



H E G P

## FORMATION DE L'ARBRE VASCULAIRE

**Jean-Sébastien Silvestre**

Inserm UMRS 970, Paris Cardiovascular Research Center,  
Paris, France

<http://silvestrelab.weebly.com>

jean-sebastien.silvestre@inserm.fr



-|-

## Généralités-Principaux acteurs

## ✓Modifications quantitatives:

**Vasculogenèse:** migration, prolifération, différenciation des cellules progénitrices endothéliales pour former des cellules endothéliales qui s'associent entre elles pour donner des tubes endothéliaux (Réseau capillaire primitif)

**Angiogenèse:** croissance, extension du réseau capillaire pré-existant

**Artériogenèse:** épaissement pariétal (MEC), migration, prolifération, différenciation des cellules progénitrices vasculaires pour former des CML et générer un vaisseau de type artériole

## ✓Modifications qualitatives:

**Spécification artérioveineuse**

**Spécification lymphatique**

**Adaptation à l'environnement tissulaire**

**Remodelage artériel:** modification de la structure du vaisseau (diamètre du vaisseau et épaisseur de la paroi artérielle) en réponse à un stimulus (augmentation du débit sanguin, exercice musculaire, sténose...)

## 1- Tube endothélial

EC tube



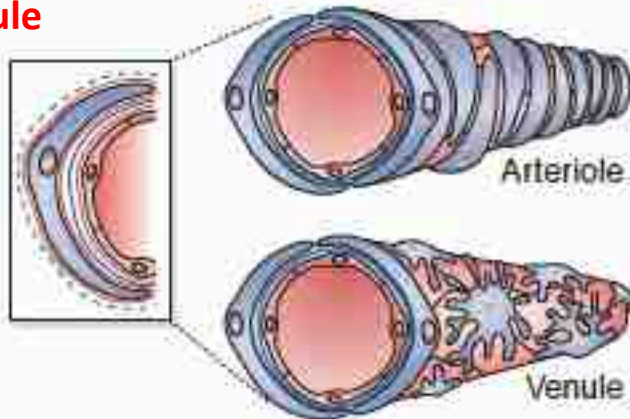
## 2- Capillaire

EC tube  
PCs  
BM



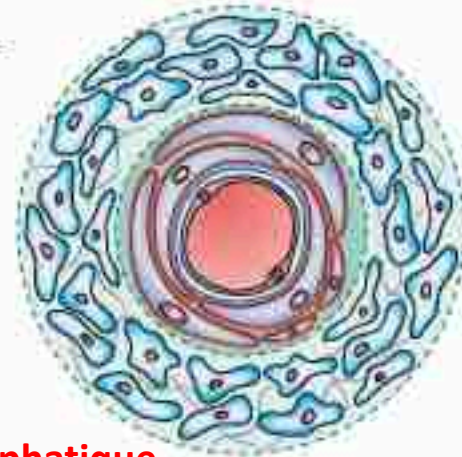
## 3- Artériole/Veinule

EC tube  
IEL  
SMCs  
BM  
EEL



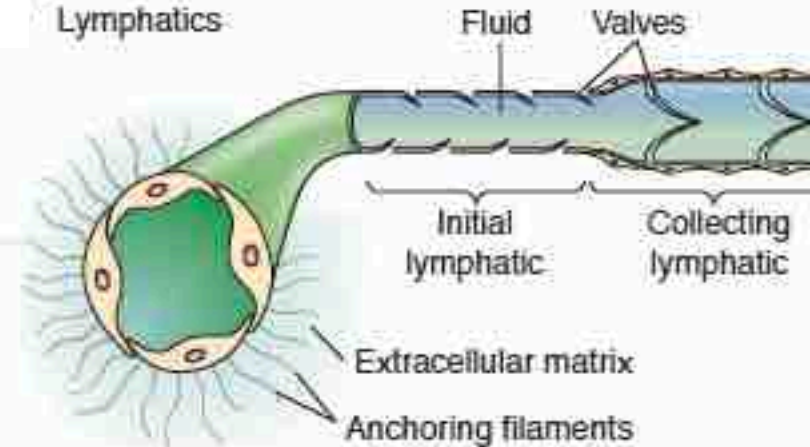
## 4- Artère

EC tube  
IEL  
SMCs  
EEL  
FBs  
EM  
EEL



## 5- Lymphatique

Lymphatics



	Endothelial cell (EC)		Internal elastic lamina (IEL)
	Pericyte (PC)		External elastic lamina (EEL)
	Smooth muscle cell (SMC)		Basement membrane (BM)
	Fibroblast (FB)		Lymphatic endothelial cell
			Extracellular matrix (EM)



## 2- Les principaux acteurs

√ Différents membres

### Vascular Endothelial Growth Factor

VEGF-A

VEGF-B

VEGF-C

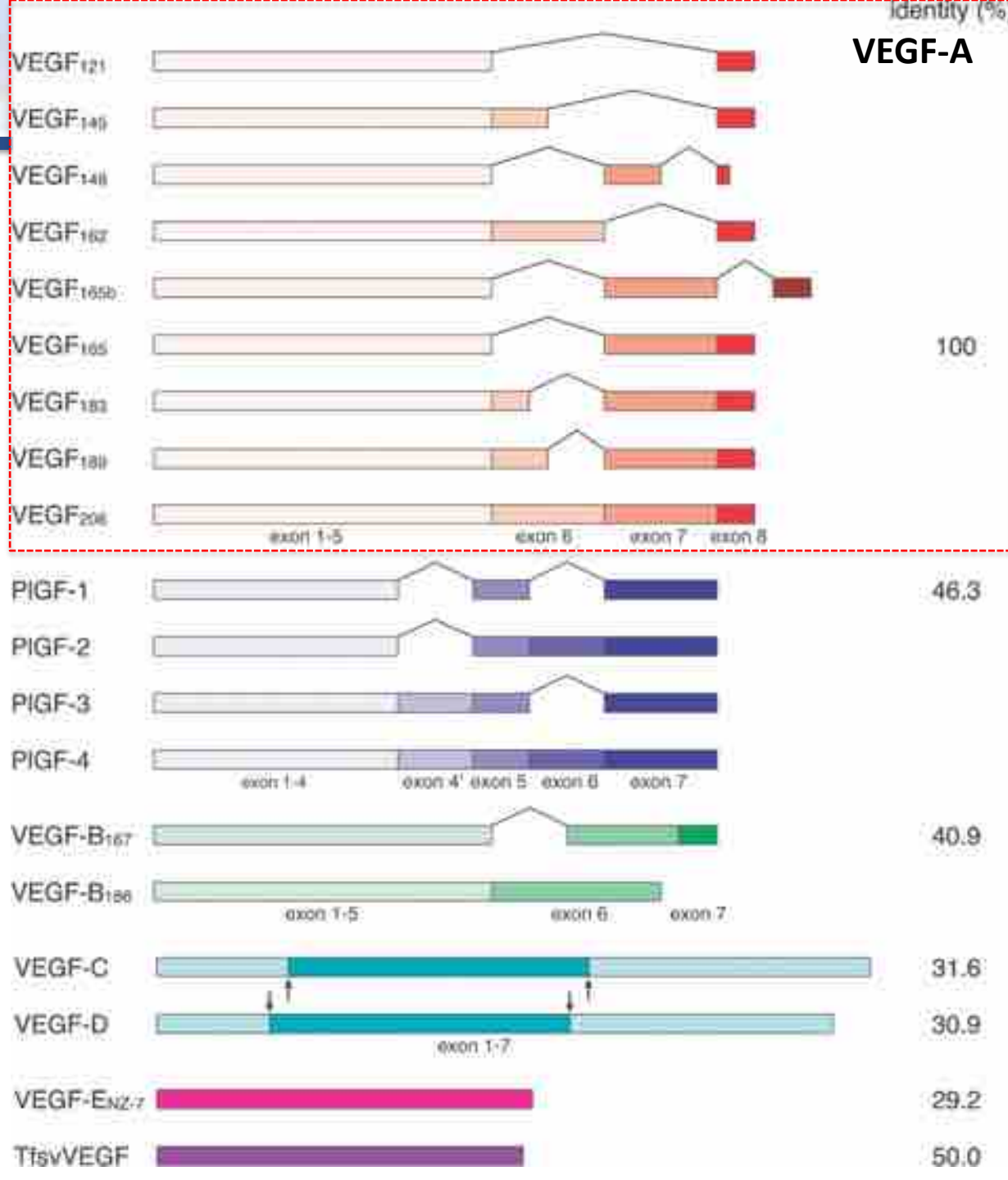
VEGF-D

VEGF-E

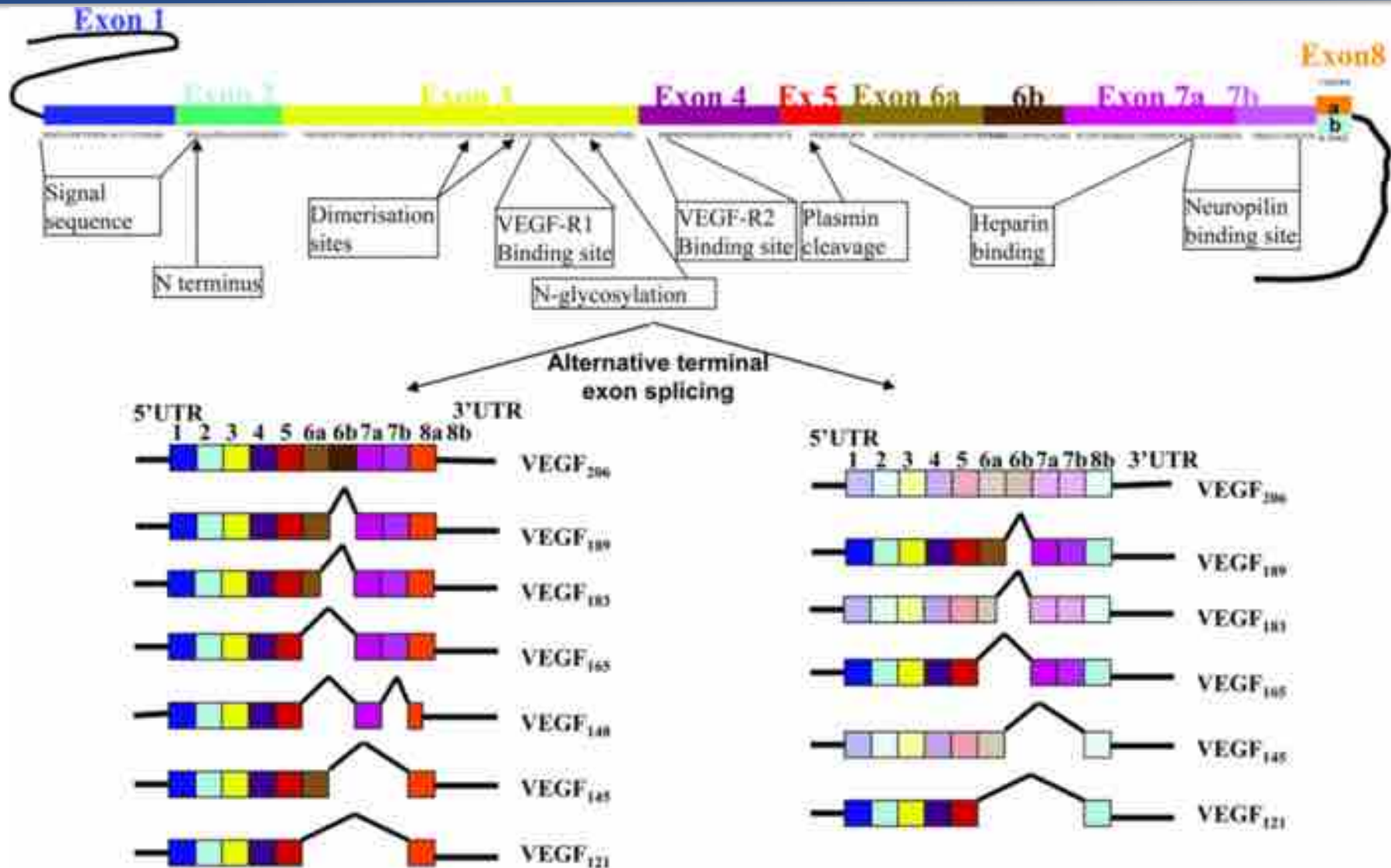
### Placenta Growth Factor

PlGF

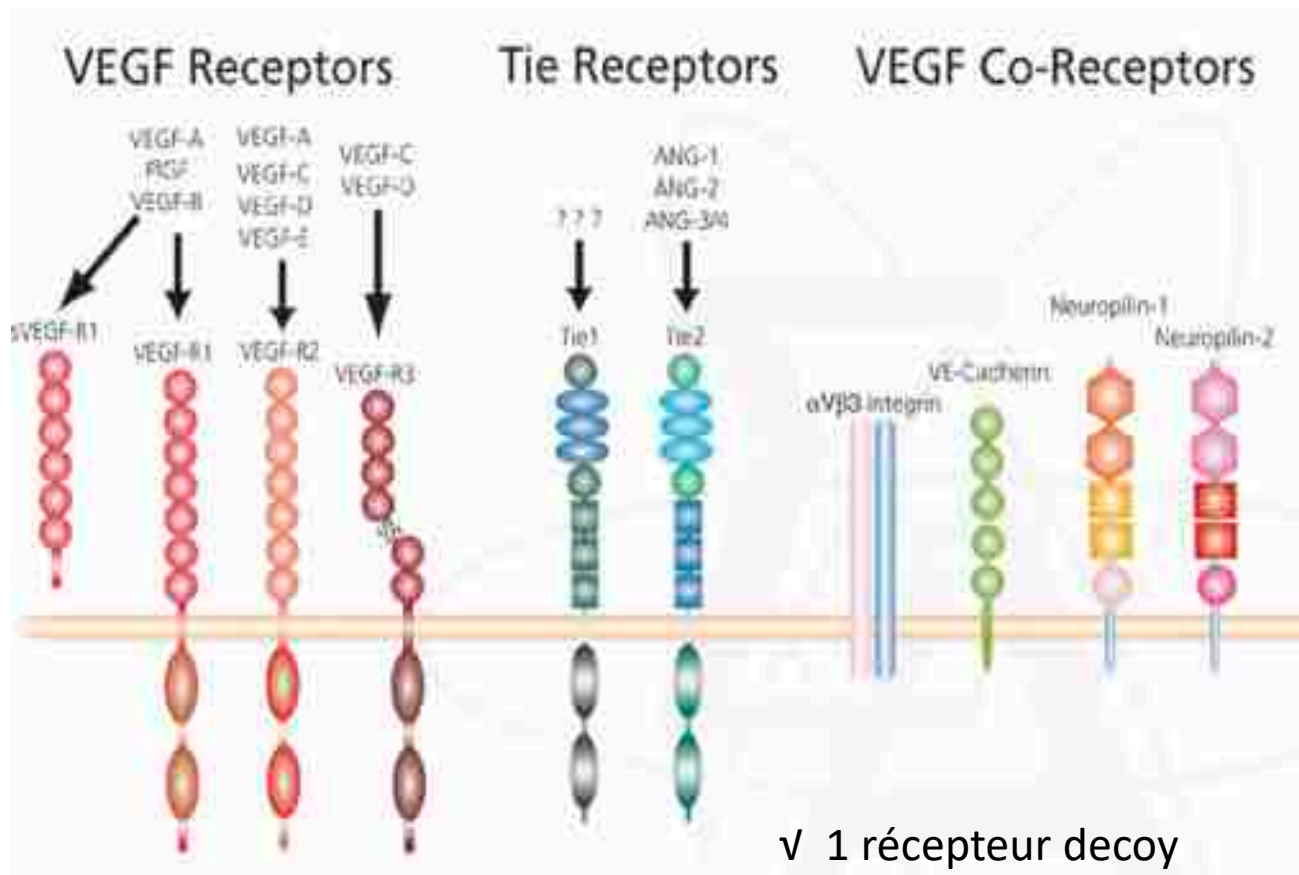
√ Pour certains membres, différentes isoformes



# Les différents membres de la famille des VEGFs



**VEGF-A165b: anti-angiogénique (Kikuchi R, Nat Med, 2014)!!**



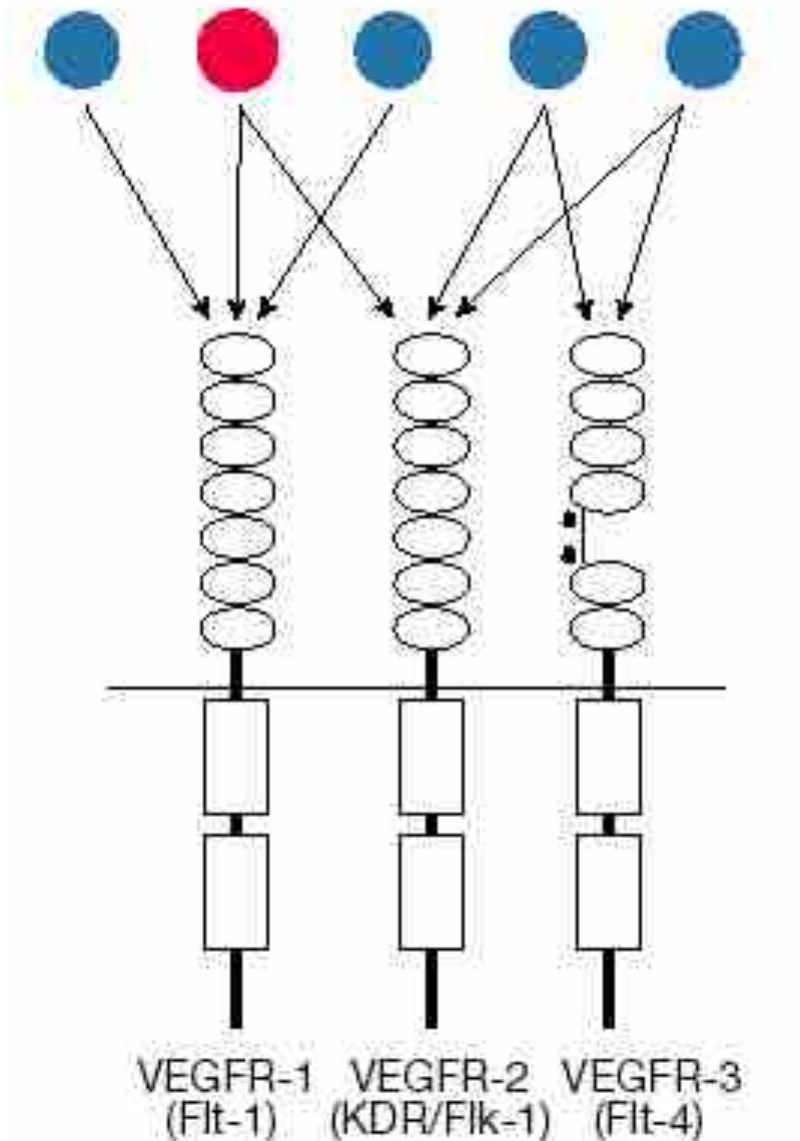
✓ 3 récepteurs principaux  
**VEGFR1**  
**VEGFR2**  
**VEGFR3**

✓ 1 récepteur decoy  
sVEGFR1

✓ Co-récepteurs  
Neuropiline  
VE-Cadherin  
AlphaVbeta3-Integrin

✓ Co-activateurs  
ANG1&2/TIE1&2

PIGF VEGF-A VEGF-B VEGF-C VEGF-D



## VEGF/VEGFR:

VEGF-A: initiation of vasculogenesis and sprouting angiogenesis, Immature vessels, Vascular permeability factor, Haploid insufficiency in k.o. mice,

PIGF: remodeling of adult vessels

VEGF-B: synergism with VEGF-A?

VEGF-C: lymphatic vessels

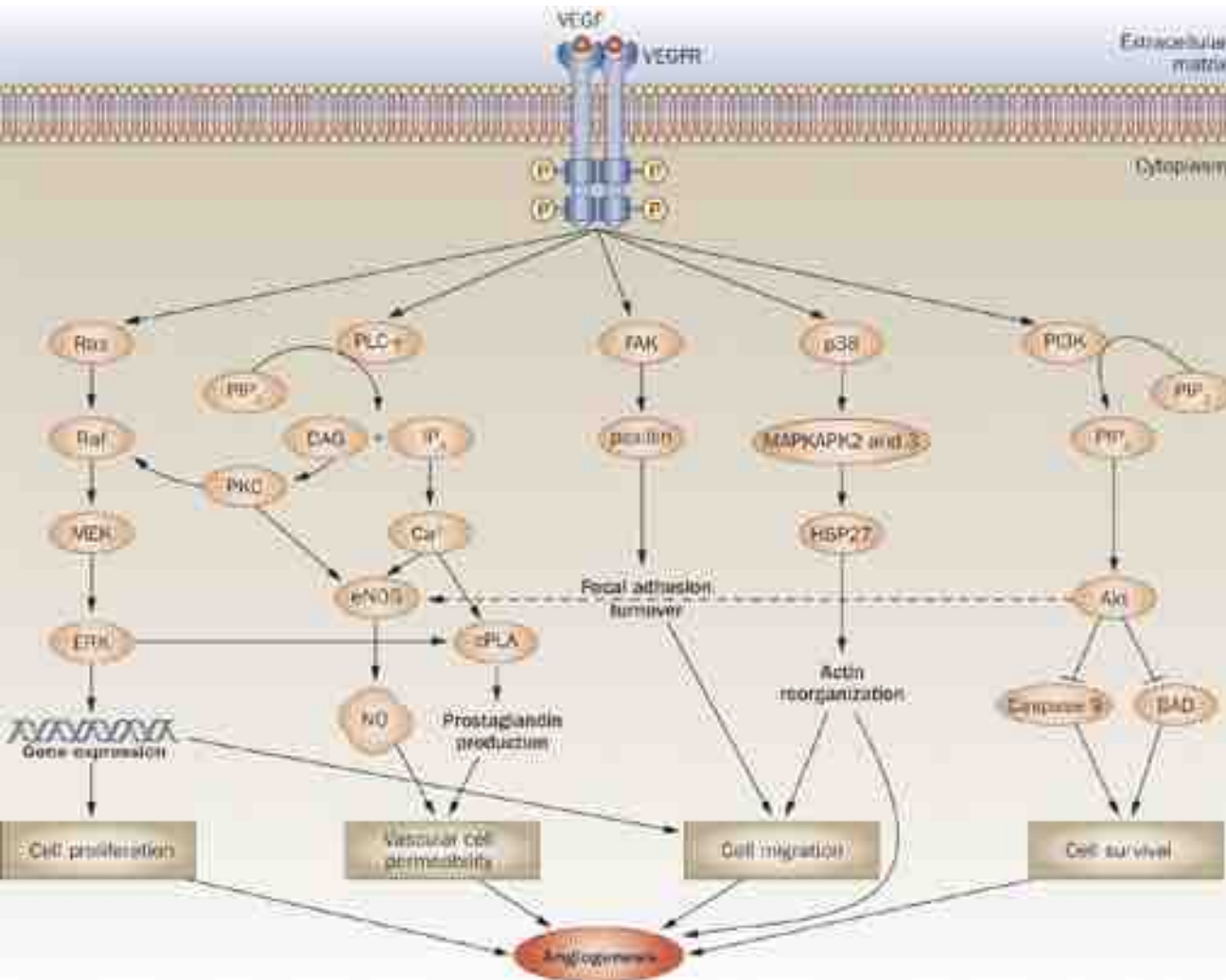
VEGF-D: lymphatic vessels ?

VEGFR-2: growth and permeability

VEGFR-1: negative role ?, decoy receptor, synergism with VEGFR2, Inflammation?

