871
47	215446_s_at	LOX	2.9	0.00017	119	216511_s_at	TCF7L2	1.3	0.02416	192	204627_s_at	ITGB3	-2.7	0.02868
48	205941_s_at	COL10A1	2.8	0.00047	120	201289_at	CYR61	1.3	0.02364	193	204501_at	NOV	-2.7	0.00059
49	203167_at	TIMP2	2.8	0.02316	121	200862_at	DHCR24	1.3	0.02768	194	214321_at	NOV	-2.8	0.00201
50	203083_at	THBS2	2.8	0.00603	122	202827_s_at	MMP14	1.3	0.01093	195	203477_at	COL15A1	-2.9	0.00195
51	201656_at	ITGA6	2.8	0.03867	123	209156_s_at	COL6A2	1.2	0.02067	196	209875_s_at	SPP1	-2.9	0.00097
52	209184_s_at	IRS2	2.7	0.00214	124	207334_s_at	TGFBR2	1.2	0.00998	197	203821_at	HBEGF	-3.0	0.01907
53	212253_x_at	DST	2.6	0.00302	125	211651_s_at	LAMB1	1.2	0.00411	198	216841_s_at	SOD2	-3.2	0.00094
54	205646_s_at	PAX6	2.6	0.00589	126	200771_at	LAMC1	1.2	0.00960	199	210998_s_at	HGF	-3.6	0.02333
55	209356_x_at	EFEMP2	2.6	0.01089	127	211160_x_at	ACTN1	1.2	0.01704	200	213992_at	COL4A6	-3.6	0.00516
56	202936_s_at	SOX9	2.5	0.00705	128	218469_at	GREM1	1.2	0.02602	201	219935_at	ADAMTSS5	-3.9	0.03016
57	206117_at	TPM1	2.5	0.03351	129	208636_at	ACTN1	1.2	0.01334	202	206243_at	TIMP4	-4.8	0.00012
58	209335_at	DCN	2.5	0.00069	130	203441_s_at	CDH2	1.2	0.04527	203	204475_at	MMP1	-4.9	0.00131
59	215073_s_at	NR2F2	2.5	0.00043	131	201438_at	COL6A3	1.2	0.03399	204	215223_s_at	SOD2	-5.2	0.00101
60	209772_s_at	CD24	2.5	0.00868	132	207012_at	MMP16	1.2	0.00521	205	210997_at	HGF	-5.4	0.00307
61	202756_s_at	GPC1	2.4	0.02433	133	212761_at	TCF7L2	1.2	0.00227	206	209278_s_at	TFPI2	-5.5	0.00013

Table S1. Cont.

No.	AffyID	Symbol	Fold change (log ₂)	P value	No.	AffyID	Symbol	Fold change (log ₂)	P value	No.	AffyID	Symbol	Fold change (log ₂)	P value
62	219250_s_at	FLRT3	2.3	0.00102	134	203989_x_at	F2R	1.2	0.03282	207	39402_at	IL1B	-5.6	0.03794
63	201852_x_at	COL3A1	2.3	0.00045	135	203685_at	BCL2	1.1	0.00990	208	213421_x_at	PRSS3	-6.2	0.00044
64	213260_at	FOXC1	2.3	0.00070	136	203570_at	LOXL1	1.1	0.02588	209	207850_at	CXCL3	-6.4	0.00130
65	209101_at	CTGF	2.3	0.00643	137	219778_at	ZFPM2	1.1	0.01821	210	207463_x_at	PRSS3	-6.4	0.00028
66	201124_at	ITGB5	2.3	0.01019	138	218468_s_at	GREM1	1.1	0.01509	211	205207_at	IL6	-6.5	0.00468
67	202363_at	SPOCK1	2.3	0.00411	139	38671_at	PLXND1	1.1	0.02939	212	205767_at	EREG	-6.8	0.00030
68	213022_s_at	UTRN	2.2	0.00616	140	204682_at	LTBP2	1.1	0.02166	213	207510_at	BDKRB1	-6.9	0.00006
69	212254_s_at	DST	2.2	0.00217	141	200665_s_at	SPARC	1.1	0.00834	214	209277_at	TFPI2	-6.9	0.00012
70	209119_x_at	NR2F2	2.2	0.02285	142	203940_s_at	VASH1	1.1	0.00464	215	205828_at	MMP3	-7.5	0.00012
71	212940_at	COL6A1	2.1	0.00097	143	212665_at	TIPARP	1.1	0.00578	216	211506_s_at	IL8	-7.7	0.00012
72	212091_s_at	COL6A1	2.1	0.00410	144	216035_x_at	TCF7L2	1.1	0.00684	217	202859_x_at	IL8	-8.4	0.00009
					145	203789_s_at	SEMA3C	1.0	0.00441					

Gene expression array of U87dn and U87ctrl cells grown in culture was realized by using Affymetrix gene chips. Functional annotation clustering was performed by using Netaffx Analysis Center (Affymetrix database) as well as the DAVID Bioinformatics Resources v6.7. Selected genes (153 genes, 217 set probes) were assembled in the following clusters: (i) blood vessel/vascular development, blood vessel morphogenesis, and angiogenesis; (ii) regulation of cell motion/migration/locomotion; and (iii) extracellular matrix components.

Table S2. Primers used in this study

Gene	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (3'→5')
<i>β-actin</i>	cgtaccactggcatcgtgat	tttctggacatgCGgttTgtg
<i>CTGF</i>	ggcaaaaagtgcacccgtact	gacacctcacaatgCGgtgCC
<i>decorin</i>	gggagcttcaactggacaacaac	caacctagttcaactgaagacggg
<i>HPRT1</i>	ccagacaagtTgtTgttagg	ctcaagttcaactcaaacct
<i>HSPG2</i>	tccccagtcaccatcagacc	gctgagcccacttatgcacac
<i>IL-6</i>	aggagacttgCctgTgTgaaa	tctacgttatTgtTgtgggac
<i>IL-8</i>	ctaagttctTtagcactcctTggca	gcCGgtogaacctcagta
<i>IL-1β</i>	cagctaCGaatctcCGaccac	cttctacgaccaagggacgg
<i>MIST1</i>	cggacaagaagctctccaag	tggtaggactggtacaggtc
<i>MMP-1</i>	cctcGctgggagcaaaaca	acacctggtacggttaactct
<i>MMP-2</i>	cCGtcgcccacatcaaa	ttctcaaccgtcacttatgga
<i>MMP-9</i>	cattcagggagacgcccc	cgttccccgagcaccaaa
<i>PLAU</i>	cttaactccaacacgcaagggg	ctaggggtcaaacCGgttCGa
<i>SPARC</i>	gagagCGcGctctGcctGccg	cggactactctGtctccaccac
<i>THBS-1</i>	TgctGatgacaagTccaag	ctGcctttctGgtGagacc
<i>TIMP-2</i>	caagaggatccagTatGagat	tatctcaaatagatGtgcccG
<i>TIMP-3</i>	ccccatGtgCagTacaTcca	cctacatGtgcccGgacacG
<i>VEGF-A</i>	cGaaacctgaactTtctGc	cctcacacagggTgactcc
<i>XBP1</i>	ggagTtaagacGcctTgg	agtggggaggtctTgtagag

ARTICLE 2 (en préparation).

