

THÈSE PRÉSENTÉE  
POUR OBTENIR LE GRADE DE  
**DOCTEUR DE**  
**L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ECOLE DOCTORALE : Sciences de la vie et de la santé  
SPECIALITE : Génétique

Par Nathalie FRANZL

**Expression du récepteur Frizzled7 par les macrophages : rôle  
dans le contrôle de l'angiogenèse via la régulation de la  
polarisation macrophagique**

Sous la direction de: Pr. Thierry COUFFINHAL

Soutenue le 8 décembre 2014

Membres du Jury :

Mme Sophie JAVERZAT

Mme Catherine MONNOT

Mme Barbara GARMY-SUSINI

PU (Bordeaux), INSERM U1029

CR, CIRB (Collège de France)

CR, INSERM UMR1048

Président

Rapporteur

Rapporteur

## Remerciements

---

Voilà plus de trois ans passés au sein de cette unité Inserm U1034. J'y ai rencontré des gens qui m'ont apporté beaucoup aux niveaux professionnel et personnel. C'est pourquoi je souhaite les remercier.

### **Aux membres du jury**

Mme Garmy-Susini et Mme Monnot,

Merci d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse et merci pour votre participation au jury. Merci pour tout le temps accordé à la lecture de ce manuscrit et pour vos remarques pertinentes.

Mme Javerzat,

Merci d'avoir accepté d'être la présidente de mon jury.

### **A mes encadrants**

Cécile Duplâa et Marie-Ange Renault,

Je vous remercie pour votre aide à l'obtention de ma bourse de thèse.

Thierry Couffinhal et Cécile Duplâa,

Merci beaucoup de m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire et de votre équipe. Je vous remercie d'avoir dirigé mon travail et guidé mes réflexions pendant ces trois ans.

### **A mes collègues thésards**

Claire et Raj,

Merci pour votre aide et soutien de tous les jours. Ce fut une grande chance pour moi de vous côtoyer pendant ces trois ans. Vous m'avez beaucoup apporté que ce soit en partageant vos connaissances sur nos chères voies de signalisation Wnt/Frizzled, en me remontant le moral, avant et après les séminaires, ou tout simplement en plaisantant et parlant de tout et de rien.

### **Aux membres du FAN club**

Aude et Frédéric,

Merci à vous deux d'avoir fondés avec moi le labo FAN. Que de bons moments et de discussions intéressantes, scientifiques ou non, partagés. Vous m'avez apporté votre expérience, donné des conseils d'expert et toujours soutenue dans les moments de doute. Merci aussi pour ces déjeuners au Québec Café, notre repaire.

### **A mes soutiens techniques (mais pas que ...)**

Catherine,

Merci à toi, le pilier technique de notre équipe, de m'avoir transmis avec tant de gentillesse et d'énergie une partie de tes nombreuses compétences. Nous en avons passé du temps avec ces sacrés macrophages, qui ne nous l'ont pas bien rendu. La chanson des macrophages n'aura pas toujours suffi à la réussite des expériences mais aura bien égayé les journées.

Annabel et Myriam,

Merci à vous deux pour votre grande aide en histologie. Merci pour toutes ces fixations, ces inclusions, ces coupes et ces marquages. Merci d'avoir dompté tous les tissus que je vous ai donnés, ces peaux et ces oreilles incollables. Merci aussi pour votre énergie et vos discussions.

Béatrice,

Merci pour toutes les discussions que nous avons eu sur ton expérience et sur l'avenir après la thèse.

Jérôme,

Merci d'avoir pris si bien soin des souris. Merci aussi pour l'organisation des soirées bowling si sympathiques.

Christelle,

Merci pour ton soutien administratif, tes bonnes idées, ton sens de l'organisation, ta disponibilité et ta gentillesse.

### **A l'équipe Gadeau & Co.**

Alain, Marie-Ange, Yu, Candice, Soizic, Isabelle,

Merci à vous, ma première équipe d'adoption en master 2, de m'avoir si bien intégrée au sein du laboratoire. Ce fut un plaisir de faire partie de votre équipe pendant ces six mois et de vous avoir côtoyé pendant ces années au laboratoire. Marie-Ange je te remercie pour tes conseils toujours avisés. Yu, quel plaisir de t'avoir rencontrée. Ma collègue et amie chinoise merci pour toute ton aide au laboratoire, ta joie de vivre, et les sorties en dehors du labo (poterie, vendanges, ...). Candice, merci pour tes récits de voyages et ces moments partagés en plein mois d'aout dans un labo désert. Soizic, ma jumelle de galère, merci pour ces discussions qui me remontaient le moral et me permettaient de me sentir moins seule. Et merci pour ces soirées burger/ciné si sympas.

### **A la bande des sorties après le travail**

Christelle, Catherine, Marie-Ange, Yu, Soizic, Candice, Claire, Raj, Marie-Lise, Jérôme, Aude, Fred, Badr, Annabel, Myriam, Juliana, ...,

Merci à tous pour tous ces bons moments passés ensemble en dehors du travail et qui ont fait de ma thèse une expérience humaine très forte. Je pense par exemple aux nombreux pique-niques et repas partagés dans la bonne humeur. Christelle, je te remercie tout particulièrement d'avoir été à l'origine d'un grand nombre de ces moments très sympathiques. Je pense aussi à nos sorties cinéma du mardi, à nos parties de bowling et nos soirées dansantes. Et quels excellents souvenirs, de moments de rires, lors des tournages de vidéos et des répétitions de chorégraphie pour les thèses de Yu et Candice.

### **A ma famille et mes amis**

Merci d'avoir été là dans les bons et les mauvais moments. Je vous remercie pour tout votre soutien. Vous avez toujours cru en moi.

# Table des matières

---

Abréviations .....	10
Liste des figures .....	12
Préface .....	15
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>18</b>
I. Macrophages .....	19
A. Origine des macrophages : Hématopoïèse et Lignée myéloïde .....	19
B. Propriétés fonctionnelles : Phagocytose, Présentation d'antigènes et Sécrétion .....	22
C. Structure : Des récepteurs pour répondre à l'environnement .....	24
D. Polarités M1, M2s .....	25
i. Macrophages M1 .....	28
ii. Macrophages M2 .....	29
a. Macrophages M2a.....	29
b. Macrophages M2b.....	31
c. Macrophages M2c.....	31
iii. Tumor-Associated Macrophages (TAMs).....	32
II. Rôle des macrophages dans la réaction inflammatoire .....	34
A. La réaction inflammatoire .....	34
B. Voies de signalisation impliquées dans l'inflammation et la polarité M1/M2.....	37
i. NF-kB .....	38
ii. JAK/STATs.....	39
a. JAK1,2 / STAT1,2,3 : signalisation pro-inflammatoire .....	40
b. JAK1,3 / STAT3,6 : signalisation anti-inflammatoire .....	40
iii. Smad.....	40
iv. Autres voies de signalisation.....	41
III. Rôle des macrophages dans l'angiogenèse.....	41
A. Angiogenèse : Généralités.....	41
B. Angiogenèse physiologique.....	44
i. Rétine .....	44
ii. Cerveau .....	48
iii. Cicatrisation.....	49
C. Angiogenèse pathologique.....	51
i. Rétinopathie.....	51
ii. Inflammations chroniques .....	54

iii.	Cancer.....	54
a.	Rôle des macrophages (TAMs et TEMs) dans l'angiogenèse tumorale.....	55
b.	Rôle des macrophages dans la lymphangiogenèse .....	57
D.	Rôle des macrophages dans l'ischémie.....	58
i.	Rôle des macrophages dans les différentes phases de la réparation tissulaire post-ischémie .....	58
a.	Phase inflammatoire .....	60
b.	Phase proliférative.....	62
c.	Phase de remodelage .....	64
ii.	Rôle des macrophages TEM dans l'arteriogenèse post-ischémique dans le membre inférieur.....	65
IV.	Signalisation Wnt/Frizzled .....	68
A.	Facteurs Wnt .....	69
B.	Récepteurs Fzd .....	72
C.	Voies de signalisation Wnt/Frizzled .....	76
i.	Voie Wnt canonique.....	76
ii.	Voies Wnt non canoniques .....	79
a.	Voie de polarité planaire cellulaire (PCP).....	80
b.	Voie calcium-dépendante (Wnt/Ca <sup>2+</sup> ).....	80
D.	Autres ligands modulateurs des voies Wnt/Fzd.....	81
E.	Signalisation Wnt/Fzd dans l'inflammation et l'angiogenèse .....	82
i.	Signalisation Wnt/Fzd dans l'inflammation .....	82
a.	Wnt5a .....	82
b.	Wnt1.....	83
c.	sFRP1 .....	83
ii.	Signalisation Wnt/Fzd dans l'angiogenèse.....	85
a.	Ligands Wnt.....	85
b.	Récepteurs Frizzled.....	87
c.	sFRP1 .....	88
V.	Récepteur Frizzled 7 .....	89
A.	Expression de Frizzled 7 .....	89
B.	Rôle de Frizzled 7.....	90
i.	Rôle dans le développement.....	90
a.	Rôle dans le développement du Xénope et du Poisson zèbre .....	91
b.	Rôle dans le développement de la souris.....	92
ii.	Rôle dans les cellules souches.....	92

iii.	Rôle dans les cancers .....	93
iv.	Rôle dans l'inflammation .....	94
v.	Rôle dans l'angiogenèse .....	94
a.	Rôle dans la perméabilité vasculaire .....	94
b.	Rôle dans l'angiogenèse rétinienne .....	97
VI.	Voies Wnt/Frizzled dans les macrophages .....	98
A.	Rôle dans l'inflammation .....	98
i.	Rôle pro-inflammatoire .....	98
a.	Wnt5a/Fzd5 .....	98
b.	GSK3 $\beta$ .....	101
ii.	Rôle anti-inflammatoire .....	101
a.	Wnt3a/Fzd1 .....	101
b.	$\beta$ -catenine .....	103
c.	Wnt5a .....	104
B.	Rôle dans l'angiogenèse .....	105
i.	Wnt7b .....	106
ii.	Voie non canonique Wnt-Flt1 .....	106
	<b>CONTEXTE ET OBJECTIF DE L'ETUDE</b> .....	<b>109</b>
	<b>MATERIEL ET METHODES</b> .....	<b>110</b>
I.	Lignées murines .....	111
II.	Hypersensibilité retardée de contact .....	112
III.	Irritation cutanée .....	113
IV.	Ischémie du membre inférieur .....	113
V.	Infarctus du myocarde .....	114
VI.	Cytométrie en flux .....	114
VII.	Immuno-Histologie .....	116
VIII.	Quantifications et mesures .....	117
A.	Mesure d'épaisseur de peau .....	117
B.	Quantification des marquages CD31, CD68 et MMR .....	118
C.	Quantification du pourcentage de réparation musculaire .....	118
IX.	Isolement de macrophages péritonéaux .....	119
X.	Culture cellulaire .....	119
A.	Différenciation de cellules de moelle osseuse en macrophages .....	119

B.	Activation des macrophages de moelle osseuse en macrophages M1 et M2 .....	120
C.	Activation des macrophages de moelle osseuse avec Wnt3a .....	120
D.	Culture de cellules RAW264.7 .....	120
XI.	Extraction d'ARN, transcription inverse et PCR quantitative .....	120
XII.	Western Blot.....	122
XIII.	Statistiques .....	123
	<b>RESULTATS</b> .....	124
I.	Expression de Frizzled7 par les macrophages et vérification des lignées murines utilisées..	125
A.	Expression des récepteurs Frizzled par les macrophages .....	125
B.	Lignées murines utilisées.....	126
i.	Vérification de l'absence de <i>Frizzled7</i> dans les macrophages .....	126
a.	Extinction de l'expression de Fzd7 par les macrophages .....	126
b.	Extinction de la signalisation $\beta$ -caténine.....	127
C.	Macrophages utilisés pour les études <i>in vitro</i> .....	129
II.	Frizzled 7 régule l'angiogenèse dans plusieurs modèles d'inflammation chez la souris .....	130
A.	Hypersensibilité retardée de contact.....	130
i.	Présentation du modèle.....	130
ii.	Résultats chez les souris Fzd7KO.....	132
iii.	Résultats chez les souris Fzd7KO <sup>M<math>\phi</math></sup> .....	134
B.	Irritation cutanée .....	136
i.	Présentation du modèle.....	136
ii.	Résultats chez les souris Fzd7KO.....	136
iii.	Résultats chez les souris Fzd7KO <sup>M<math>\phi</math></sup> .....	139
C.	Ischémie du membre inférieur.....	144
i.	Présentation du modèle.....	144
ii.	Résultats à cinq jours post-ischémie.....	145
iii.	Résultats à dix jours post-ischémie.....	151
D.	Conclusions sur les modèles <i>in vivo</i> utilisés .....	154
III.	L'expression de Frizzled 7 par les macrophages n'influence pas la réparation du muscle après ischémie.....	156
A.	Doppler .....	156
B.	Desmine.....	157
C.	MYH1.....	158
IV.	L'absence de Fzd7 dans les macrophages modifie leurs réponses aux signaux inflammatoires, <i>in vitro</i> .....	159

V. L'infarctus du myocarde : un modèle prometteur .....	163
A. Présentation du modèle .....	164
B. Résultats préliminaires obtenus .....	165
<b>CONCLUSION, DISCUSSION ET PERSPECTIVES</b> .....	<b>167</b>
I. Conclusion et discussion .....	168
A. FZD7 régule l'angiogenèse dans plusieurs modèles d'inflammation chez la souris .....	170
i. L'absence de Frizzled 7 modifie le profil M1/M2 des macrophages .....	170
ii. L'absence de Frizzled 7 dans les lignées myéloïdes favorise l'angiogenèse dans des modèles pathologiques .....	172
B. L'expression de Frizzled7 par les macrophages n'influence pas la réparation du muscle	173
C. L'absence de Frizzled 7 dans les macrophages modifie leurs réponses aux signaux inflammatoires <i>in vitro</i> .....	173
II. Perspectives .....	175
<b>PUBLICATIONS</b> .....	<b>178</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>182</b>

## Abréviations

---

<b>ADN :</b>	Acide DésoxyriboNucléique
<b>AGM :</b>	Aorte-Gonades-Mesonephros
<b>Ang-1/2:</b>	Angiopoïetine-1/2
<b>APC:</b>	Adenomatous Poliposis Coli
<b>Arg:</b>	Arginase
<b>ARN:</b>	Acide RiboNucléique
<b>BCG:</b>	Bacillus Calmette-Guerin
<b>bFGF:</b>	basic Fibroblast Growth Factor
<b>CAMKII:</b>	Ca <sup>2+</sup> /calmodulin-dependent protein kinase II
<b>CHS :</b>	Cellule Souche Hématopoïétique
<b>CCL:</b>	Chemokine (C-C motif) ligand
<b>CD:</b>	Cluster of Differentiation
<b>CE:</b>	Cellule Endothéliale
<b>CLR:</b>	C-type Lectins Receptor
<b>CRD:</b>	Cysteine-Rich Domain
<b>CSF:</b>	Colony Stimulating Factor
<b>DAAM1:</b>	Dishevelled-Associated Activator of Morphogenesis 1
<b>DAMP:</b>	Damage- Associated Molecular Patterns
<b>DII:</b>	Delta-like ligand
<b>DTR:</b>	Diphtheria Toxin Receptor
<b>Dvl:</b>	Dishevelled
<b>FcR:</b>	Fc Receptor
<b>Flt1:</b>	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1
<b>Fzd:</b>	Frizzled
<b>GFP:</b>	Green Fluorescent Protein
<b>GSK3β:</b>	Glycogen Synthase Kinase 3beta
<b>HIF:</b>	Hypoxia-Inducible Factor
<b>HUVEC:</b>	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
<b>IC:</b>	Immune Complex
<b>IFNγ:</b>	Interferon gamma
<b>IgG:</b>	Immunoglobuline G
<b>IL:</b>	Interleukine
<b>iNOS:</b>	inducible Nitric Oxide Synthase
<b>IRF:</b>	Interferon Regulatory Factor
<b>JAK:</b>	Janus Kinase
<b>JNK:</b>	Jun-N-terminal Kinase
<b>KLF:</b>	Kruppel-Like Factor
<b>KO:</b>	Knock-Out
<b>LEF:</b>	Lymphoid Enhancing Factor
<b>LRP:</b>	Lipoprotein Receptor-related Protein
<b>LysM:</b>	Lysozyme M
<b>LPS:</b>	Lipopolysaccharide
<b>MAPK:</b>	Mitogen-Activated Protein kinase
<b>M-CSF:</b>	Macrophage-Colony Stimulating Factor

<b>MCP1:</b>	Monocyte Chemotactic Protein-1
<b>MMP:</b>	Matrix MetalloProteinase
<b>MMR:</b>	Macrophage Mannose Receptor
<b>MRC1:</b>	Mannose Receptor, C type 1
<b>NFAT:</b>	Nuclear Factor of Activated T-cells
<b>NF-κB:</b>	Nuclear Factor-kappa B
<b>NK:</b>	Natural Killer (cellules NK)
<b>NLR:</b>	NOD-Like Receptor
<b>NO:</b>	Nitric Oxide
<b>OIR:</b>	Oxygen-Induced Retinopathy
<b>PAMP:</b>	Pathogen-Associated Molecular Patterns
<b>PBS:</b>	Phosphate Buffer Saline
<b>PCP:</b>	Planar cell polarity / Polarité Cellulaire Planaire
<b>PCR:</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PDGF:</b>	Platelet-Derived Growth Factor
<b>PHD:</b>	Prolyl Hydroxylase
<b>PKC:</b>	Protein Kinase C
<b>PLC:</b>	Phospholipase C
<b>PPAR:</b>	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
<b>PRR:</b>	Pattern Recognition Receptor
<b>PS:</b>	Penicilline-Streptomycine
<b>qPCR:</b>	quantitative real-time PCR
<b>RLR:</b>	RIG-1-Like Receptor
<b>ROCK:</b>	Rho-associated Kinase
<b>ROS:</b>	Reactive Oxygen Species
<b>sFRP:</b>	Secreted Frizzled-Related Protein
<b>SNC:</b>	Système Nerveux Central
<b>SOCS:</b>	Supressors Of Cytokine Signaling
<b>STAT:</b>	Signal Transducers and Activators of Transcription
<b>SVF:</b>	Sérum de Veau Foetal
<b>TAM:</b>	Tumor-Associated Macrophage
<b>TEM:</b>	Tie2-Expressing Monocyte/Macrophage
<b>TCF:</b>	T-cell Factor
<b>TGFβ:</b>	Tumor Growth Factor beta
<b>TLR:</b>	Toll Like Receptor
<b>TNFα:</b>	Tumor Necrosis Factor alpha
<b>VCAM:</b>	Vascular Cell Adhesion Molecule
<b>VEGF:</b>	Vascular Endothelial Growth Factor
<b>VEGFR:</b>	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
<b>Wls:</b>	Wntless

## Liste des figures

---

Figure 1 : Sites d'hématopoïèse, à l'origine des cellules souches hématopoïétiques, au cours du développement embryonnaire et après la naissance chez la Souris et l'Homme .....	20
Figure 2 : Origine et étapes de différenciation des cellules sanguines .....	21
Figure 3 : Chronologie des avancées de la recherche dans le domaine de la polarisation des macrophages .....	26
Figure 4 : Fonctions des TAMs dans la progression tumorale .....	33
Figure 5 : Les grandes étapes de la réaction inflammatoire .....	36
Figure 6 : Principales voies de signalisation impliquées dans la polarisation des macrophages .....	37
Figure 7 : Signalisation NF- $\kappa$ B .....	38
Figure 8 : Signalisation JAK/STAT .....	39
Figure 9 : Les différentes étapes de l'angiogenèse .....	43
Figure 10 : Représentation schématique du réseau vasculaire de la rétine à 2, 6, 10 et 18 jours postnatal .....	44
Figure 11 : Présence de macrophages au contact des vaisseaux en formation dans la rétine .....	45
Figure 12 : Morphologie du plexus vasculaire rétinien .....	47
Figure 13 : Présence de macrophages aux jonctions vasculaires lors de la formation du cerveau .....	49
Figure 14 : Impact de l'ablation des macrophages sur l'angiogenèse et la sécrétion de cytokines lors de la cicatrisation d'une plaie cutanée chez la souris .....	50
Figure 15 : Représentation schématique du modèle d'OIR (Rétinopathie Induite par l'Oxygène) chez la souris.	52
Figure 16 : Impact de l'élimination sélective des TEMs sur la croissance et l'angiogenèse tumorale chez la souris .....	56
Figure 17 : Impact de l'injection de macrophages TEMs sur l'angiogenèse tumorale chez la souris .....	56
Figure 18 : Phases de la réparation tissulaire .....	60
Figure 19 : Sécrétion de cytokines par les macrophages après phagocytose de débris cellulaires du muscle in vitro .....	61
Figure 20 : Inflammation et polarisation des macrophages dans la blessure et la réparation du muscle squelettique .....	63
Figure 21 : Implication des macrophages Tie2 <sup>+</sup> dans la revascularisation après ischémie chez l'Homme et la souris .....	66
Figure 22 : Illustration schématique des résultats obtenus par Hamm et al. ....	68
Figure 23 : Arbre phylogénétique des récepteurs Frizzled .....	73
Figure 24 : Structure des récepteurs Frizzled .....	74
Figure 25 : La voie Wnt canonique .....	78
Figure 26 : Les voies Wnt non canoniques .....	79
Figure 27 : Infiltration des neutrophiles après infarctus du myocarde .....	84
Figure 28 : Expression des cytokines dans la zone ischémisée après infarctus du myocarde .....	84
Figure 29 : Réseau vasculaire de patte non ischémisées et ischémisées .....	88
Figure 30 : Co-localisation de Fzd7, VE-cadhérine et $\beta$ -caténine aux jonctions cellulaires de cellules endothéliales .....	95
Figure 31 : Analyse de la perméabilité cellulaire in vitro .....	95

Figure 32 : Analyse de la perméabilité cellulaire in vivo .....	96
Figure 33 : Modèle de l'implication du couple Wnt5a/Fzd5 dans la modulation de la réponse inflammatoire des macrophages à des stimuli microbien .....	99
Figure 34 : Hypothèse du rôle de Fzd5 dans la réponse inflammatoire .....	100
Figure 35 : Expression des dix récepteurs Frizzled dans les poumons de souris soumises à une inflammation chronique par inhalation de M. tuberculosis .....	102
Figure 36 : Modèle de l'implication du couple Wnt3a/Fzd1 dans la modulation de la réponse inflammatoire des macrophages à des stimuli microbien .....	103
Figure 37 : Test d'activation du promoteur NF- $\kappa$ B et IL-10 .....	105
Figure 38 : Représentation schématique de la suppression du branchement angiogénique par la signalisation Wnt/Flt1 dans les cellules myéloïdes de la couche profonde de la rétine .....	107
Figure 39 : Génération des lignées de souris Fzd7KO et Fzd7KO <sup>M<math>\Phi</math></sup> .....	112
Figure 40 : Quantification de l'épaisseur de la peau du dos et de l'oreille .....	117
Figure 41 : Quantification d'immuno-marquages par seuillage effectuée avec le logiciel Image J .....	118
Figure 42 : Quantification des zones réparées et en cours de réparation du muscle tibial ischémié .....	119
Figure 43 : Expression relatives des gènes Fzd par les macrophages issus de moelle osseuse .....	125
Figure 44 : Analyse de la délétion de Fzd7 dans les macrophages obtenus des souris Fzd7KO et Fzd7KOM $\Phi$ .....	127
Figure 45 : La signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine est abolie en absence de Frizzled7 .....	128
Figure 46 : Comparaison des niveaux d'expression de Fzd7 dans les macrophages issus de moelles osseuse et dans la lignée de macrophages RAW264.7 .....	129
Figure 47 : Activation du système immunitaire en réponse à un allergène .....	131
Figure 48 : L'absence de Fzd7 augmente la réponse inflammatoire induite par l'oxazolone .....	133
Figure 49 : L'absence de Fzd7 dans les macrophages n'a pas d'effet sur l'intensité de la réponse inflammatoire induite par l'oxazolone .....	135
Figure 50 : L'absence de Fzd7 augmente la réponse inflammatoire induite par le SDS .....	137
Figure 51 : L'absence de Fzd7 induit une augmentation du nombre de macrophages MMR <sup>+</sup> et une angiogenèse accrue dans la zone d'inflammation induite par le SDS .....	138
Figure 52 : Confirmation par comptage du nombre de cellules CD31 <sup>+</sup> et MMR <sup>+</sup> de la technique de quantification de l'angiogenèse et des populations de macrophages par mesure du pourcentage de zones marquées .....	139
Figure 53 : L'absence d'expression de Fzd7 par les macrophages augmente la réponse inflammatoire induite par le SDS .....	140
Figure 54 : L'absence d'expression de Fzd7 par les macrophages n'a pas d'influence sur le recrutement de macrophages dans la zone d'inflammation induite par le SDS .....	142
Figure 55 : L'absence d'expression de Fzd7 par les macrophages induit une présence de macrophages MMR <sup>+</sup> et une angiogenèse accrues dans la zone d'inflammation induite par le SDS .....	143
Figure 56 : Evaluation quantitative de la densité capillaire .....	144
Figure 57 : Imagerie par mCT de la néovascularisation de la patte ischémie à 0, 7, 15, 21 et 28 jours après opération .....	145
Figure 58 : L'absence d'expression de Fzd7 par les macrophages favorise l'angiogenèse dans le muscle à 5 jours post-ischémie .....	146
Figure 59 : L'absence d'expression de Fzd7 par les macrophages n'a pas d'effet sur le recrutement de macrophages dans le muscle à 5 jours post-ischémie .....	147

Figure 60 : L'augmentation d'angiogenèse dans le muscle des souris Fzd7KO <sup>M<math>\phi</math></sup> à 5 jours post-ischémie s'accompagne d'une présence accrue de macrophages M2 .....	148
Figure 61 : L'absence d'expression de Fzd7 par les macrophages n'a pas d'effet sur le pourcentage de macrophages présents dans le muscle à 5 jours post-ischémie .....	149
Figure 62 : Le pourcentage de macrophages M1 parmi les macrophages présents dans le muscle à 5 jours post-ischémie est plus faible chez les souris Fzd7KO <sup>M<math>\phi</math></sup> .....	150
Figure 63 : L'absence d'expression de Fzd7 par les macrophages n'a pas d'effet sur le recrutement de macrophages dans le muscle à 10 jours post-ischémie .....	151
Figure 64 : Le nombre de macrophages M2 MMR <sup>+</sup> est identique dans le muscle des souris Fzd7WT <sup>M<math>\phi</math></sup> et Fzd7KO <sup>M<math>\phi</math></sup> à 10 jours post-ischémie .....	152
Figure 65 : Le nombre de vaisseaux CD31 <sup>+</sup> est identique dans le muscle des souris Fzd7WT <sup>M<math>\phi</math></sup> et Fzd7KO <sup>M<math>\phi</math></sup> à 10 jours post-ischémie .....	153
Figure 66 : Evolution du pourcentage de macrophages, macrophages M2 et vaisseaux dans le muscle entre cinq et dix jours post-ischémie .....	154
Figure 67 : Le retour du flux sanguin dans les pattes ischémisées est identique entre les souris Fzd7WT <sup>M<math>\phi</math></sup> et Fzd7KO <sup>M<math>\phi</math></sup> .....	156
Figure 68 : La réparation du muscle ischémisé est identique entre les souris Fzd7WT <sup>M<math>\phi</math></sup> et Fzd7KO <sup>M<math>\phi</math></sup> .....	157
Figure 69 : La régénération du muscle ischémisé est identique entre les souris Fzd7WT <sup>M<math>\phi</math></sup> et Fzd7KO <sup>M<math>\phi</math></sup> .....	158
Figure 70 : In vitro, les macrophages déficients en Fzd7 adoptent de façon basale un profil M1 .....	160
Figure 71 : L'expression des marqueurs de profils M1 et M2 est identique entre les macrophages Fzd7WT et Fzd7KO après activation en profil M1 .....	161
Figure 72 : Les macrophages Fzd7KO ont tendance à moins réagir aux signaux de désactivation que les Fzd7WT .....	162
Figure 73 : Le milieu de déprivation utilisé active les macrophages .....	163
Figure 74 : Caractérisation des profils des macrophages dans le cœur au cours du temps post-infarctus .....	164
Figure 75 : L'absence d'expression de Fzd7 par les macrophages n'a pas d'effet sur le pourcentage de macrophages présents dans le cœur à 3 jours post-infarctus .....	165
Figure 76 : Le pourcentage de macrophages M1 parmi les macrophages présents dans le cœur à 3 jours post-infarctus est plus faible chez les souris Fzd7KO <sup>M<math>\phi</math></sup> .....	166
Figure 77: Communication indirecte et directe entre les cellules endothéliales et les macrophages .....	169

## Préface

---

*Le fonctionnement normal d'un tissu dépend de ses capacités à être pourvu en oxygène à partir des vaisseaux sanguins. Une dérégulation de la formation des vaisseaux (angiogénèse) est impliquée dans de nombreuses pathologies. La croissance tumorale, les rétinopathies ainsi que les maladies inflammatoires telles que l'arthrite rhumatoïde ou le psoriasis sont liées à une angiogénèse accrue. Un défaut de vascularisation en revanche entraîne une ischémie tissulaire (diminution de l'apport en oxygène aux tissus).*

*L'ischémie tissulaire est une circonstance fréquente en pathologie humaine, qu'il s'agisse du muscle cardiaque, du cerveau ou du muscle squelettique. L'apparition d'une hypo-perfusion dans un territoire musculaire induit le développement de nouveaux vaisseaux et d'une circulation collatérale qui a pour finalité de réduire l'ischémie musculaire. Ce développement est souvent insuffisant et la persistance de cette ischémie entraîne une limitation de la capacité fonctionnelle ainsi qu'une altération du pronostic vital. Les projets de recherche de l'unité INSERM1034 s'inscrivent dans un effort de meilleure compréhension des voies mises en jeu pour protéger le muscle de l'ischémie en favorisant la formation et la stabilisation du vaisseau.*

*Plusieurs types cellulaires sont impliqués dans le processus angiogénique. Outre les cellules endothéliales jouant le rôle principal, les cellules murales (péricytes et cellules musculaires lisses), les fibroblastes, les astrocytes (dans la rétine) ou encore les macrophages sont nécessaires à la formation et à la maturation correcte des néovaisseaux. Les macrophages, en tant que cellules du système immunitaire, interviennent dans grand nombre de pathologies où l'angiogénèse est un évènement central : cancer, rétinopathies, ischémies, arthrite rhumatoïde, ... Leur rôle angiogénique, que ce soit par sécrétion de facteurs angiogéniques tels que le VEGF ou par remodelage du réseau vasculaire, est décrit dans le développement (rétine, cerveau) et en pathologie.*

*Les macrophages s'adaptent aux signaux de leur environnement en adoptant une palette de profils fonctionnels allant du profil (ou polarisation) inflammatoire, M1, aux profils anti-inflammatoires, M2s. Par cette grande diversité et plasticité les macrophages interviennent dans la régulation fine des réponses inflammatoires et apparaissent de plus en plus comme des acteurs clés de nombreux processus. Parmi les voies de signalisation*

*permettant la modulation de la polarisation des macrophages se trouvent les voies Wnt/Frizzled.*

*Ces voies de signalisation Wnt/Frizzled sont aussi impliquées dans le développement des vaisseaux sanguins en contrôlant la prolifération, la polarité, l'apoptose des cellules endothéliales (CE) et le branchement vasculaire. Les morphogènes Wnt sécrétés (19 membres) activent des voies de signalisation canoniques et non canoniques en se liant aux récepteurs Frizzled (10 homologues). Notre équipe a entrepris un criblage des récepteurs Frizzled jouant un rôle dans la morphogenèse des cellules vasculaires et a identifié le récepteur Frizzled7 comme un nouvel acteur majeur. L'étude de ce récepteur au niveau des cellules endothéliales a montré son rôle dans la perméabilité vasculaire et des travaux en cours sur des souris déficientes en Frizzled7 spécifiquement dans les CE démontrent son action dans l'angiogenèse rétinienne.*

*En 2011, Stefater et al. découvrent une régulation négative de l'anastomose vasculaire, lors du développement de la rétine chez la souris, induite par la sécrétion via une signalisation Wnt du récepteur au VEGF, FLT1, par les macrophages. Le criblage de l'expression des récepteurs Fzd par ces macrophages révèle une expression de Fzd7. Ces données de la littérature nous ont poussé à nous intéresser au rôle de ce récepteur dans l'angiogenèse, non pas au niveau de la cellule endothéliale mais au niveau des macrophages.*

*L'objectif de ma thèse a été de déterminer le rôle de la signalisation induite par le récepteur Fzd7, dans les macrophages, dans leurs propriétés angiogéniques. Les données de la littérature ayant mis en évidence l'implication des voies Wnt/Frizzled dans la régulation de la réponse inflammatoire des macrophages je me suis concentrée sur l'angiogenèse pathologique. Ainsi j'ai mis en place au laboratoire une lignée de souris déficientes en Frizzled7 spécifiquement dans les macrophages. Sur ces souris, j'ai expérimenté plusieurs modèles in vivo mêlant inflammation et angiogenèse (hypersensibilité retardé de contact, irritation cutanée, ischémie du membre inférieur, infarctus du myocarde) pour répondre à l'objectif. Ces études in vivo révèlent un changement de polarisation des macrophages, passant d'un profil inflammatoire à angiogénique, en absence de Frizzled7. Ce changement de profil, visualisable au cours des phases précoces du processus inflammatoire, n'est pas observé au stade plus tardif du remodelage tissulaire. Le changement de polarisation des macrophages s'accompagne d'une angiogenèse accrue dans les tissus enflammés. Dans un*

*contexte inflammatoire, le récepteur Frizzled7 semble donc jouer un rôle dans le contrôle de l'angiogenèse via la régulation de la polarisation des macrophages.*

# INTRODUCTION

---

## I. Macrophages

---

La description générale des macrophages faite dans ce paragraphe repose sur un grand nombre de revues regroupant les connaissances actuelles sur l'origine, la structure, les fonctions et la polarité des macrophages. Dans le texte les références rapportant aux revues seront distinguées des articles par un astérisque. Cette nomenclature sera maintenue tout au long de ce mémoire.

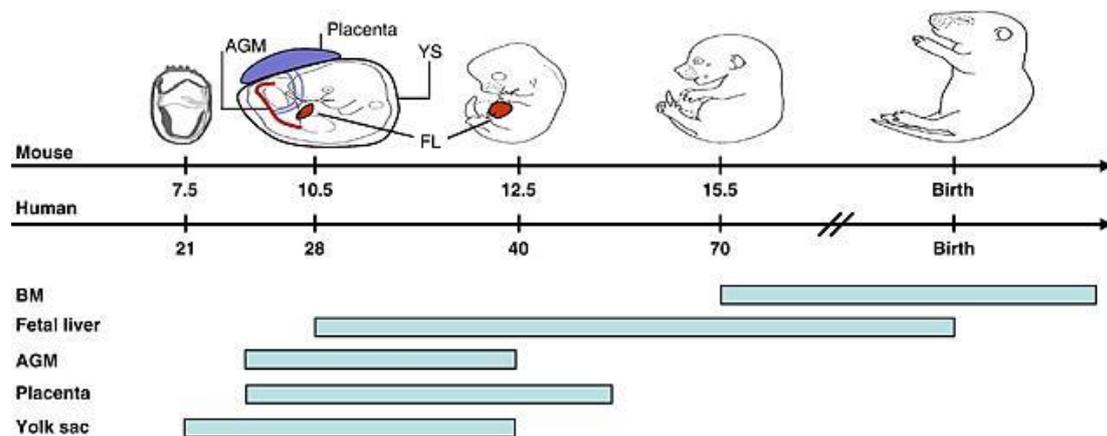
Les macrophages ont été identifiés pour la première fois par Elie Metchnikoff au début du 20<sup>ème</sup> siècle. A l'époque il les décrit comme des cellules phagocytaires impliquées dans l'élimination des pathogènes. Plus d'un siècle plus tard les connaissances sur les macrophages et leurs fonctions sont beaucoup plus vastes et ne cessent de s'élargir. Leur implication dans grands nombres de mécanismes physiologiques et pathologiques, tels que la défense immunitaire, l'inflammation, l'angiogenèse, le remodelage et la réparation tissulaire, l'athérosclérose, l'obésité, l'asthme, le cancer, ..., est désormais établie (Pollard\* 2009, Liu\* et al. 2014).

### A. Origine des macrophages : Hématopoïèse et Lignée myéloïde

---

Les macrophages sont issus de cellules souches hématopoïétiques (CSH) qui apparaissent dès les premiers stades embryonnaires. Au cours du développement embryonnaire l'hématopoïèse, processus de formation des cellules sanguines, est assurée successivement par plusieurs organes. Les premières CSH se forment dans le mésoderme de la paroi du sac vitellin ainsi que dans la région para-aortique dite AGM pour «Aorte-Gonades-Mesonephros ». Cet événement débute au cours de la troisième semaine du développement embryonnaire chez l'Homme et au stade E7.5 chez la souris. On y retrouve des îlots sanguins primitifs constitués de cellules bipotentes appelées hémangioblastes, capables de se différencier en cellules hématopoïétiques et en cellules endothéliales. Ces CSH originelles vont ensuite migrer vers le foie et dans une moindre mesure vers la rate. L'hématopoïèse passe alors de sa phase mésenchymateuse à sa phase hépatique. L'activité hématopoïétique décline et le foie devient le principal organe hématopoïétique. Il sera jusqu'à la naissance un stock important de cellules souches hématopoïétiques multipotentes, capables de générer la totalité des lignées sanguines. Plus tardivement dans la gestation l'hématopoïèse devient

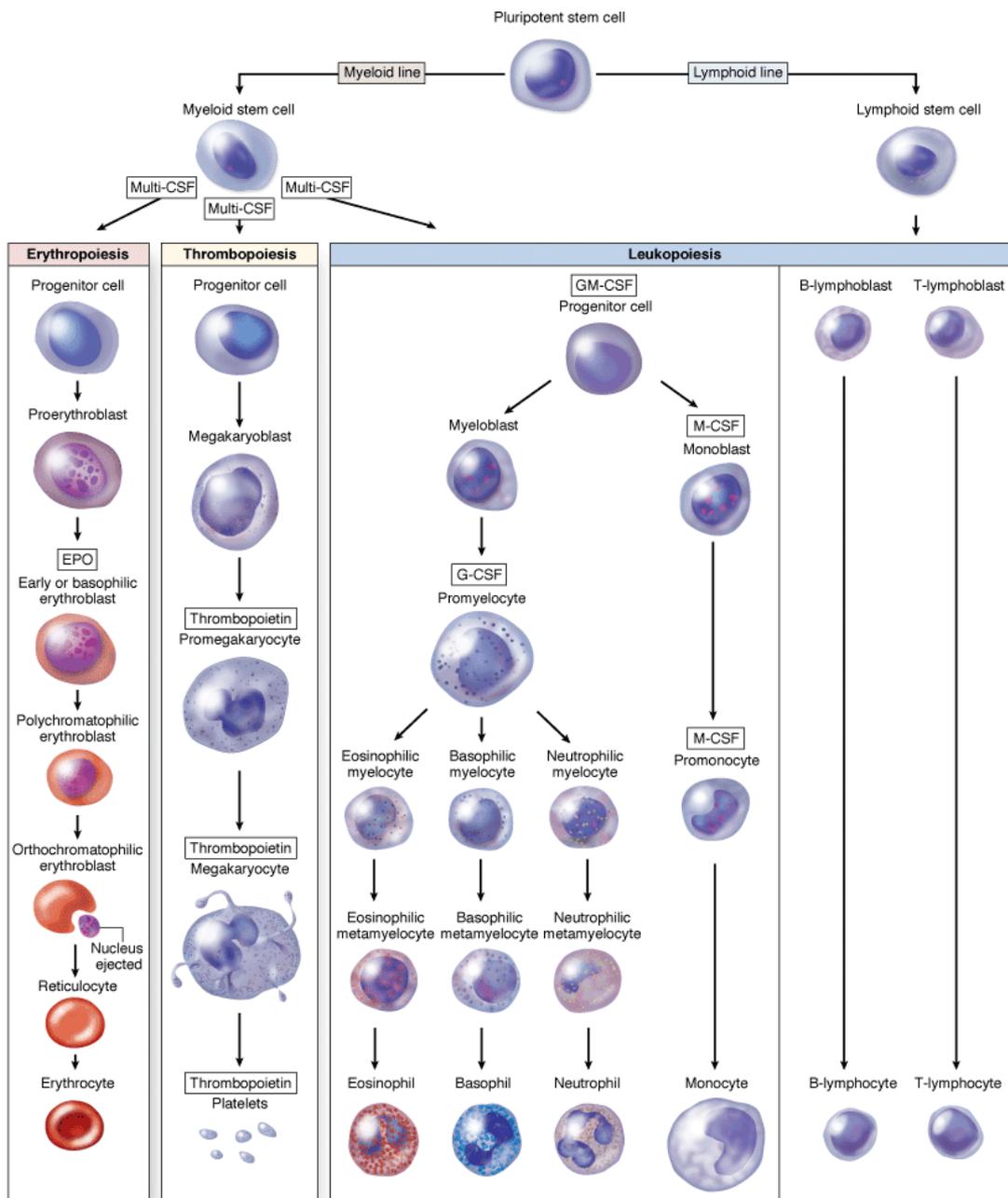
médullaire. Cette phase débute lors de l'ossification du squelette et de la formation au sein des os de cavités médullaires. C'est dans ces cavités que vont se constituer des foyers hématopoïétiques. La moelle osseuse va progressivement devenir le principal organe hématopoïétique, au détriment du foie. Quelques jours après la naissance la moelle osseuse devient l'unique site de l'hématopoïèse (**Figure 1**) (Golub\* et al. 2013).



**Figure 1 : Sites d'hématopoïèse, à l'origine des cellules souches hématopoïétiques, au cours du développement embryonnaire et après la naissance chez la Souris et l'Homme.** Les stades embryonnaires sont donnés en jours, sur les frises chronologiques. Les barres bleues représentent les sites actifs d'hématopoïèse : Moelle osseuse (BM), Foie fœtal (Fetal Liver, FL), région para-aortique dite Aorte-Gonades-Mesonephros (AGM), Placenta, Sac vitellin (Yolk sac,YS). Source : (Luis\* et al. 2012).

Les CSH sont capables d'auto-renouveau, afin de maintenir un stock permanent de CSH dans la moelle, et de totipotence, leur permettant de se différencier en n'importe quelle cellule sanguine. La différenciation des CSH est à l'origine de deux grandes lignées sanguines, la lignée lymphoïde regroupant les lymphocytes B et T, et la lignée myéloïde composée des érythrocytes, granulocytes, mégacaryocytes et des monocytes à l'origine des macrophages.

Ainsi une CSH qui s'engage dans le processus hématopoïétique va se différencier en un progéniteur qui lui-même se différenciera en un précurseur. Parmi les précurseurs on retrouve les lymphoblastes, érythroblastes, myéloblastes, mégacaryoblastes et les monoblastes. Les monoblastes donneront ensuite les promonocytes qui se différencieront en monocytes (**Figure 2**) (Mosser\* et al. 2008).



Source: Mescher AL: *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, 12th Edition*: <http://www.accessmedicine.com>  
 Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.

**Figure 2 : Origine et étapes de différenciation des cellules sanguines.** Les cellules souches pluripotentes (CSH) sont à l'origine des lignées myéloïdes et lymphoïdes. Source: Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas 12<sup>ème</sup> Edition par Anthony Mescher.

Les monocytes sont des cellules circulant dans le sang qui vont être recrutées dans les tissus où elles se différencieront en macrophages. D'autres macrophages dits résidents sont présents en permanence dans les tissus. Ils sont ainsi capables d'intervenir rapidement en cas d'invasion microbienne ou d'accumulation de débris. Dans certains tissus les

macrophages portent un nom spécifique (**Tableau 1**) (Mosser\* et al. 2008, Pollard\* 2009). Ils peuvent aussi avoir des fonctions spécifiques au tissu dans lequel il se situe comme par exemple la surveillance immune pour les cellules de Langerhans dans l'épiderme et le remodelage osseux pour les ostéoclastes (Pollard\* 2009).

Tissu	Nom des macrophages
Os	Ostéoclastes
Cerveau	Microglies
Peau	Cellules de Langerhans
Foie	Cellules de Kupffer
Tissu conjonctif	Histiocytes
Poumons	Macrophages alvéolaires

**Tableau 1 : Noms des macrophages selon les tissus.** Noms spécifiques donnés à certains macrophages tissulaires. Bien que n'ayant pas de noms spécifiques, des macrophages sont également présents dans les autres organes et tissus de l'organisme (yeux, utérus, foie, pancréas, ...).

## B. Propriétés fonctionnelles : Phagocytose, Présentation d'antigènes et Sécrétion

Une des fonctions principales des macrophages est la phagocytose. En tant que cellule clé de l'immunité innée le macrophage nettoie l'organisme des corps apoptotiques, des corps nécrotiques, des pathogènes et autres débris présents dans les tissus.

Dans la plus grande majorité des cas la phagocytose sert à éliminer les cellules apoptotiques et les débris générés par le remodelage des tissus. Les macrophages expriment à leur surface des récepteurs nécessaires à la détection de ces signaux de nettoyage. C'est le cas des récepteurs de la phosphatidylsérine, constituant phospholipidique des membranes cellulaires qui passe d'une position intracellulaire à extracellulaire lors du processus d'apoptose. Cette phagocytose de « routine » n'induit pas et ne s'accompagne pas d'inflammation (Mosser\* et al. 2008).

Les macrophages sont également impliqués dans l'élimination des déchets cellulaires générés par la nécrose des cellules résultant d'un traumatisme ou d'un stress. Les déchets issus de la nécrose sont souvent toxiques et constituent un signal de danger pour le macrophage. C'est pourquoi, contrairement à la phagocytose liée à l'apoptose, cette phagocytose de « crise » provoque un changement radical dans la physiologie des

macrophages qui se traduit par l'expression de facteurs pro-inflammatoires et une modification des protéines de surfaces (Mosser\* et al. 2008).

Dans les cas d'inflammations ou d'infections les macrophages issus des monocytes circulants interviennent en compléments des macrophages résidents. Ils agissent notamment dans le nettoyage du site d'infection en éliminant les cellules immunitaires (neutrophiles et macrophages) déjà présentes et ayant phagocyté les éléments étrangers ou toxiques. La reconnaissance des éléments à phagocyter peut se faire directement ou par l'intermédiaire de protéines solubles dites opsonines qui se lient aux pathogènes et qui sont reconnues par les macrophages.

La phagocytose se fait par endocytose de l'élément à éliminer. La vésicule intracellulaire formée est nommée phagosome. Elle va fusionner avec les lysosomes dans lesquels les enzymes lysosomiales et les radicaux libres de l'oxygène vont lyser et digérer les débris ou l'intrus. Toda et al. ont montré que la phagocytose de cellules apoptotiques se déroule en deux étapes. Dans un premier temps le récepteur TIM4 se fixe aux phosphatidylsérines exprimés par les cellules apoptotiques. Cet accrochage active au niveau des macrophages le complexe d'intégrines  $\alpha(v)\beta(3)$  qui va lier à son tour, par l'intermédiaire de la protéine MFG-E8, les résidus phosphatidylsérine et induire l'englobement du corps apoptotique (Toda et al. 2012).

Les macrophages interviennent également dans l'immunité adaptative en tant que cellules présentatrices d'antigène, même si cette fonction est principalement assurée par les cellules dendritiques. Après phagocytose et digestion d'éléments étrangers, les macrophages exposent ces antigènes à leur surface afin de stimuler les lymphocytes T ( $CD4^+$ ) et ainsi déclencher une réponse immunitaire spécifique.

Enfin, les macrophages agissent sur leur environnement grâce à leur fonction sécrétrice. En réponse aux signaux extérieurs qu'il reçoit le macrophage sécrète une grande palette de facteurs : cytokines, chimiokines, protéases, fractions du complément ... Par exemple, dans un contexte inflammatoire le macrophage va amplifier le signal en relarguant des cytokines pro-inflammatoires telles que les interleukines-1 et -6 (IL-1, IL-6) ou encore le facteur de nécrose tumoral (TNF $\alpha$ ). Plus tard il sécrète entre autres les interleukines-10 et -4 (IL-4, IL-10) anti-inflammatoires et le TGF $\beta$  (Tumor Growth Factor) pour limiter cette inflammation et

revenir à un état d'homéostasie. Et dans un contexte de remodelage tissulaire ils sécrètent des protéases (Striz\* et al. 2014). Tout au long de ce manuscrit, l'expression cytokinique des macrophages sera présentée au cas par cas selon les contextes décrits ou étudiés.

### C. Structure : Des récepteurs pour répondre à l'environnement

Les fonctions immunitaires innées des macrophages décrites ci-dessus sont permises par la présence de récepteurs capables de reconnaître des « motifs moléculaires conservés associés aux pathogènes » (PAMP pour « Pathogen-Associated Molecular Patterns » en anglais), retrouvés chez les pathogènes, et des « motifs moléculaires associés aux dégâts » (DAMP pour « Damage-Associated Molecular Patterns » en anglais) provenant de cellules âgées, abimées ou mortes. Ces récepteurs sont appelés « récepteurs de reconnaissance des motifs moléculaires » (PRR) (Owen\* 2014). Il existe plusieurs familles de PRR qui vont reconnaître et lier une grande variété de PAMP et DAMP et ainsi induire les différentes réponses immunitaires (Cinel\* et al. 2009). Ces familles sont séparées en PRR dits membranaires (ou endocytiques) et PRR cytoplasmiques (ou de signalisation).

Parmi les PRR membranaires il y a les récepteurs aux lectines de type C (CLR), dont font partie les récepteurs aux mannoses (MMR pour Macrophage Mannose Receptor). Les CLR reconnaissent des composants de la surface cellulaire, surtout des sucres et des polysaccharides, des bactéries et des champignons. Au niveau membranaire, on retrouve aussi les récepteurs du complément et les récepteurs scavengers qui jouent un rôle dans la phagocytose (Owen\* 2014).

Dans les PRR cytoplasmiques on regroupe les récepteurs de type RIG-1 (RLR) et les récepteurs de type NOD (NLR). Les RLR reconnaissent des ARN double-brin et déclenchent les voies de signalisation impliquant NF- $\kappa$ B, MAP-Kinase et interféron. Les NLR quant à eux regroupent trois grandes sous-familles de récepteurs (NOD, NALP et NAID) qui reconnaissent presque exclusivement des composants bactériens. Ils vont agir en recrutant des caspases responsables du clivage et de l'activation de cytokines inflammatoires (Owen\* 2014).

Une autre famille de PRR est celle des récepteurs dits TLR (Toll Like Receptors) qui jouent un rôle majeur dans l'activation de la réponse inflammatoire et antivirale. Les TLR sont divisés en deux grands groupes : les TLR situés au niveau de la membrane plasmique, tels que TLR-4 qui reconnaît les Lipopolysaccharides (LPS), et les TLR présents au niveau des

endosomes reconnaissant les composants viraux et bactériens comme les ARN simples ou doubles brins (TLR-7 et TLR-3 respectivement) (Boehme et al. 2004). La transmission du signal à partir de ces récepteurs se fait principalement par l'activation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B, de facteurs de régulation de l'interferon (IRF) et des facteurs de transcription en aval des voies des MAP kinases (MAPK) (Owen\* 2014).

Outre ces récepteurs PRR de l'immunité innée, les macrophages possèdent des récepteurs qui lient les complexes immuns, c'est-à-dire des complexes formés d'anticorps liés à leur antigène. Il s'agit des récepteurs Fc (FcR) qui lient les parties constantes des anticorps. Il existe différents types de récepteurs Fc qui sont classifiés en fonction du groupe d'immunoglobulines qu'ils reconnaissent (Takai\* 2002). Par exemple, les Fc $\gamma$ R lient la partie constante des immunoglobulines G (IgG). Ces récepteurs peuvent avoir une action activatrice comme pour le Fc $\gamma$ RI ou inhibitrice comme pour le Fc $\gamma$ RIIB. La fixation des complexes immuns sur les FcR entraîne leur élimination par phagocytose.

Enfin, les macrophages expriment aussi un très grand nombre de récepteurs très variés nécessaires à leurs interactions chimiques et physiques avec l'environnement. On peut citer en exemple les récepteurs des cytokines (IL-1R, IL-12R, IL-23R, ...), des chimiokines (CCR, CXCR, XCR), les intégrines, ... .

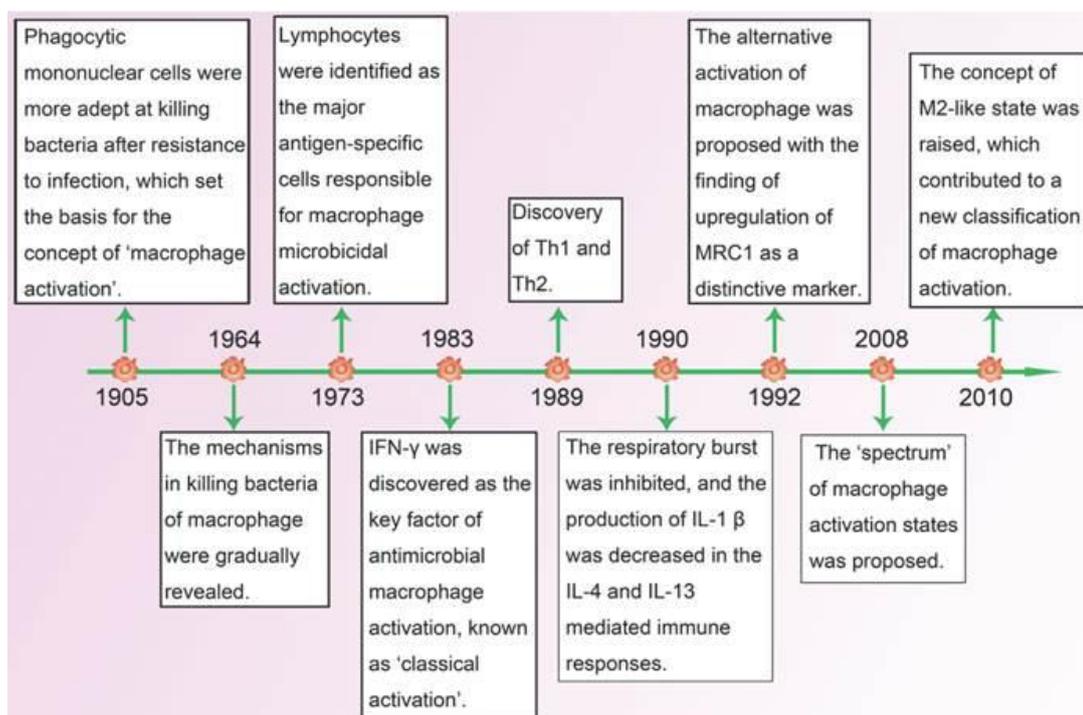
#### D. Polarités M1, M2s

---

Il n'est pas possible de définir clairement et simplement le phénotype d'un macrophage tellement la diversité et la plasticité de ces cellules sont grandes. Elles répondent à un très grand nombre de signaux et interviennent dans une multitude de contextes, allant de la défense de l'organisme contre des pathogènes, au maintien de l'intégrité des tissus par l'élimination des débris cellulaires, sans oublier la réparation et le remodelage des tissus. En fonction des signaux qu'ils reçoivent et des récepteurs qu'ils expriment les macrophages vont adopter des profils phénotypiques très variés et différents (Sica\* et al. 2012).

Historiquement les macrophages furent classés en deux catégories. Nathan et al. ont montré en 1983 que l'interféron gamma (IFN $\gamma$ ) produit par les lymphocytes Th1 activait les macrophages en cellules fortement toxiques (Nathan et al. 1983). Ces macrophages développant une forte activité antimicrobienne, avec une sécrétion de cytokines pro-

inflammatoires importante, en réponse à l'IFN $\gamma$  ont été ainsi décrits comme étant à « activation classique ». Quelques années plus tard Abramson et son équipe découvrent que l'IL-4 produit par les lymphocytes Th2 induisent chez les macrophages un état d'activation distinct des macrophages à activation classique (Abramson et al. 1990). Ces macrophages non inflammatoires répondant à l'IL-4, par notamment l'expression du marqueur MRC1 (ou MMR), furent nommés à « activation alternative » (Stein et al. 1992) (**Figure 3**). Afin de faire un parallèle avec la classification de la polarisation des lymphocytes T (nommés Th1 et Th2) les macrophages à activation classique sont dits « M1 » et ceux à activation alternatives, sont dits « M2 ».



**Figure 3 : Chronologie des avancées de la recherche dans le domaine de la polarisation des macrophages.** Source : (Liu\* et al. 2014).

Par la suite des études réalisées *in vitro* ont permis de mieux caractériser les macrophages M1 et M2. Le groupe de macrophages M2 fut globalement élargi à l'ensemble des macrophages non inflammatoires et fut subdivisé en trois sous populations (M2a, M2b et M2c). Les caractéristiques de ces populations M1 et M2s sont décrites par la suite et présentées dans le **Tableau 2**.

	Populations de macrophages			
	M1	M2a	M2b	M2c
<b>Activateurs</b>	IFN $\gamma$ + TNF $\alpha$ ou LPS	IL-4 IL-13	ICs + LPS ou IL-1 $\beta$	IL-10 TGF $\beta$ Glucocorticoïdes
<b>Récepteurs membranaires</b>	Fc $\gamma$ RI, II, et III TLR2 TLR4 IL-1R CD86	CD163 Fc $\epsilon$ RIIa CD206 (MMR) DecoyR IL-1R II	CD86	Recepteurs Scavenger A et B, CD206 (MMR) CD163, CCR2 TLR1, TLR8
<b>Cytokines exprimées</b>	IL-1, IL-6 IL-12, IL-15 IL-23 TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$	TGF $\beta$ IL-10 IL-1ra	IL-10 IL-1 $\beta$ , IL-6 TNF $\alpha$	TGF $\beta$ IL-10 IL-1ra
<b>Chimiokines exprimées</b>	CCL2, CCL3 CCL4, CCL5 CXCL8, CXCL9 CXCL10, CXCL11 CXCL13, CXCL16	CCL8, CCL13, CCL14, CCL17 CCL18, CCL22 CCL23, CCL24 CCL26	CCL1, CCL20 CXCL1, CXCL2 CXCL3	CCL16 CCL18
<b>Autres molécules</b>	iNOS	Arginase-1, Fizz1, Ym1 Polyamines		Polyamines
<b>Caractéristiques principales</b>	Sécrétions facteurs pro- inflammatoires	Sécrétions de facteurs nécessaires à la réparation tissulaire	Forte expression d'IL-10 et faible d'IL-12	Régulation négative des facteurs pro- inflammatoires

**Tableau 2 : Phénotypes caractéristiques des différentes polarisations des macrophages déterminés *in vitro*.** Liste non exhaustive, réalisée d'après (Mantovani\* et al. 2004), (Martinez\* et al. 2008) et (Minireview: Macrophage Polarization d'AbD Serotec).

Cette classification M1 / M2 établie *in vitro* a permis de mettre en évidence la capacité des macrophages à répondre à des signaux variés en modifiant leur profil d'expression (récepteurs, cytokines, chimiokines, ...). Un même macrophage est capable de s'adapter très rapidement aux changements cytokiniques de son environnement en passant d'un profil M1 à un profil M2 et vice-versa, comme l'a montré l'équipe de Davis dans un contexte d'infection par *Cryptococcus neoformans* (Davis et al. 2013).

Les études réalisées sur les macrophages au fil des années ont cependant montré que cette distinction n'est pas si nette. Il existerait plus vraisemblablement tout un continuum de phénotypes macrophagiques (Mosser\* et al. 2008, Sica\* et al. 2012). La distinction des profils M2a, M2b et M2c est difficilement et rarement faite dans les études *in vivo*. Les macrophages sont souvent séparés uniquement en M1 (pro-inflammatoires) et M2 (anti-inflammatoires et acteurs de la réparation tissulaire). Les marqueurs utilisés pour caractériser les populations de macrophages dans les tissus sont très variables en fonction des études, ce qui rend difficile une classification précise des macrophages *in vivo*.

Les marqueurs permettant la détection des macrophages dans leur ensemble, sans distinction M1/M2, sont aussi variés dans la littérature. Les plus fréquemment utilisés et décrits dans la suite de ce manuscrit sont F4/80 (Fantin et al. 2010, Outzz et al. 2011), CD68 (Smith et al. 1999, Patel et al. 2013), Mac1 (Rymo et al. 2011), CD18 (Checchin et al. 2006), CD11b (Maruyama et al. 2005, De Palma et al. 2005).

### i. Macrophages M1

---

Les macrophages M1 sont essentiels pour la défense de l'organisme contre les bactéries, les virus et toute autre agression. Ils sont caractérisés par une activité microbicide et tumoricide augmentée, une forte capacité de présentation des antigènes et un fort niveau de sécrétion de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires.

Les M1 sont induits par la combinaison de deux signaux dont le premier est l'IFN $\gamma$ . Dans la première description faite de l'activation classique des macrophages, le second signal associé à l'IFN $\gamma$  est le TNF $\alpha$  (Tumor Nécrosis Factor). Le TNF $\alpha$  exogène peut être le second signal mais généralement ce deuxième signal est l'activation des récepteurs TLR. Cette activation induit ensuite la production de TNF endogène agissant de manière autocrine, en collaboration avec l'IFN $\gamma$ , pour activer les macrophages. Ainsi, les macrophages M1 sont classiquement activés en réponse à l'IFN $\gamma$ , et à une exposition à un microbe ou un produit microbien tel que le LPS (Lipopolysaccharide), ligand des TLR (Mosser\* 2003).

L'IFN $\gamma$  peut être produit par les cellules de l'immunité innée, telles que les cellules NK (Natural Killer), ou adaptative, comme les lymphocytes auxiliaires (CD4+) et cytotoxiques (CD8+). Les cellules NK répondent au stress et aux infections en produisant de l'IFN $\gamma$  et activent ainsi les macrophages. Cette production par les cellules NK n'étant souvent que

transitoire, une réponse immunitaire adaptative est généralement nécessaire pour maintenir l'activation classique des macrophages et permettre le maintien de la réponse immunitaire. Ce sont les lymphocytes T auxiliaires Th1, activés par l'interleukine-12 (IL-12) produite par les macrophages M1, qui assurent entre autre cette continuité de sécrétion d'IFN $\gamma$ . Bien que les lymphocytes T soient antigène spécifique, les macrophages qu'ils activent agissent quant à eux sans discrimination (Mosser\* et al. 2008).

Les études menées sur l'activation classique des macrophages ont permis de déterminer des éléments que l'on considère comme étant caractéristiques de cet état d'activation. Il s'agit de récepteurs membranaires et autres marqueurs biologiques exprimés, et de cytokines, chimiokines et autres produits sécrétés. On peut citer par exemple les récepteurs aux opsonines, comme Fc $\gamma$ RIII, plusieurs interleukines (IL-1, IL-6, IL-12, IL-23, ...), le TNF $\alpha$  ou encore la forme inductible de l'oxyde nitrique synthase (iNOS) (Mantovani\* et al. 2004). Ces éléments sont répertoriés dans le **Tableau 2**.

## ii. Macrophages M2

On distingue *in vitro* trois groupes de macrophages M2: M2a, M2b et M2c. Ces différents profils diffèrent par leurs signaux d'activation, leurs marqueurs biologiques et leurs fonctions. Encore aujourd'hui la classification des macrophages M2 et de ces sous-groupes est en cours et semble plus complexe que les connaissances que nous avons à l'heure actuelle. Par exemple, Duluc et al. en 2007 nomme M2d un sous-groupe de macrophages possédant un profil similaire aux Macrophages Associés aux Tumeurs (TAM en anglais) présents dans les tumeurs ovariennes (Duluc et al. 2007). Cette dénomination M2d est cependant également utilisé par Ferrante et al. en 2012 pour décrire une autre population de macrophages pro-angiogéniques impliquée dans la cicatrisation (Ferrante et al. 2012).

### a. Macrophages M2a

Les macrophages M2a sont activés par les interleukines IL-4 et IL-13. Ils participent à l'atténuation de l'inflammation notamment par l'expression d'IL-10 et favorisent également la réparation des tissus, la constitution de la matrice extracellulaire et l'angiogenèse. Pour cela ils sont parfois aussi décrits comme les macrophages de la cicatrisation (Wound-healing macrophage) (Mosser\* 2003, Hoeksema\* et al. 2012).

En effet, *in vitro*, les macrophages traités avec de l'IL-4 et IL-13 montrent des signes de désactivation et de limitation de l'inflammation. Ils produisent un taux minimal de cytokines pro-inflammatoires, de radicaux d'oxygène et d'azote et perdent leur capacité de présentation d'antigènes aux lymphocytes T, et d'élimination de pathogènes (Edwards et al. 2006). En revanche, ils sécrètent des composants de la matrice extracellulaire, tels que la fibronectine (Gratchev et al. 2001), utiles à la réparation tissulaire.

Une des différences entre les macrophages M1 et les M2a se situe au niveau de leur métabolisme de l'arginine. Les macrophages M1, activés par les cytokines pro-inflammatoires, produisent l'enzyme iNOS en forte quantité. Cette enzyme transforme l'arginine en oxyde d'azote (NO). En revanche, exposés aux cytokines telles que l'IL-4, les macrophages M2a synthétisent l'arginase-1. L'enzyme produite métabolise l'arginine en urée et ornithine, un précurseur des polyamines et de la proline. Les polyamines étant impliquées dans la division et la croissance cellulaire et la proline un constituant majeur du collagène, les macrophages M2a participent à la réparation tissulaire (Hesse et al. 2001, Mosser\* 2003, Satriano\* 2004).

Tout comme les macrophages M1, les M2a peuvent être activés aussi bien par les cellules de l'immunité innée que par celles de l'immunité adaptative. Dans le cas d'un dommage tissulaire, les granulocytes (basophiles et mastocytes principalement) présents au site d'inflammation produisent rapidement de l'interleukine-4. L'IL-4 stimule l'activité arginase des macrophages, comme décrit ci-dessus, et entraîne la formation d'une population de macrophages favorisant la cicatrisation (Mosser\* et al. 2008). Des réponses immunitaires adaptatives de type Th2 sont également la source activatrice des M2a, par sécrétion d'IL-4 et d'IL-13, dans la réparation des lésions au niveau des muqueuses intestinales et bronchiques.

Il existe plusieurs marqueurs permettant d'identifier cette population macrophagique (**Tableau 2**). Parmi eux on trouve l'arginase-1, Fizz1, Ym1 et le récepteur au mannose (Raes et al. 2002). Les macrophages M2a expriment également de forts niveaux de chimiokines CCL13 (MCP-4), CCL8 (MCP-2), and CCL26 (eotaxine-3), qui coordonnent le recrutement d'éosinophiles, de basophiles et de cellules polarisées Th2, et sont impliqués dans les processus pro-angiogéniques (Martinez\* et al. 2008, Labonte\* et al. 2014).

## b. Macrophages M2b

---

Les macrophages M2b sont aussi nommés macrophages de type-II. Tout comme les macrophages M1, leur activation nécessite la combinaison de deux signaux. Le premier signal est la liaison de complexes immuns sur les récepteurs FcγR. Cette liaison doit être couplée à un signal stimulateur des macrophages. Il peut s'agir des ligands des récepteurs TLRs ou du récepteur IL-1R, tels que respectivement le LPS ou l'IL-1β (Mosser\* 2003).

A la différence des macrophages M2a, cette population de macrophages M2 n'exprime pas l'arginase et ne participe pas à la formation de la matrice extracellulaire. Ils sont caractérisés par une forte production d'IL-10 et faible d'IL-12 favorisant le développement de réponses immunitaires adaptatives de type-II (Gerber et al. 2001). Le ratio IL-10 / IL-12 peut être utilisé comme marqueur des macrophages M2b. Bien que sécrétant un fort taux d'IL-10, la population de macrophages M2b sécrète aussi des taux significatifs de cytokines pro-inflammatoires (TNFα, IL-1β, et IL-6) (Mantovani\* et al. 2004, Martinez\* et al. 2008).

Malgré cela les macrophages M2b ont un effet anti-inflammatoire et participent à l'activation Th2 et à l'immuno-régulation. En effet, l'injection de macrophages de type-II dans des souris ayant reçu une dose létale de LPS leur permet de survivre à l'inverse des souris contrôles (Gerber et al. 2001).

Les caractéristiques des macrophages M2b sont regroupées dans le **Tableau 2**.

## c. Macrophages M2c

---

Les macrophages M2c sont induits par l'interleukine-10, le TGFβ ou les glucocorticoïdes. Ils regroupent un groupe hétérogène de macrophages. Ils sont considérés comme des macrophages désactivés dont la caractéristique commune est la régulation négative des cytokines pro-inflammatoires (**Tableau 2**).

L'IL-10 et le TGFβ sont produits entre autres par les macrophages en fin d'inflammation, afin d'éviter la toxicité liée à l'inflammation, en induisant l'activation des macrophages M2c. Des souris KO dépourvues de ces deux cytokines se sont avérées être hypersensibles à des pathologies inflammatoires (Mosser\* 2003).

L'IL-10 est produit par les macrophages, les lymphocytes T et B ainsi qu'un grand nombre d'autres cellules comme les mastocytes et les kératinocytes. Il limite la durée et l'intensité des réactions immunitaires et inflammatoires. Dans les macrophages, il inhibe fortement la

production des cytokines pro-inflammatoires TNF $\alpha$ , IL-6 et IL-12, induites par le LPS (Martinez\* et al. 2008).

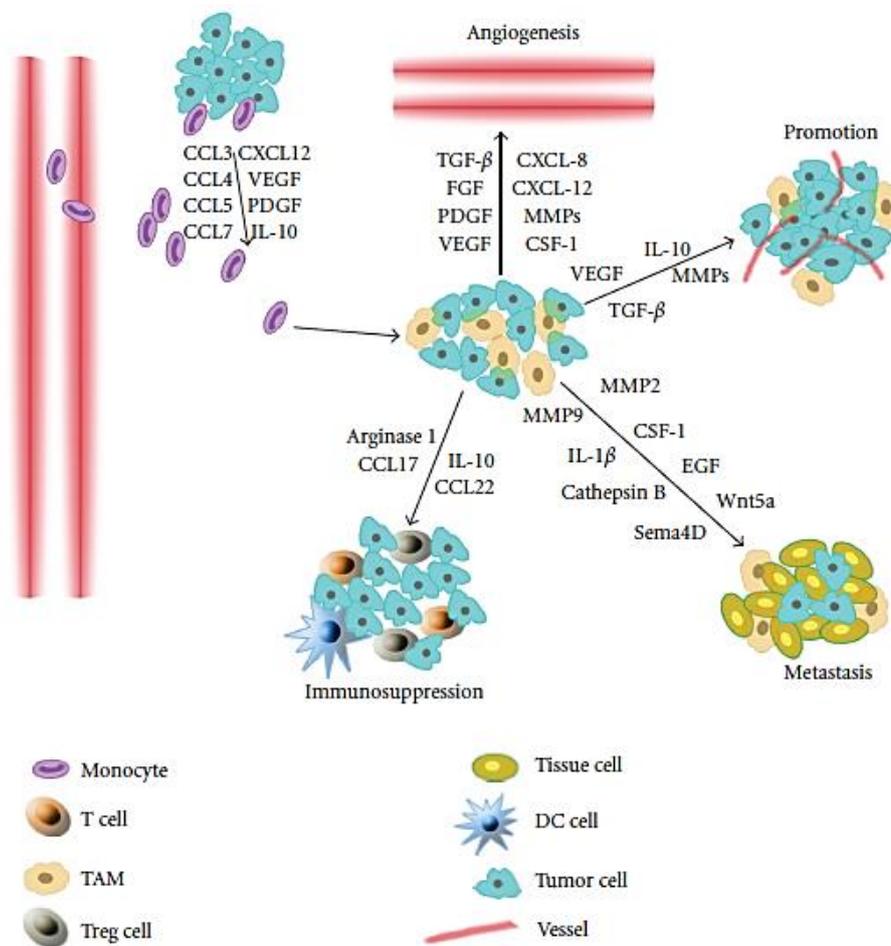
TGF $\beta$  inhibe également la production des cytokines pro-inflammatoires TNF $\alpha$ , d'IL-1 $\alpha$  et d'IL-18. Son action est plus faible et tardive que l'IL-10 (Bogdan et al. 1992). Il a une grande variété d'effets sur la prolifération, l'activation et la différenciation cellulaire (Martinez\* et al. 2008).