VEGFR-3: lymphatic vessels





## 3 voies de signalisation principales

- Ras
- PLC- $\gamma$  (Phospholipase C-  $\gamma$ )
- PI3-Kinase (Phosphoinositol 3-Kinase)

## Effets cellulaires principaux

- ✓ MAPK – Prolifération
- ✓ p38/MAPK/eNOS- Perméabilité
- ✓ HSP27- Migration, remodelage actine
- ✓ PI3K/AKT- Survie cellulaire

# Les différents membres de la famille des FGFs

## Fibroblast growth factor

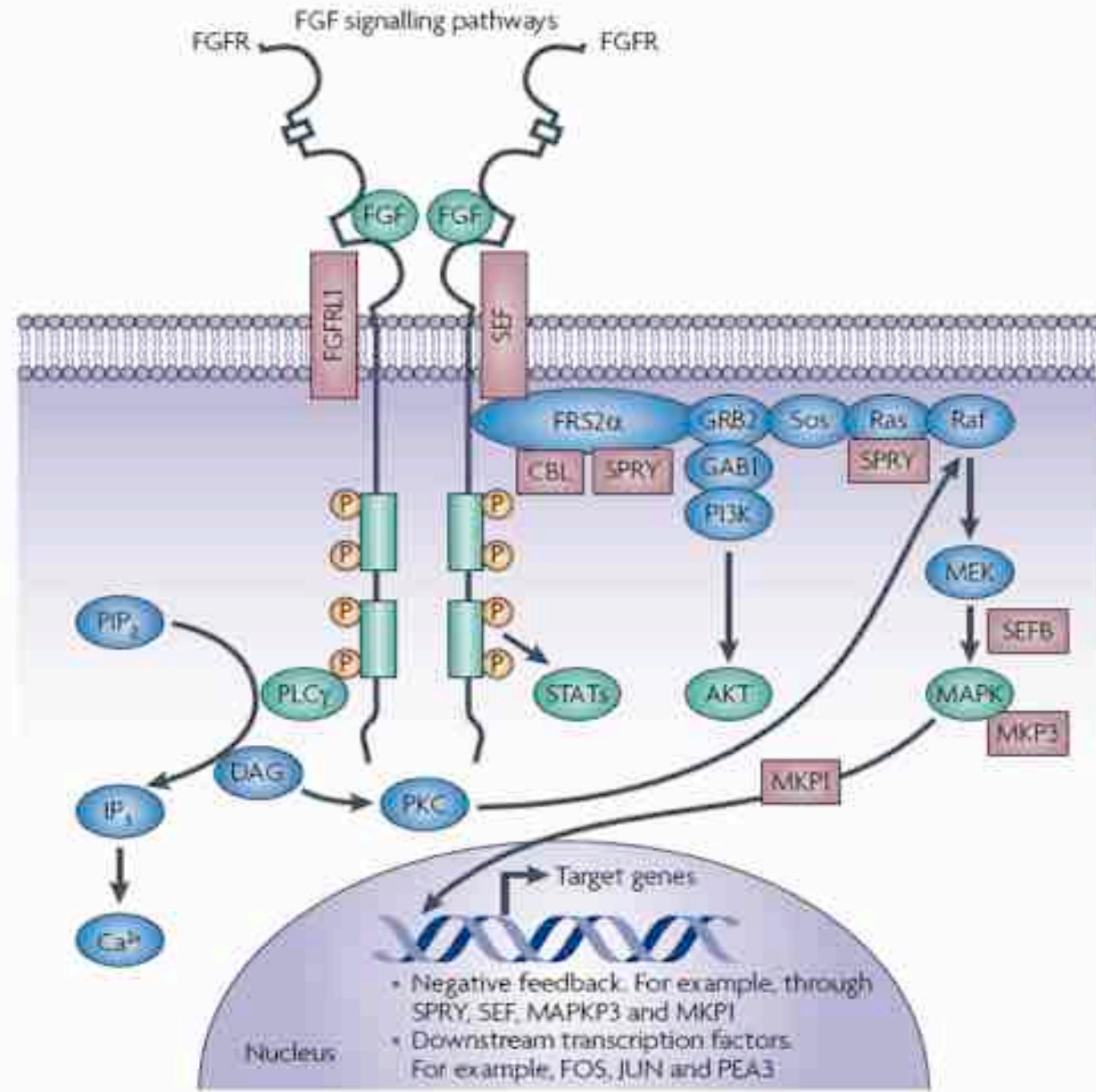
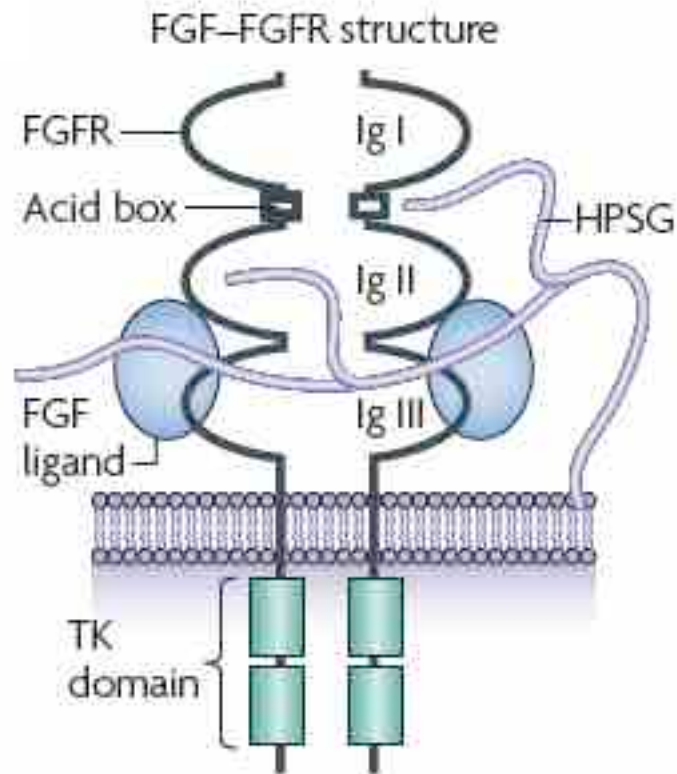
18 ligands (FGF-1, 2)

4 récepteurs

FGFR1, FGFR2

FGFR3, FGFR4

FGFR5 (FGFRL1, no tyrK)



# Les différents membres de la famille des PDGFs

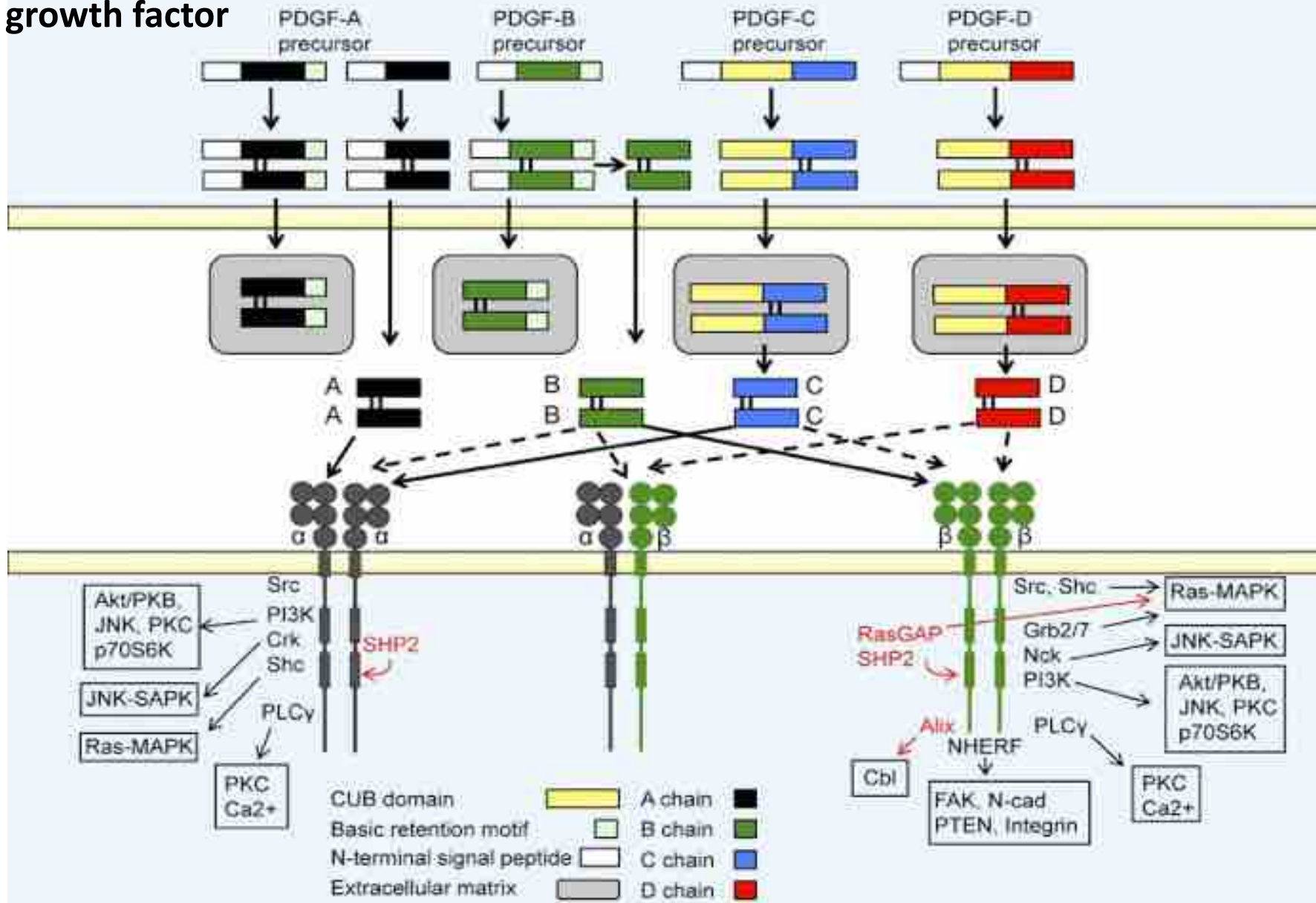
## Platelet-derived growth factor

4 membres

- PDGF-AA
- PDGF-BB
- PDGF-CC
- PDGF-DD

2 récepteurs:

- PDGF-R $\alpha$
- PDGF-R $\beta$



# Les différents membres de la famille des TGFβ

## Transforming growth factor β

3 membres

TGFβ1

TGFβ2

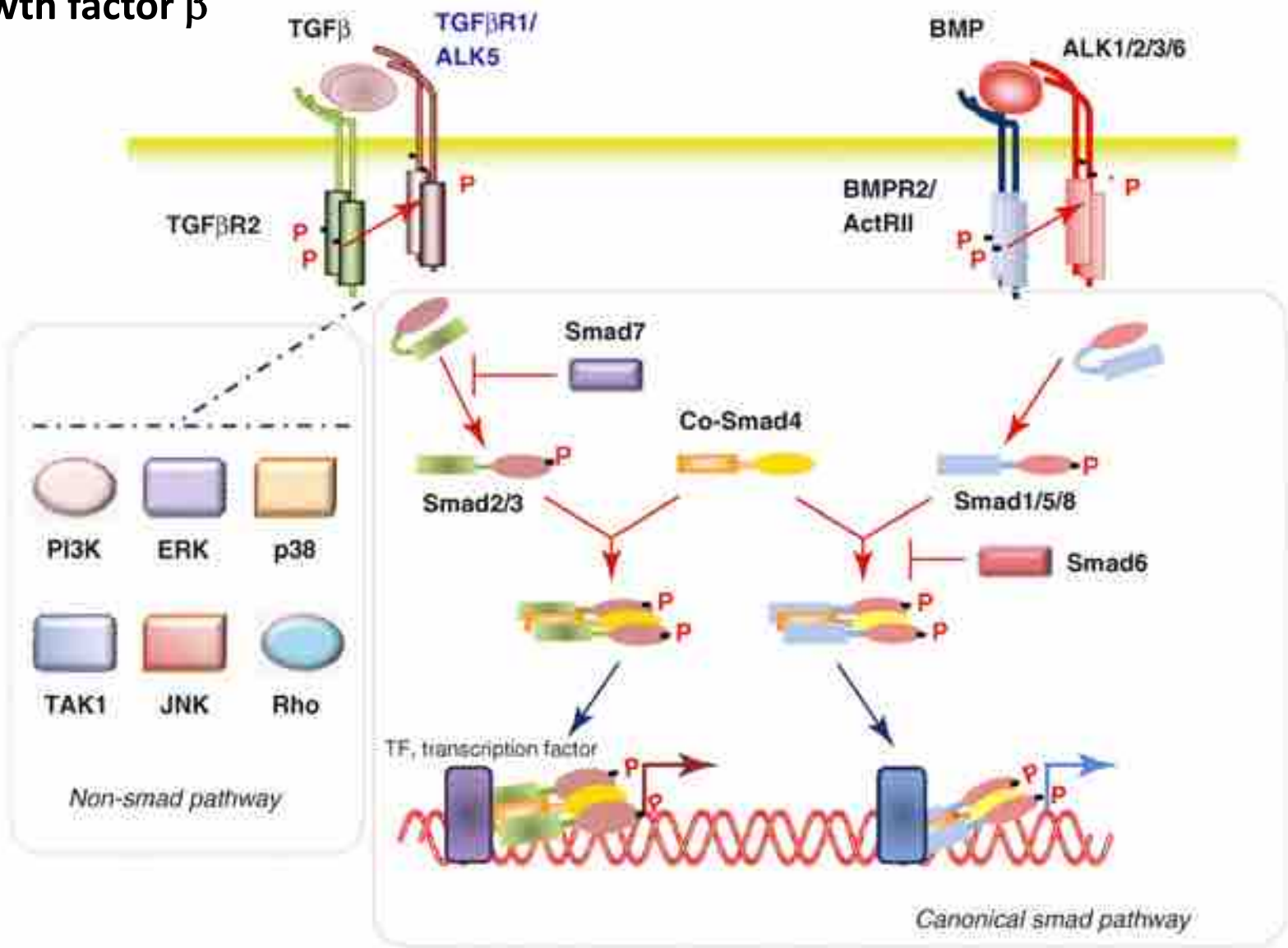
TGFβ3

3 récepteurs

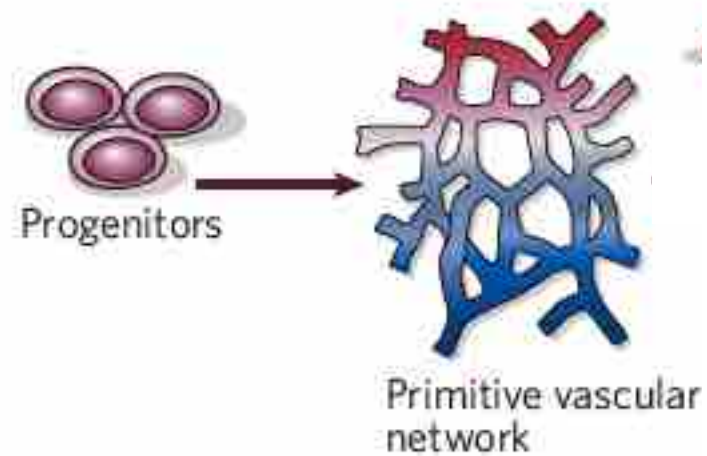
RI

RII

RIII



## -II- VASCULOGENESE

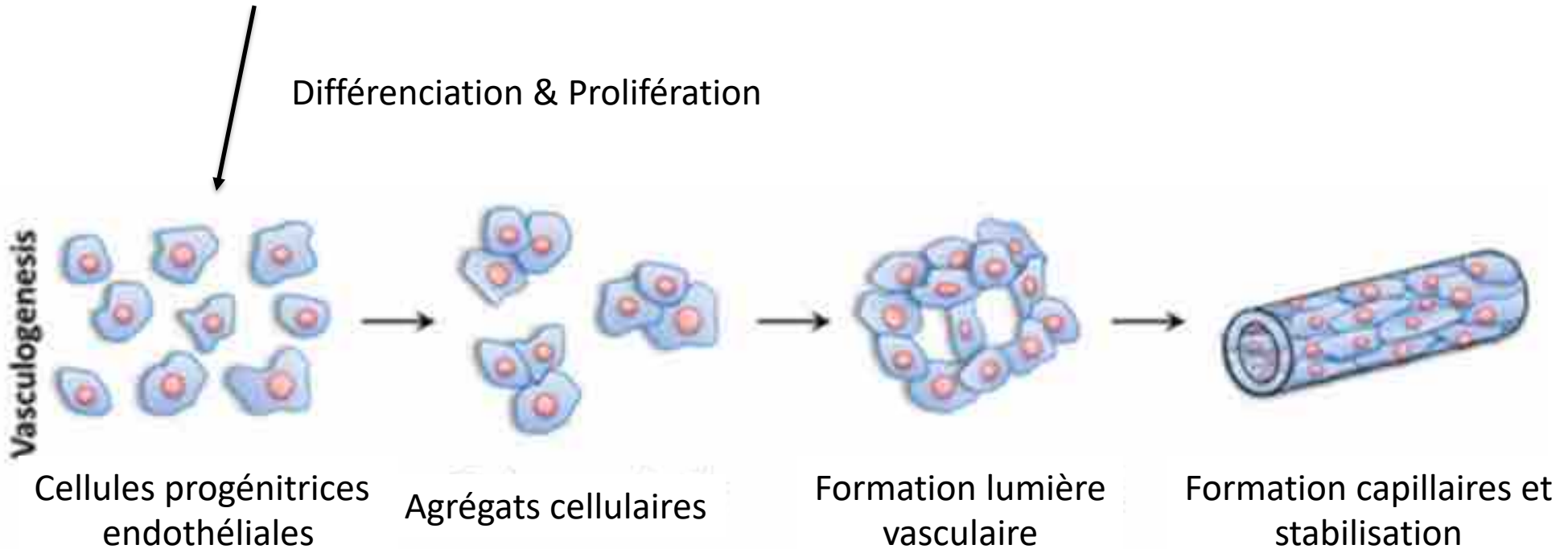


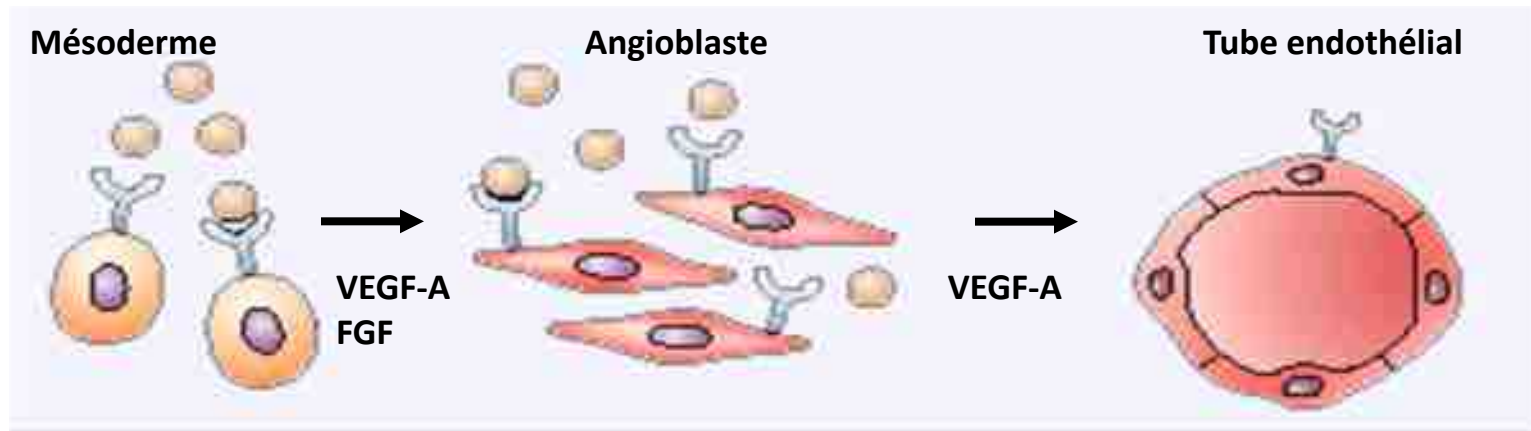
## Angioblastes (cellules souches endothéliales)

Embryon: Mésoderme

Tissu adulte: Niche tissulaire, moelle osseuse, paroi vasculaire etc...

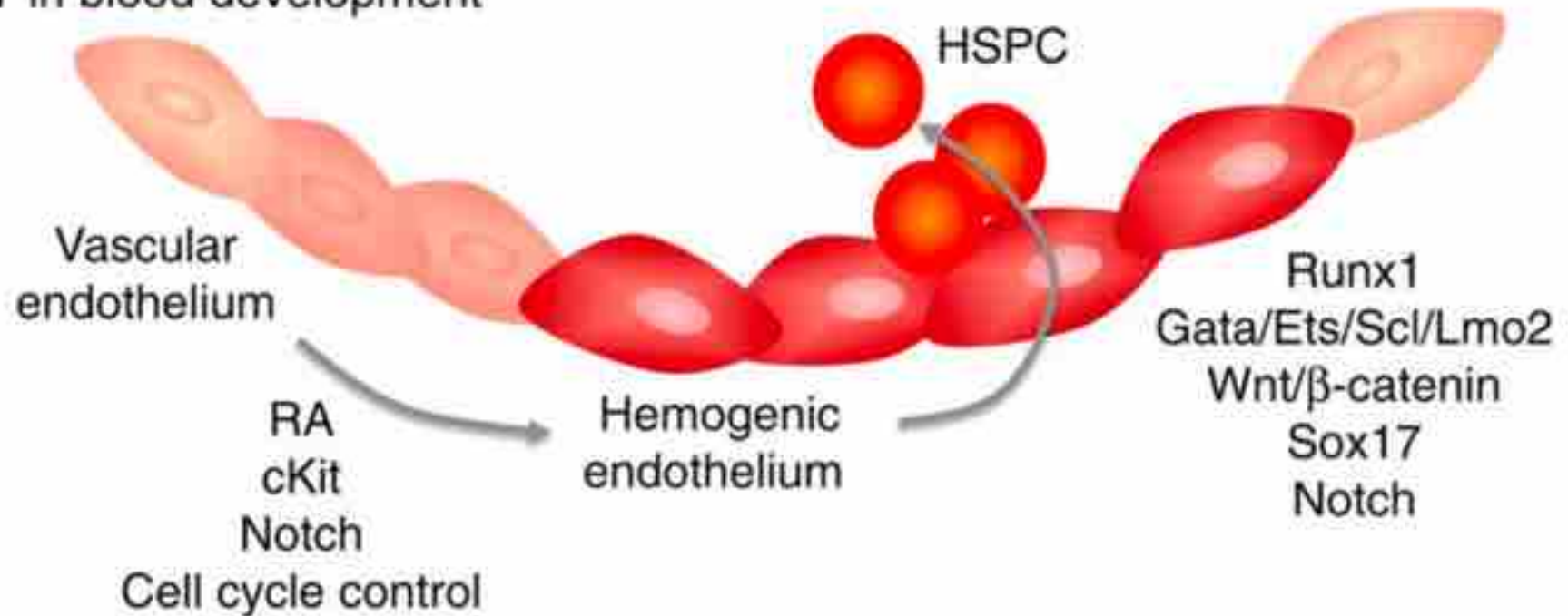
Différenciation & Prolifération





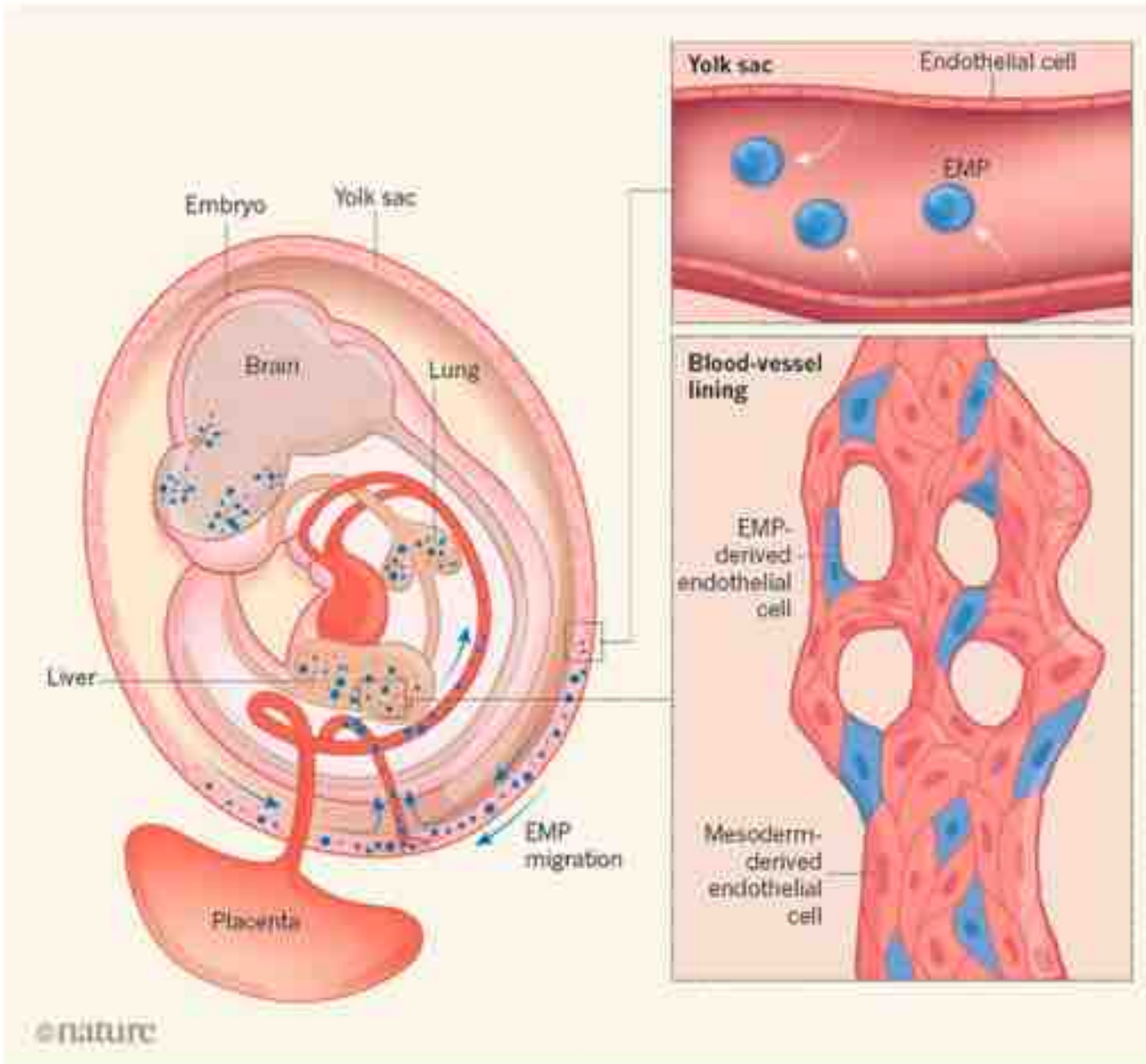
- Les angioblastes (cellules souches endothéliales) prolifèrent et se différencient en cellules progénitrices endothéliales (Early & Late EPCs) puis en cellules endothéliales qui vont tapisser la lumière vasculaire
- **Les cellules endothéliales primaires (non spécialisées)** forment des tubes qui vont ensuite s'associer pour générer un réseau capillaire primitif (plexus)