Au moment de la rédaction de ce manuscrit nous ne disposons pas de la totalité des résultats pour écrire l'article sous sa forme définitive. Les résultats sont donc présentés en français et la discussion ne peut être approfondie plus loin que sur les données obtenues in vitro sur le lien entre TSP1 et TGFβ1 et 2 suite à l'inactivation de IRE1 dans les cellules U87.

Matériels et méthodes

Les conditions de culture, d'implantation orthotopique et de prélèvement pour les qPCR, Western Blot et dosages ELISA sont identiques à celles décrites dans le premier article (Auf et al., 2010).

Les amorces utilisées pour quantifier l'expression des ARNm par **qPCR** sont reportées dans le tableau III. Les kits utilisés et le protocole d'amplification sont identiques à ceux décrits dans l'article 1 (Auf et al., 2010). L'actine a été utilisée pour normaliser les résultats obtenus pour TSP1 et les TGFβ1/2/3.

Tableau III : amorces utilisées en qPCR pour quantifier l'expression des TGFβ1/2/3 et TSP1 dans les différentes conditions expérimentales. Les qPCR sont réalisées selon le protocole décrit dans l'article 1.

	sens	antisens
hbAct	CGTACCACTGGCATCGTGAT	GTGTTGGCGTACAGGTCTTT
hTSP1	TGC CTGATGACAAGTTCCAAG	CCAGAGTGGTCTTTCCGCTC
hTGFβ1	CCCTGGACACCAACTATTGC	GTCCTTGCGGAAGTCAATGT
	GTGGAAACCCACAACGAAAT	CGGAGCTCTGATGTGTTGAA
hTGFβ2	TAAGCTCAGGACCTGCTGT	ATGCGGCCTATTGCTTTAGA
	TTGACGTCTCAGCAATGGAG	TCGCCTTCTGCTCTTGTTTT
hTGFβ3	GGAAAACACCGAGTCGGAATAC	GCGGAAAACCTTGGAGGTAAT

Le **dosage** des formes active et globale du **TGB1** a été réalisé avec une technique de gène rapporteur dans le laboratoire de JJ. FEIGE (Vittet et al., 2012). Le dosage des formes active et globale du **TGFβ2** a été réalisé avec un kit ELISA (R&D System). Ces deux techniques reconnaissent exclusivement les formes actives des TGFβ1 et 2. Pour avoir la quantité globale de TGFβ1/2 sécrétés dans le milieu de culture, nous chauffons pendant 3min à 85°C une partie des surnageants ce qui nous permet d'activer tout le TGFβ et donc de doser la totalité de facteur sécrété (actif et inactif).

Pour évaluer la **translocation de SMAD2/3 phosphorylées** (activation autocrine de la signalisation par le TGFβ), nous avons mis en culture les cellules sur des lamelles. Une fois le

traitement appliqué, les cellules sont rincées avec du PBS froid puis fixées avec du paraformaldéhyde 4% pendant 10 min. Après rinçage au PBS, les cellules sont saturées 1h à température ambiante avec 5% de BSA, puis incubées pendant une nuit avec une solution d'anticorps primaire comprenant 0,1% de BSA (1/50 pour PhosphoSmad2-3, #9510 Cell Signaling). Ensuite, les lamelles sont rincées avec du PBS et incubées avec l'anticorps secondaire (chèvre anti lapin, 1/500 en BSA 0,1%) pendant 2h à température ambiante. Enfin, une coloration des noyaux au DAPI (1/2000) est réalisée et lamelles sont montées (Prolong Gold antifade reagent, Invitrogen). Les acquisitions ont été réalisées avec un microscope confocal (Nikon).

Pour les expériences de **siRNA**, les cellules U87DN ont étéensemencées à la densité de $3,5 \cdot 10^4$, $1 \cdot 10^5$ $8 \cdot 10^5$ cellules par puits en plaque vingt-quatre puits, en plaque six puits et dans des boîtes de 10 cm de diamètre, respectivement. Nous avons transfecté les cellules avec les siRNA dirigés contre TSP1 (ON-TARGET plus SMART pool, Human THBS1, L-019743-00-0005, Dharmacon) ou les sinégatif (ON-Target plus non-targeting pool, D-001810-10-05, Dharmacon) selon le protocole fourni par le fabricant, avec une concentration finale des siRNA de 10nM. Après transfection, les cellules ont été cultivées avec du milieu complet pendant 24 à 72h, puis 24h en milieu minimum + 0,1% BSA avant des récupérer les surnageants et les cellules pour les différents protocoles.

Pour l'**étude *in vivo***, des cellules U87DN ont été implantées dans des cerveaux de souris immunodéficientes RAG2/ γ c, gavées avec un inhibiteur d'un des récepteurs de type I du TGF β (ALK5) et les cerveaux ont ensuite été récupérés afin de procéder à l'analyse des tumeurs formées. Deux semaines après l'implantation, la moitié des souris a été gavée avec une solution contenant du GW788388 (4mg/kg, 3fois/semaine dissout dans du DMSO 4%, 96% [0,5% Hydroxypropylméthylcellulose, 5% Tween 20, 20% HCl 1M dans du tampon 0,1M NaH₂PO₄]) et l'autre moitié des souris a reçu la solution de dilution. L'implantation et le prélèvement des cerveaux se font selon le protocole décrit dans Auf et al., 2010.

Résultats.

Nous observons une diminution progressive et notable du **volume de l'hémisphère implanté** par rapport à l'hémisphère controlatéral sur les cerveaux ayant reçu les cellules U87DN (Fig. 48A). Ce résultat est surprenant car, les souris vivant apparemment normalement (pas de perte de poids importante, démarche normale), nous ne nous attendions pas à une telle réduction de l'hémisphère cérébral implanté. Cette régression suggère une mort cellulaire massive parmi les populations de cellules normales et/ou tumorales et nous avons donc réalisé des co-marquages des cellules tumorales (vimentine, vert) avec les cellules gliales (Glial Fibrillary Acidic protein, GFAP, rouge) (Fig. 48B).