Les glucocorticoïdes, quant à eux, sont essentiels dans le maintien des fonctions homéostatiques. Leur reconnaissance par des récepteurs nucléaires provoque la répression de cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12) et de médiateurs tels que l'iNOS. De plus, les glucocorticoïdes augmentent l'expression de molécules anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et inhibent un grand nombre de gènes induits par l'IFN $\gamma$  (Martinez\* et al. 2008).

### iii. Tumor-Associated Macrophages (TAMs)

De tous les leukocytes, les macrophages sont ceux qui jouent le rôle le plus majeur dans la croissance tumorale. Les macrophages que l'on retrouve associés aux tumeurs forment le groupe des TAMs (Tumor-Associated Macrophages). Ils interviennent à chaque étape du développement du cancer et leur phénotype change entre les phases d'initiation tumorale, de progression et de métastases. On retrouve dans les tumeurs les profils M1 et M2. L'initiation tumorale peut être induite par la présence permanente de composés cytotoxiques et mutagènes (ex : espèces réactives de l'oxygène et d'azote) sécrétés par les macrophages M1 lors d'inflammations chroniques. La progression tumorale est, quant à elle, associée à un passage des TAMs d'un profil M1 à un profil plus M2, impliqué dans le remodelage des tissus et l'angiogenèse. Enfin, au stade métastatique les TAMs participent au recrutement et à l'invasion des cellules cancéreuses dans les niches métastatiques (Van Overmeire\* et al. 2014). La polarisation des macrophages varie également en fonction de leur localisation spatiale dans l'environnement tumoral. Par exemple, les TAMs situés dans les zones hypoxiques expriment l'arginase-2, marqueur M2, à la différence des macrophages présents près des vaisseaux. L'hypoxie environnementale et les facteurs HIF $\alpha$  (Hypoxia-inducible Factor) ont un rôle important dans la régulation de cette polarisation (Liu\* et al. 2014).

Le rôle des macrophages dans les tumeurs est encore controversé. Dans des tumeurs colorectales les TAMs pro-inflammatoires ont été décrits comme anti-tumoraux et associés à un bon pronostic. Dans ce type de cancers, les TAMs expriment une série de cytokines pro-inflammatoires (IFN $\gamma$ , IL-1, IL-6) qui activent une réponse immunitaire anti-tumorale chez les lymphocytes T. Cependant dans la plupart des cancers (du sein, de la prostate, ovarien, pulmonaire, mélanome, ...) les TAMs sont considérés comme anti-inflammatoires et corrélés à un mauvais pronostic (Hao\* et al. 2012, Van Overmeire\* et al. 2014). Les fonctions des TAMs dans la progression tumorale sont présentées dans la **Figure 4**.



**Figure 4 : Fonctions des TAMs dans la progression tumorale.** Les monocytes sont recrutés dans la tumeur par plusieurs chimiokines (CCL2, 3, 4, 5, 7, 8 et 12) et cytokines (VEGF, PDGF, IL-10) sécrétées par les cellules tumorales. La plupart des macrophages sont de type M2. Ils expriment des cytokines, chimiokines et protéases qui entraînent la prolifération des cellules tumorales, l'angiogenèse, les métastases et l'immuno-suppression. Source : (Hao\* et al. 2012).

Parmi les différentes sous-populations de TAMs, a été décrite une population de monocytes/macrophages pro-angiogéniques nommés TEMs (Tie2-Expressing Monocytes /

Macrophages). Ils sont caractérisés par l'expression de Tie2, un récepteur des angiopoïétines présents sur les cellules endothéliales et les cellules hématopoïétiques. Le profil angiogénique est retrouvé dans les macrophages TEMs isolés de tumeurs mais aussi dans les monocytes TEM isolés du sang. L'équipe de F. Pucci, a comparé le profil d'expression de gènes de TEMs isolés de tumeurs à ceux de TAMs, de macrophages péritonéaux, de monocytes circulants, de neutrophiles, et de cellules endothéliales. Au total l'expression de 280 gènes, impliqués dans l'angiogenèse, le remodelage tissulaire, la réponse immunitaire, l'adhésion cellulaire,..., a été mesurée par qPCR. Ainsi il fut établi que les TEMs sont bien une sous population de TAMs, distincte des cellules endothéliales exprimant elles aussi le récepteur Tie2. Bien que proches des TAMs, les TEMs expriment de façon spécifique des gènes codant pour des facteurs pro-angiogéniques et de remodelage tissulaire. Les marqueurs spécifiques des TEM définis par cette étude (Tie2<sup>+</sup> Lyve1<sup>+</sup> Mrc1<sup>+</sup> Cd163<sup>+</sup>) sont retrouvés exprimés par une grande proportion de macrophages embryonnaires et fœtaux qui apparaissent très tôt dans le développement au niveau des zones d'angiogenèse et de remodelage cellulaire (Pucci et al. 2009).

## II. Rôle des macrophages dans la réaction inflammatoire

### A. La réaction inflammatoire

La réaction inflammatoire (**Figure 5**) est une réponse défensive de l'organisme à des attaques qui peuvent être des agents infectieux, des éléments étrangers, des lésions tissulaires post-traumatiques,... . La réponse inflammatoire à ces attaques fait intervenir un grand nombre de cellules et de facteurs qui peuvent varier selon le contexte. Ci-dessous sont présentées de façon concise les principales étapes d'une inflammation stérile (sans intervention de pathogènes) comme dans le cas d'une ischémie ou d'une coupure non infectée.

Lorsque des tissus sont endommagés, une nécrose cellulaire est induite chez les cellules affectées directement par le dommage ou subissant l'hypoxie induite par le dommage, comme dans le cas d'une ischémie. Des déchets cellulaires, des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) et des composés du complément s'accumulent très rapidement. Les mastocytes et les macrophages présents dans les tissus sont alors activés et synthétisent des facteurs pro-

inflammatoires tels que le TNF $\alpha$ , l'histamine ou des protéases. De plus, la dégranulation des mastocytes favorisent la vasodilatation des vaisseaux. Suivant le gradient chimiotactique de facteurs pro-inflammatoires sécrétés (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, ...) les cellules immunitaires circulant dans le sang vont alors rejoindre le site lésé (Mackay\* et al. 2000).

Les neutrophiles sont les premières cellules immunitaires à être recrutées. Leur recrutement est permis par l'expression de molécules d'adhésion (E et P-sélectines, ICAM-1) par les cellules endothéliales situées à proximité de la zone lésée. Leur fonction principale est la phagocytose (Frangogiannis\* et al. 2002, Vinten-Johansen\* 2004).

Dans un deuxième temps ce sont les monocytes qui vont être recrutés et se différencier en macrophages inflammatoires. Tout comme les neutrophiles, les monocytes suivent le gradient pro-inflammatoire engendré dans la zone d'inflammation (C5a, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, ROS ...). Les macrophages ont plusieurs fonctions. Ils phagocytent les cellules mortes et les débris cellulaires. Ils nettoient aussi le tissu des neutrophiles apoptotiques ayant terminé leur action. En complément ils sécrètent des cytokines (Frangogiannis\* 2008).

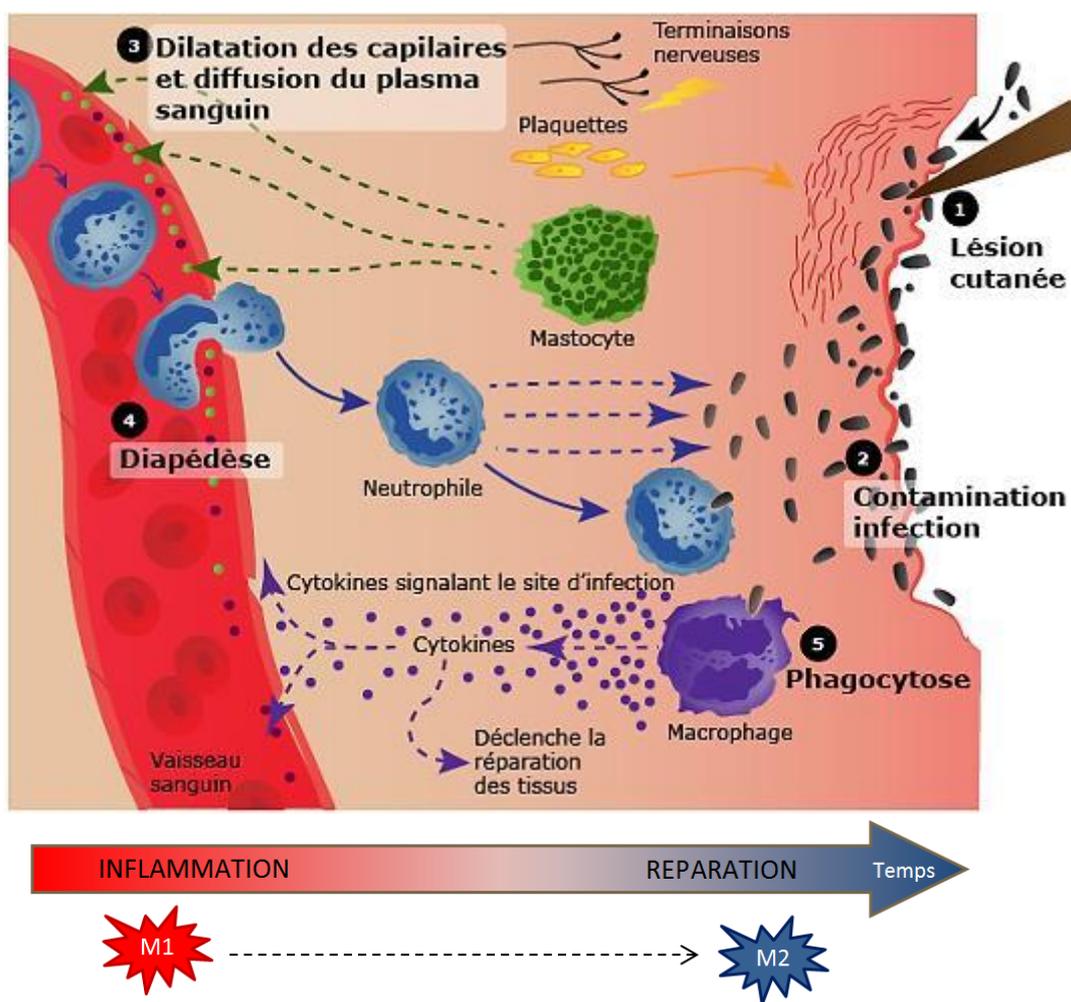
Dans les premiers temps de l'inflammation les cytokines et les autres facteurs sécrétés par les macrophages sont pro-inflammatoires. Ils entretiennent l'inflammation en recrutant d'autres cellules inflammatoires (macrophages, lymphocytes, ...). Ces macrophages correspondent à la population M1. Cependant, bien qu'essentiels à la réponse immunitaire, ces cytokines, telles que l'IL-1, l'IL-6 ou encore l'IL-23, ces ROS, et autres facteurs, peuvent engendrer des dommages à l'organisme. Il existe donc un système de régulation négative de l'inflammation afin d'éviter la destruction non contrôlée des tissus (Frangogiannis\* 2008).

Les signaux de désactivation proviennent soit des macrophages eux-mêmes soit des cellules environnantes. Deux cytokines sont principalement responsables de cette régulation. Il s'agit du TGF $\beta$  et de l'IL-10 (Mosser\* 2003). L'IL-10 va inhiber chez les macrophages inflammatoires la synthèse d'IL-6, d'IL-1 et de TNF $\alpha$  et va permettre la stabilisation de la matrice extra-cellulaire. Le TGF $\beta$ , dont une partie est produite par les macrophages apoptotiques, a un rôle double. Il désactive les macrophages et participe également à la transition entre la phase d'inflammation aiguë et la phase de réparation tissulaire en favorisant la fibrose (Frangogiannis\* et al. 2002, Frangogiannis\* 2008).

Les macrophages (M2) jouent également un rôle important dans la réparation tissulaire. Ils sécrètent des facteurs de croissances, favorisant la croissance des fibroblastes et

l'angiogenèse (VEGFA), ainsi que des protéases (MMPs) et des éléments de la matrice extra-cellulaire nécessaires au remodelage tissulaire.

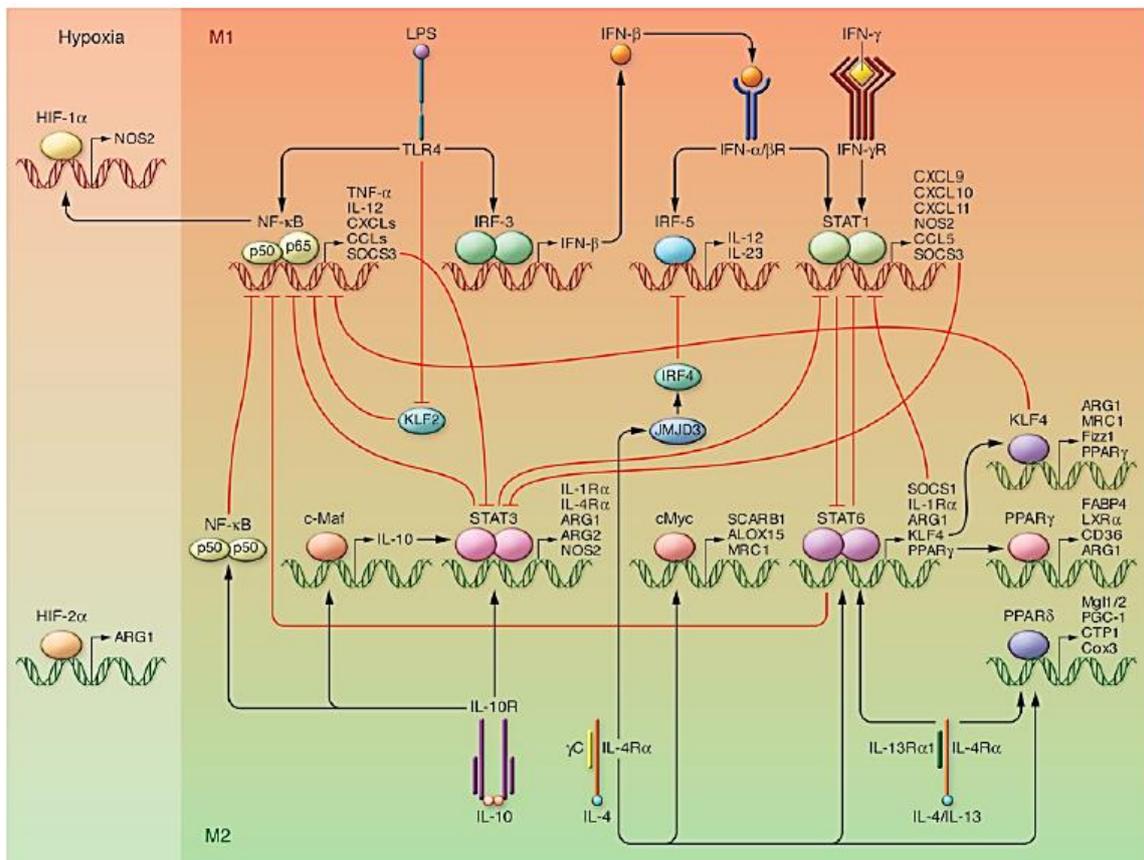
D'autres cellules participent à cette cicatrisation. Il s'agit, des fibroblastes, des cellules vasculaires et des péricytes. Ces cellules sont recrutées sur le site de cicatrisation par des facteurs sécrétés en grande partie par les macrophages. On observe pendant la phase de réparation la formation d'un réseau dense de capillaires. Dans un premiers temps dépourvus (ou pauvres) en péricytes, ces derniers vont être recrutés progressivement. Au final les vaisseaux non recouverts de péricytes vont régresser (Frangiannis\* 2008).



**Figure 5 : Les grandes étapes de la réaction inflammatoire.** Sur cette représentation de la réaction inflammatoire est schématisée l'infection par les pathogènes au niveau des plaies et leur phagocytose par les neutrophiles et macrophages. Si l'infection n'est pas enrayerée par la réponse immunitaire innée, la réponse adaptative est déclenchée (activation et recrutement des lymphocytes). Source : © Copyright 2000-2014 Maxicours, la réaction inflammatoire aiguë.

## B. Voies de signalisation impliquées dans l'inflammation et la polarité M1/M2

Un grand nombre de voies de signalisation et de facteurs de transcription ont été décrites comme étant impliquée dans l'inflammation. De même avec l'engouement récent pour la caractérisation des profils M1, M2s des macrophages la liste des facteurs impliqués dans les mécanismes de polarisation des macrophages ne cesse de s'allonger. C'est pourquoi, dans les paragraphes suivants, vous trouverez une description simplifiée des voies les plus étudiées. Dans la **Figure 6** ci-dessous est schématisé, de façon beaucoup plus détaillée, la plupart des voies qui seront abordées dans ce manuscrit (Sica\* et al. 2012).

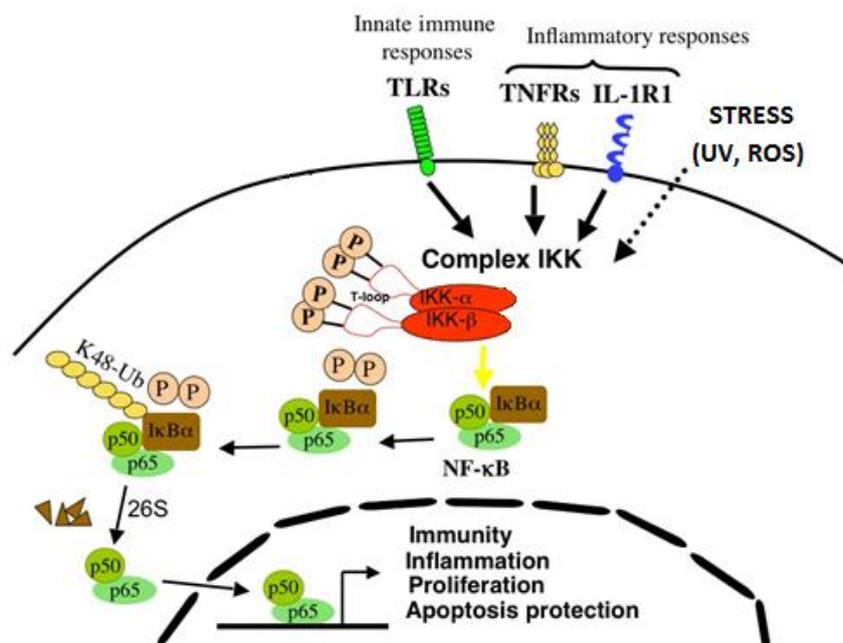


**Figure 6 : Principales voies de signalisation impliquées dans la polarisation des macrophages.** Les voies de signalisation impliquées dans la polarisation des macrophages en profil M1 sont présentées sur fond rouge. NF-κB et STAT1 ont un rôle prédominant dans l'induction des fonctions cytotoxiques et inflammatoires des macrophages. Les voies de signalisation impliquées dans la polarisation des macrophages en profil M2 sont présentées sur fond vert. STAT3 et STAT6, activés entre autres par IL-4/IL-13 et IL-10 sont prédominants dans l'activation du profil M2. PPAR $\gamma$  and PPAR $\delta$  contrôlent différents aspects de l'activation des macrophages M2 et du métabolisme oxydatif. KLF4 et KLF2 coopèrent avec STAT6 et suppriment la transcription dépendante de NF-κB/HIF-1 $\alpha$ . L'homodimère NF-κB p50 induit par IL-10 inhibe la polarisation M1. Source : (Sica\* et al. 2012).

## i. NF-κB

La signalisation NF-κB (Nuclear Factor-κB) a un rôle central dans l'inflammation en orchestrant l'expression de nombreux gènes pro-inflammatoires. NF-κB est une famille composée, chez les mammifères, de cinq facteurs de transcription : RelA (ou p65), RelB, c-Rel, NFκB1 (ou p50) et NFκB2 (ou p52). Le dimère le plus étudié et décrit comme entraînant l'expression de gènes codant pour des facteurs pro-inflammatoires est l'hétérodimère p65/p50 (RelA/p50). Un grand nombre de stimuli peut être à l'origine de l'activation de cette voie de signalisation. Parmi ces facteurs on peut nommer les cytokines TNFα, IL-1β, mais aussi les composants de la paroi bactérienne tels que le LPS ou encore les stress génotoxiques comme les UV ou les ROS (Hanada\* et al. 2002).

En condition basale IκB séquestre NF-κB dans le cytoplasme, le maintenant ainsi sous forme inactive. Lorsque les différents stimuli se lient à leurs récepteurs respectifs (TNFα/TNFR, IL-1/IL-1R, LPS/TLR, ...) des signalisations diverses aboutissent à l'activation du complexe IKK (IκB Kinase). Ce complexe IKK phosphoryle alors IκB, sur des résidus sérine spécifiques, entraînant son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome. Libéré d'IκB, le dimère NF-κB (p65/p50) transloque dans le noyau où il va lier les éléments activateurs des gènes cibles (*iNOS*, *Ccl5*, *Il-6*, *Il-12*, *Tnfa* ...) (**Figure 7**) (Hanada\* et al. 2002, Tugal\* et al. 2013).

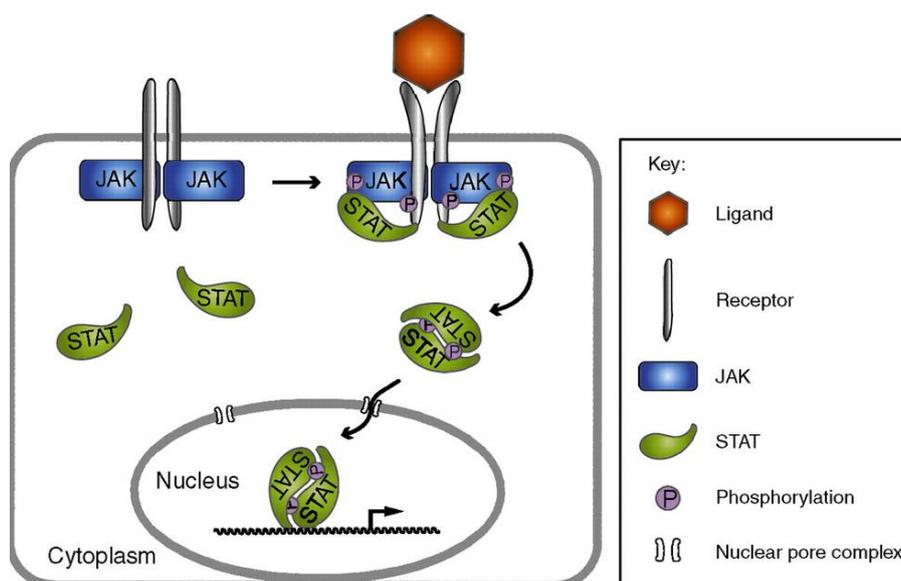


**Figure 7 : Signalisation NF-κB.** Source : Institut Pasteur (The NEMO Team)

La signalisation NF- $\kappa$ B possède des systèmes de régulation interne. En effet, l'hétérodimère p50/p52 fonctionne comme un répresseur puisqu'il ne possède pas les domaines nécessaires à l'activation transcriptionnelle, présents uniquement sur RelA, RelB et c-Rel. Dans les macrophages M2, présents dans des tumeurs chez la souris, des niveaux significatifs d'homodimères p50/p50 ont été retrouvés. L'IL-10 serait impliquée dans la formation de cet homodimère. La voie NF- $\kappa$ B, semble donc une voie clé dans la polarisation à la fois en M1 et en M2 des macrophages (Sica\* et al. 2012, Tugal\* et al. 2013).

## ii. JAK/STATs

Les cytokines pro et anti-inflammatoires influencent la polarisation des macrophages en passant par une signalisation JAK/STAT dépendante. Elles induisent l'homodimérisation et l'activation de leurs récepteurs spécifiques, entraînant l'activation des kinases associées à ces récepteurs, les JAKs (JAK1, JAK2, JAK3 et Tyk2). L'activation des kinases JAKs provoque la phosphorylation des domaines cytoplasmiques des récepteurs, créant ainsi des sites de liaison et de phosphorylation pour des protéines de signalisation appelées STATs (Signal Transducer and Activators of the Transcription). Les STATs, une fois activés par phosphorylation de résidus tyrosine, vont participer à la transcription des gènes cibles pro ou anti-inflammatoires (**Figure 8**). La durée de la signalisation JAK/STAT induite par les cytokines est régulée par une famille de protéines inhibitrices des kinases JAK, les SOCS (Suppressors Of Cytokine Signaling)(Hanada\* et al. 2002).



**Figure 8 : Signalisation JAK/STAT.** Source : (Arbouzova et al. 2006).

#### a. JAK1,2 / STAT1,2,3 : signalisation pro-inflammatoire

---

L'IFN $\gamma$  en se liant à son récepteur active le duo JAK1-JAK2, ce qui induit la phosphorylation et l'homodimérisation de STAT1. Cet homodimère va activer les gènes pro-inflammatoires tels que *iNOS* et *IL-12*.

Les IFN $\alpha$  et IFN $\beta$ , quant à eux, induisent l'hétérodimérisation de STAT1 et STAT2. Cette hétérodimérisation peut être induite indirectement par le LPS. En effet, l'activation pro-inflammatoire induite par le LPS et passant par la voie NF- $\kappa$ B aboutit à la sécrétion d'IFN $\beta$  qui va agir de façon autocrine et activer la signalisation STAT1/2. STAT1 est crucial pour l'activation M1 des macrophages.

Enfin, une signalisation pro-inflammatoire JAK1/STAT3 est déclenchée par la fixation de l'interleukine-6 sur son récepteur. Cette signalisation pro-inflammatoire STAT3 est inhibée par SOCS3, protéine exprimée en réponse aux cytokines pro-inflammatoires TNF $\alpha$  et IL-1 $\beta$  (Tugal et al. 2013).

#### b. JAK1,3 / STAT3,6 : signalisation anti-inflammatoire

---

STAT3 est également impliqué dans la réaction anti-inflammatoire déclenchée par IL-10. Il agit sous forme d'homodimère en réprimant la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12 et IFN $\gamma$  (Tugal et al. 2013).

Les cytokines IL-4 et IL-13 activent les couples JAK1/3 ou JAK1/Tyk2, respectivement. Ces couples phosphorylent STAT6 qui s'homodimérise et active les gènes caractéristiques de la polarisation M2a dont ceux de l'Arg1, MMR, Fizz1 et Ym1 (Tugal\* et al. 2013).

#### iii. Smad

---

TGF $\beta$ , activateur anti-inflammatoire des macrophages, déclenche une signalisation Smads dépendante. Les récepteurs de type-I et -II de TGF $\beta$  phosphorylent les protéines Smads grâce à leur activité sérine/thréonine kinase. Les récepteurs de type I de TGF $\beta$  reconnaissent et phosphorylent les Smad 2 et 3 (R-Smad) qui s'associent avec Smad4 (Co-Smad) pour former un complexe participant au recrutement et à la liaison sur l'ADN de facteurs de transcriptions. Des Smads dits inhibiteurs (I-Smads) tels que Smad6 et 7 participent à une boucle de régulation négative. En effet, induits par TGF $\beta$ , ils se lient aux récepteurs activés et gênent la liaison de Smad2 et 3 (Hanada\* et al. 2002).

#### iv. Autres voies de signalisation

---

Parmi les voies de signalisation responsables du maintien du phénotype pro-inflammatoire des macrophages on recense la voie JNK/AP-1 (Activated Protein-1) dont les cibles se recoupent avec celles de NF- $\kappa$ B. AP-1 est induit par la signalisation TNF $\alpha$ /STAT4.

Les Facteurs Régulateurs d'IFN (IRF), recensés au nombre de neuf chez les mammifères, sont impliqués dans la polarisation M1/M2 des macrophages. La stimulation de TLR4 par le LPS active IRF3 qui induit la transcription du gène codant l'IFN $\beta$  pro-inflammatoire. De son côté IRF4 a été décrit comme régulant la polarisation M2, en aval de l'activation de STAT6 par l'IL-4 (Tugal et al. 2013).

Les Facteurs Induits par l'Hypoxie (HIFs) sont eux aussi impliqués dans la polarisation des macrophages en M1 et M2. Il existe deux isoformes d'HIF $\alpha$  : HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$ . Pendant l'activation M1, les cytokines pro-inflammatoires induisent l'activité d'HIF-1 $\alpha$ , tandis que lors de l'activation alternative des macrophages c'est l'isoforme HIF-2 $\alpha$  qui est exprimé. HIF-1 $\alpha$  est induit par NF- $\kappa$ B et entraîne la transcription d'*iNOS*. HIF-2 $\alpha$  au contraire limite la production d'oxyde nitrique en induisant l'expression d'*Arg1* (Tugal et al. 2013).

Dans les tissus adipeux les récepteurs nucléaires PPARs (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors) sont impliqués dans la polarisation des macrophages. PPAR- $\gamma$  inhibe les trois classes de facteurs de transcription pro-inflammatoires, STAT, NF- $\kappa$ B et AP-1. Il stabilise un complexe de corecepteurs sur le promoteur des gènes cibles empêchant leur transcription. PPAR- $\gamma$  induit également l'expression de gènes associés au phénotype M2. Bien que constitutivement présent à faible niveau dans les macrophages, PPAR- $\gamma$  peut être induite par IL-4 et IL-13 via STAT6. Un autre PPAR, PPAR- $\delta$  est lui aussi induit par la signalisation IL-4/STAT6 et permet le maintien d'un phénotype protecteur M2 dans les tissus adipeux (Tugal et al. 2013).

### III. Rôle des macrophages dans l'angiogenèse

---

#### A. Angiogenèse : Généralités

---

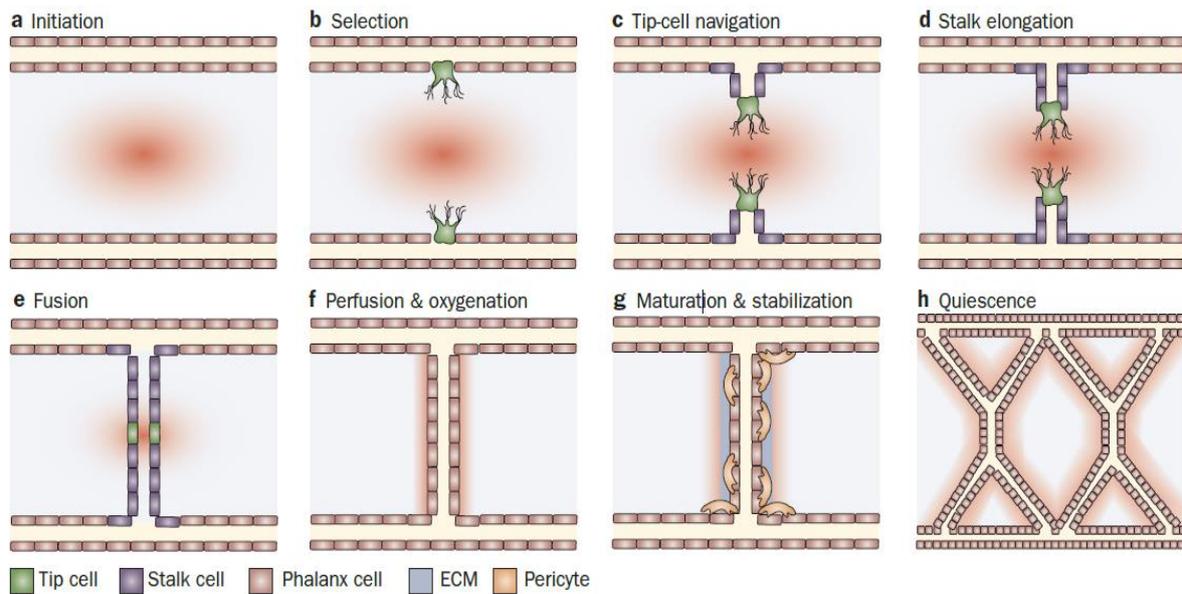
L'angiogenèse est décrite comme la formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants. Ce processus physiologique est impliqué dans la formation du système vasculaire lors du développement embryonnaire. Le système vasculaire des

vertébrés forme un réseau tubulaire branché d'artères, de capillaires et de veines permettant d'apporter aux tissus l'oxygène et les nutriments qui sont nécessaires à leur bon fonctionnement et d'éliminer les déchets de l'organisme en les transportant au niveau des organes de filtration tels que les reins ou les poumons. La formation de l'arbre vasculaire fait intervenir trois processus majeurs : la vasculogénèse, l'angiogénèse et l'artériogénèse. La vasculogénèse consiste en la formation d'un plexus vasculaire primitif, peu organisé, à partir de précurseurs endothéliaux appelés hémangioblastes. L'angiogénèse permet la croissance, l'organisation et le remodelage du réseau vasculaire primitif préexistant, par bourgeonnement des capillaires, afin de rendre ce réseau fonctionnel. Enfin, l'artériogénèse permet la maturation du réseau vasculaire par un recrutement de cellules musculaires lisses autour des tubes endothéliaux. L'angiogénèse physiologique a également lieu chez l'adulte au cours de la vascularisation cyclique de l'endomètre et des ovaires chez la femme ou des processus de cicatrisation.

Une anomalie du processus angiogénique est impliquée dans de nombreuses pathologies. En effet un excès d'angiogénèse peut être observé dans les pathologies inflammatoires (psoriasis, arthrites), les cancers ou entraîner des pathologies oculaires (rétinopathies, dégénérescence maculaire liée à l'âge), tandis qu'un défaut d'angiogénèse peut induire l'apparition d'une ischémie tissulaire et une réparation tissulaire insuffisante.

L'angiogénèse est un processus complexe nécessitant une fine régulation et résultant de la balance entre l'action de facteurs anti- ou pro-angiogéniques. C'est une réponse à l'hypoxie. Elle est déclenchée par l'activation des cellules endothéliales par des facteurs pro-angiogéniques, dont le VEGF, produit par des cellules non vasculaires présentes dans le tissu hypoxique. L'hypoxie agit également sur la matrice extracellulaire en induisant, entre autres, la libération du VEGF qu'elle stocke (Germain\* et al. 2010).

Les mécanismes mis en jeu lors de l'angiogénèse sont la dégradation de la matrice extracellulaire et de la membrane basale, la migration et la prolifération de cellules endothéliales et la formation de tubes endothéliaux avec une nouvelle membrane basale. Des péricytes, voire des cellules musculaires lisses viennent alors soutenir ces néo-vaisseaux pour les stabiliser. Les différentes étapes de l'angiogénèse sont décrites dans la **Figure 9**.



**Figure 9: Les différentes étapes de l'angiogenèse.** L'angiogenèse se décompose en deux phases : une phase d'activation (étapes a-f) et une phase de maturation (étapes g et h). **(a) Initiation** : En réponse à une hypoxie, des cellules non vasculaires expriment des facteurs de croissance et créent notamment un gradient de VEGF (tâche rouge diffuse). **(b) Sélection** : Les cellules endothéliales exposées à la plus forte concentration en VEGF sont sélectionnées et deviennent des tip cells (en vert). **(c) Navigation des Tip cells** : Les tip cells initient le bourgeonnement en suivant le gradient de VEGF et envahissent le tissu environnant en émettant de nombreux filopodes qui jouent le rôle de senseurs. **(d) Elongation des Stalk cells** : Le bourgeonnement ou «sprouting» s'allonge grâce à la prolifération des cellules endothéliales stalk cells (violet) qui se situent juste derrière la tip cell. **(e) Fusion** : Le nouveau branchement se connecte avec un autre branchement via la fusion des tip cells. **(f) Perfusion et oxygénation** : La formation de la lumière vasculaire permet au sang de circuler et ainsi l'oxygénation du tissu qui entraîne ainsi une diminution de la concentration en VEGF. **(g) Maturation et stabilisation** : Les cellules endothéliales sécrètent alors des facteurs de maturation (PDGF-B, TGF $\beta$ ) qui recrutent des péricytes (en orange) et stimulent la synthèse d'une matrice extracellulaire (ECM, en bleu) autour du néo-vaisseau permettant sa maturation et stabilisation. **(h) Quiescence** : Dans le réseau vasculaire stable, fonctionnel et mature, les cellules endothéliales adoptent un phénotype de quiescence et sont appelées phalanx cells (beige). Source : (Carmeliet et al., Nature reviews Clinical oncology 2009)

Le processus angiogénique fait intervenir différents types cellulaires: les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les cellules inflammatoires, les fibroblastes, mais aussi de nombreux composants de la matrice extracellulaire.

Les macrophages, considérés à l'origine comme des cellules immunitaires et inflammatoires, ont été progressivement décrits comme impliqués dans la régulation positive et négative de l'angiogenèse. Ils l'induisent par la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques mais aussi par la destruction et le remodelage de la membrane basale et de la matrice extracellulaire. Ces cellules stimulent et entraînent également d'autres cellules dans

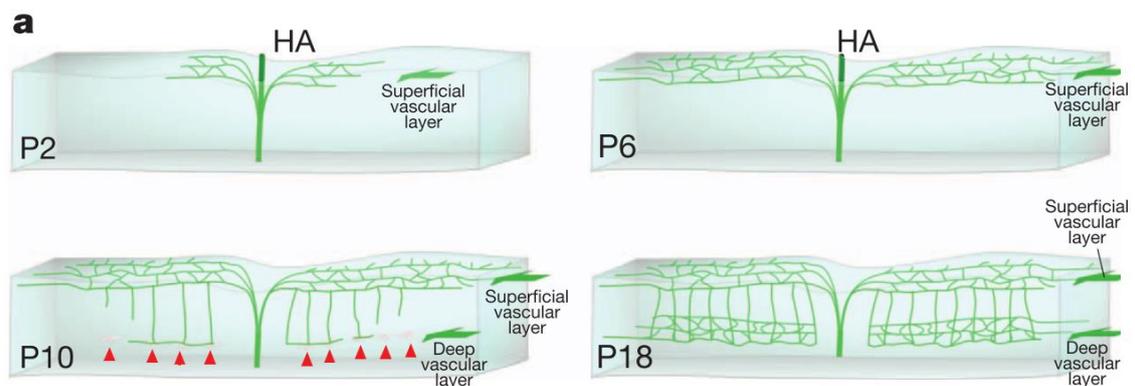
un processus pro-angiogénique. Elles possèdent aussi la capacité de limiter l'angiogénèse par l'inhibition et la stimulation de la sécrétion, respectivement, de facteurs pro-inflammatoires et anti-inflammatoires.

L'implication des macrophages dans l'angiogénèse physiologique et pathologique fut décrite dans plusieurs organes et contextes pathologiques dont les principaux sont décrits ci-dessous. Les données présentées seront concentrées sur les connaissances chez la souris et l'Homme.

## B. Angiogenèse physiologique

### i. Rétine

Chez la souris, à la naissance la rétine est avasculaire. Le développement du réseau vasculaire se fait les premières semaines après la naissance en commençant par la formation d'un réseau vasculaire primaire. Ce réseau se développe à partir du nerf optique vers la périphérie de la rétine. S'en suit la formation de plexus vasculaires profonds. La cinétique de formation du réseau vasculaire de la rétine, avec ses différents plexus, est schématisée dans la figure suivante (**Figure 10**).

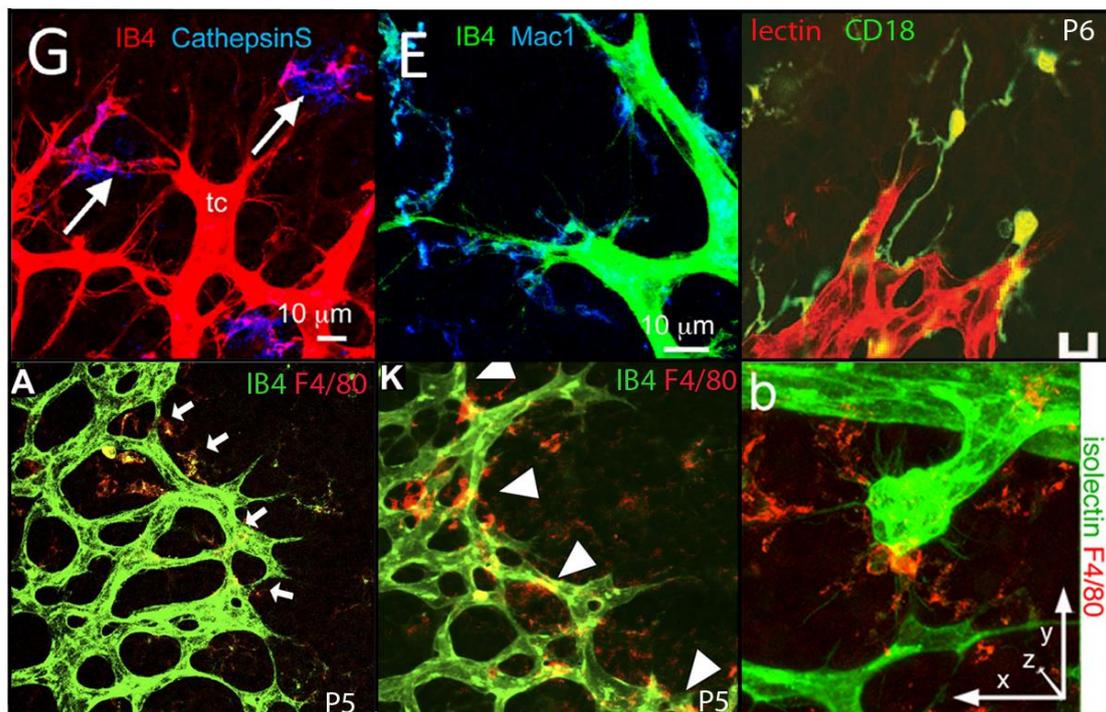


**Figure 10: Représentation schématique du réseau vasculaire de la rétine à 2, 6, 10 et 18 jours postnatal.** L'angiogénèse rétinienne commence chez la souris le jour de la naissance. Elle débute par la formation du plexus vasculaire superficiel les sept premiers jours (P0 à P7). A partir de P8 et jusqu'à P14, les « sprouts » angiogéniques descendent verticalement à travers les couches de la rétine. Ils tournent alors de nouveau et forment des branchements les uns avec les autres pour former la couche vasculaire profonde, parallèle à la couche superficielle. Source : (Stefater et al. 2011)

Les macrophages envahissent la rétine avant le début de la vascularisation (Rymo et al. 2011) et sont fortement présents lors de la formation de ce réseau vasculaire comme le montrent Kataoka et al. par marquage des microglies à 7 (P7) et 17 (P17) jours après la naissance (Kataoka K. et al. 2011).

Chez l'Homme la rétine se vascularise au cours du développement embryonnaire. Là encore des microglies apparaissent dès la dixième semaine de gestation et sont présents dans la rétine lorsque la vascularisation débute (Diaz-Araya CM 1995, Checchin et al. 2006).

Plusieurs études faites chez l'Homme (Diaz-Araya CM 1995), le rat (Ashwell KW 1989) ou encore la souris (Checchin et al. 2006, Outtz et al. 2011, Rymo et al. 2011, Stefater et al. 2011) ont montré la présence des macrophages en contact très proche des vaisseaux lors de la formation du réseau vasculaire rétinien. Ces macrophages sont visualisés aussi bien au niveau des « tips cells », au front de migration du réseau, qu'au niveau des zones d'anastomoses où les vaisseaux sanguins se connectent entre eux (**Figure 11**).

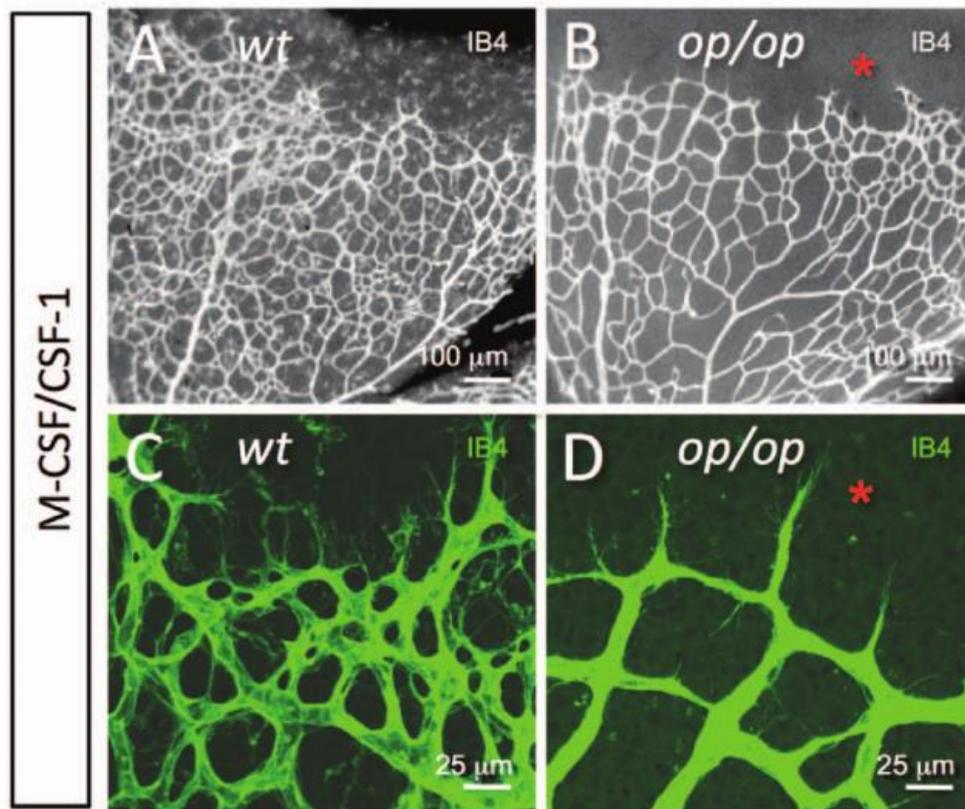


**Figure 11: Présence de macrophages au contact des vaisseaux en formation dans la rétine.** Compilation d'immuno-marquages issus de plusieurs études faites chez la souris sur le rôle des macrophages dans le développement rétinien. Les cellules endothéliales sont marquées par l'isolectineB4 et les macrophages par, selon les études, des anticorps anti-F4/80, -Mac1, -CD18 et -cathepsineS. Source : (Checchin et al. 2006, Outtz et al. 2011, Rymo et al. 2011, Stefater et al. 2011).

La déplétion pharmacologique des macrophages résidents (microglies) est associée à une diminution de la vascularisation chez le rat. Des liposomes contenant du clodronate de disodium sont injectés en intravitréen ou en intrapéritonéal chez des rats nouveaux nés afin de dépléter les macrophages respectivement résidents ou systémiques. Cinq jours après l'injection les rats, injectés en intravitréen, présentent un réseau vasculaire moins développé et moins dense. Ce retard de croissance peut être restauré par injection de microglies dans le vitré chez les rats traités au clodronate (Checchin et al. 2006).

Chez la souris, Kubota et al. observent à P2 et P4 un nombre de branchements des vaisseaux beaucoup moins dense dans les rétines des souris dépourvues de macrophages ( $csf-1^{op/op}$ ) que dans celles de souris contrôles. Ils excluent un potentiel rôle du VEGF mais mettent en évidence une diminution d'expression des métalloprotéinases MMP-9 et MMP-2 dans les rétines de ces souris  $csf-1^{op/op}$ . Ces MMPs sont connues pour participer au remodelage des vaisseaux en agissant avec des protéines de la matrice extracellulaire, telle que la fibronectine. Trois mois après la naissance la différence de branchement n'est plus visible. Le M-CSF, impliqué dans la formation des macrophages, contribuerait donc au remodelage vasculaire développemental, indépendamment de VEGF, mais ne participerait pas à la maintenance du réseau vasculaire chez l'adulte (Kubota et al. 2009).

Ces résultats sont confirmés par l'équipe de Rymo sur des souris  $csf-1^{op/op}$  et des souris  $PU.1^{-/-}$  dépourvues de microglies. Ils observent entre P1 et P5 la formation d'un réseau vasculaire rétinien beaucoup moins dense que chez des souris contrôles (**Figure 12**) (Rymo et al. 2011).



**Figure 12: Morphologie du plexus vasculaire rétinien.** Observations faites à P6 chez des souris dépourvues de macrophages (*op/op*) et contrôles (*wt*). Marquage vasculaire par l'isolectine B4. L'absence de microglies (marqués par l'isolectine B4) est bien visible à l'avant du réseau vasculaire chez les souris *op/op* (B) comparées aux contrôles (A). Densité vasculaire plus faible (A et B) et orientation des filopodes perturbée (C et D) chez les souris *op/op*. Source : (Rymo et al. 2011)

Comme décrit plus haut, ils visualisent par immuno-marquage sur rétine entière la présence de macrophages au contact des vaisseaux dans les zones d'anastomoses vasculaires (**Figure 11**). La culture *in vitro* d'anneaux d'aortes, en présence ou absence de microglies, confirme la stimulation de l'angiogenèse et de la formation de branchements par les microglies. Cependant cette étude d'angiogenèse *in vitro* établit que le contact physique entre les microglies et les cellules endothéliales n'est pas nécessaire pour l'action angiogénique des microglies. Les microglies agiraient donc sur le branchement des vaisseaux par sécrétion de facteurs pro-angiogéniques (autre que le VEGFA) (Rymo et al. 2011).

L'équipe de Outtz quant à elle avance l'idée d'une interaction des macrophages et des cellules endothéliales aux zones d'anastomose via une interaction entre Notch1 et Dll4. Ils s'appuient sur un nombre plus faible de macrophages au niveau des branchements des vaisseaux et une altération de l'anastomose au front de migration chez des souris

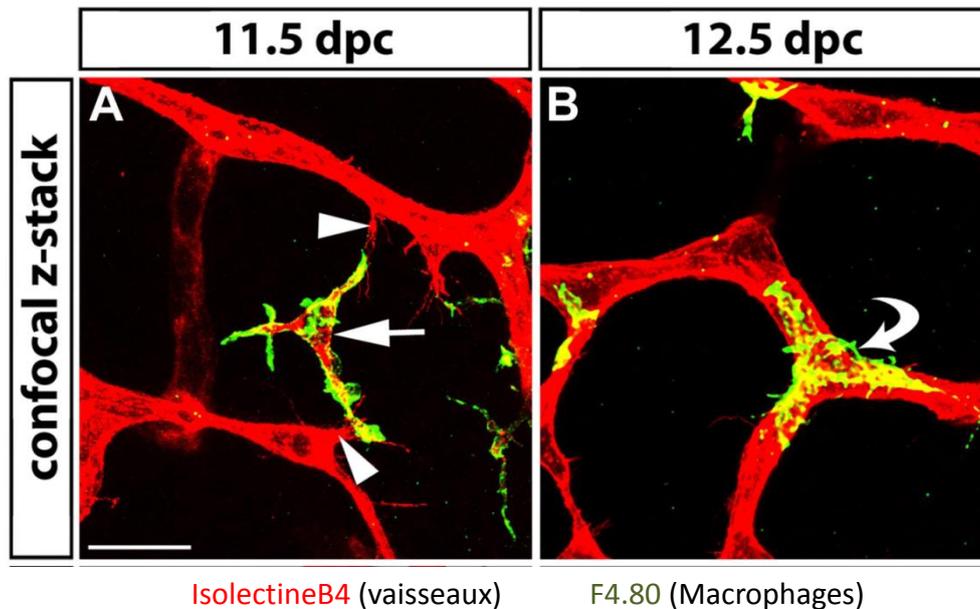
LysMcre ;Notch1<sup>flox/flox</sup>, dépourvues de Notch1 dans les macrophages. En outre, par immuno-marquage, ils visualisent aux sites d'anastomose une expression de Dll4 par les « tips cells » et l'activation d'une signalisation Notch dans les macrophages. Les macrophages faciliteraient ainsi l'anastomose en jouant un rôle de « connecteurs » entre les cellules endothéliales (Outtz et al. 2011).

Bien que la présence et l'importance des macrophages dans la formation des vaisseaux aient été établies à plusieurs reprises, leur fonction exacte reste encore à déterminer. Entre autres l'importance d'un contact physique entre les macrophages et les cellules endothéliales n'a pas été clairement prouvée.

## ii. Cerveau

---

Tout comme dans la rétine, les macrophages semblent être impliqués dans la formation du réseau vasculaire cérébral. Une étude fut menée en 2010 par Fantin et al. sur le rôle des macrophages dans le développement embryonnaire du réseau vasculaire cérébral chez la souris. Des immuno-marquages des cellules endothéliales et des macrophages, révèlent la présence de macrophages au contact des cellules endothéliales. Cette observation est faite aux différents stades de formation du réseau vasculaire et notamment lors des étapes de fusions de vaisseaux voisins, nécessaires à la formation d'un réseau complexe. Les macrophages sont très souvent localisés au niveau des jonctions des vaisseaux comme le montrent les photos de microscopie confocale présentées ci-après (**Figure 13**) (Fantin et al. 2010).



**Figure 13: Présence de macrophages aux jonctions vasculaires lors de la formation du cerveau.** Immuno-marquages réalisés sur des cerveaux de souris aux stades embryonnaires E11.5 et 12.5. Vaisseaux et macrophages marqués respectivement par l'isolectineB4 (rouge) et le F4/80 (vert). Les macrophages interagissent avec les filopodes de deux cellules endothéliales (tips cells) à E11.5. Macrophage positionné au niveau du branchement de trois vaisseaux à E12.5. Source : (Fantin et al. 2010)

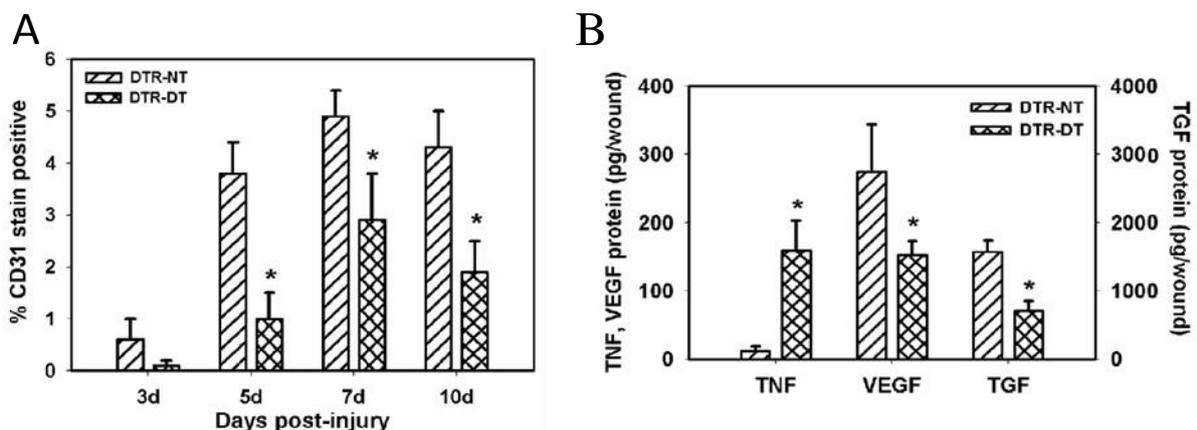
L'utilisation de souris  $PU.1^{-/-}$ , dépourvues de macrophages, révèle une réduction du nombre d'intersections entre les vaisseaux en absence de macrophages. Des études supplémentaires les amènent à proposer un modèle dans lequel des gradients de VEGF induiraient la formation de « tip cells » et la croissance des vaisseaux tandis que les macrophages agiraient dans un deuxième temps pour promouvoir l'anastomose, indépendamment du VEGF.

### iii. Cicatrisation

Suite à un dommage tissulaire au niveau de la peau, l'organisme met en place un mécanisme de cicatrisation qui se décompose en trois phases : inflammation (voir le paragraphe correspondant), prolifération et remodelage (Crowther\* M. 2001). L'angiogenèse joue un rôle majeur dans le processus de cicatrisation. En effet, la formation de nouveaux vaisseaux est nécessaire pour pallier au manque d'oxygène, de nutriments et à l'accumulation de déchets métaboliques engendrés par la destruction tissulaire. Les macrophages participent à cette angiogenèse en intervenant à la fois pendant la phase de prolifération et pendant la phase de remodelage. En phase de prolifération ils participent à la synthèse de matrice

extra-cellulaire, au recrutement et à la prolifération des cellules endothéliales. Lors du remodelage ils jouent un rôle majeur dans le remodelage de la matrice extra-cellulaire et la régression des nouveaux vaisseaux nécessaire à la formation d'un réseau vasculaire fonctionnel (Crowther\* M. 2001, Lingen\* 2001).

Luisa DiPietro qui a beaucoup travaillé sur le processus de cicatrisation des plaies a montré avec son équipe en 2009 que l'élimination spécifique des macrophages chez la souris est préjudiciable à la cicatrisation. Ils ont utilisé des souris transgéniques exprimant le récepteur de la toxine diphtérique sous contrôle du promoteur du gène CD11b pour éliminer spécifiquement les macrophages pendant la cicatrisation. Ainsi ils ont observé en absence de macrophages, un retard de ré-épithélialisation, une diminution de formation de collagène, une diminution de l'angiogenèse (**Figure 14**) et une diminution de la prolifération cellulaire. Ces modifications phénotypiques sont associées à une augmentation du niveau de TNF $\alpha$  et une diminution des niveaux de TGF $\beta$  et VEGF dans la plaie, cinq jours après formation de la blessure (**Figure 14**) (Mirza et al. 2009).



**Figure 14: Impact de l'ablation des macrophages sur l'angiogenèse et la sécrétion de cytokines lors de la cicatrisation d'une plaie cutanée chez la souris.** Une excision de peau est réalisée sur le dos de souris transgéniques DTR. Ces souris expriment le récepteur à la toxine diphtérique (DTR) humaine sous le promoteur de CD11b, exprimé par les macrophages. Ainsi l'injection intrapéritonéale de toxine diphtérique (DT), toxique pour les cellules, permet l'élimination spécifique des macrophages au moment souhaité (souris DTR-DT). Les souris DTR non injectées (DTR-NT) servent de contrôles. L'injection de DT est faite au moment de la formation de la blessure et 48h après pour dépléter les macrophages lors de la cicatrisation. **(A) Analyse de l'angiogenèse entre 3 et 10 jours post-blessure.** Réalisation d'immuno-marquage sur cryosections de peau avec un anticorps anti-CD31. On observe une augmentation de la densité vasculaire entre 3 et 7 jours post-blessure chez les souris contrôles. Cette densité est réduite chez les souris dépourvues de macrophages. **(B) Analyse de l'expression protéique de TNF $\alpha$ , VEGF et TGF $\beta$ 1 à 5 jours post-blessure.** En absence de macrophages, la quantité de TNF $\alpha$  dans la plaie est plus forte. A l'inverse VEGF et TGF $\beta$ 1 sont moins présents. Source : (Mirza et al. 2009).

Une étude quasiment similaire fut menée la même année par Goren et al. Ils ont utilisé la même stratégie d'élimination spécifique des macrophages, pendant la période de cicatrisation, par la toxine diphtérique. Cependant dans leur cas le promoteur utilisé pour l'élimination spécifique des macrophages n'était pas celui du gène CD11b mais celui de la lysosymeM. Ils observent eux aussi un retard de cicatrisation, en absence de macrophages dans la plaie, associé à une forte expression des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$  et MCP1 et une plus faible expression du TGF $\beta$  anti-inflammatoire. Ils mettent également en évidence une dérégulation de l'expression du VEGF responsable d'un déficit de néo-vascularisation de la plaie (Goren et al. 2009).

D'après les travaux de Lucas et al. le retard d'angiogenèse induit par une diminution de TGF $\beta$  et VEGF, cinq jours après la blessure, serait dû à l'absence de macrophages en début de phase de réparation (phase inflammatoire). Plus tard, en milieu de phase de réparation, les macrophages agiraient sur la stabilité vasculaire tandis qu'une perte de macrophages en phase plus tardive n'aurait pas d'influence sur la réparation tissulaire (Lucas et al. 2010).

Les travaux menés semblent montrer que les macrophages favoriseraient la cicatrisation en régulant l'environnement cytokinique dans la plaie.

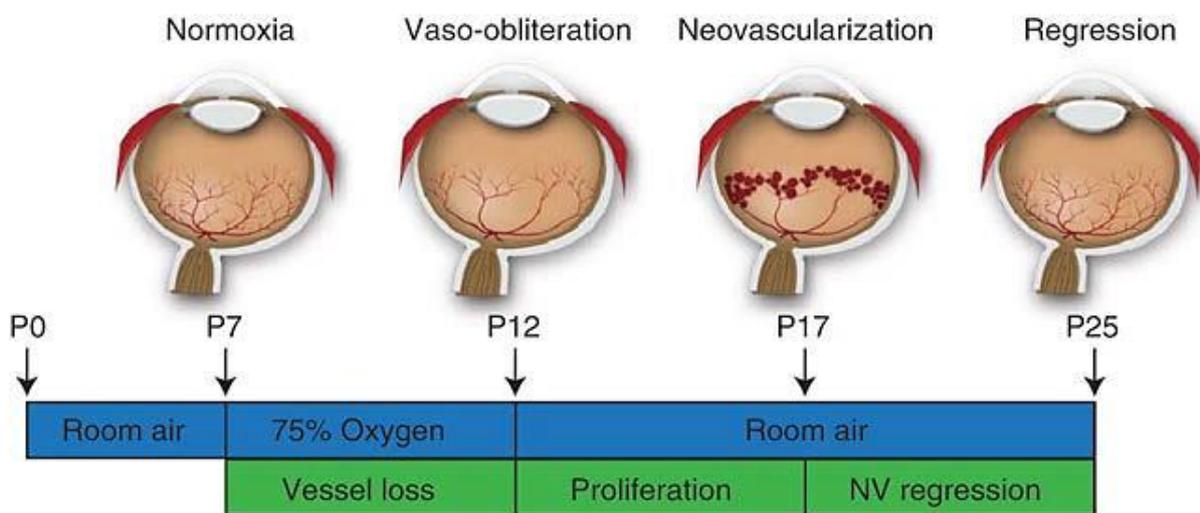
## C. Angiogenèse pathologique

### i. Rétinopathie

Dans l'œil le réseau vasculaire se développe au niveau de la rétine au cours du développement. Dans certaines conditions pathologiques l'angiogenèse rétinienne peut être réactivée en réponse à une hypoxie. Les tissus ischémiques relarguent des cytokines angiogéniques dont le VEGF. Cette angiogenèse pathologique se développe à la surface de la rétine, contrairement à l'angiogenèse intra rétinienne physiologique, et induit une cécité (Zou et al. 2010). C'est le cas chez les prématurés exposés à un air trop riche en oxygène. Une fois remis en normoxie l'organisme réagit à l'hypoxie relative par la formation de nouveaux vaisseaux. De même chez les patients diabétiques, on observe très souvent une rétinopathie diabétique qui se traduit par une destruction du réseau vasculaire. L'hypoxie induite par cette perte de vaisseaux est responsable d'une néovascularisation.

Chez la souris un modèle de rétinopathie induite par l'oxygène (OIR) est utilisé pour étudier les rétinopathies ischémiques (**Figure 15**). Plusieurs études utilisant ce modèle d'OIR

ont montré le rôle de macrophages dans le processus d'angiogenèse induit par l'ischémie. L'exposition à de fortes doses d'oxygène inhibe le développement vasculaire et entraîne ainsi la formation d'une zone avasculaire au centre de la rétine. De retour en normoxie (hypoxie relative), le réseau vasculaire se reforme depuis les extrémités jusqu'au centre de la rétine. Cette revascularisation peut être considérée comme une angiogenèse physiologique. De plus, des amas vasculaires se forment de façon anarchique, à la limite entre la zone vasculaire et avasculaire, et envahissent la surface de la rétine. L'angiogenèse pathologique responsable de ces amas vasculaires est caractéristique de ce modèle (Zou et al. 2010).



**Figure 15: Représentation schématique du modèle d'OIR (Rétinopathie Induite par l'Oxygène) chez la souris.** Les souris nouveau-nées sont laissées avec leur mère dans un environnement normoxique jusqu'à 7 jours après leur naissance (P7). Le développement vasculaire se fait normalement. A P7 les souris sont placées dans un environnement contenant 75% d'oxygène qui inhibe la croissance des vaisseaux rétiniens et cause une perte significative de vaisseaux. A P12 les souris sont remises à l'air ambiant. La rétine avasculaire devient hypoxique, entraînant à la fois une reprise de la croissance normale des vaisseaux et une néovascularisation pathologique. La néovascularisation (NV) atteint son maximum à P17. Rapidement après, la néovascularisation régresse et à P25 la résolution est totale. Source : (Connor et al. 2009).

Kataoka et al. ont montré la présence de macrophages concentrés dans ces zones d'amas vasculaires. La transplantation de cellules de moelle osseuse exprimant la GFP, ainsi que l'injection de macrophages péritonéaux exprimant la GFP, chez des souris soumises à une hyper-oxygénation ont confirmé un fort recrutement de macrophages dans ou autour des zones d'amas cellulaires (comparé à des souris restées en normoxie). Une partie des macrophages retrouvés dans la zone d'angiogenèse pathologique proviennent de l'humeur

vitreuse. La déplétion sélective des macrophages vitréens par injection de liposomes contenant du clodronate de disodium, réduit la formation des amas vasculaires (Kataoka K. et al. 2011).

De même chez des souris déficientes en macrophages ( $csf-1^{op/op}$ ), une forte diminution du nombre d'amas vasculaires est observée en hypoxie relative (P16) par rapport aux souris contrôles. En revanche la revascularisation physiologique de la zone avasculaire est augmentée. Des résultats similaires seraient observés chez des souris  $MMP-9^{-/-}$  (Kubota et al. 2009).

Dans une autre étude, l'injection intravitréenne de cellules myéloïdes ( $CD14^+$ ), issues de sang de cordon ombilical humain, dans des souris soumises au protocole OIR, limite les dommages vasculaires (vaso-oblitération) pendant la période d'hyperoxie (P7-P12). Plus tard, en phase d'hypoxie relative (P17), ces cellules réduisent la néovascularisation (Marchetti et al. 2011). L'analyse transcriptomique des rétines après injection de cellules  $CD14^+$  révèle une expression élevée de marqueurs de macrophages M2 et de gènes régulant l'apoptose, l'inflammation et l'angiogenèse (TGF $\beta$ , STAT3, ...). Pour tester l'hypothèse d'un rôle de la polarisation des macrophages dans le phénotype de protection vasculaire observé, des macrophages différenciés *in vitro* en population M1 ou M2 sont injectés dans l'humeur vitreuse de souris. Ces souris sont ensuite placées en hyperoxie pendant cinq jours pour induire la rétinopathie ischémique. Les deux populations de macrophages, M1 et M2, réduisent l'oblitération vasculaire mais seule la population M2 limite la formation d'amas vasculaires caractéristique de la néovascularisation. De plus ces macrophages M2 recrutent des cellules endogènes exprimant le récepteur aux mannoses (cellules M2). Ainsi, les cellules  $CD14^+$  répondraient à leur environnement en adoptant un profil M2 qui régulerait l'inflammation et la réponse à l'hypoxie.

Bien que ces études montrent l'implication de populations de macrophages dans la néovascularisation rétinienne post-ischémie, le rôle exact de ces populations ne semble pas encore bien établi.

## ii. Inflammations chroniques

---

Les maladies inflammatoires chroniques telles que l'arthrite rhumatoïde et le psoriasis sont caractérisées par une prolifération des cellules du tissu enflammé ainsi qu'une migration et un recrutement de cellules inflammatoires. Une angiogenèse importante fait également partie des particularités de ces maladies. Elle est induite par une hypoxie relative qui s'explique par le fait que le besoin métabolique des tissus en constante prolifération dépasse les capacités d'apport en oxygène et nutriments du réseau vasculaire. Ainsi la formation de nouveaux vaisseaux participe à la boucle inflammatoire pathologique en apportant des nutriments et de l'oxygène et en permettant le recrutement de nouvelles cellules inflammatoires.

De nombreuses cellules sont à l'origine des signaux pro-angiogéniques (kératinocytes, fibroblastes, ...). Parmi ces cellules, les nombreux macrophages présents au site d'inflammation sont responsables de cette codépendance entre l'inflammation chronique et l'angiogenèse (Jackson\* et al. 1997).

Une étude d'immunolocalisation réalisée récemment sur des coupes de tissu synovial humain a révélé l'expression de MMP-2 et MMP-9 par les synoviocytes ainsi que certaines cellules immunitaires dont les macrophages. L'expression de ces métalloprotéines pourrait jouer un rôle important dans l'angiogenèse et donc la progression de l'arthrite rhumatoïde (Zhou et al. 2014).

## iii. Cancer

---

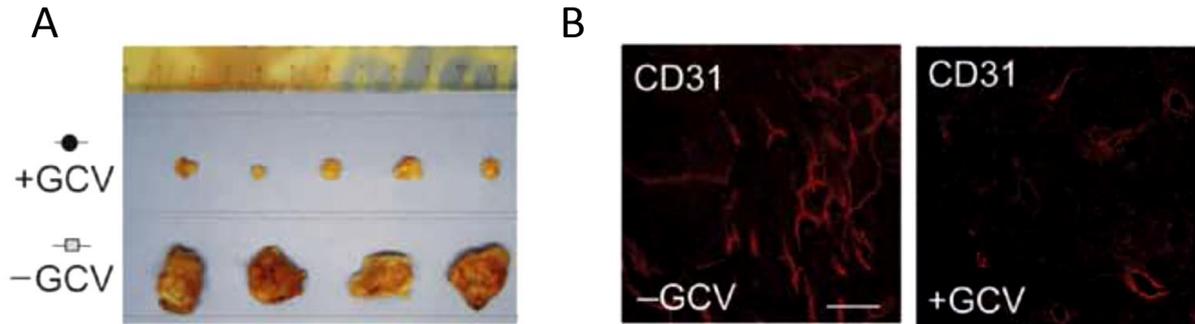
La survie et le développement des tumeurs dépendent d'événements et d'échanges biologiques nutritionnels et respiratoires assurés par le sang et la lymphe. La prolifération tumorale est associée à un accroissement des réseaux vasculaires soit à proximité de la tumeur, soit en intra-tumoral. Les tissus tumoraux sont capables d'augmenter leurs approvisionnements, en fonction de leurs besoins au sein de l'organisme, en orientant et en optimisant le développement des vaisseaux péri-tumoraux. En parallèle, la production par les cellules cancéreuses de facteurs de croissance stimulant la néoformation des vaisseaux lymphatiques constitue une des adaptations responsables de la propagation métastatique.