## EHT in blood development



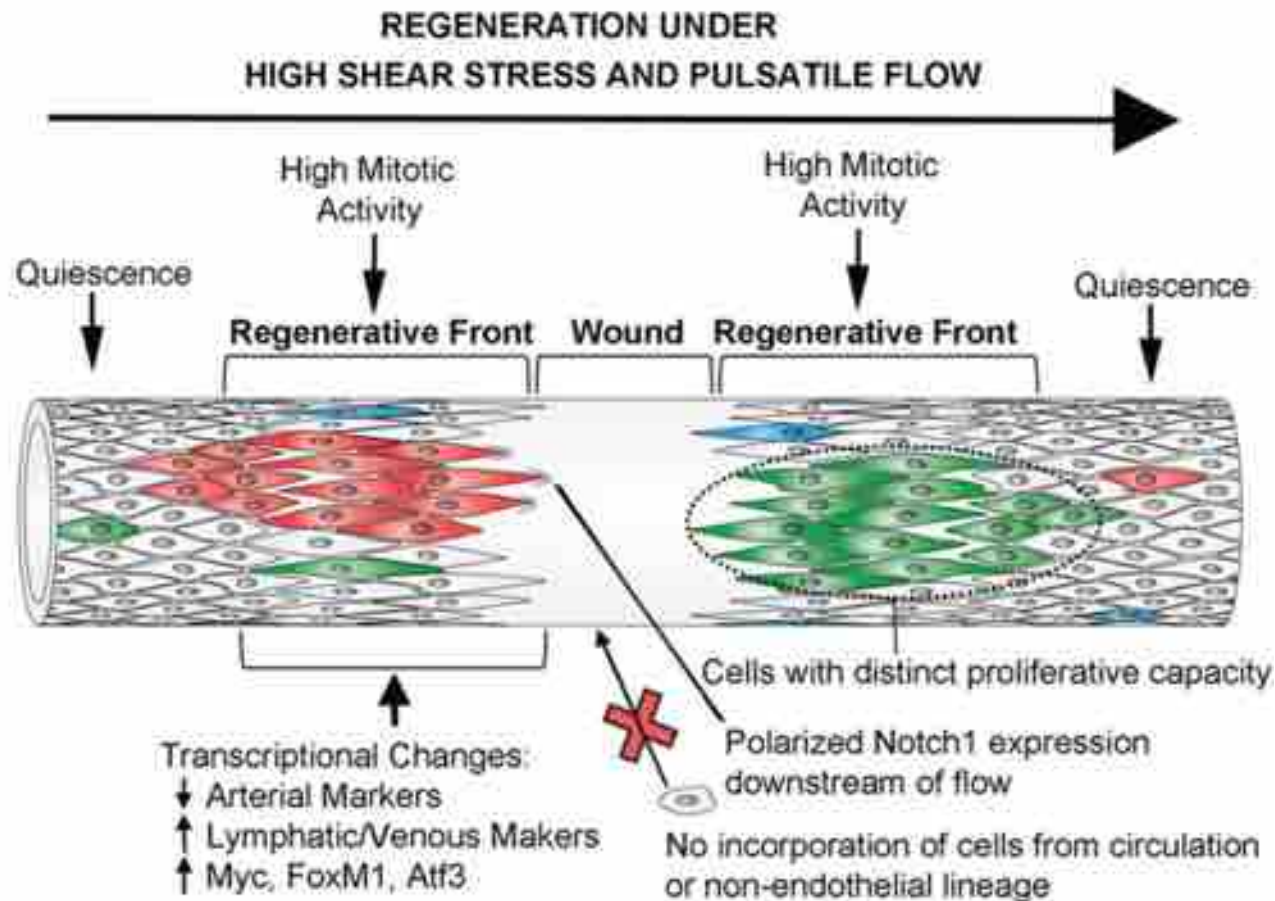
Au cours de l'hématopoïèse définitive, un sous-ensemble de cellules endothéliales est appelé à devenir hémogénique (rouge foncé) et ces cellules donnent naissance à des cellules souches et progénitrices hématopoïétiques (HSPC) via la transition endothéliale-hématopoïétique (EHT). La spécification des cellules endothéliales hémogéniques nécessite une signalisation par l'acide rétinoïque (RA).



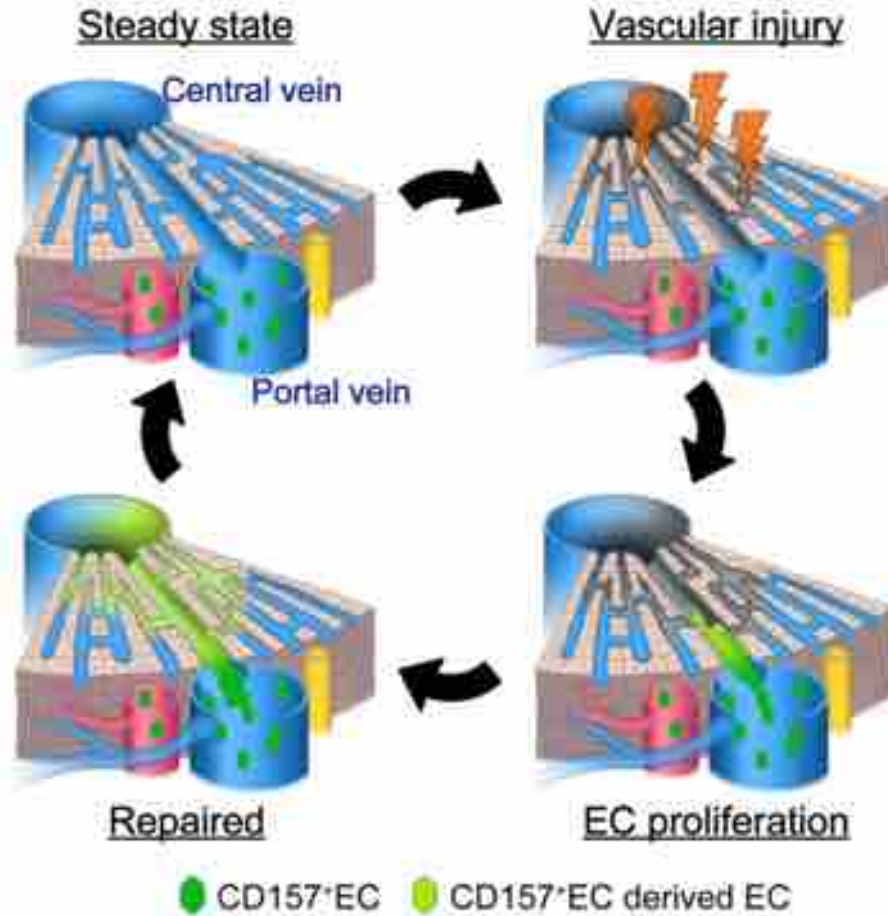


Une première vague de progéniteurs erythromyéloïdes (EMP) contribue à la formation de cellules endothéliales dans l'endothélium du sac vitellin, et une deuxième vague de EMP colonise l'embryon et fournit des cellules endothéliales à l'endothélium intra-embryonnaire dans de multiples organes, où elles persistent jusqu'à l'âge adulte.

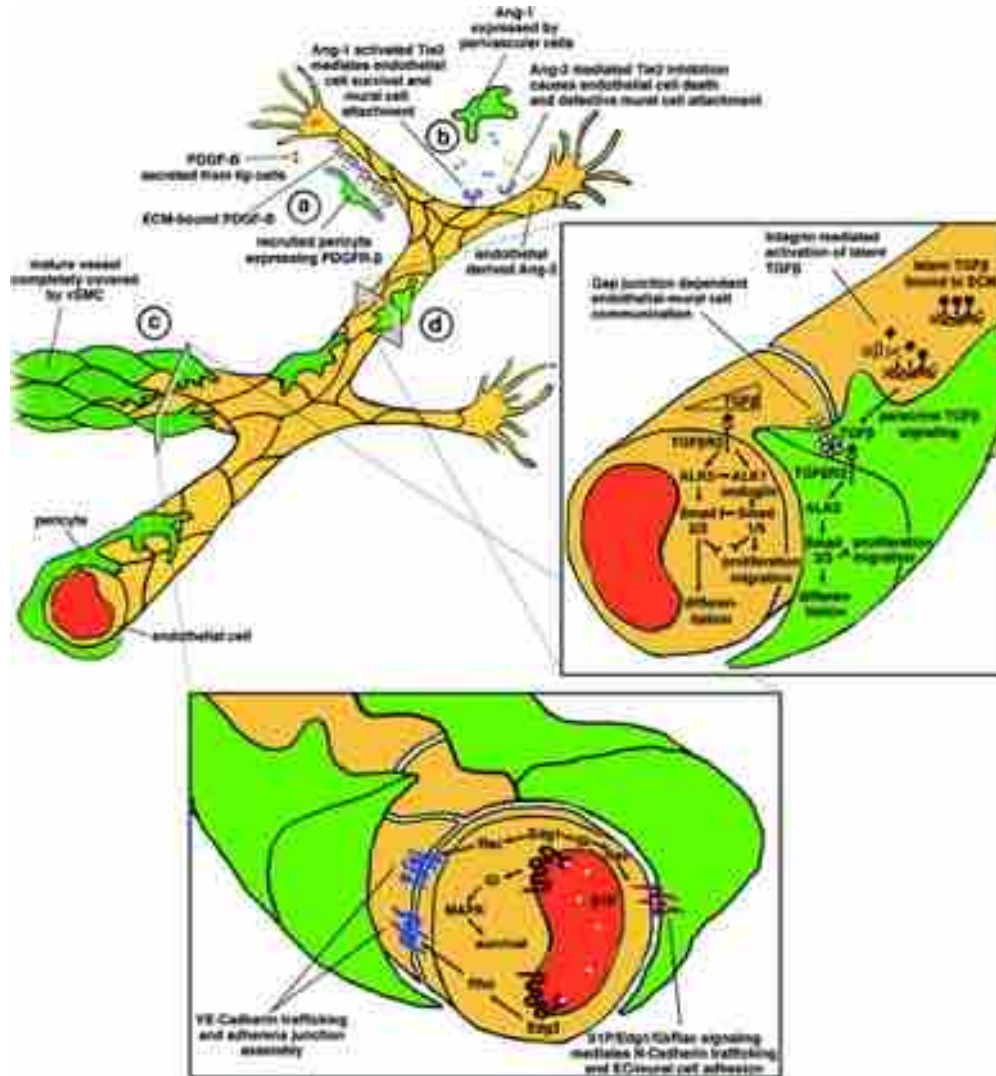
L'endothélium de l'aorte abrite des cellules ayant différentes capacités de prolifération - des cellules capables de régénérer des vaisseaux adultes coexistent avec des cellules présentant un potentiel de prolifération inférieur. Cette variabilité est peut-être liée à l'origine de ces cellules.



La régénération est un processus biphasique entraînée par des populations distinctes issues de cellules endothéliales différenciées. La majorité des cellules immédiatement adjacentes au site de la blessure entrent de nouveau dans le cycle cellulaire lors de la réponse initiale aux dommages, avec une seconde phase entraînée par une sous-population hautement proliférative.



CD157 (bst1, antigène 1 du stroma de la moelle osseuse) est un marqueur des cellules souches endothéliales vasculaires (CSEV) résidentes dans les tissus des grandes artères et des veines de nombreux organes de souris. Des CSEV CD157<sup>+</sup> forment des colonies in vitro et génèrent des sinusoides et des cellules endothéliales de veine porte et centrale dérivées du donneur lors d'une transplantation dans le foie. En réponse à une blessure, les CSEV développent et régénèrent des structures vasculaires entières, soutenant l'existence d'une hiérarchie endothéliale dans les vaisseaux sanguins.

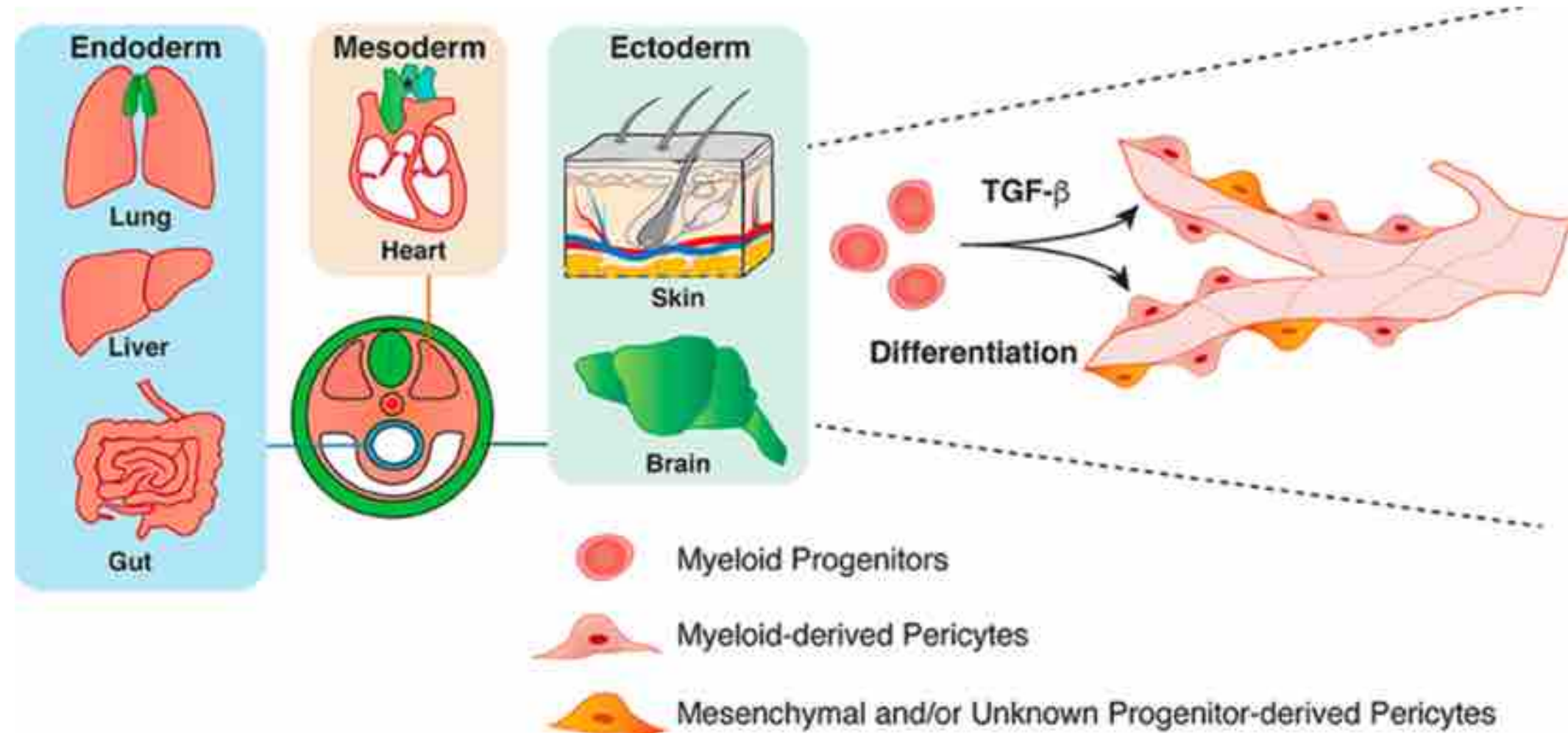


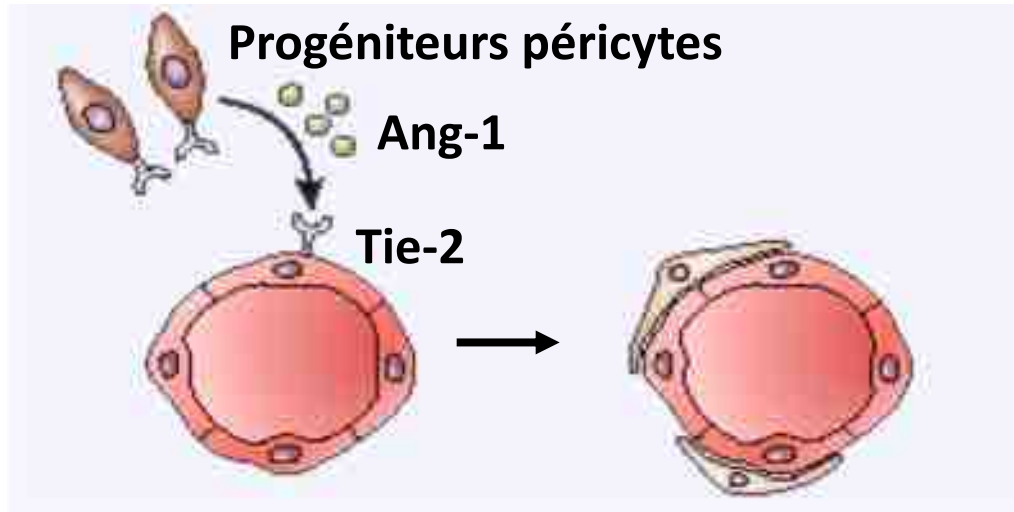
Tous les vaisseaux sanguins sont composés de deux types de cellules distinctes : les cellules endothéliales et les cellules murales. Alors que les cellules endothéliales forment la paroi interne du vaisseau, les cellules murales s'associent au tube endothélial et le recouvrent. Selon leur densité, leur morphologie, leur emplacement et l'expression de marqueurs spécifiques, les cellules murales sont généralement subdivisées en cellules musculaires lisses vasculaires et péricytes.

**Les cellules musculaires lisses vasculaires** sont associées aux artères et aux veines autour desquelles elles forment de multiples couches concentriques.

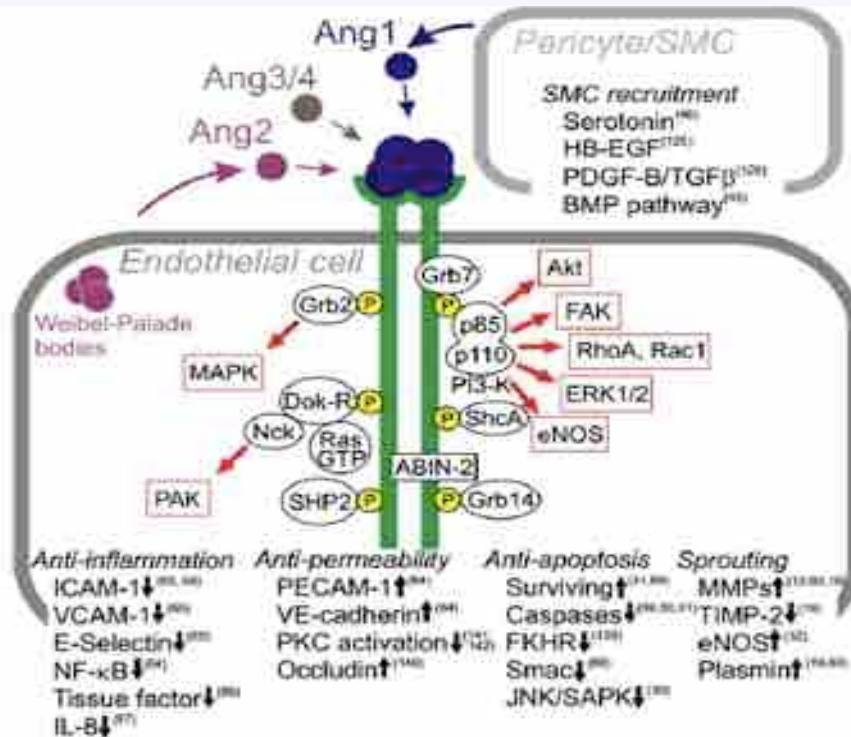
**Les péricytes** sont associés aux vaisseaux sanguins de plus petit diamètre (artérioles, capillaires et veinules) et partagent leur membrane basale avec l'endothélium.