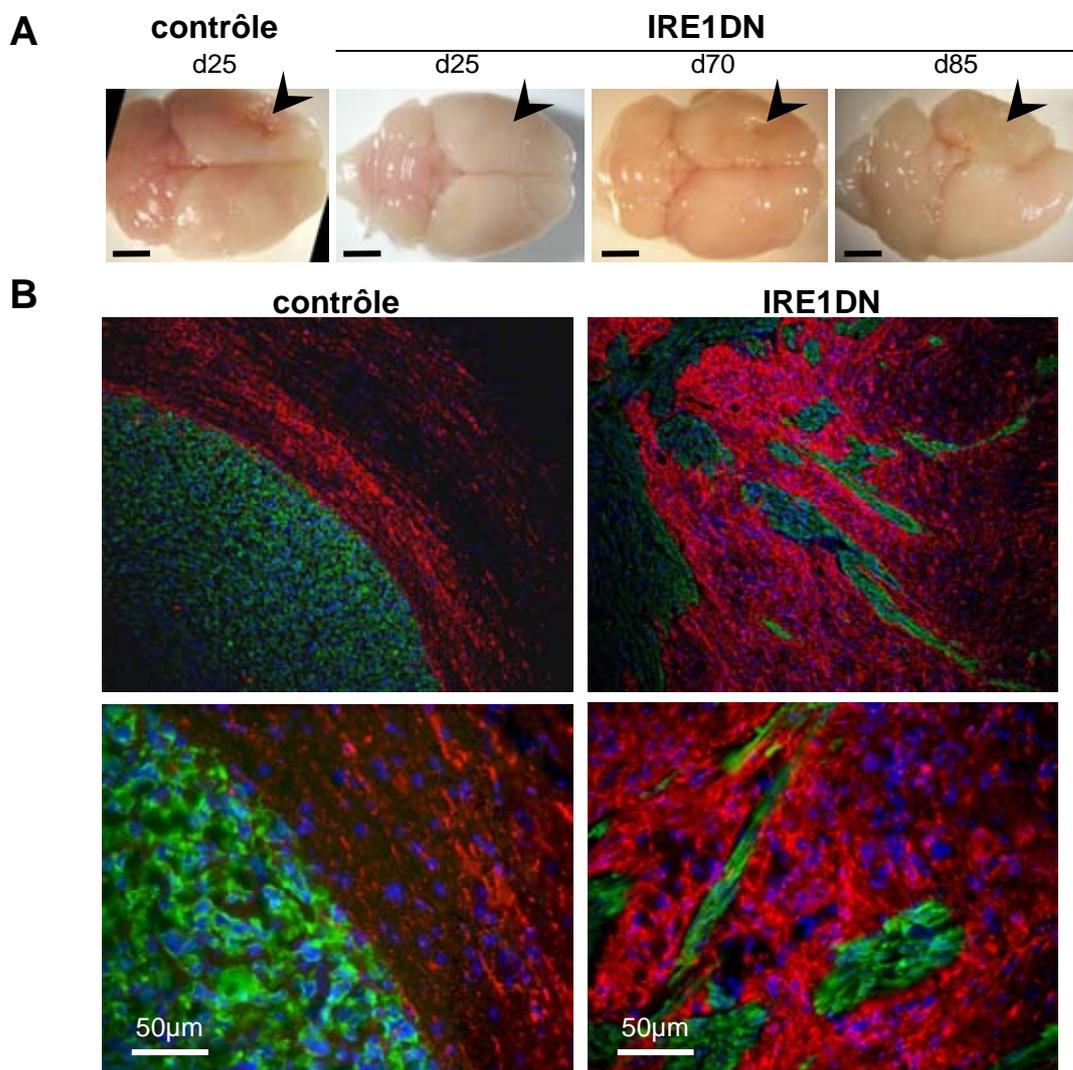


Fig. 48: Effet du blocage d'IRE1 sur le développement tumoral. Les cerveaux implantés avec les cellules U87DN présentent une régression progressive de l'hémisphère injecté. *Les flèches indiquent le point d'injection, échelle 2mm.* (A). L'analyse par immunohistomarquage montre que les tumeurs (vimentine, vert) sont entourées par des cellules gliales (GFAP, rouge). Le marquage très intense de la GFAP observé autour des tumeurs U87DN laisse supposer une réaction astrocytaire à proximité des cellules tumorales (B).

Comme cela a été décrit précédemment, les tumeurs formées à partir des cellules U87Ctrl sont massives avec des bords bien délimités alors que celles formées à partir des cellules U87DN sont étoilées et dispersées dans l'hémisphère implanté (Drogat et al., 2007 et Fig. 48B). Le **marquage de la GFAP** est plus intense autour des tumeurs dans les deux conditions (U87DN et U87Ctrl, Fig. 48B). Pour les tumeurs U87Ctrl, le nombre de cellules gliales marquées décroît avec l'éloignement de la tumeur avec un profil concentrique. Nous pouvons émettre l'hypothèse que, en se développant, la tumeur U87Ctrl pousse le tissu environnant ce qui peut provoquer les cercles observés. Pour les tumeurs dérivées des cellules U87DN, le marquage de la GFAP est dramatiquement augmenté en périphérie de la tumeur. Nous pouvons aussi supposer que la tumeur repousse le tissu. Cependant, du fait du marquage plus intense associé à une augmentation du nombre de noyaux (marquage DAPI), l'hypothèse d'une gliose peut être suggérée. Des marquages du Ki67 ne montrent pas de prolifération à proximité de la tumeur (figure 1D d'Auf et al., 2010). Nous pouvons donc supposer qu'il s'agit d'une réaction astrocytaire (recrutement d'astrocytes, augmentation expression GFAP) caractérisée par une hypertrophie cellulaire et une expression accrue de certains filaments intermédiaires du cytosquelette à l'image de la GFAP (Fig. 48B), la nestine ou la vimentine (Pekny et al., 2007; Sofroniew, 2009).

Nous avons aussi réalisé des marquages par immunohistochimie afin d'appréhender la présence de la **matrice extracellulaire** dans les 2 types de tumeurs. Alors qu'ils sont peu ou pas détectés dans les tumeurs U87Ctrl, le Biglycan (BGN), la Fibronectine (FNC), la Tenascin C (TenC) et la Thrombospondine 1 (TSP1) sont visibles dans les tumeurs U87DN avec des dépôts importants au niveau des fronts de migration (Fig. 49). Ces résultats, ajoutés à ceux publiés pour SPARC (figure 4B d'Auf et al., 2010), montrent une augmentation de la sécrétion des facteurs de la matrice extracellulaire suite à l'inhibition d'IRE1 dans la lignée U87.