### a. Rôle des macrophages (TAMs et TEMs) dans l'angiogenèse tumorale

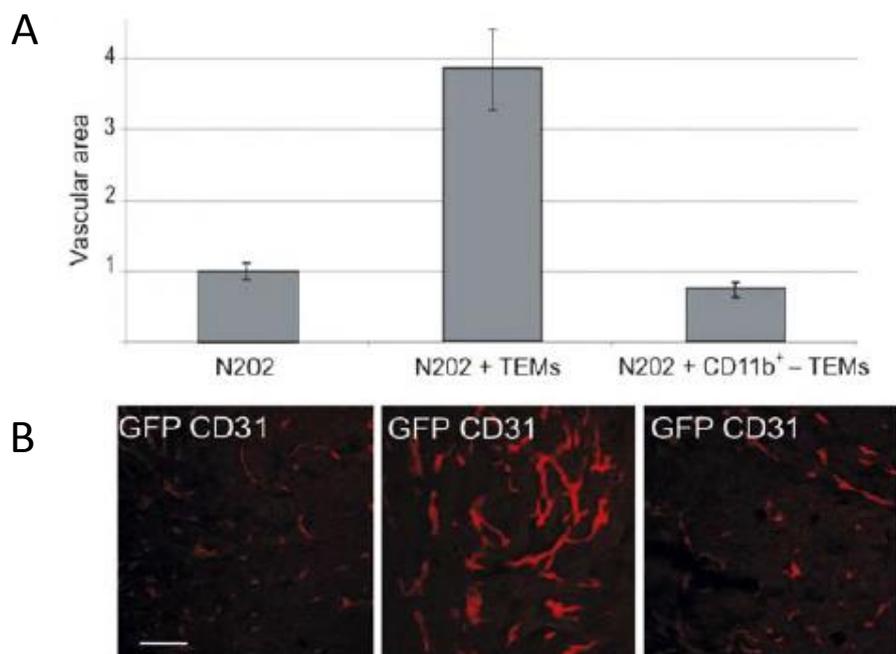
Au cours du développement tumoral se produit un switch angiogénique provoquant le passage d'un stade dormant avascularisé à un stade de croissance et de vascularisation aboutissant à un stade malin. Les macrophages TAMs sont fortement impliqués dans l'angiogenèse tumorale. Ils sont connus pour être une source importante de facteurs de croissance, cytokines et chimiokines pro-angiogéniques tels que VEGF, TNF $\alpha$ , PDGF, TGF $\beta$ , IL-8, bFGF, (...). VEGFA est connu pour être la principale cytokine pro-inflammatoire sécrétée par les TAMs. Les facteurs de transcription HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$  induits par l'hypoxie semblent être des régulateurs importants de l'expression du VEGFA par les macrophages. Les TAMs sécrètent également des protéases (MMP-2, MMP-7, MMP-9, ...) favorisant l'angiogenèse par la destruction et le remodelage de la matrice extra-cellulaire. Il a été montré dans un modèle de cancer pancréatique murin que le MMP-9 sécrété par les TAMs dégrade la matrice extracellulaire, libérant ainsi le stock extracellulaire de VEGFA. (Crowther\* M. 2001, Kemp et al. 2007, Schmid\* et al. 2012, Riabov\* et al. 2014).

Dans des modèles murins, l'inhibition ou l'absence d'expression de CSF-1 (Colony-stimulating factor 1), facteur nécessaire à la différenciation des monocytes, est responsable d'un retard dans le switch angiogénique et d'une diminution de vascularisation tumorale (Lin et al. 2006, Hao\* et al. 2012). Inversement le recrutement précoce de macrophages, chez des souris surexprimant CSF-1, induit la formation d'un réseau vasculaire précoce et très dense dans les tumeurs pré-malignes (Lin et al. 2006).

Parmi les TAMs, la sous-population TEMs, macrophages exprimant le récepteur Tie2, est particulièrement angiogénique. Les TEMs sont retrouvés dans le sang et dans les tumeurs des patients cancéreux (Venneri et al. 2007). L'élimination sélective des TEMs chez des souris porteuses de tumeurs humaines inhibe la croissance et l'angiogenèse tumorale (**Figure 16**) (De Palma et al. 2005, De Palma et al. 2007). Inversement, la coinjection dans des souris de cellules de carcinomes mammaires ou de gliomes humains et de TEMs issus de sang de patients, augmente la croissance tumorale et l'angiogenèse (**Figure 17**). Les vaisseaux formés sont plus larges, irréguliers et le nombre de branchements est augmenté (De Palma et al. 2005, Venneri et al. 2007).



**Figure 16: Impact de l'élimination sélective des TEMs sur la croissance et l'angiogénèse tumorale chez la souris.** Des cellules de carcinome mammaire (N202) sont injectées chez des souris Tie2-TK, possédant le gène de la tyrosine kinase (TK) sous le promoteur de Tie2. TK convertit le ganciclovir (GCV) en un produit toxique. L'injection de GCV chez les souris Tie2-TK va donc permettre l'élimination sélective des cellules exprimant Tie2. Les cellules sont traitées pendant 12 jours avec du GCV 8 ou 15 jours après l'injection des cellules tumorales. **(A)** Analyse de la taille des tumeurs. Le GCV induit une régression rapide de la masse tumorale. **(B)** Marquage des vaisseaux (CD31) dans des coupes de tumeurs. La densité vasculaire est réduite de façon drastique chez les souris traitées au GCV comparées aux souris non traitées. Source: (De Palma et al. 2005).



**Figure 17: Impact de l'injection de macrophages TEMs sur l'angiogénèse tumorale chez la souris.** Des macrophages GFP<sup>+</sup>-CD11b<sup>+</sup> de tumeurs N202 développées chez des souris transgéniques, exprimant la GFP sous le promoteur de Tie2 (Tie2-GFP), sont isolés par FACS. Ces macrophages TEMs sont co-injectés avec des cellules tumorales N202 chez des souris immunodéficientes (N202+TEMs). Comme contrôles, des cellules N202 sont injectées seules (N202) ou coinjectées avec des cellules GFP<sup>+</sup>-CD11b<sup>+</sup>, regroupant toutes les cellules myéloïdes à l'exception des TEMs (N202+CD11b<sup>+</sup>-TEMs). **(A)** Densité vasculaire dans les tumeurs 5 jours après injection des cellules tumorales N202 (et co-injections) dans les souris immunodéficientes. Les TEMs augmentent la densité vasculaire dans les tumeurs. **(B)** Coupes de tumeurs immuno-marquées avec des anticorps anti-CD31 (rouge) et GFP (vert). Echelle : 120µm. Source : (De Palma et al. 2005)

Les cellules endothéliales (CE) semblent être en partie responsables du maintien des TEMs dans l'environnement des vaisseaux sanguins. En effet les CE activées produisent de l'angiopoïétine-2 (ANG2) qui va induire l'expression de Tie2 par les macrophages. L'injection d'anticorps bloquant anti-ANG2 ne gêne pas le recrutement des TEMs mais empêche leur expression de Tie2, leur association avec les vaisseaux et leur capacité à induire l'angiogenèse tumorale. Une interaction cellules-cellules, médiée par la liaison ANG2/TIE2, paraît être importante pour l'angiogenèse tumorale (Mazzieri et al. 2011, Van Overmeire\* et al. 2014).

#### b. Rôle des macrophages dans la lymphangiogenèse

Les macrophages ne sont pas seulement des régulateurs de l'angiogenèse, ils sont également des acteurs importants de la formation de vaisseaux lymphatiques, processus nommé lymphangiogenèse. Par leur sécrétion de facteurs (VEGFA, B et C, MMP-2 et 9,...) les TAMs sont un lien entre l'angiogenèse et la lymphangiogenèse.

La lymphangiogenèse est une étape clé dans la diffusion généralisée des cellules tumorales à l'origine des métastases. Elle est associée à un mauvais pronostic. Ce processus est initié entre autres par l'activation d'un récepteur nommé VEGFR-3 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-3) localisé sur la membrane plasmique des cellules endothéliales des vaisseaux lymphatiques. Le récepteur VEGFR-3 est spécifiquement activé par les facteurs de croissance VEGFC et VEGFD. Ces deux facteurs sont exprimés par les cellules tumorales mais aussi par les macrophages TAMs (Schoppmann et al. 2002). Des souris dépourvues de CSF-1 (nécessaire à la différenciation des monocytes) présentent des défauts de développement du réseau lymphatique (Kubota et al. 2009).

De façon intéressante il fut observé des macrophages exprimant le marqueur de cellules endothéliales lymphatiques LYVE-1 au contact des vaisseaux lymphatiques cutanés lors de l'embryogenèse chez la souris. Ces macrophages ont un profil proche de celui des TEMs (Harvey\* et al. 2012). De plus, Maruyama et al. ont décrit dans un modèle d'inflammation de la cornée, l'existence de macrophages CD11b<sup>+</sup> issus de la moelle osseuse exprimant des marqueurs de cellules endothéliales lymphatiques (LYVE-1 et Prox-1) et induisant la lymphangiogenèse (Maruyama et al. 2005). Zumsteg et al, dans des cancers pancréatiques et de la prostate chez la souris ont visualisé des TAMs F4.80<sup>+</sup>Lyve-1<sup>+</sup> intégrés aux vaisseaux

lymphatiques péri-tumoraux et perdant probablement leurs caractéristiques macrophagiques après intégration (Zumsteg et al. 2009). Il semblerait donc que les macrophages induisent la lymphangiogenèse par deux voies différentes: la trans-différenciation en cellules endothéliales lymphatiques et l'incorporation dans la couche endothéliale, ou la stimulation de la division des cellules endothéliales lymphatiques préexistantes par sécrétion de facteurs pro-lymphangiogéniques (Hao\* et al. 2012, Riabov\* et al. 2014).

Les macrophages sont donc essentiels à l'angiogenèse et la lymphangiogenèse, deux processus impliqués dans le développement des tumeurs et des métastases. Le recrutement par les tumeurs des monocytes circulant dans le sang est ainsi une étape clé dans le développement tumoral. Jin et al. ont confirmé la fonction pro-angiogénique et pro-lymphangiogénique des macrophages par l'utilisation, chez la souris, de Matrigel contenant des monocytes humains (CD14<sup>+</sup>). De plus, cette étude révèle que parmi les intégrines exprimées par les monocytes CD14<sup>+</sup>, l'intégrine  $\alpha 4\beta 1$  est essentielle à leur fixation sur l'endothélium des vaisseaux tumoraux via une interaction avec la protéine VCAM (Vascular Cell Adhesion Molécule) exprimée par l'endothélium activé. Le traitement de souris porteuses de carcinomes pulmonaires de Lewis avec des antagonistes d' $\alpha 4\beta 1$  réduit le nombre de macrophages et la densité vasculaire dans les tumeurs. Jin et al. ont ainsi montré le rôle de l'intégrine  $\alpha 4\beta 1$  dans le recrutement des monocytes et l'angiogenèse tumorale (Jin et al. 2006). Cette intégrine fut également montrée comme favorisant les processus d'adhésion et de migration des cellules endothéliales lymphatiques, nécessaires à la lymphangiogenèse (Garmy-Susini et al. 2010).

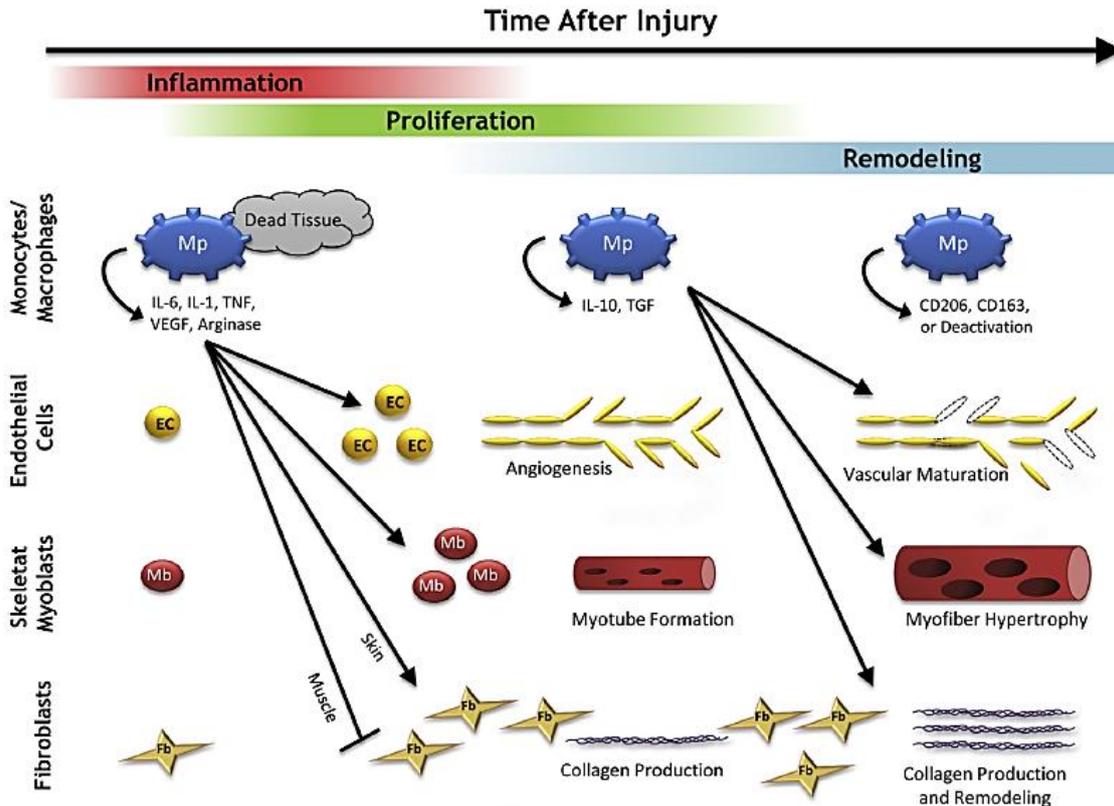
#### D. Rôle des macrophages dans l'ischémie

##### i. Rôle des macrophages dans les différentes phases de la réparation tissulaire post-ischémie

L'ischémie est définie comme la diminution ou l'arrêt de la circulation artérielle dans une région plus ou moins étendue d'un organe ou d'un tissu. Selon la localisation du dommage artériel l'ischémie peut toucher des organes variés tels que le cœur (ischémie du myocarde), le cerveau (ischémie cérébrale) ou encore les membres (ischémie du membre inférieur par exemple) et avoir des conséquences plus ou moins graves. L'ischémie peut être due à une

thrombose, la rupture d'une plaque d'athérome, une hémorragie, une hypo-perfusion ou encore une compression physique de l'artère (garrot, hématome, tumeur, ...). L'absence de perfusion sanguine en aval de l'obstruction entraîne l'infarctus de l'organe caractérisé par la nécrose partielle ou totale des tissus.

Le corps réagit à l'ischémie en déclenchant un processus de réparation tissulaire au niveau du tissu ischémique. On observe notamment le développement de nouveaux vaisseaux sanguins traduisant l'adaptation vasculaire mise en place par l'organisme pour corriger le défaut de perfusion tissulaire. Dans la plupart des tissus, et comme nous l'avons vu dans le cas de la cicatrisation d'une plaie cutanée, la réparation tissulaire se fait en trois phases (**Figure 18**). Le processus débute par une phase d'inflammation à laquelle suivent une phase de prolifération et de remodelage. La cinétique de chaque phase dépend beaucoup de la sévérité de la blessure, du tissu à réparer, et de facteurs tels que l'âge ou l'infection du tissu par des pathogènes. De plus le passage d'une phase à l'autre est progressif, ce qui rend difficile la détermination des bornes de chaque étape. Cependant, au vu des recherches menées sur des modèles expérimentaux, on considère globalement que la phase d'inflammation est généralement limitée aux premiers jours après la blessure. La phase proliférative débute seulement quelques jours après et atteint son maximum une semaine après la blessure. Enfin la phase de remodelage débute lorsque la phase de prolifération s'estompe et peut durer plusieurs mois selon les cas. Les macrophages, grâce à leur forte plasticité phénotypique et fonctionnelle, semblent jouer un rôle important tout au long de la réparation tissulaire successive à une ischémie. Ils semblent notamment être impliqués dans la succession des différentes phases (Arnold et al. 2007, Novak\* et al. 2013).



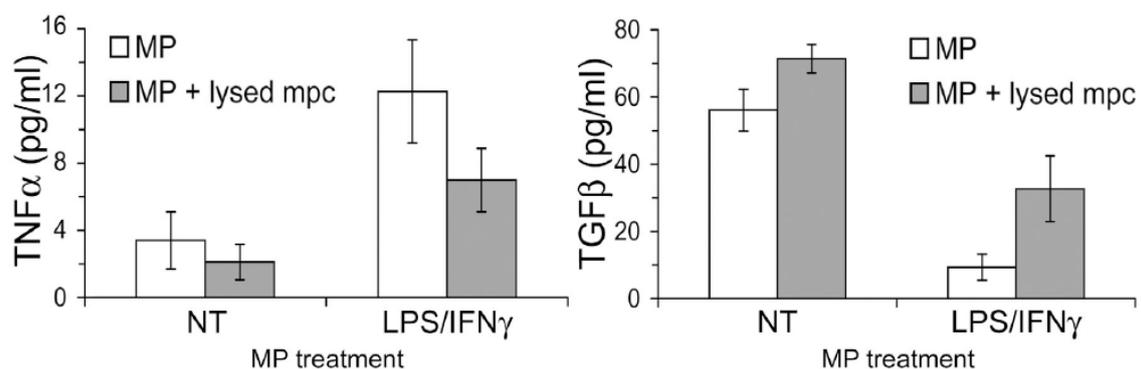
**Figure 18: Phases de la réparation tissulaire.** La réparation efficace des tissus se déroule en trois phases chevauchantes, d'inflammation, de prolifération, et de remodelage. Les Monocytes / Macrophages (Mps) sont présents durant les trois phases de la réparation et orchestrent la progression, au bon moment, d'une phase à l'autre. Les macrophages de la phase inflammatoire phagocytent les tissus morts et favorisent la prolifération des cellules endothéliales (EC) et des myoblastes du muscle squelettique (Mbs). Les effets sur la prolifération des fibroblastes (Fbs) et la production de collagène semblent être tissu dépendant (inhibiteur dans le muscle et activateur dans la peau). Les macrophages de la phase proliférative favorisent la maturation des vaisseaux, l'hypertrophie des fibres musculaires, la production de collagène et le remodelage. Source : (Novak\* et al. 2013).

### a. Phase inflammatoire

Comme décrit plus tôt dans le paragraphe sur la réponse inflammatoire, cette phase est caractérisée par l'intervention rapide des neutrophiles suivie par celle des macrophages pro-inflammatoires. Les neutrophiles sont déjà présents en grande quantité à deux heures post-blessure et leur pic d'intervention a lieu environ un jour après le dommage tissulaire. Leur nombre revient ensuite progressivement à un état basal entre cinq et dix jours post-blessure. Les macrophages quant à eux sont à leur nombre maximum entre trois et sept jours post-blessure, avant de rediminuer après dix à quatorze jours. Ils restent cependant encore présents pendant plusieurs semaines (Kharraz\* et al. 2013, Novak\* et al. 2013).

Le rôle principal des macrophages dans cette phase inflammatoire est l'élimination des dommages tissulaires par phagocytose des débris cellulaires, nécrotiques, apoptotiques, ... . La sécrétion de facteurs pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ ,...) est l'autre action majeure des macrophages lors de cette phase.

De plus les macrophages présents lors de cette phase inflammatoire semblent orchestrer la transition vers la phase proliférative. La déplétion des monocytes, 12h avant ou au moment de la blessure, par injection de toxine diphtérique chez des souris CD11b-DTR, provoque une élimination plus lente des fibres nécrotiques mais aussi une altération de la régénération musculaire (Arnold et al. 2007). Arnold et al. observent, par cytométrie en flux, une transition dans les populations de monocytes/macrophages présentes dans le muscle murin après blessure. Au pool de monocytes/macrophages Ly6c<sup>+</sup>, exprimant fortement du TNF $\alpha$  et de l'IL-1 $\beta$ , succède des macrophages Ly6c<sup>-</sup>, anti-inflammatoires et tournés vers la régénération tissulaire, sécrétant du TGF $\beta$  et de l'IL-10 (Arnold et al. 2007). Il est intéressant de noter que les macrophages anti-inflammatoires Ly6c<sup>-</sup> proviennent uniquement de la prolifération et de la différenciation des monocytes Ly6c<sup>-</sup>, issus eux même de la transformation des monocytes Ly6c<sup>+</sup>. Dans la même étude, il fut montré *in vitro* que la phagocytose par des macrophages M1 de débris cellulaires du muscle entraînait leur passage d'un état pro-inflammatoire à anti-inflammatoire caractérisé par la sécrétion de TGF $\beta$  (**Figure19**) (Arnold et al. 2007).



**Figure 19: Sécrétion de cytokines par les macrophages après phagocytose de débris cellulaires du muscle *in vitro*.** Des macrophages issus de monocytes isolés de sang humain sont traités ou non pendant 48h avec 1  $\mu$ g/ml LPS + 10 ng/ml IFN $\gamma$  (respectivement macrophages NT et LPS/IFN $\gamma$ ). Les macrophages sont ensuite mis 3h en présence ou non de cellules précurseurs myogéniques humaines (mpc) dont on a induit la nécrose (respectivement condition MP et MP + lysed mpc). La sécrétion de TNF $\alpha$  et TGF $\beta$  par ces macrophages est quantifiée 24 heures après. Les macrophages M1 (LPS/IFN $\gamma$ ) sécrètent du TGF $\beta$  en réponse à la phagocytose de débris cellulaires. En parallèle leur sécrétion de TNF $\alpha$  est diminuée. Source (Arnold et al. 2007).

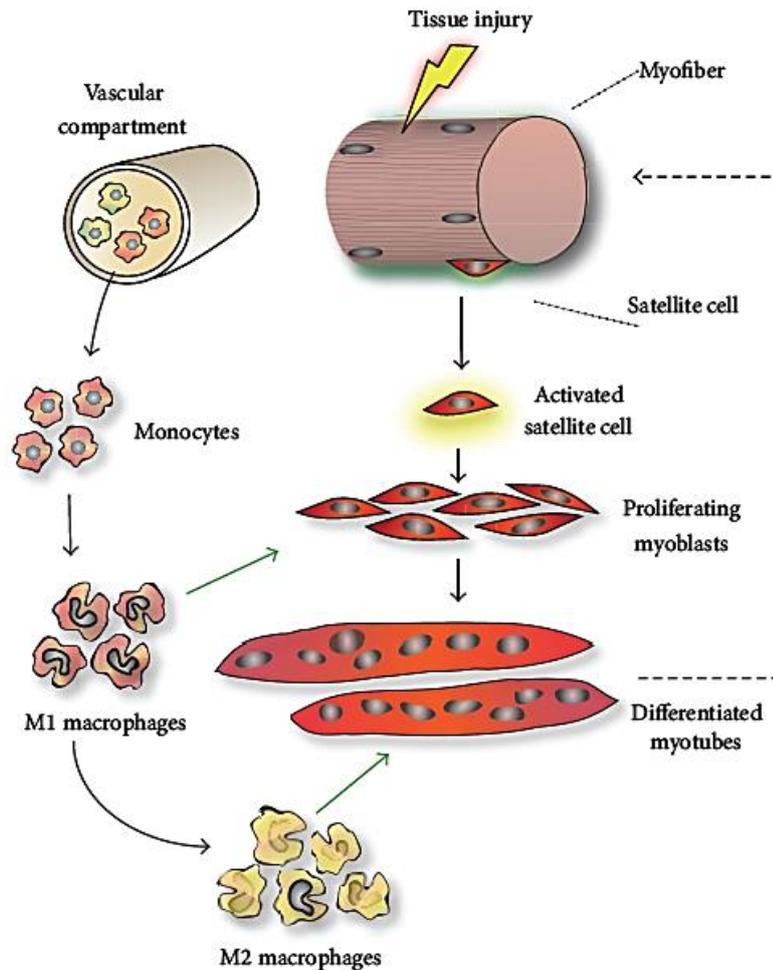
Ces observations laissent suggérer que la production de cytokines induite par la phagocytose est l'un des mécanismes par lequel les macrophages initient la transition entre la phase inflammatoire et proliférative.

#### b. Phase proliférative

---

La prolifération cellulaire est observée dans les premiers jours après la blessure, est culminante au bout de cinq jours, puis diminue à un niveau faible au dixième ou douzième jours. Cette cinétique de prolifération est très similaire à celle des macrophages dans le muscle ischémié décrite plus haut (cf phase inflammatoire). C'est durant cette phase que les cellules satellites, cellules souches du muscle squelettique, s'activent, prolifèrent, se différencient et s'agencent pour former de nouvelles fibres musculaires fonctionnelles (Novak\* et al. 2013). En parallèle de cette régénération musculaire se produit la prolifération de fibroblastes et de cellules endothéliales, nécessaires respectivement à la formation de matrice et à l'angiogenèse.

La prolifération cellulaire est favorisée par les macrophages présents en fin de phase inflammatoire/début de phase proliférative. L'expression de certaines cytokines pro-inflammatoires, d'arginase et de VEGF par ces macrophages entraîne la prolifération de plusieurs types cellulaires. Par exemple, des souris IL-6<sup>-/-</sup>, ayant subi un dommage musculaire, présentent une inflammation réduite, un défaut de réparation et une diminution de prolifération des myoblastes (observé par co-marquage BrdU-MyoD) (Zhang et al. 2013). Les macrophages présents plus tardivement dans la phase de prolifération, et exprimant du TGFβ et de l'IL-10, semblent quant à eux agir d'avantage sur la différenciation et la maturation des tissus que sur la prolifération en elle-même (**Figure 20**). Ils vont avoir un rôle dans la survie des cellules endothéliales et dans le contrôle de la taille des fibres musculaires en régénération (Arnold et al. 2007, Novak\* et al. 2013). On observe chez des souris IL-10<sup>-/-</sup>, ayant subi un dommage musculaire, une transition M1/M2 altérée, une différenciation du muscle perturbée et une diminution de la taille des fibres musculaires comparés aux souris sauvages (Deng et al. 2012).



**Figure 20: Inflammation et polarisation des macrophages dans la blessure et la réparation du muscle squelettique.** Les cellules souches résidentes du muscle, appelées cellules satellites, sont localisées sous la lame basale des fibres musculaires (myofibers) et sont quiescentes en temps normal. Lors d'un dommage musculaire les cellules satellites sont activées, commencent à proliférer et former des myoblastes qui fusionnent et se différencient en myotubes. Ces myotubes, une fois leur croissance achevée, remplacent à terme les muscles endommagés. Plusieurs types cellulaires influencent la régénération, en particulier les cellules inflammatoires provenant du sang. Les monocytes pro-inflammatoires envahissent rapidement la zone lésée et se différencient en macrophages pro-inflammatoires. Ces macrophages M1 relarguent des cytokines qui stimulent la prolifération des myoblastes. Les macrophages de type-M2 présents localement aux stades plus tardifs de la réparation favorisent la différenciation et la fusion des myoblastes. Source : (Kharraz\* et al. 2013).

Il a été observé après lésion d'un muscle squelettique chez l'Homme, que les zones en régénération avec une forte prolifération de myoblastes étaient préférentiellement associées à des macrophages pro-inflammatoires. Les zones contenant des myoblastes en différenciation étaient occupées par des macrophages arborant des marqueurs anti-inflammatoires. Il est intéressant de noter que dans cette étude faite chez l'Homme, les deux populations de macrophages, pro et anti-inflammatoires, ont été visualisées comme coexistant dans la majorité des zones en réparation du muscle endommagé (Saclier et al. 2013).

Tout comme les macrophages de la phase inflammatoire initient la phase de prolifération, les macrophages de cette phase proliférative semblent donc initier la phase de maturation.

### c. Phase de remodelage

---

La phase de remodelage constitue une étape de maturation des tissus fraîchement réparés. Ainsi se fait entre autres une réorganisation du réseau vasculaire et une hypertrophie des fibres musculaires. Le réseau vasculaire est remodelé par régression des vaisseaux non matures. La densité vasculaire importante dans le muscle lors de la réparation va ainsi progressivement diminuer jusqu'à atteindre celle d'un muscle normal. L'élimination des macrophages, six jours après la blessure, chez des souris CD11b-DTR entraîne une diminution de la taille des fibres musculaires (Arnold et al. 2007, Novak\* et al. 2013).

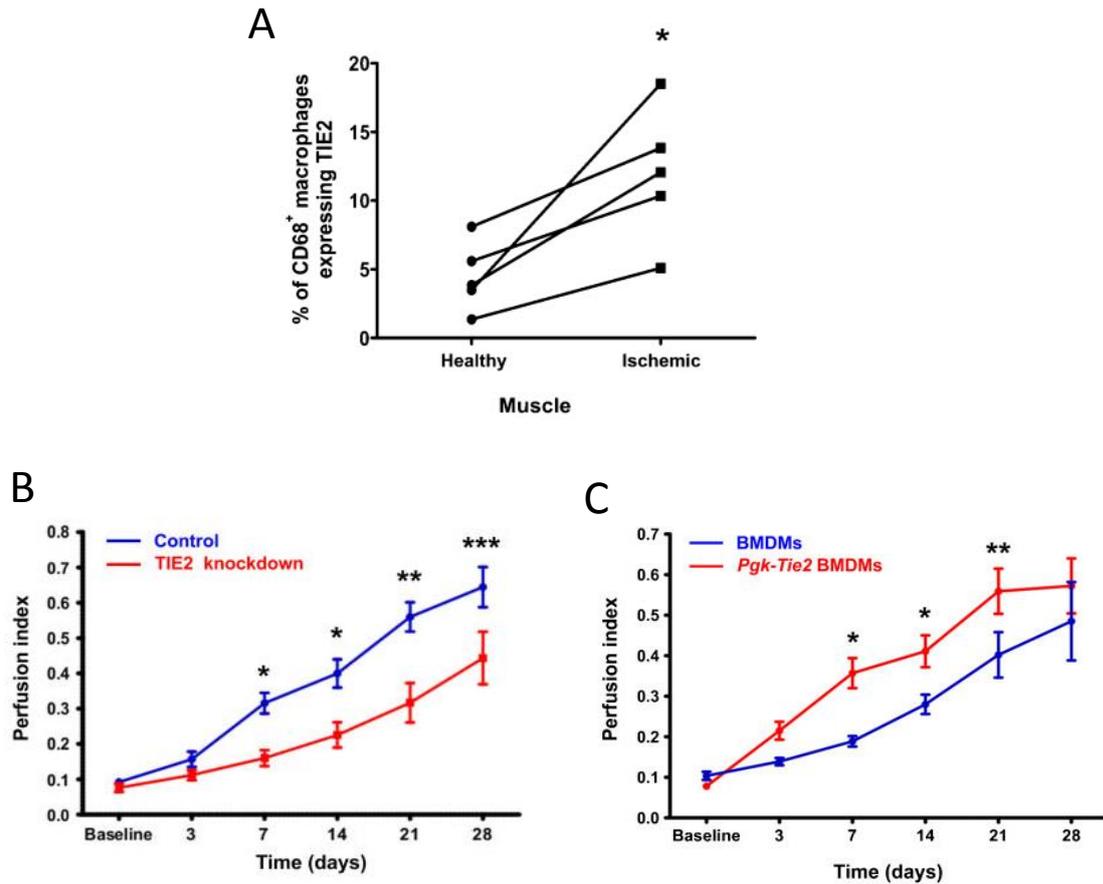
Les macrophages impliqués dans cette phase de maturation présentent une expression importante de CD206 (MMR) et CD163. La fonction de ces macrophages lors de cette phase de remodelage reste très peu connue. Peu d'études ont été réalisées sur leur rôle spécifique dans la réparation tissulaire (Kharraz\* et al. 2013, Novak\* et al. 2013).

## ii. Rôle des macrophages TEM dans l'arteriogenèse post-ischémique dans le membre inférieur

---

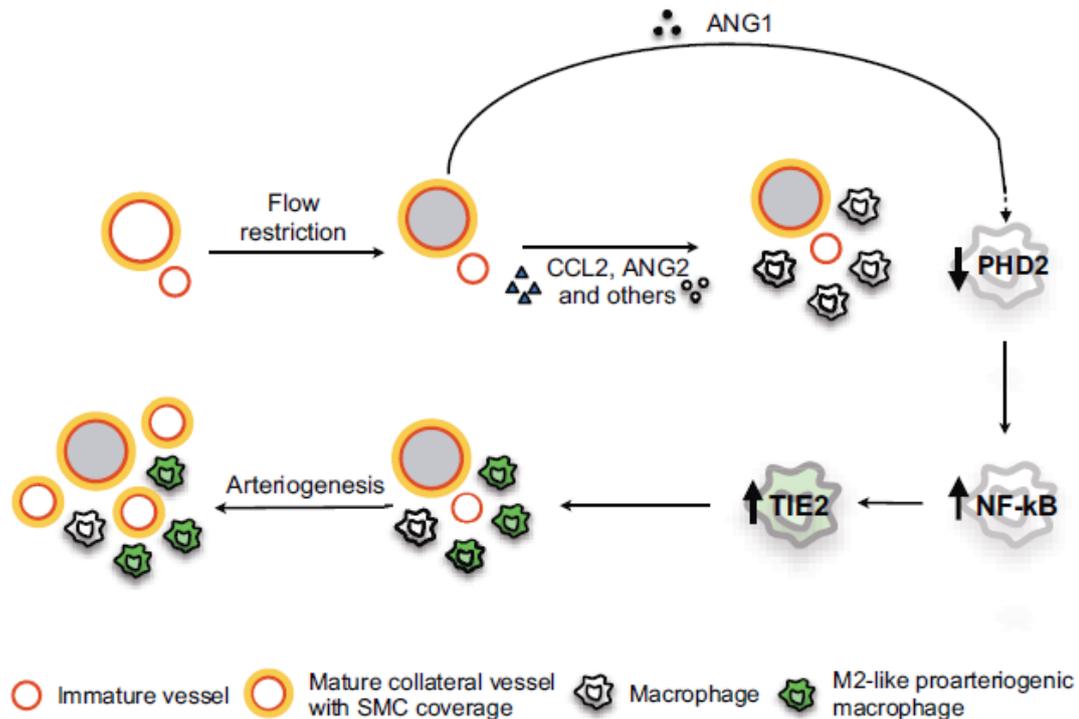
En réponse à l'occlusion d'une artère se mettent en place plusieurs adaptations vasculaires nécessaires à un rétablissement du flux sanguin dans les tissus en aval. Cette néovascularisation comprend essentiellement les processus d'angiogenèse et d'artériogenèse. L'angiogenèse, comme décrit plus haut, correspond à la formation de nouveaux capillaires dans le tissu en aval, en réponse à l'hypoxie. L'artériogenèse correspond quant à elle au phénomène de remodelage des vaisseaux collatéraux préexistants. Le développement de ces vaisseaux collatéraux dépend des modifications hémodynamiques associées à l'occlusion vasculaire, mais aussi de la réaction inflammatoire qui se déroule dans le tissu ischémique (Silvestre\* 2007).

Des recherches récentes ont montré le rôle de macrophages exprimant le récepteur Tie2 (TEM) sur la néovascularisation dans la patte ischémisée. Cette population de macrophages TEM est connue pour son rôle pro-angiogénique dans les tumeurs ou le remodelage tissulaire (voir le paragraphe « Tumor-Associated Macrophages (TAMs) ». Patel et al. ont montré que chez des patients atteints d'ischémie critique du membre inférieur le nombre de TEM circulant dans le sang est entre neuf et quinze fois supérieur (chez les patients âgés et jeunes respectivement) à celui de personnes saines. Cette augmentation de TEM est une réponse spécifique à l'ischémie tissulaire. En effet le nombre de TEM circulant revient à un niveau normal en cas de revascularisation ou d'amputation du membre ischémique. Des immuno-marquages réalisés sur des biopsies de muscles ont révélés la présence en plus grand nombre des TEM dans le muscle ischémique comparé au muscle normoxique d'un même patient (**Figure 21**). Ces augmentations du nombre de TEM circulant et résidents, consécutifs à une ischémie, sont confirmés dans un modèle murin d'ischémie du membre inférieur. L'injection de macrophages TIE2<sup>-/-</sup> ou de TEM (Tie2<sup>+</sup>) dans des souris ischémisées diminue ou accélère, respectivement, la revascularisation de la patte (**Figure 21**)(Patel et al. 2013).



**Figure 21: Implication des macrophages Tie2<sup>+</sup> dans la revascularisation après ischémie chez l'Homme et la souris.** (A) Analyse par cytométrie en flux de la proportion de macrophages CD68<sup>+</sup> exprimant TIE2 dans des biopsies de muscles ischémiques (partie distale) et sains (partie proximale) de patients souffrant d'ischémie critique du membre. La partie ischémique du muscle contient une plus grande proportion de macrophages TIE2<sup>+</sup> que la partie saine. (B et C) Analyse (à 3, 7, 14, 21 et 28 jours après ischémie) par Doppler de la perfusion dans la patte ischémisée : (B) de souris irradiées puis transplantées avec de la moelle osseuse dont l'expression de TIE2 est inhibée (TIE2 knockdown) comparés à des souris contrôles ; et (C) de souris injectées, 24h après ischémie, avec des macrophages de moelle osseuse surexprimant TIE2 (Pgk-Tie2 BMDMs) ou contrôles (BMDMs). En absence ou présence de macrophages TIE2 dans le muscle, la perfusion est respectivement diminuée ou augmentée dans la patte ischémisée. Source : (Patel et al. 2013).

Deux études menées récemment (Takeda et al. 2011, Hamm et al. 2013) ont mis en avant que l'occlusion de l'artère fémorale induisait le changement de profil des macrophages par la répression, due à l'angiopoïétine-1, de l'expression d'une protéine senseur d'oxygène, PHD2 (prolyl hydroxylase 2) (**Figure 22**). En effet, après ligature de l'artère fémorale chez la souris, le niveau d'expression de *phd2* est diminué de moitié dans le muscle adducteur ischémique (Takeda et al. 2011). Des souris *phd2*<sup>+/-</sup> furent utilisées dans les deux études pour mimer à l'état basal la faible expression de *phd2* dans le muscle ischémique. Il fut mis en évidence que la diminution d'expression de *phd2* entraîne les macrophages vers un phénotype de type M2 qui favorise l'artériogénèse. L'induction de l'expression de Tie2 par les macrophages (TEM) dans le muscle ischémique serait provoquée par l'activation de la voie NF-κB, elle-même induite par la diminution de PHD2 (Takeda et al. 2011, Hamm et al. 2013). PHD2 est connue pour dégrader les sous-unités α des complexes HIF et donc inhiber l'expression des gènes cibles d'HIF1-α, comme l'angiopoïétine-1 (ANG1) (Emanuelli et al. 2013). Il a été montré *in vitro* que réciproquement la stimulation des macrophages par l'ANG1 réduit leur expression de *phd2* (Hamm et al. 2013). *In vivo*, la diminution d'expression de *phd2* et l'augmentation du nombre de macrophages M2 (MMR<sup>+</sup>) peut être induite par injection d'ANG1 dans le muscle ischémique. L'ANG1 présent dans le muscle ischémique serait donc en partie responsable de la diminution de PHD2. Une boucle de rétro contrôle entre ANG1 et PHD2 maintiendrait ce faible taux de PHD2 nécessaire à l'induction des TEMs (Emanuelli et al. 2013).



**Figure 22: Illustration schématique des résultats obtenus par Hamm et al.** La restriction du flux sanguin suite à l’occlusion d’une artère principale entraîne une ischémie dans les tissus en aval, et augmente les forces de cisaillements sur les parois des vaisseaux collatéraux en amont, induisant le relargage de cytokines et chimiokines (triangles noirs). Les chimioattractants, tels que CCL2, et les molécules de perméabilité vasculaire, comme l’angiopoïétine2 (ANG2), favorisent directement ou indirectement le recrutement des macrophages au niveau des vaisseaux collatéraux immatures. Par la suite, l’angiopoïétine1 (ANG1) (cercles noirs) induit la régulation négative de la transcription de Phd2 par les macrophages, activant ainsi la voie de signalisation NF-κB. NF-κB régule positivement le récepteur TIE2 qui est nécessaire au maintien des macrophages dans un phénotype pro-artériogénique. Les TEM sont ensuite nécessaires pour promouvoir la maturation des vaisseaux collatéraux (artériogénèse). Source : (Hamm et al. 2013).

#### IV. Signalisation Wnt/Frizzled

La signalisation Wnt/Frizzled (Wnt/Fzd) est une signalisation contrôlant divers processus cellulaires et biologiques et intervenant notamment dans la régulation de nombreuses propriétés et fonctions cellulaires (adhésion, prolifération, migration, apoptose, polarité, différenciation). Ce système joue un rôle essentiel au cours de l’embryogenèse (convergence-extension, formation de la crête neurale, formation de l’axe antéropostérieur) et participe au développement et à la maturation tissulaire (système nerveux central, système cardiovasculaire). Chez l’Homme, les composants de la voie de signalisation Wnt

ont été reliés à diverses pathologies telles que les cancers, l'ostéoporose ou encore la maladie d'Alzheimer.

La signalisation Wnt/Frizzled (Wnt/Fzd) met en jeu des morphogènes Wnt qui agissent en tant que ligands de récepteurs Frizzled (Fzd). Elle fait intervenir 19 ligands Wnt et 10 récepteurs Frizzled et comporte différentes voies de signalisation : une canonique et deux non-canoniques. Des études ont émis l'hypothèse que certains Wnt activeraient préférentiellement la voie de signalisation Wnt canonique, tandis que d'autres activeraient les voies de signalisation non-canoniques. Plusieurs membres du système Wnt/Fzd possèdent un profil d'expression spatio-temporel et pourraient interagir de façon spécifique, permettant une régulation fine de la réponse initiée par l'activation du système (Angers\* et al. 2009).

Depuis plusieurs années, les fonctions de ce système ont fait l'objet de nombreuses études. Les résultats recueillis ont été réunis sur un site élaboré et fréquemment mis à jour par l'équipe de Roel Nusse à l'Université de Stanford « The Wnt Homepage » (<http://web.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/>)

#### A. Facteurs Wnt

---

Les ligands Wnt sont des glycoprotéines riches en cystéine. Au moins 19 membres de la famille Wnt ont été décrits à ce jour et la plupart d'entre eux sont très conservés dans l'évolution. Bien que les membres de la famille Wnt aient un haut degré de similarité de séquence, l'expression de différentes protéines Wnt peut aboutir à des résultats très différents en termes de signalisation. Pour devenir fonctionnelles, les protéines Wnt subissent des modifications post-traductionnelles dont la glycosylation et la palmitoylation qui les rendent difficiles à purifier (Mikels\* et al. 2006). Les différentes études réalisées ont permis de distinguer deux sous-classes parmi la famille des Wnt qui activeraient deux voies de signalisation différentes: la sous-famille comprenant Wnt1, 3, 3a, 7a activerait la voie canonique; et la sous-famille comprenant Wnt2, 4, 5a, 6, 7b, 11 activerait les voies non canoniques.

Plusieurs études ont été réalisées sur des souris mutantes ou surexprimant les Wnt. Les phénotypes de ces souris, et les phénotypes humains de patients portants des allèles mutés de certains Wnt, sont regroupés dans le tableau ci-dessous (**Tableau 3**). Ce tableau s'inspire

de ceux du site internet « The Wnt Homepage » (<http://web.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/>). Les références bibliographiques des études ayant décrit ces phénotypes sont disponibles sur le site internet.

<b>gène</b>	<b><i>Mus Musculus:</i> phénotype chez les mutants</b>	<b><i>Homo Sapiens:</i> phénotype associé</b>
<b>Wnt1</b>	-défaut développement du mésencéphale et cervelet -défaut de formation de la crête neurale, diminution des précurseurs neuronaux dorso-latéraux dans le tube neural dans les doubles mutants délétés aussi pour Wnt3a -diminution du nombre de thymocytes avec la délétion de Wnt4	-Ostéogenèse imparfaite
<b>Wnt2</b>	-défauts de placentation -défaut de développement des poumons avec la délétion de Wnt2b	
<b>Wnt2b/13</b>	-Surexpression inhibe la différenciation des cellules de la rétine -défaut de développement des poumons avec la délétion de Wnt2	
<b>Wnt3</b>	-défaut précoce de la gastrulation; formation de l'axe -défaut de croissance des poils -défaut de formation des membres -topographie retinotectale médio-latérale -régule neurogenèse hippocampique	-Tetra-Amelia
<b>Wnt3a</b>	-somitogenèse et bourgeon caudal perturbés -défaut de formation de la crête neurale, diminution des précurseurs neuronaux dorso-latéraux dans le tube neural dans les doubles mutants délétés aussi pour Wnt1 -défaut de développement de l'hippocampe -asymétrie droite-gauche -défaut d'auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques	
<b>Wnt4</b>	-défauts de formation des reins et l'induction de la vésicule rénale -détermination du sexe: défaut de développement du tractus reproducteur femelle, absence des canaux de Müller, testostérone ectopique synthétisée chez la femelle. -défaut de ramification dans les glandes mammaires -diminue le nombre de thymocytes avec la délétion de Wnt1 -Répression migration des précurseurs stéroïdogènes des surrénales dans les gonades -Anomalie de guidance axonale	-virilisation et regression des canaux de Müller -syndrome de SERKAL

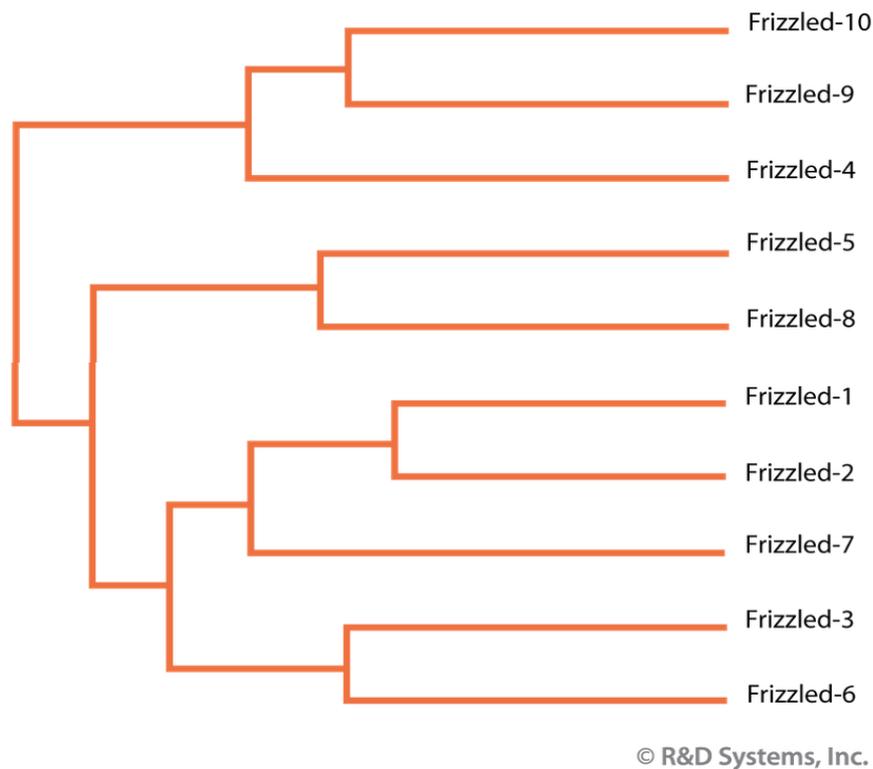
<b>Wnt5a</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-défaut de croissance des membres (tronqués), axis antéro-postérieur tronqué, diminution de la prolifération des cellules</li> <li>-défaut de morphogenèse distale des poumons</li> <li>-différentiation des chondrocytes, croissance longitudinale du squelette</li> <li>-inhibe la prolifération des cellules B, suppresseur de tumeurs</li> <li>-défaut formation tractus reproducteur femelle</li> <li>-cochlée raccourcie et élargie (polarité planaire)</li> <li>-développement des glandes mammaires</li> <li>-développement de la prostate</li> <li>-élongation de l'intestin</li> <li>-endothelial differentiation of ES cells</li> </ul>	
<b>Wnt5b</b>		-Associé à des susceptibilités au diabète de type2
<b>Wnt6</b>	-prolifération des cellules stromales chez l'embryon	
<b>Wnt7a</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-défaut de polarité du membre</li> <li>-infertilité chez la femelle; défaut de régression des canaux de Müller</li> <li>-défauts formation du tractus reproducteur femelle</li> <li>-défaut maturation des synapses dans le cervelet</li> <li>-favorise la différenciation neuronale</li> <li>-vascularisation système nerveux central avec Wnt7b</li> </ul>	-syndrome de Fuhrmann
<b>Wnt7b</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-défauts développement placentaire</li> <li>-problèmes respiratoires, défaut de prolifération précoce du mésenchyme, hypoplasie pulmonaire</li> <li>-mort cellulaire programmée induite par macrophage (aussi dans les mutants LRP5 et LEF1)</li> <li>-développement du poumon</li> <li>-vascularisation système nerveux central avec Wnt7a</li> <li>-axe cortico-médullaire du rein</li> </ul>	
<b>Wnt8a</b>		
<b>Wnt8b</b>	-mutant perte de fonction: pas d'effet sur le développement neuronal mais changements d'expression génique	
<b>Wnt9a</b>	-mutant perte de fonction: intégrité des articulations	
<b>Wnt9b</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-régulation transition mésenchymale/épithéliale</li> <li>-induction vésicule rénale</li> <li>-polarité cellulaire planaire de l'épithélium rénale</li> </ul>	
<b>Wnt10a</b>		-Dysplasie odonto-onycho-cutanée

<b>Wnt10b</b>	-mutant perte de fonction: diminution os trabéculaire, diminution masse osseuse -développement papilles gustatives -mutant perte de fonction: co-expression des programmes myogénique et adipogénique -mutant surexpression: inhibe adipogénèse	-Mutations chez patients obèses -Malformation, dédoublement main/pied
<b>Wnt11</b>	-défaut branchement uretères rénaux -cardiogénèse	
<b>Wnt16</b>	-phénotype touchant la densité osseuse	-Densité osseuse

**Tableau 3 : Gènes Wnt chez la souris et chez l'homme et phénotypes associés.** Pour l'humain (Homo sapiens), le phénotype associé correspond à des mutations des gènes Wnt observées chez certains patients. Pour la souris (Mus musculus), le phénotype associé correspond à l'inactivation du gène ou à sa surexpression ectopique. D'après le site : <http://web.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/>

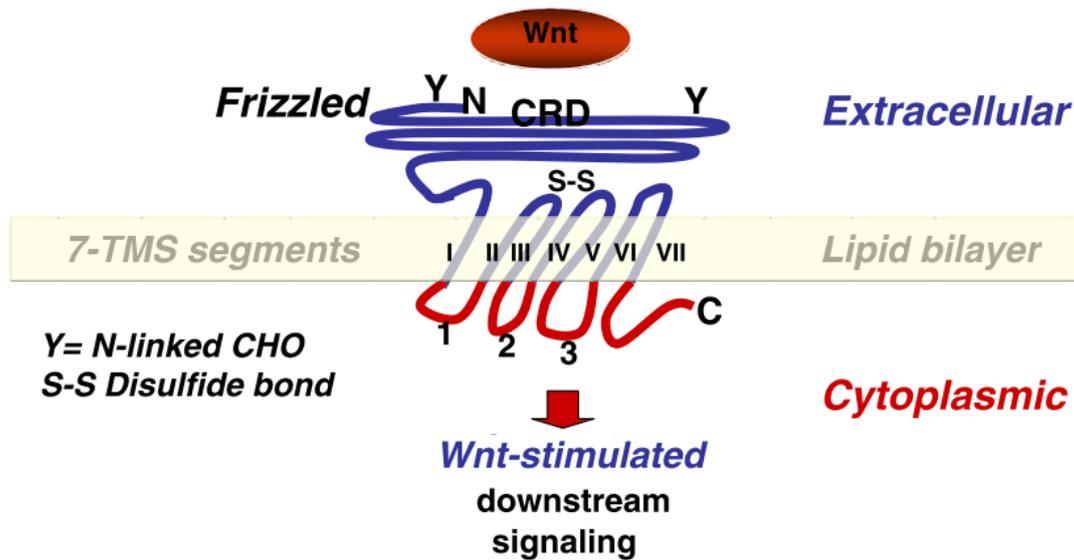
## B. Récepteurs Fzd

Il a été suggéré que plusieurs classes de récepteurs peuvent interagir avec les protéines Wnt. Les récepteurs de la voie Wnt les plus étudiés sont les membres de la famille Frizzled. Ces récepteurs Fzd sont des protéines à sept domaines transmembranaires avec un grand domaine extracellulaire N-terminal (Schulte\* et al. 2007). Les gènes *Frizzled* ont d'abord été identifiés chez la Drosophile lors d'études portant sur les mutations qui perturbent la polarité des cellules épidermiques (Wang et al. 1996). Chez les mammifères, 10 membres de la famille ont été décrits à ce jour. Il a été également mis en évidence que les membres de la famille LRP (Lipoprotein receptor related proteins) agissent comme des corécepteurs de la voie Wnt (Huelsenken\* et al. 2001). L'analyse des séquences en acides aminés suggère que les dix gènes *Frizzled* retrouvés chez l'Homme se répartissent en quatre groupes principaux. *Fzd1*, *Fzd2* et *Fzd7* partagent environ 75% identité, *Fzd5* et *Fzd8* 70%, *Fzd4*, *Fzd9* et *Fzd10* 65% et *Fzd3* et *Fzd6* 50% (Fredriksson et al. 2003). Les gènes entre les différents clusters partagent entre 20% et 40% de similarité de séquence (**Figure 23**).



**Figure 23: Arbre phylogénétique des récepteurs Frizzled.** Le récepteur Fzd7 est phylogénétiquement plus proche de Fzd1, Fzd2 avec lesquels il partage 75% d'identité. Source : R&D Systems.

La structure des récepteurs Frizzled est conservée de la *Drosophile* à l'Homme. La plus grande divergence d'identité pour les domaines cytoplasmiques des récepteurs Frizzled se trouve dans la queue C-terminale. Les récepteurs Fzd peuvent être considérés comme des récepteurs membranaires composés de trois domaines principaux (Wang\* et al. 2006, Schulte\* et al. 2007). Le domaine N-terminal, extracellulaire, participe (avec ou sans corécepteurs, comme LRP5/6) à la liaison de l'agoniste (par exemple les Wnt) ou antagoniste (par exemple, les ligands soluble-Frizzled-related protein (sFRP)). La région transmembranaire est composée de sept hélices alpha hydrophobes qui traversent la bicouche lipidique. Trois boucles intracellulaires (iLoop1, iLoop2 et iLoop3) et une queue cytoplasmique communiquent en aval avec les éléments de signalisation cytoplasmiques. Le motif C-terminal « Ser/Thr-XXX-Val » constitue un domaine de liaison pour les protéines possédant un domaine PDZ (**Figure 24**). On retrouve ce motif chez les Fzd1, 2, 4, 5, 7, 8 et 10 mais pas chez les Fzd3, 6 et 9.



**Figure 24: Structure des récepteurs Frizzled.** Les facteurs Wnt se lient aux récepteurs Fzd avec une forte affinité via le domaine Cysteine-Rich Domain (CRD) de Fzd. La région transmembranaire est composée de sept hélices alpha hydrophobes. Trois boucles intracellulaires et une queue cytoplasmique communiquent en aval avec les éléments de signalisation cytoplasmiques. Source : (Wang\* et al. 2006)

Les récepteurs Frizzled peuvent activer les 3 principales voies de signalisation du système Wnt/Fzd. Cependant, les mécanismes biochimiques par lesquels la liaison du ligand Wnt au récepteur Fzd induit une transduction du signal restent encore mal compris. Les facteurs Wnt se lient aux récepteurs Fzd avec une forte affinité via le domaine CRD de Fzd. Ce domaine qui est nécessaire à la fixation des ligands ne semble pas indispensable à la transduction du signal (Chen et al. 2004, Povelones et al. 2005). En revanche, la dimérisation des récepteurs Fzd pourrait à elle seule induire l'activation de la voie canonique (Carron et al. 2003).

Tout comme pour les Wnt, plusieurs études ont été réalisées sur des souris mutantes ou surexprimant les récepteurs Fzd. Les phénotypes de ces souris, et les phénotypes humains de patients portants des allèles mutés de certains Fzd, sont regroupés dans le **Tableau 4**. Ce tableau s'inspire du site internet « The Wnt Homepage » (<http://web.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/>). Les références bibliographiques des études ayant décrit ces phénotypes sont disponibles sur le site internet.

<b>gène</b>	<b><i>Mus Musculus:</i> phénotype chez les mutants</b>	<b><i>Homo Sapiens:</i> phénotype associé</b>
<b>Fzd1</b>		
<b>Fzd2</b>	-défauts de convergence-extension avec mutant Fzd7	
<b>Fzd3</b>	-anomalies des fibres du système nerveux central -guidance antéro-postérieur des axones commissurales -défaut de morphogenèse du cerveau moyen avec mutant Fz6	
<b>Fzd4</b>	-défauts dans l'œsophage, l'audition et le cervelet -empêche la formation du corps lutéal -anomalies de la croissance vasculaire et de l'endothélium - phénotype touchant le rein avec mutant Fz8	-Angiogenèse de la rétine: vitreoretinopathie exudative familiale
<b>Fzd5</b>	-anomalies de l'angiogenèse placentaire et du sac vitellin -phénotype des cellules de Paneth -survie neuronale dans le noyau parafasciculaire -développement des glandes mammaires	
<b>Fzd6</b>	-anomalies polarité tissulaire et système pileux -défaut morphogenèse cerveau moyen avec mutant Fzd3	
<b>Fzd7</b>	-queue tronquée et déformée -défauts de convergence-extension avec mutant Fzd2	-Auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques
<b>Fzd8</b>	-phénotype touchant le rein avec mutant Fz4	
<b>Fzd9</b>	-développement des cellules B -défauts de l'hippocampe et de l'apprentissage visual et spatial	
<b>Fzd10</b>		

**Tableau 4: Gènes *Fzd* chez la souris et chez l'homme et phénotypes associés.** Pour l'humain (*Homo sapiens*), le phénotype associé correspond à des mutations des gènes *Wnt* observées chez certains patients. Pour la souris (*Mus musculus*), le phénotype associé correspond à l'inactivation du gène ou à sa surexpression ectopique. D'après le site : <http://web.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/>

## C. Voies de signalisation Wnt/Frizzled

---

Les voies de signalisation Wnt/Fzd sont séparées en deux grands groupes : la voie dite Wnt canonique,  $\beta$ -caténine dépendante, et les voies de signalisation indépendantes de la  $\beta$ -caténine regroupant la voie de la polarité cellulaire planaire (PCP) et la voie calcium dépendante.

Malgré les nombreuses investigations et études qui ont été menées sur la signalisation Wnt/Fzd, notre connaissance de ces voies, bien qu'ayant beaucoup progressé, reste à ce jour incomplète. En effet, l'existence de dix-neuf Wnt et de dix Fzd conduit à une multiplicité d'interactions possibles et explique la complexité de ce système. D'autre part, en plus des ligands Wnt et des récepteurs frizzled, il existe un grand nombre d'autres molécules pouvant réguler et moduler ces voies de signalisation rendant ainsi ce système très complexe.

### i. Voie Wnt canonique

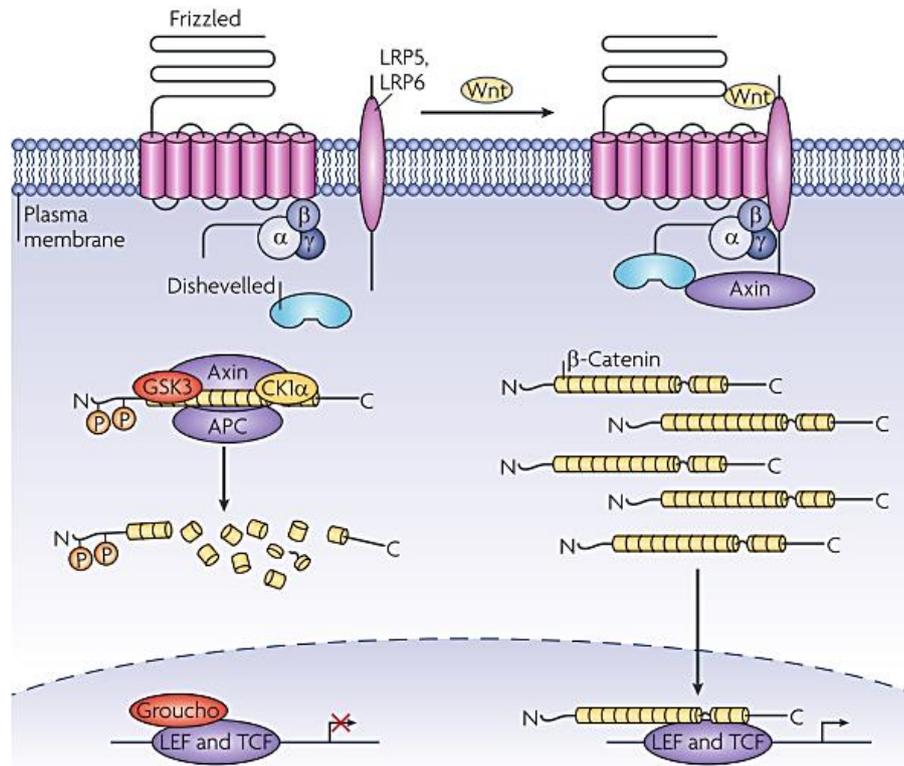
---

La voie Wnt canonique,  $\beta$ -caténine dépendante, dans laquelle la  $\beta$ -caténine agit en tant que second messager, est la voie de signalisation Wnt la plus étudiée (Nelson\* et al. 2004, Kikuchi\* et al. 2006) (**Figure 25**).

En l'absence de stimulation des récepteurs Fzd par les ligands Wnt, la  $\beta$ -caténine cytosolique est séquestrée dans le cytoplasme par un complexe qui va entraîner sa dégradation. Ce complexe est composé de l'Axine2, des gènes suppresseurs de tumeur APC (Adenomatous Poliposis Coli), de la Caséine Kinase 1 bis (CK1A) et de la Glycogène Synthase Kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ). APC et Axine2 se lient à la  $\beta$ -caténine nouvellement synthétisée et servent de protéines d'échafaudage dans la séquestration de la  $\beta$ -caténine (Hinoi et al. 2000). Cette dernière est ainsi phosphorylée par la CK1A sur des résidus sérine/thréonine à son extrémité N-terminale, puis fait l'objet de trois autres phosphorylations par la GSK3 $\beta$ . La  $\beta$ -caténine phosphorylée induit le recrutement et la liaison de l'ubiquitine ligase E3 qui transforme la  $\beta$ -caténine en une cible pour la dégradation par le protéasome (Kimelman\* et al. 2006). En conséquence, les niveaux de  $\beta$ -caténine libre dans les cellules restent faibles et le facteur de transcription TCF (T-cell factor) /LEF (Lymphoid enhancer factor) reste complexé avec Groucho qui assure la répression des gènes cibles de Wnt. La formation du complexe nucléaire TCF/LEF/ $\beta$ -caténine est empêché. Ainsi, dans l'état « éteinte » de la

signalisation Wnt, la GSK3 $\beta$  est constitutivement active et les cellules ont de faibles niveaux cytoplasmiques et nucléaires de  $\beta$ -caténine.

Lorsqu'un ligand Wnt se lie à un complexe formé par un récepteur transmembranaire Fzd et un corécepteur LRP5/6, la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine « s'allume » (Cong et al. 2004). Cette activation provoque la phosphorylation, l'activation et le recrutement d'une protéine nommée dishevelled (Dvl). Dvl permettrait ainsi le recrutement à la membrane de l'Axine (et du reste du complexe de dégradation) qui va interagir avec la queue intracytoplasmique de LRP5/6. L'Axine est alors dégradée, ce qui favorise la déstructuration du complexe de dégradation et protège la  $\beta$ -caténine cytosolique (Cliffe et al. 2003). L'activation de Dvl entraîne également l'inhibition de la GSK3 $\beta$ , ce qui permet de diminuer la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine et sa dégradation. Ainsi, l'activation de la voie canonique permet une stabilisation post-traductionnelle de la  $\beta$ -caténine par une dégradation de l'Axine et une inhibition de la GSK3 $\beta$ . A mesure que le taux de  $\beta$ -caténine cytosolique augmente, celle-ci peut être transloquée dans le noyau pour interagir avec les facteurs LEF/TCF liés à l'ADN et activer l'expression de gènes cibles.



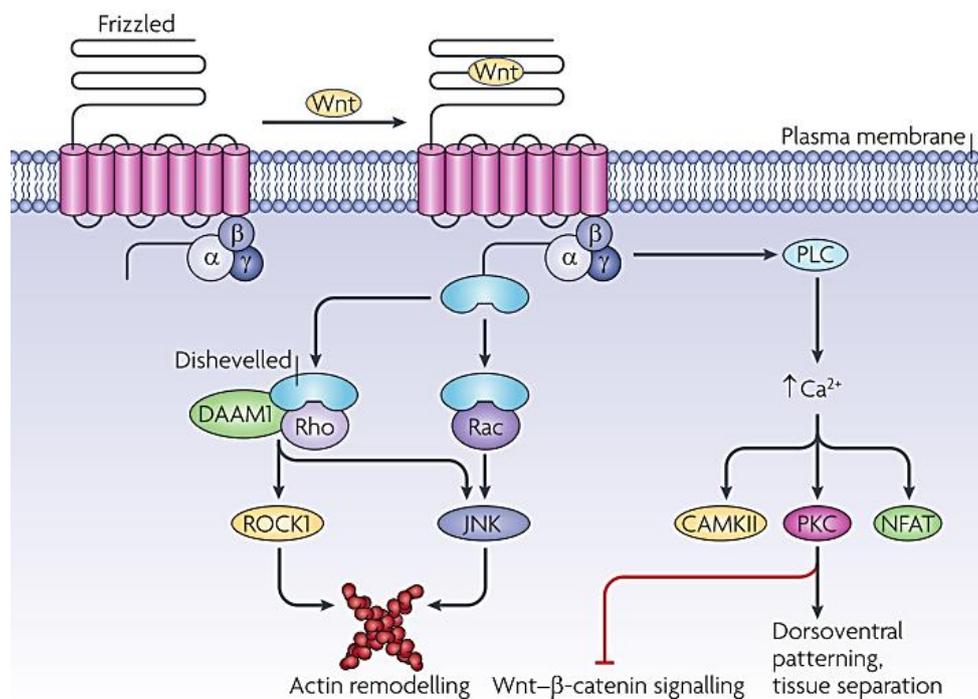
**Figure 25: La voie Wnt canonique. A gauche : Etat « éteinte » de la signalisation Wnt canonique.** Lorsque les récepteurs Fzd ne sont pas liés à des protéines Wnt, un complexe de dégradation de la  $\beta$ -caténine, composé de nombreuses protéines dont l'APC et l'axine, se forme. Ces protéines se lient à la  $\beta$ -caténine et conduisent à sa phosphorylation. Ceci conduit au recrutement d'une ubiquitine ligase E3, qui transforme la  $\beta$ -caténine en une cible pour la dégradation par le protéasome. **A droite : Etat « allumée » de la signalisation Wnt canonique.** La formation du complexe Wnt/Fzd/LRP inhibe l'activité kinase du complexe de dégradation de la  $\beta$ -caténine. La  $\beta$ -caténine n'est plus dégradée, va s'accumuler dans le cytoplasme et être transloquée dans le noyau pour interagir avec les facteurs TCF/LEF liés à l'ADN et activer l'expression de gènes cibles. Source : (Angers\* et al. 2009).

La voie Wnt canonique joue un rôle important au cours du développement mais intervient également dans la régulation de la prolifération, la différenciation, l'apoptose cellulaire et l'homéostasie tissulaire. On a pu mettre en évidence une dérégulation de cette voie dans plusieurs pathologies, notamment dans les cancers. Cette voie participant à de nombreux processus cellulaires et biologiques régule de nombreux gènes cibles (Logan\* et al. 2004, Vlad\* et al. 2008, MacDonald\* et al. 2009). Parmi ces gènes, on peut citer c-myc (He 1998), c-jun (Mann et al. 1999), la E-cadhérine (Anna et al. 2003), le VEGF (Zhang et al. 2001), les métalloprotéases matricielles comme la MMP-7 (Brabletz et al. 1999), MMP-2 et -9 (Wu et al. 2007), les éphrines EphB/ephrin-B (Batlle et al. 2002). Les composants de la voie Wnt, incluant Wnt3a (Zhang et al. 2009), Fzd7 (Willert et al. 2002), Axine2 (Jho et al. 2002), TCF/LEF (Filali et al. 2002) sont également régulés par la voie  $\beta$ -caténine. D'autres gènes

cibles ont été identifiés et rentrent en compte dans l'explication des processus biologiques joués par cette voie de signalisation. Une liste de ces gènes cibles est mise à jour régulièrement et peut être consultée sur le site « The Wnt Homepage » (<http://web.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/>).

## ii. Voies Wnt non canoniques

L'intérêt porté aux voies non canoniques étant plus récent, elles sont moins bien caractérisées que la voie canonique. Cependant, les connaissances accumulées ont permis de déterminer et de diviser ces voies en 2 branches distinctes: la voie de polarité planaire cellulaire (PCP ou Planar Cell Polarity) et la voie calcium-dépendante (Wnt/Ca<sup>2+</sup>) (**Figure 26**).



**Figure 26: Les voies Wnt non canoniques.** Les récepteurs Fzd engagent leur protéines G hétérotrimérique (composée des sous-unités α, β et γ) et/ou les protéines dishevelled pour initier les voies de signalisation non canoniques. **A gauche : La voie de polarité cellulaire planaire (PCP).** Cette voie entraîne l'activation des petites GTPases Rho et Rac pour réguler le cytosquelette d'actine. Dishevelled-associated activator of morphogenesis 1 (DAAM1), lorsqu'il est complexé avec Dishevelled et Rho, active la Rho-associated protein kinase 1 (Rock1), tandis que le complexe Dishevelled-Rac active Jun kinase N-terminale (JNK). Ces complexes interviennent ainsi dans le remodelage de l'actine. **A droite : La voie calcium dépendante.** Cette voie entraîne l'activation de la phospholipase C (PLC) et induit une augmentation de la concentration et des flux de Ca<sup>2+</sup> intracellulaires qui conduit à l'activation de la Calmodulin-dependent protein kinase (CAMKII), de la Protéine Kinase C (PKC) et du Facteur de Transcription Nucléaire des cellules T (NFAT). Source : (Angers\* et al. 2009).

### a. Voie de polarité planaire cellulaire (PCP)

---

La voie de signalisation PCP, découverte tout d'abord chez la drosophile, est un mécanisme conservé de régulation de l'organisation du tissu épithélial. En effet, les cellules de l'épithélium possèdent une polarité apico-basolatérale et sont également polarisées le long du plan de la couche épithéliale. Chez les vertébrés, ce système est à la base de l'organisation des cils de l'épithélium sensoriel dans l'oreille interne, de l'orientation des poils et de la migration des cellules mésodermes dorsales durant la gastrulation (Montcouquiol et al. 2003, Guo et al. 2004, Wang\* et al. 2007). Plus récemment, des études ont montré que la voie PCP est impliquée dans des processus physiologiques du développement tels que la migration neuronale, la guidance des axones et l'organogenèse du cœur, du poumon, du rein et de l'œil (Gessert et al. 2010, Tissir et al. 2010, Yates et al. 2011, Jiang et al. 2013).

La voie PCP met en jeu la régulation du cytosquelette d'actine pour une organisation polarisée des structures et une migration dirigée. Comme pour la voie canonique, l'activation de la voie PCP requiert l'activation de récepteurs Fzd et le recrutement de Dvl à la membrane. Cependant, après la relocalisation de Dvl à la membrane, on peut observer une activation de deux branches indépendantes faisant intervenir les petites GTPases Rho et Rac (Habas et al. 2003, Angers\* et al. 2009). La première branche active Rho et la molécule DAAM1 (Dishevelled associated activator of morphogenesis 1) qui activent ensuite ROCK (Rho-associated kinase)(Habas et al. 2001, Ju et al. 2010). La deuxième branche implique l'activation de Rac puis de Jun-N-terminal kinase (JNK)(Fanto\* et al. 2004, Kikuchi\* et al. 2007). Ces deux branches agissent sur le remodelage de l'actine (**Figure 26**).