# Maturation des capillaires: le rôle des péricytes

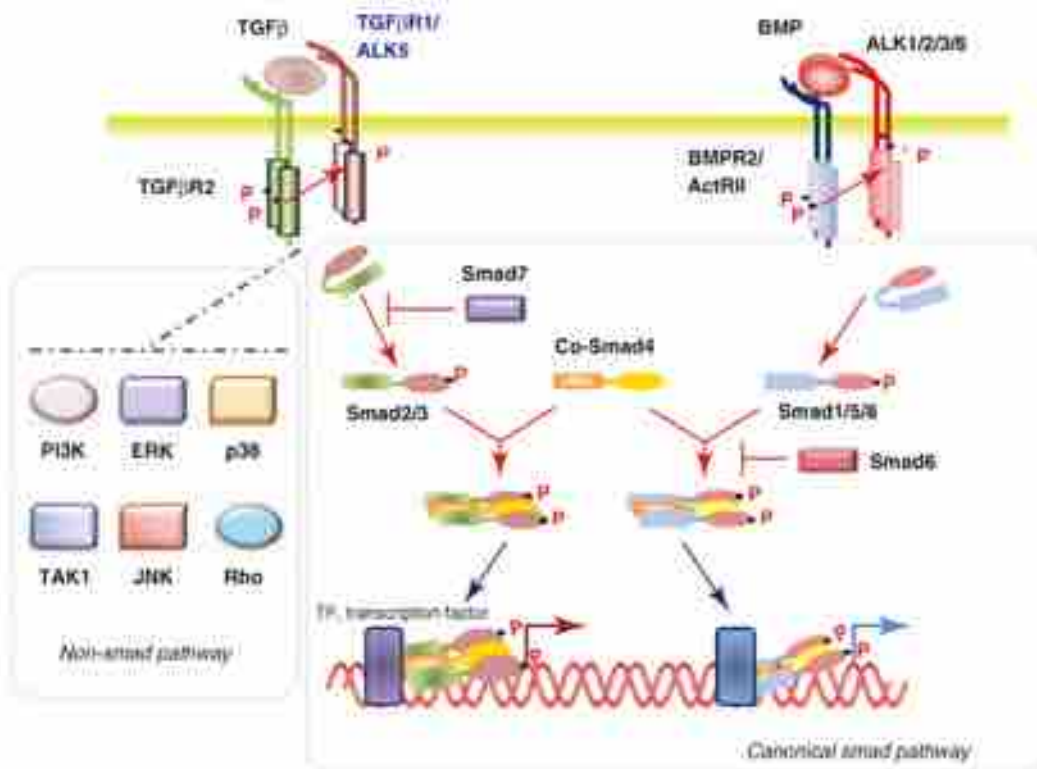
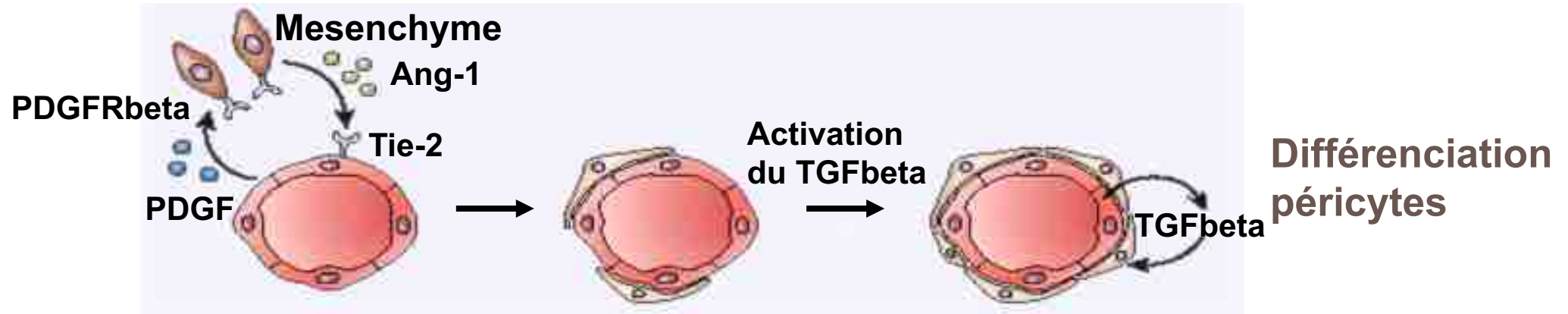




**Recrutement des progéniteurs  
des cellules murales**

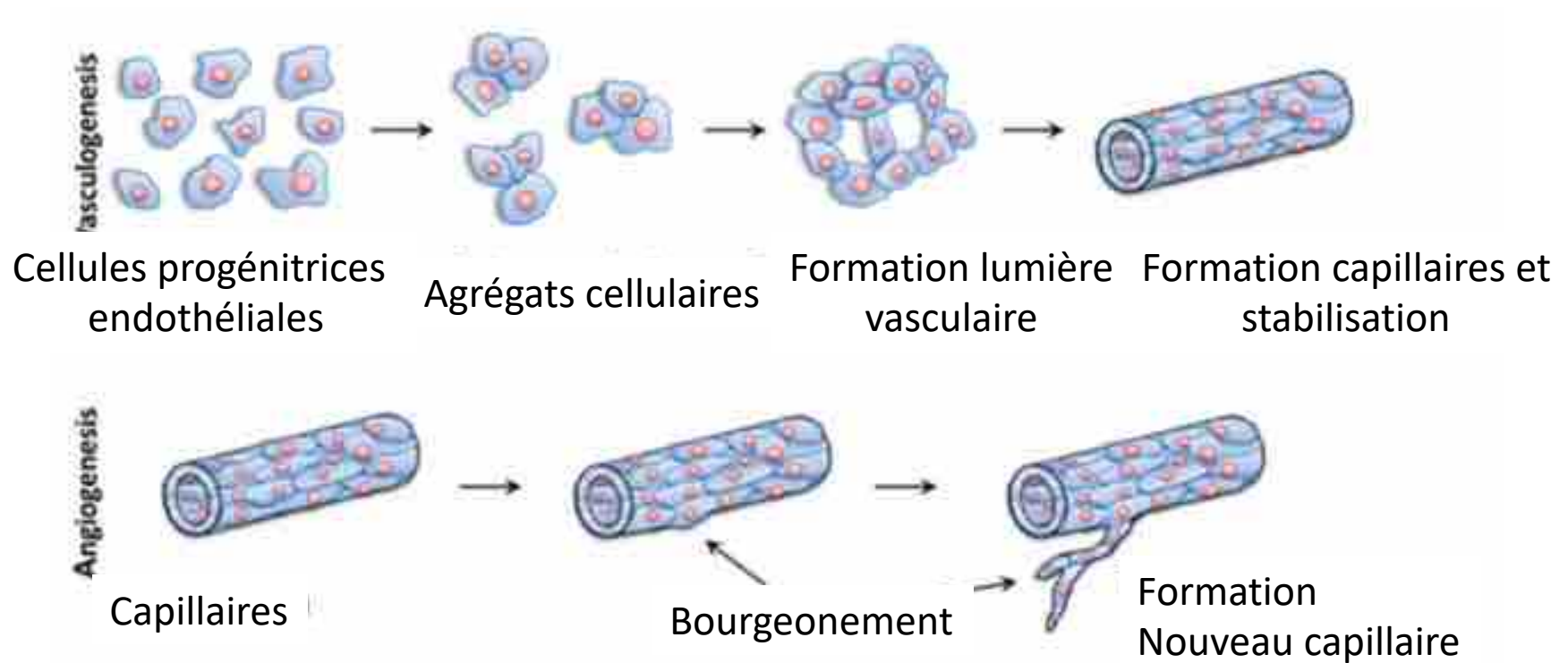


**Les angiopoïétines et leurs  
récepteurs TIE**



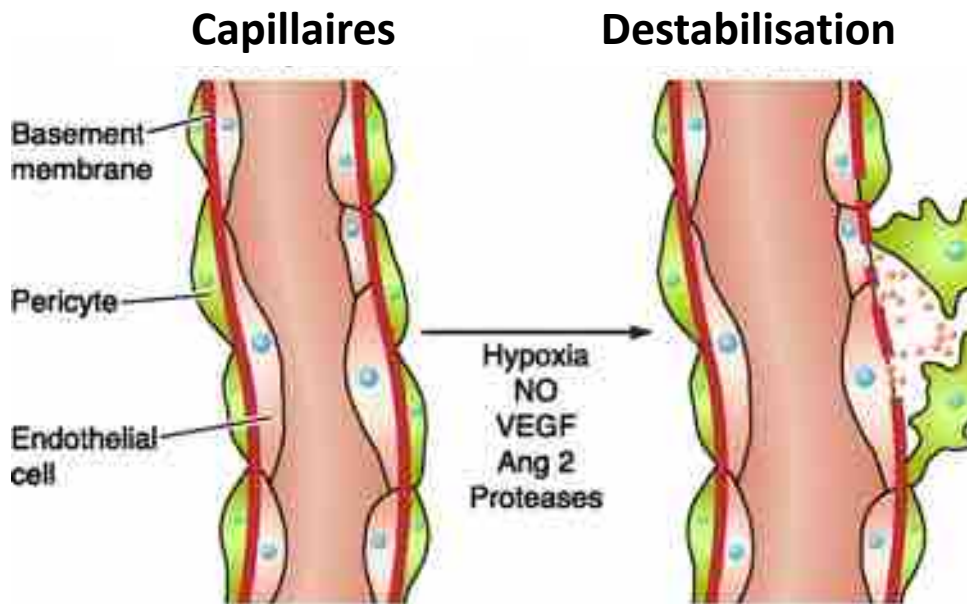
TGFbeta et ses récepteurs

## -III- ANGIOGENESE





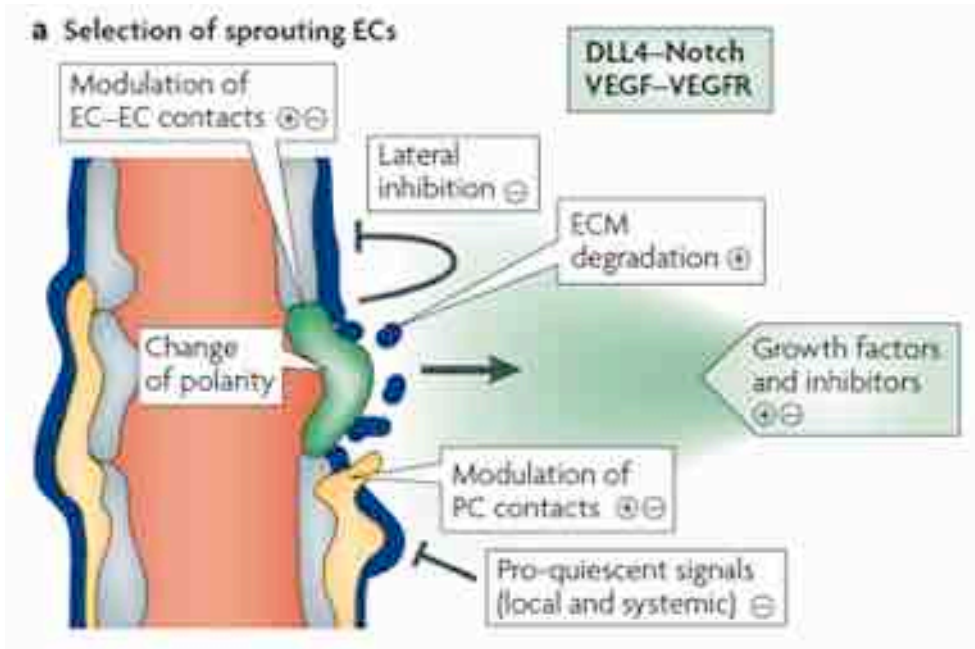
- Destabilisation de la paroi vasculaire
- Dégradation de la matrice extracellulaire
- Bourgeonnement et/ou intussusception
- Prolifération/migration cellules endothéliales
- Perfusion et stabilisation de la paroi vasculaire



**C endo maintenues  
quiescentes par mb basale**

**Détachement des péricytes**

**Dégradation mb basale et  
exposition des c endo au  
collagène 1 = phénotype activable**



Trois types de cellules endothéliales:

✓ Tip Cells – migration

✓ Stalk Cells – prolifération

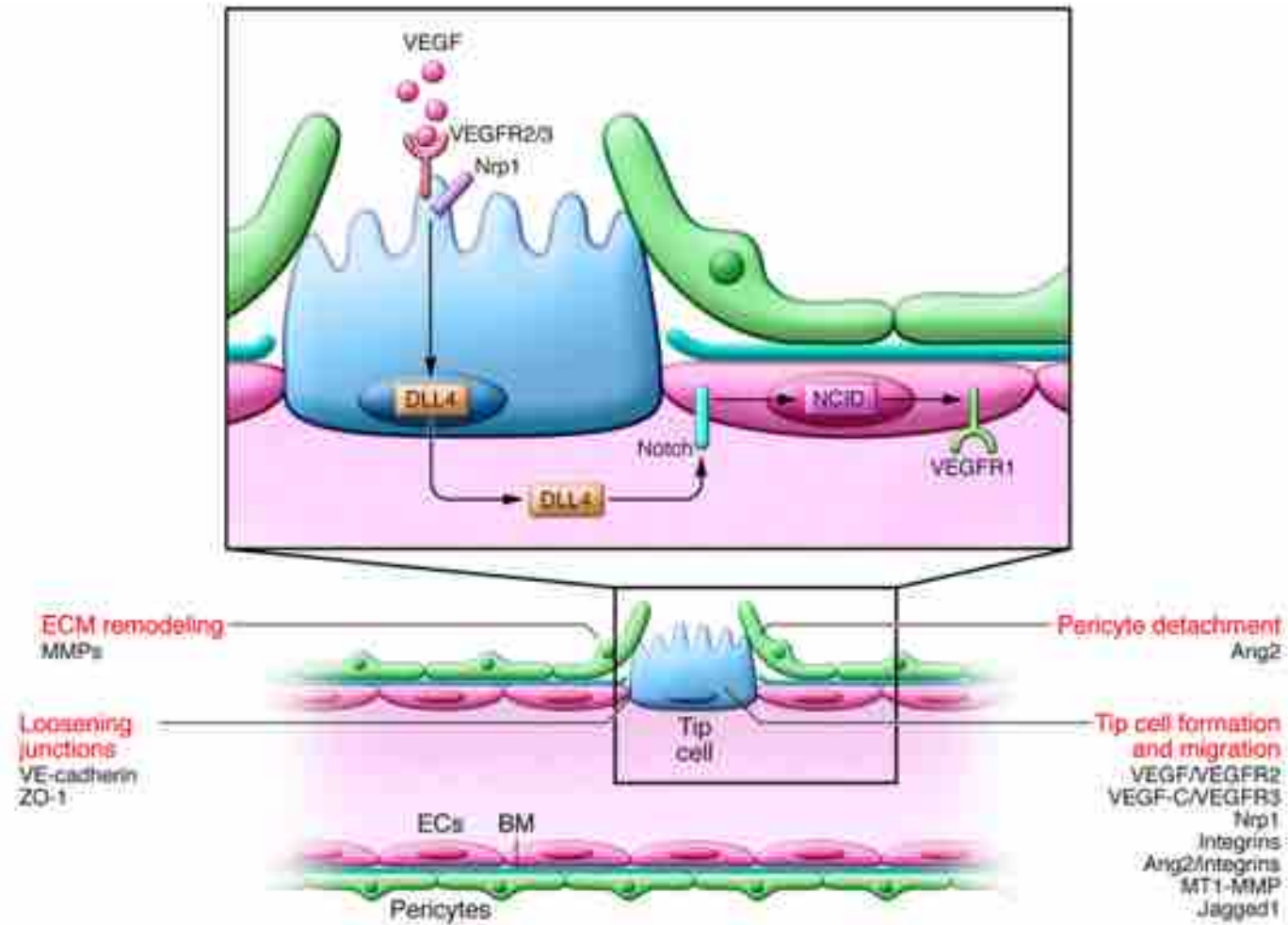
✓ Phalanx Cells - quiescence

Sélection des Tip cells

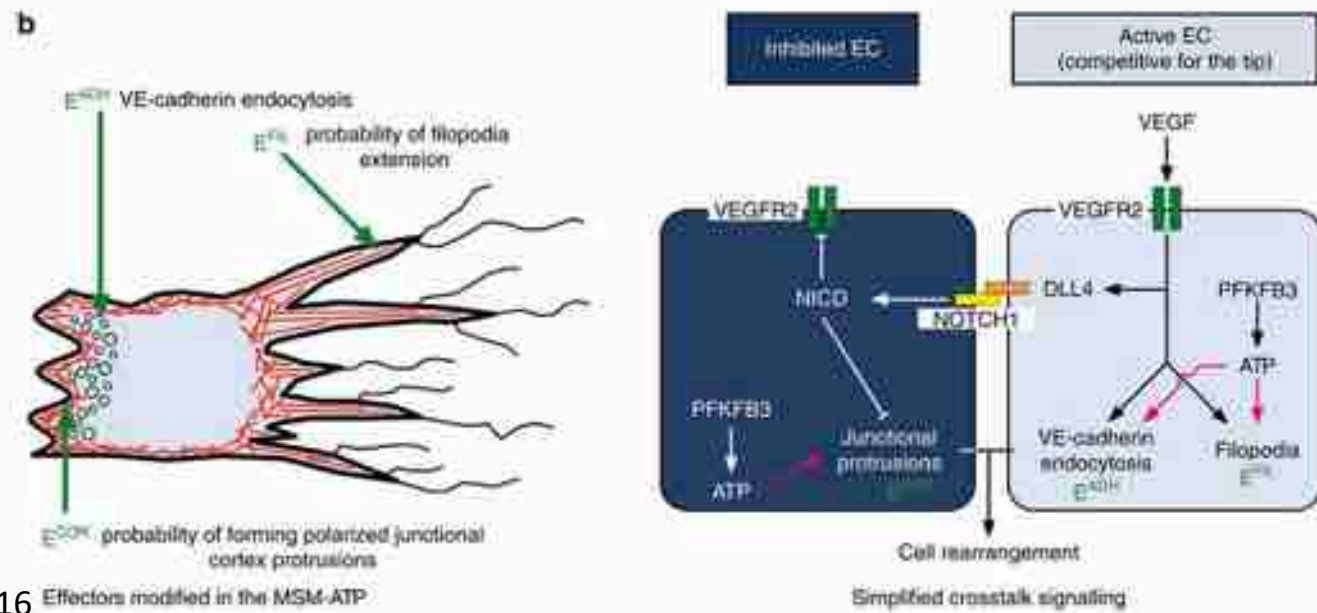
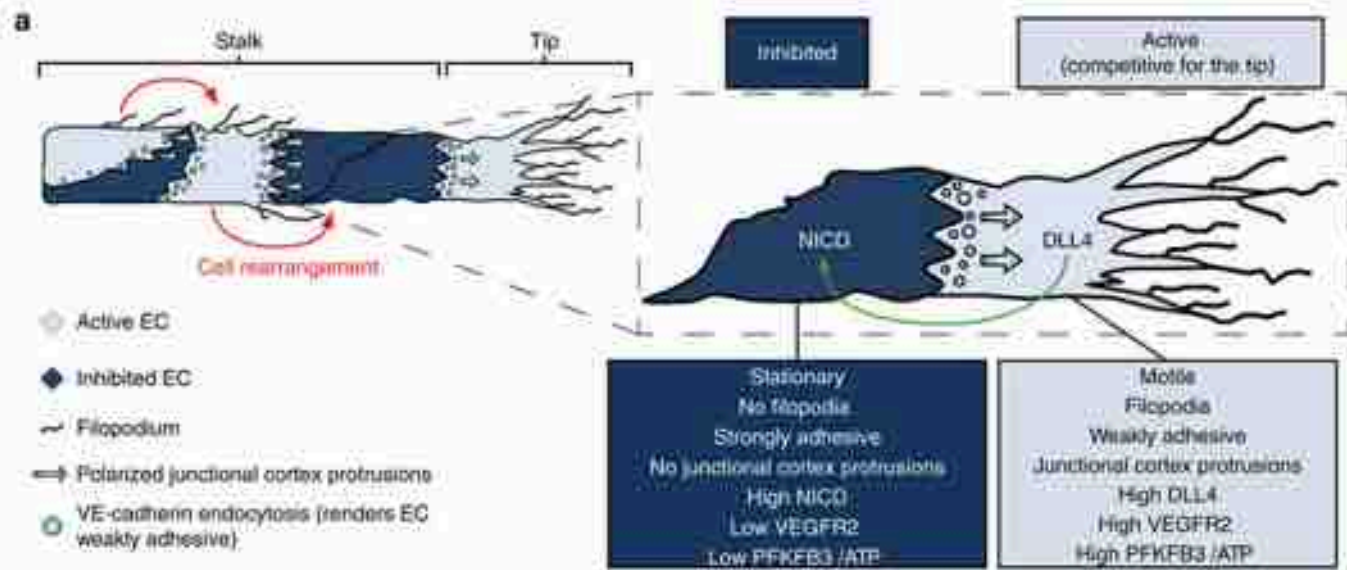
Inhibition adhésion C endo/Cendo et C endo/péricytes

Gradient facteur de croissance

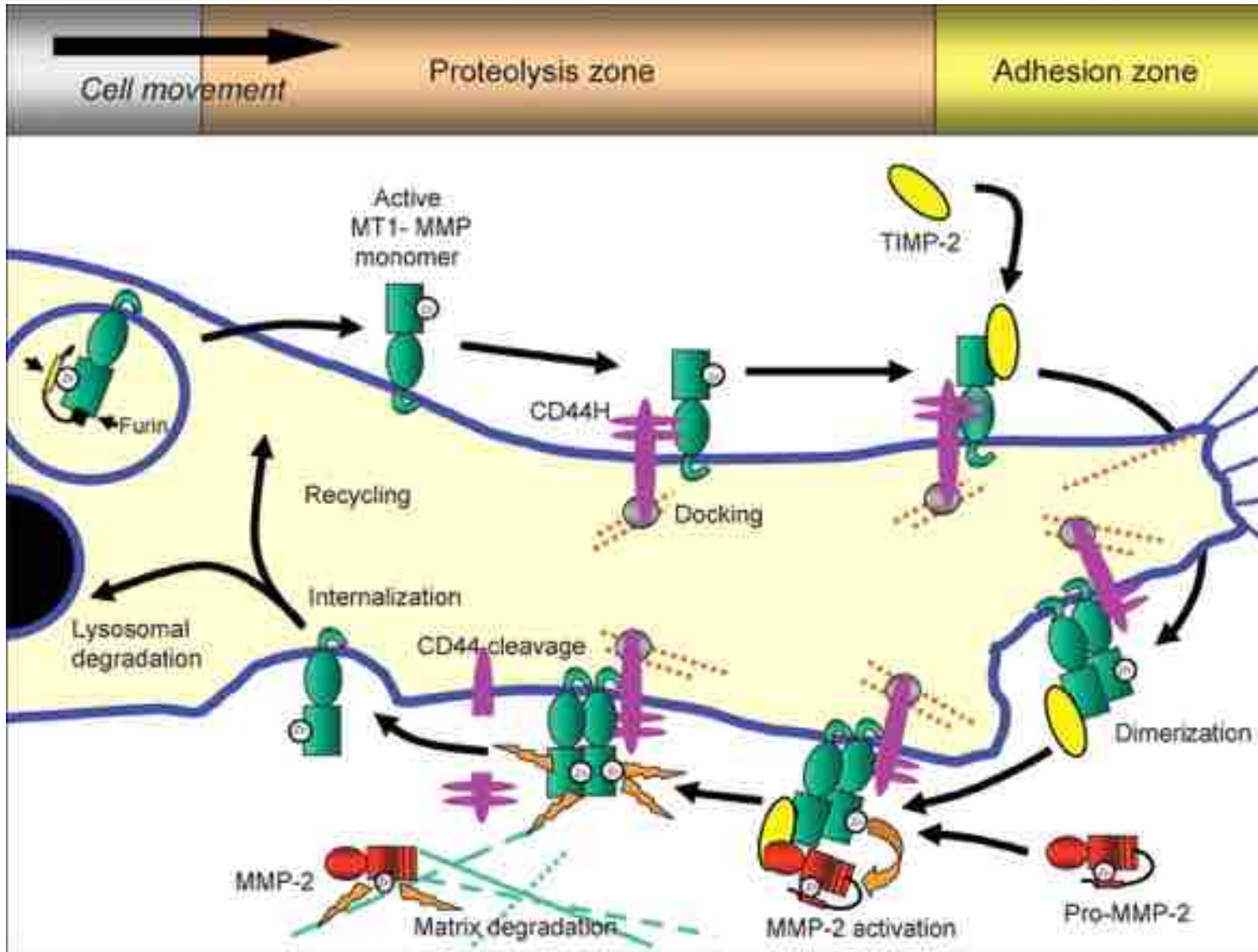
## 2- Sélection des tip cells & des stalk cells