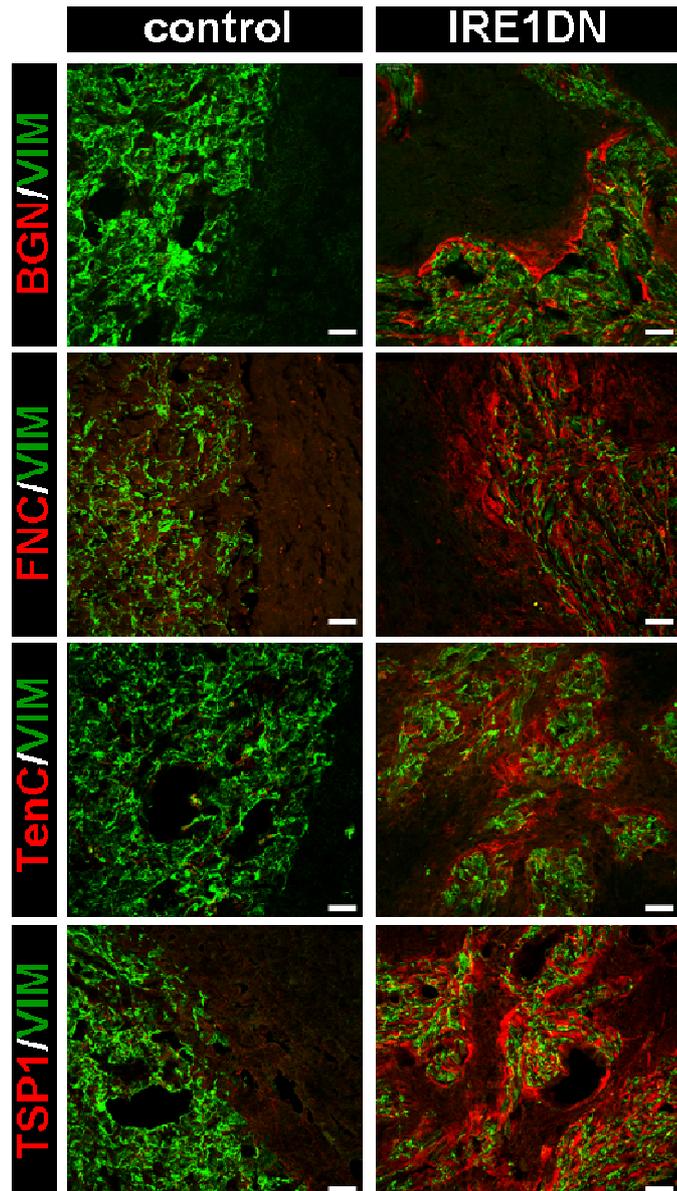


Fig. 49: Immunolocalisation de protéines matricielles dans les tumeurs U87Ctrl et U87DN. Le biglycan (BGN), la fibronectine C (FNC), la tenascine C (TenC) et la thrombospondine 1 (TSP1) sont très exprimés dans les tumeurs U87DN (vimentine VIM, vert) et au niveau de leur front de migration alors qu'ils sont presque indétectables dans les tumeurs U87Ctrl. *Echelle 20µm.*

Ces marquages par immunohistochimie montrent que nous avons une réaction astrocytaire prononcée et une synthèse accrue de composants de la matrice extracellulaire au niveau des tumeurs U87DN formées dans les cerveaux des souris. Ces deux phénomènes peuvent être consécutifs à l'augmentation de l'activation du TGFβ (Sofroniew and Vinters, 2010) et il a été montré que l'expression de ce facteur est corrélée à la malignité des gliomes (Bruna et al., 2007).

Nous avons donc étudié l'activation des TGFβ1 et 2 en fonction du blocage d'IRE1. Nous avons dosé les TGFβ1 et 2 actifs et totaux dans les surnageants de cellules U87Ctrl et U87DN. Pour le TGFβ1 nous observons une augmentation du rapport TGFβactif/global lié principalement à une augmentation du facteur actif dans le milieu de culture (Fig. 50A1). En effet, la quantité de TGFβ1 global ne varie pas dans les surnageants des 2 types cellulaires comparés. De plus, les données de microarrays ne montrent pas de variation du transcrit pour TGFβ1 (non montré). Nous avons bien une augmentation de l'activation basale de TGFβ1 due à l'expression du dominant négatif d'IRE1 dans les cellules U87.

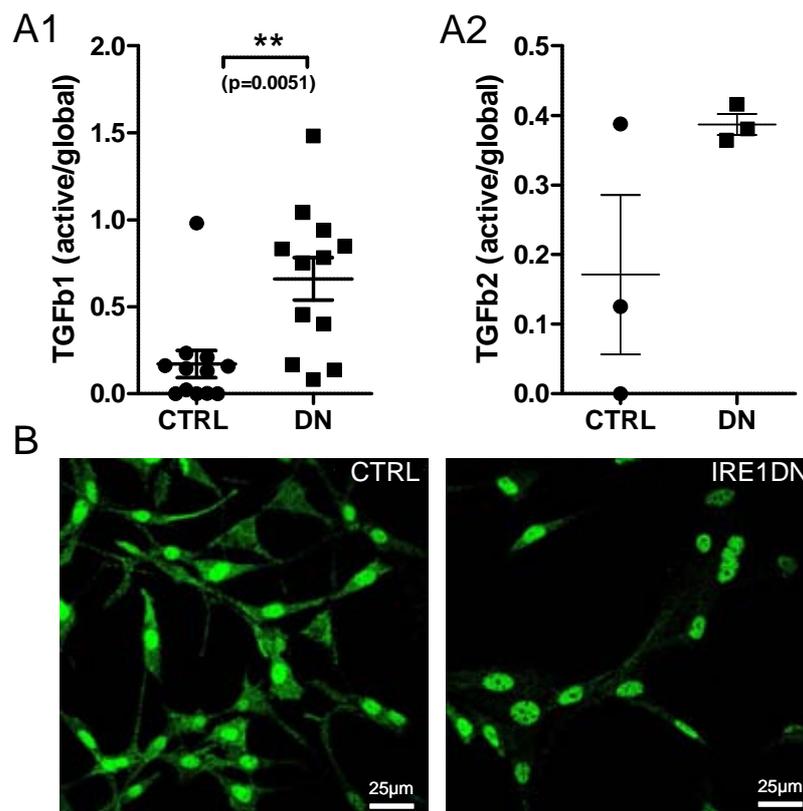


Fig. 50: Activation des TGFβ1 et 2 et effet autocrine sur les cellules U87 exprimant ou non un dominant négatif de la protéine IRE1. Le rapport entre les formes actives et globales du TGFβ1 est augmenté dans les surnageants des cellules U87DN par rapport aux cellules U87Ctrl (A1). Les premières données obtenues pour le TGFβ2 laissent supposer des résultats similaires mais, du fait de l'hétérogénéité des quelques échantillons U87Ctrl, la différence observée n'est pas significative (A2). Les TGFβ1 et 2 agissent de façon autocrine sur les cellules en culture comme le démontre la translocation nucléaire des protéines phosphorylées SMAD2 et 3 qui est plus prononcée pour les cellules U87DN (B).