### b. Voie calcium-dépendante (Wnt/Ca<sup>2+</sup>)

---

La voie Wnt/Ca<sup>2+</sup> reste la voie de signalisation Wnt/Fzd la moins décrite, mais il a été démontré que cette voie intervient dans des processus importants au cours du développement ou en pathologie. La voie Wnt/Ca<sup>2+</sup> joue ainsi un rôle dans la polarité dorso-ventrale et les mouvements de convergence-extension et est également impliquée dans les cancers (Pukrop et al. 2006, Dissanayake et al. 2007).

Cette voie de signalisation Wnt non canonique fait intervenir la liaison de protéines Wnt sur des récepteurs Fzd, le recrutement de Dvl et l'activation de la phospholipase C (PLC) en

aval. Ceci entraîne une augmentation de la concentration du calcium intracellulaire (Kikuchi et al. 2007) et induit l'activation de plusieurs cibles en aval y compris la protéine kinase C (PKC) et la Calcium calmoduline kinase II (CaMKII) (Pongracz\* et al. 2006). Le taux élevé de Ca<sup>2+</sup> peut également activer la calcineurine, une phosphatase qui induit la déphosphorylation du facteur de transcription nucléaire des cellules T (NFAT), résultant en une accumulation de NFAT dans le noyau et une activation de gènes cibles (van Es\* et al. 2003) (**Figure 26**).

#### D. Autres ligands modulateurs des voies Wnt/Fzd

---

Il existe plusieurs groupes de modulateurs des voies Wnt/Frizzled, qui peuvent être des antagonistes ou des régulateurs positifs.

Le premier groupe d'antagonistes inclut les secreted Frizzled-related protein (sFRP). Ces protéines ont un domaine N terminal riche en cystéine (CRD) très fortement similaire au site de liaison des Wnt présents sur les récepteurs Frizzled. Ainsi les sFRP peuvent se lier directement aux ligands Wnt, les séquestrer et bloquer les voies canoniques et non canoniques. Ils peuvent également former des complexes non fonctionnels avec les récepteurs Fzd (Bafico et al. 1999).

Le deuxième groupe d'antagonistes comprend les 4 protéines de la famille Dickkopf (Dkk1 à 4). Ces protéines se lient via leur domaine C-terminal au co-récepteur LRP5/6 et empêchent ainsi son interaction avec les ligands Wnt.

D'autres facteurs solubles tels que la Norrin ou la R-spondin peuvent réguler positivement les voies de signalisation Wnt/Fzd. La Norrin est une protéine sécrétée qui agit comme un facteur de croissance à la fois de manière autocrine et paracrine. Les gènes R-spondin représentent une famille de protéines sécrétées conservées (R-spondin1 à 4) qui sont capables d'induire les voies Wnt/Fzd (Chien\* et al. 2009).

## E. Signalisation Wnt/Fzd dans l'inflammation et l'angiogénèse

---

### i. Signalisation Wnt/Fzd dans l'inflammation

---

#### a. Wnt5a

---

L'implication des voies Wnt/Fzd dans l'inflammation repose essentiellement sur la surexpression de Wnt5a dans les pathologies inflammatoires chroniques telles que l'arthrite rhumatoïde (Sen et al. 2000, Sen\* 2005), le psoriasis (Reischl et al. 2007, Gudjonsson et al. 2010), la septicémie (Pereira et al. 2008)) et l'athérosclérose (Christman II et al. 2008) ainsi que dans des cancers tels que le mélanome où l'inflammation joue un rôle important dans le développement de la maladie (Weeraratna et al. 2002). L'infection par un pathogène peut également induire l'expression de Wnt5a par le tissu infecté. C'est le cas de poumons de patients infectés par *Mycobacterium tuberculosis* (Blumenthal et al. 2006). Dans de nombreux cas, la surexpression de Wnt5a est accompagnée d'une surexpression du récepteur Fzd5 (Sen et al. 2000, Gudjonsson et al. 2010). Les voies de signalisation Wnt/Fzd sous-jacentes ne sont pas toujours connues mais sont souvent décrites comme étant non canoniques (Sen et al. 2008).

Sen et al. ont criblé le profil d'expression des Wnt et Fzd dans des tissus synoviaux de patients atteints d'arthrite rhumatoïde. Wnt1, Wnt5a, Wnt10b, Wnt11, Wnt13 ainsi que Fzd2, Fzd5 et Fzd7 y sont retrouvés plus fortement exprimés comparés aux tissus sains. En culture, les synoviocytes fibroblastiques (FLS) de patients expriment plus fortement les cytokines pro-inflammatoires IL-6, IL-8 et IL-15 que des fibroblastes synoviaux normaux. Cette activation peut être induite dans des fibroblastes par transfection de Wnt5a (Sen et al. 2000). La production de cytokines en réponse à Wnt5a passerait en partie par la signalisation NF- $\kappa$ B (Sen\* 2005, Bhatt\* et al. 2014).

Dans le contexte inflammatoire du psoriasis, Wnt5a est la seule protéine Wnt retrouvée fortement surexprimée dans l'épiderme de biopsies de peaux de patients. Lors du large criblage par micro-array effectué par l'équipe de Reischl, environ 10% des gènes différentiellement exprimés entre les peaux saines et atteintes de psoriasis sont directement ou indirectement liés aux voies Wnt/canonique et non canoniques (Reischl et al. 2007). Romanowska et al. retrouvent une forte expression de Wnt5a dans les kératinocytes de patients comparés aux contrôles (Romanowska et al. 2009).

Kim et al. en 2010 réalisent une étude *in vitro* sur des cellules endothéliales humaines. Ils démontrent que Wnt5a provoque l'expression de facteurs pro-inflammatoires (IL-6, IL-8, IL-1 $\alpha$ , ...) par les cellules endothéliales (Kim et al. 2010).

#### b. Wnt1

---

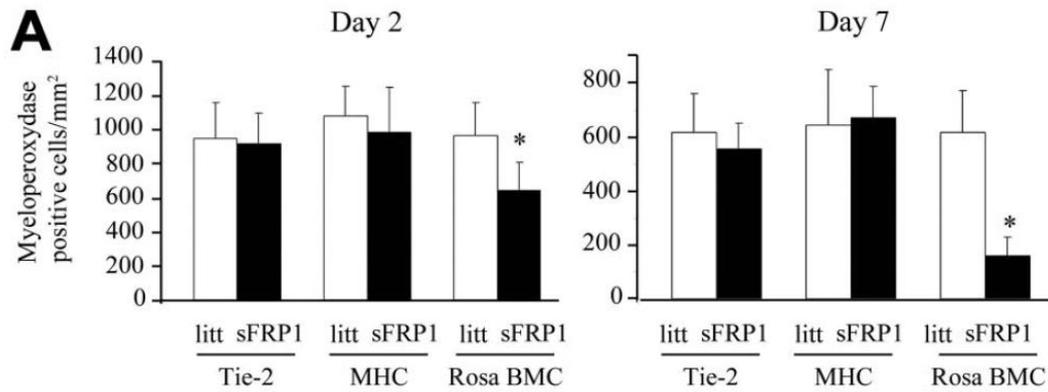
Bien que Wnt5a semble être le principal Wnt à jouer un rôle dans l'inflammation, Wnt1 est lui aussi impliqué dans l'arthrite rhumatoïde. Wnt1 induit l'expression de fibronectine via une signalisation LEF/TCF/ $\beta$ -caténine dans les synoviocytes de patients. Wnt1 stimule également la sécrétion de MMP-3 (impliqué dans la dégradation du cartilage) par une voie LEF/TCF/ $\beta$ -caténine-indépendante. Enfin dans des chondrocytes (cellules de cartilage) la signalisation LEF-1/ $\beta$ -caténine a été montrée comme favorisant la transcription de médiateurs pro-inflammatoires (COX2 et MMP-13) (Sen et al. 2008, Bhatt\* et al. 2014).

#### c. sFRP1

---

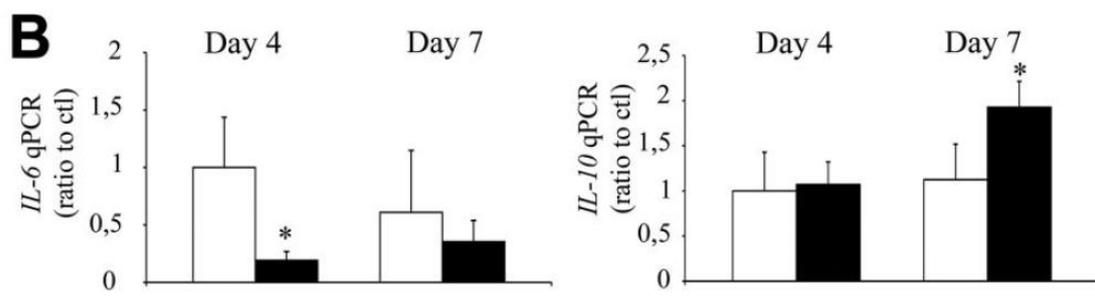
Des études ont montré que la signalisation Wnt5a est spécifiquement bloquée par sFRP1, un modulateur de la signalisation Wnt (Pereira et al. 2008). Des études réalisées au laboratoire, sur le rôle de sFRP1 dans la cicatrisation post-infarctus chez la souris, ont déterminé qu'une surexpression de sFRP1 réduit la taille de la cicatrice post-infarctus et diminue l'infiltration des neutrophiles dans le tissu ischémique (Barandon et al. 2003, Barandon et al. 2011).

*In vivo*, l'infiltration des neutrophiles dans la zone infarctée est diminuée chez des souris contrôles irradiées puis transplantées avec de la moelle osseuse de souris surexprimant sFRP1, comparées aux souris contrôles. L'infiltration des macrophages et lymphocytes T n'est en revanche pas modifiée. Cette action est spécifique de l'expression de sFRP1 par les cellules de moelle osseuse. En effet la surexpression de sFRP1 dans les cellules endothéliales ou les cardiomyocytes ne perturbe pas le recrutement des neutrophiles (**Figure 27**) (Barandon et al. 2011).



**Figure 27: Infiltration des neutrophiles après infarctus du myocarde.** Quantification de l'infiltration de neutrophiles, par marquage myéloperoxydase, à 2 et 7 jours post-infarctus dans des souris contrôles (blanc) ou surexprimant sFRP1 (noir) dans les cellules endothéliales (Tie-2), les cardiomyocytes (MHC) ou les cellules de moelle osseuse (Rosa BMC). Source : (Barandon et al. 2011)

*In vitro*, sFRP1 bloque la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-8 et TNF $\alpha$ ) par des neutrophiles humains en réponse à une activation par du TNF $\alpha$ . *In vivo*, les expressions en ARNm de plusieurs cytokines pro- et anti-inflammatoires furent analysées à 4 et 7 jours post-infarctus. La surexpression de sFRP1 dans les cellules de moelle osseuse diminue l'expression d'IL-6 (pro-inflammatoire) à 4 jours et au contraire augmente celle d'IL-10 (anti-inflammatoire) à 7 jours (**Figure 28**). Les expressions de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et MCP1 (pro-inflammatoires) ne sont pas modifiées. De même la surexpression de sFRP1 dans les cellules endothéliales ou les cardiomyocytes n'a aucun effet sur l'expression des cytokines (Barandon et al. 2011).



**Figure 28: Expression des cytokines dans la zone ischémisée après infarctus du myocarde.** Analyse par qPCR de l'expression d'IL-6 et IL-10 à 4 et 7 jours post-infarctus dans les souris contrôles (blanc) et surexprimant sFRP1 dans les cellules de moelle osseuse (noir). Source : (Barandon et al. 2011).

Chez ces souris surexprimant sFRP1 dans les cellules de moelle osseuse, la taille de la zone infarctée et l'incidence de rupture cardiaque sont plus faibles que chez les souris contrôles ou surexprimant sFRP1 dans les cellules endothéliales ou les cardiomyocytes (Barandon et al. 2011).

Ce travail est le premier montrant le rôle de sFRP1, un modulateur de la voie Wnt/Fzd, dans la régulation du processus inflammatoire après infarctus du myocarde. Cette régulation se fait de façon autocrine par l'action du sFRP1 exprimé par les leucocytes sur les neutrophiles.

Dans plusieurs des pathologies décrites ci-dessus, le rôle de la signalisation Wnt/Fzd, et surtout de Wnt5a, sur l'inflammation semble avoir lieu principalement dans les macrophages. Ces travaux sur la signalisation Wnt/Fzd dans les macrophages dans les contextes inflammatoires sont présentés plus loin dans le manuscrit.

#### i. Signalisation Wnt/Fzd dans l'angiogenèse

Plusieurs études ont démontré *in vitro* et *in vivo* que la signalisation Wnt/Fzd est présente dans les cellules endothéliales, cellules centrales de l'angiogenèse. De plus, l'évidence du rôle de la signalisation Wnt/Fzd dans la formation des vaisseaux est venue des travaux faits sur des souris délétées pour les différents Wnt et Frizzled (**Tableau 3**). Ces études ont montré l'implication des voies canoniques et non canoniques. Ci-dessous vous sont présentés quelques exemples de l'implication de la signalisation Wnt/Fzd dans l'angiogenèse.

#### a. Ligands Wnt

Les protéines Wnt, exprimées par les cellules endothéliales ainsi que les cellules murales, les astrocytes, les neurones, les cellules musculaires et les cellules souches mésenchymateuses (...), agissent de manière autocrine et/ou paracrine et régulent les fonctions des cellules endothéliales durant l'angiogenèse physiologique ou post-ischémique (Wright et al. 1999, Goodwin et al. 2006, Leroux et al. 2010). Par exemple, les cellules endothéliales expriment Wnt5a, Wnt7a et Wnt10b et les cellules musculaires lisses vasculaires expriment Wnt5a (Wright et al. 1999). *In vivo*, les vaisseaux du placenta

expriment Wnt2 (Monkley et al. 1996) et les vaisseaux du sac vitellin de la souris expriment Wnt5a et Wnt10b (Ishikawa et al. 2001).

Wnt2 est nécessaire à la formation d'un réseau vasculaire placentaire normal. En effet, le phénotype de souris déficientes en Wnt-2 se caractérise par une vascularisation anormale du placenta avec un nombre réduit de capillaires. Environ 50% des embryons déficients en Wnt-2 meurent pendant la période périnatale et le pourcentage de survie des embryons est réduit par rapport au type sauvage, avec une durée de survie après la naissance en corrélation avec la gravité des anomalies placentaires (Monkley et al. 1996).

Wnt4 fut décrit comme intervenant dans la formation vasculaire des gonades de manière spécifique du sexe. Un défaut de Wnt4 chez la souris empêche la formation de vaisseaux sanguins coelomiques spécifiques des mâles (Zerlin\* et al. 2008).

Wnt7b participe au développement du réseau vasculaire des poumons, car il a été montré que des embryons murins dépourvus de Wnt7b présentent des défauts graves dans la couche musculaire lisse des vaisseaux pulmonaires, conduisant à des hémorragies pulmonaires (Zerlin\* et al. 2008).

En plus d'exprimer les ligands Wnt, les cellules vasculaires sont aussi capables de répondre aux signaux Wnt via la voie Wnt canonique.

Il a été par exemple montré que l'expression des ligands Wnt7a et Wn7b est enrichie dans le Système Nerveux Central (SNC) et que l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine est suivie par la formation et la différenciation des vaisseaux cérébraux (Stenman et al. 2008). Les souris doublement mutées pour Wnt7a/7b présentent des défauts sévères de l'angiogenèse du SNC (Daneman et al. 2009).

Phng et al. ont démontré que la voie Wnt canonique est fortement activée dans les vaisseaux sanguins envahissant le cerveau durant l'embryogenèse et durant l'angiogenèse post-natale de la rétine (Phng et al. 2009).

De plus, des études ont montré l'implication de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans le développement vasculaire. Ainsi, la délétion de la  $\beta$ -caténine dans les cellules endothéliales induit une létalité embryonnaire précoce in utero due à une altération de la formation des lumières des vaisseaux et la présence d'hémorragies diffuses (Cattelino et al. 2003).

## b. Récepteurs Frizzled

---

Comme indiqué dans le tableau 3, plusieurs récepteurs Frizzled ont été impliqués dans la formation des vaisseaux. C'est le cas de Fzd4 dans la formation du réseau rétinien et de Fzd5 dans le développement du sac vitellin.

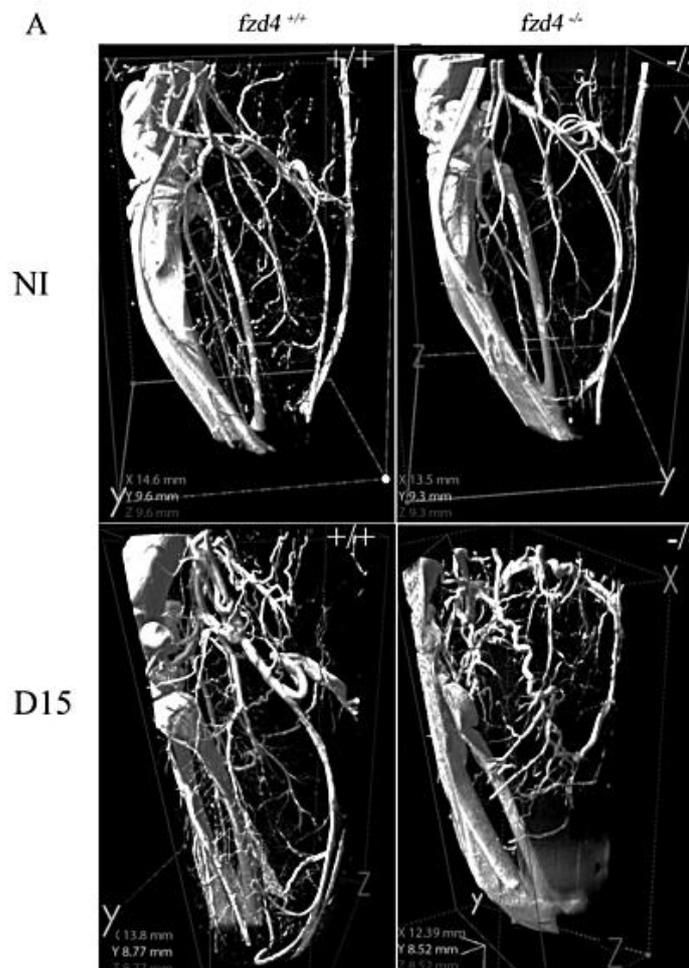
Fzd4 contrôle la croissance et l'organisation vasculaire de la rétine. Des mutations de Fzd4 sont connues pour être liées à des pathologies vasculaires rétiniennes telles que la pathologie oculaire héréditaire humaine nommée FEVR (Familial Exudative VitreoRetinopathy). Cette pathologie se caractérise par un défaut de vascularisation périphérique de la rétine. Des études ont montré que Fzd4 transmet son signal via la voie canonique ou la voie non canonique calcium dépendante. Des défauts dans l'une ou l'autre des voies peuvent contribuer au phénotype de la FEVR (Zerlin\* et al. 2008).

*In vivo*, la signalisation par Fzd5 est critique pour l'angiogenèse du sac vitellin et du placenta. Les souris déficientes en Fzd5 présentent un phénotype létal au jour E11,5 du développement en raison d'une vascularisation insuffisante et d'un réseau désorganisé dans le sac vitellin et le placenta. La prolifération des cellules endothéliales est réduite (Ishikawa et al. 2001).

Au laboratoire, des études ont montré l'implication de plusieurs récepteurs Fzd, Fzd4 (Descamps et al.), Fzd6 (données non publiées) et Fzd7 (Ferreira et al.), dans la régulation de l'angiogenèse et de l'intégrité du réseau vasculaire dans plusieurs modèles chez la souris. Descamps et al. ont étudié le lien entre Fzd4 et l'angiogenèse via la voie non canonique PCP. Les souris déficientes en Fzd4 (Fzd4<sup>-/-</sup>) présentent une diminution de densité et de branchements vasculaires des petites artères du cœur et des reins. Ces défauts de densité et de branchement sont également visibles dans la patte des souris. L'évaluation de la capacité des souris Fzd4<sup>-/-</sup> à restaurer un réseau artériel fonctionnel fut testé sur le modèle d'ischémie de la patte. Le retour du flux sanguin, la densité et le branchement vasculaire sont diminués chez les souris mutantes à 15 jours post-ischémie. De plus les néovaisseaux formés sont désorganisés (**Figure 29**) (Descamps et al. 2012).

Les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les fibroblastes embryonnaires isolés des souris Fzd4<sup>-/-</sup> ont un défaut de prolifération et de migration explicable par une stabilisation des microtubules et une polarisation perturbées. La

signalisation Fzd4 intervenant dans ces mécanismes passe par une voie Wnt/PCP dépendante (Descamps et al. 2012).



**Figure 29: Réseau vasculaire de patte non ischemiées et ischemiées.** Des souris contrôles ( $fzd4^{+/+}$ ) et déficientes en Fzd4 ( $fzd4^{-/-}$ ) subissent une ligature de l'artère fémorale induisant une ischemie du membre inférieur. Le réseau vasculaire des pattes contrôles non ischemiées (NI) et des pattes à 15 jours post-ischemie (D15) est visualisé par micro-scanner. Source : (Descamps et al. 2012)

### c. sFRP1

Plusieurs études du laboratoire se sont concentrées sur le rôle de sFRP1 dans la cellule endothéliale et l'angiogenèse. Chez la souris, sFRP1 est fortement exprimé dans le réseau vasculaire du sac vitellin lors des phases précoces du développement embryonnaire. Chez l'adulte on le trouve exprimé entre autres dans l'endothélium des artères et des capillaires où il inhibe la prolifération des cellules vasculaires (Duplâa et al. 1999, Jaspard et al. 2000).

Dufourcq et al. ont montré l'induction de l'angiogenèse par sFRP1 dans plusieurs modèles : angiogenèse cyclique des ovaires (souris), membrane chorioallantoïque (poulet), gliome (souris) et ischémie du membre inférieur (souris) (Dufourcq et al. 2002, Dufourcq et al. 2008).

sFRP1 est naturellement induit dans la patte des souris après ischémie. L'injection de sFRP1 au moment même de l'induction de l'ischémie entraîne une diminution de la prolifération cellulaire et de la densité capillaire à 3 et 7 jours post-ischémie. Cet effet passe par une voie  $\beta$ -caténine dépendante (Ezan et al. 2004). La surexpression de sFRP1 spécifiquement dans les cellules endothéliales de souris transgénique induit un retard de revascularisation de la patte jusqu'à 14 jours post-ischémie. Cependant après quinze jours le résultat s'inverse, la densité vasculaire devient plus importante chez les souris surexprimant sFRP1. L'extinction de sFRP1 entre 0 et 6 jours post-ischémie puis sa ré-expression à 7 jours dans les cellules endothéliales, grâce à un système inductible de type Tet-Off, provoque une forte augmentation de la densité capillaire 15 jours après l'ischémie (Dufourcq et al. 2008). Dans ce cas, l'action de sFRP1 est dépendante de la GSK3 $\beta$  mais indépendante de la  $\beta$ -caténine. sFRP1 active la GSK3 $\beta$  en inhibant la phosphorylation de sa sérine 9 (Dufourcq et al. 2002, Dufourcq et al. 2008). Dufourcq et al. propose un modèle dans lequel sFRP1 régulerait deux processus au cours de la réparation post-ischémie.

De plus, il a été montré que sFRP1 interagit avec les récepteurs Fzd4 et Fzd7. sFRP1 participerait à la néovascularisation postnatale après ischémie en bloquant les récepteurs Fzd dans les cellules endothéliales (Dufourcq et al. 2008).

## V. Récepteur Frizzled 7

---

### A. Expression de Frizzled 7

---

Le récepteur Fzd7 murin est exprimé dans l'épiblaste, l'endoderme et le mésoderme (Kemp et al. 2007). Ce récepteur est ensuite exprimé dans les frontières ventro-latérales des somites nouvellement formés, le tube neural et le mésenchyme au cours de l'embryogenèse (Borello et al. 1999). Il est également exprimé dans le cerveau adulte, les yeux, le cœur, le rein, le foie, le poumon, la rate (Wang et al. 1996) et également dans les cryptes intestinales et du côlon (Gregorieff et al. 2005).

Le récepteur Fzd7 humain est exprimé dans le blastocyste et dans les cellules souches embryonnaires, les progéniteurs endodermiques et neuronaux dérivés des cellules souches embryonnaires et la cochlée foetale (Kato et al. 2007). Ce récepteur est fortement exprimé dans le rein et le poumon du fœtus, le muscle squelettique et le cœur des adultes, mais faiblement exprimé dans le cerveau adulte et les reins (Sagara et al. 1998). Fzd7 est aussi exprimé dans le tractus gastro-intestinal, y compris l'oesophage, l'estomac, le duodénum et le côlon (Kirikoshi et al. 2001). Fzd7 est préférentiellement exprimé dans les cryptes coliques (Kosinski et al. 2007), ce qui est compatible avec le domaine d'expression de Fzd7 dans le côlon chez la souris. De plus, il a été montré que l'expression de Fzd7 dans les cellules souches mésenchymateuses est diminuée au cours de l'ostéogenèse (Boland et al. 2004).

Chez l'Homme, le récepteur Fzd7 est aussi retrouvé fortement exprimé dans différents types de cancer. Il est notamment exprimé dans les cellules du cancer colorectal (SW480), les cellules du cancer du poumon (A549) et les cellules tumorales du cerveau (G361) (Sagara et al. 1998). Fzd7 est régulé positivement dans le cancer gastrique, le cancer de l'oesophage, le cancer colorectal et le cancer du foie (Sagara et al. 1998, Kirikoshi et al. 2001, Merle et al. 2004, Merle et al. 2005, Vincan et al. 2007).

## B. Rôle de Frizzled 7

### i. Rôle dans le développement

De nombreuses études ont démontré l'implication de Fzd7 dans la régulation de différents processus cellulaires pendant les premiers stades de l'embryogenèse tels que les mouvements de convergence-extension, la séparation des tissus pendant la gastrulation, la formation de l'axe dorso-ventral et l'induction du mésoderme et de la crête neurale.

Les rôles de Fzd7 ont surtout été étudiés dans les modèles de développement chez le Xénope, le poisson Zèbre et plus récemment chez la souris.

## a. Rôle dans le développement du Xénope et du Poisson zèbre

---

Des expériences de gain de fonction de Xfzd7 et des études *in vitro* ont montré que Xfzd7 peut interagir avec plusieurs ligands XWnt (tels que XWnt8b, XWnt5a et XWnt11) pour activer les voies de signalisation canonique et non canoniques (Djiane et al. 2000, Medina et al. 2000, Sumanas et al. 2001).

La surexpression de l'orthologue Fzd7 dans le mésoderme dorsal du Xénope affecte le processus de convergence-extension, induit un retard de l'invagination du mésoderme au cours de la gastrulation et perturbe la migration des cellules de la crête neurale. La transduction du signal par le biais de XWnt5a et XWnt11 et de Fzd7 active la cascade de signalisation PKC-Cdc42, une activation dépendante de Dvl mais indépendante de la  $\beta$ -caténine (Djiane et al. 2000, Medina et al. 2000, Penzo-Mendèz et al. 2003).

D'autre part, des expériences de perte de fonction ont mis en évidence l'interaction entre Xfzd7 et XWnt8b ainsi que le rôle de Xfzd7 dans le contrôle de la spécification de l'axe dorso-ventral *via* la voie Wnt/ $\beta$ -caténine (Sumanas et al. 2000, Sumanas et al. 2001). L'activation de Xfzd7 par XWnt1, XWnt7b et XWnt8 participe également à la régulation de l'induction de la crête neurale *via* la voie  $\beta$ -caténine (Abu-Elmagd et al. 2006).

A l'inverse, dans le chordo-mésoderme, Xfzd7 régule les mouvements cellulaires au cours de la gastrulation *via* différentes voies non canoniques. En effet, l'activation de la voie PKC par la liaison entre XWnt5a, XWnt11 et Xfzd7 permet de contrôler la séparation des tissus mésodermique et ectodermique tandis que la voie Fzd7/JNK régule la convergence-extension du mésoderme axial (Winklbauer et al. 2001, Medina et al. 2004, Kim et al. 2008).

Enfin, une étude plus récente a montré que différents niveaux d'activation de la voie Wnt/Fzd7 permettent de moduler l'organogenèse du tube digestif chez le Xénope. Les voies de signalisation Fzd7/ $\beta$ -caténine et Fzd7/JNK coordonnent ainsi la prolifération, la morphogenèse et le devenir des cellules progénitrices de l'endoderme (Zhang et al. 2013).

La fonction de Fzd7 au cours de la gastrulation chez le Xénope est conservée chez le poisson Zèbre *via* la voie de signalisation non canonique faisant intervenir Cdc42 (Knowlton et al. 2004). Chez le poisson Zèbre, Wnt11 interagit avec Fzd7 intervenant ainsi dans la régulation des mouvements de convergence-extension (Witzel et al. 2006).

## b. Rôle dans le développement de la souris

Chez la souris, la transduction du signal Wnt6 par Fzd7 active la voie de signalisation  $\beta$ -caténine au cours de la somitogenèse (Linker et al. 2005).

De plus, une étude très récente a mis en évidence le rôle redondant de Fzd7 et Fzd2 chez la souris. En effet, Yu et al ont montré que ces deux récepteurs interviennent synergiquement dans le contrôle des processus de convergence-extension et de la fermeture du septum ventriculaire et du palais chez la souris. Fzd7 et Fzd2 sont capables d'activer la voie de signalisation canonique et la voie de polarité cellulaire planaire et réguleraient ces différentes étapes de l'embryogenèse *via* leurs interactions avec différents ligands Wnt (Wnt3a, Wnt5a et Wnt11) et avec Dvl3 et Vangl2 (Yu et al. 2012).

### ii. Rôle dans les cellules souches

Divers auteurs ont mis en évidence le rôle de Fzd7 dans l'auto renouvellement des cellules souches embryonnaires et dans leur différenciation vers la lignée hématopoïétique. Melchior et al ont montré que l'expression de Fzd7 est augmentée dans les cellules souches embryonnaires humaines comparé aux cellules différenciées et que son inhibition par des shRNA conduit à une diminution de l'expression de Oct-4, un facteur intervenant dans le maintien des cellules souches dans un état indifférencié (Melchior et al. 2008). D'autres études menées sur des cellules souches embryonnaires humaines ont montré que Wnt11 induit la différenciation vers la lignée hématopoïétique en induisant l'expression de Fzd7 et de la E-cadhérine. A l'inverse, la voie canonique (Wnt3a) est importante dans la prolifération des progéniteurs hémogéniques et hématopoïétiques qui apparaissent lors du développement du corps embryoïde (Vijayaragavan et al. 2009).

Une étude récente a montré que Fzd7 est fortement exprimé par les cellules progénitrices de la cornée chez l'homme. De plus, l'inhibition de Fzd7 par des shRNA entraîne une perte des caractéristiques de ces cellules suggérant que Fzd7 aide à maintenir les cellules progénitrices de la cornée dans un état indifférencié (Mei et al. 2014).

### iii. Rôle dans les cancers

---

Comme décrit précédemment, Fzd7 est fortement exprimé dans certains types de cancers chez l'homme. Ainsi, Fzd7 est surexprimé dans 90% des carcinomes hépatocellulaires et régule positivement la migration et la prolifération des cellules tumorales. (Merle et al. 2004, Merle et al. 2005). La transduction du signal par le biais de Wnt3 et de Fzd7 active la cascade de signalisation  $\beta$ -caténine/TCF dans le carcinome hépatique (Bengochea et al. 2008, Kim et al. 2008).

Fzd7 est fréquemment surexprimé dans les cancers colorectaux et régule la motilité, l'invasion et les propriétés métastatiques des cellules cancéreuses via la voie canonique et non canonique. Fzd7 joue également un rôle important dans l'épithélialisation et dans la transition épithélio-mésenchymateuse dans la lignée cellulaire humaine de cancer colorectal LIM1863 (Vincan et al. 2007).

Une étude récente de Yang et al. a montré que Fzd7 est surexprimé dans des cancers du sein triplement négatif. Fzd7 via l'activation de la voie canonique intervient essentiellement dans la prolifération des cellules cancéreuses (Yang et al. 2011).

Ces différents travaux ont mis en évidence un rôle critique de Fzd7 dans la tumorigenèse et ont permis d'identifier ce récepteur comme un nouveau bio-marqueur et comme une cible thérapeutique potentielle dans le traitement des cancers. L'inhibition pharmacologique de Fzd7 *in vitro* et *in vivo* par l'utilisation de petits peptides (RHPD) ou d'un antagoniste (Fj9) qui inhibent l'interaction entre Fzd7 et Dvl induit l'inhibition de la voie canonique et permet ainsi d'augmenter l'apoptose des cellules tumorales dans le carcinome hépatocellulaire et de diminuer la croissance de ces tumeurs (Fujii et al. 2007, Nambotin et al. 2011). L'utilisation d'un récepteur Fzd7 soluble *in vitro* et *in vivo* entraîne l'inhibition de la voie canonique et sensibilise les cellules de carcinomes hépatiques à d'autres chimiothérapies telles que la doxorubicine (Wei et al. 2011). Enfin, Ueno et al. ont montré que l'inhibition de Fzd7 *in vitro* par une stratégie d'ARN interférence entraîne une diminution de la viabilité des cellules et de leur activité d'invasion (Ueno et al. 2009).

L'ensemble de ces données indiquent que les orthologues de Fzd7 sont capables de transmettre les signaux de la voie Wnt canonique et non-canonique en fonction du contexte au cours de l'embryogenèse, de l'homéostasie des tissus adultes et en pathologie.

#### iv. Rôle dans l'inflammation

---

Comme décrit plus haut (paragraphe « Signalisation Wnt/Fzd dans l'inflammation ») Fzd7 est retrouvé exprimé, ainsi que Fzd2 et Fzd5, dans le tissu synovial de patients atteints d'arthrite rhumatoïde par l'équipe de Sen et al. Cependant ils étudient et montrent une action principale de Fzd5 (Sen et al. 2000).

De plus Fzd7 a été montré comme une des cibles de sFRP1, antagoniste des voies Wnt/Fzd, décrit comme étant impliqué dans l'angiogenèse (Dufourcq et al. 2008) et la modulation de l'inflammation post-infarctus chez la souris (Barandon et al. 2011).

Cependant aucun rôle direct de Fzd7 dans l'inflammation n'a encore été établi.

#### v. Rôle dans l'angiogenèse

---

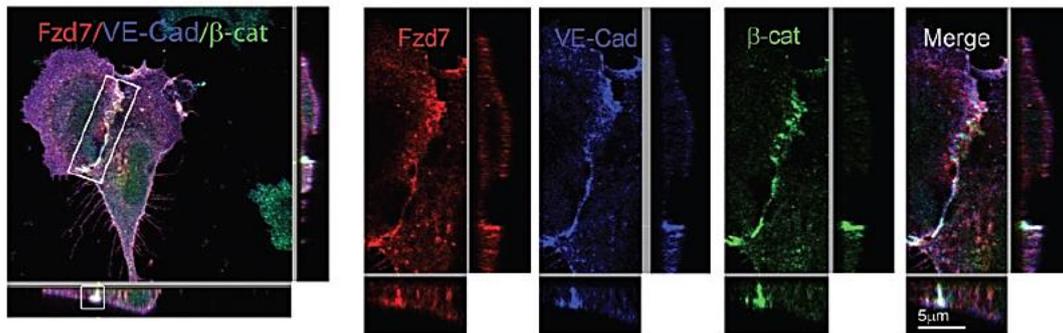
Jusqu'à très récemment, il n'existait pas de donnée sur le rôle de Fzd7 dans la physiologie vasculaire et l'angiogenèse. Il était seulement connu l'expression de ce récepteur par les cellules endothéliales (Goodwin et al. 2006) et son implication dans l'étalement des CE et la modification du cytosquelette d'actine (Dufourcq et al. 2008). Les premiers éléments apportant les preuves d'une implication dans la physiologie vasculaire et l'angiogenèse ont été apportés par deux études menées au laboratoire, l'une tout juste publiée (Ferreira Tojas et al. 2014) et l'autre en cours d'écriture.

##### a. Rôle dans la perméabilité vasculaire

---

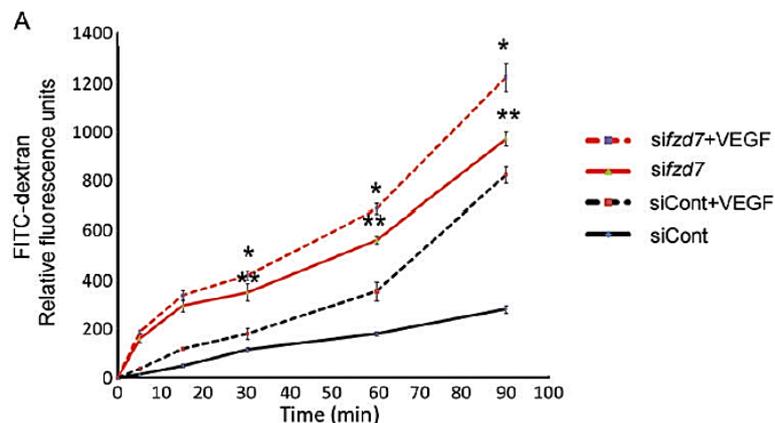
Les travaux de Nancy Ferreira Tojas, auxquels j'ai en partie participé, ont permis de montrer le rôle important de Fzd7 dans le contrôle de la perméabilité vasculaire, *in vitro* et *in vivo*, via la voie Wnt canonique et les complexes jonctionnels VE-cadhérine dépendants des cellules endothéliales. Les détails de cette étude sont décrits ci-dessous (Ferreira Tojas et al. 2014).

*In vitro*, l'utilisation du modèle de corps embryotaire et la culture de cellules endothéliales humaines (HUVEC) transfectées avec un plasmide contenant Fzd7, a permis de mettre en évidence une colocalisation de Fzd7 et du complexe jonctionnel composé de la protéine de jonction VE-cadhérine et de la  $\beta$ -caténine, au niveau des contacts cellule-cellule (**Figure 30**). Fzd7 semble interagir directement avec ces deux protéines pour former un complexe multi-protéique.



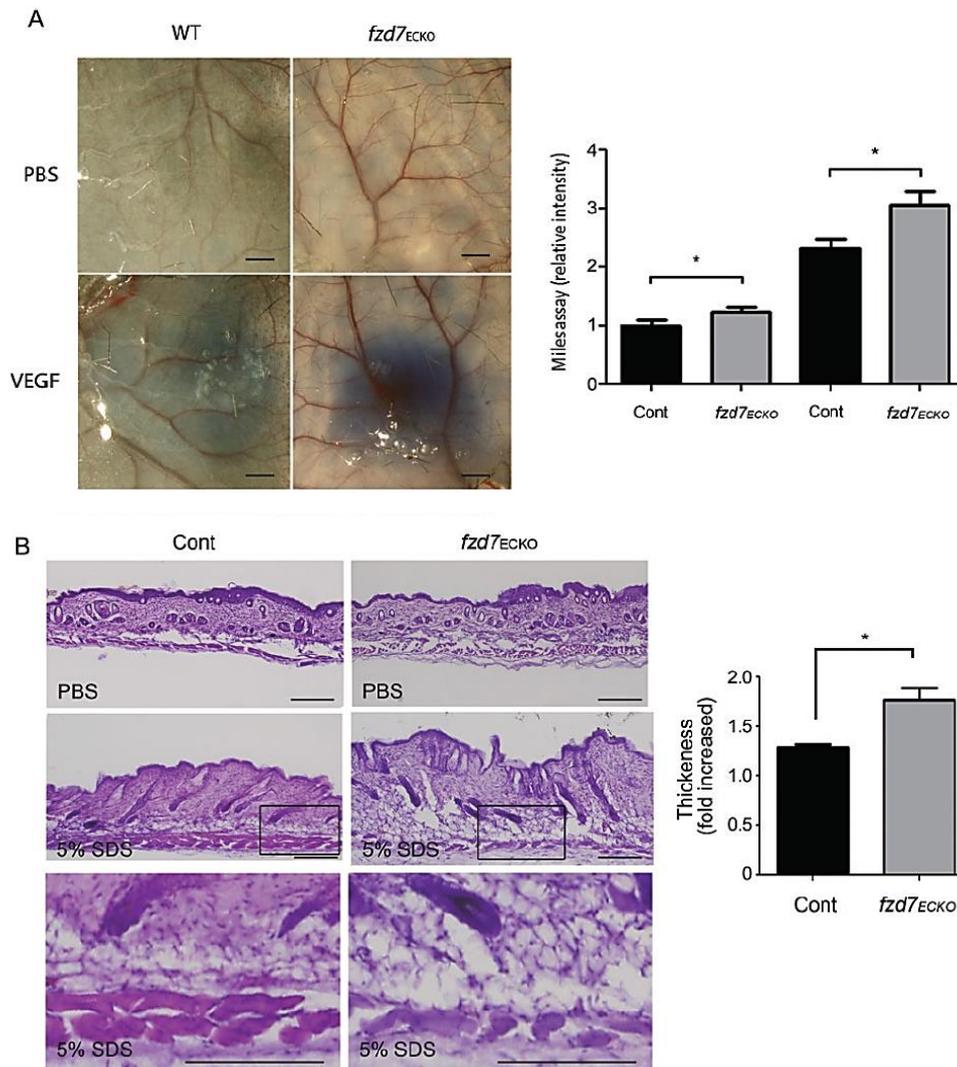
**Figure 30: Co-localisation de Fzd7, VE-cadhérine et  $\beta$ -caténine aux jonctions cellulaires de cellules endothéliales.** Des HUVEC sont transfectées avec un plasmide codant pour la protéine Fzd7 couplée à une étiquette myc (Fzd7-myc). Fzd7 est ainsi détecté en immunofluorescence par un anticorps anti-myc (rouge). La VE-cadhérine et la  $\beta$ -caténine endogènes sont révélés respectivement par des anticorps anti-VE-cadhérine (bleu) et anti- $\beta$ -caténine (vert). Source : (Ferreira Tojais et al. 2014)

*In vitro* la délétion de *fzd7* par siARN dans des cellules endothéliales humaines (HUVEC) augmente la perméabilité de la couche cellulaire aussi bien dans une condition d'inactivation cellulaire qu'en présence du stimulateur de perméabilité VEGF (**Figure 31**). Cette perméabilité excessive est due à une perturbation de l'organisation fonctionnelle des jonctions entre cellules en absence de Fzd7. En effet, Fzd7 régule positivement l'expression de VE-cadhérine et de  $\beta$ -caténine aux jonctions et empêche leur déstabilisation afin de maintenir les contacts cellules-cellules, dans les conditions de confluence cellulaire.



**Figure 31: Analyse de la perméabilité cellulaire *in vitro*.** Des HUVEC sont transfectées avec un siARN contrôle (siCont) ou un siARN dirigé contre *fzd7* (siFzd7) et mises en culture dans un chambre de Boyden jusqu'à former une monocouche cellulaire. Cette monocouche forme une séparation entre un compartiment supérieur et un compartiment inférieur. Le passage de FITC-dextran du compartiment supérieur au compartiment inférieur est quantifié et sert de mesure de la perméabilité de la couche cellulaire. La perméabilité cellulaire peut être induite par ajout de VEGF dans le milieu de culture. Le VEGF induit une perte des jonctions entre cellules, nécessaire à la perméabilité des couches cellulaires. L'absence de *fzd7* augmente la perméabilité en condition basale (couche cellulaire non activée) et en condition activée (+ VEGF). Source : (Ferreira Tojais et al. 2014)

De même, *in vivo* l'absence d'expression de *fzd7* dans les cellules endothéliales (souris Tie2cre ; *Fzd7*<sup>F/F</sup> ou *Fzd7*<sup>ECKO</sup>) augmente la perméabilité vasculaire. Ceci fut observé par le test de perméabilité de Miles et par un test d'irritation cutanée (**Figure 32**).



**Figure 32: Analyse de la perméabilité cellulaire *in vivo*.** **A : Test de Miles.** Du bleu Evan's est injecté dans la circulation sanguine de souris *Fzd7*<sup>ECKO</sup> et contrôles suivi 30 minutes plus tard par une injection en sous-cutané de VEGF ou du PBS au niveau du dos des souris (préalablement épilé). La visualisation et la quantification de l'extravasation du bleu au niveau de zones riches en VEGF (injection en sous-cutanée dans le dos préalablement épilé) ou des zones contrôles (injection de PBS) sont ensuite réalisées. L'absence de *fzd7* augmente la perméabilité en condition basale (PBS) et en condition de perméabilité provoquée (VEGF) **B : Test d'irritation cutanée.** L'inflammation est connue pour induire une perméabilité des vaisseaux et un œdème. Des souris *Fzd7*<sup>ECKO</sup> et contrôles sont soumises à une application cutanée quotidienne de SDS5% pendant dix jours (modèle d'irritation cutanée décrite dans la partie matériel et méthode de ce manuscrit). L'œdème est visualisé par mesure de l'épaisseur de la peau. Les résultats obtenus montrent un œdème plus important chez les souris *Fzd7*<sup>ECKO</sup> comparées aux contrôles. Source : (Ferreira Tojais et al. 2014)

*In vitro*, il a été montré que Fzd7 agit via une signalisation Wnt/canonique. L'activation de la voie  $\beta$ -caténine, induite par des milieux conditionnés riches en Wnt3a ou Wnt1, est inhibée dans les cellules transfectées par un siFzd7. L'expression des gènes cibles Axine2 et Lef1 est diminuée ainsi que celle de  $\beta$ -caténine. L'activation forcée de la voie Wnt/canonique, par traitement au LiCl, des cellules siFzd7 restaure une perméabilité comparable aux cellules contrôles.

Fzd7 initie donc une signalisation  $\beta$ -caténine dépendante nécessaire à la régulation de l'expression du complexe VE-cadhérine/ $\beta$ -caténine aux jonctions des cellules et à l'intégrité fonctionnelle des monocouches cellulaires.

#### b. Rôle dans l'angiogenèse rétinienne

Des travaux de thèse réalisés au laboratoire et prochainement publiés montrent l'implication de Fzd7 dans la vascularisation post-natale de la rétine chez la souris. Les données obtenues indiquent que la délétion spécifique de Fzd7 dans les cellules endothéliales *in vivo* (souris Fzd7<sup>CEKO</sup>) ou la délétion de Dishevelled1 (souris DVL1<sup>-/-</sup>), un partenaire de Fzd7, entraîne un retard de formation du plexus vasculaire primaire de la rétine associé à une augmentation du nombre de «tip cells» et de filopodes ainsi qu'une diminution de la prolifération des «stalk cells». Ce phénotype est associé à une forte diminution de l'expression des gènes de la voie canonique  $\beta$ -caténine dépendante (Axine2, Lef1, et  $\beta$ -caténine). L'injection de LiCl, activateur de la voie  $\beta$ -caténine, chez ces souris mutantes entraîne la réversion de ces effets suggérant que Fzd7 et DVL1 activent la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine pour réguler l'angiogenèse.

## VI. Voies Wnt/Frizzled dans les macrophages

---

### A. Rôle dans l'inflammation

---

#### i. Rôle pro-inflammatoire

---

##### a. Wnt5a/Fzd5

---

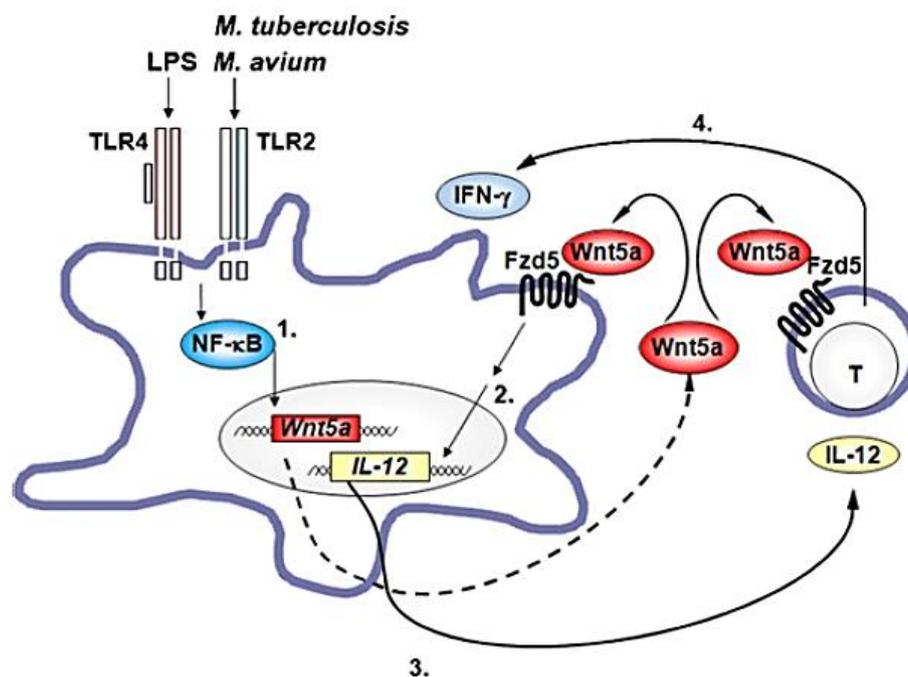
Plusieurs études ont montré la présence de Wnt5a dans les tissus inflammatoires de patients atteints d'arthrite rhumatoïde, de psoriasis, d'adénocarcinome ou encore d'athérosclérose (Schaale\* et al. 2011). Smith et al. en 1999 démontrent, par hybridation in situ et immuno-marquage, une forte expression de Wnt2 et Wnt5a par les macrophages (CD68+) dans les adénocarcinomes (Smith et al. 1999). Wnt5a est également retrouvé dans les zones riches en macrophages des aortes et carotides de patients athérosclérotiques (Christman II et al. 2008). Bien que ces études réalisées chez l'Homme suggèrent l'implication des macrophages dans l'expression de Wnt5a, les preuves d'un lien direct entre l'expression de Wnt5a par les macrophages et leur fonction pro-inflammatoire furent obtenues *in vitro*.

En 2006, Blumenthal et al. réalisent un criblage par micro-array de l'expression de gènes de macrophages humains infectés par des mycobactéries (*M. tuberculosis* et *M. avium*) ou stimulés par du LPS pendant quatre heures. Parmi les nombreux gènes surexprimés (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , CCL5, NF- $\kappa$ B, ...) ils trouvent celui de WNT5a. Ils confirment par hybridation in situ sur des macrophages issus de monocytes humains et sur des coupes de tissus de poumons de patients cancéreux l'expression de Wnt5A par les macrophages humains. L'activation inflammatoire des macrophages par les mycobactéries et le LPS est connue pour passer par les récepteurs TLR2 et TLR4. Ils démontrent que l'expression de Wnt5a par les macrophages est médiée par les récepteurs TLR et la voie de signalisation NF- $\kappa$ B. En effet, la culture de macrophages humains en présence d'anticorps bloquant anti-TLR2, d'un antagoniste de LPS ou d'un inhibiteur spécifique de la phosphorylation d'I $\kappa$ B $\alpha$  bloque l'induction d'expression de Wnt5a (Blumenthal et al. 2006).

De plus, ils observent par qPCR que l'augmentation d'expression de Wnt5a en réponse aux mycobactéries et au LPS s'accompagne d'une surexpression du récepteur Fzd5 (respectivement de 5 et 50 fois après quatre heures d'activation). Cette augmentation de

Fzd5 est également visible dans les lymphocytes activés par des anticorps anti-CD3. Enfin l'utilisation d'anticorps anti-Wnt5a et anti-Fzd5 bloque la synthèse d'IFN $\gamma$  par les lymphocytes T et d'IL-12 par les macrophages démontrant l'implication de Wnt5a et Fzd5 dans la défense antimicrobienne (Blumenthal et al. 2006).

Le modèle proposé par ces auteurs sur le rôle de WNT5a et Fzd5 comme modulateurs de l'interaction entre les macrophages et les lymphocytes T est présenté dans la figure ci-dessous (**Figure 33**).

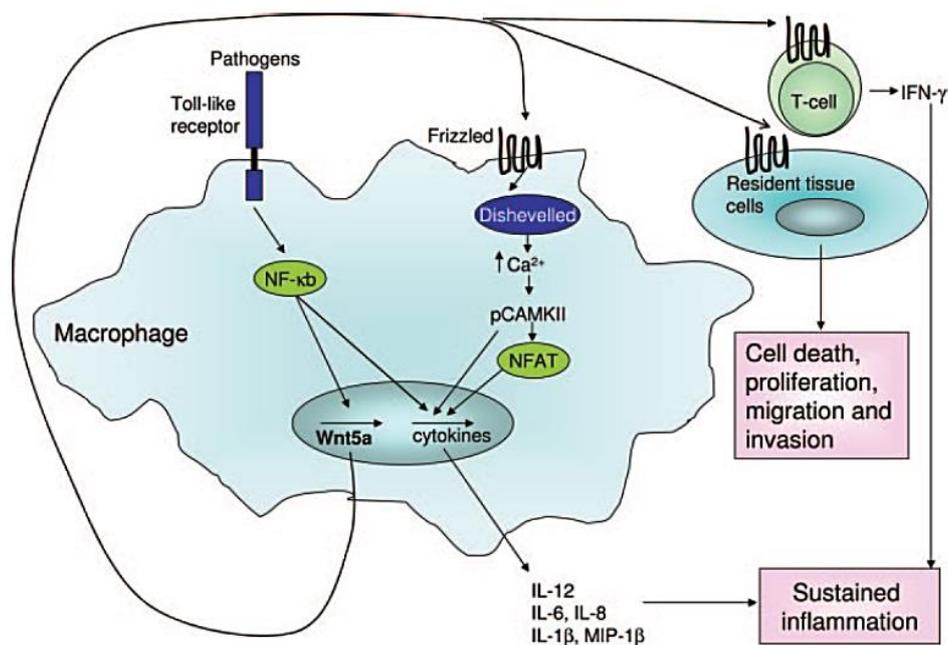


**Figure 33: Modèle de l'implication du couple Wnt5a/Fzd5 dans la modulation de la réponse inflammatoire des macrophages à des stimuli microbien.** 1. L'activation des récepteurs TLR2 et/ou TLR4 par des bactéries induit la transcription par les macrophages de Wnt5a, via une signalisation NF- $\kappa$ B dépendante. Wnt5a est sécrété et va interagir avec les récepteurs Fzd5 présents à la surface des macrophages et des lymphocytes situés à proximité. 2. Wnt5a et Fzd5 régulent la production d'IL-12 dans les macrophages de façon autocrine. 3/4. L'IL-12 sécrété par les macrophages va alors activer les lymphocytes T et induire leur production d'interferon gamma (IFN $\gamma$ ). Puisque les lymphocytes expriment Fzd5 à leur surface il est aussi possible que Wnt5a ait un effet paracrine sur les lymphocytes et régule ainsi directement la sécrétion d'IFN $\gamma$ . La signalisation Wnt5a/Fzd5 participe ainsi à une boucle de régulation positive qui entretient le profil inflammatoire des macrophages et la réponse inflammation. Source : (Blumenthal et al. 2006)&(Schaale\* et al. 2011)

Une autre équipe a mis en évidence que le rôle de Wnt5a sur la réponse inflammatoire des macrophages passe par une signalisation CaMKII dépendante (Pereira et al. 2008). Pereira et al. constatent *in vitro* une activation de Wnt5a (qPCR) et de CaMKII

(immunofluorescence) chez des macrophages humains en réponse aux stimuli pro-inflammatoires, LPS/IFN $\gamma$ . Wnt5a stimule à son tour la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$ , ...) chez les macrophages. Le blocage par sFRP1 de la liaison de Wnt5a sur son récepteur Fzd5 empêche l'activation de la signalisation Wnt5a/CaMKII et diminue la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages cultivés en condition inflammatoire (LPS/IFN $\gamma$ ).

Ces deux études laissent suggérer un rôle de Wnt5a, via une signalisation Fzd/CaMKII, dans une boucle de régulation positive de l'inflammation dans des conditions d'infections bactériennes. Ci-dessous (**Figure 34**), un schéma de cette boucle de régulation proposé par S. J. George dans une revue regroupant les résultats de ces différentes études (George\* 2008).



**Figure 34: Hypothèse du rôle de Fzd5 dans la réponse inflammatoire.** L'activation des récepteurs TLR, dans les macrophages, par des pathogènes conduit à l'activation de la voie NF- $\kappa$ B et l'expression de Wnt5a et de cytokines. La sécrétion de Wnt5a active alors de façon autocrine ou/et paracrine la voie Wnt/non canonique faisant intervenir le calcium et la kinase CAMKII. Ceci conduit à une régulation positive des cytokines pro-inflammatoires telles qu'IL-12, IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$ , de façon NFAT-dépendante ou indépendante. En outre, l'augmentation de Wnt5a et de cytokines peut affecter d'autres cellules mononucléaires, y compris les lymphocytes T et les cellules résidentes des tissus environnants. Source : (George\* 2008)

## b. GSK3 $\beta$

---

Il semblerait que la GSK3 $\beta$  joue un rôle clé dans la régulation du profil pro versus anti-inflammatoire des macrophages. En effet GSK3 $\beta$  est à la fois impliqué dans la régulation de la voie NF- $\kappa$ B et dans la signalisation  $\beta$ -caténine dépendante. GSK3 $\beta$  favorise l'inflammation en provoquant la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$ , un inhibiteur de la voie NF- $\kappa$ B. Par le même principe il entraîne la dégradation de la  $\beta$ -caténine, inhibant ainsi la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine connue pour désactiver les macrophages comme décrit plus bas.

Zhang et al. visualisent une diminution de sécrétion de TNF $\alpha$ , IL-6 et IL-12 par des macrophages murins infectés par *F. tularensis* lorsqu'un inhibiteur de GSK3 $\beta$  est présent. Quelques années auparavant des résultats similaires furent obtenus sur des monocytes humains activés par des antagonistes de plusieurs TLR, en présence d'un inhibiteur de GSK3 $\beta$ . L'induction de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 fut observée en parallèle de la diminution de plusieurs cytokines inflammatoires (Schaale\* et al. 2011).

## ii. Rôle anti-inflammatoire

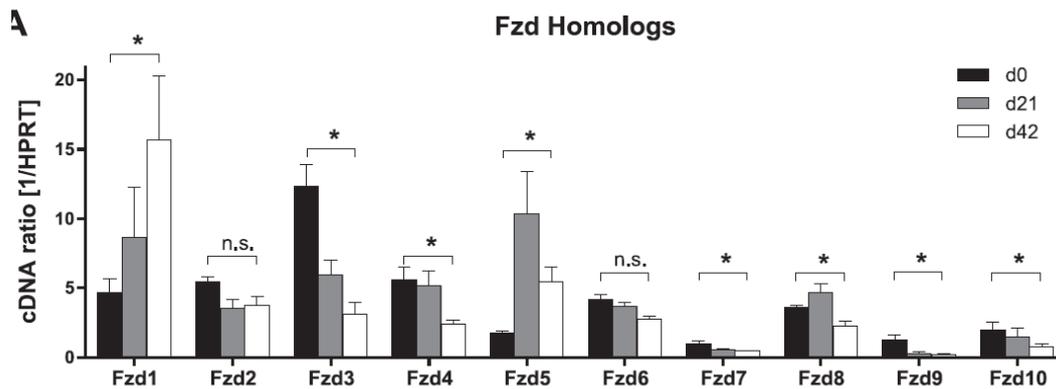
---

### a. Wnt3a/Fzd1

---

Le couple ligand/récepteur, Wnt3a/Frizzled1, a été mis en évidence comme étant impliqué dans un mécanisme de régulation négative de l'activation des macrophages dans un contexte inflammatoire bactérien. Cette étude réalisée en 2010 par l'équipe de J. Neumann repose sur des analyses effectuées *in vivo*, sur souris, et *in vitro*, sur macrophages issus de moelle osseuse de souris.

Un criblage d'expression des dix récepteurs Frizzled fut réalisé sur des poumons de souris soumises à une inflammation chronique par inhalation de *M. tuberculosis*. La quasi-majorité de ces récepteurs sont régulés négativement pendant l'infection. C'est le cas du récepteur Frizzled7. Deux récepteurs Frizzled sont surexprimés, Fzd1 et Fzd5. La surexpression est visible à 21 jours pour les deux récepteurs, en revanche tandis que Fzd5 voit son expression rediminuer à 42 jours, Fzd1 est encore plus fortement exprimé à ce temps tardif (**Figure 35**). Des expériences menées avec plusieurs lignées de souris knock-down amènent à la conclusion que l'induction de Fzd1 est dépendante d'une signalisation TLR (récepteurs impliqués dans l'activation des macrophages) / NF- $\kappa$ B (Neumann et al. 2010).

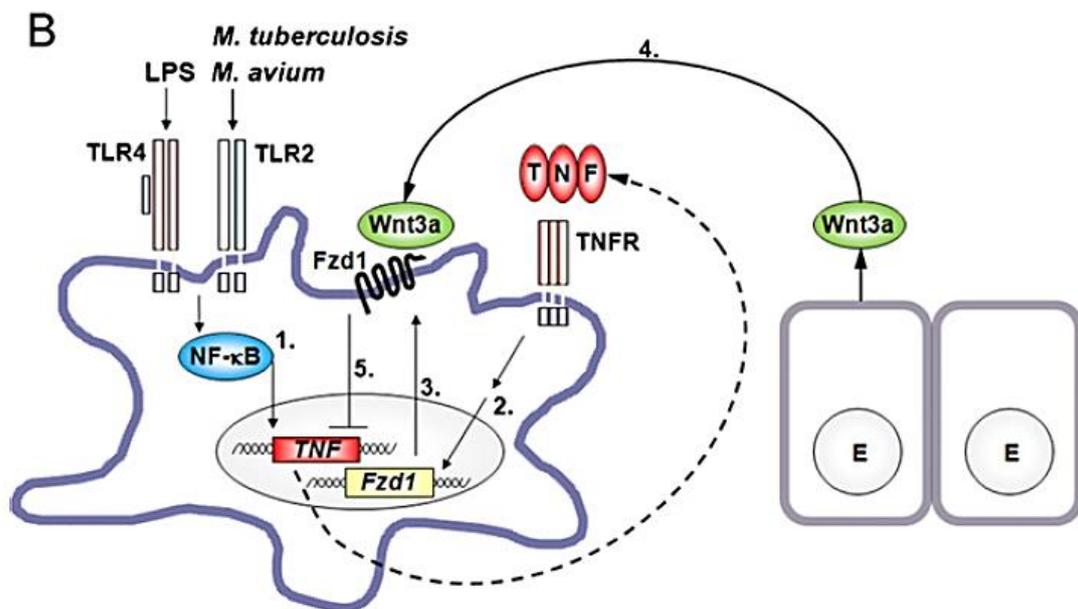


**Figure 35: Expression des dix récepteurs Frizzled dans les poumons de souris soumises à une inflammation chronique par inhalation de *M. tuberculosis*.** Une RT-qPCR est réalisée à partir des ARN totaux de poumons de souris à 0, 21 et 42 jours après inhalation de de *M. tuberculosis*. Source : (Neumann et al. 2010).

Dans les poumons de souris infectées on retrouve également, comme attendu une forte expression de  $TNF\alpha$  et d' $IFN\gamma$ , mais aussi une diminution de la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine visible par une baisse de la  $\beta$ -caténine et de sa cible Axine-2. Wnt3a, connu pour activer Frizzled1, est retrouvé à un niveau constant dans l'épithélium bronchiolaire des souris infectées et contrôles (Neumann et al. 2010).

*In vitro*, ils déterminent que la surexpression de Fzd1 visible *in vivo* peut avoir lieu dans les macrophages. En effet, des macrophages issus de moelle osseuse de souris expriment Fzd1 en réponse aux mycobactéries *M. tuberculosis* et *M. avium*. L'activation des macrophages par du LPS induit la même réponse, indiquant que la régulation positive de Fzd1, corrélée à l'activation des macrophages, intervient largement dans la réponse infectieuse. Un milieu conditionné riche en Wnt3a provoque, via le récepteur Fzd1, l'accumulation de  $\beta$ -caténine dans les macrophages. L'activation de cette signalisation  $\beta$ -caténine inhibe la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages infectés (Neumann et al. 2010).

Cette étude démontre l'existence d'une régulation réciproque entre les voies de signalisation TLR/ $NF-\kappa B$  et Wnt/ $\beta$ -caténine respectivement pro- et anti-inflammatoires. Ce mécanisme de rétrocontrôle permet d'éviter les risques liés à une inflammation excessive en désactivant les macrophages. Ci-dessous, un schéma récapitulatif de cette régulation proposé par Schaale dans une revue, reprenant les travaux de Neumann (**Figure 36**).



**Figure 36: Modèle de l'implication du couple Wnt3a/Fzd1 dans la modulation de la réponse inflammatoire des macrophages à des stimuli microbiens.** 1. L'activation des récepteurs TLR2 et/ou TLR4 par des bactéries induit la transcription par les macrophages de TNF, via une signalisation NF-κB dépendante. 2/3. Le TNF sécrété agit de façon autocrine via le récepteur TNFR pour induire l'expression du récepteur Fzd1 qui vient se placer à la surface des macrophages. 4. Lorsque les cellules environnantes, telles que les cellules épithéliales bronchiques (E), sécrètent le facteur Wnt3a dans le milieu, celui-ci vient se fixer au récepteur Fzd1 des macrophages. 5. La liaison de Wnt3a sur Fzd1 inhibe l'expression de TNF par les macrophages. La signalisation Wnt3a/Fzd1 est ainsi impliquée dans la limitation d'une inflammation excessive, régulation nécessaire au retour à l'homéostasie tissulaire après la réaction inflammatoire. Source : (Schaale\* et al. 2011)

Les études, présentées ci-dessus, sur les couples Wnt5a/Fzd5 et Wnt3a/Fzd1 laissent pointer l'implication des voies Wnt/Fzd dans la grande plasticité des macrophages et leur capacité à répondre rapidement à leur environnement pour maintenir l'homéostasie, dans un contexte d'infection.

### b. $\beta$ -caténine

L'équipe de Neumann n'est pas la seule à avoir mis en évidence un rôle de la  $\beta$ -caténine dans la régulation négative de l'inflammation.

L'activation de macrophages RAW264.7 par du LPS provoque l'accumulation de  $\beta$ -caténine, coïncidant avec une inactivation de la GSK3 $\beta$ . L'activité de NF- $\kappa$ B et l'expression d'IL-6 induites par le LPS sont augmentées dans les macrophages transfectés par un si $\beta$ -caténine (siARN) comparés aux contrôles. La  $\beta$ -caténine semble donc bien être un régulateur anti-inflammatoire (Lee et al. 2012).

Une étude très récente a également permis de conforter ces observations. Une activation de la  $\beta$ -caténine, en réponse à une infection par *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG), est observée dans des macrophages RAW264.7 ainsi qu'une diminution de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. De plus l'activation par Wnt3a entrainerait l'apoptose des macrophages infectés (Wu et al. 2014).

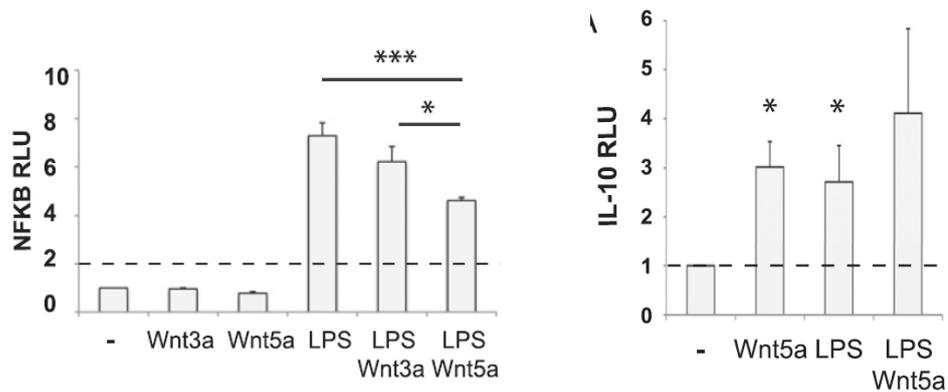
On retrouve en partie dans ces études la boucle d'auto-régulation observée par Neumann avec une activation au cours de l'infection de la voie  $\beta$ -caténine dépendante pour limiter la réaction inflammatoire des macrophages.

### c. Wnt5a

---

Bien que, comme présenté ci-dessus, des études aient montré l'implication de Wnt5a dans la régulation positive de l'inflammation, le rôle de Wnt5a ne semble pas si clair. En effet en 2012, Bergenfelz et al. montrent l'induction par Wnt5a d'un phénotype tolérogénique des macrophages chez des patients atteints de septicémie et cancer du sein (Bergenfelz et al. 2012). *In vitro*, ils observent un blocage par Wnt5a de la différenciation des macrophages primaires humains en macrophages M1. Ces cellules traitées au Wnt5a présentent un phénotype semblable à celui des macrophages immuno-suppresseurs présents dans différents cancers humains et dans des cas de tolérance aux endotoxines lors de septicémies.

Sur la lignée macrophagique murine, RAW264.7, Wnt5a réduit l'induction par le LPS de la signalisation pro-inflammatoire NF- $\kappa$ B et induit l'expression de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 (**Figure 37**). Ils observent ainsi une boucle de régulation négative de l'inflammation où le Wnt5a produit lors de l'inflammation entraîne la production d'IL-10, régulateur négatif de la signalisation pro-inflammatoire NF- $\kappa$ B.



**Figure 37: Test d'activation du promoteur NF-κB et IL-10.** Les tests d'activation des promoteurs de NF-κB (à gauche) et d'IL-10 (à droite) sont réalisés sur des macrophages RAW264.7 par la technique de « Dual-Luciferase® Reporter Assay ». Les cellules sont cultivées 24h avec du milieu contenant du Wnt3a, du Wnt5a, du LPS, du LPS+Wnt3a ou du LPS+Wnt5a. La quantification est faite par mesure de l'activité luciférase. Source : (Bergenfelz et al. 2012)

Cette étude (action anti-inflammatoire de Wnt5a) comparée aux précédentes (action pro-inflammatoire) nous amène à réfléchir sur la difficulté de la caractérisation et polarisation pro et anti-inflammatoire des macrophages. Leur grande diversité, plasticité et leur forte réactivité aux signaux de l'environnement rend leur étude très compliquée. Le type de pathologies et de macrophages (macrophages résidents, activés, ou lignées ; humains ou murins, ...) étudiés, les conditions de culture, d'activation et les marqueurs utilisés sont autant de critères importants à prendre en compte dans l'analyse et la comparaison des résultats obtenus. Il semble difficile « d'établir » des généralités.

## B. Rôle dans l'angiogenèse

Très peu d'études ont été réalisées sur le rôle de la signalisation Wnt/Frizzled dans l'action angiogénique des macrophages. Trois équipes ont travaillé sur ce sujet dans des modèles d'angiogenèse différents (physiologiques et pathologiques). Un résultat commun ressort de ces travaux : une action locale de Wnt produits par les macrophages sur les cellules endothéliales.

### i. Wnt7b

---

Lors de l'embryogenèse l'œil est alimenté par le réseau vasculaire hyaloïde. Lors de la maturation de la rétine, ce réseau hyaloïde régresse, et le réseau vasculaire rétinien se forme. La régression du réseau hyaloïde se fait en grande partie par apoptose et autophagie. Les macrophages sont fortement impliqués dans ce processus notamment par la phagocytose des cellules en mort cellulaire. La régression du réseau hyaloïde ne se fait pas chez des souris  $PU^{-/-}$  dépourvues de macrophages. Lobov et al. démontrent l'implication du facteur Wnt7b dans la régression des cellules endothéliales vasculaires. Wnt7b est exprimé par les macrophages situés au niveau du hyaloïde au moment de sa régression. Une fois sécrété Wnt7b déclenche un programme de mort cellulaire dans les cellules endothéliales présentes à proximité immédiate. Cette signalisation passerait par le récepteur Frizzled 4 exprimé par les cellules endothéliales (Lobov et al. 2005).