# 2- Sélection des tip cells & des stalk cells



### 3- Migration des Tip cells

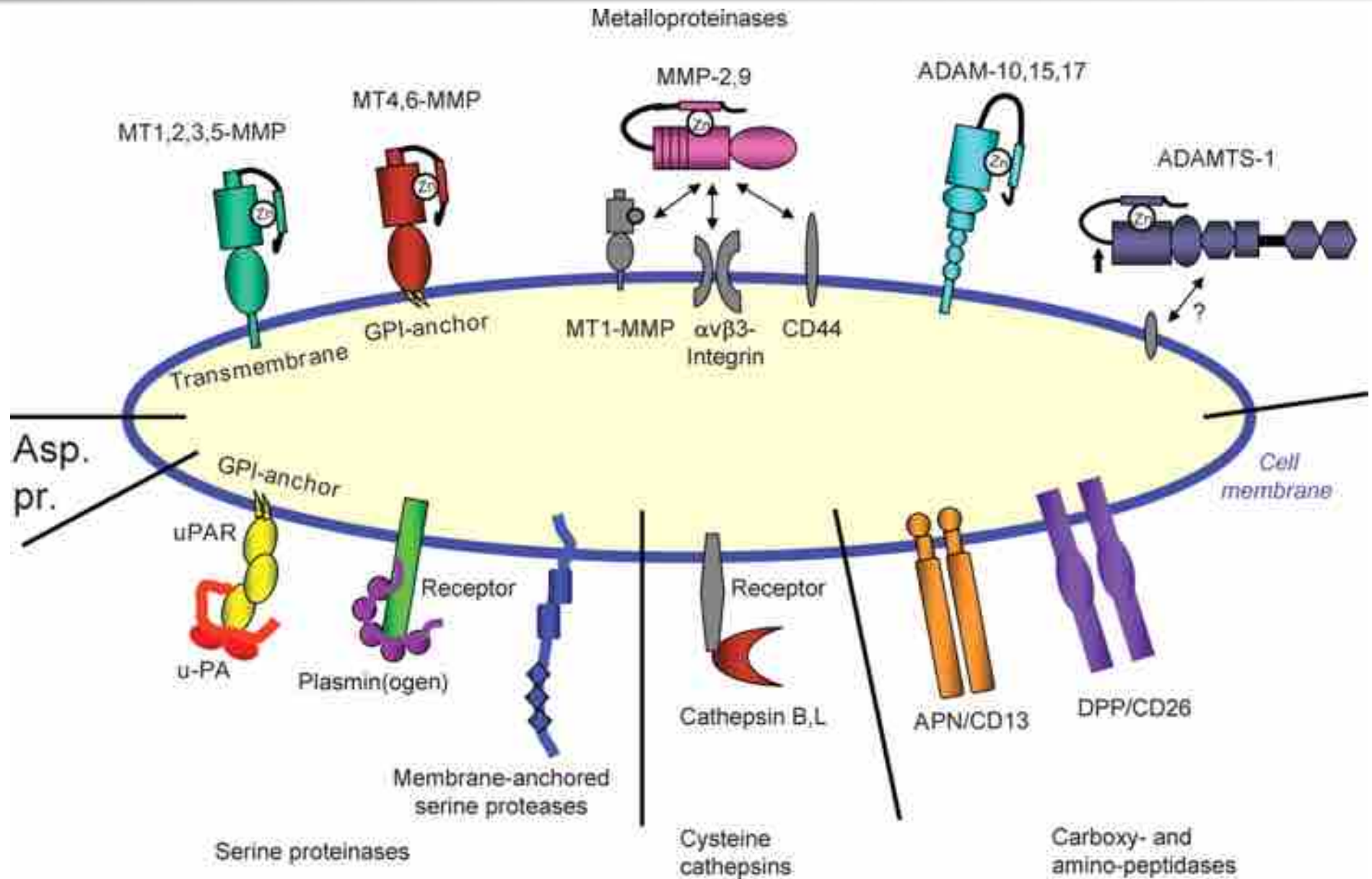


Espace pour la migration des cellules endothéliales

Libération de facteurs de croissance

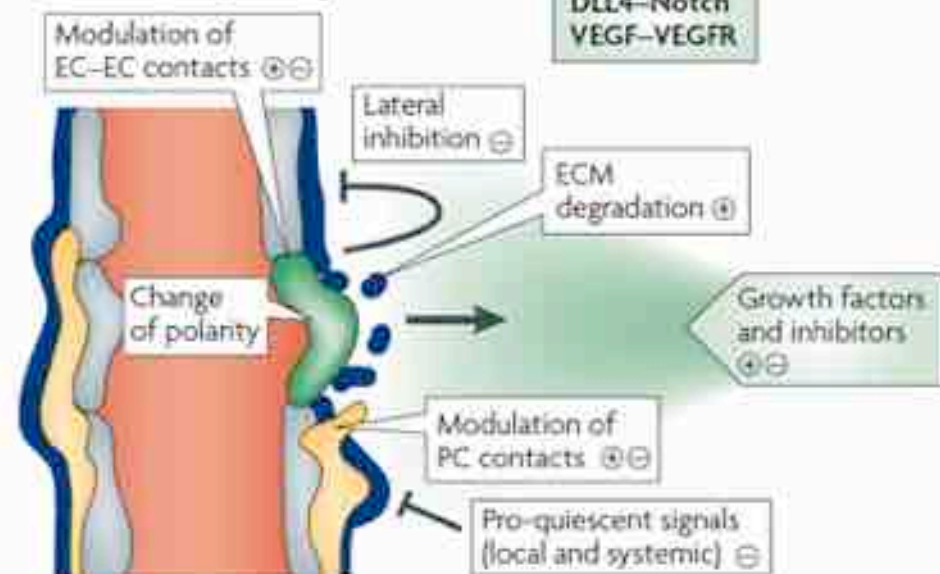
Activation de certaines cytokines (TGF $\beta$ )

Production de fragments protéolytiques ayant des propriétés angiogéniques

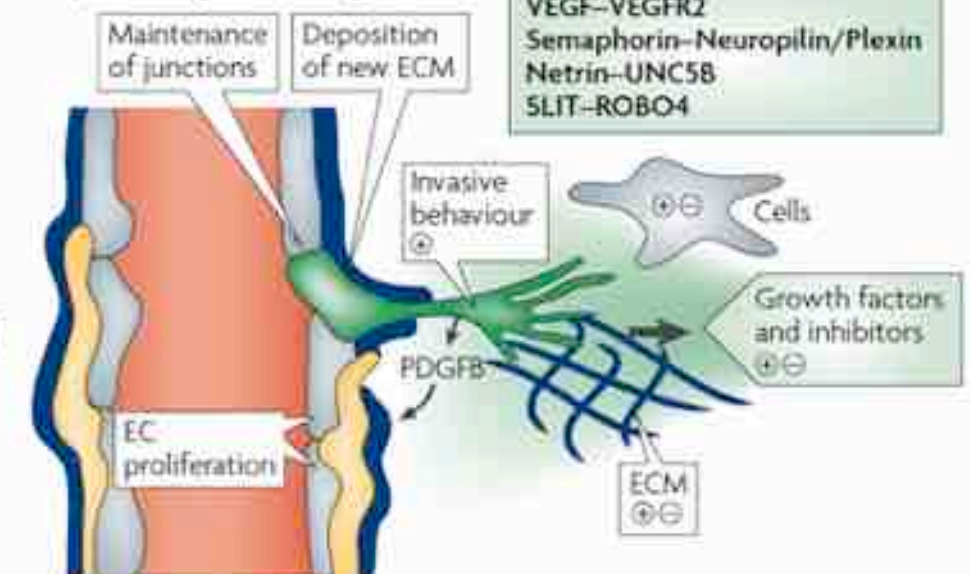


# 3- Migration des Tip cells

## a Selection of sprouting ECs



## b Sprout outgrowth and guidance

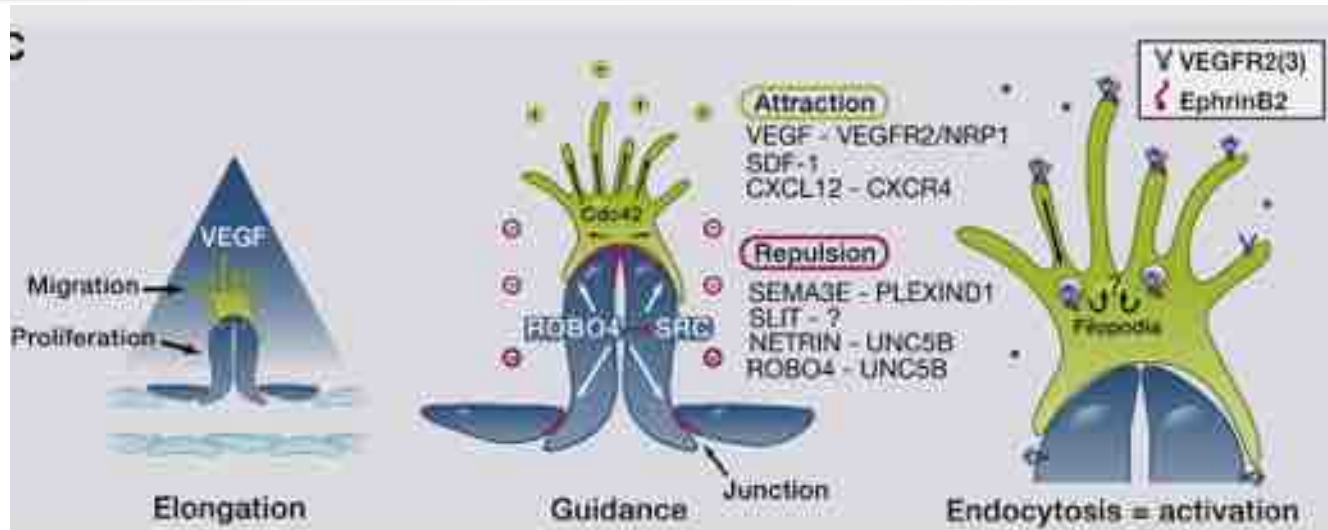


Sélection des cellules endothéliales à l'origine du bourgeon  
Inhibition adhésion C endo/Cendo et C endo/péricytes  
Gradient facteur de croissance

Développement du bourgeon  
Guidance/orientation du néocapillaire



# Orientation de la migration des Tip Cells

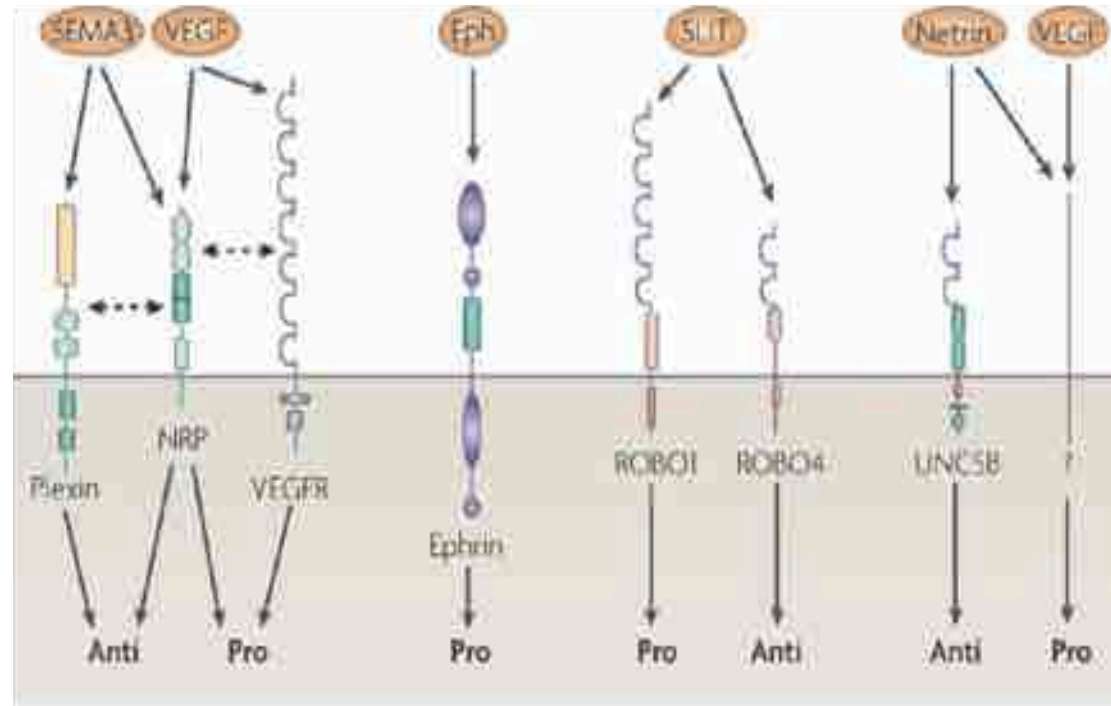


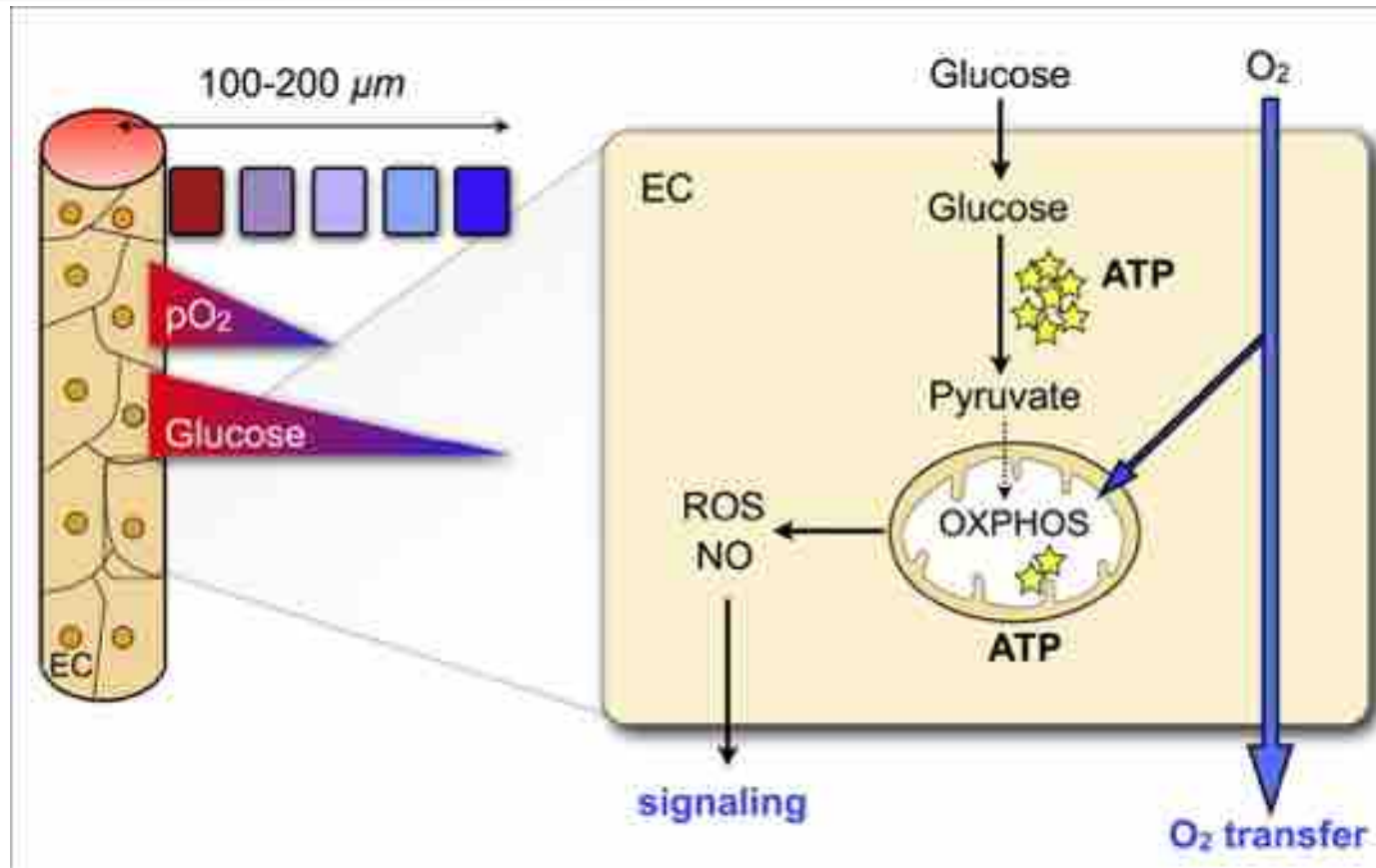
∨ Attraction :

VEGF/VEGFR2  
Slit2/Robo1  
Netrin1/DCC

∨ Répulsion:

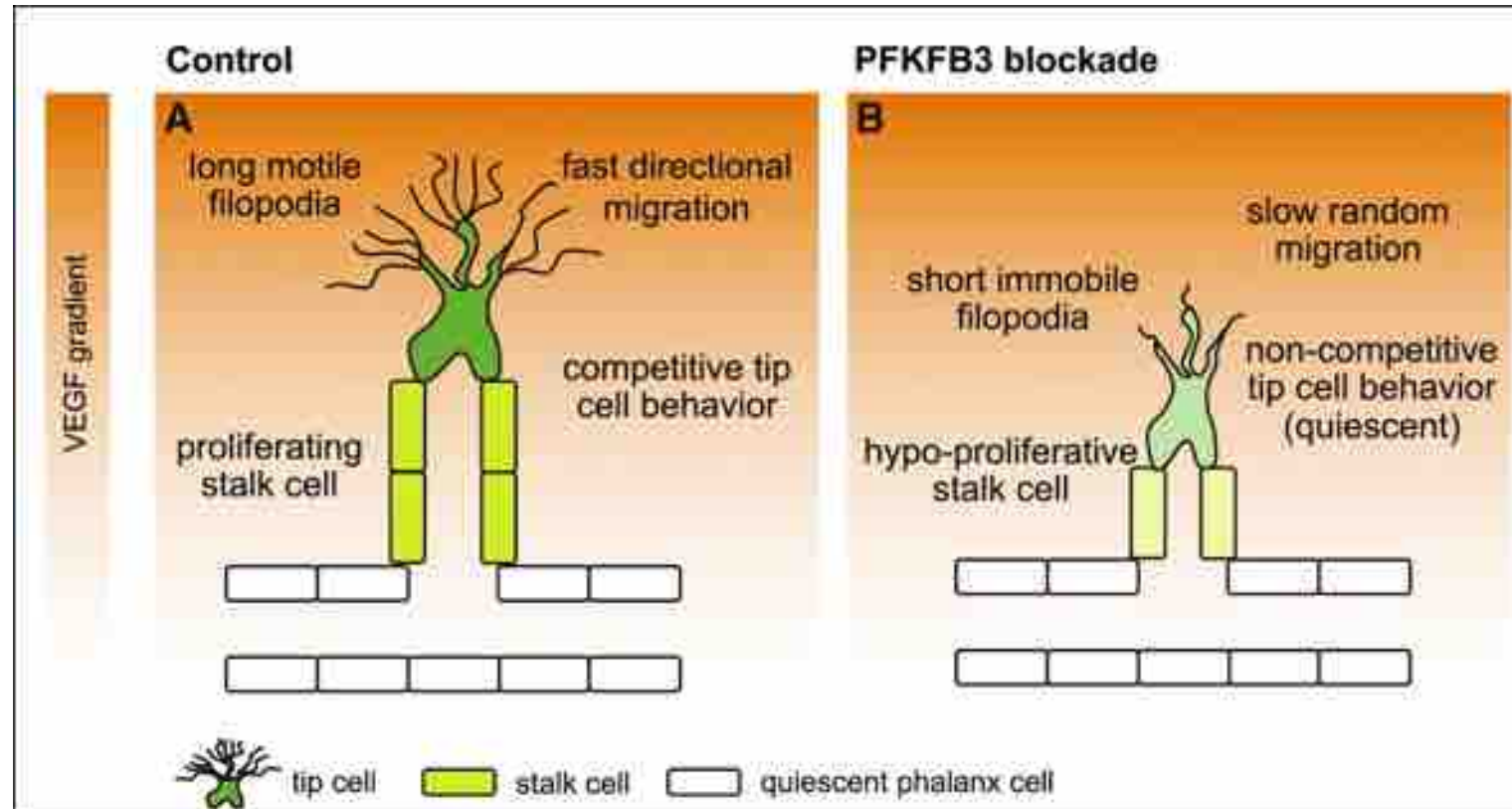
Slit2/Robo4  
Netrin1/UNC5B  
Semaphorin/Plexin D1





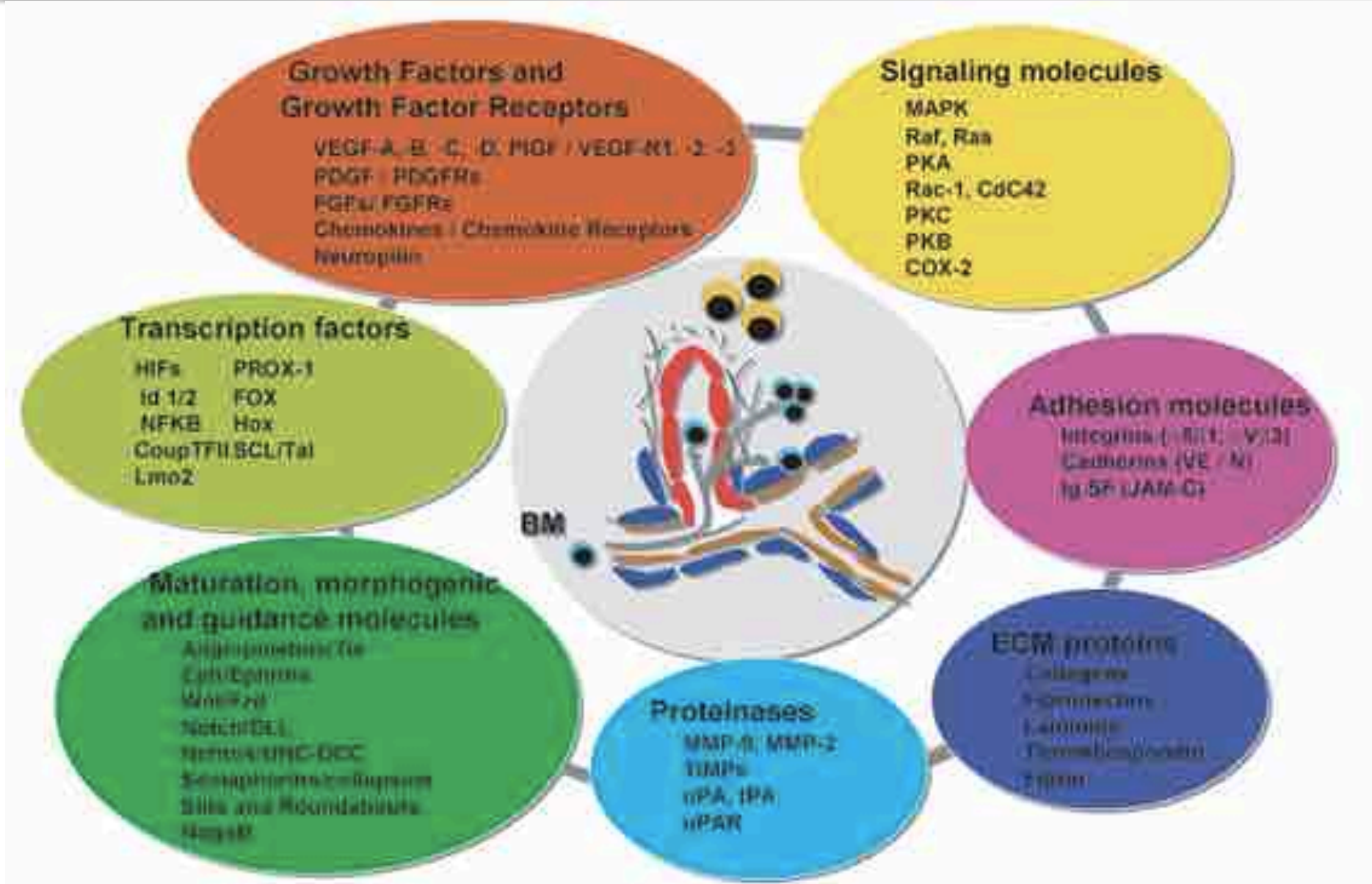
Malgré un accès immédiat à l'oxygène de la circulation sanguine, les CE produisent de l'ATP par la glycolyse. Les mitochondries agissent en produisant des ROS et du NO.

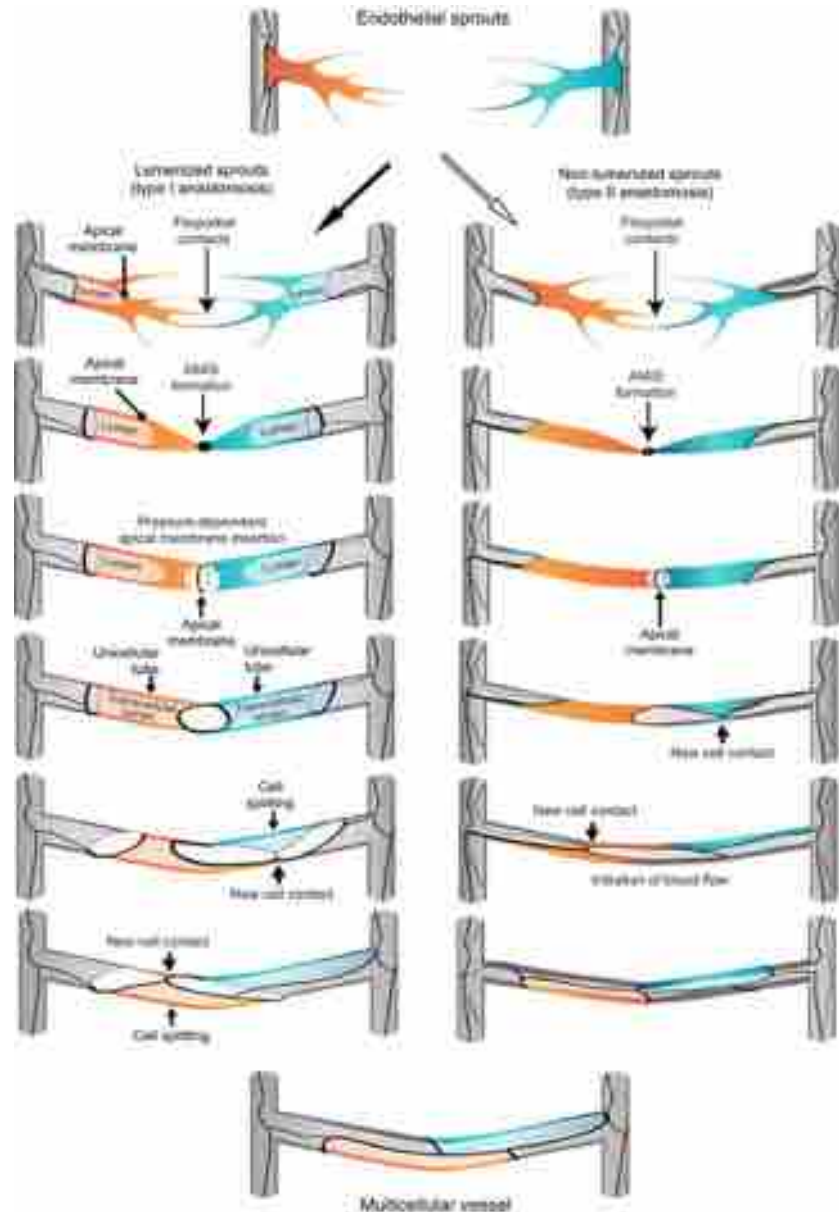
**Diffusion maximale de l'oxygène à travers la barrière endothéliale vers les tissus péri-vasculaires**



(A) Conditions contrôles: les stalk cells prolifèrent et les tip cells migrent uni-directionnellement en étendant leurs filopodes mobiles.