Malgré la tendance observée, nous n'observons pas de différence significative dans l'activation du TGFβ2, probablement à cause de l'hétérogénéité des résultats des cellules U87Ctrl (échantillonnage faible) (Fig. 50A2).

La fixation des TGF β 1/2 sur leurs récepteurs induit la phosphorylation puis la translocation nucléaire de SMAD2 et SMAD3. Afin de tester les effets autocrines du TGF β sur les cellules U87, nous avons localisé les SMAD2/3 phosphorylées par immunocytochimie. Si pour les cellules U87Ctrl, les SMAD2/3 phosphorylées sont détectées à la fois dans le cytoplasme et le noyau, leur localisation est strictement nucléaire dans les cellules U87DN (Fig. 50B). Nous avons donc bien une activation autocrine plus importante des voies des TGF β 1 et 2 dans les cellules U87 dont l'activité d'IRE1 est bloquée par l'expression d'un dominant négatif de ce senseur de stress.

Nous avons démontré pour le TGF β 1 une augmentation du rapport TGF β 1 actif/global liée principalement à une augmentation du facteur actif dans le milieu de culture. Le TGF β peut être activé par de nombreux facteurs dont TSP1 (Schultz-Cherry and Murphy-Ullrich, 1993). De plus, il a été montré que l'expression du TGF β et de TSP1 est augmentée avec la malignité des gliomes (Kawataki et al., 2000). Or, nous avons montré une augmentation de TSP1 dans deux modèles *in vivo* (membrane chorioallantoïdienne de poulet et implantation orthotopique chez la souris, (Auf et al., 2010 et Fig 49). Nous avons donc cherché à établir un lien entre IRE1, TGF β et TSP1 dans notre modèle expérimental. Pour cela nous avons opté pour une stratégie par siRNA dirigés contre TSP1 dans les cellules U87DN. Les résultats présentés sont ceux obtenus pour des cellules cultivées 48h en milieu complet après contact avec les siRNA puis 24h en milieu minimum + BSA 0,1% soit 72h après transfection.

Nous obtenons une diminution moyenne de 70% des ARNm codant pour TSP1 lors du traitement par les siRNA (non montré). Nous n'observons pas de modification dans l'expression des ARNm de TGF β 1, 2 et 3 (qPCR, résultats regroupant 3 séries de PCR sur 3 échantillons de culture indépendants, Fig. 51A). Nous avons évalué l'activation du TGF β 2 sur une première série de prélèvements et nous observons une légère diminution du rapport TGF β 2 actif/global dans les cellules U87DN traitées par le siTSP1 comparé aux cellules U87DN traitées par le sinégatif (Fig. 51B). Ces résultats sont en cours de confirmation sur d'autres prélèvements. Nous pouvons dire que l'activation du TGF β 2 pour les cellules U87DN traitées par le siTSP1 est intermédiaire entre les cellules U87DN et les cellules U87Ctrl. A l'heure actuelle, les investigations sont en cours pour les dosages des formes actives et globales du TGF β 1 dans les surnageants des cellules traitées par siRNA.