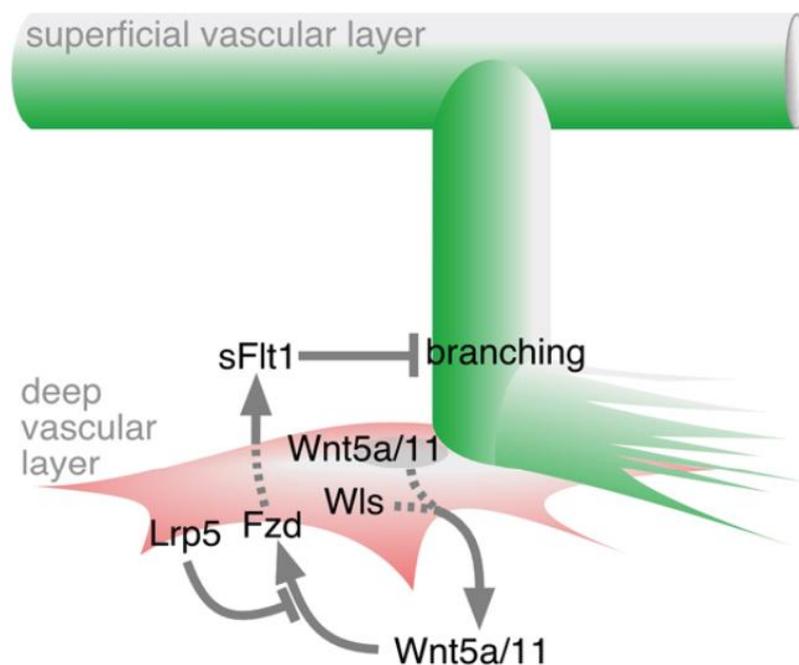
### ii. Voie non canonique Wnt-Flt1

---

Lors du développement rétinien, il fut établi la présence de macrophages au contact des vaisseaux notamment aux zones d'anastomose (voir le paragraphe sur la rétine dans la partie "Rôle des macrophages dans l'angiogenèse"). La plupart des travaux présentés plus haut concluent à un rôle pro-angiogénique des macrophages sans réellement expliquer les mécanismes sous-jacents. Dans l'une de ces études, parue dans Nature en 2011, les auteurs déterminent l'implication d'une voie Wnt-Flt1 dans l'inhibition, par les macrophages, de l'angiogenèse lors de la formation de la couche profonde du réseau rétinien. Une fois le réseau vasculaire superficiel formé les cellules endothéliales plongent puis se réorientent à nouveau pour former le réseau secondaire plus profond (**Figure 10**). Le phénomène d'anastomose est très présent lors de la formation de ce réseau profond. Des macrophages sont observés en relation étroite avec les cellules endothéliales au niveau des zones de changement d'orientation du réseau vasculaire et d'anastomoses. Les auteurs de cette étude distinguent par cytométrie en flux les macrophages situés dans la couche superficielle du réseau rétinien de ceux qui se situent dans la couche plus profonde. Ils établissent que les macrophages de la couche profonde expriment Wnt5a, Wnt6, Wnt11 ainsi que Fzd7, Fzd8 et le récepteur au VEGF (Flt1). Des souris transgéniques dépourvues, exclusivement dans les cellules myéloïdes, de Wls (transporteur nécessaire à la sécrétion des Wnt) ou de Flt1

développent un réseau profond beaucoup plus dense. Cette augmentation de branchements est bien due à une augmentation d'angiogenèse et non à un défaut de remodelage. De plus les souris sans Wls voient leur expression de Flt1 diminuer de 90% (Stefater et al. 2011).

S'appuyant sur des expériences supplémentaires réalisées *in vitro* sur macrophages RAW264.7, les auteurs proposent le modèle suivant (**Figure 38**). Les macrophages présents aux zones d'anastomose sécrètent des facteurs wnt non canoniques tel que Wnt5a et Wnt11. Ces facteurs vont alors agir sur les macrophages eux même via un récepteur Fzd (non démontré). Les macrophages inhibent l'anastomose probablement par la sécrétion de récepteurs Flt1 solubles, en réponse aux Wnt, qui vont capter le VEGF et empêcher son action angiogénique sur les cellules endothéliales voisines (Stefater et al. 2011).



**Figure 38: Représentation schématique de la suppression du branchement angiogénique par la signalisation Wnt/Flt1 dans les cellules myéloïdes de la couche profonde de la rétine.** Wnt5a et Wnt11 sont exprimés par les cellules myéloïdes de la couche profonde de la rétine (rouge). Leur sécrétion est permise par le transporteur Wls. La signalisation Wnt/Flt1 déclenchée de façon autocrine induit la sécrétion de sFLT1 (récepteur soluble au VEGF) qui inhibe le branchement angiogénique des cellules endothéliales (vert). Le corécepteur Lrp5 pourrait jouer un rôle dans la suppression de la réponse non canonique. Source : (Stefater et al. 2011)

Sur leur lancée l'équipe de Stefater s'est intéressée à la régulation négative de l'angiogenèse par cette voie de signalisation Wnt-Flt1 dans un contexte de cicatrisation. De façon cohérente avec leurs données sur la rétine, ils observent une cicatrisation et une angiogenèse beaucoup plus rapide chez des souris déficientes en Wls dans les macrophages. Le nombre de macrophages présents dans la plaie reste cependant identique. Là encore l'absence de Wls provoque une diminution d'expression de la forme soluble (et aussi de la forme membranaire) de Flt1. Outre la confirmation dans un modèle pathologique des résultats obtenus précédemment dans la rétine, cette étude a permis de compléter les connaissances sur cette signalisation Wnt-Flt1. En effet, grâce à l'utilisation de plusieurs lignées de souris mutantes, l'implication de la signalisation calcineurine-NFAT dans la transmission du signal Wnt-Flt1 fut établie (Stefater 2013).

Les macrophages semblent donc utiliser une signalisation Wnt-calcineurine-NFAT-Flt1 pour supprimer ou du moins limiter l'angiogenèse et la réparation lors du processus de cicatrisation. L'idée que l'organisme mette en place un mécanisme pour limiter la réparation ne semble pas logique. Les auteurs tentent d'y apporter une explication en faisant l'hypothèse qu'une réparation trop rapide pourrait être mal effectuée. Ralentir le processus de cicatrisation serait donc bénéfique et garante de la qualité de la réparation (Stefater 2013).

## CONTEXTE ET OBJECTIF DE L'ETUDE

---

Essentielle au cours du développement, l'angiogenèse est un processus qui se déclenche également chez l'adulte dans un certain nombre de pathologies. Elle peut avoir un effet réparateur (ischémie du membre, infarctus, cicatrisation) ou néfaste pour l'organisme (croissance tumorale, psoriasis, arthrite rhumatoïde, ...). Dans tous les cas l'environnement tissulaire est inflammatoire et riche en macrophages. Ces cellules immunitaires, grâce à leur polarisation variable, sont impliquées à la fois dans la résolution de l'inflammation (macrophages M1) et dans la réparation tissulaire (macrophages M2) où elles favorisent l'angiogenèse. Dans le développement les macrophages ont également été décrit comme régulant l'angiogenèse et notamment le branchement des vaisseaux.

Les voies de signalisation Wnt/Frizzled, et plus particulièrement les couples Wnt3a/Fzd1 et Wnt5a/Fzd5, sont impliquées dans la réponse inflammatoire des macrophages. Ces voies interviennent dans la modulation de la polarisation des macrophages.

L'équipe au sein de laquelle j'ai effectué ma thèse concentre ses recherches sur l'étude des voies de signalisation Wnt/Frizzled dans l'angiogenèse. Ces voies de signalisation furent décrites dans le développement des vaisseaux sanguins comme contrôlant la prolifération, la polarité, l'apoptose des cellules endothéliales et le branchement vasculaire. Notre équipe a identifié le récepteur Fzd7 comme un nouvel acteur de l'angiogenèse. Son rôle dans les cellules endothéliales est étudié *in vitro* et *in vivo* dans la régulation du réseau vasculaire rétinien.

En 2011, Stefater et al. découvrent une régulation négative de l'anastomose vasculaire, lors du développement de la rétine chez la souris. Cette régulation est induite par sécrétion via une signalisation Wnt du récepteur au VEGF, FLT1, par les macrophages. Le criblage de l'expression des récepteurs Fzd par ces macrophages révèle une expression de Fzd7. Ces données de la littérature nous ont poussé à nous intéresser à l'expression de ce récepteur par les macrophages et à son implication potentielle dans l'angiogenèse.

Ainsi, l'objectif de cette étude fut d'étudier le rôle de la signalisation induite par Fzd7, dans les macrophages, dans la régulation de l'angiogenèse.

# **MATERIEL ET METHODES**

---

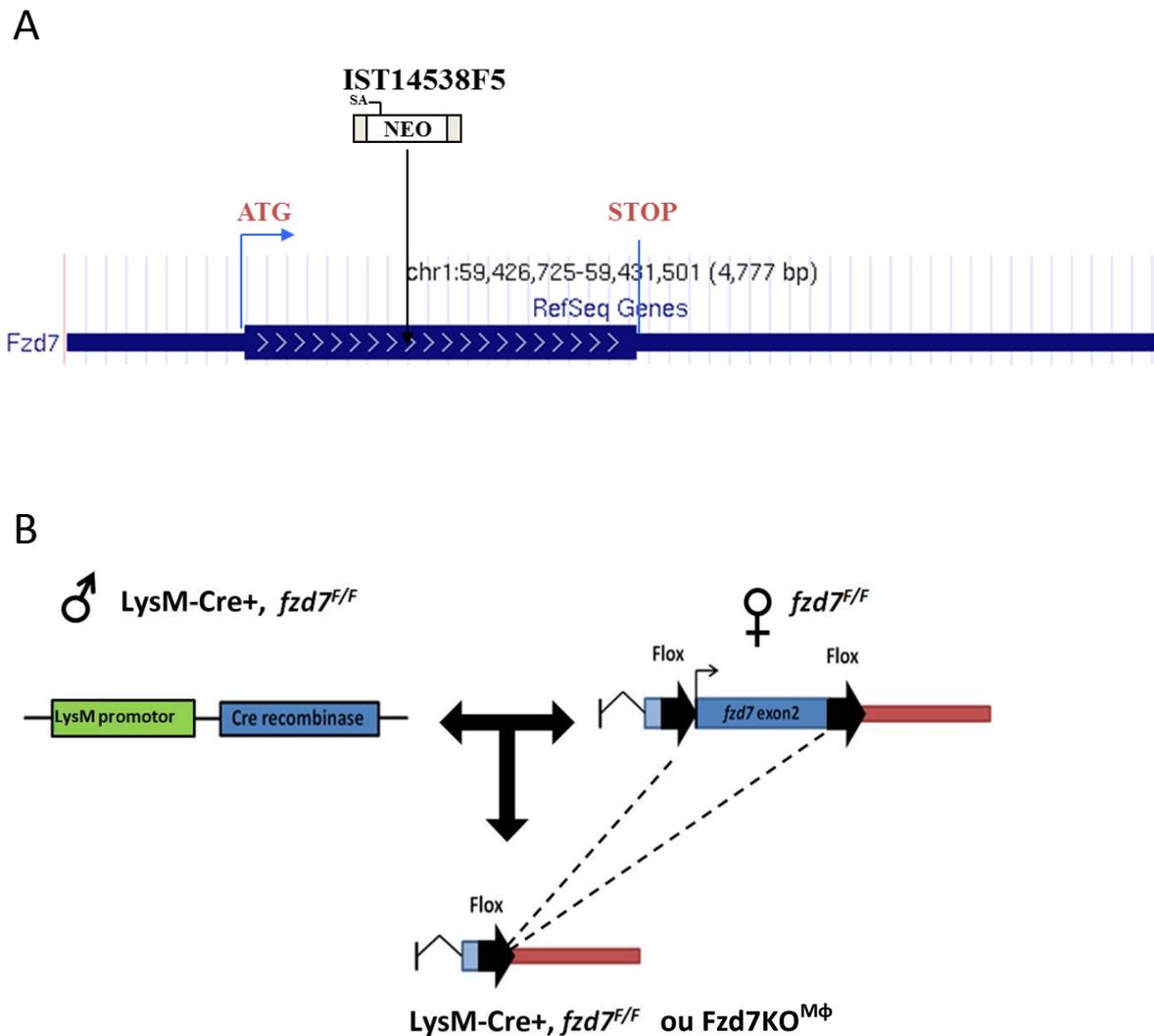
## I. Lignées murines

---

Deux lignées murines ont été utilisées dans cette étude : une lignée de souris « Knock-Out » (KO) pour *frizzled 7* et une lignée de souris possédant une délétion spécifique constitutive de *frizzled 7* dans les cellules de la lignée myéloïde. Ces deux lignées ont été générées au laboratoire par croisements successifs avec des souris de fond génétique C57BL6/J.

La lignée de souris KO *Fzd7* a été générée à partir de cellules ES obtenues du consortium TIGM (Texas Institut de médecine génomique). L'inactivation du gène s'est faite par « piégeage de gène », par l'insertion dans le gène de *Fzd7* d'une séquence contenant le gène de la néomycine (**Figure 39**). La manipulation et l'injection des cellules ES a été fait par le département SEAT (Service des Animaux Transgéniques) du CNRS UPS44 (Villejuif, Paris). Pour le reste de ce mémoire les animaux de la lignée de souris KO seront nommés **Fzd7WT** pour les souris contrôles, non délétées, et **Fzd7KO** pour les délétées dans l'ensemble des cellules de l'organisme.

Les souris ayant une délétion spécifique de *fzd7* dans les cellules myéloïdes ont été développées par croisement de mâles *LysM-Cre*, possédant le gène de la Cre-recombinase sous influence du promoteur du gène de la lysozyme M, avec des femelles *fzd7<sup>F/F</sup>* possédant la séquence codante (exon2) de *fzd7* encadrée de deux séquences loxP (**Figure 39**). Ces souris seront nommées par la suite, **Fzd7WT<sup>MΦ</sup>** pour les souris *LysM-Cre<sup>-</sup>;fzd7<sup>F/F</sup>* non délétées de *fzd7*, et **Fzd7KO<sup>MΦ</sup>** pour les souris *LysM-Cre<sup>+</sup>;fzd7<sup>F/F</sup>* déficientes en *Fzd7* dans les macrophages.



**Figure 39 : Génération des lignées de souris Fzd7KO et Fzd7KO<sup>MΦ</sup>.** (A) Génération de la lignée de souris Fzd7KO : Le vecteur de « piégeage » de gène contenant la séquence de la néomycine est inséré au niveau de la séquence de *Fzd7* dans une cellule ES (clone IST14538F5) de souris C57BL/6. (B) Génération de la lignée de souris Fzd7KO<sup>MΦ</sup> : Les souris homozygotes *fzd7<sup>F/F</sup>* ont été croisées avec des souris exprimant la cre-recombinase sous le promoteur LysM-Cre (*LysM-Cre<sup>+</sup>, fzd7<sup>F/F</sup>*) pour générer des souris délétées pour *fzd7* dans les cellules myéloïdes (souris *LysM-Cre<sup>+</sup>, fzd7<sup>F/F</sup>* ou Fzd7KO<sup>MΦ</sup>) et les souris contrôles (souris *LysM-Cre<sup>-</sup>, fzd7<sup>F/F</sup>* ou Fzd7WT<sup>MΦ</sup>).

## II. Hypersensibilité retardée de contact

Nous avons suivi le protocole d'induction d'hypersensibilité de contact chez la souris décrite par Lange-Asschenfeldt et al. (Lange-Asschenfeldt et al. 2002). Les souris sont anesthésiées par inhalation de 2,5-4% d'isoflurane. 50 µl d'oxazolone 2% sont déposés sur le ventre, préalablement rasé, ainsi que 5µl sur les quatre pattes au niveau de l'articulation du pied. L'oxazolone (4-ethoxymethylene-2-phenyloxazol-5-one, Sigma) est dilué dans une

solution acétone : huile d'olive (ratio 4:1). Après cinq jours, 20µl d'oxazolone 1% sont déposés sur la face interne de l'oreille droite de la souris et 20µl sur la face externe de cette même oreille. De la même façon 20µl d'excipient (acétone : huile, ratio 4 : 1) sont déposés sur la face interne et externe de l'oreille gauche, qui servira de contrôle. 24h plus tard les souris sont sacrifiées par dislocation. Les oreilles traitées et contrôles sont prélevées et fixées une heure dans de la formaldéhyde 4% (Formaline) avant d'être incluses dans de la paraffine.

Ce protocole fut réalisé sur un groupe de 3 souris Fzd7WT et 3 Fzd7KO et sur 4 souris Fzd7WT<sup>MΦ</sup> et 4 Fzd7KO<sup>MΦ</sup> âgées de 15 à 17 semaines.

### **III. Irritation cutanée**

---

L'irritation cutanée a été induite chez les souris, selon le protocole décrit précédemment par Cramer et al. (Cramer et al. 2003). Les souris sont anesthésiées par inhalation de 2,5-4% d'isoflurane. Leur dos est rasé avec de la crème dépilatoire. Après deux jours, le dos rasé est frotté quotidiennement pendant cinq jours avec un coton-tige imbibé d'une solution de SDS 5% (dilution du SDS dans du PBS 1X). Les souris sont sacrifiées par dislocation 24h après la dernière application de SDS 5%. Des souris rasées mais non traitées servent de contrôles. Les peaux traitées et contrôles sont récupérées et fixées 1h dans de la formaldéhyde 4% (Formaline) avant d'être incluses dans de la paraffine.

Deux expériences indépendantes furent réalisées sur un total de 5 souris Fzd7WT et 5 Fzd7KO et trois expériences sur un total de 9 souris Fzd7WT<sup>MΦ</sup> et 7 Fzd7KO<sup>MΦ</sup>, âgées de 6 à 12 semaines.

### **IV. Ischémie du membre inférieur**

---

Les souris âgées de 9 à 12 semaines sont anesthésiées par inhalation de 2,5-4% d'isoflurane. Un anti-douleur (1 mg/kg buprenorphine) est injecté trente minutes avant le début de la chirurgie. L'ischémie du membre inférieur est réalisée suivant le protocole décrit précédemment (Couffinhal et al. 1998). L'extrémité proximale de l'artère fémorale et la portion distale de la veine saphène sont ligaturées. L'artère et les branches latérales

comprises entre les deux ligatures sont réséquées. Les souris sont sacrifiées par dislocation cinq ou dix jours après la chirurgie et les muscles tibiaux antérieurs (des pattes ischémisées et des pattes contrôles non opérées) sont récupérés.

Pour les analyses par immuno-marquages les muscles sont fixés dans du méthanol avant d'être inclus dans de la paraffine. Trois expériences indépendantes furent réalisées, pour les analyses à cinq jours post-ischémie, regroupant au total 11 souris Fzd7WT<sup>M $\phi$</sup>  et 10 Fzd7KO<sup>M $\phi$</sup> . De plus un groupe de 5 Fzd7WT<sup>M $\phi$</sup>  et 5 Fzd7KO<sup>M $\phi$</sup>  fut utilisé pour les analyses à dix jours post-ischémie.

La perfusion sanguine de la patte est mesurée par laser doppler à l'aide d'un appareil MoorLDI2-IR. Les mesures ont été faites sur un groupe de 8 souris Fzd7WT<sup>M $\phi$</sup>  et 8 souris Fzd7KO<sup>M $\phi$</sup>  à deux (J2), cinq (J5) et dix (J10) jours post-opération. Les souris sont anesthésiées par une injection péritonéale de ketamine (100 mg/kg) et xylazine (10 mg/kg). Pour prendre en compte les variations telles que l'intensité lumineuse ou la température de la souris, les valeurs obtenues dans la patte ischémisée sont rapportées à celles de la patte contrôle. Le retour du flux sanguin au cours du temps est analysé pour chaque souris, où le flux sanguin à J5 est pris comme référence.

## V. Infarctus du myocarde

---

Les souris âgées de 12 à 14 semaines sont anesthésiées par injection intrapéritonéale d'un mélange de ketamine et xylazine. Elles sont intubées et mises sous respirateur tout au long de la procédure chirurgicale. L'infarctus est induit par ligature de l'artère interventriculaire antérieure. Les souris sont sacrifiées par dislocation trois jours après la chirurgie et les cœurs sont prélevés. Les cœurs serviront à une analyse des populations macrophagiques par cytométrie en flux. Deux expériences indépendantes furent réalisées avec un total de 6 Fzd7WT<sup>M $\phi$</sup>  et 6 Fzd7KO<sup>M $\phi$</sup> .

## VI. Cytométrie en flux

---

L'isolement des cellules de muscles ischémisés (muscle tibial et cœur) et la cytométrie en flux furent réalisés selon le protocole décrit précédemment (Cochain et al. 2010). Après

sacrifice des souris, les muscles tibiaux antérieurs des pattes ischémisées ou les cœurs ayant subi un infarctus sont récupérés et coupés en très fins morceaux. Ils sont ensuite incubés 1h-1h30 sous agitation à 37°C dans 2 ml de solution de digestion. Cette solution est composée de PBS 1X contenant du MgCl<sub>2</sub> et CaCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich) auquel on ajoute 1,5 mg/ml de collagenase I, 100 µg/ml de collagenase XI, 30 µg/ml de DNase I et 150 µg/ml de Hyaluronidase fraîchement préparé (Sigma-Aldrich). Après digestion la solution est filtrée (filtre nylon de 40µm) et centrifugée dix minutes à 400g. La suspension cellulaire est déposée sur une solution de Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare) et centrifugée 30 minutes à 400g afin d'opérer une séparation des cellules mononuclées, polynucléaires et globules rouges par gradient de densité. L'anneau de cellules mononuclées situé à l'interface entre le Ficoll et le milieu est récupéré. Les cellules sont lavées plusieurs fois au PBS. Les cellules sont alors incubées 30 minutes à 4°C avec les anticorps présentés dans le **Tableau 5**. Les cellules sont passées au cytomètre en flux BD-Accuri C6 et les données analysées avec le logiciel C6 Analysis Software.

Six expériences indépendantes furent réalisées pour l'analyse post-ischémie de la patte, avec au total 18 Fzd7WT<sup>M $\phi$</sup>  et 19 Fzd7KO<sup>M $\phi$</sup>  âgées de 9 à 12 semaines. Pour l'étude de l'infarctus du myocarde, deux expériences furent réalisées avec un total de 6 Fzd7WT<sup>M $\phi$</sup>  et 6 Fzd7KO<sup>M $\phi$</sup>  âgées de 12 à 14 semaines.

Anticorps	Fournisseur / Référence	Concentration stock	Dilution utilisée
PE/Cy7 anti-mouse/human cd11b	BioLegend / 101216	0,2 mg/ml	1/60ème
FITC anti-mouse cd11c	BioLegend / 117305	0,5 mg/ml	1/150ème
APC anti-mouse Ly-6G and Ly-6c	BD Pharmingen / 561083	0,2 mg/ml	1/150ème
FITC anti-mouse F4.80	EBioscience / 11-4801	0,5 mg/ml	1/150ème
PE/Cy7 rat IgG2bk Isotype control	BioLegend / 400617	0,2 mg/ml	1/60ème
FITC Armenian Hamster IgG Isotype control	BioLegend / 400905	0,5 mg/ml	1/150ème
APC rat IgG2bk Isotype control	BioLegend / 400611	0,2 mg/ml	1/150ème
FITC rat IgG2ak Isotype control	EBioscience / 11-4321	0,5 mg/ml	1/150ème

**Tableau 5 : Liste des anticorps utilisés en cytométrie en flux.**

## VII. Immuno-Histologie

Les tissus (oreilles, peaux et muscles) inclus dans la paraffine sont coupés transversalement (7  $\mu\text{m}$  d'épaisseur). Les coupes sont ensuite déparaffinées par bains successifs de xylène puis d'éthanol 100%, 95% et 80%.

La structure des tissus est observée grâce à une coloration Hémalun-Eosine.

La majorité des immuno-marquages est réalisée à l'aide d'un automate Ventana Discovery XT apportant une grande reproductibilité de marquages. Les réactifs nécessaires aux marquages (tampon de démasquage, tampon de lavage, diluant des anticorps, kit de révélation ...) proviennent tous de chez Ventana.

Après l'étape de déparaffinage, le démasquage des antigènes est réalisé soit manuellement soit par l'automate, en fonction des antigènes d'intérêt. Le démasquage manuel se fait par trente minutes d'incubation à 37°C dans un tampon TE pH8 (Tris 0,1 M, EDTA 50 mM) contenant 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de protéinase K (Sigma).

Les anticorps primaires utilisés sont listés dans le **Tableau 6**.

Antigène	Types / hôte	Fournisseur / Référence	Concentration stock	Dilution utilisée
CD31	Monoclonal / Rat	BD Pharmingen / 553370	0,5 mg/ml	1/40ème
CD31	Monoclonal / Rat	BMA / T-2001	0,2 mg/ml	1/50ème
MMR	Polyclonal / Chèvre	R&D systems / AF2535	0,2 mg/ml	1/50ème
CD68	Monoclonal / Rat	Biologend / 137001	0,5 mg/ml	1/50ème

**Tableau 6 : Liste des anticorps utilisés en immuno-histology.**

La révélation des anticorps primaires se fait par utilisation d'anticorps secondaires biotinylés puis par incubation avec un complexe streptavidine/péroxydase lui-même révélé par un marquage diaminobenzidine (DAB). Pour les doubles marquages, un anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline dont l'activité est révélée grâce aux substrats NBT/BCIP est utilisé en complément du marquage DAB.

Les immunofluorescences sont réalisées manuellement. Après déparaffinage et démasquage manuel, les coupes sont mises trente minutes dans un tampon de saturation

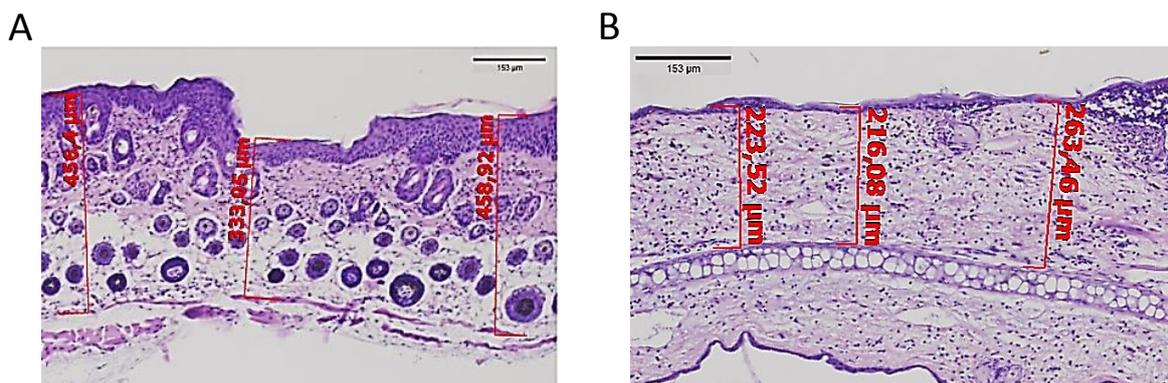
(PBS 1X, 10% sérum d'âne, 0,5% Triton X100) puis incubées une à deux heures à 37°C (ou toute la nuit à 4°C) dans un tampon de PBS 1X, 5% sérum d'âne, 0,5% Triton X100. Après plusieurs lavages au PBS 1X les tissus sont incubés une heure à température ambiante avec des anticorps secondaires couplés à des fluorochromes (ALEXA 488 ou/et ALEXA 568) dilués dans du PBS 1X, 5% sérum d'âne, 0,5% Triton X100.

Les marquages sont visualisés à l'aide d'un microscope Nikon Microphot-FXA et un microscope à fluorescence Zeiss Observer Z1.

## VIII. Quantifications et mesures

### A. Mesure d'épaisseur de peau

L'épaisseur de la peau des oreilles (contrôles et traitées à l'oxazolone) et des échantillons de peaux (contrôles et traitées au SDS), prélevés sur les souris, est mesurée comme décrit ci-dessous (**Figure 40**). Les images des coupes de tissus sont prises au microscope (grossissement x4,2) sur toute la longueur de l'échantillon de la peau ou de l'oreille. Au moins trois mesures sont effectuées par coupe, à l'aide du logiciel « Axion Vision Rel. 4.6 ». L'épaisseur de la peau pour chaque souris correspond à la moyenne de l'ensemble des mesures.



## B. Quantification des marquages CD31, CD68 et MMR

L'angiogenèse, la population totale de macrophages et la population M2 des tissus prélevés sont analysés par immuno-marquages (respectivement anti-CD31, anti-CD68 et anti-MMR) sur coupes transversales. Des photos sont prises au microscope (grossissement 4x ou 10x) sur la totalité de la surface des coupes. La quantification des marquages est faite sur chaque photo par mesure, via le logiciel Image J, du pourcentage de zones CD31<sup>+</sup>, CD68<sup>+</sup> ou MMR<sup>+</sup> sur la surface totale du tissu (**Figure 41**). La moyenne des valeurs obtenues sur l'ensemble des coupes est représentée dans les résultats.

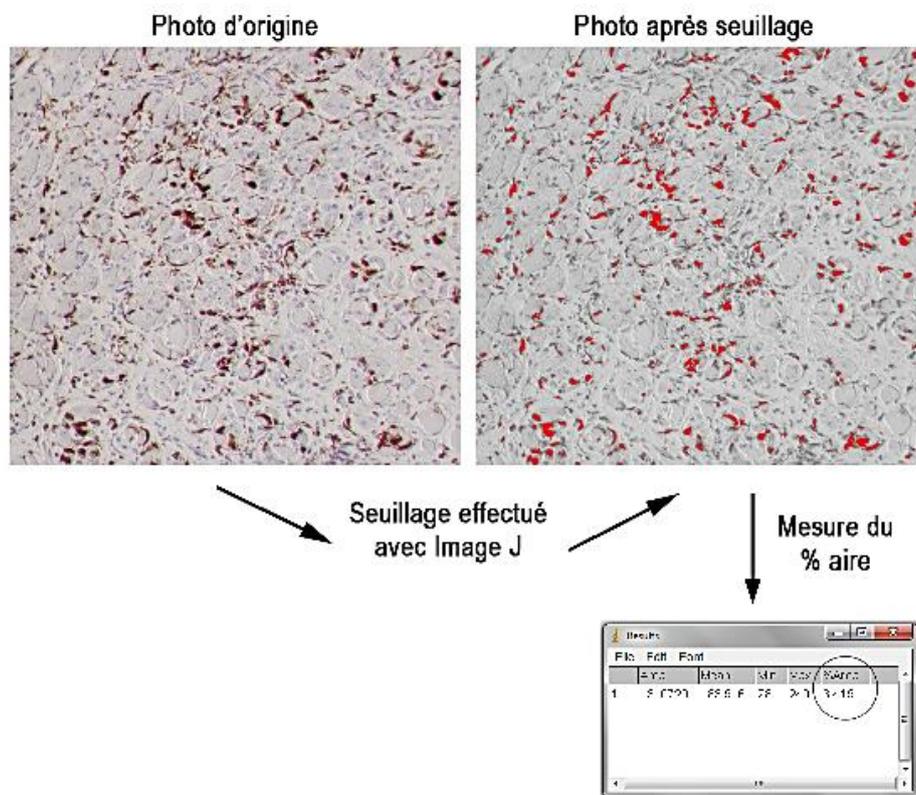


Figure 41: Quantification d'immuno-marquages par seuillage effectuée avec le logiciel Image J.

## C. Quantification du pourcentage de réparation musculaire

La mesure de réparation du muscle tibial après ischémie, se fait par mesure de l'aire positive au marquage dirigé contre la desmine, rapportée à l'aire totale du muscle. Le résultat du rapport est exprimé en tant que pourcentage de muscle réparé (**Figure 42**).



**Figure 42: Quantification des zones réparées et en cours de réparation du muscle tibial ischémié.** Des coupes transversales de muscles sont marquées avec un anticorp anti-desmine. La surface des zones desmine<sup>+</sup> est mesurée et rapportée à la surface totale du muscle.

## IX. Isolement de macrophages péritonéaux

---

Une injection intrapéritonéale de 2 ml de thioglycolate de Brewer est réalisée sur des souris Fzd7WT, Fzd7KO, Fzd7WT<sup>M $\phi$</sup>  et Fzd7KO<sup>M $\phi$</sup> . Trois jours après l'injection les souris sont sacrifiées par dislocation. Le liquide intrapéritonéal est récupéré puis centrifugé 5min à 1000 tour/min à 4°C. Après lavage du culot cellulaire dans du milieu de culture RPMI, les cellules sont à nouveau centrifugées 5min à 1000 tour/min à 4°C. Les cellules récupérées sont alors mises en culture 1h. Au bout d'une heure les cellules non adhérentes sont éliminées. Les cellules ayant adhéré sont fortement enrichies en macrophages péritonéaux.

## X. Culture cellulaire

---

### A. Différenciation de cellules de moelle osseuse en macrophages

---

Des souris Fzd7WT et Fzd7KO âgées de 8 à 12 semaines sont sacrifiées. Les cellules de moelle osseuse contenues dans les fémurs et tibias sont récupérées stérilement et centrifugées 10 minutes à 1200 rpm. Les cellules sont comptées et mises en culture dans du milieu RPMI 1640 (Gibco) contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Gibco), 1% d'acides aminés non essentiels (AANE, Gibco) et 1% de Penicilline-Streptomycine (PS, Gibco). 20 ng/ml de M-CSF (Tebu-bio) sont ajoutés au milieu de culture. Les cellules sontensemencées à  $2 \cdot 10^6$  cellules par puits (dans 500 $\mu$ l de milieu) dans des plaques de culture de 12 puits

(Falcon). Les cellules sont cultivées pendant sept jours en présence de 20 ng/ml de M-CSF. Du milieu de culture contenant 20 ng/ml de M-CSF est ajouté tous les deux jours. Les premiers jours le milieu est ajouté au milieu existant. A partir du quatrième jour de culture le milieu (contenant les cellules non adhérentes et les débris cellulaire) est entièrement renouvelé.

#### B. Activation des macrophages de moelle osseuse en macrophages M1 et M2

Après sept jours de culture des macrophages de moelle osseuse en milieu RPMI 10% SVF contenant 20 ng/ml de M-CSF, les cellules sont déprivées 6h dans un milieu RPMI 1% SVF 0,25% BSA. Ensuite les cellules sont activées pendant 24h avec du milieu RPMI 1% SVF 0,25% BSA contenant 100 ng/ml de LPS et 50 ng/ml d'IFN $\gamma$  (PeproTech), pour une activation M1, ou 10ng/ml de TGF $\beta$  et 10ng/ml d'IL-10 (PeproTech), pour une activation M2. Le milieu servant de condition contrôle, non activée, est du milieu RPMI 1% SVF 0,25% BSA.

#### C. Activation des macrophages de moelle osseuse avec Wnt3a

Après sept jours de culture des macrophages de moelle osseuse en milieu RPMI 10% SVF contenant 20 ng/ml de M-CSF, les cellules sont mises en culture 4h ou 18h dans un milieu conditionné Wnt3a ou dans un milieu conditionné contrôle. Ces milieux conditionnés sont produits au laboratoire par culture de cellules exprimant Wnt3a (L Wnt3a CRL 2647, ATCC) et de cellules contrôles (L Cells CRL-2648, ATCC) selon le protocole recommandé par ATCC.

#### D. Culture de cellules RAW264.7

La lignée cellulaire de macrophages RAW264.7 est cultivée dans du milieu RPMI 1640 (Gibco) contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Gibco) et 1% de Penicilline-Streptomycine (PS, Gibco). Les cellules ont été régulièrement repiquées afin de les maintenir en phase exponentielle de croissance et ainsi les garder viables.

### XI. Extraction d'ARN, transcription inverse et PCR quantitative

Les ARN sont extraits à l'aide de Tri Reagent<sup>®</sup> (Molecular Research Center Inc) comme décrit par le fabricant. La transcription inverse est faite à partir de 0,4 à 1 $\mu$ g d'ARN grâce à

l'enzyme M-MLV reverse transcriptase (Promega). La réaction se déroule pendant 1h30 à 42°C, puis l'enzyme est stoppée par une incubation à 65°C pendant 10 minutes.

La PCR quantitative est faite à l'aide de B-R SYBER® Green SuperMix (Quanta Biosciences) sur une machine DNA Engine Opticon®2 (MJ Research Inc). Les amorces utilisées sont listées dans le tableau suivant (**Tableau 7**). L'expression relative des gènes est calculée par la formule  $2^{-\Delta C(t)}$  où le  $\Delta C(t)$  est obtenu par soustraction du C(t) d'un gène de ménage au C(t) du gène d'intérêt. Très souvent pour faciliter l'analyse et la visualisation des résultats, les expressions relatives ont été normalisées en utilisant comme référence (=1) la valeur moyenne des expressions relatives dans les cellules ou tissus contrôles.

Gènes	Amorces	Séquences
<b>Gènes de ménage</b>		
<i>Cyclophiline A</i>	Sens	AGCTAGACTTGAAGGGGAATG
	Antisens	ATTTCTTTTGACTTGCGGGC
<i>Phosphoprotéine ribosomale P0</i>	Sens	GCGACCTGGAAGTCCAAC
	Antisens	CCATCAGCACCCACAGCCTTC
<b>Gènes d'intérêt</b>		
<i>Frizzled 1</i>	Sens	TTTTCTGGGGCTCAACAACG
	Antisens	AGGGCAAGGGATGGCATAAC
<i>Frizzled 2</i>	Sens	TCAAGGTGCCGTCTATCTCAG
	Antisens	GGTGGTGACCGTGAAGAAAGTG
<i>Frizzled 3</i>	Sens	TGGGGTTTCTCTCCTTTAGCC
	Antisens	GCTTGCTTCTTTGGTCATCCACC
<i>Frizzled 4</i>	Sens	TGACAACCTTTCACGCCGCTC
	Antisens	TACAAGCCAGCATCGTAGCCACAC
<i>Frizzled 5</i>	Sens	CGTTGCCACCTTCCTCATTGAC
	Antisens	GCACCAAGAATCCCAGTGACAC
<i>Frizzled 6</i>	Sens	TATCTCTGCGGTCTTCTGGGTTGG
	Antisens	TCCATTGCTTCTCTCCTTCAGGC
<i>Frizzled 7</i>	Sens	GCCCCGACTTTACAGTCTTC
	Antisens	ATACCGCAGTTTCCCCCTTG
<i>Frizzled 8</i>	Sens	CATCTGGTGGGTAATCCTGTGCG
	Antisens	AGGTTGTCAAGGCTCTGGTTGC
<i>Frizzled 9</i>	Sens	GAGCCTGTGCTACCGAAAAATG
	Antisens	CCTTCTGCCCTTCTTATCCTG
<i>Frizzled 10</i>	Sens	TGGTGTGTGTTATGTGGGCAGC
	Antisens	ATCAGGCAGTCAGGTGTCTTGG

<i>Tnfa</i>	Sens Antisens	AAAGATGGGGGGCTCCAGAACTC CCCACTGAGGTAGGAAAGATGTAGC
<i>IL-6</i>	Sens Antisens	TCTGGGAAATCGTGGAAATGAG TGGATGGTCTTGGTCCTTAGCC
<i>IL-12b</i>	Sens Antisens	AGCTGGGAGTACCCTGACTC AGCGATCCTGAGCTTGCACG
<i>Mrc1</i> (mannose receptor, C type 1) (gène codant pour MMR)	Sens Antisens	TGCCGGCGTTGCAGCCTATT GCTCATTCTGCTCGATGTTGCCCA
<i>Myh1</i> (myosin heavy chain 1)	Sens Antisens	TGAGGAAGCGGAGGAACAAT GTCACCTTCTGCACTTGAT

**Tableau 7 : Liste des amorces utilisées en qPCR.**

## XII. Western Blot

Les cellules en culture sont lysées dans du tampon RIPA (NP-40 1 %, déoxycholate de sodium 0,5%, Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 0,1%, tampon tris pH8 50 mM) supplémenté en inhibiteurs de protéases ajoutés extemporanément (aprotinine 1 mM, leupeptine 10µg/ml, AEBSF 1 mM, benzamidine 1mM) ainsi qu'un inhibiteur de phosphatases (orthovanadate 1mM). Après centrifugation à 14 000 rpm, les surnageants sont récupérés puis dosés selon la technique de Smith utilisant le kit de dosage protéique BCA (Pierce).

Les extraits protéiques sont repris dans un tampon d'échantillon à 5x, le H5R (bleu de bromophénol 0.025%, SDS 2%, β-mercaptoéthanol 100 mM, glycérol 10%, Tris/HCl 100 mM pH 6,8), et bouillis à 95°C pendant 5 min afin d'être dénaturés.

Des quantités équivalentes de protéines (20 à 30 µg) sont soumises à une électrophorèse SDS-PAGE dans un gel de polyacrilamide à 7,5 ou 10%, dans un tampon de migration (Tris 5 mM, glycine 40 µM, SDS 0,2 %, pH 8,3), puis sont transférées sur une membrane PVDF (Millipore) par électrotransfert liquide dans un tampon de transfert (Tris 25 mM, Glycine 192 mM, Méthanol 20%, pH8.3) pendant 1 h, à 100V et à 4°C.

Après transfert, les membranes sont saturées pendant 30 min à température ambiante soit dans un tampon PBS-T (PBS1X + 0.05% Tween 20) contenant 10% de lait écrémé lyophilisé, soit dans un tampon PBS-T contenant 10% de BSA, suivant l'anticorps utilisé. Elles sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire, dans du tampon PBS-T 5% de lait, ou du PBS-T 5% de BSA, pendant 2 h à température ambiante ou bien toute la nuit à 4°C. Ces membranes sont rincées dans du tampon PBS-T, incubées 1h avec un anticorps secondaire

couplé à un fluorochrome (1/5000<sup>ème</sup>) (IgG de souris AlexaFluor-700 et IgG de lapin AlexaFluor-750 (Invitrogen)) dans du tampon PBS-T 5% de lait, puis rincées de nouveau dans du tampon PBS-T.

La révélation se fait avec le système Odyssey Infrared Imaging System, qui lit la fluorescence émise par les anticorps secondaires excités à une longueur d'onde précise : 700 nm pour l'IgG de souris AlexaFluor-700, 750 nm pour l'IgG de lapin AlexaFluor-750.

La liste des anticorps primaires utilisés est présentée dans le **Tableau 8**.

Antigène	Types / hôte	Fournisseur / Référence	Dilution utilisée
$\beta$ -caténine	Polyclonal / Lapin	Sigma / C2206	1/3 000 <sup>ème</sup>
pERK (= Phospho-p44/42 MAPK)	Monoclonal / Lapin	Cell Signaling / 91015	1/1 000 <sup>ème</sup>
$\alpha$ -tubuline	Monoclonal / Souris	Sigma / T5168	1/8 000 <sup>ème</sup>
GSK3 $\beta$	Monoclonal / Souris	BD Biosciences / 610201	1/15 000 <sup>ème</sup>

**Tableau 8 : Liste des anticorps utilisés en Western Blot.**

### XIII. Statistiques

Les analyses statistiques sont faites avec le logiciel GraphPad Prism 5. Les résultats sont donnés comme étant la moyenne plus ou moins l'erreur standard à la moyenne ( $\pm$  SEM). La comparaison entre les groupes est analysée en utilisant le test non paramétrique de Mann-Whitney. Les différences sont considérées significatives lorsque  $p \leq 0,05$ . \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$

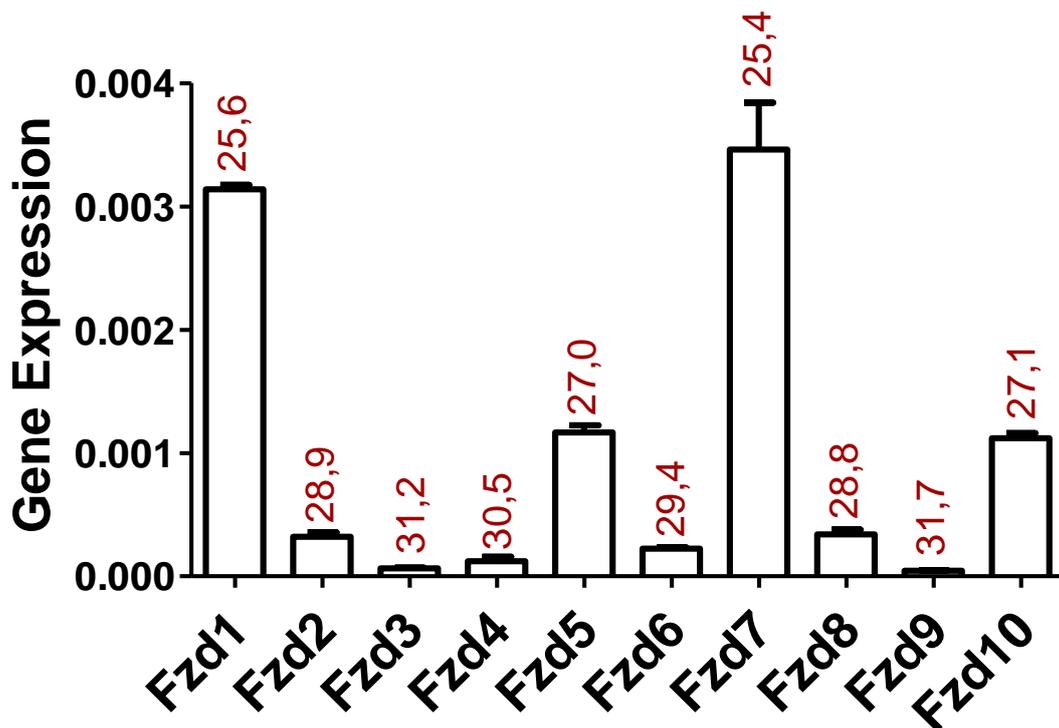
# RESULTATS

---

## I. Expression de Frizzled7 par les macrophages et vérification des lignées murines utilisées

### A. Expression des récepteurs Frizzled par les macrophages

Nous avons commencé par déterminer, par RT-qPCR sur l'ARN de macrophages différenciés à partir de moelle osseuse, l'expression relative des dix récepteurs Frizzled murins (**Figure 43**). Les récepteurs, relativement, les plus fortement exprimés par les macrophages sont Fzd1 et Fzd7 (Ct détectés entre 25 et 26 cycles). Les macrophages expriment également dans une moindre mesure Fzd5 et Fzd10 (Ct = 27 cycles). Les récepteurs Fzd2, Fzd6 et Fzd8 sont quant à eux plus faiblement exprimés (Ct détectés aux alentours de 29 cycles). Enfin, nécessitant plus de 30 cycles d'amplification pour atteindre le seuil de détection Fzd3, Fzd4, et Fzd9 ne sont quasiment pas exprimés.



**Figure 43 : Expression relatives des gènes *Fzd* par les macrophages issus de moelle osseuse.** RT-qPCR réalisée à partir de macrophages différenciés en culture à partir de moelle osseuse de souris C57Bl6/J. L'expression relative des différents gènes est donnée par rapport à l'expression du gène de ménage (cyclophiline A). Le nombre de cycles d'amplification nécessaires à la détection des ADNc (ou Ct) est donné en rouge sur le graphique pour chaque *Fzd*. Pour référence : Ct cyclophiline A = 17,3 cycles.

*Fzd7* est fortement exprimé par les macrophages. Nos données du laboratoire montrent son implication dans les cellules endothéliales et sur leurs propriétés angiogéniques. Mon projet a été d'analyser son rôle sur les propriétés angiogéniques des macrophages.

## B. Lignées murines utilisées

---

Pour cette étude nous disposons de deux lignées murines déficientes en *frizzled 7* : la lignée de souris KO (**Fzd7WT/Fzd7KO**) et la lignée de souris où *Fzd7* n'est pas exprimé par les macrophages (**Fzd7WT<sup>MΦ</sup>/Fzd7KO<sup>MΦ</sup>**). Cette dernière fut développée lors de ma thèse.

La délétion de *Fzd7* est induite spécifiquement dans les cellules myéloïdes, grâce au système Cre/LoxP. Le gène de la Cre-recombinase est placé sous influence du promoteur du gène de la lysozyme M. La lysozyme M est une enzyme, sécrétée par les cellules de la lignée myéloïde (monocytes, macrophages et granulocytes), capable d'hydrolyser les peptidoglycanes des parois bactériennes. Faiblement exprimée par les myéloblastes et modérément par les macrophages immatures, elle est très fortement exprimée dans les tissus par les macrophages matures (Uniprot).

### i. Vérification de l'absence de *Frizzled7* dans les macrophages

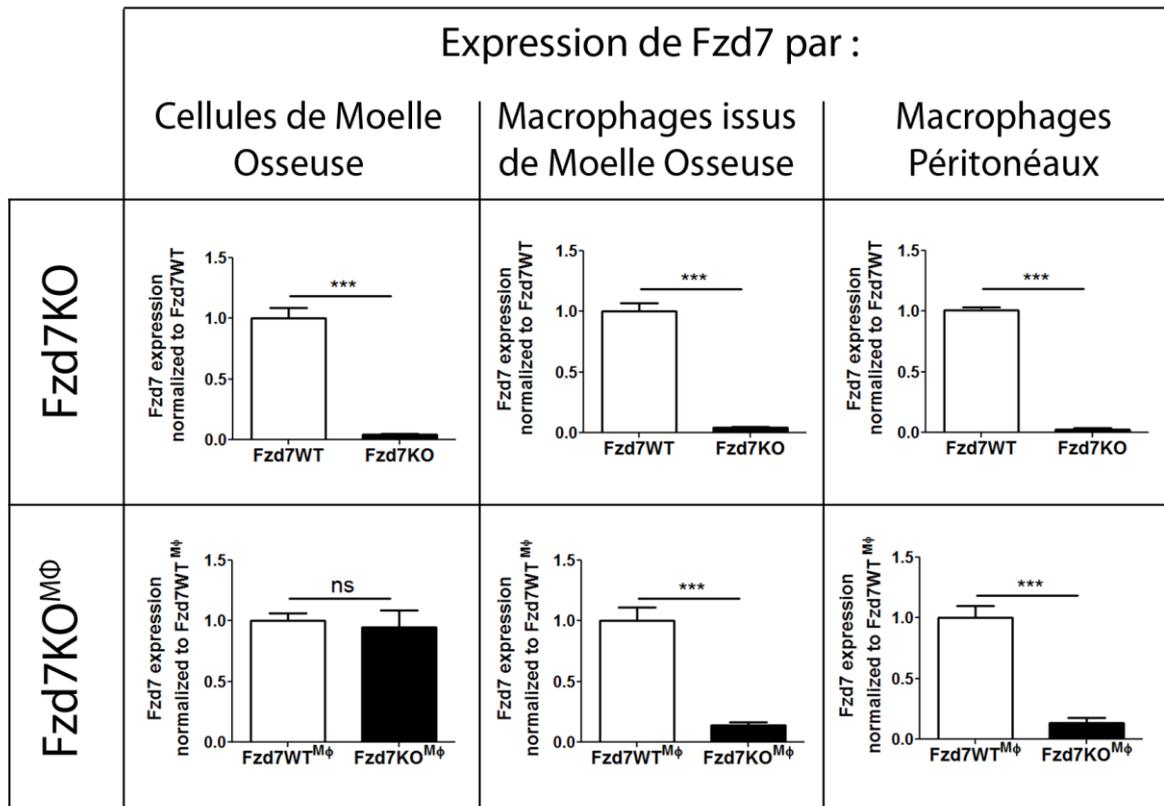
---

#### a. Extinction de l'expression de *Fzd7* par les macrophages

---

Afin de vérifier la délétion du gène *frizzled 7* dans les macrophages de ces deux lignées, des RT-qPCR ont été réalisées sur des ARN de cellules de moelle osseuse, de macrophages différenciés *in vitro* à partir de cellules de moelle osseuse, et de macrophages péritonéaux (**Figure 44**). La délétion de *frizzled 7* est bien visible dans les macrophages de moelle osseuse et péritonéaux ainsi que dans les cellules de moelle osseuse chez la souris *Fzd7KO*. Les cellules de moelle osseuse issues des souris *Fzd7KO<sup>MΦ</sup>* expriment autant *Fzd7* que les *Fzd7WT<sup>MΦ</sup>*. Cependant après une semaine de culture en présence du facteur de différenciation macrophagique, M-CSF, on observe 86% d'extinction de *Fzd7* dans les cellules issues de moelle osseuse *Fzd7KO<sup>MΦ</sup>* comparées aux cellules issues de moelle osseuse *Fzd7WT<sup>MΦ</sup>*. Ces résultats sont une preuve de l'efficacité de la technique de différenciation de macrophages *in vitro* à partir de cellules de moelle osseuse ainsi que de l'efficacité de la délétion spécifique dans les macrophages. De même on observe une très forte diminution d'expression de *frizzled 7* par les macrophages péritonéaux *Fzd7KO<sup>MΦ</sup>* comparées aux

Fzd7WT<sup>MΦ</sup> (87% d'extinction). La faible expression de *frizzled 7* observée dans les échantillons de macrophages de moelle osseuse et péritonéaux ( $\approx 14\%$ ) peut être due à la présence de quelques cellules non macrophagiques subsistant après récupération des cellules chez l'animal et différenciation ou isolement des macrophages.



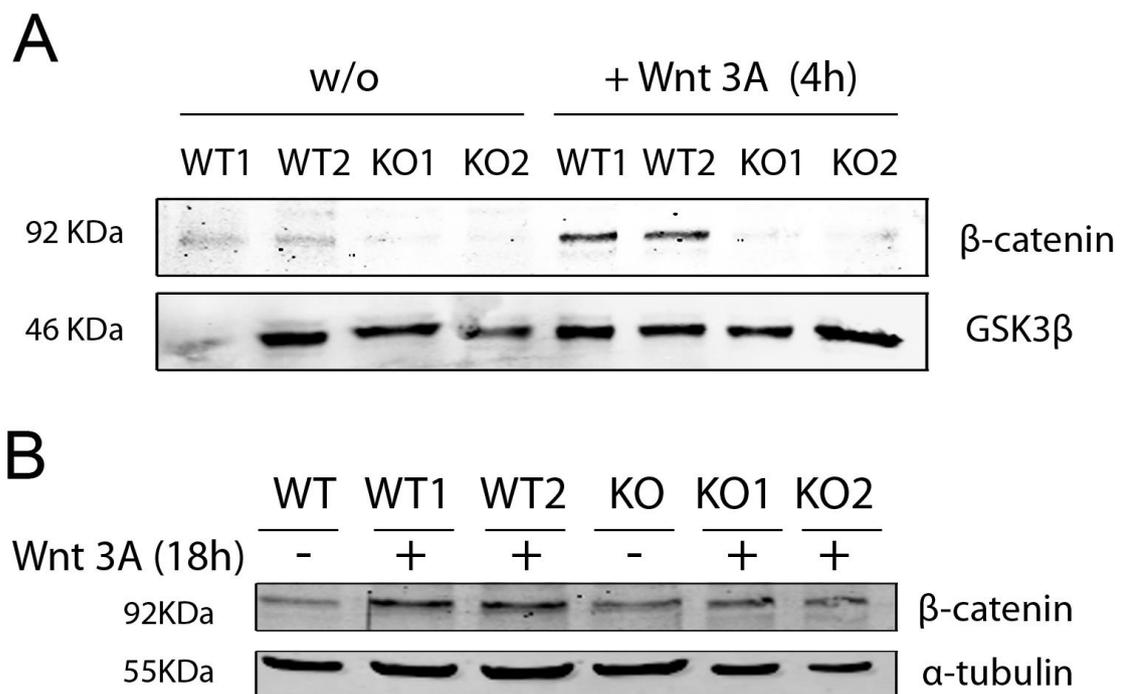
**Figure 44 : Analyse de la délétion de *Fzd7* dans les macrophages obtenus des souris Fzd7KO et Fzd7KO<sup>MΦ</sup>.** Le niveau d'expression de *Fzd7* dans les cellules de moelle osseuse, les macrophages issus de moelle osseuse et les macrophages péritonéaux des souris Fzd7KO et Fzd7KO<sup>MΦ</sup> est analysé par RT-qPCR et comparé à celui des cellules des souris contrôles (Fzd7WT et Fzd7WT<sup>MΦ</sup>). Les niveaux d'expression dans les cellules de souris contrôles sont prises comme référence (=1).

#### b. Extinction de la signalisation $\beta$ -caténine

Nous avons analysé si la délétion de *frizzled 7* dans les macrophages pouvait inhiber l'induction de la  $\beta$ -caténine. Nous avons montré que la signalisation induite par Fzd7 dans les cellules endothéliales dépendait de la voie  $\beta$ -caténine. L'activation de la voie  $\beta$ -caténine via Fzd7 est induite *in vitro* par la présence de Wnt3a dans le milieu de culture des cellules. (Ferreira Tojais et al. 2014).

Nous avons donc comparé *in vitro* l'activation de la voie canonique  $\beta$ -caténine dépendante dans des macrophages de moelle osseuse de souris Fzd7WT et Fzd7KO. Les macrophages sont ainsi mis en culture avec du milieu conditionné Wnt3a pendant 4h à 18h. Un milieu conditionné contrôle est utilisé comme condition contrôle.

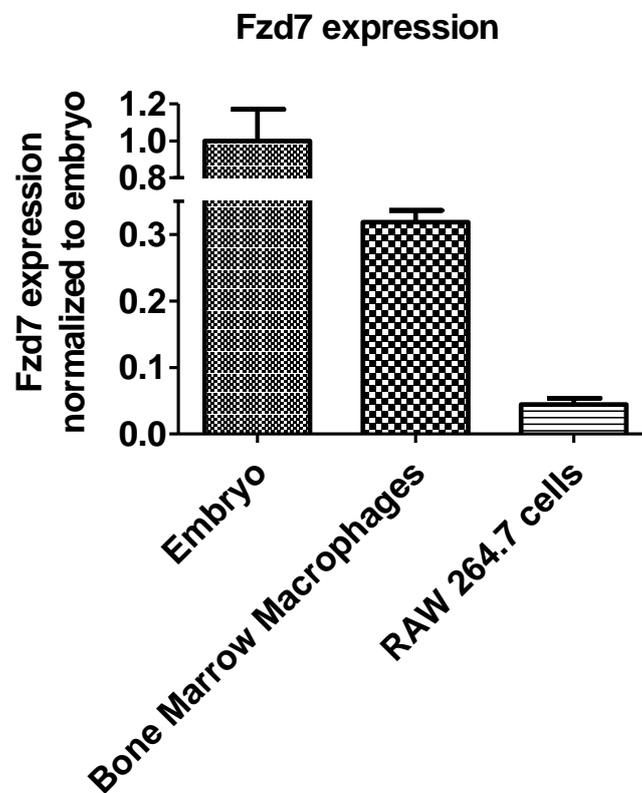
L'accumulation de  $\beta$ -caténine caractéristique d'une activation de la voie Wnt/canonique est analysée par Western-Blot. Les protéines GSK3 $\beta$  et  $\alpha$ -tubuline sont utilisées comme contrôle de charge. La présence de Wnt3a dans le milieu de culture provoque dans les macrophages Fzd7WT une accumulation de  $\beta$ -caténine, comme attendu. En revanche, cette accumulation n'est pas visible dans les macrophages délétés pour *frizzled 7* (**Figure 45**), cela aussi bien après 4h que 18h d'activation. La signalisation  $\beta$ -caténine en aval du récepteur Frizzled 7 est donc bien abolie dans les macrophages en absence de FZD7.



**Figure 45: La signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine est abolie en absence de Frizzled 7.** Des macrophages différenciés à partir de moelle osseuse de souris Fzd7WT et Fzd7KO sont mis en culture 4h (**A**) ou 18h (**B**) dans un milieu conditionné contrôle ou contenant du Wnt3a. La détection de la  $\beta$ -caténine est faite par WB. GSK  $\beta$  et  $\alpha$ -tubuline servent de contrôles de charge. Cette expérience fut répétée trois fois avec deux souris Fzd7WT et Fzd7KO par expérience.

### C. Macrophages utilisés pour les études *in vitro*

Pour les études *in vitro* l'expression de *frizzled 7* a été comparée, par RT-qPCR, entre des macrophages issus de la différenciation de cellules de moelle osseuse et une lignée de macrophages murins, les cellules RAW 264.7. Le niveau d'expression de *Fzd7* dans un embryon a servi de contrôle positif. Les résultats obtenus montrent que les macrophages issus de cellules de moelle osseuse expriment 14 fois plus de *Fzd7* que les RAW 264.7 (**Figure 46**). Les expériences *in vitro* seront donc par la suite réalisées sur des macrophages différenciés à partir de cellules de moelle osseuse de souris.



**Figure 46 : Comparaison des niveaux d'expression de *Fzd7* dans les macrophages issus de moelles osseuse et dans la lignée de macrophages RAW264.7.** RT-qPCR réalisée à partir d'ARN d'embryon (E12.5 dpc), de macrophages issus de la moelle osseuse de souris *Fzd7*WT et de cellules RAW264.7. Le niveau d'expression de *Fzd7* dans l'embryon sert de référence (=1).

## II. Frizzled 7 régule l'angiogenèse dans plusieurs modèles d'inflammation chez la souris

---

Notre étude portant sur le rôle de l'expression de *frizzled 7* par les macrophages dans l'angiogenèse nous avons choisi de travailler sur des modèles d'inflammation caractérisée par une angiogenèse pathologique et une intervention importante des macrophages. Trois modèles ont été développés chez les souris mutantes versus contrôles. Ces différents modèles et les résultats obtenus sont présentés ci-dessous.

### A. Hypersensibilité retardée de contact

---

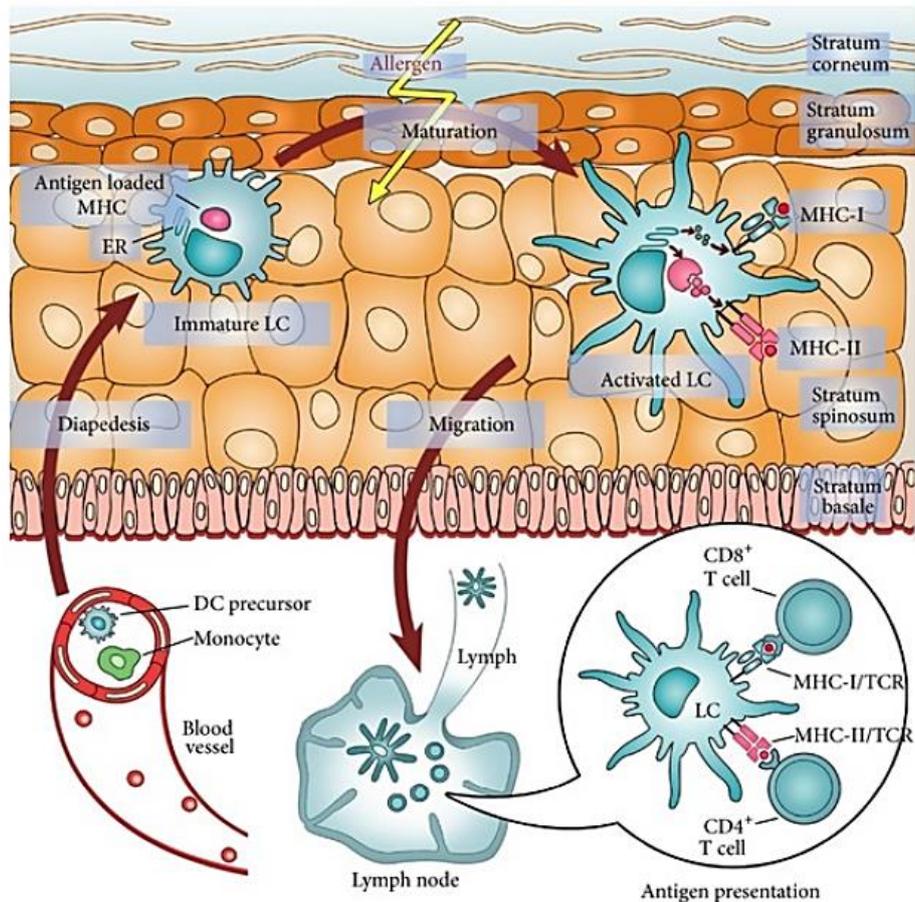
#### i. Présentation du modèle

---

L'hypersensibilité retardée de contact chez la souris est un modèle animal utilisé pour reproduire les dermatites de contact allergique humaines. Il s'agit d'une manifestation typique d'immunité cellulaire caractérisée principalement par l'action de lymphocytes T, de cellules dendritiques et de macrophages.

L'hypersensibilité retardée de contact consiste en deux étapes successives: une phase de sensibilisation et une phase de déclenchement (Christensen\* et al. 2012).

Lors de la sensibilisation, le premier contact de la peau avec l'agent sensibilisant, l'haptène, conduit à la liaison de cet haptène avec une protéine endogène. Des complexes « haptène-transporteur » fortement immunogéniques sont ainsi formés. Ces complexes sont reconnus et capturés au niveau de la peau par les cellules de Langerhans et les cellules dendritiques dermiques. Ces cellules migrent alors de l'épiderme jusqu'aux ganglions lymphatiques où elles vont activer les lymphocytes T naïfs en leur présentant les complexes peptides/haptènes. Les lymphocytes T activés vont proliférer et entrer dans la circulation sanguine (**Figure 47**) (Christensen\* et al. 2012, Peiser\* 2013).



**Figure 47: Activation du système immunitaire en réponse à un allergène.** Après rupture de la barrière épidermique les haptènes, comme certains produits chimiques, parviennent dans la couche profonde de la peau. Jouant leur rôle de sentinelles du système immunitaire, les cellules de Langerhans (LC) détectent l'allergène et le captent. Les LC chargées de l'antigène quittent alors l'épiderme et migrent jusqu'aux ganglions lymphatiques où elles vont stimuler la prolifération des lymphocytes T cytotoxiques et lymphocytes T auxiliaires. Les lymphocytes T générés ont une spécificité liée à l'allergène présenté. Après l'inflammation les cellules de Langerhans sont recrutées à partir des monocytes circulant dans le sang et repeuplent l'épiderme. DC = Cellules Dendritiques; LC = Cellules de Langerhans; MHC = Complexe Majeur d'Histocompatibilité; TCR = Récepteur Lymphocytes T. Source : (Peiser 2013)

Dans la phase de déclenchement, la ré-exposition de la peau à l'haptène va activer ces lymphocytes T sensibilisés et déclencher une réaction inflammatoire dans la peau (Christensen\* et al. 2012). La réaction inflammatoire se traduit macroscopiquement par un érythème, un œdème et une vésiculation. L'inflammation peut être facilement suivie par l'épaississement de l'oreille dû à l'œdème, 24 à 48h après le déclenchement de la réaction inflammatoire.

Pour notre étude, l'haptène utilisé est l'oxazolone. La sensibilisation se fait par application d'oxazolone 2% au niveau du ventre, préalablement rasé, et des quatre pattes de la souris. La réaction inflammatoire est déclenchée cinq jours plus tard par dépôt d'oxazolone 1% au niveau de l'oreille droite. L'oreille gauche sert de contrôle, seul l'excipient étant appliqué.

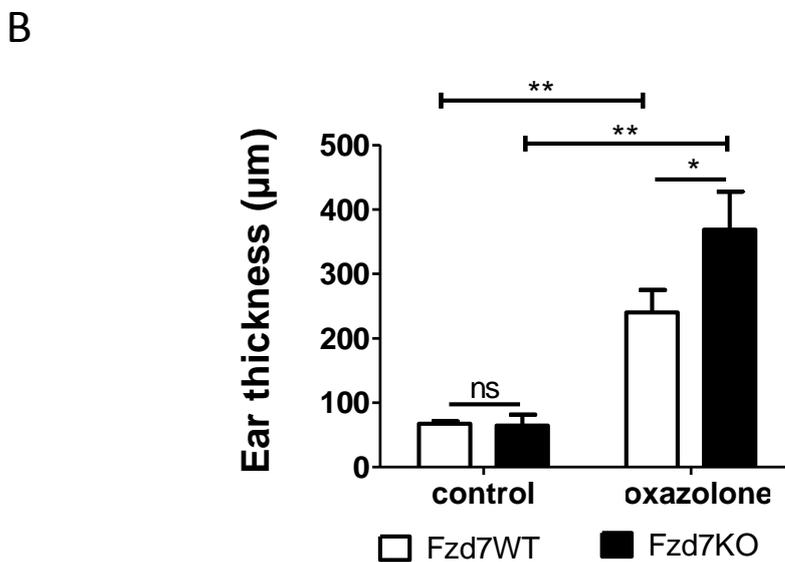
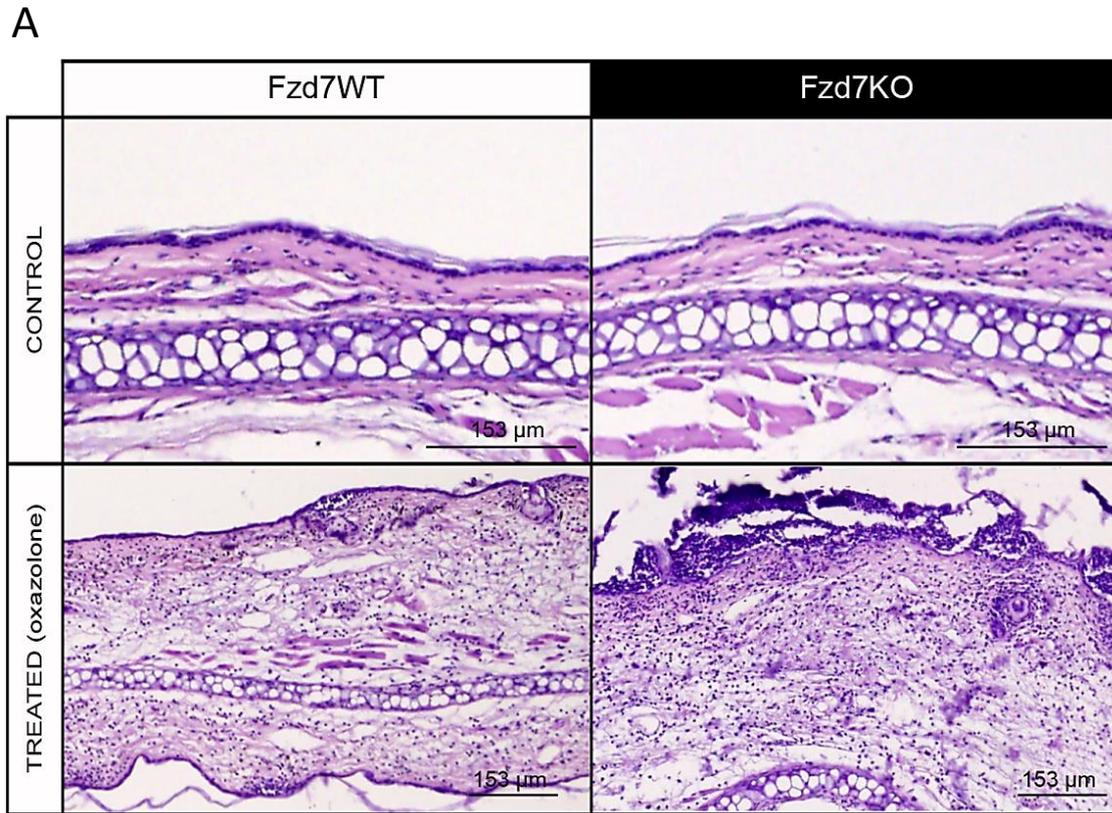
## ii. Résultats chez les souris Fzd7KO

---

Le modèle d'irritation retardée de contact a été réalisé sur les souris de la lignée Fzd7KO. 24h après le dépôt d'oxazolone sur l'oreille, les souris sont sacrifiées. Les oreilles traitées et les oreilles contrôles sont prélevées, fixées et incluses dans de la paraffine afin de garder une structure intacte du tissu. L'épaisseur des oreilles, traduisant le niveau d'inflammation, est mesurée à partir de coupes transversales colorées à l'Hémalun-Eosine.