(B) Après inhibition de PFKFB3 (phosphofruktokinase-2/fructose-2,6-bisphosphatase 3 qui transforme G6P en F6P au cours de la glycolyse), les stalk cells sont hypo-prolifératives alors que les tip cells ont une capacité migratoire restreinte.



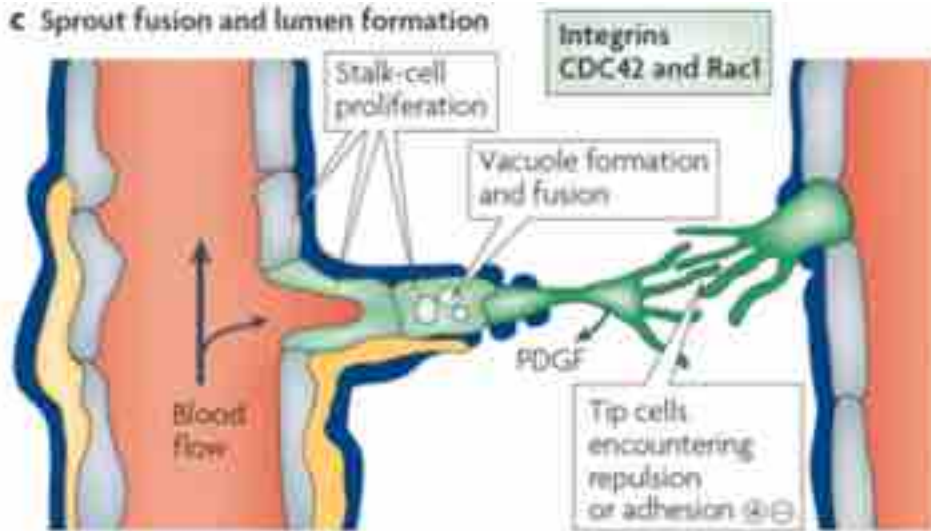


L'anastomose peut se produire entre deux pousses et impliquer deux Tip cells (anastomose "tête à tête"), ou entre les pousses et un vaisseau sanguin fonctionnel, impliquant une seule cellule de pointe (anastomose "tête à côté")

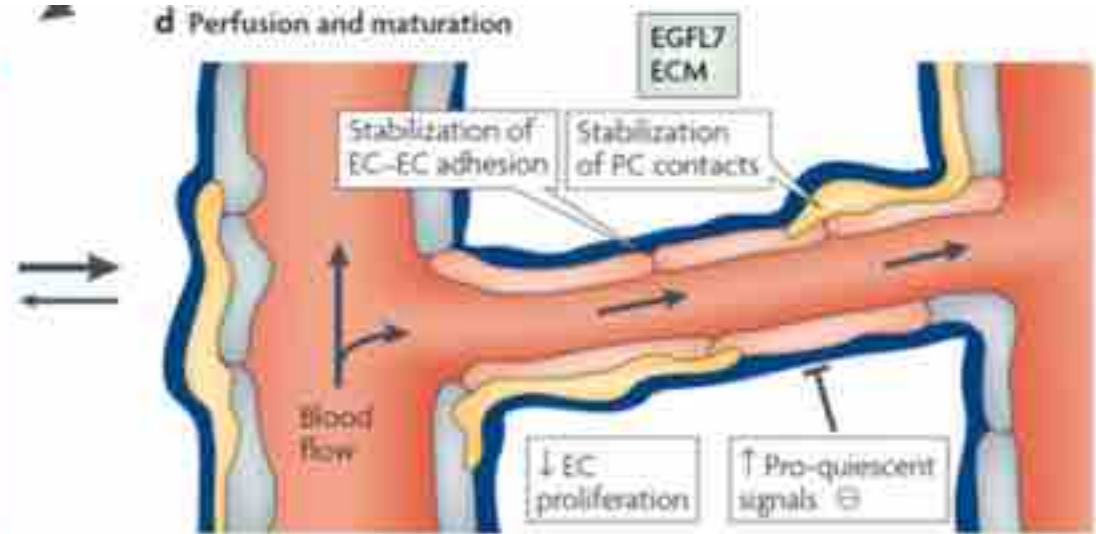
**Dans l'anastomose de type I,** l'invagination de la membrane apicale par la pression sanguine et la fusion ultérieure de la membrane apicale génère un tube unicellulaire contenant des cellules avec une lumière transcellulaire. La transition ultérieure d'un tube unicellulaire à un tube multicellulaire dans l'anastomose de type I implique des réarrangements cellulaires et une division cellulaire.

**Dans l'anastomose de type II,** les réarrangements cellulaires entraînent une coalescence de la lumière et la formation d'un tube multicellulaire

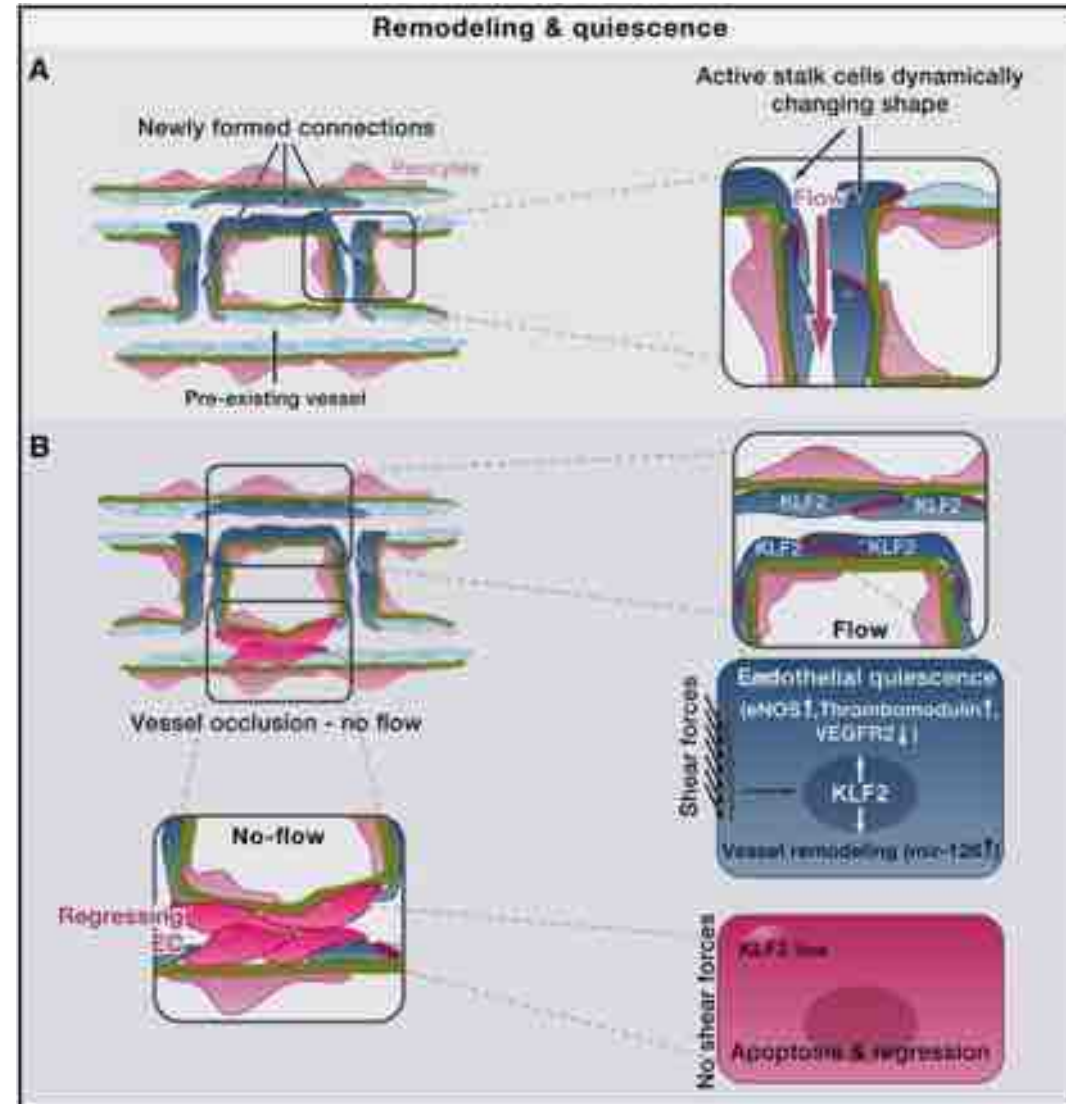
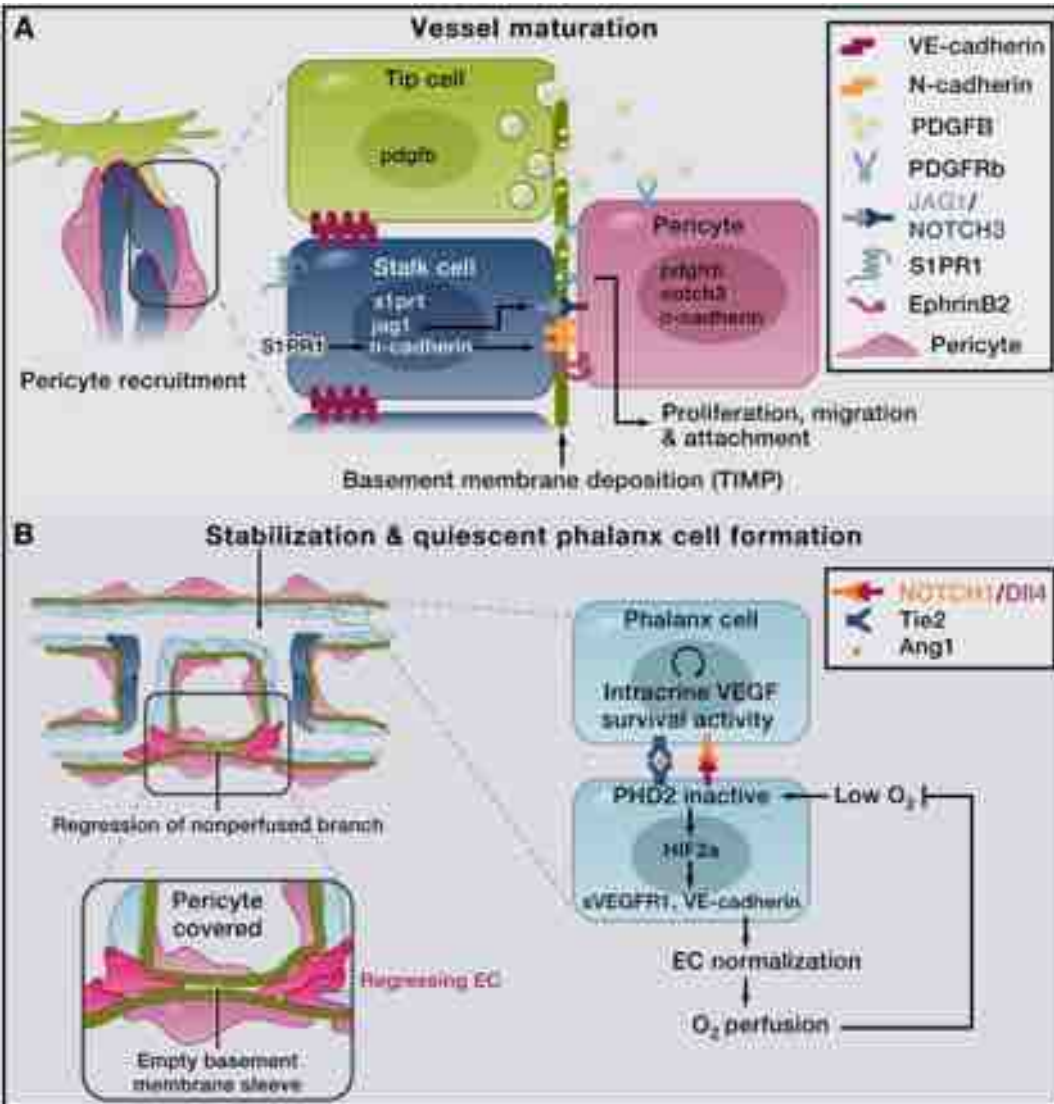
**c** Sprout fusion and lumen formation



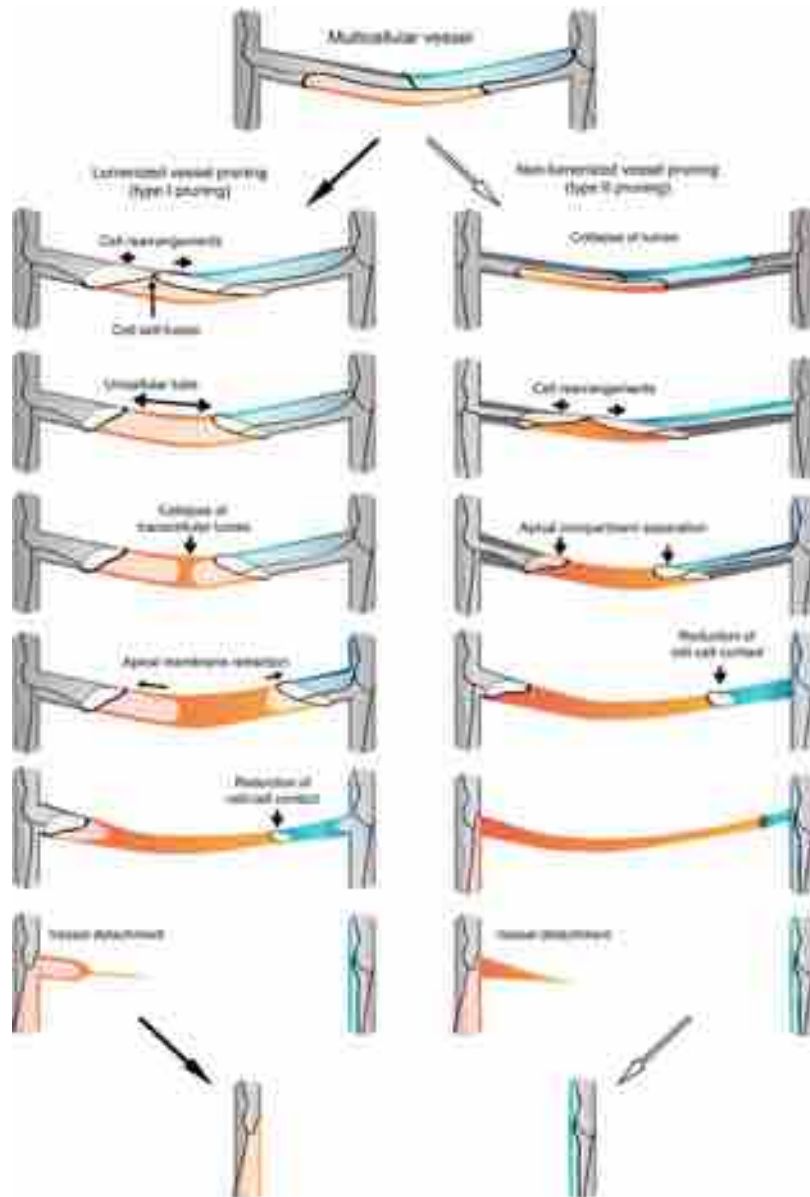
**d** Perfusion and maturation



# 6- Maturation, stabilisation et formation des phallanx cells



# 7- Pruning (Taille): élimination des vaisseaux

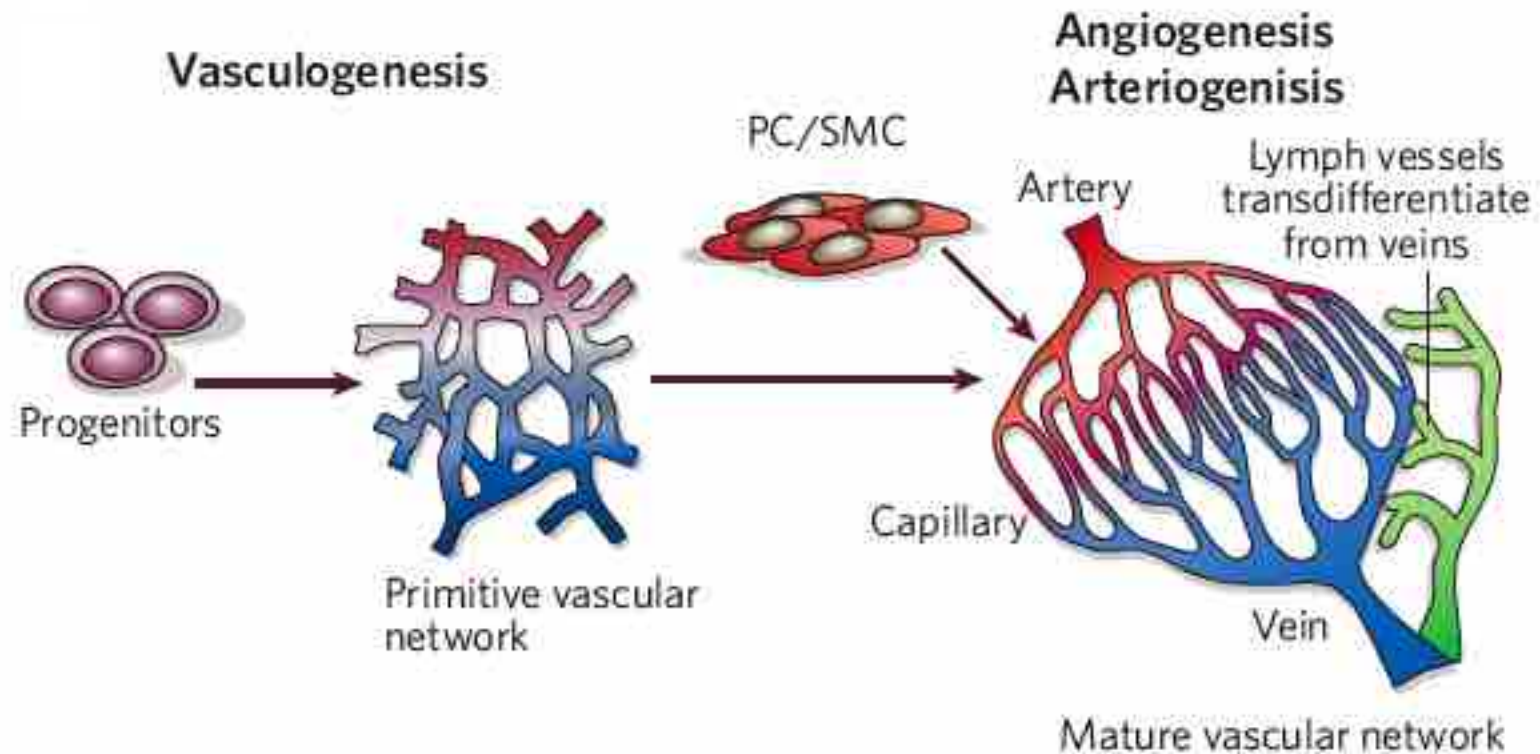


Après avoir été établis, les réseaux vasculaires fonctionnels se remodelent souvent afin d'optimiser le débit ou de s'adapter aux demandes changeantes du flux sanguin.

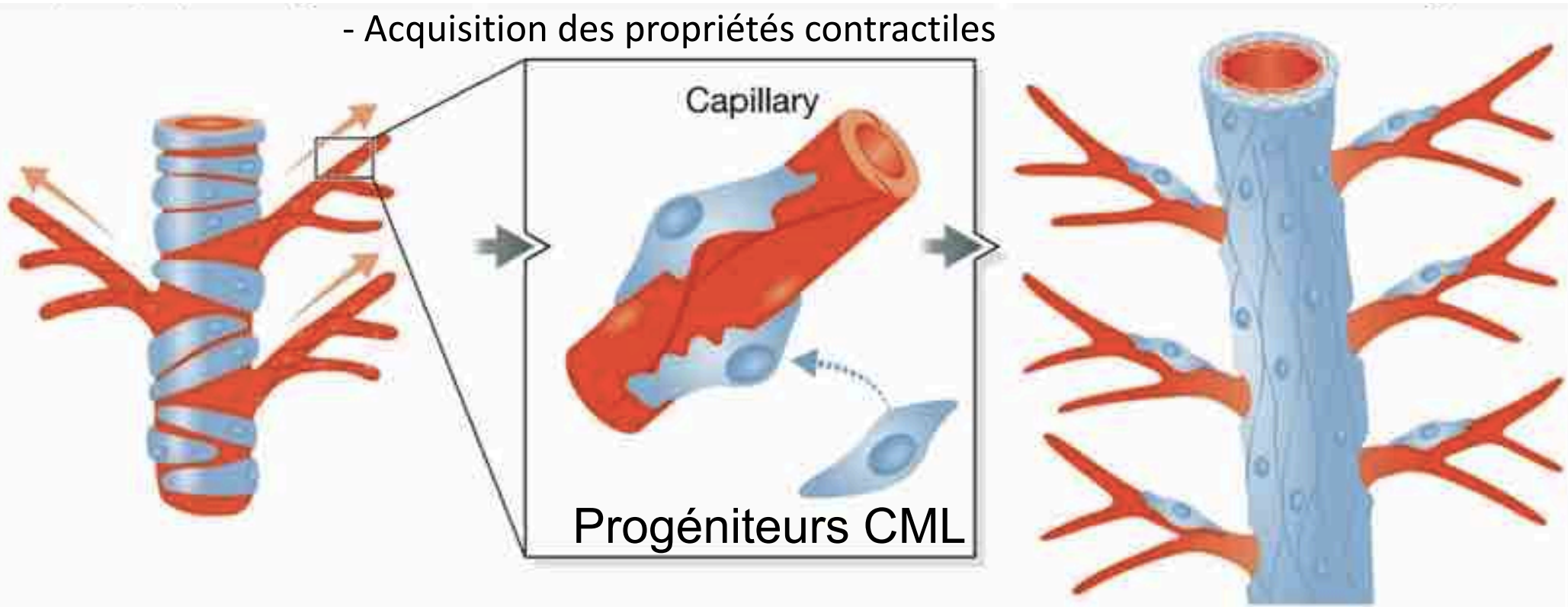
Bien que l'apoptose ait été impliquée dans la régression des gros vaisseaux sanguins, il s'avère que les petits vaisseaux sont taillés par la réabsorption des CE dans le reste du système vasculaire. Il est intéressant de noter que cet élagage est régulé par le flux sanguin.