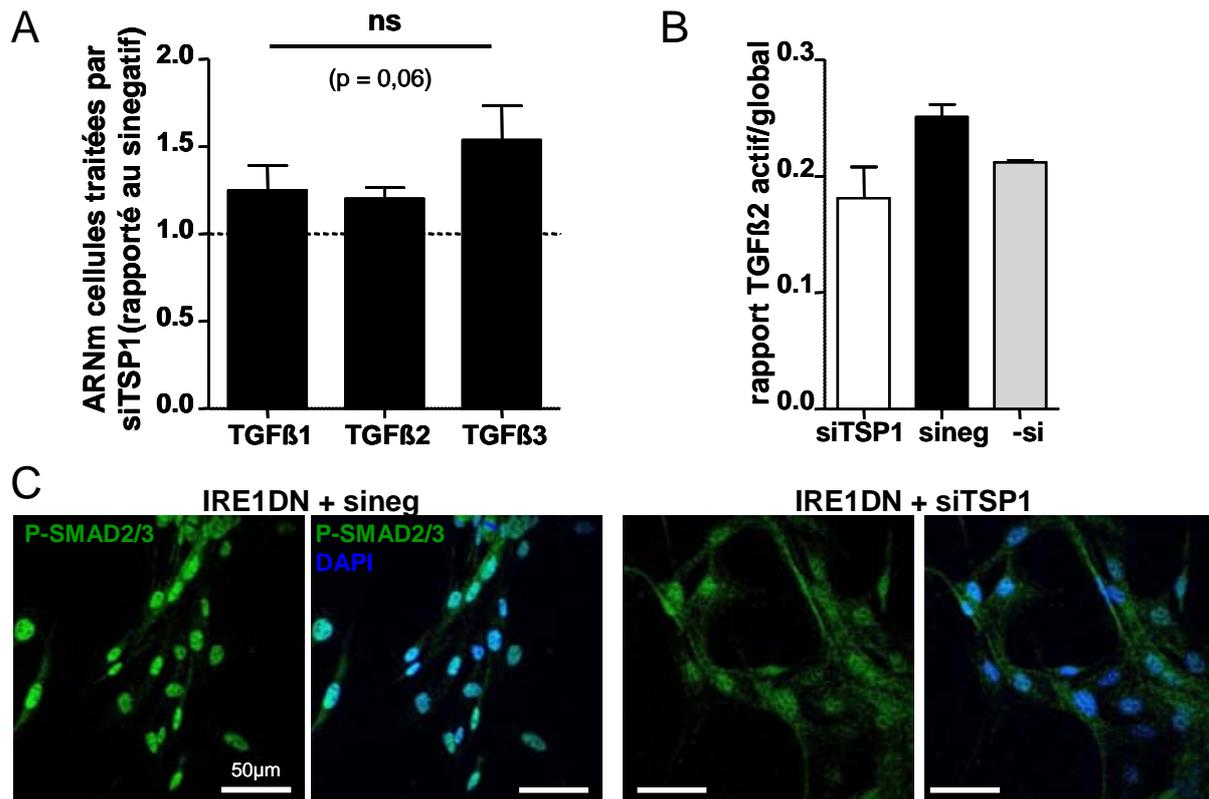


Fig. 51: Conséquences de l'inactivation de TSP1 par siRNA sur l'activation du TGFβ dans les cellules U87DN. L'inhibition de TSP1 par stratégie siRNA n'affecte pas l'expression de TGFβ1/2/3. Analyse sur 3 séries de PCR sur 3 échantillons indépendants (A). L'activation de TGFβ2 est diminuée lorsque les cellules U87DN sont traitées par le siTSP1 en comparaison des cellules traitées avec le sinégatif (sineg). Analyse sur 1 prélèvement de surnageants (B). La boucle d'activation autocrine par le TGFβ observée chez les U87DN est réduite pour les cellules U87DN traitées avec le siTSP1 (diminution de la translocation nucléaire de SMAD2/3 phosphorylés) (C). Les données sont obtenues sur des cellules cultivées 48h en milieu complet après contact avec les siRNA puis 24h en milieu minium.

Nous avons aussi détecté la localisation des SMAD2/3 phosphorylés par immunocytochimie. Les cellules U87DN traitées par le siTSP1 perdent la localisation strictement nucléaire observée chez les cellules U87Dn traitées par le sinégatif (Fig. 51C). Le marquage phospho-SMAD2/3 dans les cellules U87DN traitées par le siTSP1 est similaire à celui observé pour les cellules U87Ctrl (Fig. 50B). Nous avons déjà démontré au laboratoire que l'expression de TSP1 est augmentée dans les cellules U87DN. Ce résultat est obtenu alors que nous observons aussi une augmentation de l'activation des TGFβ1 et 2. Or, en bloquant l'expression de TSP1 par interférence ARN, nous diminuons l'activation de TGFβ2. Nous pouvons donc confirmer notre hypothèse d'un lien entre IRE1, TSP1 et TGFβ dans les cellules U87. Ainsi, l'inhibition d'IRE1 augmenterait l'expression de TSP1 qui à son tour augmente l'activation du TGFβ.

Nous savons que le blocage d'IRE1 diminue la formation des vaisseaux au sein des tumeurs de notre modèle. Ceci peut conférer un avantage thérapeutique puisque les tumeurs se développent plus lentement. Cependant, l'invasion du tissu cérébral est aussi exacerbée. Or, nous savons que le TGF β est impliqué dans l'invasivité tumorale et plus particulièrement dans les gliomes de haut grade. Nous pouvons donc espérer qu'en combinant l'inhibition d'IRE1 (diminution de la vascularisation) avec l'inhibition de la voie du TGF β (diminution de l'invasion) nous ayons un gain thérapeutique encore plus marqué et prometteur pour une application clinique.

Pour compléter ces études *in vitro*, nous avons donc implanté des cellules U87DN dans des cerveaux de souris immunodéficientes RAG2/ γ c. Nous allons gaver la moitié des souris avec un inhibiteur des récepteurs du TGF β : le GW788388 et l'autre moitié des souris recevra la solution de gavage seule. Cet inhibiteur cible ALK5 (type I) qui est un des récepteurs du TGF β (Gellibert et al., 2006). Son efficacité en administration par voie orale (mêlé à nourriture ou gavage) a été démontrée lors d'autres études (de Oliveira et al., 2012; Petersen et al., 2008). Nous étudierons le phénotype des tumeurs formées : vascularisation, forme, taille, réaction astrocytaire, expression des composants de la matrice extracellulaire... Par ce traitement, nous espérons réduire le phénotype invasif des tumeurs formées à partir des cellules U87DN.

De nombreuses récurrences sont constatées après exérèse de tumeurs chez les patients atteints de glioblastome. La diminution ou le blocage de l'invasion tumorale permettrait de ralentir la dissémination des cellules tumorales dans tout le tissu cérébral. Des traitements visant le tissu stromal sont actuellement en cours d'étude (Jones and Holland, 2012). Des études en phase II ou III ciblant le TGF β par diverses techniques (anticorps neutralisant, récepteurs solubles, molécules antisens, inhibiteurs chimiques, ...) sont actuellement en cours dans d'autres modèles de cancers et montrent un apport bénéfique en supplément des approches thérapeutiques classiques (Santibanez et al., 2011). Dans le cadre du glioblastome, une première étude pré-clinique a montré un effet bénéfique du ciblage du TGF β en association avec des approches thérapeutiques plus classiques (Zhang et al., 2011). Une étude en phase II montre aussi des résultats prometteurs en inhibant l'expression du TGF β par stratégie antisens (Bogdahn et al., 2011).