Les données ainsi obtenues confirment l'efficacité du traitement à déclencher une réaction inflammatoire. En effet, les oreilles traitées à l'oxazolone présentent une forte augmentation de volume comparées à celui obtenu dans les oreilles contrôles, cela chez les souris Fzd7WT comme les Fzd7KO. La réaction inflammatoire est cependant beaucoup plus importante chez les animaux Fzd7KO que chez les Fzd7WT, avec une oreille, respectivement, 5,7 et 3,6 fois plus épaisse que l'oreille contrôle (**Figure 48**).

Le récepteur Frizzled 7 joue donc un rôle dans la régulation de l'inflammation.



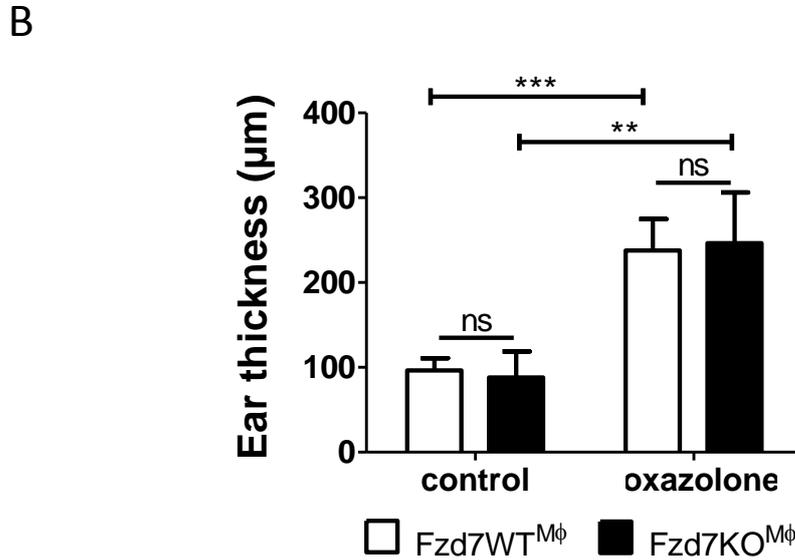
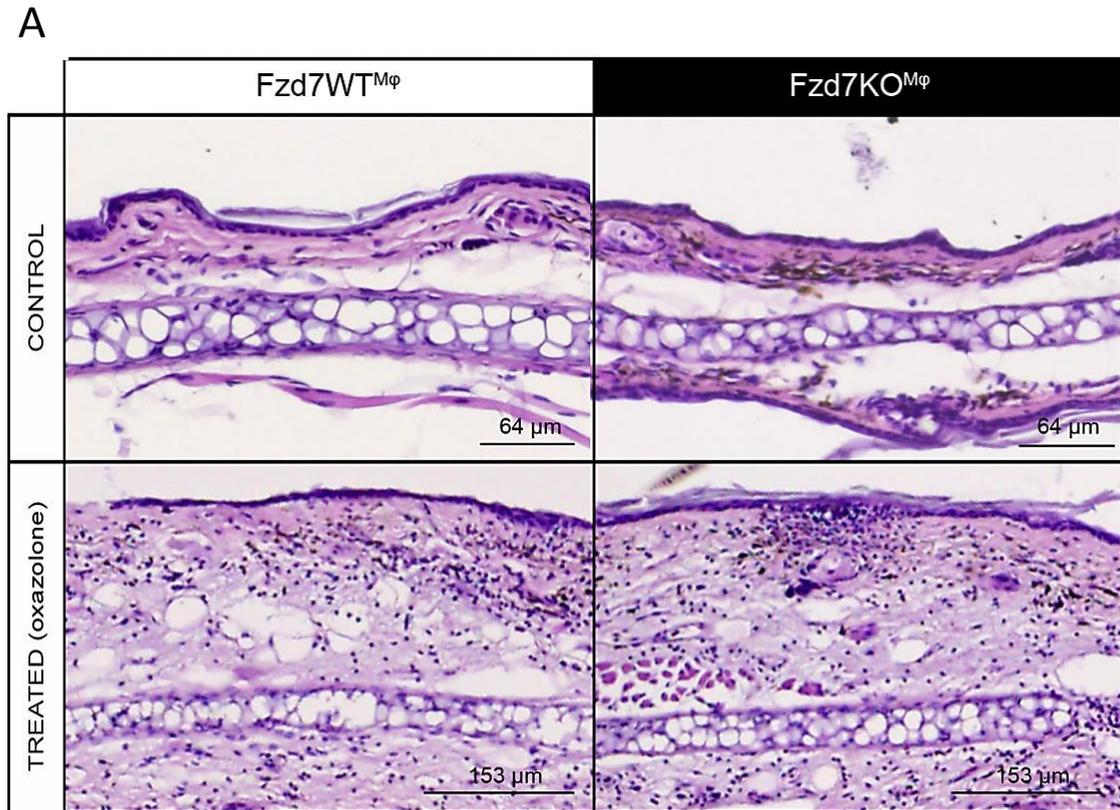
**Figure 48 : L'absence de Fzd7 augmente la réponse inflammatoire induite par l'oxazolone.** Une hypersensibilité retardée de contact est induite, au niveau de l'oreille, chez des souris Fzd7WT et Fzd7KO par contact cutané avec de l'oxazolone. Seule une oreille est mise en contact avec l'agent sensibilisant, l'autre oreille sert de contrôle. La réponse inflammatoire provoquée est analysée par mesure de l'épaisseur de l'oreille. **(A)** Coupes d'oreilles traitées et contrôles (souris Fzd7WT et Fzd7KO) après coloration Hémalun-Eosine. **(B)** Représentation graphique de l'épaisseur des oreilles mesurée à partir des coupes colorées à l'Hémalun-Eosine. Expérience réalisée sur 3 souris Fzd7WT et 3 souris Fzd7KO.

### iii. Résultats chez les souris Fzd7KO<sup>M $\phi$</sup>

---

La même expérience fut également réalisée sur les souris Fzd7KO<sup>M $\phi$</sup>  et leurs contrôles. La réaction inflammatoire est bien déclenchée dans les deux groupes, avec une épaisseur de l'oreille traitée, respectivement, 2,5 et 2,7 fois plus importante que l'oreille contrôle. En revanche, contrairement aux souris Fzd7KO, l'intensité de l'inflammation est équivalente chez les souris Fzd7WT<sup>M $\phi$</sup>  et Fzd7KO<sup>M $\phi$</sup>  (**Figure 49**).

La différence de phénotype observée dans la lignée Fzd7KO ne semble donc pas explicable par une absence de Fzd7 spécifiquement dans les macrophages. Ce modèle d'inflammation retardée de contact est très largement basé sur une réaction lymphocytaire. Fzd7 est exprimé par les lymphocytes B et T (Sercan et al. 2010) et tout comme les macrophages, ces cellules immunitaires adaptent leur phénotype en fonctions des signaux environnementaux (cytokines et chimiokines) (Biedermann\* et al. 2004). Il serait intéressant de réaliser ce test sur des souris délétées de *Fzd7* spécifiquement dans les lymphocytes afin de tester si l'on retrouve la même augmentation d'inflammation que celle décrite chez les souris KO.



**Figure 49 : L'absence de Fzd7 dans les macrophages n'a pas d'effet sur l'intensité de la réponse inflammatoire induite par l'oxazolone.** Une hypersensibilité retardée de contact est induite, au niveau de l'oreille, chez des souris Fzd7WT<sup>Mφ</sup> et Fzd7KO<sup>Mφ</sup> par contact cutané avec de l'oxazolone. Seule une oreille est mise en contact avec l'agent sensibilisant, l'autre oreille sert de contrôle. La réponse inflammatoire provoquée est analysée par mesure de l'épaisseur de l'oreille. **(A)** Coupes d'oreilles traitées et contrôles (souris Fzd7WT<sup>Mφ</sup> et Fzd7KO<sup>Mφ</sup>) après coloration Hémalum-Eosine. **(B)** Représentation graphique de l'épaisseur des oreilles mesurée à partir des coupes colorées à l'Hémalum-Eosine. Expérience réalisée sur 4 souris Fzd7WT<sup>Mφ</sup> et 4 souris Fzd7KO<sup>Mφ</sup>.

## B. Irritation cutanée

---

### i. Présentation du modèle

---

Tout comme l'hypersensibilité retardée de contact, l'irritation cutanée est un modèle *in vivo* d'inflammation cutanée couramment utilisé. Cependant, la composante lymphocytaire y est plus réduite et le rôle des macrophages plus prépondérant.

La peau sert de barrière physique entre l'organisme et l'environnement extérieur. En cas de rupture de cette barrière, la peau devient alors le point d'entrée de pathogènes et autres éléments potentiellement nocifs pour l'organisme. Le système immunitaire est très présent et réactif au niveau de cet organe.

La rupture de la barrière épidermique peut être provoquée mécaniquement ou chimiquement. Les détergents, tels que le dodécylsulfate de sodium (SDS), font partis des agents chimiques pouvant entraîner cette rupture.

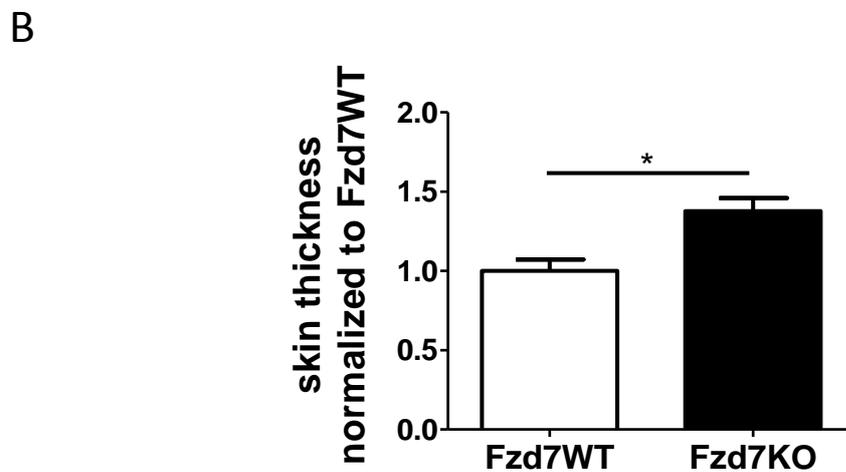
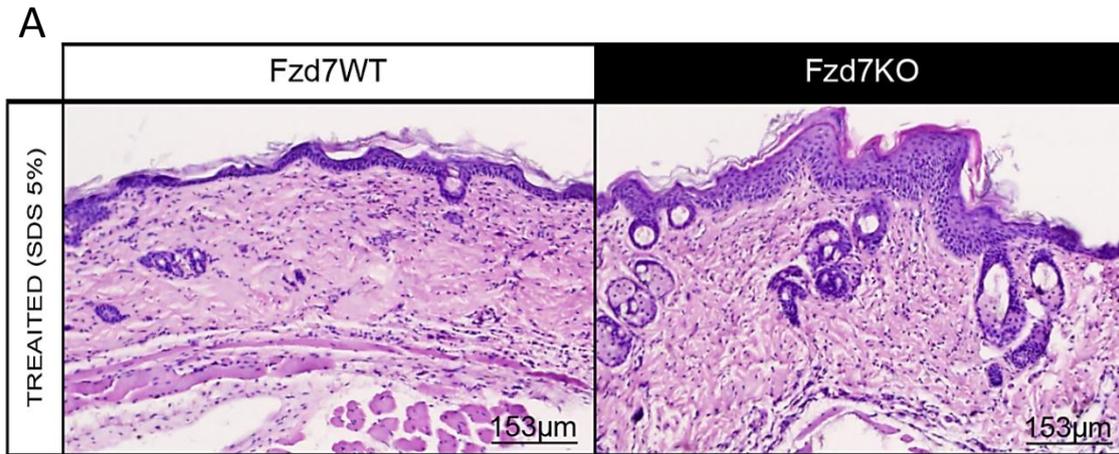
Expérimentalement, le SDS est utilisé chez la souris pour mimer les dermatites de contact observées chez l'Homme. L'application cutanée et journalière d'une solution de SDS entraîne une inflammation cutanée caractérisée par une invasion de leukocytes (lymphocytes T, cellules dendritiques et macrophages), une vasodilatation, une hyperprolifération de l'épiderme et un œdème. L'équipe de Theo Thepen, a montré le rôle prépondérant des macrophages inflammatoires dans la réaction inflammatoire provoquée par l'application de SDS (Thepen et al. 2000).

### ii. Résultats chez les souris Fzd7KO

---

Dans un premier temps l'irritation cutanée a été induite sur des souris Fzd7WT et Fzd7KO. Après cinq jours de traitement au SDS les souris sont sacrifiées, les peaux prélevées, fixées et incluses dans de la paraffine. L'évaluation de l'inflammation est faite par mesure de l'épaisseur de la peau sur des coupes colorées à l'Hémalun-Eosine.

Ainsi nous avons observé que les souris Fzd7KO présentait un œdème 1,4 fois plus important que les souris Fzd7WT (**Figure 50**).

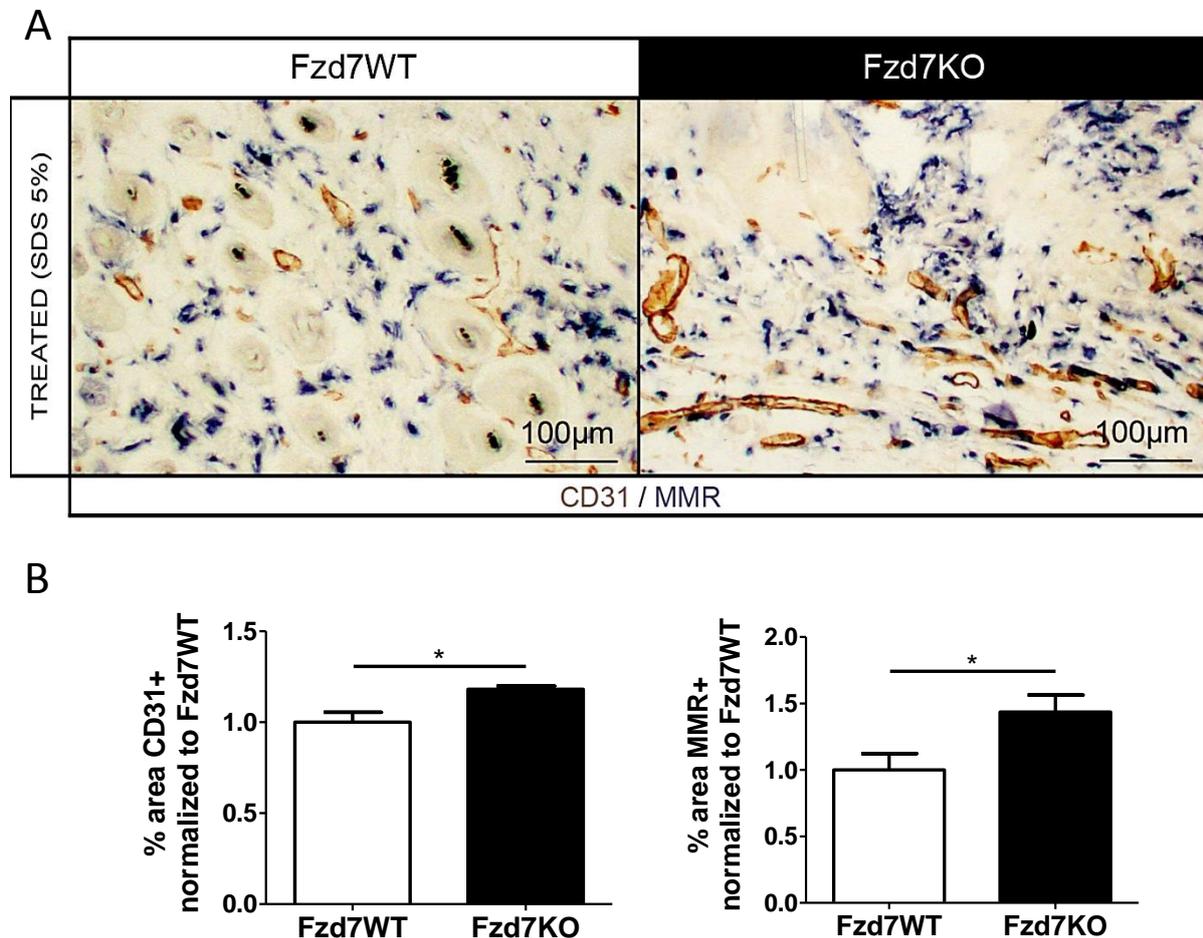


**Figure 50 : L'absence de Fzd7 augmente la réponse inflammatoire induite par le SDS.** Une irritation cutanée est induite sur le dos de souris Fzd7WT et Fzd7KO par application quotidienne de SDS pendant 5 jours. La réponse inflammatoire provoquée est analysée par mesure de l'épaisseur de la peau (derme + épiderme). **(A)** Coupes d'échantillons de peaux, traitées au SDS, de souris Fzd7WT et Fzd7KO après coloration Hémalum-Eosine. **(B)** Représentation graphique de l'épaisseur de la peau mesurée à partir des coupes colorées à l'Hémalum-Eosine. L'épaisseur moyenne de la peau des souris Fzd7WT traitées au SDS est prise comme référence (=1). Expérience réalisée sur 5 souris Fzd7WT et 5 souris Fzd7KO.

En parallèle nous nous sommes intéressés à l'angiogénèse induite par la réaction inflammatoire. Les vaisseaux ont été marqués avec un anticorps anti-CD31 et le pourcentage de zones CD31<sup>+</sup> a été quantifié, via le logiciel Image J. L'absence de Frizzled 7 entraîne statistiquement une angiogénèse plus importante (x1,2) **(Figure 51)**.

Nous avons ensuite recherché si la délétion de *Fzd7* pouvait modifier le mécanisme de polarisation des macrophages. Pour cela, un immuno-marquage des macrophages M2 a été

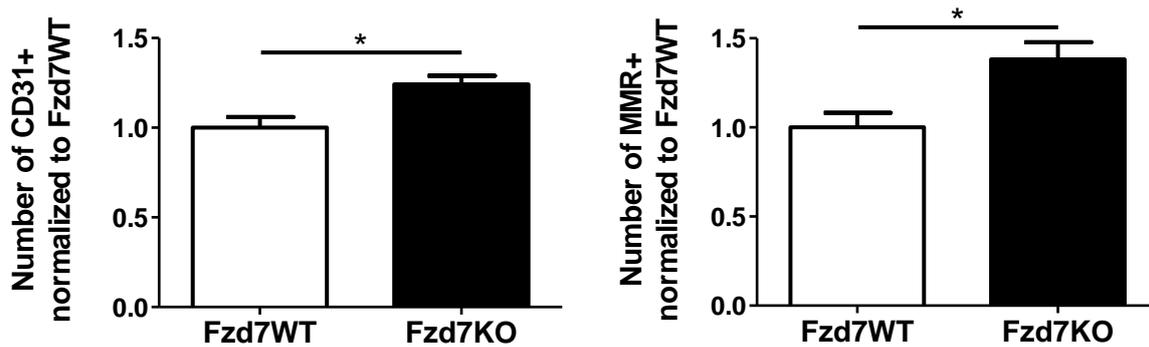
réalisé, en utilisant l'anticorps anti-MMR. Nous avons ainsi pu déterminer que l'augmentation de vaisseaux s'accompagne d'une présence accrue de macrophages de type M2 (x 1,4) (**Figure 51**).



**Figure 51 : L'absence de Fzd7 induit une augmentation du nombre de macrophages MMR<sup>+</sup> et une angiogenèse accrue dans la zone d'inflammation induite par le SDS.** Une irritation cutanée est induite sur le dos de souris Fzd7WT et Fzd7KO par application quotidienne de SDS pendant 5 jours. L'analyse de l'angiogenèse et de la population de macrophages M2 dans les peaux traitées au SDS est effectuée par immuno-marquages. **(A)** Coupes d'échantillons de peaux, traitées au SDS, de souris Fzd7WT et Fzd7KO après immuno-marquages. Les vaisseaux et les macrophages M2 sont marqués respectivement par les anticorps anti-CD31 (marron) et anti-MMR (bleu). **(B)** Représentation graphique des quantifications des vaisseaux et des macrophages MMR<sup>+</sup> faites à partir des coupes histologiques après immuno-marquages. Le pourcentage de zone marquée dans la peau des souris Fzd7WT traitées au SDS est pris comme référence (=1). Expérience réalisée sur 5 souris Fzd7WT et 5 souris Fzd7KO.

L'analyse par quantification, via Image J, du pourcentage de zones marquées permet une analyse rapide et systématique ainsi qu'une mesure sur la totalité des coupes. Cependant

pour s'assurer que les différences observées ne sont pas dues simplement à une dilatation des vaisseaux ou à une différence d'intensité du marquage, un certain nombre de coupes ont été ré-analysées, à plus fort grossissement, en dénombrant les vaisseaux. Il a été fait de même après marquage avec l'anticorps anti-MMR (**Figure 52**). Les résultats ont été ainsi confirmés, validant la technique de quantification utilisée.

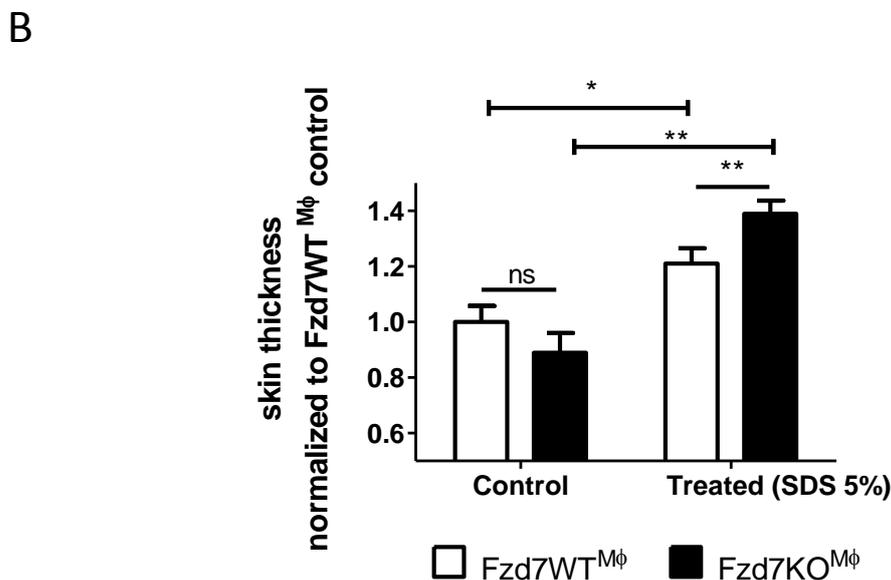
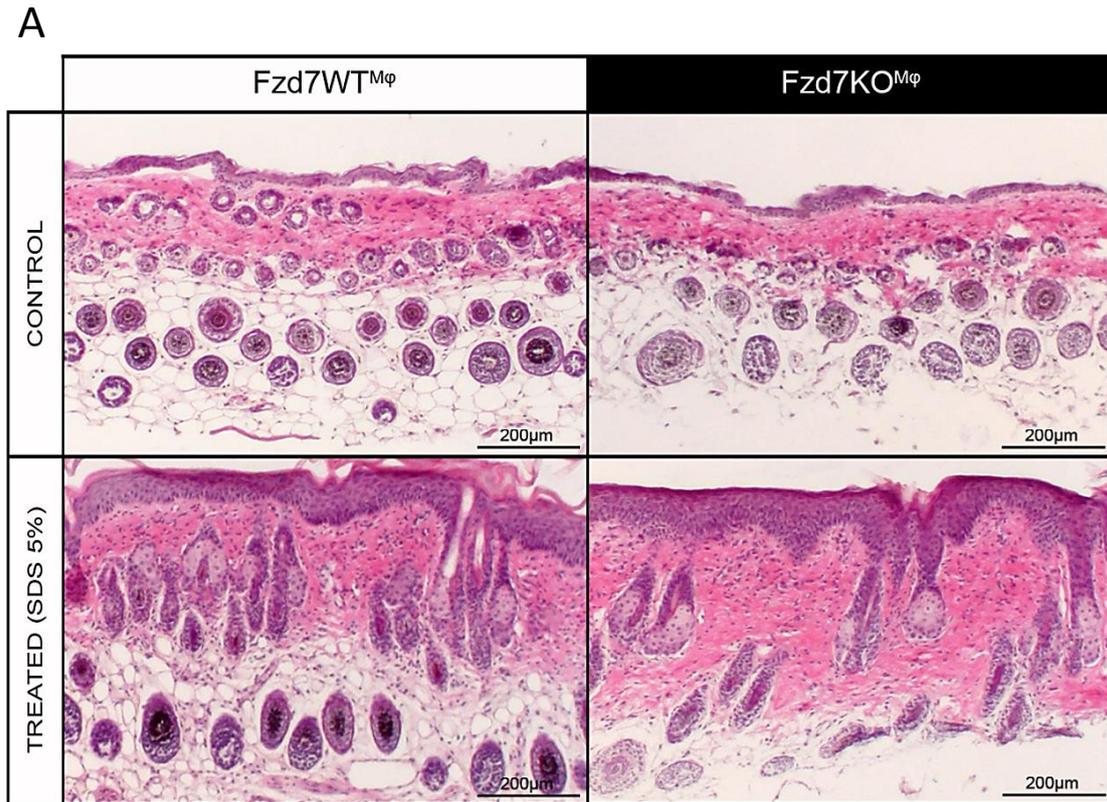


**Figure 52 : Confirmation par comptage du nombre de cellules CD31<sup>+</sup> et MMR<sup>+</sup> de la technique de quantification de l'angiogenèse et des populations de macrophages par mesure du pourcentage de zones marquées.** Décompte manuel du nombre de vaisseaux CD31<sup>+</sup> et de macrophages MMR<sup>+</sup> réalisées sur plusieurs coupes de peaux de souris Fzd7WT et Fzd7KO, traitées au SDS, marquées par immuno-fluorescence.

### iii. Résultats chez les souris Fzd7KO<sup>M $\phi$</sup>

Nous avons réalisé la même expérience avec cette fois les souris Fzd7KO<sup>M $\phi$</sup> , délétées de *frizzled 7* dans les macrophages.

Les marquages à l'Hémalun-Eosine effectués sur les coupes des peaux contrôles et des peaux traitées ont confirmé l'induction d'un œdème par le SDS. Tout comme chez les souris Fzd7KO, l'œdème est augmenté chez les souris Fzd7KO<sup>M $\phi$</sup>  comparé aux souris contrôles. En effet, les souris Fzd7KO<sup>M $\phi$</sup>  traitées au SDS ont une peau 1,3 fois plus épaisse que les souris Fzd7WT<sup>M $\phi$</sup>  ayant subi le même traitement. (**Figure 53**).



**Figure 53: L'absence d'expression de *Fzd7* par les macrophages augmente la réponse inflammatoire induite par le SDS.** Une irritation cutanée est induite sur le dos de souris Fzd7WT<sup>Mφ</sup> et Fzd7KO<sup>Mφ</sup> par application quotidienne de SDS pendant 5 jours. La réponse inflammatoire provoquée est analysée par mesure de l'épaisseur de la peau (derme + épiderme). Des souris non traitées servent de contrôles. **(A)** Coupes d'échantillons de peaux, contrôles et traitées au SDS, de souris Fzd7WT<sup>Mφ</sup> et Fzd7KO<sup>Mφ</sup> après coloration Hémalun-Eosine. **(B)** Représentation graphique de l'épaisseur de la peau mesurée à partir des coupes colorées à l'Hémalun-Eosine. L'épaisseur moyenne de la peau non traitée des souris Fzd7WT est prise comme référence (=1). 9 souris Fzd7WT<sup>Mφ</sup> et 7 souris Fzd7KO<sup>Mφ</sup> ont été traitées au SDS. 3 souris Fzd7WT<sup>Mφ</sup> et 3 souris Fzd7KO<sup>Mφ</sup> non traitées ont servi de contrôles.

Le recrutement de macrophages a été observé par marquage avec l'anticorps anti-CD68. CD68, aussi appelé macrosialine, est une glycoprotéine exprimée par les macrophages et impliquée entre autre dans les interactions cellules-cellules et cellules-pathogènes. C'est un marqueur de macrophages communément utilisé (Smith et al. 1999, Patel et al. 2013). On observe bien un recrutement de macrophages dans la peau après cinq jours de traitement au SDS. 8 à 9 fois plus de macrophages sont présents au niveau des peaux des souris traitées au SDS, chez les souris Fzd7WT<sup>M $\phi$</sup>  et Fzd7KO<sup>M $\phi$</sup> , que dans celles des souris non traitées (**Figure 54**). Ceci confirme l'implication de ces cellules dans l'inflammation cutanée provoquée par le détergent et nous conforte dans l'utilisation de ce modèle pour notre étude centrée sur les macrophages. La comparaison des peaux traitées des souris Fzd7WT<sup>M $\phi$</sup>  et Fzd7KO<sup>M $\phi$</sup>  amène à la conclusion que le nombre global de macrophages est identique entre les deux groupes (**Figure 54**). L'absence d'expression de *frizzled 7* par les macrophages ne perturbe pas le recrutement des macrophages dans la zone d'inflammation.

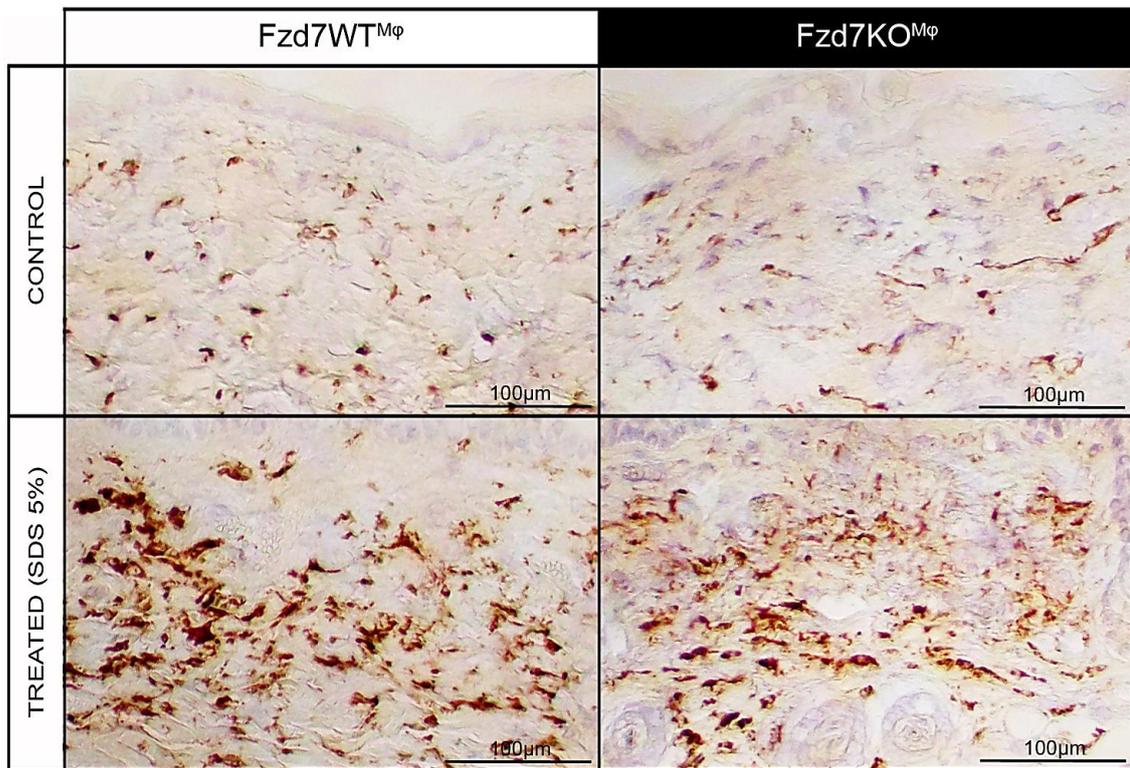
En revanche, le marquage anti-MMR montre une augmentation (x1,7) de la population de macrophages M2 chez les souris Fzd7KO<sup>M $\phi$</sup>  comparées aux souris contrôles (**Figure 55**).

En parallèle, le marquage des vaisseaux par l'anticorps anti-CD31 révèle une angiogenèse 1,6 fois plus importante en absence d'expression de *frizzled7* par les macrophages (**Figure 55**).

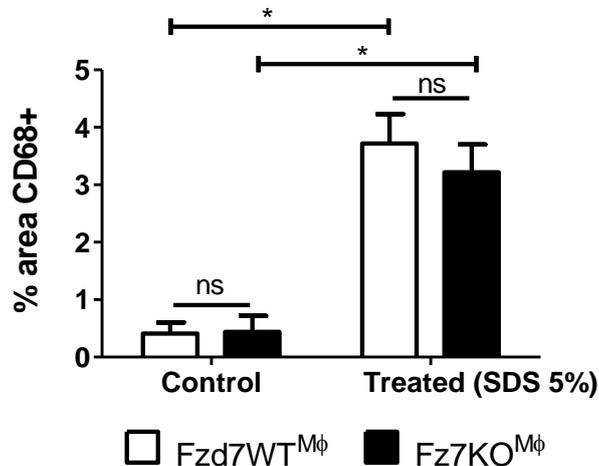
Nous retrouvons là les mêmes résultats phénotypiques que chez la lignée de souris Fzd7KO. Le phénotype observé dans cette lignée Fzd7KO paraît en partie, être lié à l'absence de Frizzled 7 dans les macrophages.

L'expression du récepteur Frizzled 7 par les macrophages semble jouer un rôle dans la régulation de l'angiogenèse en modulant le phénotype des macrophages dans ce modèle d'irritation cutanée.

A

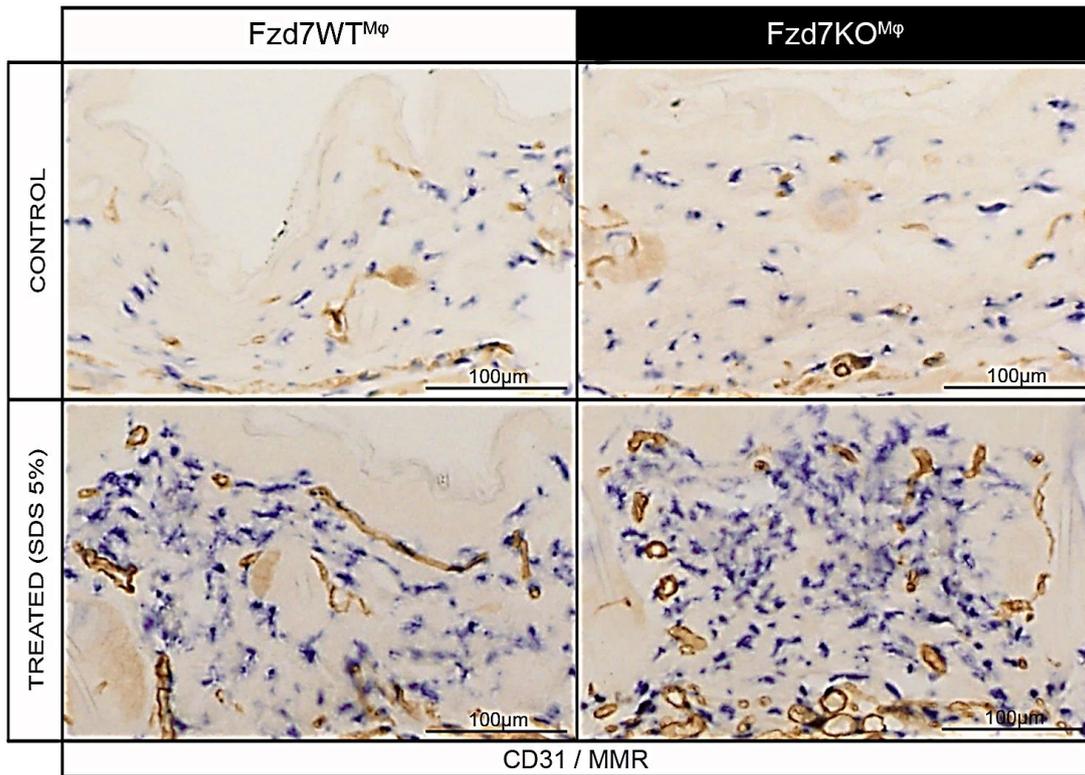


B

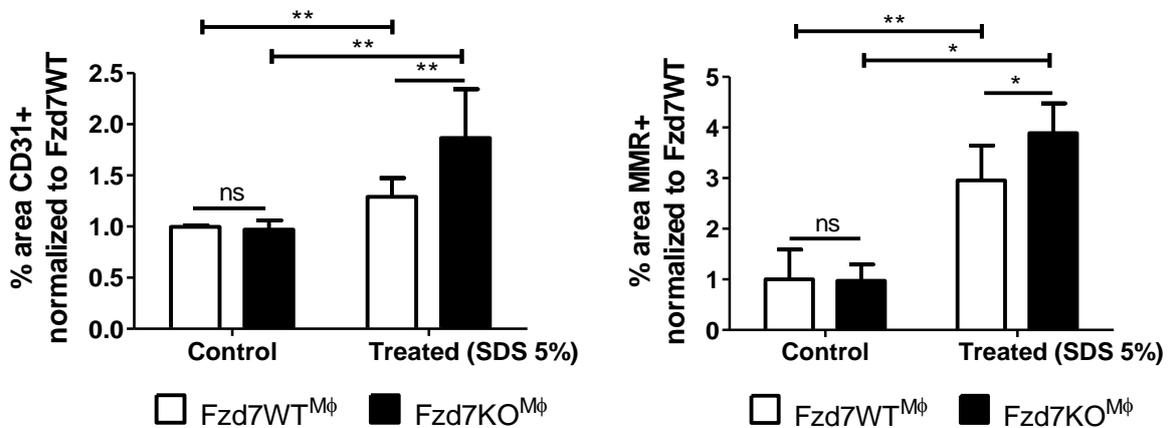


**Figure 54 : L'absence d'expression de *Fzd7* par les macrophages n'a pas d'influence sur le recrutement de macrophages dans la zone d'inflammation induite par le SDS.** Une irritation cutanée est induite sur le dos de souris Fzd7WT<sup>Mφ</sup> et Fzd7KO<sup>Mφ</sup> par application quotidienne de SDS pendant 5 jours. La présence de macrophages dans les peaux traitées au SDS est mesurée par immuno-marquages. Des souris non traitées servent de contrôles. **(A)** Coupes d'échantillons de peaux, contrôles ou traitées au SDS, de souris Fzd7WT<sup>Mφ</sup> et Fzd7KO<sup>Mφ</sup> après immuno-marquages. Les macrophages sont marqués par l'anticorps anti-CD68 (marron). **(B)** Représentation graphique de la quantification des macrophages CD68<sup>+</sup> faites à partir des coupes immuno-marquées. Le pourcentage de zones CD68<sup>+</sup> dans la peau des souris Fzd7WT non traitées au SDS est pris comme référence (=1). 9 souris Fzd7WT<sup>Mφ</sup> et 7 souris Fzd7KO<sup>Mφ</sup> ont été traitées au SDS. 3 souris Fzd7WT<sup>Mφ</sup> et 3 souris Fzd7KO<sup>Mφ</sup> non traitées ont servi de contrôles.

A



B

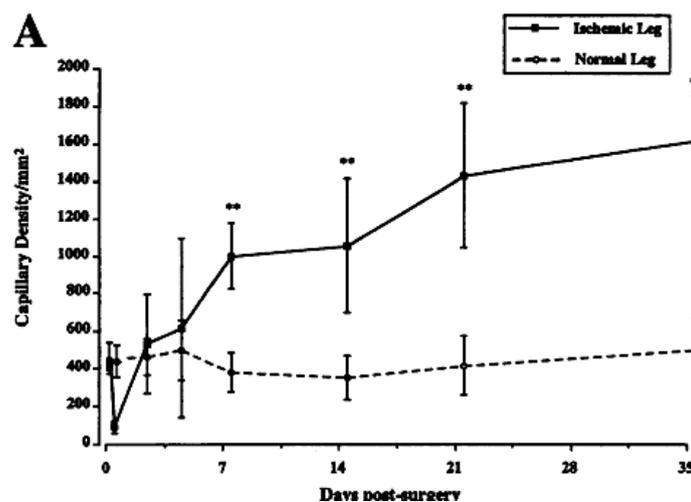


**Figure 55 : L'absence d'expression de *Fzd7* par les macrophages induit une présence de macrophages MMR<sup>+</sup> et une angiogenèse accrues dans la zone d'inflammation induite par le SDS.** Une irritation cutanée est induite sur le dos de souris Fzd7WT<sup>Mφ</sup> et Fzd7KO<sup>Mφ</sup> par application quotidienne de SDS pendant 5 jours. La présence de macrophages dans les peaux traitées au SDS est mesurée par immuno-marquages. Des souris non traitées servent de contrôles. **(A)** Coupes d'échantillons de peaux, contrôles ou traitées au SDS, de souris Fzd7WT<sup>Mφ</sup> et Fzd7KO<sup>Mφ</sup> après immuno-marquages. Les vaisseaux et les macrophages M2 sont marqués respectivement par les anticorps anti-CD31 (marron) et anti-MMR (bleu). **(B)** Représentation graphique des quantifications des vaisseaux et des macrophages MMR<sup>+</sup> faites à partir des coupes immuno-marquées. Le pourcentage de zones marquées dans la peau des souris Fzd7WT non traitées au SDS est pris comme référence (=1). 9 souris Fzd7WT<sup>Mφ</sup> et 7 souris Fzd7KO<sup>Mφ</sup> ont été traitées au SDS. 3 souris Fzd7WT<sup>Mφ</sup> et 3 souris Fzd7KO<sup>Mφ</sup> non traitées ont servi de contrôles.

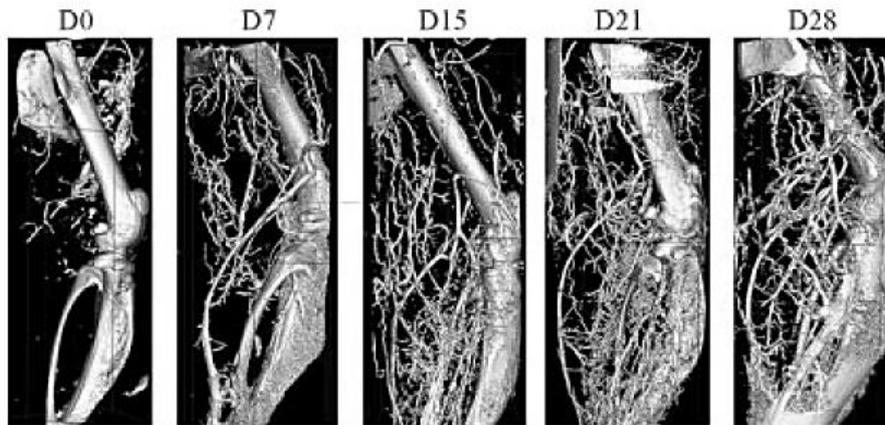
## C. Ischémie du membre inférieur

### i. Présentation du modèle

Le modèle d'ischémie du membre inférieur est utilisé pour mimer les maladies artérielles périphériques. La technique, développée par Couffinhal et al., consiste à ligaturer et exciser l'artère fémorale (Couffinhal et al. 1998). Cette intervention provoque la nécrose des muscles de la patte situés en aval de la ligature. La zone nécrosée se forme au centre du muscle et est entourée d'une zone de tissu viable. La réparation musculaire qui s'en suit nécessite une forte angiogenèse. La mesure, par laser Doppler, du flux sanguin sur 35 jours après l'induction de l'ischémie montre une augmentation progressive de vascularisation dans la patte. Après une réduction initiale très forte, une récupération modeste est observée à sept jours. A 14 jours le flux est plus conséquent et entre 28 et 35 jours on observe un plateau. L'analyse de la densité de capillaires par immuno-marquage des vaisseaux (CD31) confirme la forte angiogenèse qui a lieu dans le muscle. A 35 jours la densité capillaire dans la patte ischémiée est quatre fois supérieure à celle de la patte non-ischémiée (**Figure 56**) (Couffinhal et al. 1998). La cinétique de formation des vaisseaux, de retour du flux sanguin et l'organisation 3D des néovaisseaux (par imagerie mCT) (**Figure 57**) furent également étudiées sur 28 jours par Oses et al. (Oses et al. 2009).



**Figure 56: Evaluation quantitative de la densité capillaire.** Quantification faite à partir de coupes de muscles marquées avec un anticorps anti-CD31. Source : (Couffinhal et al. 1998)



**Figure 57: Imagerie par mCT de la néovascularisation de la patte ischémie à 0, 7, 15, 21 et 28 jours après opération.** Source : (Oses et al. 2009)

La nécrose du muscle provoquée par l'ischémie induit une réaction inflammatoire. Comme décrit dans l'introduction cette réaction inflammatoire se divise en trois phases : inflammatoire, proliférative et de remodelage. Bien que variable on considère globalement que la phase d'inflammation est limitée aux premiers jours après la blessure. La phase proliférative débute seulement quelques jours après. La prolifération cellulaire est culminante à cinq jours, puis diminue à jusqu'au dixième ou douzième jour. La courbe de prolifération est très similaire à celle du recrutement des macrophages dans le muscle ischémié. Enfin la phase de remodelage tissulaire débute lorsque la phase de prolifération s'estompe. A 21 jours, le muscle chez la souris est réparé.

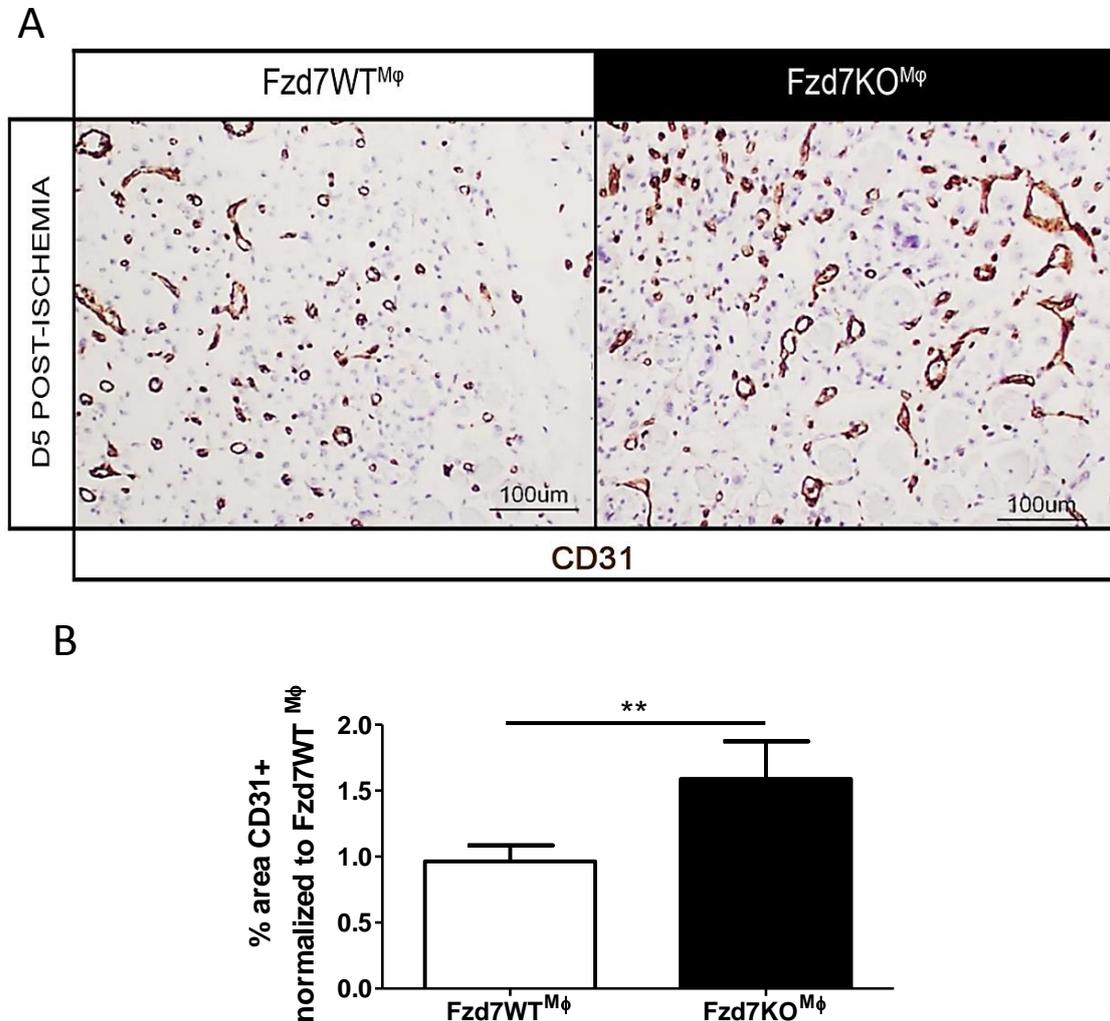
Afin d'étudier le rôle sur l'angiogenèse d'une absence de Fzd7 dans les macrophages, nous avons décidé de faire nos analyses à cinq jours (phase proliférative) et dix jours (phase de remodelage) post-opération, chez les souris mutantes.

## ii. Résultats à cinq jours post-ischémie

Cinq jours après résection de l'artère fémorale les souris sont euthanasiées. Le muscle tibial antérieur de la patte ischémiée est prélevé, fixé et inclus dans de la paraffine.

L'angiogenèse induite en réponse à l'ischémie a été mesurée par marquage de coupes transversales de muscles ischémiés avec un anticorps anti-CD31. L'évaluation du niveau d'angiogenèse est faite par quantification du pourcentage de zones CD31<sup>+</sup> dans le muscle. Ainsi on a pu détecter dans les muscles de souris Fzd7KO<sup>Mφ</sup> une angiogenèse

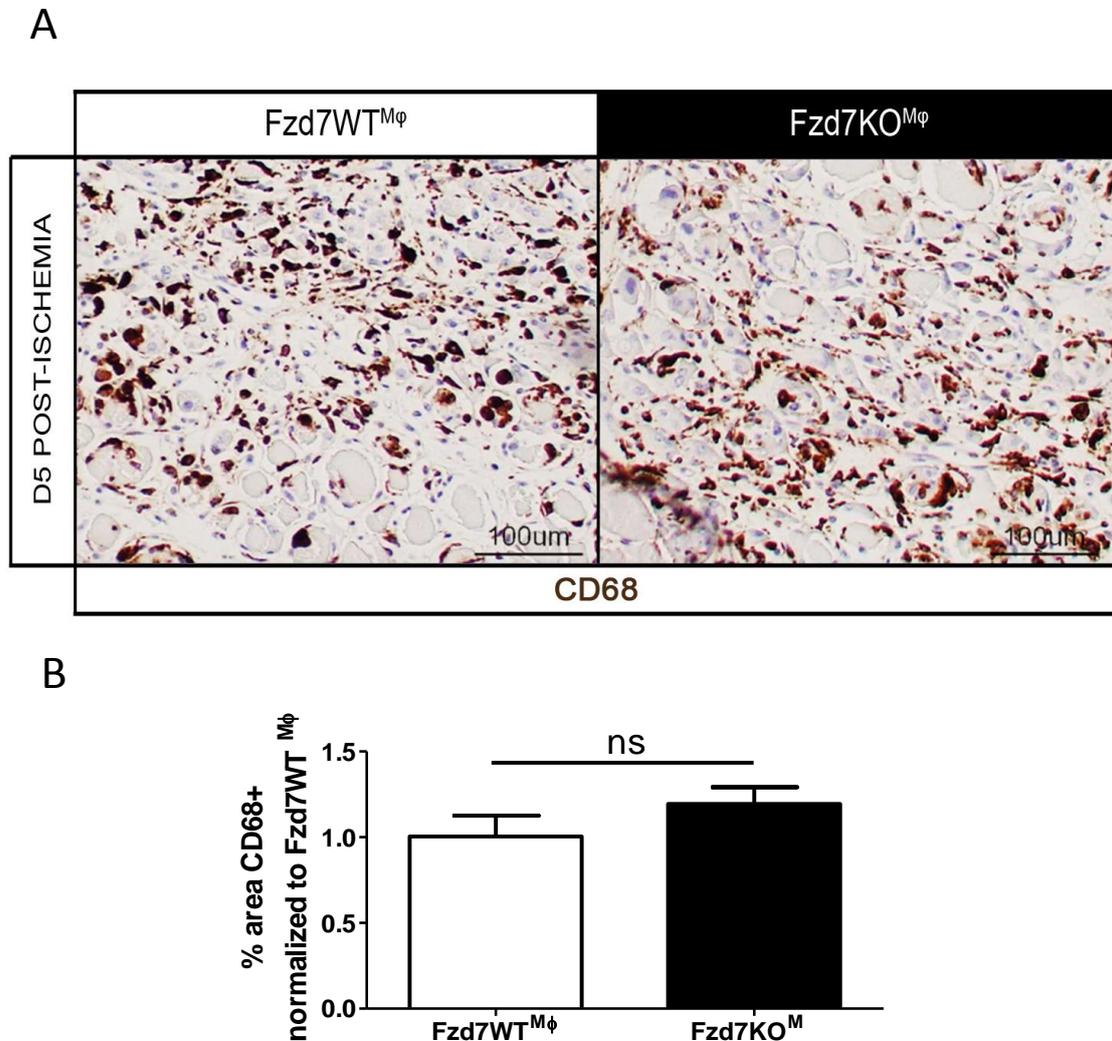
significativement 1,6 fois plus importante que dans les muscles ischémiés des souris contrôles (**Figure 58**).



**Figure 58: L'absence d'expression de *Fzd7* par les macrophages favorise l'angiogenèse dans le muscle à 5 jours post-ischémie.** Une ischémie unilatérale du membre inférieur est provoquée chez des souris Fzd7WT<sup>Mφ</sup> et Fzd7KO<sup>Mφ</sup> par ligature et résection de l'artère fémorale. L'angiogenèse dans le muscle tibial antérieur de la patte ischémiée est mesurée par immuno-marquages. **(A)** Coupes de muscles tibiaux cinq jours après la chirurgie. Les vaisseaux du muscle tibial sont marqués par l'anticorps anti-CD31 (marron). **(B)** Représentation graphique de la quantification des vaisseaux CD31<sup>+</sup> faite à partir des coupes immuno-marquées. Le pourcentage moyen de zones marquées CD31<sup>+</sup> dans les muscles tibiaux des pattes ischémiées des souris Fzd7WT<sup>Mφ</sup> est pris comme référence (=1). Expérience réalisée sur 11 souris Fzd7WT<sup>Mφ</sup> et 10 souris Fzd7KO<sup>Mφ</sup>.

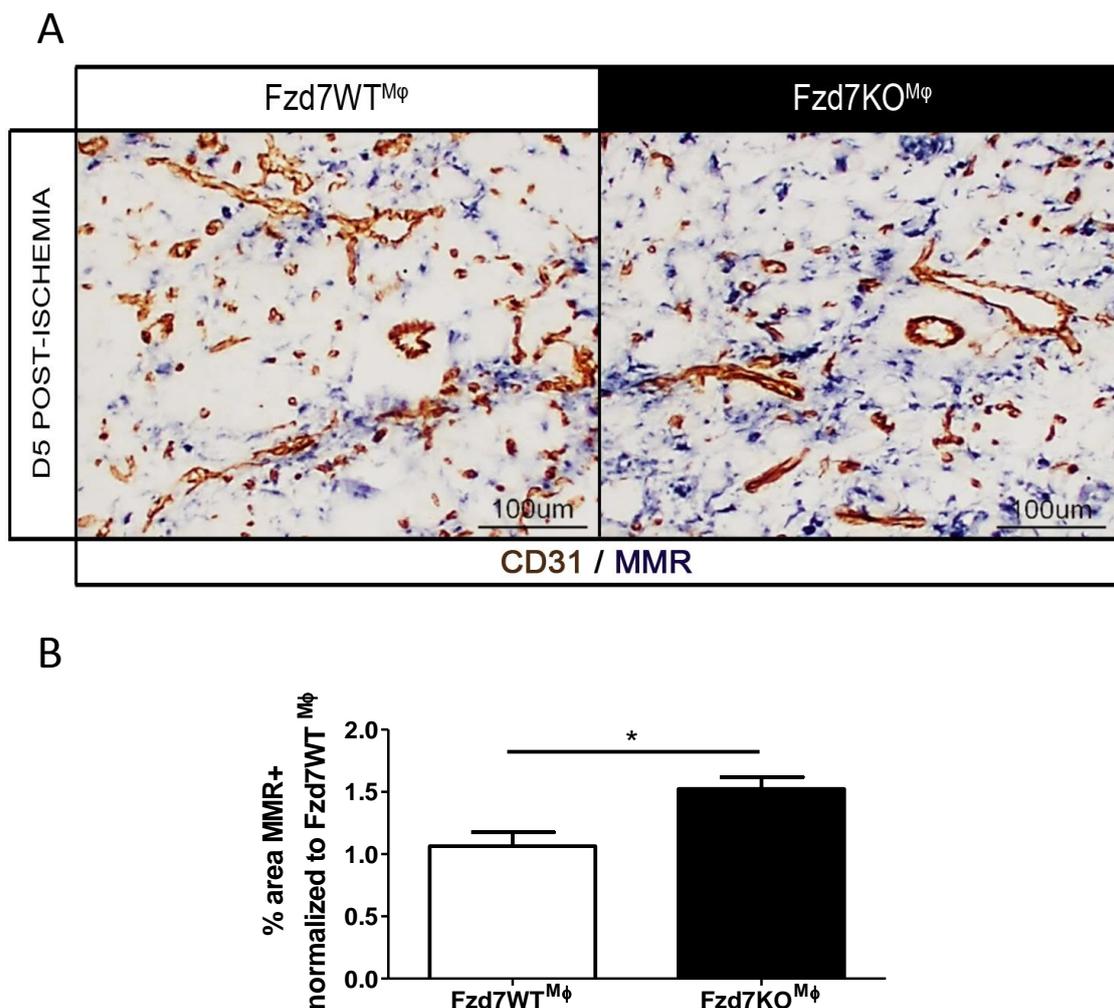
Pour visualiser l'infiltration de macrophages dans le muscle ischémié, un anticorps anti-CD68 est utilisé sur des coupes transversales de muscles. Les résultats sont analysés en mesurant le pourcentage de zone CD68<sup>+</sup> dans le muscle. Ainsi on a pu observer que, tout

comme dans le modèle d'irritation cutanée, le recrutement de macrophages dans le muscle est le même entre les souris contrôles et les souris  $Fzd7KO^{M\phi}$  à cinq jours post-ischémie (**Figure 59**).



**Figure 59: L'absence d'expression de *Fzd7* par les macrophages n'a pas d'effet sur le recrutement de macrophages dans le muscle à 5 jours post-ischémie.** Une ischémie unilatérale du membre inférieur est provoquée chez des souris  $Fzd7WT^{M\phi}$  et  $Fzd7KO^{M\phi}$  par ligature et résection de l'artère fémorale. La présence de macrophages dans le muscle tibial antérieur de la patte ischémisée est analysée par immuno-marquages. **(A)** Coupes de muscles tibiaux cinq jours après la chirurgie. Les macrophages du muscle tibial sont marqués par l'anticorps anti-CD68 (marron). **(B)** Représentation graphique de la quantification des macrophages CD68<sup>+</sup> faite à partir des coupes immuno-marquées. Le pourcentage moyen de zones marquées CD68<sup>+</sup> dans les muscles tibiaux des pattes ischémisées des souris  $Fzd7WT^{M\phi}$  est pris comme référence (=1). Expérience réalisée sur 11 souris  $Fzd7WT^{M\phi}$  et 10 souris  $Fzd7KO^{M\phi}$ .

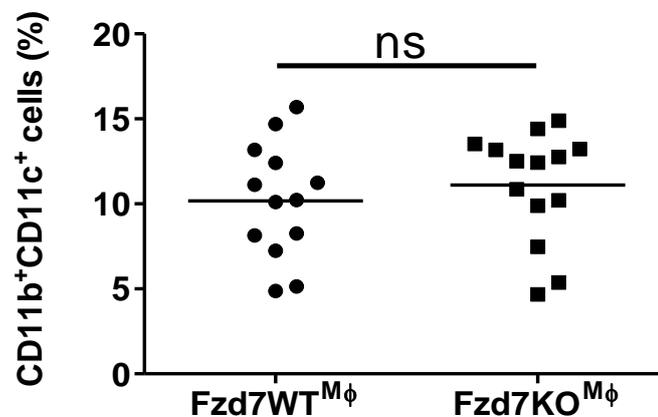
La différence d'angiogenèse ne pouvant s'expliquer par un excès de recrutement du nombre total de macrophages nous nous sommes intéressés à la population de macrophages M2, connue pour son rôle anti-inflammatoire et pro-angiogénique. Ainsi nous avons utilisés un anticorps anti-MMR. Cette expérience révèle une augmentation (x1,5) du nombre de macrophages M2 MMR<sup>+</sup> dans le muscle ischémié des souris Fzd7KO<sup>Mφ</sup> comparés aux muscles des souris Fzd7WT<sup>Mφ</sup> (**Figure 60**).



**Figure 60: L'augmentation d'angiogenèse dans le muscle des souris Fzd7KO<sup>Mφ</sup> à 5 jours post-ischémie s'accompagne d'une présence accrue de macrophages M2.** Une ischémie unilatérale du membre inférieur est provoquée chez des souris Fzd7WT<sup>Mφ</sup> et Fzd7KO<sup>Mφ</sup> par ligature et résection de l'artère fémorale. La présence de macrophages M2 dans le muscle tibial antérieur de la patte ischémiée est analysée par immuno-marquages. **(A)** Coupes de muscles tibiaux cinq jours après la chirurgie. Les vaisseaux et les macrophages M2 sont marqués respectivement par les anticorps anti-CD31 (marron) et anti-MMR (bleu). **(B)** Représentation graphique de la quantification des macrophages MMR<sup>+</sup> faite à partir des coupes immuno-marquées. Le pourcentage moyen de zones marquées MMR<sup>+</sup> dans les muscles tibiaux des pattes ischémiées des souris Fzd7WT<sup>Mφ</sup> est pris comme référence (=1). Expérience réalisée sur 11 souris Fzd7WT<sup>Mφ</sup> et 10 souris Fzd7KO<sup>Mφ</sup>.

En complément de ces données histologiques, nous avons utilisé la technique de cytométrie en flux pour distinguer les populations de macrophages M1 et M2 dans les muscles ischémiés. Les cellules mononuclées des muscles ischémiés ont été récupérées après digestion des muscles et séparation des cellules sur gradient de ficoll. La population totale de macrophages est détectée grâce aux marqueurs CD11b et CD11c. CD11c est une glycoprotéine exprimée principalement par les cellules de la lignée myéloïde et CD11b par les macrophages et les cellules dendritiques. La pertinence de l'utilisation de ce double marquage pour la détection des macrophages a été confirmée par la réalisation d'un triple marquage avec l'anticorps anti-F4.80. F4.80 est une protéine transmembranaire exprimé à la surface des macrophages. Les résultats de ce triple marquage montrent que les cellules CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> sont également F4.80<sup>+</sup>.

L'analyse de la population de cellules CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> confirme les données histologiques obtenues avec le marquage CD68. Il n'y a pas de différence de recrutement de macrophages dans les muscles ischémiés des souris Fzd7KO<sup>Mφ</sup> et Fzd7WT<sup>Mφ</sup> (**Figure 61**).

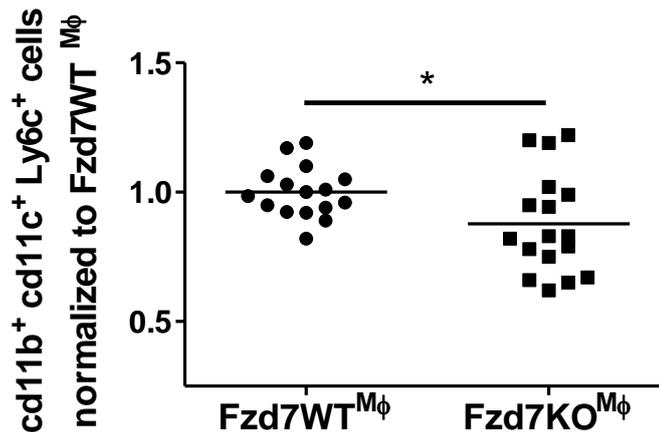


**Figure 61: L'absence d'expression de *Fzd7* par les macrophages n'a pas d'effet sur le pourcentage de macrophages présents dans le muscle à 5 jours post-ischémie.** Une ischémie unilatérale du membre inférieur est provoquée chez des souris Fzd7WT<sup>Mφ</sup> et Fzd7KO<sup>Mφ</sup> par ligature et résection de l'artère fémorale. Le pourcentage de cellules CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> présentes dans le muscle tibial des pattes ischémiées est mesuré par cytométrie en flux. Un double marquage avec les anticorps anti-CD11b et anti-CD11c est réalisé.

Egalement par cytométrie en flux nous avons mesuré le pourcentage de macrophages M1 parmi la population de cellules CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup>. Dans la littérature une différence d'expression du marqueur Ly6c entre les monocytes/macrophages M1 et M2 est

couramment utilisée pour distinguer ces deux populations (Yan et al. 2013). Les macrophages M1 expriment fortement ce marqueur contrairement aux macrophages M2.

Le résultat du triple marquage CD11b, CD11c, Ly6c révèle une présence de macrophages M1 plus faible dans les muscles ischémiés des souris Fzd7KO<sup>Mφ</sup> que dans ceux des Fzd7WT<sup>Mφ</sup> (Figure 62).



**Figure 62: Le pourcentage de macrophages M1 parmi les macrophages présents dans le muscle à 5 jours post-ischémie est plus faible chez les souris Fzd7KO<sup>Mφ</sup>.** Une ischémie unilatérale du membre inférieur est provoquée chez des souris Fzd7WT<sup>Mφ</sup> et Fzd7KO<sup>Mφ</sup> par ligature et résection de l'artère fémorale. Le pourcentage de macrophages M1 parmi la population de macrophages CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> est analysée par cytométrie en flux (triple marquage avec les anticorps anti-CD11b, anti-CD11c et anti-Ly6c). Le pourcentage moyen de cellules Ly6c<sup>+</sup> parmi les cellules CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> présentes dans le muscle tibial des souris Fzd7WT<sup>Mφ</sup> ischémiées est pris comme référence (=1).

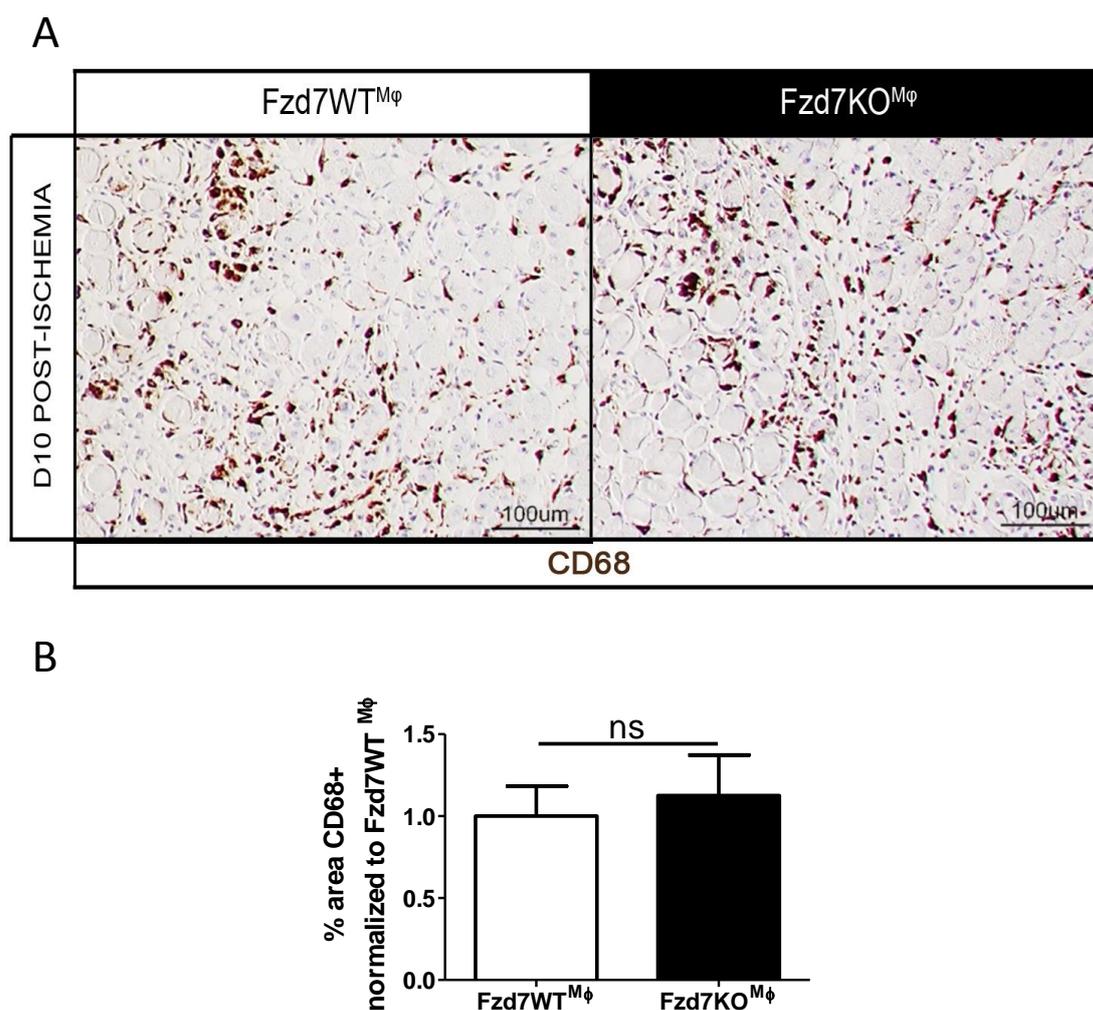
Nous retrouvons dans ce modèle d'ischémie de la patte, les résultats constatés dans le modèle d'irritation de la peau. Nous pouvons conclure de ces premières expériences *in vivo* que l'absence de Fzd7 au niveau des macrophages modifie l'activation des macrophages, favorisant leur profil M2 et entraînant une augmentation de l'angiogenèse.

Les doubles marquages, des vaisseaux (anti-CD31) et des macrophages MMR<sup>+</sup>, effectués sur les coupes de muscles ischémiés (Figure 60) et de peaux irritées (Figure 55), ne montrent pas une présence des macrophages M2 MMR<sup>+</sup> au contact direct des vaisseaux. Ceci laisse suggérer que si le nombre accru de macrophages MMR<sup>+</sup> est bien à l'origine de l'augmentation de l'angiogenèse cela ne passerait pas par une action directe mais via une sécrétion de facteurs angiogéniques.