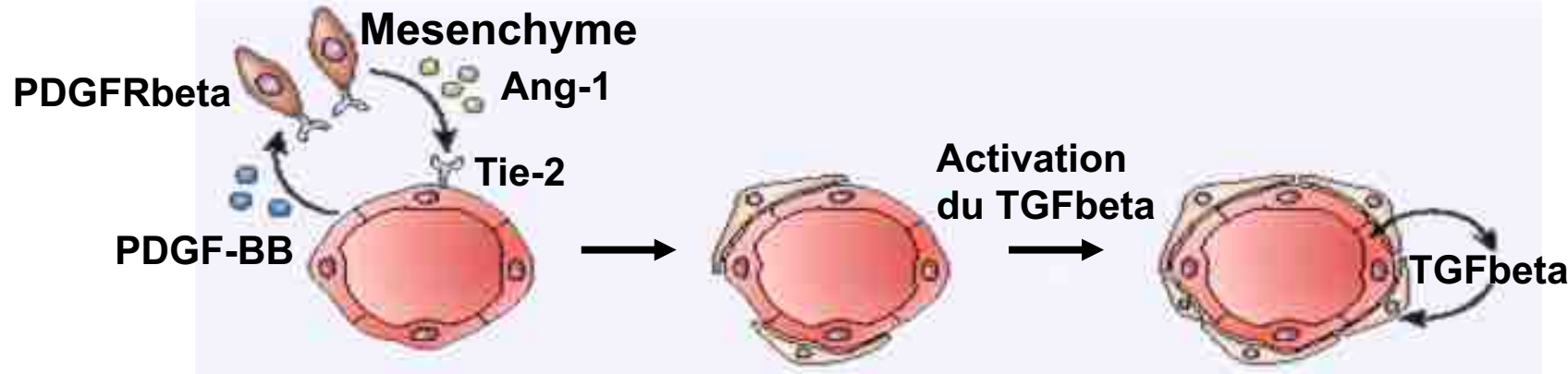
# -IV- ARTERIOGENESE



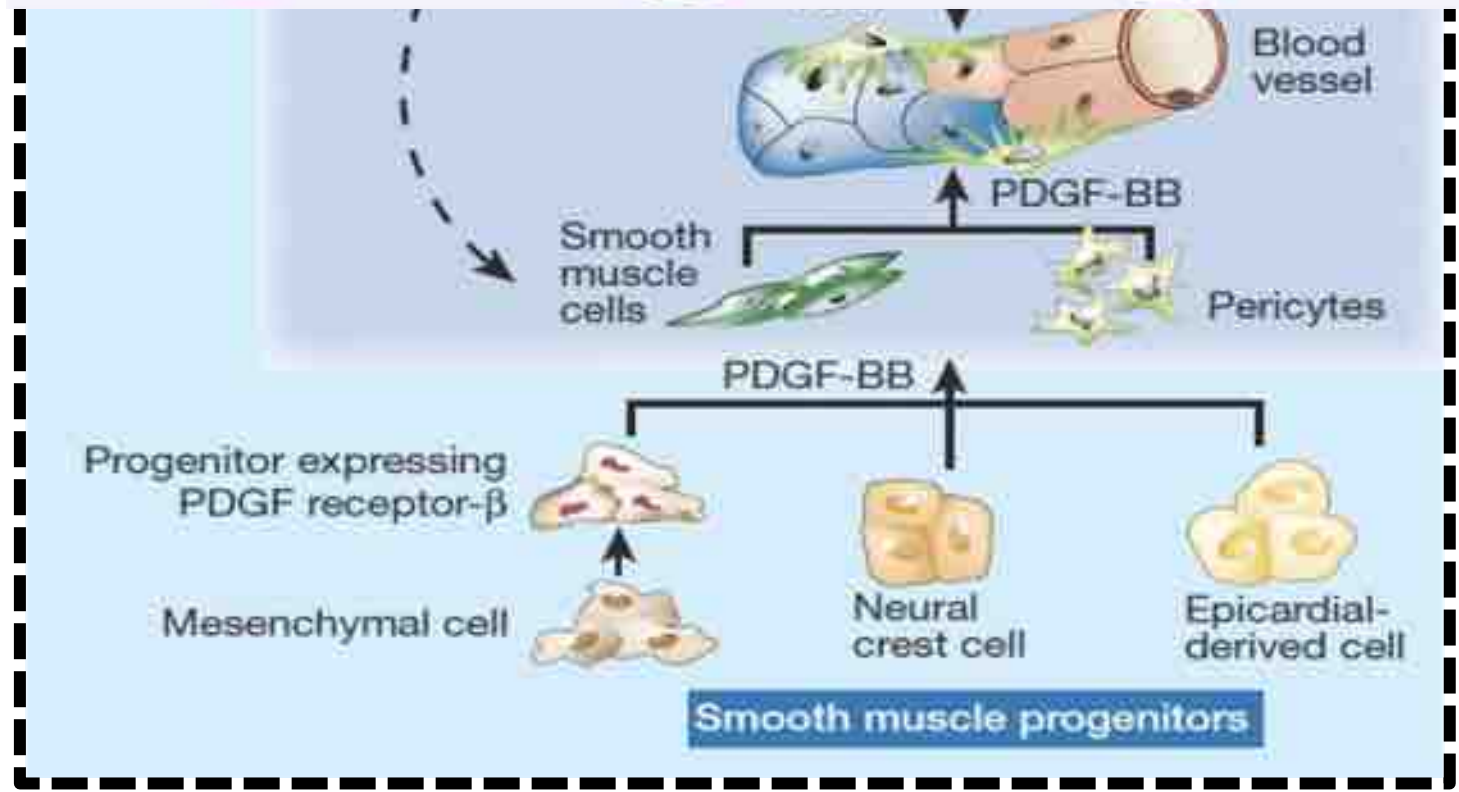
- Recrutement des cellules souches pariétales
- Différenciation/prolifération en CML
- Epaissement pariétale: production MEC
- Acquisition des propriétés contractiles



# 1- Assemblage des cellules musculaires lisses

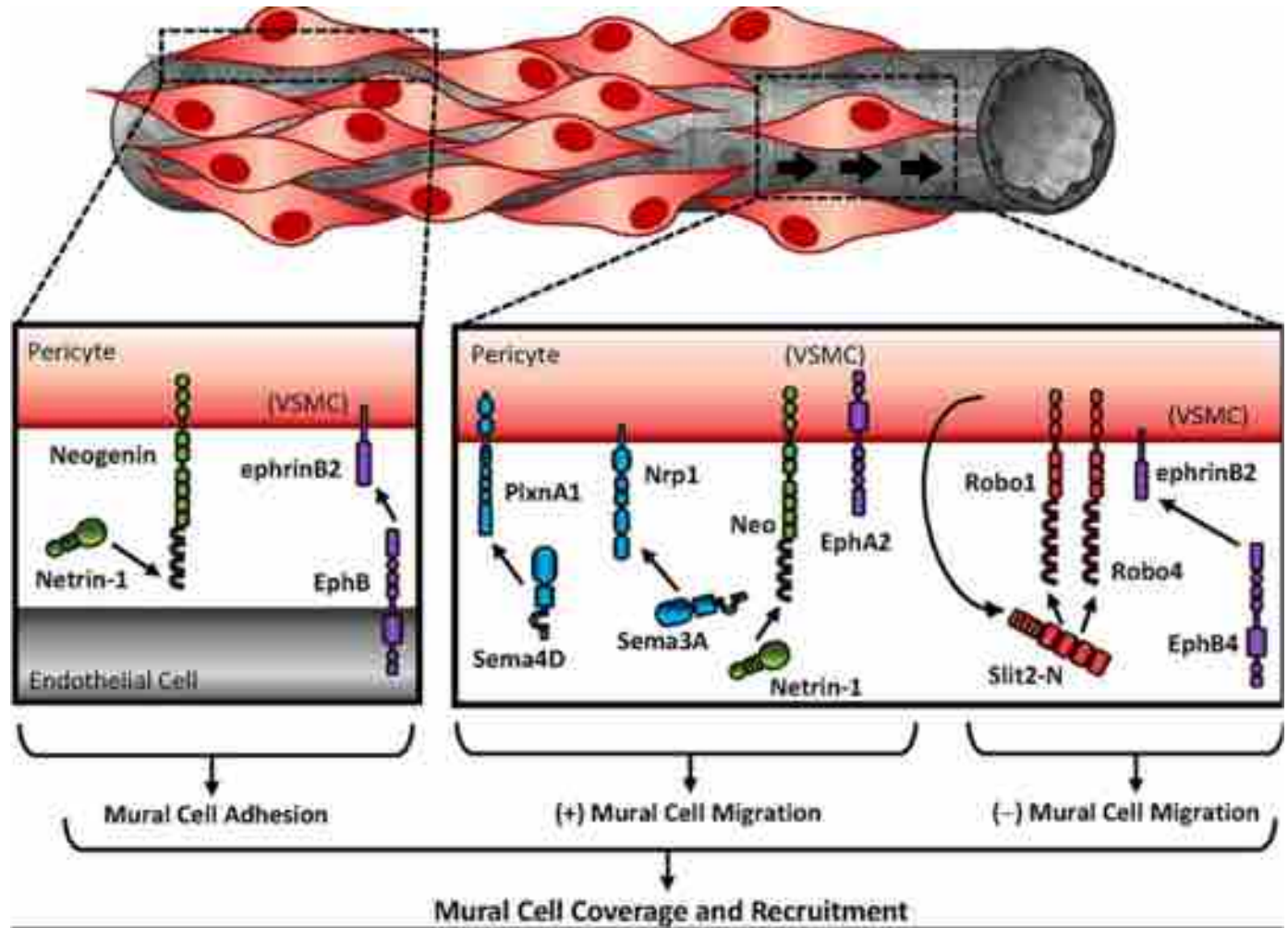


**Différenciation CML**



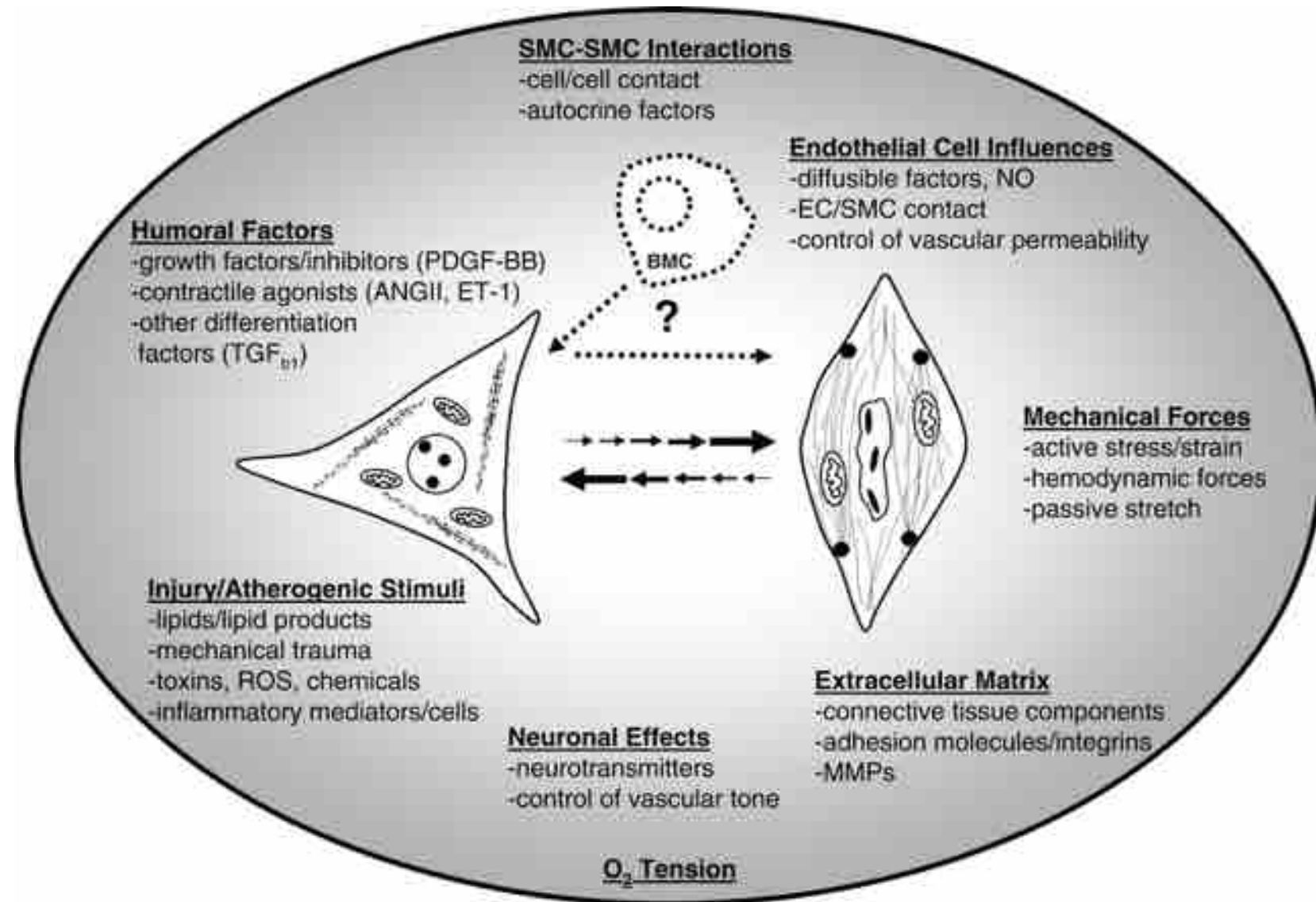
**Origine des CML**

# 1- Assemblage des cellules musculaires lisses

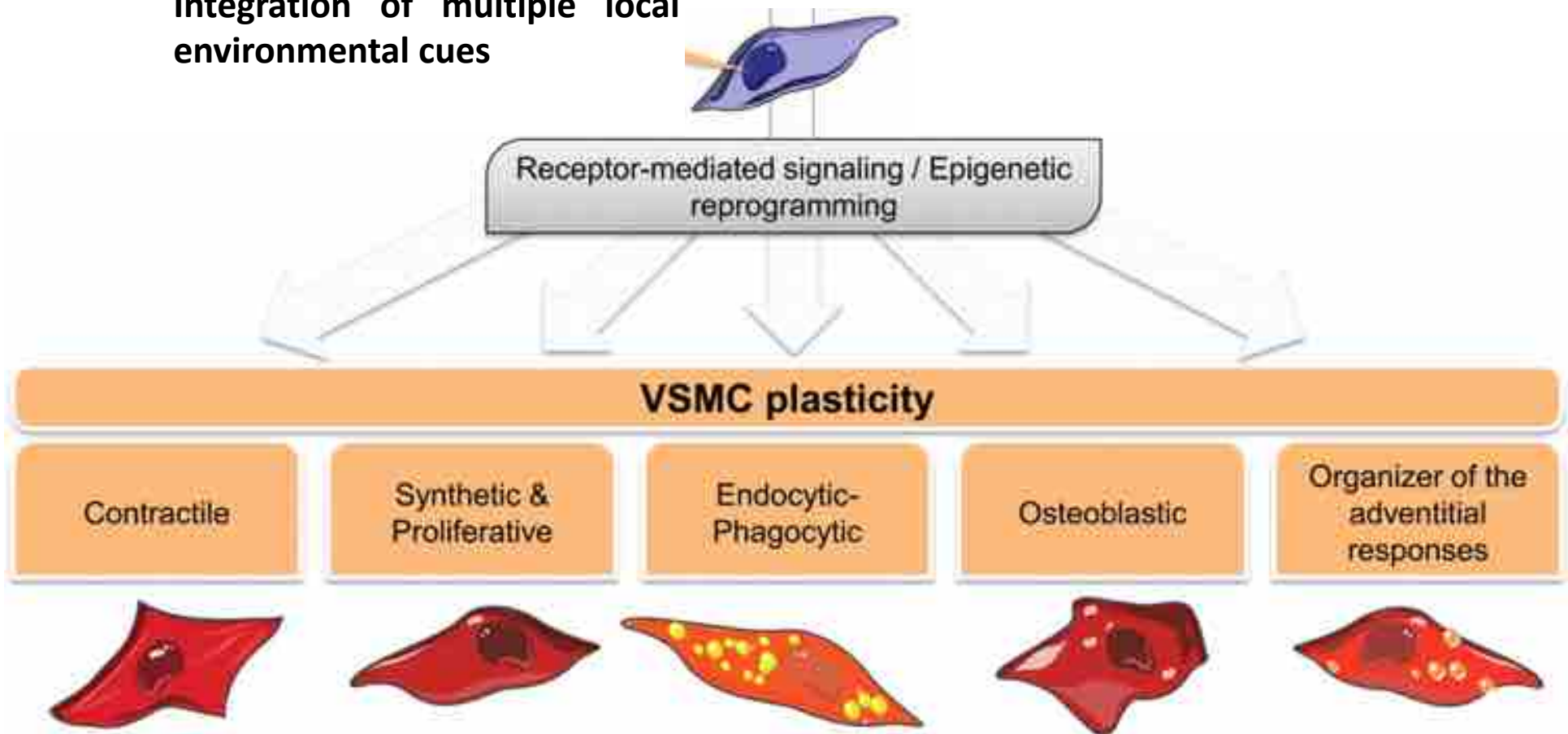


L'expression différentielle des molécules de guidage régule l'assemblage des CML. Alors que les sémaphorines et les nétrines favorisent la migration des cellules murales, les Slits et les éphrines inhibent la migration des cellules murales.

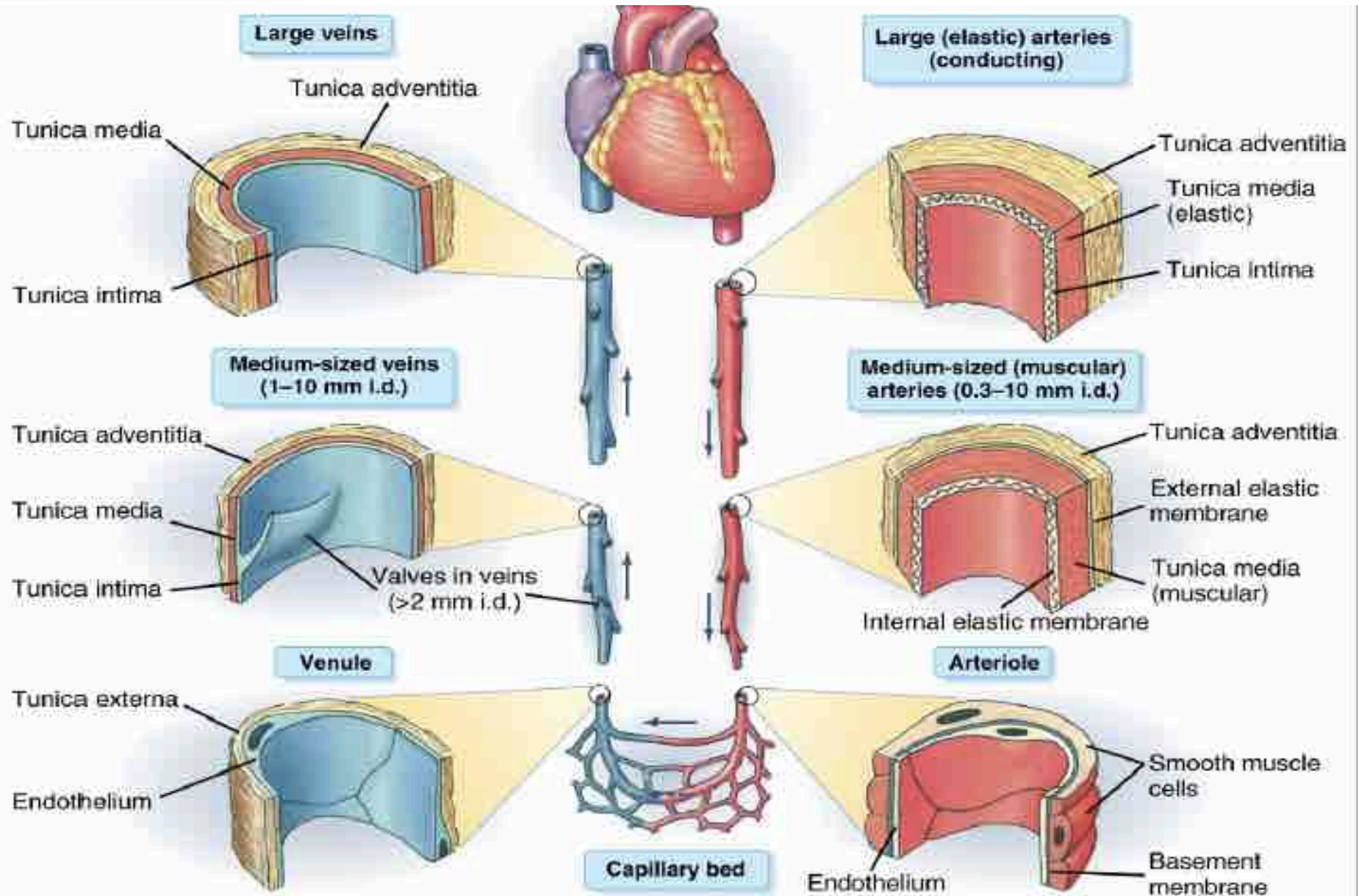
L'état de différenciation des cellules musculaires lisses est très plastique et dépend de l'intégration de multiples signaux provenant du microenvironnement.