En conclusion, l'analyse du rôle d'IRE1 dans l'angiogenèse et le développement tumoral doit permettre de définir les meilleures stratégies thérapeutiques anti-cancéreuses par l'utilisation d'inhibiteurs chimiques. Dans le cas présent, ces perspectives sont le blocage d'une part des voies conduisant à l'angiogenèse mais aussi d'autre part de celles impliquées dans la survie les processus invasifs.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Acosta-Alvear, D., Zhou, Y., Blais, A., Tsikitis, M., Lents, N. H., Arias, C., Lennon, C. J., Kluger, Y., and Dynlacht, B. D. (2007). XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks. *Molecular cell* 27, 53-66.
- Aigner, L., and Bogdahn, U. (2008). TGF-beta in neural stem cells and in tumors of the central nervous system. *Cell and tissue research* 331, 225-241.
- Annes, J. P., Munger, J. S., and Rifkin, D. B. (2003). Making sense of latent TGFbeta activation. *Journal of cell science* 116, 217-224.
- Auf, G., Jabouille, A., Guerit, S., Pineau, R., Delugin, M., Bouche-careilh, M., Magnin, N., Favereaux, A., Maitre, M., Gaiser, T., *et al.* (2010). Inositol-requiring enzyme 1alpha is a key regulator of angiogenesis and invasion in malignant glioma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 15553-15558.
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L. M., Harding, H. P., and Ron, D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nature cell biology* 2, 326-332.
- Bogdahn, U., Hau, P., Stockhammer, G., Venkataramana, N. K., Mahapatra, A. K., Suri, A., Balasubramaniam, A., Nair, S., Oliushine, V., Parfenov, V., *et al.* (2011). Targeted therapy for high-grade glioma with the TGF-beta2 inhibitor trabedersen: results of a randomized and controlled phase IIb study. *Neuro-oncology* 13, 132-142.
- Bruna, A., Darken, R. S., Rojo, F., Ocana, A., Penuelas, S., Arias, A., Paris, R., Tortosa, A., Mora, J., Baselga, J., and Seoane, J. (2007). High TGFbeta-Smad activity confers poor prognosis in glioma patients and promotes cell proliferation depending on the methylation of the PDGF-B gene. *Cancer cell* 11, 147-160.
- Carmeliet, P., and Jain, R. K. (2011). Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nature reviews Drug discovery* 10, 417-427.
- de Oliveira, F. L., Araujo-Jorge, T. C., de Souza, E. M., de Oliveira, G. M., Degraeve, W. M., Feige, J. J., Bailly, S., and Waghbi, M. C. (2012). Oral administration of GW788388, an inhibitor of transforming growth factor beta signaling, prevents heart fibrosis in Chagas disease. *PLoS neglected tropical diseases* 6, e1696.
- Dejeans, N., Pluquet, O., Lhomond, S., Grise, F., Bouche-careilh, M., Juin, A., Meynard-Cadars, M., Bidaud-Meynard, A., Gentil, C., Moreau, V., *et al.* (2012). Autocrine control of glioma cells adhesion/migration through Inositol Requiring enzyme 1alpha (IRE1alpha)-mediated cleavage of Secreted Protein Acidic Rich in Cysteine (SPARC) mRNA. *Journal of cell science*.
- Drogat, B., Auguste, P., Nguyen, D. T., Bouche-careilh, M., Pineau, R., Nalbantoglu, J., Kaufman, R. J., Chevet, E., Bikfalvi, A., and Moenner, M. (2007). IRE1 signaling is essential for ischemia-induced vascular endothelial growth factor-A expression and contributes to angiogenesis and tumor growth in vivo. *Cancer research* 67, 6700-6707.
- Gellibert, F., de Gouville, A. C., Woolven, J., Mathews, N., Nguyen, V. L., Bertho-Ruault, C., Patikis, A., Grygielko, E. T., Laping, N. J., and Huet, S. (2006). Discovery of 4-{4-[3-(pyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl]pyridin-2-yl}-N-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)benzamide (GW788388): a potent, selective, and orally active transforming growth factor-beta type I receptor inhibitor. *Journal of medicinal chemistry* 49, 2210-2221.
- Ghosh, R., Lipson, K. L., Sargent, K. E., Mercurio, A. M., Hunt, J. S., Ron, D., and Urano, F. (2010). Transcriptional regulation of VEGF-A by the unfolded protein response pathway. *PLoS one* 5, e9575.

- Gorman, A. M., Healy, S. J., Jager, R., and Samali, A. (2012). Stress management at the ER: regulators of ER stress-induced apoptosis. *Pharmacology & therapeutics* *134*, 306-316.
- Hetz, C., Martinon, F., Rodriguez, D., and Glimcher, L. H. (2011). The unfolded protein response: integrating stress signals through the stress sensor IRE1alpha. *Physiological reviews* *91*, 1219-1243.
- Hollien, J., and Weissman, J. S. (2006). Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. *Science* *313*, 104-107.
- Hyytiainen, M., Penttinen, C., and Keski-Oja, J. (2004). Latent TGF-beta binding proteins: extracellular matrix association and roles in TGF-beta activation. *Crit Rev Clin Lab Sci* *41*, 233-264.
- Jones, T. S., and Holland, E. C. (2012). Standard of care therapy for malignant glioma and its effect on tumor and stromal cells. *Oncogene* *31*, 1995-2006.
- Kawataki, T., Naganuma, H., Sasaki, A., Yoshikawa, H., Tasaka, K., and Nukui, H. (2000). Correlation of thrombospondin-1 and transforming growth factor-beta expression with malignancy of glioma. *Neuropathology* *20*, 161-169.
- Kim, Y. H., Joo, H. S., and Kim, D. S. (2010). Nitric oxide induction of IRE1-alpha-dependent CREB phosphorylation in human glioma cells. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society* *23*, 112-120.
- Krex, D., Klink, B., Hartmann, C., von Deimling, A., Pietsch, T., Simon, M., Sabel, M., Steinbach, J. P., Heese, O., Reifenberger, G., *et al.* (2007). Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain : a journal of neurology* *130*, 2596-2606.
- Louis, D. N. (2006). Molecular pathology of malignant gliomas. *Annual review of pathology* *1*, 97-117.
- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvet, A., Scheithauer, B. W., and Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta neuropathologica* *114*, 97-109.
- Lu, D. Y., Chang, C. S., Yeh, W. L., Tang, C. H., Cheung, C. W., Leung, Y. M., Liu, J. F., and Wong, K. L. (2012). The novel phloroglucinol derivative BFP induces apoptosis of glioma cancer through reactive oxygen species and endoplasmic reticulum stress pathways. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* *19*, 1093-1100.
- Lyons, S. A., Chung, W. J., Weaver, A. K., Ogunrinu, T., and Sontheimer, H. (2007). Autocrine glutamate signaling promotes glioma cell invasion. *Cancer research* *67*, 9463-9471.
- Ma, Y., and Hendershot, L. M. (2004). The role of the unfolded protein response in tumour development: friend or foe? *Nature reviews Cancer* *4*, 966-977.
- Massague, J. (2008). TGFbeta in Cancer. *Cell* *134*, 215-230.
- Moenner, M., Pluquet, O., Bouche-careilh, M., and Chevet, E. (2007). Integrated endoplasmic reticulum stress responses in cancer. *Cancer research* *67*, 10631-10634.
- Oklu, R., and Hesketh, R. (2000). The latent transforming growth factor beta binding protein (LTBP) family. *Biochem J* *352 Pt 3*, 601-610.
- Pekny, M., Wilhelmsson, U., Bogestal, Y. R., and Pekna, M. (2007). The role of astrocytes and complement system in neural plasticity. *International review of neurobiology* *82*, 95-111.
- Pereira, E. R., Liao, N., Neale, G. A., and Hendershot, L. M. (2010). Transcriptional and post-transcriptional regulation of proangiogenic factors by the unfolded protein response. *PloS one* *5*.
- Petersen, M., Thorikay, M., Deckers, M., van Dinther, M., Grygielko, E. T., Gellibert, F., de Gouville, A. C., Huet, S., ten Dijke, P., and Laping, N. J. (2008). Oral administration of