### iii. Résultats à dix jours post-ischémie

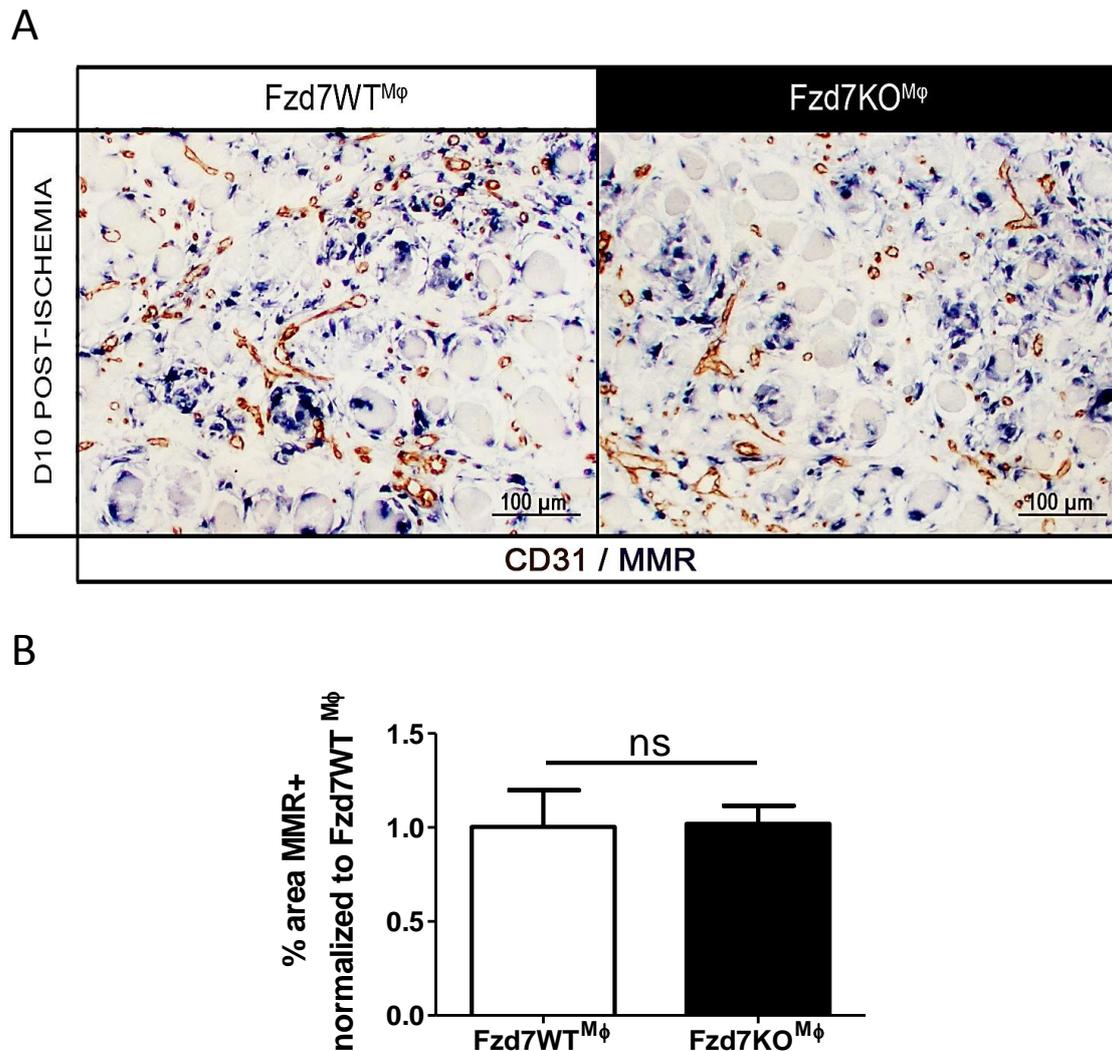
Les mêmes analyses histologiques ont été faites sur des muscles à dix jours post-ischémie quand l'inflammation est moins forte et la réparation tissulaire plus avancée.

Le nombre de macrophages dans le muscle chute entre cinq et dix jours post-ischémie (**Figure 66**). Cela confirme le passage à une phase moins inflammatoire. Tout comme à cinq jours, la population totale de macrophages est identique entre les souris contrôles et mutantes  $Fzd7KO^{M\phi}$  (**Figure 63**).



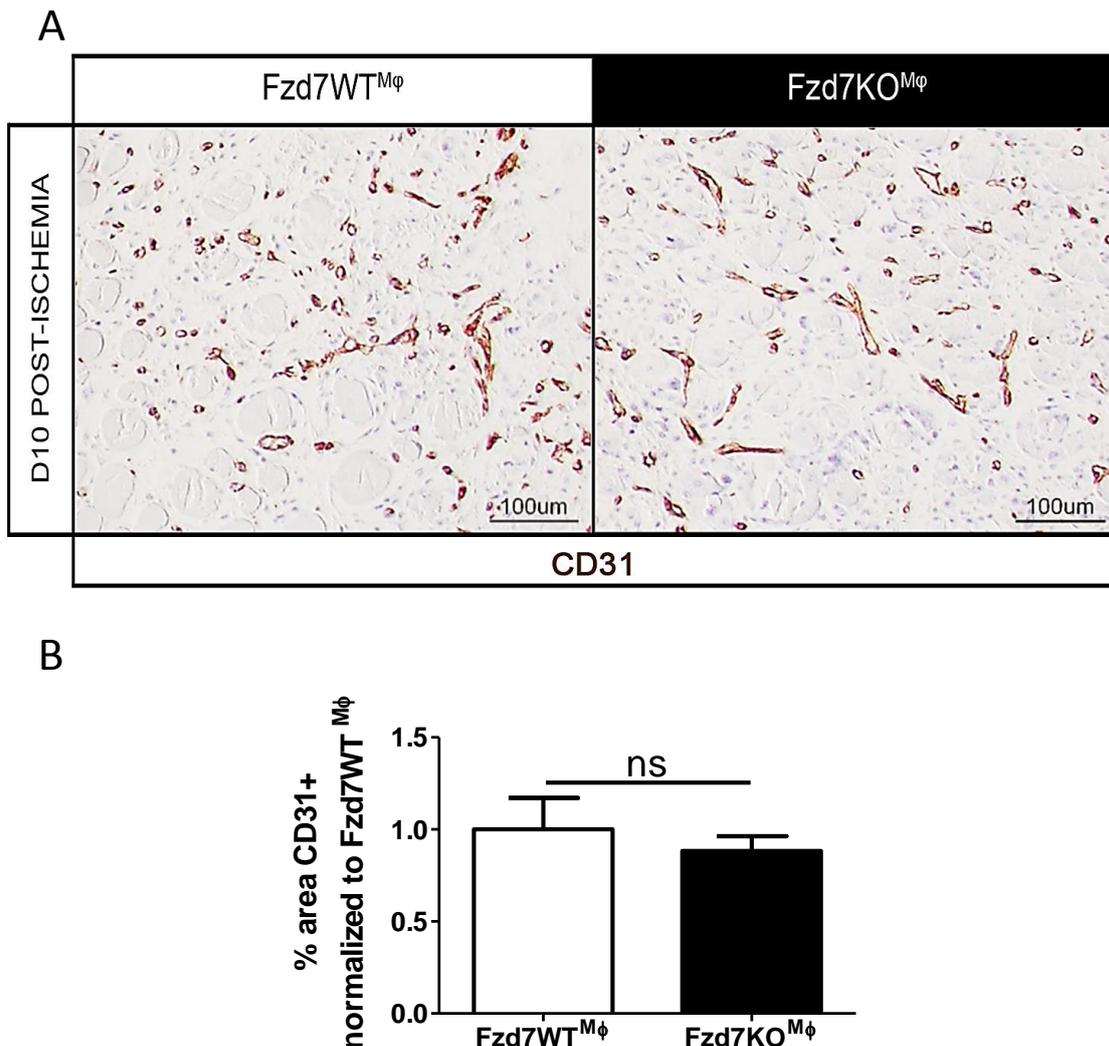
**Figure 63: L'absence d'expression de *Fzd7* par les macrophages n'a pas d'effet sur le recrutement de macrophages dans le muscle à 10 jours post-ischémie.** Une ischémie unilatérale du membre inférieur est provoquée chez des souris  $Fzd7WT^{M\phi}$  et  $Fzd7KO^{M\phi}$  par ligature et résection de l'artère fémorale. La présence de macrophages dans le muscle tibial antérieur de la patte ischémisée est analysée par immuno-marquages. **(A)** Coupes de muscles tibiaux dix jours après la chirurgie. Les macrophages du muscle tibial sont marqués par l'anticorps anti-CD68 (marron). **(B)** Représentation graphique de la quantification des macrophages CD68<sup>+</sup> faite à partir des coupes immuno-marquées. Le pourcentage moyen de zones marquées CD68<sup>+</sup> dans les muscles tibiaux des pattes ischémisées des souris  $Fzd7WT^{M\phi}$  est pris comme référence (=1). Expérience réalisée sur 5 souris  $Fzd7WT^{M\phi}$  et 5 souris  $Fzd7KO^{M\phi}$ .

Le nombre de macrophages M2 MMR<sup>+</sup> reste en revanche constant dans le muscle des souris Fzd7KO<sup>Mφ</sup> entre cinq et dix jours post-ischémie (**Figure 66**). Contrairement aux observations faites à cinq jours, il n’y a pas de différence quantitative de macrophages M2 dans les muscles ischémiés des souris Fzd7WT<sup>Mφ</sup> et Fzd7KO<sup>Mφ</sup> (**Figure 64**).

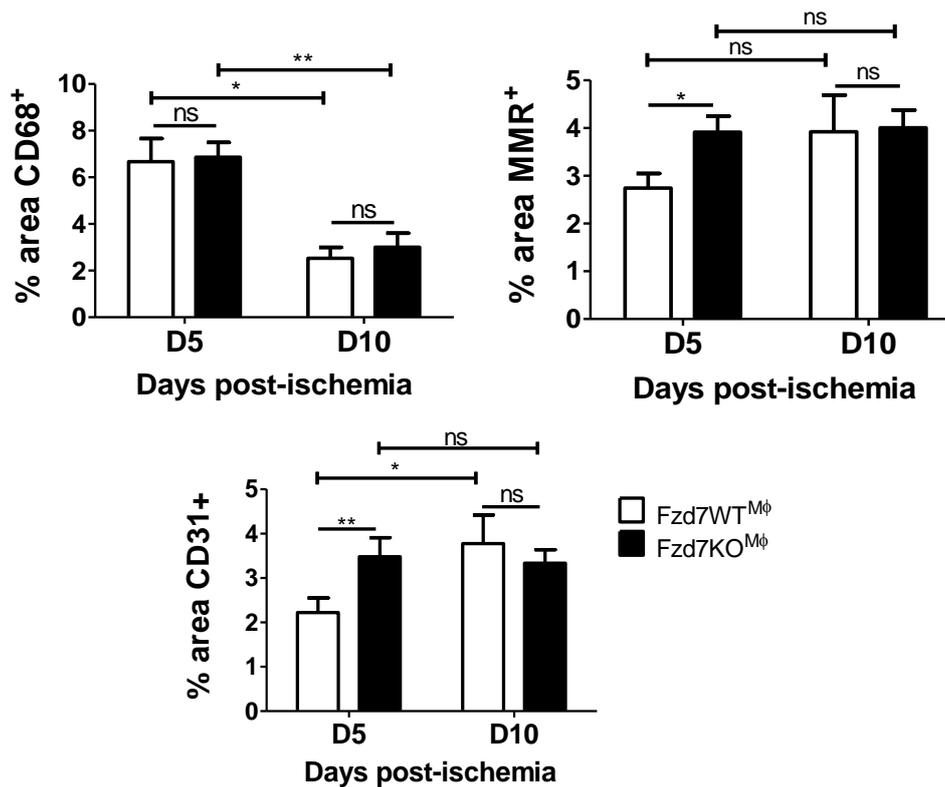


**Figure 64: Le nombre de macrophages M2 MMR<sup>+</sup> est identique dans le muscle des souris Fzd7WT<sup>Mφ</sup> et Fzd7KO<sup>Mφ</sup> à 10 jours post-ischémie.** Une ischémie unilatérale du membre inférieur est provoquée chez des souris Fzd7WT<sup>Mφ</sup> et Fzd7KO<sup>Mφ</sup> par ligature et résection de l’artère fémorale. La présence de macrophages M2 dans le muscle tibial antérieur de la patte ischémiée est analysée par immuno-marquages. **(A)** Coupes de muscles tibiaux dix jours après la chirurgie. Les vaisseaux et les macrophages M2 sont marqués respectivement par les anticorps anti-CD31 (marron) et anti-MMR (bleu). **(B)** Représentation graphique de la quantification des macrophages MMR<sup>+</sup> faite à partir des coupes immuno-marquées. Le pourcentage moyen de zones marquées MMR<sup>+</sup> dans les muscles tibiaux des pattes ischémiées des souris Fzd7WT<sup>Mφ</sup> est pris comme référence (=1). Expérience réalisée sur 5 souris Fzd7WT<sup>Mφ</sup> et 5 souris Fzd7KO<sup>Mφ</sup>

Concernant l'angiogenèse, on peut voir que le nombre de vaisseaux présents dans les muscles ischémiés des souris Fzd7KO<sup>Mφ</sup> n'a pas évolué entre cinq et dix jours post-ischémie. En revanche, chez les souris Fzd7WT<sup>Mφ</sup> le nombre de vaisseaux est 1,7 fois plus important à dix jours post-ischémie qu'à cinq jours (Figure 66). Le retard d'angiogenèse visible à cinq jours chez les Fzd7WT<sup>Mφ</sup> a été rattrapé (Figure 65).



**Figure 65: Le nombre de vaisseaux CD31<sup>+</sup> est identique dans le muscle des souris Fzd7WT<sup>Mφ</sup> et Fzd7KO<sup>Mφ</sup> à 10 jours post-ischémie.** Une ischémie unilatérale du membre inférieur est provoquée chez des souris Fzd7WT<sup>Mφ</sup> et Fzd7KO<sup>Mφ</sup> par ligature et résection de l'artère fémorale. L'angiogenèse dans le muscle tibial antérieur de la patte ischémiée est mesurée par immuno-marquages. **(A)** Coupes de muscles tibiaux dix jours après la chirurgie. Les vaisseaux du muscle tibial sont marqués par l'anticorps anti-CD31 (marron). **(B)** Représentation graphique de la quantification des vaisseaux CD31<sup>+</sup> faite à partir des coupes immuno-marquées. Le pourcentage moyen de zones marquées CD31<sup>+</sup> dans les muscles tibiaux des pattes ischémiées des souris Fzd7WT<sup>Mφ</sup> est pris comme référence (=1). Expérience réalisée sur 5 souris Fzd7WT<sup>Mφ</sup> et 5 souris Fzd7KO<sup>Mφ</sup>



**Figure 66: Evolution du pourcentage de macrophages, macrophages M2 et vaisseaux dans le muscle entre cinq et dix jours post-ischémie.** Une ischémie unilatérale du membre inférieur est provoquée chez des souris Fzd7WT<sup>Mφ</sup> et Fzd7KO<sup>Mφ</sup> par ligature et résection de l'artère fémorale. Les pourcentages de macrophages (CD68), macrophages M2 (MMR) et vaisseaux (CD31) présents dans les muscles cinq et dix jours après induction d'une ischémie sont mesurée par immuno-marquages.

L'absence de récepteur Frizzled 7 induirait-elle un changement de cinétique dans le passage des macrophages d'un profil inflammatoire à angiogénique, pouvant expliquer une angiogenèse plus précoce mais au final identique ?

#### D. Conclusions sur les modèles *in vivo* utilisés

Au vu des résultats obtenus dans les trois modèles d'inflammation testés, nous avons décidé de continuer notre étude sur le modèle de l'ischémie du membre inférieur.

Le modèle d'hypersensibilité retardé de contact ne convient pas à notre étude. Les différences de phénotype observées entre les souris Fzd7KO et leurs contrôles ne sont pas retrouvées chez les souris Fzd7KO<sup>Mφ</sup>. Des études complémentaires avec des lignées de souris portant une délétion de *frizzled7* spécifiquement dans d'autres tissus ou cellules pourraient permettre de déterminer quelles cellules sont impliquées et responsables de ce phénotype.

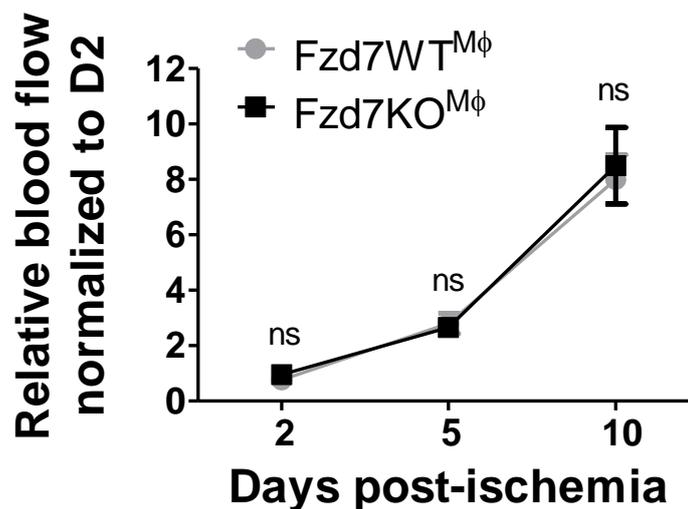
Les modèles d'irritation cutanée et d'ischémie du membre inférieur nous ont donné les premiers preuves d'une implication du récepteur Fzd7 dans la régulation de l'angiogenèse via probablement une régulation de l'activation des macrophages. Cependant l'angiogenèse qui se développe dans le modèle de l'ischémie est plus importante que celle observée dans l'irritation cutanée. Elle ne correspond pas seulement à une phase de réparation tissulaire, elle est également une réponse à l'hypoxie induite dans le muscle après l'ischémie. De plus, d'un point de vue technique l'analyse des muscles est beaucoup plus aisée et reproductible que celle des peaux.

### III. L'expression de Frizzled 7 par les macrophages n'influence pas la réparation du muscle après ischémie

Plusieurs expériences ont été réalisées pour déterminer si l'absence d'expression de Frizzled 7 par les macrophages entraînait des modifications dans la réparation du muscle.

#### A. Doppler

La restauration du flux sanguin dans la patte ischémisée peut être suivie par mesure au laser Doppler. La patte non ischémisée sert de contrôle. La mesure du flux a été faite à deux, cinq et dix jours après chirurgie. On observe un retour progressif du flux sanguin, aussi bien chez les souris  $Fzd7WT^{M\phi}$  que  $Fzd7KO^{M\phi}$  (Figure 67).

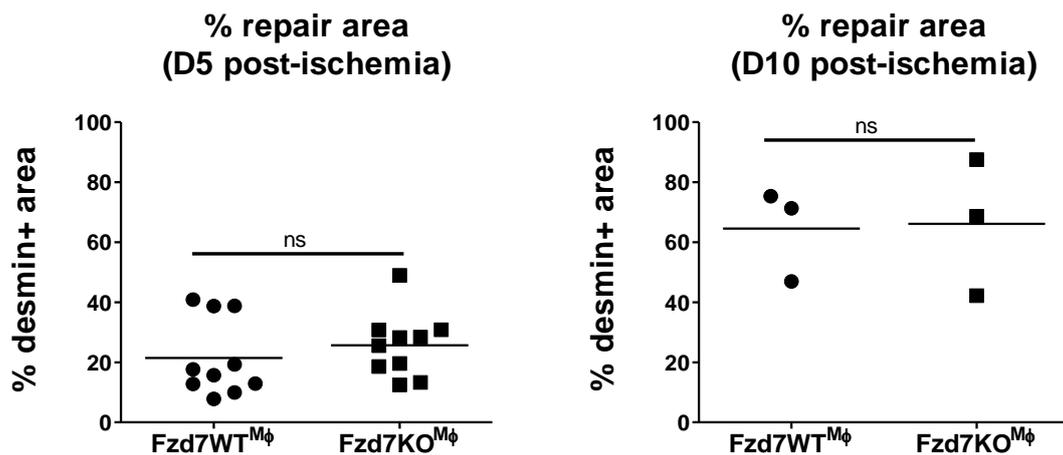


**Figure 67:** Le retour du flux sanguin dans les pattes ischémisées est identique entre les souris  $Fzd7WT^{M\phi}$  et  $Fzd7KO^{M\phi}$ . Une ischémie unilatérale du membre inférieur est provoquée chez des souris  $Fzd7WT^{M\phi}$  et  $Fzd7KO^{M\phi}$  par ligature et résection de l'artère fémorale. La perfusion sanguine de la patte est mesurée par laser doppler. Les mesures ont été faites sur un groupe de 8 souris  $Fzd7WT^{M\phi}$  et 8 souris  $Fzd7KO^{M\phi}$  à deux (J2), cinq (J5) et dix (J10) jours post-opération.

La technique du laser Doppler ne permet pas de visualiser la différence d'angiogenèse observée par histologie. Il est possible que cette technique ne soit pas assez sensible pour révéler une différence de perfusion. En effet le laser ne pénètre que sur quelques millimètres et mesure donc seulement la perfusion superficielle au niveau de la peau.

## B. Desmine

La réparation des fibres musculaires peut être suivie par marquage de la desmine sur des coupes transversales de muscle. La desmine est une protéine de filament intermédiaire exprimée dans les myocytes. Le pourcentage de zone réparée ou en réparation a été mesuré à cinq et dix jours après chirurgie. L'analyse a été faite sur plusieurs séries d'expériences. On observe une variabilité des niveaux de réparation entre les différentes expériences et entre les individus de même génotype lors d'une même expérience. La réparation progressive des muscles est visible entre cinq et dix jours post-ischémie : elle passe de 21% et 26%, à 65% et 66% respectivement chez les souris  $Fzd7WT^{M\phi}$  et  $Fzd7KO^{M\phi}$ . En revanche aucune différence significative de réparation musculaire n'est observée entre les souris  $Fzd7WT^{M\phi}$  et  $Fzd7KO^{M\phi}$  au deux temps (**Figure 68**).

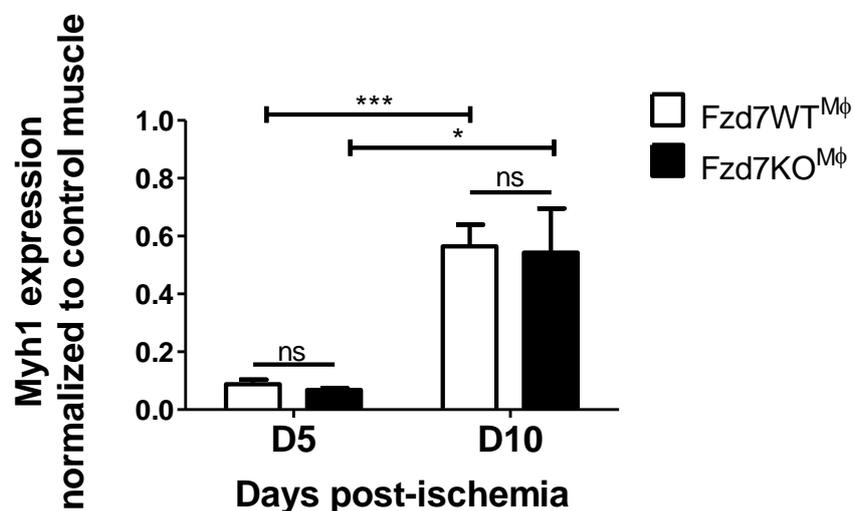


**Figure 68:** La réparation du muscle ischémié est identique entre les souris  $Fzd7WT^{M\phi}$  et  $Fzd7KO^{M\phi}$ . Une ischémie unilatérale du membre inférieur est provoquée chez des souris  $Fzd7WT^{M\phi}$  et  $Fzd7KO^{M\phi}$  par ligature et résection de l'artère fémorale. La réparation des fibres musculaires est mesurée à cinq et dix jours post-ischémie par immuno-marquage de la desmine sur des coupes transversales de muscles ischémié.

### C. MYH1

Les myosines sont des protéines impliquées dans la contraction musculaire. Il s'agit d'hexamères composés d'une paire de chaînes lourdes (MyHC ou MHC : Myosin Heavy chain) et de deux paires de chaînes légères (MLC : Myosin light chain). Il existe plusieurs isoformes de chaînes lourdes de myosine, déterminant la vitesse des myosines. Parmi ces isoformes on trouve des myosines lentes (MYH7), intermédiaires (MYH2), rapides (MYH1) et très rapides (MYH4).

Pour évaluer la régénération (myogenèse) des muscles ischémiés nous avons analysé l'expression de l'isoforme MYH1. Le niveau d'expression de ce gène est utilisé comme indicateur du nombre de myocytes dans le muscle. Des RT-qPCR ont été faites à partir de muscles ischémiés et contrôles, prélevés sur des souris Fzd7WT<sup>Mφ</sup> et Fzd7KO<sup>Mφ</sup> à cinq et dix jours post-opération. Le niveau d'expression de *Myh1* dans le muscle ischémié a été rapporté au niveau d'expression dans le muscle sain. Cette analyse nous montre une myogenèse importante dans les pattes ischémiées entre cinq et dix jours post-ischémie. Aucune différence de myogenèse n'est détectée entre les deux génotypes (**Figure 69**).



**Figure 69:** La régénération du muscle ischémié est identique entre les souris Fzd7WT<sup>Mφ</sup> et Fzd7KO<sup>Mφ</sup>. Une ischémie unilatérale du membre inférieur est provoquée chez des souris Fzd7WT<sup>Mφ</sup> et Fzd7KO<sup>Mφ</sup> par ligature et résection de l'artère fémorale. A cinq et dix jours les ARN des muscles ischémiés et contrôles sont extraits et l'expression de la myosine 1 (*Myh1*) est analysée par RT-qPCR. L'expression dans le muscle contrôle sert de référence (=1). L'analyse est réalisée sur 4 souris Fzd7WT<sup>Mφ</sup> et 4 Fzd7KO<sup>Mφ</sup>, pour le temps cinq jours et le temps dix-jours post-ischémie.

Ces résultats confirment ceux obtenus par quantification de la desmine. La détection du récepteur Frizzled 7 dans les macrophages, ne modifie pas la vitesse de réparation musculaire après ischémie.

#### IV. L'absence de Fzd7 dans les macrophages modifie leurs réponses aux signaux inflammatoires, *in vitro*

---

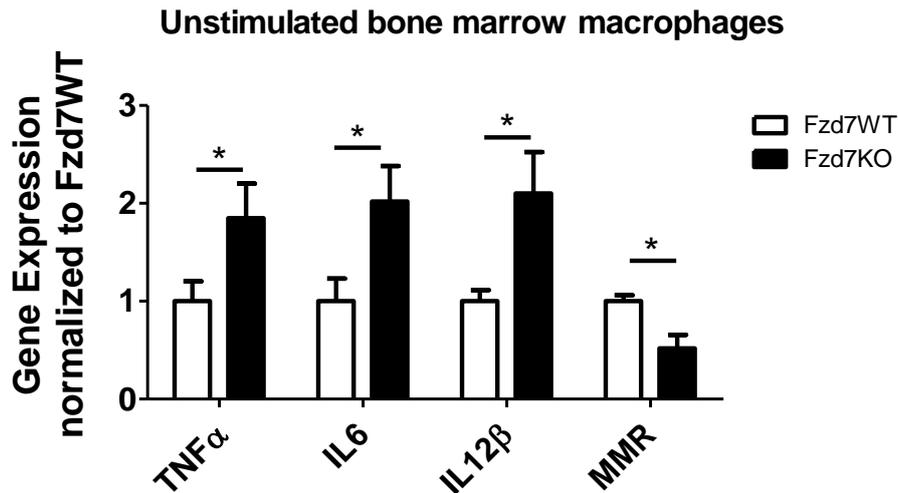
Les données obtenues *in vivo* nous laissent penser que le récepteur Frizzled 7 permet aux macrophages de réguler leur polarisation M1/M2. Pour tenter d'aller plus loin dans l'analyse de la fonction de ce récepteur nous avons donc décidé d'étudier *in vitro* la polarisation des macrophages. Nous avons travaillé avec des macrophages issus de la différenciation de moelle osseuse.

Nous avons récupéré la moelle osseuse de souris Fzd7WT et Fzd7KO. Les cellules de moelle osseuse ont été mises en culture pendant 7 jours avec 20ng/ml de M-CSF afin de les différencier en macrophages. Pendant cette période de différenciation les macrophages ont été cultivés dans un milieu RPMI contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF).

Afin de reproduire *in vitro* la stimulation inflammatoire, rencontrée par les macrophages dans les modèles *in vivo*, nous avons poussés les macrophages vers un profil M1. *In vitro*, ce phénotype est communément induit par l'ajout dans le milieu de culture de LPS et d'interféron gamma (Raes et al. 2002, Cho et al. 2014).

Ainsi dans un premier temps les macrophages ont été déprivés 6h dans du milieu RPMI contenant 1% de SVF et 0,25% de BSA afin de les mettre dans un état d'inactivation. Les macrophages ont ensuite été incubés dans un milieu RPMI 1%SVF 0,25%BSA seul (cellules non activées) ou complété avec 100ng/ml de LPS plus 50 ng/ml d'IFN $\gamma$  (cellules activées M1) pendant 24h. L'ARN des macrophages a ensuite été extrait et des RT-qPCR réalisées. L'expression de plusieurs marqueurs de macrophages M1 et M2 a été regardée.

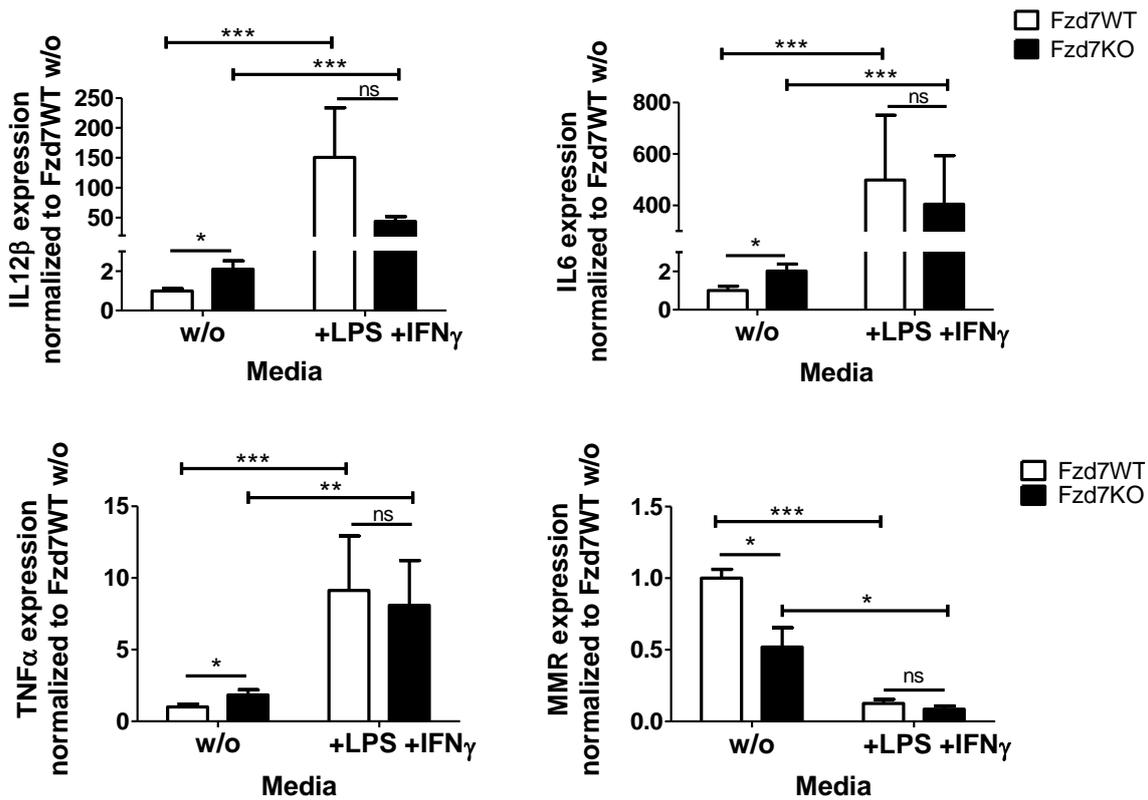
De façon inattendue nous observons des différences significatives d'expression de plusieurs marqueurs M1 et M2 entre les macrophages Fzd7WT et Fzd7KO dans la condition contrôle. En absence de Fzd7 les macrophages expriment environ deux fois plus les cytokines pro-inflammatoires TNF $\alpha$ , IL-6 et IL-12 $\beta$ . En parallèle ils expriment quasiment deux fois moins de MMR, marqueur de l'activation alternative des macrophages (**Figure 70**).



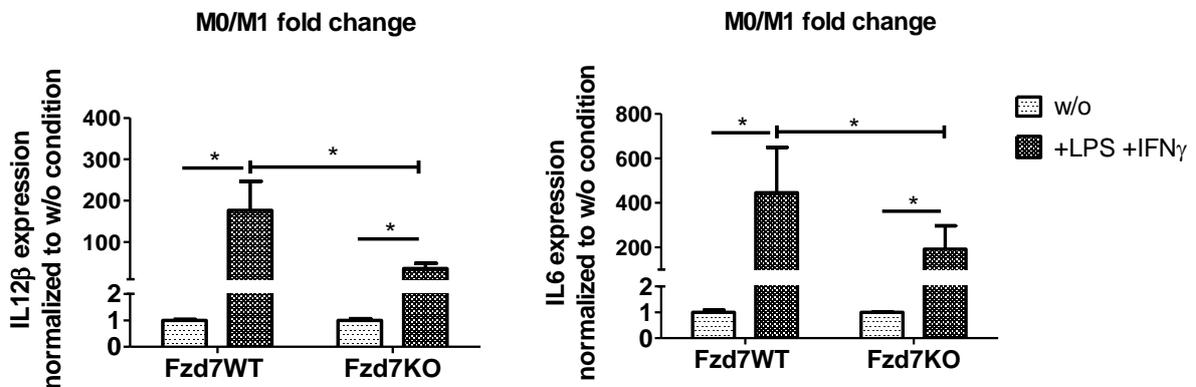
**Figure 70:** *In vitro*, les macrophages déficients en Fzd7 adoptent de façon basale un profil M1. Des macrophages différenciés *in vitro* à partir de moelle osseuse de souris Fzd7WT et Fzd7KO sont déprivés 6h dans un milieu pauvre en sérum. L'expression de plusieurs marqueurs de profil M1 (TNF $\alpha$ , IL-6, IL-12 $\beta$ ) et le marqueur de profil M2 (MMR) est analysée par RT-qPCR. 5 expériences indépendantes réalisées à chaque fois avec la moelle osseuse de 2 souris Fzd7WT et 2 Fzd7KO.

L'activation des macrophages en macrophages M1 est bien induite par la présence de LPS et d'IFN $\gamma$  avec une augmentation significative de l'expression de TNF $\alpha$ , IL-6 et IL-12  $\beta$  et une diminution de MMR. Les profils d'expression de ces marqueurs ne sont pas significativement différents dans la condition d'activation M1 entre les cellules WT et KO (**Figure 71A**). En revanche si l'on mesure la différence d'expression entre la condition M1 et la condition contrôle on remarque que l'augmentation d'expression d'IL-6 et IL-12 $\beta$  est plus faible chez les Fzd7KO (**Figure 71B**). Cela s'explique principalement par le niveau d'expression plus important dans la condition contrôle.

A

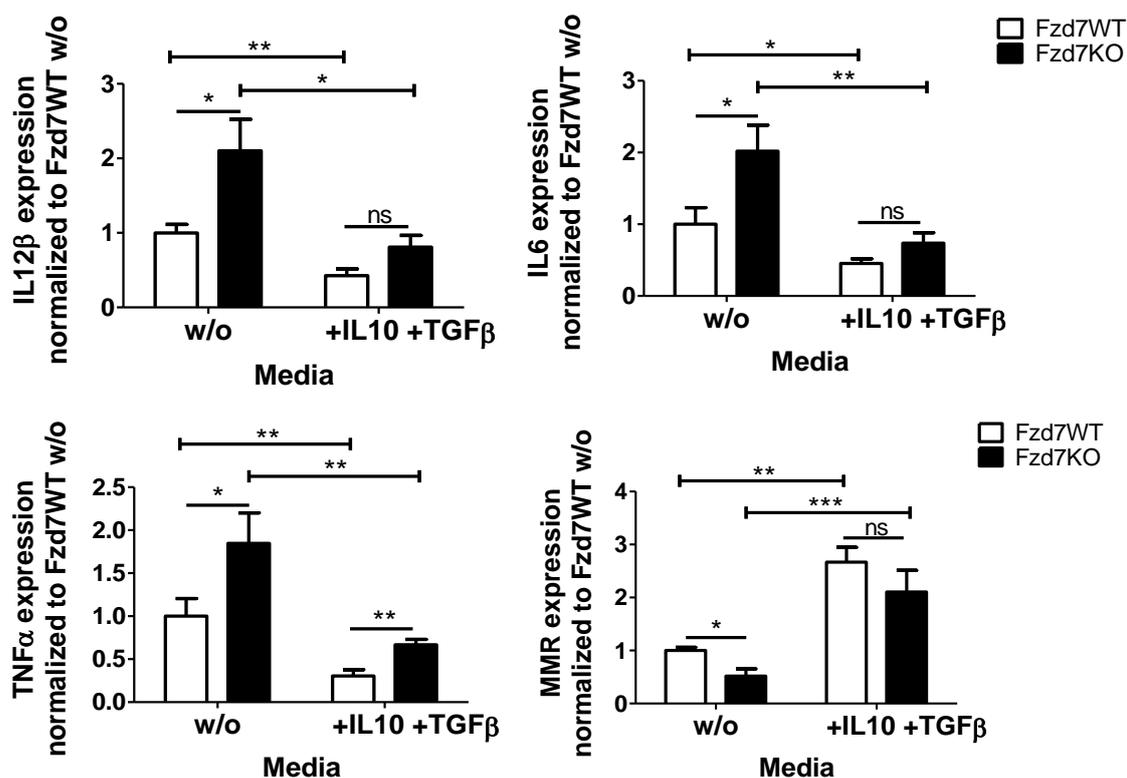


B



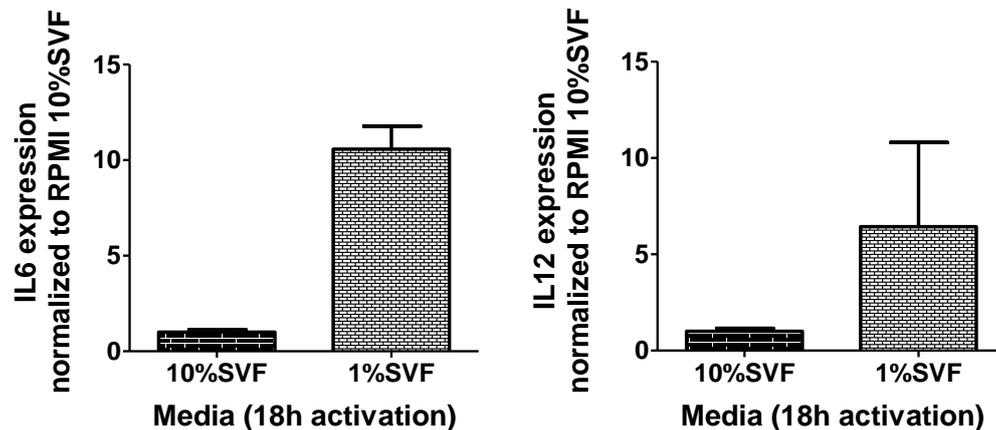
**Figure 71: (A) L'expression des marqueurs de profils M1 et M2 est identique entre les macrophages Fzd7WT et Fzd7KO après activation en profil M1.** Des macrophages sont différenciés *in vitro* à partir de moelle osseuse de souris Fzd7WT et Fzd7KO. Après 6h de déprivation dans un milieu pauvre en sérum les macrophages sont activés 24h par 100ng/ml de LPS et 50ng/ml d'IFN $\gamma$ . L'expression de plusieurs marqueurs de profil M1 (TNF $\alpha$ , IL-6, IL-12 $\beta$ ) et le marqueur de profil M2 (MMR) est analysée par RT-qPCR. **(A) L'expression moyenne de ces marqueurs dans les macrophages Fzd7WT en condition non activés (w/o) est pris comme référence (=1).** **(B) L'augmentation d'expression des marqueurs M1 (IL-6 et IL-12 $\beta$ ) en réponse à un stimuli pro-inflammatoire est moindre dans les macrophages déficients en Fzd7.** L'expression moyenne des marqueurs IL-6 et IL-12 $\beta$  dans les macrophages Fzd7WT et Fzd7KO en condition non activés (w/o) sont pris respectivement comme référence (=1). 5 expériences indépendantes ont été réalisées avec 2 souris WT et 2 KO par expérience (total : n=10 échantillons par génotype).

Nous avons également désiré étudier la capacité de désactivation des macrophages. Les macrophages, une fois différenciés, ont donc été incubés dans un milieu RPMI 1%SVF 0,25%BSA seul (cellules non activées) ou complété avec 10ng/ml de TGF $\beta$  plus 10 ng/ml d'IL-10 (cellules M2c) pendant 24h. Par RT-qPCR l'expression des marqueurs M1 et M2 fut analysée. Les résultats montrent bien une diminution d'expression des marqueurs inflammatoires IL-12 $\beta$ , IL-6 et TNF $\alpha$  (respectivement de 2,5, 2,2 et 2,5 fois dans les Fzd7WT). En parallèle l'expression du marqueur anti-inflammatoire MMR est presque triplé (2,7 fois chez le Fzd7WT). On observe que cette répression des marqueurs M1 et activation du marqueur M2 ont tendance à être plus faible chez les macrophages Fzd7KO. Ces résultats ne sont cependant pas significatifs à l'exception de ceux obtenus pour TNF $\alpha$  (**Figure 72**).



**Figure 72: Les macrophages Fzd7KO ont tendance à moins réagir aux signaux de désactivation que les Fzd7WT.** Des macrophages sont différenciés *in vitro* à partir de moelle osseuse de souris Fzd7WT et Fzd7KO. Après 6h de déprivation dans un milieu pauvre en sérum les macrophages sont activés 24h par 10ng/ml de TGF $\beta$  et 10ng/ml d'IL-10. L'expression de plusieurs marqueurs de profil M1 (TNF $\alpha$ , IL-6, IL-12 $\beta$ ) et le marqueur de profil M2 (MMR) est analysée par RT-qPCR. **(A)** L'expression moyenne de ces marqueurs dans les macrophages Fzd7WT en condition non activés (w/o) est pris comme référence (=1). 3 expériences indépendantes furent réalisées avec 6 souris Fzd7WT et 6 Fzd7KO.

La différence d'expression des facteurs pro-inflammatoires observée à l'état basal nous a amené à nous poser des questions sur notre condition « non activée ». En effet, lors de la déprivation des macrophages, avant activation, nous observons un changement de morphologie des macrophages. Nous avons donc comparé par qPCR, sur les macrophages RAW264.7, l'effet du milieu de culture (10% sérum) et du milieu de déprivation (1% sérum) sur l'expression des facteurs pro-inflammatoires. Ainsi nous avons observé une activation d'IL-6 et d'IL-12 $\beta$  induite par le milieu de déprivation contenant 1% de sérum (**Figure 73**). Le niveau d'activation induite par ce milieu n'est cependant pas comparable à celui produit par le LPS et l'IFN $\gamma$  (respectivement pour IL-6 et IL-12  $\beta$  : x10 vs x 450 et x6 vs x180). Il semblerait donc que les macrophages répondent à la déprivation par l'expression de facteurs pro-inflammatoires et que les macrophages Fzd7KO soient plus sensibles à ce stimulus.



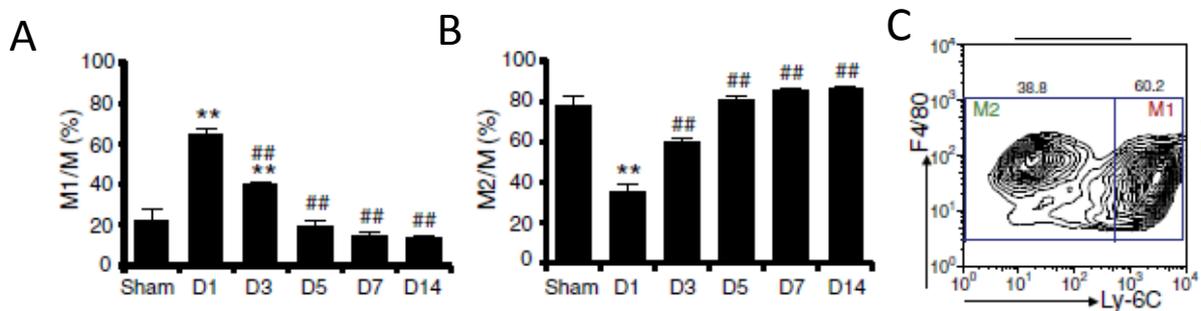
**Figure 73: Le milieu de déprivation utilisé active les macrophages.** Des RAW264.7 cultivés en milieu RPMI 10%SVF sont déprivés 6h dans un milieu RPMI 1%SVF 0,25%BSA puis mis en culture 24h dans un milieu RPMI 10%SVF ou RPMI 1%SVF 0,25%BSA. Les expressions des interleukines-6 et interleukines -12 $\beta$  sont analysées par qPCR.

## V. L'infarctus du myocarde : un modèle prometteur

Les données obtenues *in vitro* et *in vivo* nous ont montré l'implication du récepteur Fzd7 dans la polarisation des macrophages. Nous avons choisi de tester son rôle dans le modèle de l'infarctus du myocarde chez la souris. Dans ce modèle, tout comme dans celui de l'ischémie du membre inférieur, l'ischémie et la destruction des tissus induites par la ligature de l'artère provoque une forte réaction inflammatoire et une ischémie pathologique importante.

## A. Présentation du modèle

Le modèle d'infarctus du myocarde chez la souris fut développé par Yang et al. (Yang et al. 2002). L'infarctus est induit par ligature de l'artère interventriculaire antérieure. Cette opération entraîne une inflammation stérile caractérisée par le recrutement et l'activation de cellules immunitaires de l'immunité innée et adaptative. Ces cellules participent aux étapes de nettoyage des tissus morts, de réparation tissulaire et de remodelage qui suivent l'infarctus. Les trois phases de la réaction inflammatoire (inflammation, prolifération et remodelage), décrites dans l'introduction pour l'ischémie du membre inférieur, ont lieu dans le cœur après l'infarctus. Des recherches ont été faites sur la cinétique d'apparition des populations de cellules inflammatoires post-infarctus. Entre autres la présence au cours du temps des populations de macrophages M1 et M2 fut analysée (**Figure 74**) (Yan et al. 2013). Outre l'aspect inflammatoire, l'infarctus du myocarde provoque un remodelage ventriculaire, caractérisé par une dilatation de la cavité ventriculaire gauche et un amincissement de la paroi du ventricule gauche (Yang et al. 2002). La fibrose est un évènement prépondérant dans le remodelage du cœur après infarctus.

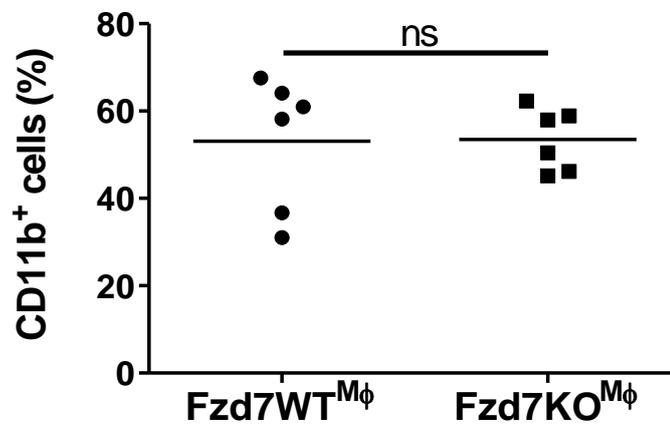


**Figure 74: Caractérisation des profils des macrophages dans le cœur au cours du temps post-infarctus. (A et B)** Pourcentage de M1 et M2 parmi la population totale de macrophages infiltrés dans le cœur à 1, 3, 5, 7 et 14 jours post-infarctus. **(C)** Représentation des analyses de cytométrie en flux effectuées sur des cellules co-marquées avec les anticorps anti-F4/80 (macrophages) et anti-Ly6c (macrophages M1) pour déterminer le pourcentage de macrophages M1 et M2 dans la population totale de macrophages. Source : (Yan et al. 2013)

## B. Résultats préliminaires obtenus

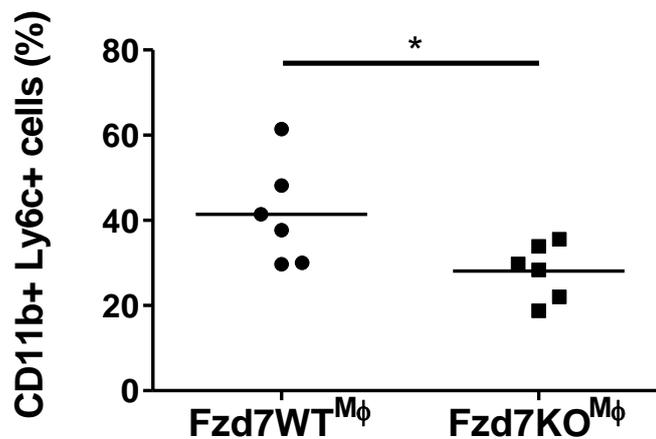
Nous avons choisi de commencer notre étude sur ce modèle par une analyse par cytométrie en flux de la population de macrophages M1 dans le cœur. Dans la patte nous avons pu voir que le niveau de macrophages M1 à J5 post-ischémie était assez bas. Ainsi dans ce modèle d'infarctus nous avons sacrifié les animaux précocement, dès trois jours post-opération, pour se placer dans un environnement inflammatoire où le ratio M1/M2 est important ( $\approx 2/3$ ) (Yan et al. 2013).

Trois jours après la ligature de l'artère et l'induction de l'infarctus, les souris sont sacrifiées. Leur cœur est prélevé, puis digéré dans un tampon de digestion. La séparation sur ficoll des cellules obtenues après digestion permet d'isoler et de récupérer les cellules mononuclées. Ainsi les neutrophiles, granulocytes polynucléaires exprimant CD11b, sont séparés des macrophages. Un marquage des cellules mononuclées par l'anticorps anti-CD11b nous montre qu'il n'y a pas de différences de recrutement de macrophages dans le cœur entre les souris Fzd7WT<sup>M $\phi$</sup>  et Fzd7KO<sup>M $\phi$</sup>  (**Figure 75**).



**Figure 75: L'absence d'expression de *Fzd7* par les macrophages n'a pas d'effet sur le pourcentage de macrophages présents dans le cœur à 3 jours post-infarctus.** Un infarctus du myocarde est provoquée chez des souris Fzd7WT<sup>M $\phi$</sup>  et Fzd7KO<sup>M $\phi$</sup>  par ligature de l'artère interventriculaire antérieure. Le pourcentage de cellules CD11b<sup>+</sup> présentes dans le cœur des souris est mesuré par cytométrie en flux. 2 expériences indépendantes furent réalisées avec pour chaque expérience, 3 Fzd7WT<sup>M $\phi$</sup>  et 3 Fzd7KO<sup>M $\phi$</sup> .

L'analyse du pourcentage de macrophages M1 parmi ces cellules CD11b<sup>+</sup> fut réalisée par co-marquage avec les anticorps anti-CD11b et anti-Ly6c. Nous obtenons chez les souris Fzd7WT un pourcentage de macrophages M1 d'environ 40%, correspondant à celui de l'étude réalisée par Yan et al (**Figure 74**). Nous observons en revanche que le pourcentage de macrophages M1 est statistiquement plus faible dans le cœur chez les souris dont les macrophages n'expriment pas Fzd7 (**Figure 76**). Ces résultats confirment ceux obtenus dans le modèle d'ischémie de la patte.



**Figure 76: Le pourcentage de macrophages M1 parmi les macrophages présents dans le cœur à 3 jours post-infarctus est plus faible chez les souris Fzd7KO<sup>Mφ</sup>.** Un infarctus du myocarde est provoquée chez des souris Fzd7WT<sup>Mφ</sup> et Fzd7KO<sup>Mφ</sup> par ligature et résection de l'artère interventriculaire antérieure. Le pourcentage de macrophages M1 parmi la population de cellules CD11b<sup>+</sup> est analysée par cytométrie en flux (double marquage avec les anticorps anti-CD11b et anti-Ly6c). 2 expériences indépendantes furent réalisées avec pour chaque expérience, 3 Fzd7WT<sup>Mφ</sup> et 3 Fzd7KO<sup>Mφ</sup>.

**CONCLUSION, DISCUSSION  
ET  
PERSPECTIVES**

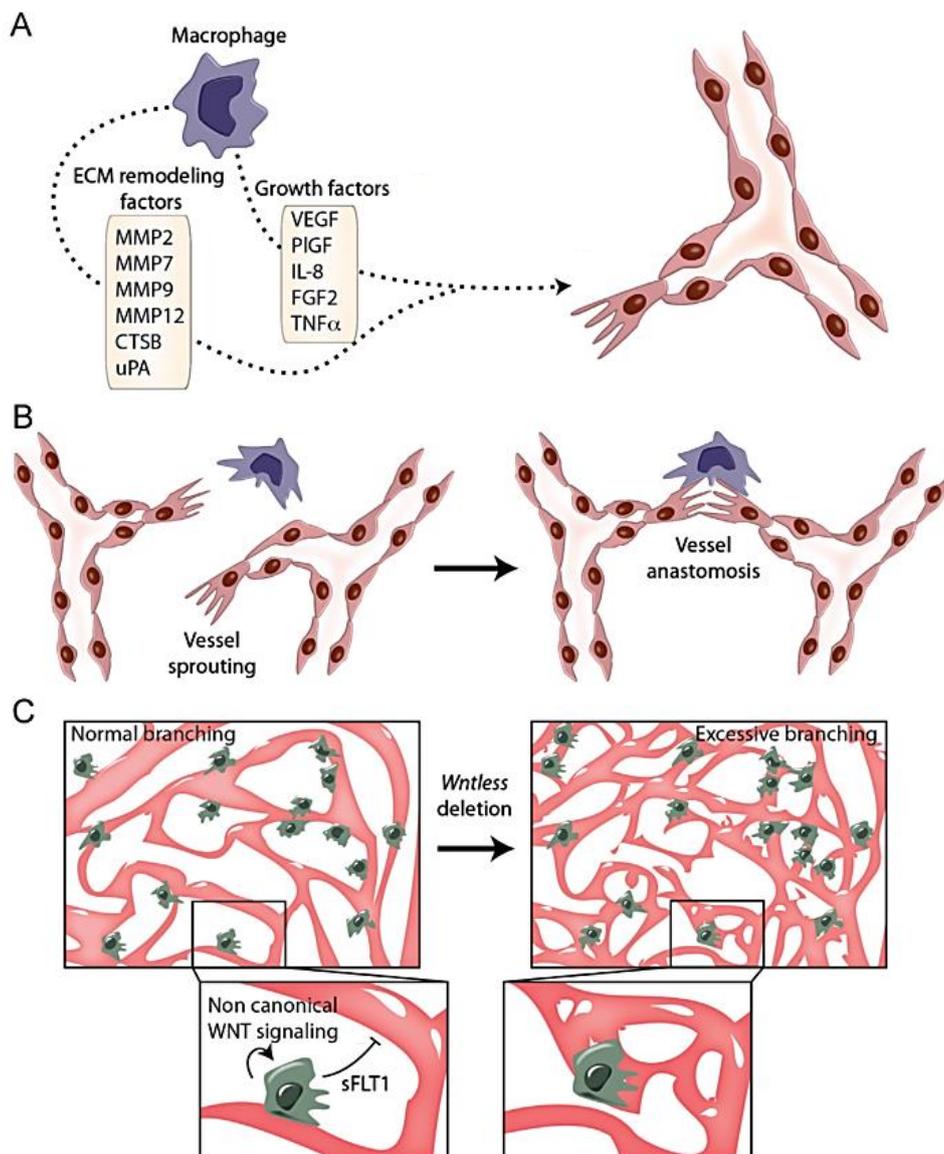
---

## I. Conclusion et discussion

---

Comprendre la régulation de l'angiogenèse et notamment de l'angiogenèse pathologique est une étape importante dans l'optique de trouver des traitements régulant positivement ou négativement l'angiogenèse chez les patients atteints d'ischémie, d'inflammation chronique ou encore de cancer. Les cellules immunitaires et particulièrement les macrophages apparaissent de plus en plus comme jouant un rôle important dans l'angiogenèse physiologique et pathologique. Les études réalisées depuis quelques années laissent à penser que la régulation de l'angiogenèse par les macrophages est complexe, peut passer par des processus variés et avoir des effets différents selon les modèles d'angiogenèse et les populations de macrophages étudiés (**Figure 77**).

Au sein d'une équipe spécialisée dans l'étude des voies de signalisation Wnt/Frizzled dans l'angiogenèse, j'ai cherché pendant mes trois ans de thèse à déterminer si la signalisation induite par le récepteur Frizzled 7 dans les macrophages jouait un rôle dans leurs propriétés angiogéniques.



**Figure 77: Communication indirecte et directe entre les cellules endothéliales et les macrophages.** (A) Les macrophages M2 (violet) sécrètent des facteurs de croissance pro-angiogéniques et des protéases qui facilitent la migration et la croissance vasculaire. (B) Lors du développement du cerveau murin, les macrophages M2 (violet) s'associent avec les cellules endothéliales et forment un pont entre les tips cells endothéliales pour faciliter l'anastomose vasculaire. (C) Dans le plexus vasculaire profond de la rétine chez la souris, les macrophages s'associent avec les vaisseaux en formation. Une signalisation Wnt/non canonique stimule la sécrétion de sFLT1 qui limite le branchement vasculaire (à gauche). En absence de signalisation Wnt, un branchement excessif des vaisseaux se produit (à droite). D'après : (Baer\* et al. 2013)

## A. FZD7 régule l'angiogenèse dans plusieurs modèles d'inflammation chez la souris

### i. L'absence de Frizzled 7 modifie le profil M1/M2 des macrophages

Les macrophages jouant un rôle central dans l'inflammation je me suis intéressée au rôle de l'expression de Frizzled7 par les macrophages dans l'angiogenèse pathologique. Sur des souris déficientes en Fzd7 dans les macrophages j'ai ainsi utilisé plusieurs modèles d'angiogenèse pathologique : hypersensibilité retardée de contact, irritation cutanée, ischémie du membre inférieur, infarctus du myocarde. De ces études nous avons pu conclure que dans trois de ces modèles (irritation cutanée, ischémie du membre inférieur, infarctus du myocarde) l'absence de Fzd7 induit une modification de polarisation des macrophages. La population de macrophages M2, caractérisés par l'expression du récepteur au Mannose (MMR), est plus importante. Ce résultat obtenu par immuno-marquage sur tissus traités ou ischémiés est renforcé par la diminution du pourcentage de macrophages M1 (Ly6c<sup>+</sup>) quantifiée par cytométrie en flux.

Des études réalisées précédemment au laboratoire ont montré l'implication de sFRP1, un antagoniste de la signalisation Wnt/Fzd, dans la modulation de la réponse inflammatoire post-infarctus chez la souris. La surexpression de cette protéine par les cellules de moelle osseuse réduit la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires et l'infiltration de neutrophiles dans la zone cicatricielle du cœur (Barandon et al. 2011). Or Fzd7 ayant été décrit comme cible de sFRP1 (Dufourcq et al. 2008), se pourrait-il que dans notre étude l'absence de Fzd7 dans les macrophages reproduise une inactivation par sFRP1 ? De plus, nous avons globalement considéré dans cette étude que l'absence d'expression de Fzd7 avait lieu dans les macrophages. Bien que la lysozyme M, dont le promoteur est utilisé pour la construction de la souris Fzd7KO<sup>M $\phi$</sup> , soit principalement exprimée par les macrophages, d'autres cellules myéloïdes peuvent l'exprimer. C'est le cas des neutrophiles et des cellules dendritiques par exemple. Nous ne pouvons donc pas exclure la possibilité que le phénotype observé soit directement ou indirectement lié à l'absence de Fzd7 dans ces cellules myéloïdes. L'étude de la population de neutrophiles pourrait être intéressante. Nous pourrions voir si l'on retrouve la diminution de neutrophiles observée dans le cœur dans le contexte de surexpression de sFRP1.

Dans la littérature, les études les plus complètes sur un rôle des voies Wnt/Frizzled dans la régulation du profil inflammatoire des macrophages démontrent l'implication d'une voie Wnt5a/Fzd5 (Blumenthal et al. 2006) et Wnt3a/Fzd1 (Neumann et al. 2010). Ces deux voies sont déclenchées *in vitro* par un signal inflammatoire d'origine bactérienne. Tandis que la paire Wnt5a/Fzd5 participe au maintien du profil inflammatoire des macrophages, Wnt3a/Fzd1 permet la désactivation des macrophages nécessaire à la limitation de l'inflammation. L'analyse des récepteurs Frizzled a mis en évidence que Fzd7 est phylogénétiquement plus proche de Fzd1 et Fzd2 que des autres récepteurs Frizzled (75% d'identité de séquences d'acides aminés) (Fredriksson et al. 2003). On pourrait ainsi supposer que si Fzd7 joue un rôle dans la polarisation des macrophages il induise, comme Fzd1, une régulation négative de l'inflammation. Or ce n'est pas ce que nous observons puisque l'absence de Fzd7 amène à une augmentation de la population de macrophages M2. L'absence de Fzd7 rendrait-elle le ligand Wnt3a d'avantage disponible pour le récepteur Fzd1 et permettrait-elle ainsi son action anti-inflammatoire ?

Cependant, la signalisation Wnt/Fzd est complexe. En effet, Fzd7 a été mis en évidence dans des interactions avec plusieurs Wnt, dont Wnt3a et Wnt5a qui sont pourtant phylogénétiquement assez éloignés (parmi les 19 Wnt) (Nam et al. 2014) et décrits comme activant des voies différentes. Wnt3a active préférentiellement la voie canonique et Wnt5a la voie non-canonique (Yu et al. 2012). En outre, dans le modèle *in vivo* d'inflammation pulmonaire chez la souris l'expression du récepteur Fzd7 est régulé négativement (Neumann et al. 2010) mais chez des patients atteints d'arthrite rhumatoïde, les tissus synoviaux enflammés surexpriment, entre autres, Frizzled 7 (Sen et al. 2000). La régulation des récepteurs Frizzled au cours de l'inflammation semble de plus assez fine. Toujours dans le modèle d'inflammation pulmonaire chez la souris, les auteurs révèlent une expression des Frizzled régulée au cours du temps. Fzd1 et Fzd5 sont surexprimés à 21 jours mais ensuite Fzd5 voit son expression rediminuer tandis que Fzd1 reste fortement surexprimés (Neumann et al. 2010). Ceci semble cohérent avec les études *in vitro* montrant un rôle de Fzd5 dans l'inflammation et de Fzd1 dans la désactivation. Le récepteur Fzd7 pourrait être lui aussi exprimé différemment, par les macrophages, au cours du temps et selon les tissus ou participer positivement ou négativement à l'inflammation en fonction des ligands Wnt présents dans le milieu.

Par immuno-marquage et par cytométrie nous avons observé que le nombre global de macrophages ne varie pas entre les souris Fzd7WT<sup>M $\phi$</sup>  et Fzd7KO<sup>M $\phi$</sup> . Le recrutement des macrophages n'est donc pas altéré par l'absence d'expression de Fzd7. Dans la littérature des études ont montré que les macrophages M2 présents dans les tissus proviennent du changement de polarisation de macrophages M1 et non pas du recrutement de monocytes de type M2 circulant dans le sang. (Arnold et al. 2007). Dans notre étude, la visualisation d'une augmentation du nombre de macrophages M2 sans modification de la population totale de macrophages chez les souris Fzd7KO<sup>M $\phi$</sup>  va dans le sens de ces études.

## ii. L'absence de Frizzled 7 dans les lignées myéloïdes favorise l'angiogenèse dans des modèles pathologiques

Dans les modèles d'irritation cutanée et d'ischémie du membre inférieur nous avons déterminé que le changement de polarisation des macrophages visible en absence de Fzd7 s'accompagne d'une angiogenèse plus importante. Le récepteur Fzd7 aurait donc un rôle de régulateur négatif de l'angiogenèse.

Dans la littérature les travaux menés sur l'action des macrophages sur l'angiogenèse rapportent des effets différents selon les modèles étudiés. La plupart des études rapportent un rôle pro-angiogénique des macrophages, dans le développement de la rétine et du cerveau (Checchin et al. 2006, Kubota et al. 2009, Fantin et al. 2010, Rymo et al. 2011), dans le processus de cicatrisation (Goren et al. 2009, Mirza et al. 2009), dans l'angiogenèse tumorale (Lin et al. 2006, Hao\* et al. 2012), ... Ils favorisent l'angiogenèse et le branchement des vaisseaux. Cependant d'autres études décrivent un rôle de régulateur négatif de l'angiogenèse, passant notamment par une régulation du branchement vasculaire. C'est le cas de l'équipe de Stefater qui révèle l'existence d'une signalisation Wnt/Flt1 dans les macrophages, responsable de l'inhibition de l'anastomose vasculaire dans la rétine et de l'angiogenèse lors de la cicatrisation d'une plaie chez la souris (Stefater et al. 2011, Stefater 2013). Une régulation négative de l'angiogenèse par le récepteur Fzd7, exprimé par les macrophages, n'est donc pas en contradiction avec les données de la littérature.

Les immuno-marquages réalisés sur les coupes de muscles ischémiés et de peaux irritées, ne semble pas montrer de contact direct entre les vaisseaux et les macrophages MMR<sup>+</sup>. L'angiogenèse accrue observée en absence d'expression de Fzd7 par les macrophages

semble être d'avantage une conséquence du changement de polarisation des macrophages vers un profil M2, pro-angiogénique, que d'une interaction directe avec les vaisseaux.

Parmi les différentes sous populations de macrophages M2, les TEM (Tie2<sup>+</sup>) apparaissent comme particulièrement angiogéniques que ce soit dans l'angiogenèse tumorale (De Palma et al. 2005, De Palma et al. 2007) que dans la revascularisation de la patte après ischémique (Patel et al. 2013). Nous n'avons réalisé qu'un marquage des macrophages MMR<sup>+</sup>, mais il serait intéressant d'étudier la population de TEM chez les souris Fzd7KO<sup>MΦ</sup>.

### B. L'expression de Frizzled7 par les macrophages n'influence pas la réparation du muscle

---

Bien que la délétion de Fzd7 dans les macrophages favorise la présence de macrophages M2 et l'augmentation de néovaisseaux dans le muscle cinq jours après induction de l'ischémie, à dix jours nous n'avons pas montré de différences significatives entre les souris mutantes et contrôles. Le récepteur semble donc être impliqué d'avantage dans la première phase de réparation (phase de prolifération) que dans la phase plus tardive de remodelage. En termes de réparation tissulaire et de retour fonctionnel du flux sanguin dans la patte ischémié, nous n'avons observé aucune modification liée à l'absence de Fzd7. L'explication est peut être due à la différence du nombre de néovaisseaux qui est certes statistique mais probablement trop faible, pour induire une modification du flux sanguin. Fzd7 a une homologie importante avec Fzd2 (75% d'identité de séquence d'acides aminés) et une redondance fonctionnelle de ces deux récepteurs a été montré dans le développement embryonnaire chez la souris. Il se pourrait donc que ces deux récepteurs agissent également de façon synergique dans la régulation de la polarisation des macrophages et de l'angiogenèse. L'effet observé chez les souris Fzd7KO<sup>MΦ</sup> pourrait peut-être être augmenté chez un double mutant *Fzd7/Fzd2*.

### C. L'absence de Frizzled 7 dans les macrophages modifie leurs réponses aux signaux inflammatoires *in vitro*

---

Pour comprendre les voies et mécanismes cellulaires responsables des différences phénotypiques observées dans plusieurs modèles *in vivo*, nous avons décidé de faire une étude *in vitro* de la polarisation des macrophages en absence de Fzd7. Nous avons donc extrait de la moelle osseuse de souris Fzd7WT et Fzd7KO, que nous avons ensuite

différenciée *in vitro* en macrophages. L'obtention de macrophages par cette technique fut validée. Dans l'objectif de reproduire l'environnement inflammatoire des modèles *in vivo*, nous avons activé les macrophages en macrophages M1 par du LPS et de l'IFN $\gamma$ . De façon inattendue, nous avons observé que dans un milieu pauvre en sérum et dépourvu de LPS et d'IFN $\gamma$ , les macrophages délétés pour Fzd7 comparés aux macrophages WT présentaient : (1) une expression plus importante de certains facteurs pro-inflammatoires (IL-6, IL-12 $\beta$ , TNF $\alpha$ ), (2) accompagnée d'une expression plus faible du facteur MMR. L'ajout de LPS et d'IFN $\gamma$  induit bien une activation M1 des macrophages (WT et KO) avec une augmentation d'expression des facteurs pro-inflammatoires plus forte dans les macrophages WT que KO. Cependant en termes de niveau d'expression en condition « activée » les deux groupes de macrophages sont identiques. De plus, la désactivation du profil inflammatoire des macrophages, induite par l'ajout de TGF $\beta$  et d'interleukine-10 dans le milieu, a tendance à être plus faible chez les macrophages Fzd7KO.

De façon inattendue, au regard des résultats *in vivo*, les expériences *in vitro* semblent indiquer que les macrophages Fzd7KO, isolés des autres cellules de l'organisme, soient plus sensibles aux signaux inflammatoires. Ces résultats ne sont cependant pas incohérents avec la littérature. En effet, l'étude de Neumann et al. réalisée *in vitro* montre un effet anti-inflammatoire de la voie Wnt3a/Fz1 via une signalisation  $\beta$ -caténine dépendante. Or comme décrit plus haut Frizzled 7 et Frizzled 1 sont phylogénétiquement proche et Wnt3a capable d'activer Fzd7. De plus, par WB nous avons confirmé que l'absence d'expression de Fzd7 par les macrophages empêchait l'accumulation de  $\beta$ -caténine induite par l'activation par Wnt3a.  $\beta$ -caténine est décrite dans plusieurs études comme régulant négativement l'inflammation induite par des pathogènes (Lee et al. 2012, Wu et al. 2014). En condition inflammatoire, lorsque la voie de signalisation NF- $\kappa$ B est activée, la signalisation  $\beta$ -caténine-dépendante est très souvent inhibée. Inversement l'activation de la  $\beta$ -caténine entraîne une diminution de l'inflammation. La protéine GSK3 $\beta$  semble être le régulateur commun entre ces deux voies (Duan et al. 2007).

Nos résultats *in vitro* en contradiction avec ceux obtenus dans les modèles d'inflammation chez la souris, mettent en lumière la difficulté de reproduire *in vitro* un environnement *in vivo* complexe.

## II. Perspectives

---

En raison de la difficulté de reproduire *in vitro* la différence de polarisation observée *in vivo* nous avons décidé de travailler uniquement sur les modèles murins et l'analyse de matériel (tissus ou cellules) isolé des souris.

L'étude du modèle de l'infarctus chez la souris sera complétée par une analyse histologique des macrophages (CD68<sup>+</sup> et MMR<sup>+</sup>) et des vaisseaux ainsi que de la taille de l'infarctus, à trois (fin de la phase inflammatoire/début de la phase proliférative) et quinze jours (phase de remodelage) post-opération. Nous souhaitons ainsi renforcer par un autre modèle d'ischémie les résultats obtenus dans le muscle tibial après ligature de l'artère fémorale.

Dans le cœur à trois jours post-infarctus les différences de polarisation des macrophages, observées par cytométrie en flux, sont plus grandes que celles obtenues à cinq jours post-ischémie dans le muscle tibial. Cette différence pourrait être due au modèle utilisé (infarctus du myocarde vs ischémie de la patte) ou à la cinétique choisie (trois vs cinq jours). A trois jours l'environnement est plus inflammatoire qu'à cinq jours, l'intervention de Fzd7 y est peut-être plus importante. Pour répondre à cela nous réaliserons dans le muscle tibial à trois jours les analyses (histologie et de cytométrie en flux) des populations de macrophages et des vaisseaux.