- GW788388, an inhibitor of TGF-beta type I and II receptor kinases, decreases renal fibrosis. *Kidney international* 73, 705-715.
- Rivera-Zengotita, M., and Yachnis, A. T. (2012). Gliosis versus glioma?: don't grade until you know. *Advances in anatomic pathology* 19, 239-249.
- Romero-Ramirez, L., Cao, H., Regalado, M. P., Kambham, N., Siemann, D., Kim, J. J., Le, Q. T., and Koong, A. C. (2009). X box-binding protein 1 regulates angiogenesis in human pancreatic adenocarcinomas. *Translational oncology* 2, 31-38.
- Ron, D., and Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature reviews Molecular cell biology* 8, 519-529.
- Saidi, A., Hagedorn, M., Allain, N., Verpelli, C., Sala, C., Bello, L., Bikfalvi, A., and Javerzat, S. (2009). Combined targeting of interleukin-6 and vascular endothelial growth factor potently inhibits glioma growth and invasiveness. *International journal of cancer Journal international du cancer* 125, 1054-1064.
- Santibanez, J. F., Quintanilla, M., and Bernabeu, C. (2011). TGF-beta/TGF-beta receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)* 121, 233-251.
- Schultz-Cherry, S., and Murphy-Ullrich, J. E. (1993). Thrombospondin causes activation of latent transforming growth factor-beta secreted by endothelial cells by a novel mechanism. *The Journal of cell biology* 122, 923-932.
- Schunemann, D. P., Grivicich, I., Regner, A., Leal, L. F., de Araujo, D. R., Jotz, G. P., Fedrigo, C. A., Simon, D., and da Rocha, A. B. (2010). Glutamate promotes cell growth by EGFR signaling on U-87MG human glioblastoma cell line. *Pathology oncology research : POR* 16, 285-293.
- Sofroniew, M. V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in neurosciences* 32, 638-647.
- Sofroniew, M. V., and Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica* 119, 7-35.
- Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H. P., and Ron, D. (2000). Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 287, 664-666.
- Vittet, D., Merdzhanova, G., Prandini, M. H., Feige, J. J., and Bailly, S. (2012). TGFbeta1 inhibits lymphatic endothelial cell differentiation from mouse embryonic stem cells. *Journal of cellular physiology* 227, 3593-3602.
- Wang, Y., Alam, G. N., Ning, Y., Visioli, F., Dong, Z., Nor, J. E., and Polverini, P. J. (2012). The Unfolded Protein Response Induces the Angiogenic Switch in Human Tumor Cells through the PERK/ATF4 Pathway. *Cancer research* 72, 5396-5406.
- Xu, P., Liu, J., and Derynck, R. (2012). Post-translational regulation of TGF-beta receptor and Smad signaling. *FEBS letters* 586, 1871-1884.
- Yoshida, H., Oku, M., Suzuki, M., and Mori, K. (2006). pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response. *The Journal of cell biology* 172, 565-575.
- Zhang, M., Herion, T. W., Timke, C., Han, N., Hauser, K., Weber, K. J., Peschke, P., Wirkner, U., Lahn, M., and Huber, P. E. (2011). Trimodal glioblastoma treatment consisting of concurrent radiotherapy, temozolomide, and the novel TGF-beta receptor I kinase inhibitor LY2109761. *Neoplasia (New York, NY)* 13, 537-549.

Les réseaux vasculaires et nerveux présentent des similitudes frappantes (points de branchements, superposition, voies afférentes/efférentes, ...) et tous deux interagissent lors du développement ou dans le cadre de pathologies.

Dans un premier projet, nous avons voulu déterminer si un facteur pro-angiogénique, c'est-à-dire induisant la formation de nouveaux vaisseaux, peut avoir un effet direct sur le réseau neuronal. Des études menées *in vitro* ou *in vivo* chez l'adulte, ont montré une implication directe du Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) sur le système nerveux (survie, prolifération neuronale, croissance axonale, ...). Nous avons cherché à savoir si ce facteur a un effet sur le développement ou l'activité des réseaux neuronaux lors de la vie embryonnaire alors que les systèmes vasculaires et nerveux se mettent progressivement en place. Avec une approche électrophysiologique, nous avons focalisé notre attention sur les motoneurons de la moelle épinière de souris entre les stades E13,5 et P0. Nos résultats montrent que le VEGF augmente de façon significative la fréquence des activités synaptiques liées à la libération de GABA et de Glycine pendant une fenêtre temporelle correspondant à la mise en place de ces mêmes activités (E13,5 et E15,5). Cet effet modulateur met en évidence un nouveau rôle du VEGF dans la maturation fonctionnelle des réseaux neuronaux et ouvre de nouvelles perspectives dans l'étude des neurodégénérescences précoces.

Dans un second projet, nous nous sommes intéressés au glioblastome, cancer cérébral très invasif. Nous montrons que l'inhibition d'IRE1 (Inositol Requiring-Enzyme 1, senseur du stress du réticulum endoplasmique) dans un modèle d'implantation orthotopique chez la souris induit la formation de tumeurs plus petites, moins vascularisées et plus dispersées avec un meilleur pronostic de survie. Nous observons aussi des altérations du microenvironnement tumoral (matrice extracellulaire, réaction astrocytaire) avec des modifications de l'expression de nombreux facteurs de croissance dont le TGF β .

Mots Clés : VEGF, activité synaptique, moelle épinière, développement embryonnaire // IRE1, glioblastome, réaction astrocytaire, TGF β , matrice extracellulaire

The nervous and the vascular systems share similarities (branching points, afferent/efferent parts ...) and are closely connected during development and pathology.

In the first part of this project, we questioned whether the pro-angiogenic key factor VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), which promotes new blood vessels formation, can directly interact with neural networks while nervous and vascular systems are developing. In the present study, using an electrophysiological approach, we focused on the effect of VEGF on embryonic spinal lumbar motoneurons (MNs). Our results demonstrate that VEGF increases the frequency of the GABA/glycinergic events at early developmental stages (E13.5 and E15.5) but not at the perinatal stage E17.5. Our data highlight a new role for VEGF which can control both the maturation of the vascular and neuronal networks and may likely be involved in early MNs degeneration.

In the second part, we focused on glioblastoma, the most aggressive form of brain cancer. Our results show that inhibition of IRE1 (Inositol Requiring-Enzyme 1, stress sensor of endoplasmic reticulum) leads to formation of smaller, less vascularized, more invasive tumors with a better prognosis. We also observe that tumoral microenvironment is altered (reactive astrogliosis, extracellular matrix) and expression of several growth factors like TGF β is modified.

Key words: VEGF, synaptic activity, spinal cord, embryonic development // IRE1, glioblastoma, reactive astrogliosis, TGF β , extracellular matrix