Notre analyse de la population M2 n'ayant été faite qu'à partir du marqueur MMR, il serait intéressant de quantifier d'autres populations de macrophages M2. Notamment l'analyse des macrophages TEM fortement angiogénique serait pertinente. Cette population est caractérisée par l'expression du récepteur Tie2. Celui-ci étant également exprimé par les cellules endothéliales, l'analyse des TEM devra passer par une analyse par cytométrie en flux permettant de détecter les macrophages et les différencier des cellules endothéliales.

Afin d'analyser les expressions de facteurs pro- et anti-inflammatoires (cytokines, chimiokines, protéases, ...) ainsi que les voies de signalisation activées dans les macrophages des muscles et des cœurs après ischémie, il est nécessaire de pouvoir isoler les macrophages. Plusieurs méthodes sont envisageables. L'isolement peut se faire par immuno-marquage de la population à extraire suivi soit d'un tri par la technique de FACS (Bréchet et al. 2008, Patel et al. 2013), soit par isolement sur colonne séparatrice. Nous

avons tenté d'isoler les macrophages des muscles ischémiés par cette technique. Après digestion des muscles, les cellules mononuclées ont été incubées avec des anticorps anti-F4.80 et anti-CD68, puis passées sur colonne séparatrice (Miltenyi). Bien que prometteurs (70% de purification) les premiers résultats ont révélés une limite de ce protocole, la faible quantité de cellules récupérées. Il est donc nécessaire de cumuler les cellules de plusieurs souris de même génotype pour récupérer suffisamment de cellules pour réaliser une extraction d'ARN ou protéines. L'autre limite de cette technique (par FACS ou par colonne) est le biais de sélection induit par le marqueur choisi pour isoler les macrophages. Une autre technique d'isolement des macrophages repose sur la capacité des macrophages à adhérer au plastique des supports de culture plus rapidement que les autres cellules. Cette technique est utilisée pour isoler les macrophages péritonéaux ou encore les macrophages alvéolaires (Zhang et al. 2008, Davis et al. 2013). Les cellules isolées de l'animal (cellules péritonéales, cellules de poumons digérés, ...) sont mis en culture 1h à 1h30. Les cellules restées en suspension sont éliminées. L'avantage de cette technique est qu'elle permettrait de récupérer plusieurs populations de macrophages. Nous avons testé l'isolement des macrophages présents dans le muscle ischémié par ce procédé, en digérant les muscles et en mettant les cellules mononuclées en culture pendant 1h. Ainsi nous avons obtenu un enrichissement en macrophages de 50%. Une mise au point des techniques d'isolement de macrophages est encore nécessaire.

La production des cytokines et chimiokines par les macrophages peut également être effectuée par cytométrie en flux avec des anticorps dirigés contre ces marqueurs.

Nous avons concentré nos recherches sur l'angiogenèse pathologique. Cependant en plus de leur rôle en pathologie les macrophages ont été décrits dans l'angiogenèse développementale et notamment dans la rétine. Une étude a révélé que Fzd7 est exprimé dans une population de macrophages impliquée dans la régulation négative de l'anastomose au niveau du plexus profond de la rétine. Il serait intéressant d'analyser l'angiogenèse dans la rétine de souris Fzd7WT<sup>M $\phi$</sup>  et Fzd7KO<sup>M $\phi$</sup> .

Ces expériences complémentaires devraient permettre d'apporter des connaissances supplémentaires sur le rôle dans l'angiogenèse de l'expression de Fzd7 par les macrophages. Si ces futures études confirment l'induction d'une angiogenèse accrue en absence de Fzd7,

démontrée lors de ma thèse, des perspectives d'études de thérapies par anticorps bloquant pourraient être envisagées dans le cas d'ischémie tissulaire.

# **PUBLICATIONS**

---

Au cours de ma thèse deux articles portant sur les travaux de mon équipe de recherche furent publiés (ci-dessous). Mon implication dans ces travaux fut essentiellement technique.

- ❖ Ferreira Tojais, N., C. Peghaire, **N. Franzl**, F. Larrieu-Lahargue, B. Jaspard, A. Reynaud, C. Moreau, T. Couffinhal, C. Duplaa and P. Dufourcq (2014). "Frizzled7 controls vascular permeability through the Wnt-canonical pathway and cross-talk with endothelial cell junction complexes." *Cardiovasc Res* 103(2): 291-303

J'ai mis au point au laboratoire un modèle *in vivo* d'irritation cutané (description dans ce mémoire). Ce modèle a permis de montrer, par évaluation de l'œdème cutané, la régulation de la perméabilité vasculaire par le récepteur Fzd7 exprimé par les cellules endothéliales. Les résultats majeurs de cette étude sont présentés dans l'introduction du mémoire.

- ❖ Sewduth, R. N., B. Jaspard-Vinassa, C. Peghaire, A. Guillabert, **N. Franzl**, F. Larrieu-Lahargue, C. Moreau, M. Fruttiger, P. Dufourcq, T. Couffinhal and C. Duplaa (2014). "The ubiquitin ligase PDZRN3 is required for vascular morphogenesis through Wnt/planar cell polarity signalling." *Nat Commun* 5: 4832.

J'ai mis au point au laboratoire un modèle *in vitro* de formation de tube en 3D, basé sur l'utilisation de billes Cytodex (GE Healthcare). Des cellules endothéliales (HUVEC) sont mises en adhésion sur des billes Cytodex. L'ensemble est ensuite intégré dans un gel de fibrine. Des fibroblastes, sources de facteurs pro-angiogéniques, sont mis en culture à la surface du gel. La formation de tubes est suivie sur plusieurs jours. Ce modèle a permis de mettre en évidence le rôle de la protéine PDZRN3 dans la régulation positive de la formation et de la stabilisation des tubes.



# Frizzled7 controls vascular permeability through the Wnt-canonical pathway and cross-talk with endothelial cell junction complexes

Nancy Ferreira Tojais<sup>1,2,3</sup>, Claire Peghaire<sup>1,2</sup>, Nathalie Franzl<sup>1,2</sup>,  
Frédéric Larrieu-Lahargue<sup>1,2</sup>, Béatrice Jaspard<sup>1,2</sup>, Annabelle Reynaud<sup>1,2</sup>,  
Catherine Moreau<sup>1,2</sup>, Thierry Couffignal<sup>1,2,4</sup>, Cécile Duplâa<sup>1,2</sup>, and Pascale Dufourcq<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Adaptation cardiovasculaire à l'ischémie, INSERM U1034, 125 Avenue du Haut Lévêque, 33 600 Pessac, France; <sup>2</sup>Adaptation cardiovasculaire à l'ischémie, Bordeaux University, U1034, Pessac, France; <sup>3</sup>Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, USA; and <sup>4</sup>Department of Cardiology, Pôle Cardiothoracique, Hôpital Haut Lévêque, Pessac, France

Received 18 October 2013; revised 2 May 2014; accepted 6 May 2014

Time for primary review: 39 days

<b>Aims</b>	Vascular permeability is essential for the health of normal tissues and is an important characteristic of many disease states. The role of the Wnt/frizzled pathway in vascular biology has recently been reported. The objectives of this study are to analyse the role of Frizzled7 (Fzd7) receptor in the control of vascular integrity.
<b>Methods and results</b>	Fzd7 is expressed in endothelial cells and accumulates at the points of cell–cell contact in association with VE-cadherin and $\beta$ -catenin, two major adherens junction molecules. To selectively delete <i>fzd7</i> in the vasculature, we developed gene targeting approaches using CreLox strategy in mice. Genetic <i>fzd7</i> inhibition in the endothelium increases vascular permeability in basal and factor-induced conditions. On the cellular level, <i>fzd7</i> knockdown or depletion leads to an increase in paracellular permeability with a loss of adherens junction organization. These impairments are associated with a decrease in both VE-Cadherin and $\beta$ -catenin expression, a decrease in their association and an increase of tyrosine phosphorylation of VE-cadherin/ $\beta$ -catenin. Fzd7 transduces a Wnt/ $\beta$ -catenin signalling cascade that is required to regulate $\beta$ -catenin and canonical target gene expression. Finally, LiCl, a GSK3 inhibitor, and $\beta$ -catenin overexpression rescued endothelial integrity and adherens junction organization, induced by <i>fzd7</i> deletion.
<b>Conclusion</b>	These findings establish that Fzd7 is a new partner of adherens junctional complex and represents a novel molecular switch for the control of vascular permeability via activation of the Wnt-canonical pathway.
<b>Keywords</b>	Wnt/frizzled signalling • Vascular permeability • Endothelial cell • Transgenic mice • Cadherin

## 1. Introduction

The function of the endothelium is to provide a network to allow delivery of oxygen and nutrients to tissues throughout the body. This network comprises adjacent endothelial cells which utilize adherens junction complexes containing vascular endothelial cadherin (VE-cadherin) link to catenin proteins ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  or p120) to maintain the appropriate level of vascular permeability.<sup>1,2</sup> In a variety of pathological conditions including ischaemic disease, acute and chronic inflammation, and tumour formation, secreted mediators lead to a prolonged and chronic increase in endothelial paracellular permeability which can result in vessel wall leakiness and organ dysfunction.<sup>3</sup>

The Wnt/Fzd pathway is known to play important roles in multiple physiological and pathological processes.<sup>4</sup> Recent advances in vascular biology highlight important roles for multiple components of the Wnt/Fzd signalling pathway in endothelial cell biology regulating cell differentiation, proliferation, survival, cell junctions, and polarity.<sup>5,6</sup> Wnt/Fzd signalling is a complex pathway with 19 soluble Wnt proteins that can bind to 10 frizzled receptors and activate canonical, dependant to the  $\beta$ -catenin, and non-canonical signalling pathways, so-called planar cell polarity (PCP) or the Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  pathway.<sup>7</sup> Among the Fzd receptors, we and others have previously demonstrated that Frizzled7 (Fzd7) is expressed in EC and that its down-regulation enhances EC spreading and modifies actin cytoskeleton.<sup>8,9</sup> Different reports have

\* Corresponding author. Tel: +33 5 57891972; fax: +33 5 56368979, Email: pascale.dufourcq@u-bordeaux2.fr

Published on behalf of the European Society of Cardiology. All rights reserved. © The Author 2014. For permissions please email: journals.permissions@oup.com.

ARTICLE

Received 24 Jan 2014 | Accepted 28 Jul 2014 | Published 8 Sep 2014

DOI: 10.1038/ncomms5832

# The ubiquitin ligase PDZRN3 is required for vascular morphogenesis through Wnt/planar cell polarity signalling

Raj N. Sewduth<sup>1</sup>, Béatrice Jaspard-Vinassa<sup>1,2</sup>, Claire Peghaire<sup>1</sup>, Aude Guillabert<sup>1</sup>, Nathalie Franzl<sup>1</sup>, Frederic Larrieu-Lahargue<sup>1</sup>, Catherine Moreau<sup>1</sup>, Marcus Fruttiger<sup>3</sup>, Pascale Dufourcq<sup>1,2</sup>, Thierry Couffignal<sup>1,2,4</sup> & Cécile Duplâa<sup>1,2</sup>

Development and stabilization of a vascular plexus requires the coordination of multiple signalling processes. Wnt planar cell polarity (PCP) signalling is critical in vertebrates for diverse morphogenesis events, which coordinate cell orientation within a tissue-specific plane. However, its functional role in vascular morphogenesis is not well understood. Here we identify PDZRN3, an ubiquitin ligase, and report that *Pdzm3* deficiency impairs embryonic angiogenic remodelling and postnatal retinal vascular patterning, with a loss of two-dimensional polarized orientation of the intermediate retinal plexus. Using *in vitro* and *ex vivo* *Pdzm3* loss-of-function and gain-of-function experiments, we demonstrate a key role of PDZRN3 in endothelial cell directional and coordinated extension. PDZRN3 ubiquitinates Dishevelled 3 (Dvl3), to promote endocytosis of the Frizzled/Dvl3 complex, for PCP signal transduction. These results highlight the role of PDZRN3 to direct Wnt PCP signalling, and broadly implicate this pathway in the planar orientation and highly branched organization of vascular plexuses.

<sup>1</sup>INSERM, Adaptation cardiovasculaire à l'ischémie, U1034, F-33600 Pessac, France. <sup>2</sup>Univ. Bordeaux, Adaptation cardiovasculaire à l'ischémie, U1034, F-33600 Pessac, France. <sup>3</sup>UCL Institute of Ophthalmology, London EC1V 9EL, UK. <sup>4</sup>CHU de Bordeaux, Service des Maladies Cardiaques et Vasculaires, F-33000 Bordeaux, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.D. (email: cecile.dupl  a@inserm.fr).

# BIBLIOGRAPHIE

---

- Abramson, S. and J. Gallin (1990). "IL-4 inhibits superoxide production by human mononuclear phagocytes." J Immunol **144**(2): 625-630.
- Abu-Elmagd, M., C. Garcia-Morales and G. N. Wheeler (2006). "Frizzled7 mediates canonical Wnt signaling in neural crest induction." Dev Biol **298**(1): 285-298.
- Angers\*, S. and R. T. Moon (2009). "Proximal events in Wnt signal transduction." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(7): 468-477.
- Anna, C. H., M. Iida, R. C. Sills and T. R. Devereux (2003). "Expression of potential  $\beta$ -catenin targets, cyclin D1, c-Jun, c-Myc, E-cadherin, and EGFR in chemically induced hepatocellular neoplasms from B6C3F1 mice." Toxicology and Applied Pharmacology **190**(2): 135-145.
- Arbouzova, N. I. and M. P. Zeidler (2006). "JAK/STAT signalling in Drosophila: insights into conserved regulatory and cellular functions." Development **133**(14): 2605-2616.
- Arnold, L., A. Henry, F. Poron, Y. Baba-Amer, N. van Rooijen, A. Plonquet, R. K. Gherardi and B. Chazaud (2007). "Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis." J Exp Med **204**(5): 1057-1069.
- Ashwell KW, H. H., Streit W, Stone J (1989). "The appearance and distribution of microglia in the developing retina of the rat." Vis Neurosci **2**(5): 437-448.
- Baer\*, C., M. L. Squadrito, M. L. Iruela-Arispe and M. De Palma (2013). "Reciprocal interactions between endothelial cells and macrophages in angiogenic vascular niches." Exp Cell Res **319**(11): 1626-1634.
- Bafico, A., A. Gazit, T. Pramila, P. W. Finch, A. Yaniv and S. A. Aaronson (1999). "Interaction of frizzled related protein with wnt ligand and the fzd receptor suggests alternative mechanisms for frp inhibition of wnt signaling." The Journal of Biological Chemistry **274**(23): 16180-16187.
- Barandon, L., F. Casassus, L. Leroux, C. Moreau, C. Allieres, J. M. Lamaziere, P. Dufourcq, T. Couffignal and C. Duplaa (2011). "Secreted frizzled-related protein-1 improves postinfarction scar formation through a modulation of inflammatory response." Arterioscler Thromb Vasc Biol **31**(11): e80-87.
- Barandon, L., T. Couffignal, J. Ezan, P. Dufourcq, P. Costet, P. Alzieu, L. Leroux, C. Moreau, D. Dare and C. Duplaa (2003). "Reduction of infarct size and prevention of cardiac rupture in transgenic mice overexpressing FrzA." Circulation **108**(18): 2282-2289.
- Batlle, E., J. Henderson, H. Beghtel, M. Van den Born, E. Sancho, G. Huls, J. Meeldijk, J. Robertson, M. van de Wetering, T. Pawson and H. Clevers (2002). "Beta-Catenin and TCF Mediate Cell Positioning in the Intestinal Epithelium by Controlling the Expression of EphB/EphrinB." Cell **111**(2): 251-263.
- Bengochea, A., M. M. de Souza, L. Lefrancois, E. Le Roux, O. Galy, I. Chemin, M. Kim, J. R. Wands, C. Trepo, P. Hainaut, J. Y. Scoazec, L. Vitvitski and P. Merle (2008). "Common dysregulation of Wnt/Frizzled receptor elements in human hepatocellular carcinoma." Br J Cancer **99**(1): 143-150.
- Bergenfelz, C., C. Medrek, E. Ekstrom, K. Jirstrom, H. Janols, M. Wullt, A. Bredberg and K. Leandersson (2012). "Wnt5a induces a tolerogenic phenotype of macrophages in sepsis and breast cancer patients." J Immunol **188**(11): 5448-5458.
- Bhatt\*, P. M. and R. Malgor (2014). "Wnt5a: A player in the pathogenesis of atherosclerosis and other inflammatory disorders." Atherosclerosis **237**(1): 155-162.
- Biedermann\*, T., M. Röcken and J. M. Carballido (2004). "TH1 and TH2 Lymphocyte Development and Regulation of TH Cell-Mediated Immune Responses of the Skin." Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings **9**(1): 5-14.
- Blumenthal, A., S. Ehlers, J. Lauber, J. Buer, C. Lange, T. Goldmann, H. Heine, E. Brandt and N. Reiling (2006). "The Wingless homolog WNT5A and its receptor Frizzled-5 regulate inflammatory responses of human mononuclear cells induced by microbial stimulation." Blood **108**(3): 965-973.
- Boehme, K. W. and T. Compton (2004). "Innate sensing of viruses by toll-like receptors." J Virol **78**(15): 7867-7873.
- Bogdan, C., J. Paik, Y. Vodovotz and C. Nath (1992). "Contrasting mechanisms for suppression of macrophage cytokine release by transforming growth factor-beta and interleukin-10." The Journal of Biological Chemistry **267**(32): 23301-23308.

- Boland, G. M., G. Perkins, D. J. Hall and R. S. Tuan (2004). "Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells." *J Cell Biochem* **93**(6): 1210-1230.
- Borello, U., V. Buffa, C. Sonnino, R. Melchionna, E. Vivarelli and G. Cossu (1999). "Differential expression of the Wnt putative receptors Frizzled during mouse somitogenesis." *Mechanisms of Development* **89**(1-2): 173-177.
- Brabletz, T., A. Jung, S. Dag, F. Hlubek and T. Kirchner (1999). " $\beta$ -Catenin Regulates the Expression of the Matrix Metalloproteinase-7 in Human Colorectal Cancer." *The American Journal of Pathology* **155**(4): 1033-1038.
- Bréchet, N., E. Gomez, M. Bignon, J. Khallou-Laschet, M. Dussiot, A. Cazes, C. Alanio-Bréchet, M. Durand, J. Philippe, J.-S. Silvestre, N. Van Rooijen, P. Corvol, A. Nicoletti, B. Chazaud and S. Germain (2008). "Modulation of Macrophage Activation State Protects Tissue from Necrosis during Critical Limb Ischemia in Thrombospondin-1-Deficient Mice." *Plos one* **3**(12): e3950.
- Carron, C., A. Pascal, A. Djiane, J. Boucaut, D. Shi and M. Umbhauer (2003). "Frizzled receptor dimerization is sufficient to activate the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway." *Journal of cell science* **116**(12): 2541-2550.
- Cattelino, A., S. Liebner, R. Gallini, A. Zanetti, G. Balconi, A. Corsi, P. Bianco, H. Wolburg, R. Moore, B. Oreda, R. Kemler and E. Dejana (2003). "The conditional inactivation of the beta-catenin gene in endothelial cells causes a defective vascular pattern and increased vascular fragility." *J Cell Biol* **162**(6): 1111-1122.
- Checchin, D., F. Sennlaub, E. Levavasseur, M. Leduc and S. Chemtob (2006). "Potential role of microglia in retinal blood vessel formation." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**(8): 3595-3602.
- Chen, C. M., W. Strapps, A. Tomlinson and G. Struhl (2004). "Evidence that the cysteine-rich domain of Drosophila Frizzled family receptors is dispensable for transducing Wingless." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(45): 15961-15966.
- Chien\*, A. J., W. H. Conrad and R. T. Moon (2009). "A Wnt survival guide: from flies to human disease." *J Invest Dermatol* **129**(7): 1614-1627.
- Cho, D. I., M. R. Kim, H. Y. Jeong, H. C. Jeong, M. H. Jeong, S. H. Yoon, Y. S. Kim and Y. Ahn (2014). "Mesenchymal stem cells reciprocally regulate the M1/M2 balance in mouse bone marrow-derived macrophages." *Exp Mol Med* **46**: e70.
- Christensen\*, A. D. and C. Haase (2012). "Immunological mechanisms of contact hypersensitivity in mice." *APMIS* **120**(1): 1-27.
- Christman II, M. A., D. J. Goetz, E. Dickerson, K. D. McCall, C. J. Lewis, F. Benencia, M. J. Silver, L. D. Kohn and R. Malgor (2008). "Wnt5a is expressed in murine and human atherosclerotic lesions." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **294**(6): 2864-2870.
- Cinèl\*, I. and S. M. Opal (2009). "Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer." *Crit Care Med* **37**(1): 291-304.
- Cliffe, A., F. Hamada and M. Bienz (2003). "A Role of Dishevelled in Relocating Axin to the Plasma Membrane during Wingless Signaling." *Current Biology* **13**(11): 960-966.
- Cochain, C., M. P. Rodero, J. Vilar, A. Recalde, A. L. Richart, C. Loinard, Y. Zouggari, C. Guerin, M. Duriez, B. Combadiere, L. Poupel, B. I. Levy, Z. Mallat, C. Combadiere and J. S. Silvestre (2010). "Regulation of monocyte subset systemic levels by distinct chemokine receptors controls post-ischaemic neovascularization." *Cardiovasc Res* **88**(1): 186-195.
- Cong, F., L. Schweizer and H. Varmus (2004). "Wnt signals across the plasma membrane to activate the beta-catenin pathway by forming oligomers containing its receptors, Frizzled and LRP." *Development* **131**(20): 5103-5115.
- Connor, K. M., N. M. Krahe, R. J. Dennison, C. M. Aderman, J. Chen, K. I. Guerin, P. Sapiéha, A. Stahl, K. L. Willett and L. E. Smith (2009). "Quantification of oxygen-induced retinopathy in the mouse: a model of vessel loss, vessel regrowth and pathological angiogenesis." *Nat Protoc* **4**(11): 1565-1573.
- Couffinhal, T., M. Silver, L. P. Zheng, M. Kearney, B. Witzgenbichler and J. M. Isner (1998). "Mouse Model of Angiogenesis." *American Journal of Pathology* **152**(6): 1667-1679.

- Cramer, T., Y. Yamanishi, B. E. Clausen, I. Förster, R. Pawlinski, N. Mackman, V. H. Haase, R. Jaenisch, M. Corr, V. Nizet, G. S. Firestein, H.-P. Gerber, N. Ferrara and R. S. Johnson (2003). "HIF-1 $\alpha$  Is Essential for Myeloid Cell-Mediated Inflammation." *Cell* **112**(5): 645-657.
- Crowther\* M., N. J. B., E. T. Bishop, and C. E. Lewis (2001). "Microenvironmental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wounds and malignant tumors." *Journal of Leukocyte Biology* **70**(4): 478-490.
- Daneman, R., D. Agalliu, L. Zhou, F. Kuhnert, C. Kuo and B. Barres (2009). "Wnt/beta-catenin signaling is required for CNS, but not non-CNS, angiogenesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**(15): 6422-6422.
- Davis, M. J., T. M. Tsang, Y. Qiu, J. K. Dayrit, J. B. Freij, G. B. Huffnagle and M. A. Olszewski (2013). "Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* infection." *MBio* **4**(3): e00264-00213.
- De Palma, M., C. Murdoch, M. A. Venneri, L. Naldini and C. E. Lewis (2007). "Tie2-expressing monocytes: regulation of tumor angiogenesis and therapeutic implications." *Trends Immunol* **28**(12): 519-524.
- De Palma, M., M. A. Venneri, R. Galli, L. Sergi Sergi, L. S. Politi, M. Sampaolesi and L. Naldini (2005). "Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors." *Cancer Cell* **8**(3): 211-226.
- Deng, B., M. Wehling-Henricks, S. A. Villalta, Y. Wang and J. G. Tidball (2012). "IL-10 triggers changes in macrophage phenotype that promote muscle growth and regeneration." *J Immunol* **189**(7): 3669-3680.
- Descamps, B., R. Sewduth, N. Ferreira Tojais, B. Jaspard, A. Reynaud, F. Sohet, P. Lacolley, C. Allieres, J. M. Lamaziere, C. Moreau, P. Dufourcq, T. Couffignal and C. Duplaa (2012). "Frizzled 4 regulates arterial network organization through noncanonical Wnt/planar cell polarity signaling." *Circ Res* **110**(1): 47-58.
- Diaz-Araya CM, P. J., Penfold PL (1995). "Ontogeny and cellular expression of MHC and leucocyte antigens in human retina." *Glia* **15**(4): 458-470.
- Dissanayake, S. K., M. Wade, C. E. Johnson, M. P. O'Connell, P. D. Leotlela, A. D. French, K. V. Shah, K. J. Hewitt, D. T. Rosenthal, F. E. Indig, Y. Jiang, B. J. Nickoloff, D. D. Taub, J. M. Trent, R. T. Moon, M. Bittner and A. T. Weeraratna (2007). "The Wnt5A/protein kinase C pathway mediates motility in melanoma cells via the inhibition of metastasis suppressors and initiation of an epithelial to mesenchymal transition." *J Biol Chem* **282**(23): 17259-17271.
- Djiane, A., J. Riou, M. Umbhauer, J. Boucaut and D. Shi (2000). "Role of frizzled 7 in the regulation of convergent extension movements during gastrulation in *Xenopus laevis*." *Development* **127**(14): 3091-3100.
- Duan, Y., A. P. Liao, S. Kuppireddi, Z. Ye, M. J. Ciancio and J. Sun (2007). "beta-Catenin activity negatively regulates bacteria-induced inflammation." *Lab Invest* **87**(6): 613-624.
- Dufourcq, P., T. Couffignal, J. Ezan, L. Barandon, C. Moreau, D. Daret and C. Duplaa (2002). "FrzA, a Secreted Frizzled Related Protein, Induced angiogenic response." *Circulation* **106**(24): 3097-3103.
- Dufourcq, P., L. Leroux, J. Ezan, B. Descamps, J. M. Lamaziere, P. Costet, C. Basoni, C. Moreau, U. Deutsch, T. Couffignal and C. Duplaa (2008). "Regulation of endothelial cell cytoskeletal reorganization by a secreted frizzled-related protein-1 and frizzled 4- and frizzled 7-dependent pathway: role in neovessel formation." *Am J Pathol* **172**(1): 37-49.
- Duluc, D., Y. Delneste, F. Tan, M. Moles, L. Grimaud, J. Lenoir, L. Preisser, I. Anegon, L. Catala, N. Ifrah, P. Descamps, E. Gamelin, H. Gascan, M. Hebbar and P. Jeannin (2007). "Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells." *Blood* **110**(13): 4319-4330.
- Duplaa, C., B. Jaspard, C. Moreau and P. A. D'Amore (1999). "Identification and Cloning of a Secreted Protein Related to the Cysteine-Rich Domain of Frizzled: Evidence for a Role in Endothelial Cell Growth Control." *Circulation Research* **84**(12): 1433-1445.
- Edwards, J. P., X. Zhang, K. A. Frauwirth and D. M. Mosser (2006). "Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations." *J Leukoc Biol* **80**(6): 1298-1307.

- Emanuelli, C. and N. Kränkel (2013). "You can teach an old dog new tricks angiopoietin-1 instructs Tie2<sup>pos</sup> myeloid cells to promote neovascularization in ischemic limbs." EMBO Molecular medicine **5**(6): 802-804.
- Ezan, J., L. Leroux, L. Barandon, P. Dufourcq, B. Jaspard, C. Moreau, C. Allieres, D. Daret, T. Couffignal and C. Duplaa (2004). "FrzA/sFRP-1, a secreted antagonist of the Wnt-Frizzled pathway, controls vascular cell proliferation in vitro and in vivo." Cardiovasc Res **63**(4): 731-738.
- Fantin, A., J. M. Vieira, G. Gestri, L. Denti, Q. Schwarz, S. Prykhozij, F. Peri, S. W. Wilson and C. Ruhrberg (2010). "Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction." Blood **116**(5): 829-840.
- Fanto\*, M. and H. McNeill (2004). "Planar polarity from flies to vertebrates." Journal of Cell Science **117**(4): 527-533.
- Ferrante, C. J. and S. J. Leibovich (2012). "Regulation of Macrophage Polarization and Wound Healing." Adv Wound Care (New Rochelle) **1**(1): 10-16.
- Ferreira Tojais, N., C. Peghaire, N. Franzl, F. Larrieu-Lahargue, B. Jaspard, A. Reynaud, C. Moreau, T. Couffignal, C. Duplaa and P. Dufourcq (2014). "Frizzled7 controls vascular permeability through the Wnt-canonical pathway and cross-talk with endothelial cell junction complexes." Cardiovasc Res **103**(2): 291-303.
- Filali, M., N. Cheng, D. Abbott, V. Leontiev and J. F. Engelhardt (2002). "Wnt-3A/beta-catenin signaling induces transcription from the LEF-1 promoter." J Biol Chem **277**(36): 33398-33410.
- Frangogiannis\*, N. G. (2008). "The immune system and cardiac repair." Pharmacol Res **58**(2): 88-111.
- Frangogiannis\*, N. G., C. W. Smith and M. L. Entman (2002). "The inflammatory response in myocardial infarction." Cardiovascular Research **53**(1): 31-47.
- Fredriksson, R., M. C. Lagerström, L.-G. Lundin and H. B. Schiöth (2003). "The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogon Groups, and Fingerprints." Molecular Pharmacology **63**(6): 1256-1272.
- Fujii, N., L. You, Z. Xu, K. Uematsu, J. Shan, B. He, I. Mikami, L. R. Edmondson, G. Neale, J. Zheng, R. K. Guy and D. M. Jablons (2007). "An antagonist of dishevelled protein-protein interaction suppresses beta-catenin-dependent tumor cell growth." Cancer Res **67**(2): 573-579.
- Garmy-Susini, B., C. J. Avraamides, M. C. Schmid, P. Foubert, L. G. Ellies, L. Barnes, C. Feral, T. Papayannopoulou, A. Lowy, S. L. Blair, D. Cheresch, M. Ginsberg and J. A. Varner (2010). "Integrin alpha4beta1 signaling is required for lymphangiogenesis and tumor metastasis." Cancer Res **70**(8): 3042-3051.
- George\*, S. J. (2008). "Wnt pathway: a new role in regulation of inflammation." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**(3): 400-402.
- Gerber, J. S. and D. M. Mosser (2001). "Reversing Lipopolysaccharide Toxicity by Ligating the Macrophage Fc Receptors." The Journal of Immunology **166**(11): 6861-6868.
- Germain\*, S., C. Monnot, L. Muller and A. Eichmann (2010). "Hypoxia-driven angiogenesis: role of tip cells and extracellular matrix scaffolding." Curr Opin Hematol **17**(3): 245-251.
- Gessert, S. and M. Kuhl (2010). "The multiple phases and faces of wnt signaling during cardiac differentiation and development." Circ Res **107**(2): 186-199.
- Golub\*, R. and A. Cumano (2013). "Embryonic hematopoiesis." Blood Cells Mol Dis **51**(4): 226-231.
- Goodwin, A. M., K. M. Sullivan and P. A. D'Amore (2006). "Cultured endothelial cells display endogenous activation of the canonical Wnt signaling pathway and express multiple ligands, receptors, and secreted modulators of Wnt signaling." Dev Dyn **235**(11): 3110-3120.
- Goren, I., N. Allmann, N. Yogev, C. Schurmann, A. Linke, M. Holdener, A. Waisman, J. Pfeilschifter and S. Frank (2009). "A transgenic mouse model of inducible macrophage depletion: effects of diphtheria toxin-driven lysozyme M-specific cell lineage ablation on wound inflammatory, angiogenic, and contractive processes." Am J Pathol **175**(1): 132-147.

- Gratchev, A., P. Guillot, N. Hakiy, O. Politz, C. Orfanos, K. Schledzewski and S. Goerdts (2001). "Alternatively activated macrophages differentially express fibronectin and its splice variants and the extracellular matrix protein betaIG-H3." Scand J Immunol **53**(4): 386-392.
- Gregorieff, A., D. Pinto, H. Begthel, O. Destrée, M. Kielman and H. Clevers (2005). "Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine." Gastroenterology **129**(2): 626-638.
- Gudjonsson, J. E., A. Johnston, S. W. Stoll, M. B. Riblett, X. Xing, J. J. Kochkodan, J. Ding, R. P. Nair, A. Aphale, J. J. Voorhees and J. T. Elder (2010). "Evidence for altered Wnt signaling in psoriatic skin." Invest Dermatol **130**(7): 1849-1859.
- Guo, N., C. Hawkins and J. Nathans (2004). "Frizzled6 controls hair patterning in mice." Proc Natl Acad Sci USA **101**(25): 9277-9281.
- Habas, R., I. B. Dawid and X. He (2003). "Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation." Genes Dev **17**(2): 295-309.
- Habas, R., Y. Kato and X. He (2001). "Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel Formin homology protein Daam1." Cell **107**(7): 843-854.
- Hamm, A., L. Veschini, Y. Takeda, S. Costa, E. Delamarre, M. L. Squadrito, A.-T. Henze, M. Wenes, J. Serneels, F. Pucci, C. Roncal, A. Anisimov, K. Alitalo, M. De Palma and M. Mazzone (2013). "PHD2 regulates arteriogenic macrophages through TIE2 signalling." EMBO Molecular Medicine **5**(6): 843-857.
- Hanada\*, T. and A. Yoshimura (2002). "Regulation of cytokine signaling in inflammation." Cytokine 1 Growth Factor Reviews **13**(4-5): 413-421.
- Hao\*, N. B., M. H. Lu, Y. H. Fan, Y. L. Cao, Z. R. Zhang and S. M. Yang (2012). "Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors." Clin Dev Immunol **2012**: 948098.
- Harvey\*, N. L. and E. J. Gordon (2012). "Deciphering the roles of macrophages in developmental and inflammation stimulated lymphangiogenesis." Vascular Cell **4**(1): 15.
- He, T. (1998). "Identification of c-MYC as a Target of the APC Pathway." Science **281**(5382): 1509-1512.
- Hesse, M., M. Modolell, A. C. La Flamme, M. Schito, J. M. Fuentes, A. W. Cheever, E. J. Pearce and T. A. Wynn (2001). "Differential Regulation of Nitric Oxide Synthase-2 and Arginase-1 by Type 1/Type 2 Cytokines In Vivo: Granulomatous Pathology Is Shaped by the Pattern of L-Arginine Metabolism." The Journal of Immunology **167**(11): 6533-6544.
- Hinoi, T., H. Yamamoto, M. Kishida, S. Takada, S. Kishida and A. Kikuchi (2000). "Complex formation of adenomatous polyposis coli gene product and axin facilitates glycogen synthase kinase-3 beta-dependent phosphorylation of beta-catenin and down-regulates beta-catenin." J Biol Chem **275**(44): 34399-34406.
- Hoeksema\*, M. A., J. L. Stoger and M. P. de Winther (2012). "Molecular pathways regulating macrophage polarization: implications for atherosclerosis." Curr Atheroscler Rep **14**(3): 254-263.
- Huelsken\*, J. and W. Birchmeier (2001). "New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates." Current opinion in genetics & development **11**(5): 547-553.
- Ishikawa, T., Y. Tamai, A. Zorn, H. Yoshida, M. Seldin, S. Nishikawa and M. Taketo (2001). "Mouse Wnt receptor gene Fzd5 is essential for yolk sac and placental angiogenesis." Development **128**(1): 25-33.
- Jackson\*, J. R., M. P. Seed, C. H. Kircher, D. A. Willoughby and J. D. Winkler (1997). "The codependance of angiogenesis and chronic inflammation " The FASEB Journal **11**(6): 457-465.
- Jaspard, B., T. Couffignal, P. Dufourcq, C. Moreau and C. Duplaa (2000). "Expression pattern of mouse sFRP-1 and mWnt-8 gene during heart morphogenesis." Mechanisms of development **90**(2): 263-267.
- Jho, E. h., T. Zhang, C. Domon, C. K. Joo, J. N. Freund and F. Costantini (2002). "Wnt/ -Catenin/Tcf Signaling Induces the Transcription of Axin2, a Negative Regulator of the Signaling Pathway." Molecular and Cellular Biology **22**(4): 1172-1183.
- Jiang, M., W. Ku, J. Fu, S. Offermanns, W. Hsu and J. Que (2013). "Gpr177 regulates pulmonary vasculature development." Development **140**(17): 3589-3594.

- Jin, H., J. Su, B. Garmy-Susini, J. Kleeman and J. Varner (2006). "Integrin alpha4beta1 promotes monocyte trafficking and angiogenesis in tumors." Cancer Res **66**(4): 2146-2152.
- Ju, R., P. Cirone, S. Lin, H. Griesbach, D. C. Slusarski and C. M. Crews (2010). "Activation of the planar cell polarity formin DAAM1 leads to inhibition of endothelial cell proliferation, migration, and angiogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(15): 6906-6911.
- Kataoka K., H. K. Koji M. Nishiguchi, Nico van Rooijen, Shu Kachi, and a. H. Terasaki (2011). "The Roles of Vitreal Macrophages and Circulating Leukocytes in Retinal Neovascularization." Investigative ophthalmology & visual science **52**(3): 1431-1438.
- Katoh, M. and M. Katoh (2007). "Comparative integromics on FZD7 orthologs: conserved binding sites for PU.1, SP1, CCAAT-box and TCF/LEF/SOX transcription factors within 5'-promoter region of mammalian FZD7 orthologs." Int J Mol Med **19**(3): 529-533.
- Kemp, C. R., E. Willems, D. Wawrzak, M. Hendrickx, T. Agbor Agbor and L. Leyns (2007). "Expression of Frizzled5, Frizzled7, and Frizzled10 during early mouse development and interactions with canonical Wnt signaling." Developmental Dynamics **236**(7): 2011-2019.
- Kharraz\*, Y., J. Guerra, C. J. Mann, A. L. Serrano and P. Munoz-Canoves (2013). "Macrophage plasticity and the role of inflammation in skeletal muscle repair." Mediators Inflamm **2013**: 491497.
- Kikuchi\*, A., S. Kishida and H. Yamamoto (2006). "Regulation of Wnt signaling by protein-protein interaction and post-translational modifications." Experimental and Molecular Medicine **38**(1): 1-10.
- Kikuchi\*, A., H. Yamamoto and S. Kishida (2007). "Multiplicity of the interactions of Wnt proteins and their receptors." Cell Signal **19**(4): 659-671.
- Kim, G. H., J. H. Her and J. K. Han (2008). "Ryk cooperates with Frizzled 7 to promote Wnt11-mediated endocytosis and is essential for *Xenopus laevis* convergent extension movements." J Cell Biol **182**(6): 1073-1082.
- Kim, J., J. Kim, D. W. Kim, Y. Ha, M. H. Ihm, H. Kim, K. Song and I. Lee (2010). "Wnt5a induces endothelial inflammation via beta-catenin-independent signaling." J Immunol **185**(2): 1274-1282.
- Kimelman\*, D. and W. Xu (2006). "beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective." Oncogene **25**(57): 7482-7491.
- Kirikoshi, H., H. Sekihara and M. Katoh (2001). "Up-regulation of Frizzled-7 (FZD7) in human gastric cancer." Int J Oncol **19**(1): 111-115.
- Knowlton, M. and G. Kelly (2004). "Zebrafish Mir antagonizes Frizzled 7-induced gastrulation defects." Zebrafish **1**(2): 133-144.
- Kosinski, C., V. S. Li, A. S. Chan, J. Zhang, C. Ho, W. Y. Tsui, T. L. Chan, R. C. Mifflin, D. W. Powell, S. T. Yuen, S. Y. Leung and X. Chen (2007). "Gene expression patterns of human colon tops and basal crypts and BMP antagonists as intestinal stem cell niche factors." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(39): 15418-15423.
- Kubota, Y., K. Takubo, T. Shimizu, H. Ohno, K. Kishi, M. Shibuya, H. Saya and T. Suda (2009). "M-CSF inhibition selectively targets pathological angiogenesis and lymphangiogenesis." J Exp Med **206**(5): 1089-1102.
- Labonte\*, A. C., A. C. Tosello-Trampont and Y. S. Hahn (2014). "The role of macrophage polarization in infectious and inflammatory diseases." Mol Cells **37**(4): 275-285.
- Lange-Asschenfeldt, B., W. Weninger, P. Velasco, T. R. Kyriakides, U. H. Von Andrian, P. Bornstein and M. Detmar (2002). "Increased and prolonged inflammation and angiogenesis in delayed-type hypersensitivity reactions elicited in the skin of thrombospondin-2-deficient mice." Blood **99**(2): 538-545.
- Lee, H., S. Bae, B. W. Choi and Y. Yoon (2012). "WNT/beta-catenin pathway is modulated in asthma patients and LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cell line." Immunopharmacol Immunotoxicol **34**(1): 56-65.
- Leroux, L., B. Descamps, N. F. Tojais, B. Seguy, P. Oses, C. Moreau, D. Daret, Z. Ivanovic, J. M. Boiron, J. M. Lamaziere, P. Dufourcq, T. Couffignal and C. Duplaa (2010). "Hypoxia preconditioned mesenchymal

- stem cells improve vascular and skeletal muscle fiber regeneration after ischemia through a Wnt4-dependent pathway." *Mol Ther* **18**(8): 1545-1552.
- Lin, E. Y., J. F. Li, L. Gnatovskiy, Y. Deng, L. Zhu, D. A. Grzesik, H. Qian, X. N. Xue and J. W. Pollard (2006). "Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer." *Cancer Res* **66**(23): 11238-11246.
- Lingen\*, M. (2001). "Role of Leukocytes and Endothelial Cells in the Development of Angiogenesis in Inflammation and Wound Healing." *Arch Pathol Lab Med* **125**(1): 67-71.
- Linker, C., C. Lesbros, J. Gros, L. W. Burrus, A. Rawls and C. Marcelle (2005). "beta-Catenin-dependent Wnt signalling controls the epithelial organisation of somites through the activation of paraxis." *Development* **132**(17): 3895-3905.
- Liu\*, Y. C., X. B. Zou, Y. F. Chai and Y. M. Yao (2014). "Macrophage polarization in inflammatory diseases." *Int J Biol Sci* **10**(5): 520-529.
- Lobov, I. B., S. Rao, T. J. Carroll, J. E. Vallance, M. Ito, J. K. Ondr, S. Kurup, D. A. Glass, M. S. Patel, W. Shu, E. E. Morrissey, A. P. McMahon, G. Karsenty and R. A. Lang (2005). "WNT7b mediates macrophage-induced programmed cell death in patterning of the vasculature." *Nature* **437**(7057): 417-421.
- Logan\*, C. Y. and R. Nusse (2004). "The Wnt signaling pathway in development and disease." *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**: 781-810.
- Lucas, T., A. Waisman, R. Ranjan, J. Roes, T. Krieg, W. Muller, A. Roers and S. A. Eming (2010). "Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair." *J Immunol* **184**(7): 3964-3977.
- Luis\*, T. C., N. M. Killmann and F. J. Staal (2012). "Signal transduction pathways regulating hematopoietic stem cell biology: introduction to a series of Spotlight Reviews." *Leukemia* **26**(1): 86-90.
- MacDonald\*, B. T., K. Tamai and X. He (2009). "Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases." *Dev Cell* **17**(1): 9-26.
- Mackay\*, I. and F. S. Rosen (2000). "The Immune System: First of Two Parts." *Advances in Immunology* **343**(1): 37-49.
- Mann, B., M. Gelos, A. Siedow, M. Hanski, A. Gratchev, M. Ilyas, W. F. Bodmer, M. P. Moyer, E. O. Riecken, H. J. Buhr and C. Hanski (1999). "Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas." *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**(4): 1603-1608.
- Mantovani\*, A., A. Sica, S. Sozzani, P. Allavena, A. Vecchi and M. Locati (2004). "The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization." *Trends Immunol* **25**(12): 677-686.
- Marchetti, V., O. Yanes, E. Aguilar, M. Wang, D. Friedlander, S. Moreno, K. Storm, M. Zhan, S. Naccache, G. Nemerow, G. Siuzdak and M. Friedlander (2011). "Differential macrophage polarization promotes tissue remodeling and repair in a model of ischemic retinopathy." *Sci Rep* **1**: 76.
- Martinez\*, F., A. Sica, A. Mantovani and M. Locati (2008). "Macrophage activation and polarization." *Front Biosci* **13**: 453-461.
- Maruyama, K., M. Ii, C. Cursiefen, D. G. Jackson, H. Keino, M. Tomita, N. Van Rooijen, H. Takenaka, P. A. D'Amore, J. Stein-Streilein, D. W. Losordo and J. W. Streilein (2005). "Inflammation-induced lymphangiogenesis in the cornea arises from CD11b-positive macrophages." *J Clin Invest* **115**(9): 2363-2372.
- Mazzieri, R., F. Pucci, D. Moi, E. Zonari, A. Ranghetti, A. Berti, L. S. Politi, B. Gentner, J. L. Brown, L. Naldini and M. De Palma (2011). "Targeting the ANG2/TIE2 axis inhibits tumor growth and metastasis by impairing angiogenesis and disabling rebounds of proangiogenic myeloid cells." *Cancer Cell* **19**(4): 512-526.
- Medina, A. and H. Steinbeisser (2000). "Interaction of Frizzled 7 and Dishevelled in *Xenopus*." *Dev Dyn.* **218**(4): 671-680.
- Medina, A., R. Swain, K. Kuerner and H. Steinbeisser (2004). "Xenopus paraxial protocadherin has signaling functions and is involved in tissue separation." *The EMBO Journal* **23**(16): 3249-3258.
- Mei, H., M. N. Nakatsu, E. R. Baclagon and S. X. Deng (2014). "Frizzled 7 maintains the undifferentiated state of human limbal stem/progenitor cells." *Stem Cells* **32**(4): 938-945.

- Melchior, K., J. Weiss, H. Zaehres, Y. Kim, C. Lutzko, N. Roosta, J. Hescheler and M. Müschen (2008). "The WNT receptor FZD7 contributes to self-renewal signaling of human embryonic stem cells." Biological Chemistry **389**(7): 897-903.
- Merle, P., S. De la Monte, M. Kim, M. Herrmann, S. Tanaka, A. Von Dem Bussche, M. C. Kew, C. Trepo and J. R. Wands (2004). "Functional consequences of frizzled-7 receptor overexpression in human hepatocellular carcinoma." Gastroenterology **127**(4): 1110-1122.
- Merle, P., M. Kim, M. Herrmann, A. Gupte, L. Lefrancois, S. Califano, C. Trepo, S. Tanaka, L. Vitvitski, S. de la Monte and J. R. Wands (2005). "Oncogenic role of the frizzled-7/beta-catenin pathway in hepatocellular carcinoma." J Hepatol **43**(5): 854-862.
- Mikels\*, A. J. and R. Nusse (2006). "Wnts as ligands: processing, secretion and reception." Oncogene **25**(57): 7461-7468.
- Mirza, R., L. A. DiPietro and T. J. Koh (2009). "Selective and specific macrophage ablation is detrimental to wound healing in mice." Am J Pathol **175**(6): 2454-2462.
- Monkley, S., S. Delaney, D. Pennisi, J. Christiansen and B. Wainwright (1996). "Targeted disruption of the Wnt2 gene results in placentation defects." Development **122**(11): 3343-3353.
- Montcouquiol, M., R. Rachel, P. Lanford, N. Copeland, N. Jenkins and M. Kelley (2003). "Identification of Vangl2 and Scrb1 as planar polarity genes in mammals." Nature **423**(6936): 173-177.
- Mosser\*, D. M. (2003). "The many faces of macrophage activation." Journal of Leukocyte Biology **73**(2): 209-212.
- Mosser\*, D. M. and J. P. Edwards (2008). "Exploring the full spectrum of macrophage activation." Nat Rev Immunol **8**(12): 958-969.
- Nam, J. S., C. Chakraborty, A. R. Sharma, Y. Her, K. J. Bae, G. Sharma, G. P. Doss, S. S. Lee, M. S. Hong and D. K. Song (2014). "Effect of Wnt3a on keratinocytes utilizing in vitro and bioinformatics analysis." Int J Mol Sci **15**(4): 5472-5495.
- Nambotin, S. B., L. Lefrancois, X. Sainsily, P. Berthillon, M. Kim, J. R. Wands, M. Chevallier, P. Jalinet, J. Y. Scoazec, C. Trepo, F. Zoulim and P. Merle (2011). "Pharmacological inhibition of Frizzled-7 displays anti-tumor properties in hepatocellular carcinoma." J Hepatol **54**(2): 288-299.
- Nathan, C., H. Murray, M. Wiebe and B. Rubin (1983). "Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity." J Exp Med **158**(3): 670-689.
- Nelson\*, W. J. and R. Nusse (2004). "Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways." Science **303**(5663): 1483-1487.
- Neumann, J., K. Schaale, K. Farhat, T. Endermann, A. J. Ulmer, S. Ehlers and N. Reiling (2010). "Frizzled1 is a marker of inflammatory macrophages, and its ligand Wnt3a is involved in reprogramming Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages." FASEB J **24**(11): 4599-4612.
- Novak\*, M. L. and T. J. Koh (2013). "Phenotypic transitions of macrophages orchestrate tissue repair." Am J Pathol **183**(5): 1352-1363.
- Oses, P., M. A. Renault, R. Chauvel, L. Leroux, C. Allieres, B. Seguy, J. M. Lamaziere, P. Dufourcq, T. Couffinal and C. Duplaa (2009). "Mapping 3-dimensional neovessel organization steps using micro-computed tomography in a murine model of hindlimb ischemia-brief report." Arterioscler Thromb Vasc Biol **29**(12): 2090-2092.
- Ottz, H. H., I. W. Tattersall, N. M. Kofler, N. Steinbach and J. Kitajewski (2011). "Notch1 controls macrophage recruitment and Notch signaling is activated at sites of endothelial cell anastomosis during retinal angiogenesis in mice." Blood **118**(12): 3436-3439.
- Owen\*, J. P., Jenni, Stranford, Sharon A. (2014). "Immunologie - 7e édition: Le cours de Janis Kuby." Dunod.
- Patel, A. S., A. Smith, S. Nucera, D. Biziato, P. Saha, R. Q. Attia, J. Humphries, K. Mattock, S. P. Grover, O. T. Lyons, L. G. Guidotti, R. Siow, A. Ivetic, S. Egginton, M. Waltham, L. Naldini, M. De Palma and B. Modarai (2013). "Tie2 expressing monocytes/macrophages regulate revascularisation of the ischemic limb." EMBO Molecular Medicine **5**(6): 858-869.

- Peiser\*, M. (2013). "Role of Th17 cells in skin inflammation of allergic contact dermatitis." Clin Dev Immunol **2013**: 261037.
- Penzo-Mendèz, A., M. Umbhauer, A. Djiane, J.-C. Boucaut and J.-F. Riou (2003). "Activation of G $\beta$ y signaling downstream of Wnt-11/Xfz7 regulates Cdc42 activity during Xenopus gastrulation." Developmental Biology **257**(2): 302-314.
- Pereira, C., D. J. Schaer, E. B. Bachli, M. O. Kurrer and G. Schoedon (2008). "Wnt5A/CaMKII signaling contributes to the inflammatory response of macrophages and is a target for the antiinflammatory action of activated protein C and interleukin-10." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**(3): 504-510.
- Phng, L. K., M. Potente, J. D. Leslie, J. Babbage, D. Nyqvist, I. Lobov, J. K. Ondr, S. Rao, R. A. Lang, G. Thurston and H. Gerhardt (2009). "Nrarp coordinates endothelial Notch and Wnt signaling to control vessel density in angiogenesis." Dev Cell **16**(1): 70-82.
- Pollard\*, J. W. (2009). "Trophic macrophages in development and disease." Nat Rev Immunol **9**(4): 259-270.
- Pongracz\*, J. E. and R. A. Stockley (2006). "Wnt signalling in lung development and diseases." Respir Res **7**: 15.
- Povelones, M. and R. Nusse (2005). "The role of the cysteine-rich domain of Frizzled in Wingless-Armadillo signaling." The EMBO Journal **24**(19): 3493-3503.
- Pucci, F., M. A. Venneri, D. Biziato, A. Nonis, D. Moi, A. Sica, C. Di Serio, L. Naldini and M. De Palma (2009). "A distinguishing gene signature shared by tumor-infiltrating Tie2-expressing monocytes, blood "resident" monocytes, and embryonic macrophages suggests common functions and developmental relationships." Blood **114**(4): 901-914.
- Pukrop, T., F. Klemm, T. Hagemann, D. Gradl, M. Schulz, S. Siemes, L. Trumper and C. Binder (2006). "Wnt 5a signaling is critical for macrophage-induced invasion of breast cancer cell lines." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(14): 5454-5459.
- Raes, G., P. De Baetselier, W. Noel, A. Beschin, F. Brombacher and a. G. H. Gh. (2002). "Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages." Journal of Leukocyte Biology **71**(4): 597-602.
- Reischl, J., S. Schwenke, J. M. Beekman, U. Mrowietz, S. Sturzebecher and J. F. Heubach (2007). "Increased expression of Wnt5a in psoriatic plaques." J Invest Dermatol **127**(1): 163-169.
- Riabov\*, V., A. Gudima, N. Wang, A. Mickley, A. Orekhov and J. Kzhyshkowska (2014). "Role of tumor associated macrophages in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis." Front Physiol **5**: 75.
- Romanowska, M., A. Evans, D. Kellock, S. E. Bray, K. McLean, S. Donandt and J. Foerster (2009). "Wnt5a exhibits layer-specific expression in adult skin, is upregulated in psoriasis, and synergizes with type 1 interferon." PLoS One **4**(4): e5354.
- Rymo, S. F., H. Gerhardt, F. Wolfhagen Sand, R. Lang, A. Uv and C. Betsholtz (2011). "A two-way communication between microglial cells and angiogenic sprouts regulates angiogenesis in aortic ring cultures." PLoS One **6**(1): e15846.
- Saclier, M., H. Yacoub-Youssef, A. Mackey, L. Arnold, H. Ardjoune, M. Magnan, F. Sailhan, J. Chelly, G. Pavlath, R. Mounier, M. Kjaer and B. Chazaud (2013). "Differentially activated macrophages orchestrate myogenic precursor cell fate during human skeletal muscle regeneration." Stem Cells **31**(2): 384-396.
- Sagara, N., G. Toda, M. Hirai, M. Terada and M. Katoh (1998). "Molecular cloning, differential expression, and chromosomal localization of human frizzled-1, frizzled-2, and frizzled-7." Biochem Biophys Res Commun **252**(1): 117-122.
- Satriano\*, J. (2004). "Arginine pathways and the inflammatory response: interregulation of nitric oxide and polyamines: review article." Amino Acids **26**(4): 321-329.
- Schaale\*, K., J. Neumann, D. Schneider, S. Ehlers and N. Reiling (2011). "Wnt signaling in macrophages: augmenting and inhibiting mycobacteria-induced inflammatory responses." Eur J Cell Biol **90**(6-7): 553-559.
- Schmid\*, M. C. and J. A. Varner (2012). "Myeloid cells in tumor inflammation." Vascular Cell **4**(1): 14.

- Schoppmann, S. F., P. Birner, J. Stöckl, R. Kalt, R. Ullrich, R. Caucig, E. Kriehuber, K. Nagy, K. Alitalo and D. Kerjaschki (2002). "Tumor-Associated Macrophages Express Lymphatic endothelial growth factors and related to peritumoral lymphangiogenesis." *American Journal of Pathology* **161**(3): 947-956.
- Schulte\*, G. and V. Bryja (2007). "The Frizzled family of unconventional G-protein-coupled receptors." *Trends Pharmacol Sci* **28**(10): 518-525.
- Sen, M. and G. Ghosh (2008). "Transcriptional Outcome of Wnt Frizzled Signal transduction in inflammation: Evolving Concepts." *The Journal of Immunology* **181**(7): 4441-4445.
- Sen, M., K. Lauterbach, H. El-Gabalawy, G. S. Firestein, M. Corr and D. A. Carson (2000). "Expression and function of wingless and frizzled homologs in rheumatoid arthritis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(6): 2791-2796.
- Sen\*, M. (2005). "Wnt signalling in rheumatoid arthritis." *Rheumatology (Oxford)* **44**(6): 708-713.
- Sercan, Z., M. Pehlivan and H. O. Sercan (2010). "Expression profile of WNT, FZD and sFRP genes in human hematopoietic cells." *Leuk Res* **34**(7): 946-949.
- Sica\*, A. and A. Mantovani (2012). "Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas." *J Clin Invest* **122**(3): 787-795.
- Silvestre\*, J.-S. (2007). "Angiogenèse et ischémie : aspects expérimentaux." *Journal des Maladies Vasculaires* **32**(S1): 17.
- Smith, K., T. D. Bui, R. Poulson, L. Kaklamanis, G. Williams and A. L. Harris (1999). "Up-regulation of macrophage wnt gene expression in adenoma-carcinoma progression of human colorectal cancer." *British Journal of Cancer* **81**(3): 496-502.
- Stefater, J. A., 3rd, Sujata Rao, Katie Bezold, Alfred C. Aplin, Roberto F. Nicosia, Jeffrey W. Pollard, Napoleone Ferrara and Richard A. Lang (2013). "Macrophage Wnt-Calcineurin-Flt1 signaling regulates mouse wound angiogenesis and repair." *Blood* **121**(13): 2574-2578.
- Stefater, J. A., 3rd, I. Lewkowich, S. Rao, G. Mariggi, A. C. Carpenter, A. R. Burr, J. Fan, R. Ajima, J. D. Molkentin, B. O. Williams, M. Wills-Karp, J. W. Pollard, T. Yamaguchi, N. Ferrara, H. Gerhardt and R. A. Lang (2011). "Regulation of angiogenesis by a non-canonical Wnt-Flt1 pathway in myeloid cells." *Nature* **474**(7352): 511-515.
- Stein, M., S. Keshav, N. Harris and S. Gordon (1992). "Interleukin 4 potentially enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation." *J Exp Med* **176**(1): 287-292.
- Stenman, J., J. Rajagopal, T. Carroll, M. Ishibashi, J. McMahon and A. McMahon (2008). "Canonical Wnt signaling regulates organ-specific assembly and differentiation of CNS vasculature." *Science* **322**(5905): 1247-1250.
- Striz\*, I., E. Brabcova, L. Kolesar and A. Sekerkova (2014). "Cytokine networking of innate immunity cells: a potential target of therapy." *Clin Sci (Lond)* **126**(9): 593-612.
- Sumanas, S. and S. C. Ekker (2001). "Xenopus frizzled-7 morphant displays defects in dorsoventral patterning and convergent extension movements during gastrulation." *Genesis* **30**(3): 119-122.
- Sumanas, S., P. Strege, J. Heasman and S. Ekker (2000). "The putative wnt receptor Xenopus frizzled-7 functions upstream of beta-catenin in vertebrate dorsoventral mesoderm patterning." *Development* **127**(9): 1981-1990.
- Takai\*, T. (2002). "Roles of Fc receptors in autoimmunity." *Nat Rev Immunol* **2**(8): 580-592.
- Takeda, Y., S. Costa, E. Delamarre, C. Roncal, R. Leite de Oliveira, M. L. Squadrito, V. Finisguerra, S. Deschoemaeker, F. Bruyere, M. Wenes, A. Hamm, J. Serneels, J. Magat, T. Bhattacharyya, A. Anisimov, B. F. Jordan, K. Alitalo, P. Maxwell, B. Gallez, Z. W. Zhuang, Y. Saito, M. Simons, M. De Palma and M. Mazzone (2011). "Macrophage skewing by Phd2 haploinsufficiency prevents ischaemia by inducing arteriogenesis." *Nature* **479**(7371): 122-126.
- Thepen, T., A. J. H. Van Vuuren, R. C. M. Kiekens, C. A. Damen, W. C. Vooijs and J. G. J. Van de Winkel (2000). "Resolution of cutaneous inflammation after local elimination of macrophages." *Nat Biotechnol* **18**(1): 48-51.

- Tissir, F. and A. M. Goffinet (2010). "Planar cell polarity signaling in neural development." Curr Opin Neurobiol **20**(5): 572-577.
- Toda, S., R. Hanayama and S. Nagata (2012). "Two-step engulfment of apoptotic cells." Mol Cell Biol **32**(1): 118-125.
- Tugal\*, D., X. Liao and M. K. Jain (2013). "Transcriptional control of macrophage polarization." Arterioscler Thromb Vasc Biol **33**(6): 1135-1144.
- Ueno, K., S. Hazama, S. Mitomori, M. Nishioka, Y. Suehiro, H. Hirata, M. Oka, K. Imai, R. Dahiya and Y. Hinoda (2009). "Down-regulation of frizzled-7 expression decreases survival, invasion and metastatic capabilities of colon cancer cells." Br J Cancer **101**(8): 1374-1381.
- van Es\*, J., N. Barker and H. Clevers (2003). "You Wnt some, you lose some: oncogenes in the Wnt signaling pathway." Current Opinion in Genetics and Development **13**(1): 28-33.
- Van Overmeire\*, E., D. Laoui, J. Keirsse, J. A. Van Ginderachter and A. Sarukhan (2014). "Mechanisms driving macrophage diversity and specialization in distinct tumor microenvironments and parallelisms with other tissues." Front Immunol **5**: 127.
- Venneri, M. A., M. De Palma, M. Ponzoni, F. Pucci, C. Scielzo, E. Zonari, R. Mazziere, C. Doglioni and L. Naldini (2007). "Identification of proangiogenic TIE2-expressing monocytes (TEMs) in human peripheral blood and cancer." Blood **109**(12): 5276-5285.
- Vijayaragavan, K., E. Szabo, M. Bossé, V. Ramos-Mejia, R. Moon and M. Bhatia (2009). "Noncanonical Wnt signaling orchestrates early developmental events toward hematopoietic cell fate from human embryonic stem cells." Cell Stem Cell **4**(3): 248-262.
- Vincan, E., P. Darcy, C. Farrelly, M. Faux, T. Brabletz and R. Ramsay (2007). "Frizzled-7 dictates three-dimensional organization of colorectal cancer cell carcinoids." Oncogene **26**(16): 2340-2352.
- Vinten-Johansen\*, J. (2004). "Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury." Cardiovasc Res **61**(3): 481-497.
- Vlad\*, A., S. Rohrs, L. Klein-Hitpass and O. Muller (2008). "The first five years of the Wnt targetome." Cell Signal **20**(5): 795-802.
- Wang, Y., J. Macke, B. Abella, K. Andreasson, P. Worley, D. J. Gilbert, N. G. Copeland, N. A. Jenkins and J. Nathans (1996). "A Large Family of Putative Transmembrane Receptors Homologous to the Product of the Drosophila Tissue Polarity Gene frizzled." Journal of Biological Chemistry **271**(8): 4468-4476.
- Wang\*, H. Y., T. Liu and C. C. Malbon (2006). "Structure-function analysis of Frizzleds." Cell Signal **18**(7): 934-941.
- Wang\*, Y. and J. Nathans (2007). "Tissue/planar cell polarity in vertebrates: new insights and new questions." Development **134**(4): 647-658.
- Weeraratna, A. T., M. Bittner, Y. Jiang, G. Hostetter and J. M. Trent (2002). "Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma." Cancer Cell **1**(3): 279-288.
- Wei, W., M. S. Chua, S. Grepper and S. K. So (2011). "Soluble Frizzled-7 receptor inhibits Wnt signaling and sensitizes hepatocellular carcinoma cells towards doxorubicin." Mol Cancer **10**: 16.
- Willert, J., M. Epping, J. R. Pollack, P. O. Brown and R. Nusse (2002). "A transcriptional response to Wnt protein in human embryonic carcinoma cells." BMC Developmental Biology: 2:8.
- Winklbauer, R., A. Medina, R. Swain and H. Steinbeisser (2001). "Frizzled-7 signalling controls tissue separation during Xenopus gastrulation." Nature **413**(6858): 856-860.
- Witzel, S., V. Zimyanin, F. Carreira-Barbosa, M. Tada and C. P. Heisenberg (2006). "Wnt11 controls cell contact persistence by local accumulation of Frizzled 7 at the plasma membrane." J Cell Biol **175**(5): 791-802.
- Wright, M., M. Aikawa, W. Szeto and J. Papkoff (1999). "Identification of a Wnt-responsive signal transduction pathway in primary endothelial cells." Biochem Biophys Res Commun **263**(2): 384-388.

- Wu, B., S. P. Crampton and C. C. Hughes (2007). "Wnt signaling induces matrix metalloproteinase expression and regulates T cell transmigration." *Immunity* **26**(2): 227-239.
- Wu, X., G. Deng, X. Hao, Y. Li, J. Zeng, C. Ma, Y. He, X. Liu and Y. Wang (2014). "A caspase-dependent pathway is involved in Wnt/beta-catenin signaling promoted apoptosis in Bacillus Calmette-Guerin infected RAW264.7 macrophages." *Int J Mol Sci* **15**(3): 5045-5062.
- Yan, X., A. Anzai, Y. Katsumata, T. Matsuhashi, K. Ito, J. Endo, T. Yamamoto, A. Takeshima, K. Shinmura, W. Shen, K. Fukuda and M. Sano (2013). "Temporal dynamics of cardiac immune cell accumulation following acute myocardial infarction." *J Mol Cell Cardiol* **62**: 24-35.
- Yang, F., Y.-H. Liu, X.-P. Yang, J. Xu, A. Kapke and O. A. and Carretero (2002). "Myocardial infarction and cardiac remodelling in mice." *Experimental Physiology* **87**(5): 547-555.
- Yang, L., X. Wu, Y. Wang, K. Zhang, J. Wu, Y. C. Yuan, X. Deng, L. Chen, C. C. Kim, S. Lau, G. Somlo and Y. Yen (2011). "FZD7 has a critical role in cell proliferation in triple negative breast cancer." *Oncogene* **30**(43): 4437-4446.
- Yates, L. L. and C. H. Dean (2011). "Planar polarity: A new player in both lung development and disease." *Organogenesis* **7**(3): 209-216.
- Yu, H., X. Ye, N. Guo and J. Nathans (2012). "Frizzled 2 and frizzled 7 function redundantly in convergent extension and closure of the ventricular septum and palate: evidence for a network of interacting genes." *Development* **139**(23): 4383-4394.
- Zerlin\*, M., M. A. Julius and J. Kitajewski (2008). "Wnt/Frizzled signaling in angiogenesis." *Angiogenesis* **11**(1): 63-69.
- Zhang, C., Y. Li, Y. Wu, L. Wang, X. Wang and J. Du (2013). "Interleukin-6/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) pathway is essential for macrophage infiltration and myoblast proliferation during muscle regeneration." *J Biol Chem* **288**(3): 1489-1499.
- Zhang, X., J. P. Gaspard and D. C. Chung (2001). "Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor by the Wnt and K-ras Pathways in Colonic Neoplasia." *Cancer research* **61**(16): 6050-6054.
- Zhang, X., R. Goncalves and D. M. Mosser (2008). "The isolation and characterization of murine macrophages." *Curr Protoc Immunol* **14**(14.1): 1-18.
- Zhang, Z., A. Deb, Z. Zhang, A. Pachori, W. He, J. Guo, R. Pratt and V. J. Dzau (2009). "Secreted frizzled related protein 2 protects cells from apoptosis by blocking the effect of canonical Wnt3a." *J Mol Cell Cardiol* **46**(3): 370-377.
- Zhang, Z., S. A. Rankin and A. M. Zorn (2013). "Different thresholds of Wnt-Frizzled 7 signaling coordinate proliferation, morphogenesis and fate of endoderm progenitor cells." *Dev Biol* **378**(1): 1-12.
- Zhou, M., S. Qin, Y. Chu, F. Wang, L. Chen and Y. Lu (2014). "Immunolocalization of MMP-2 and MMP-9 in human rheumatoid synovium." *Int J Clin Exp Pathol* **7**(6): 3048-3056.
- Zou, H., A. Otani, A. Oishi, Y. Yodoi, T. Kameda, H. Kojima and N. Yoshimura (2010). "Bone marrow-derived cells are differentially involved in pathological and physiological retinal angiogenesis in mice." *Biochem Biophys Res Commun* **391**(2): 1268-1273.
- Zumsteg, A., V. Baeriswyl, N. Imaizumi, R. Schwendener, C. Ruegg and G. Christofori (2009). "Myeloid cells contribute to tumor lymphangiogenesis." *PLoS One* **4**(9): e7067.

\* Les revues sont différenciées des articles par un astérisque au niveau du nom du premier auteur.

## **Expression du récepteur Frizzled7 par les macrophages : Rôle dans le contrôle de l'angiogenèse via la régulation de la polarisation macrophagique.**

Les macrophages ont un rôle majeur dans la régulation de l'inflammation. Ils sont capables de répondre rapidement aux signaux extérieurs en passant d'un état pro- à anti-inflammatoire (respectivement nommés macrophages M1 et M2). Certaines sous populations de macrophages M2 ont des propriétés angiogéniques. Parmi les voies de signalisation permettant aux macrophages de répondre aux signaux extérieurs on trouve les voies Wnt/Frizzled (Fzd). Elles reposent sur 10 récepteurs Fzd et 19 ligands Wnt. Il a été établi que les couples Wnt3a/Fzd1 et Wnt5a/Fzd5 sont impliqués dans la réponse inflammatoire des macrophages. Récemment le rôle d'une voie Wnt/Flt1 a été mis en évidence dans la régulation de l'angiogenèse, par les macrophages, lors du développement rétinien. Notre objectif de recherche fut d'étudier le rôle de la signalisation induite par Fzd7 sur les propriétés angiogéniques des macrophages. Nous avons étudié l'angiogenèse pathologique par l'utilisation de plusieurs modèles murins d'inflammation (irritation cutané, ischémie du membre inférieur, infarctus du myocarde). Chez des souris déficientes en Fzd7 dans les macrophages, l'angiogenèse est plus importante durant la phase d'inflammation, comparées aux souris contrôles. Par immuno-histologie et cytométrie en flux nous avons démontré que cette augmentation du nombre de vaisseaux s'accompagne d'une population de macrophages M2 plus importante, sans modification du nombre total de macrophages. Ces résultats obtenus dans plusieurs contextes inflammatoires chez la souris suggèrent que Fzd7 serait impliqué dans le contrôle de l'angiogenèse via une régulation de la polarisation M1 versus M2 des macrophages.

**Mots clés :** Frizzled 7, macrophages, angiogenèse, inflammation, polarisation M1/M2

---

### **Frizzled 7 expression by macrophages controls angiogenesis through regulation of macrophage polarization**

Macrophages play a major role in regulating inflammation. They are able to respond quickly to external signals from a pro to anti-inflammatory state (respectively named M1 and M2 macrophages). Some subpopulations of M2 macrophages have angiogenic properties. The Wnt/Frizzled (Fzd) pathway is part of pathways allowing macrophages to respond to their environment. They are composed of 10 Fzd receptors and 19 Wnt ligands. It was established that Wnt3a/Fzd1 and Wnt5a/Fzd5 are involved in the inflammatory response of macrophages. Recently the role of a Wnt/Flt1 pathway has been highlighted in the regulation of angiogenesis, by macrophages, during retinal development. Our aim was to study the role of the Fzd7-induced signaling on macrophages angiogenic properties. We studied pathological angiogenesis by using several mouse models of inflammation (skin irritation, hindlimb ischemia, myocardial infarction). In mice with Fzd7-deleted macrophages, angiogenesis is greater during the inflammatory phase, compared with control mice. By immune-histochemistry and flow cytometry we demonstrated that the increase in the vessels number is associated with a greater M2 macrophages population, without change in the total number of macrophages. These results obtained in several inflammatory contexts in mice suggest that Fzd7 be involved in the control of angiogenesis through regulation of the M1 versus M2 polarization of macrophages.

**Keywords :** Frizzled 7, macrophages, angiogenesis, inflammation, M1/M2 polarization

---