**Integration of multiple local environmental cues**



# 3- Développement de la MEC et acquisition des propriétés contractiles

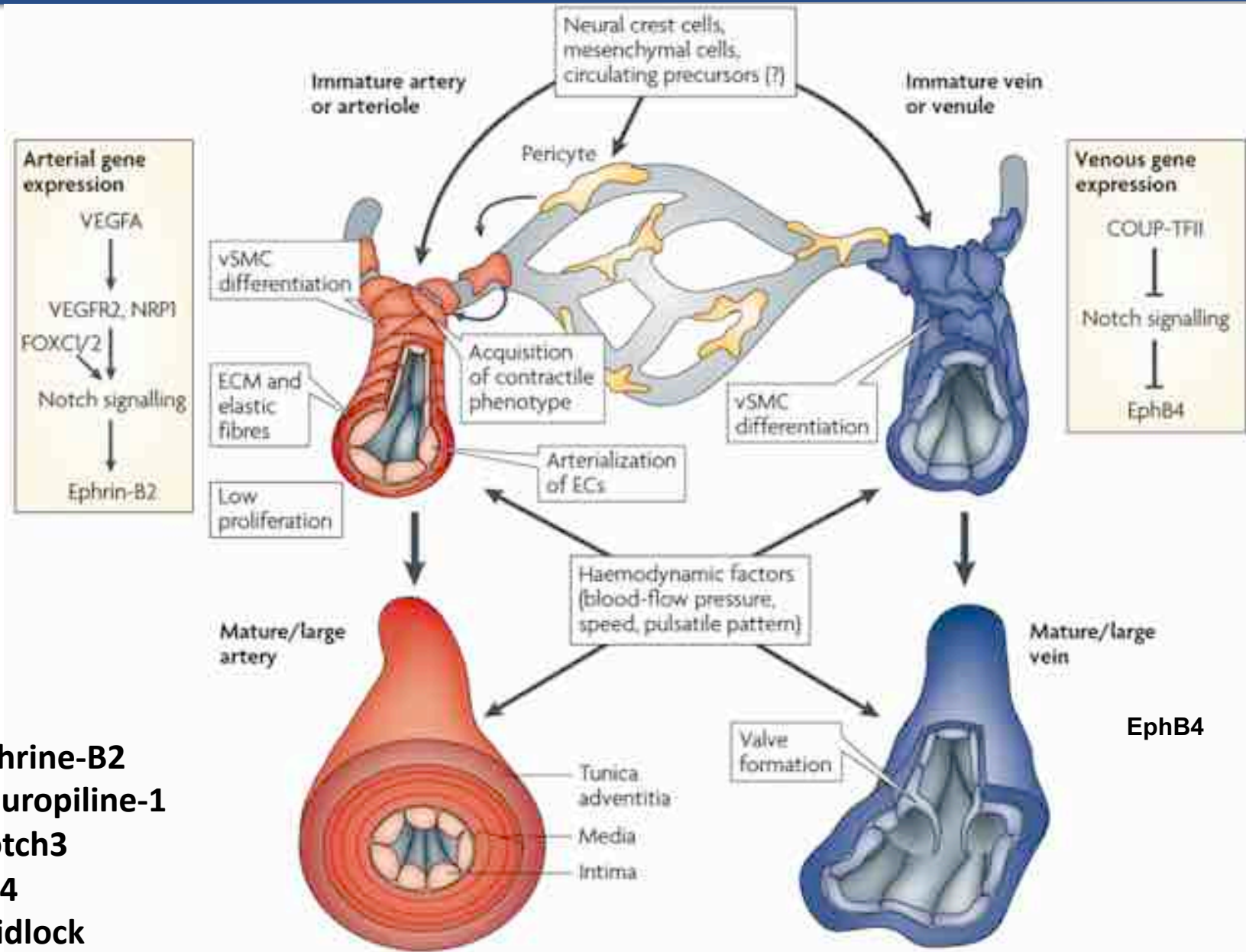


-V-

**Maturation/spécialisation de l'arbre vasculaire**



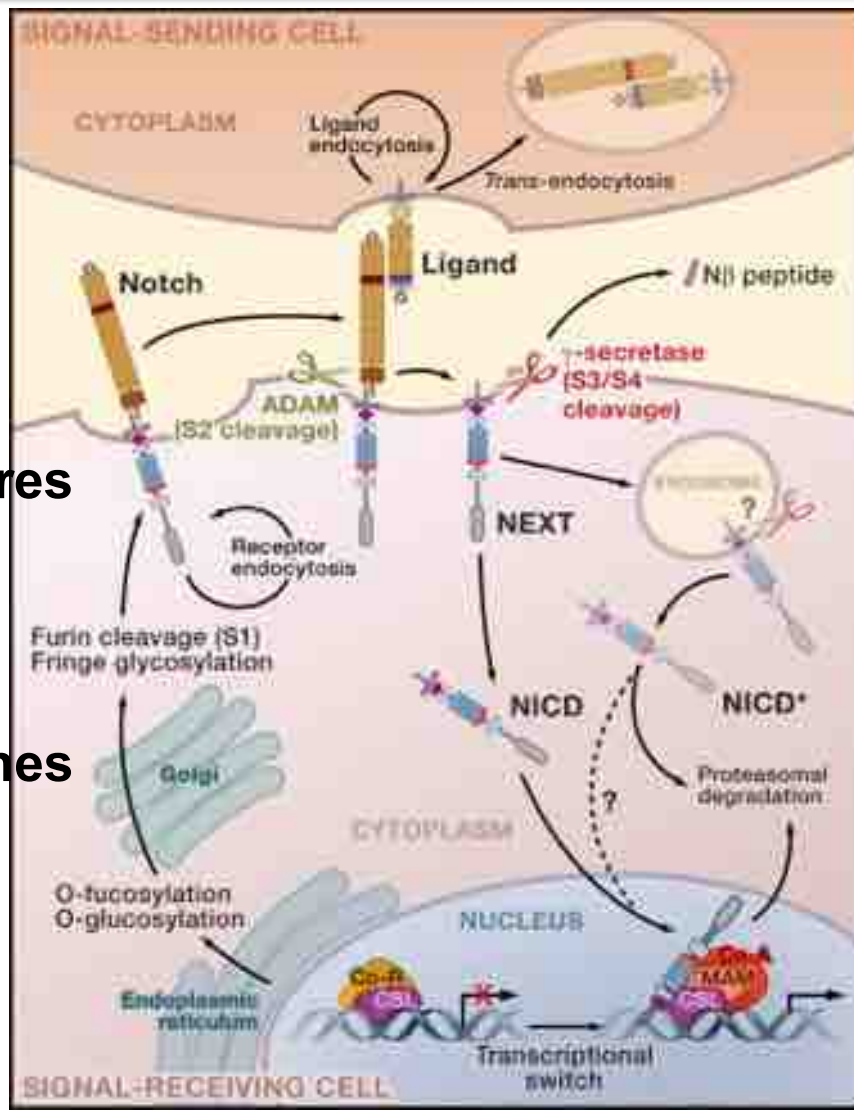
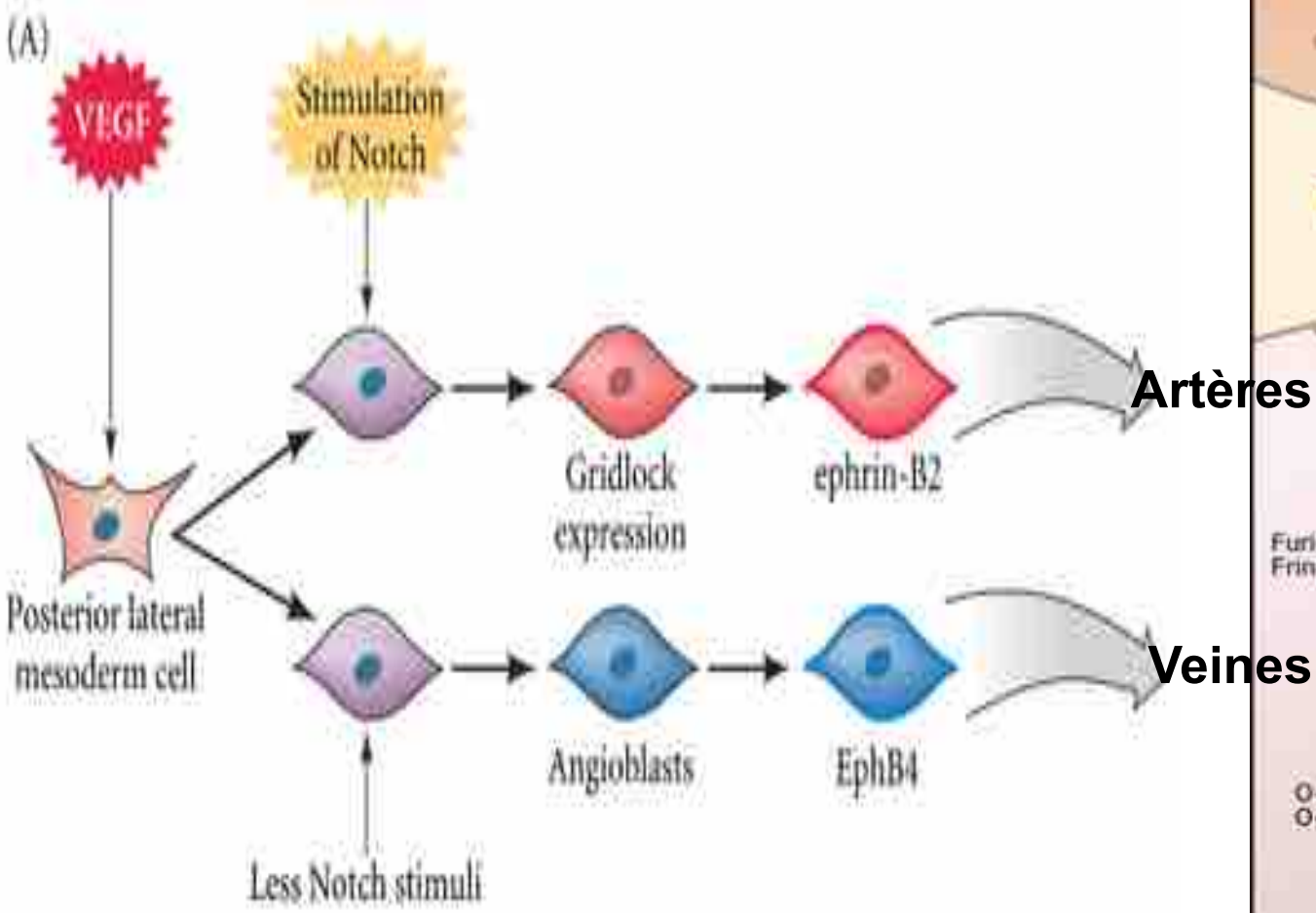
# 1- Différenciation artério-veineuse



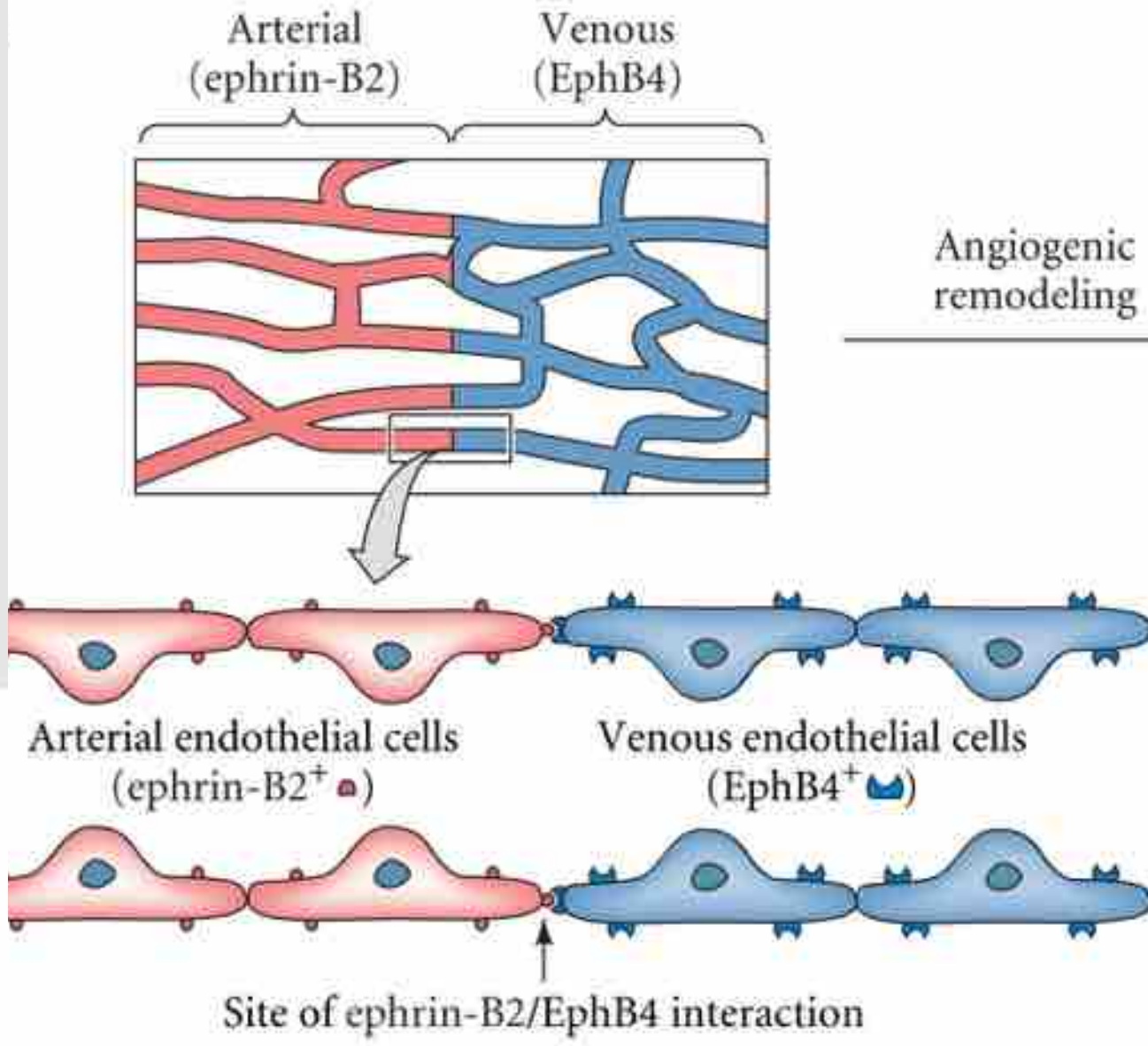
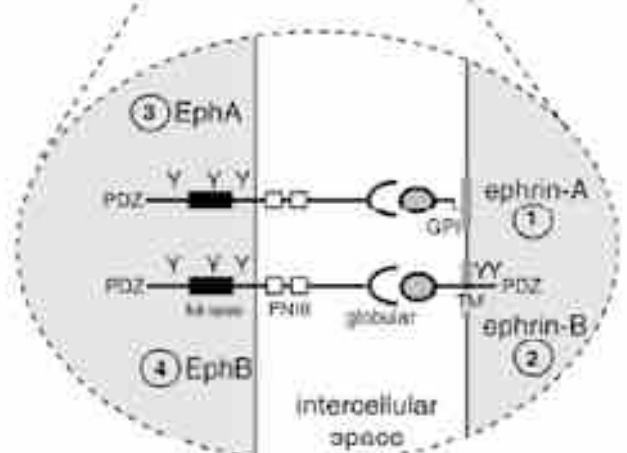
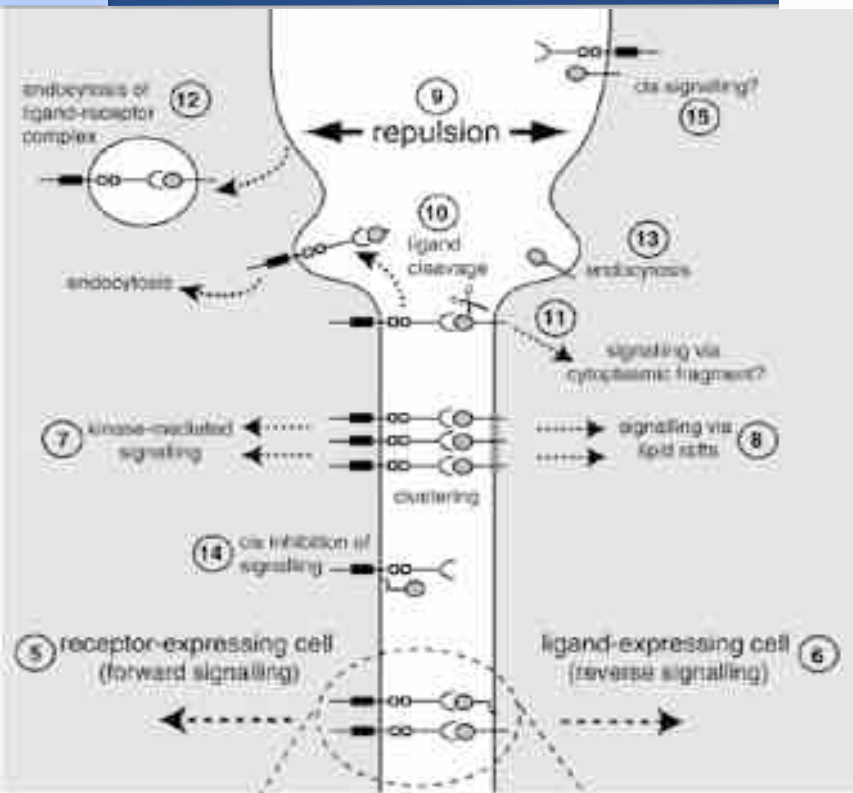
Ephrine-B2  
 Neuropiline-1  
 Notch3  
 Dll4  
 Gridlock

EphB4

# 1- Différenciation artériovoineuse: facteurs génétiques



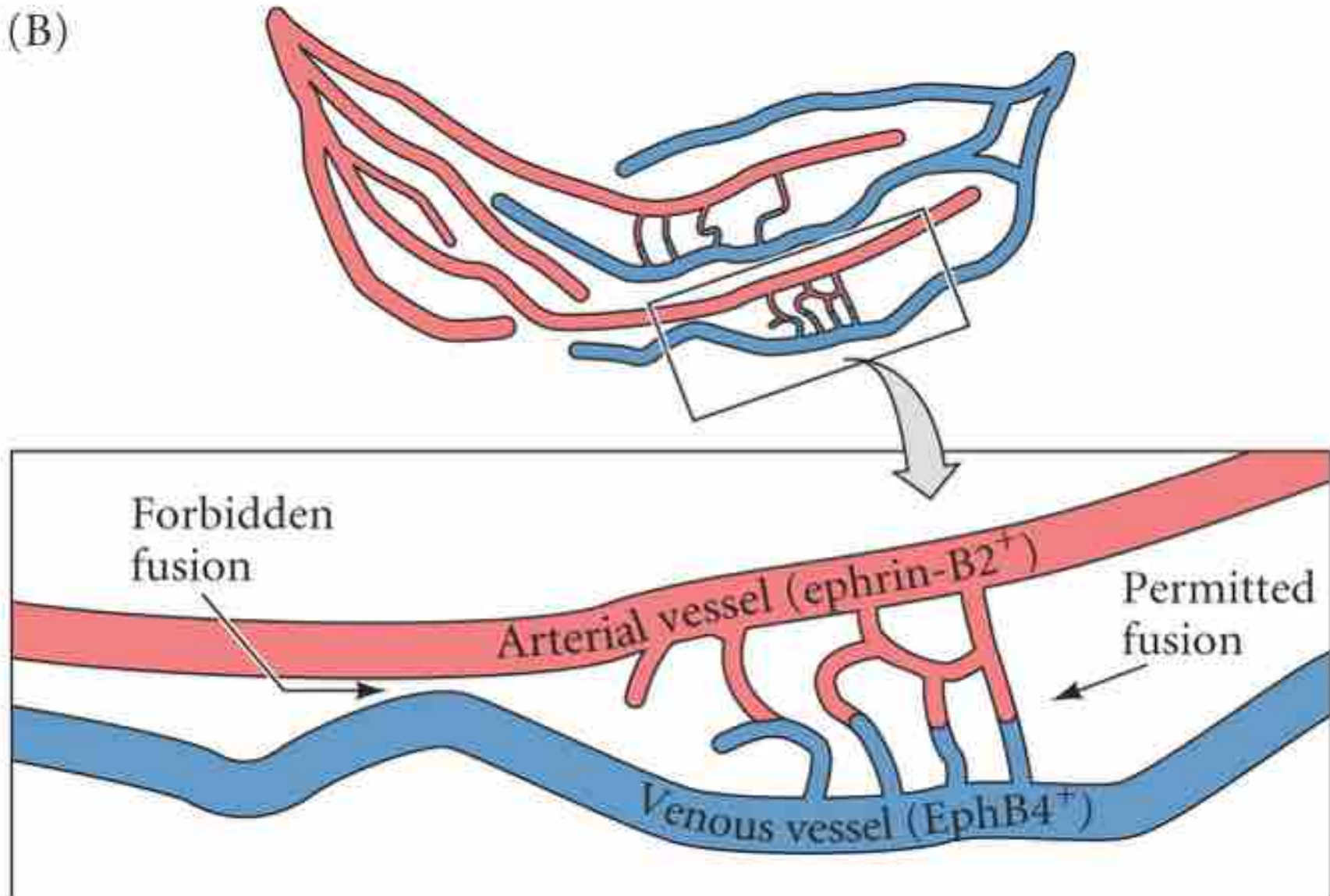
# 1- Différenciation artérioveineuse: facteurs génétiques



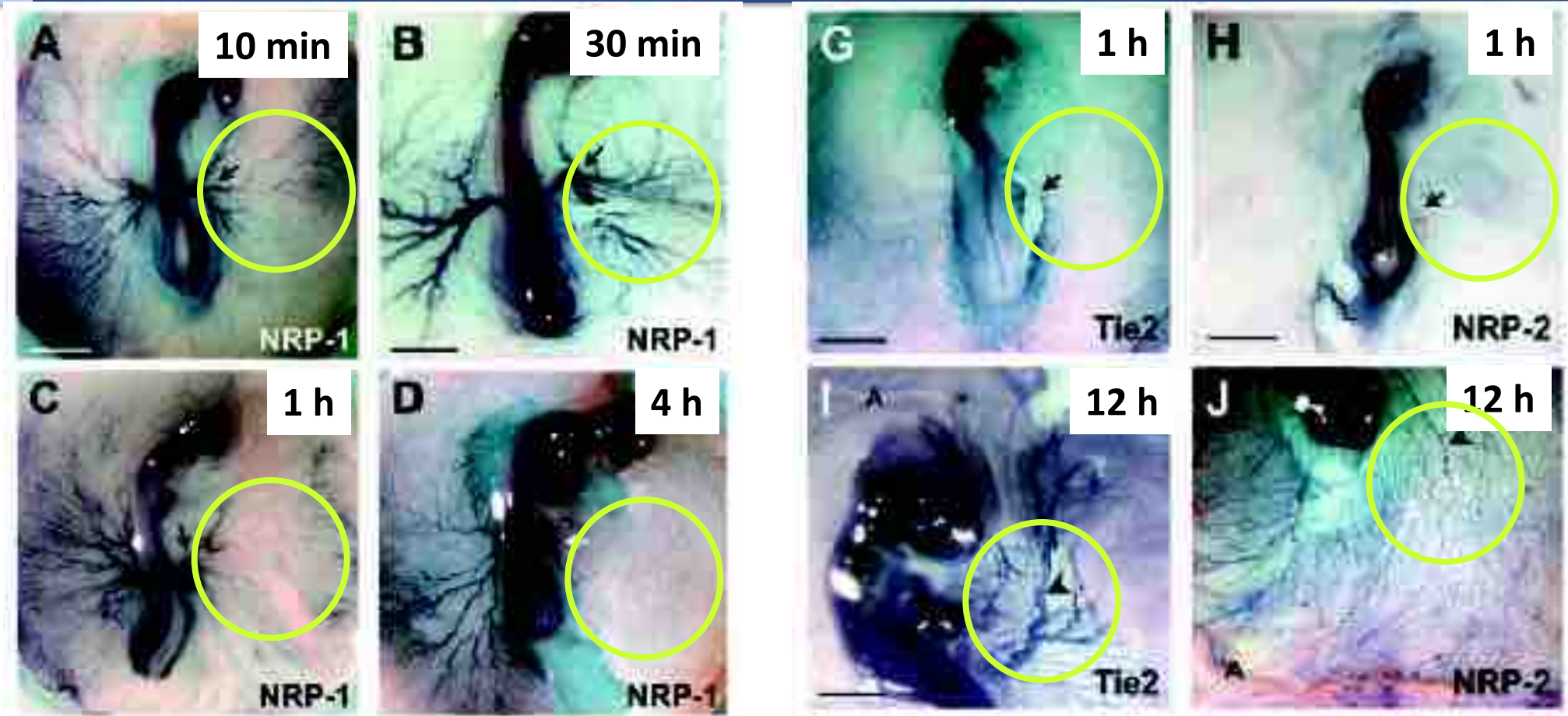
Angiogenic remodeling

Site of ephrin-B2/EphB4 interaction

(B)



# 1- Différenciation artériovoineuse: facteurs hémodynamiques

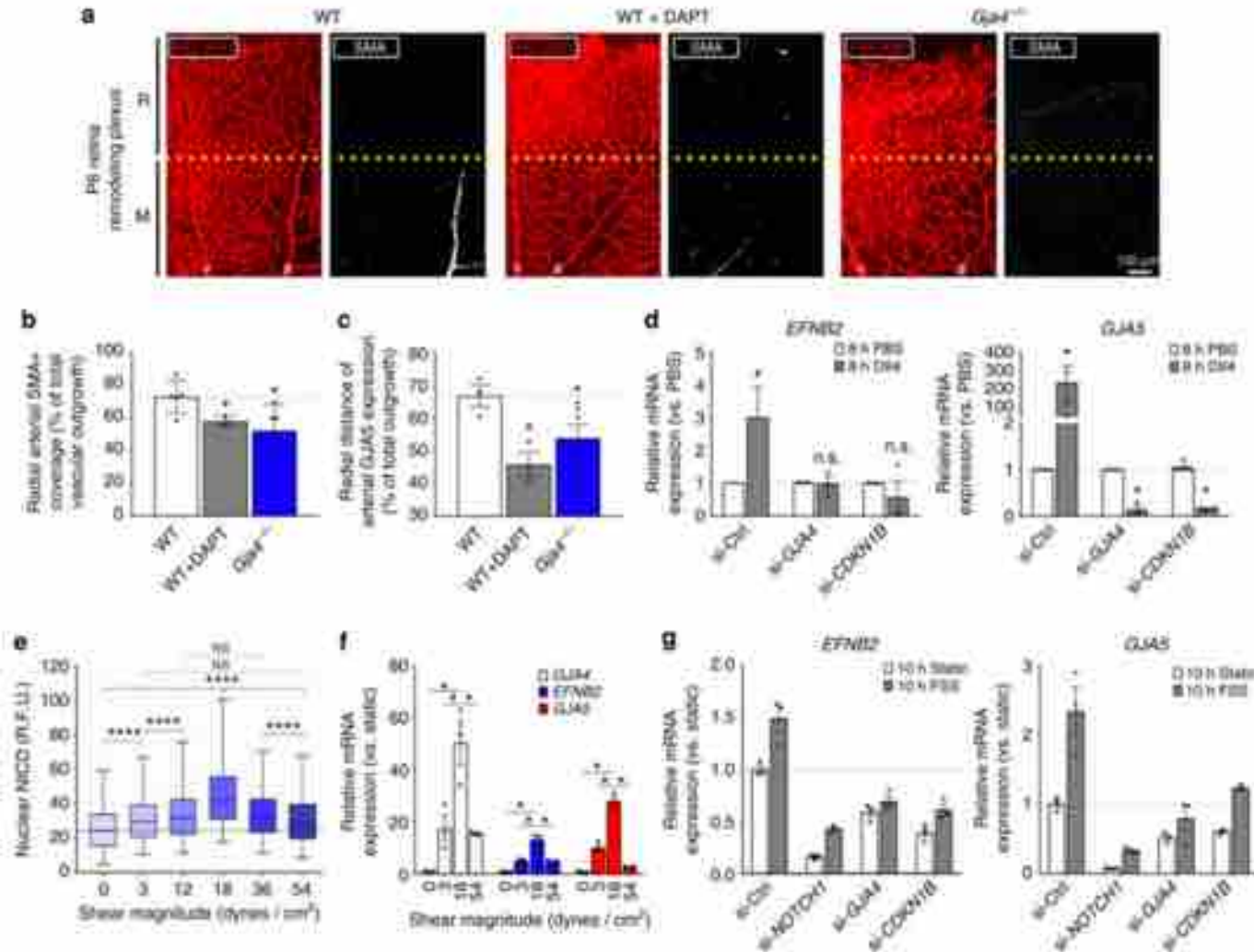


- expression marqueurs artériels

+ expression marqueurs veineux

Ligature artère vitelline droite  
Embryons de poulet, tps post-ischémique

# 1- Différenciation artério-veineuse: facteurs hémodynamiques

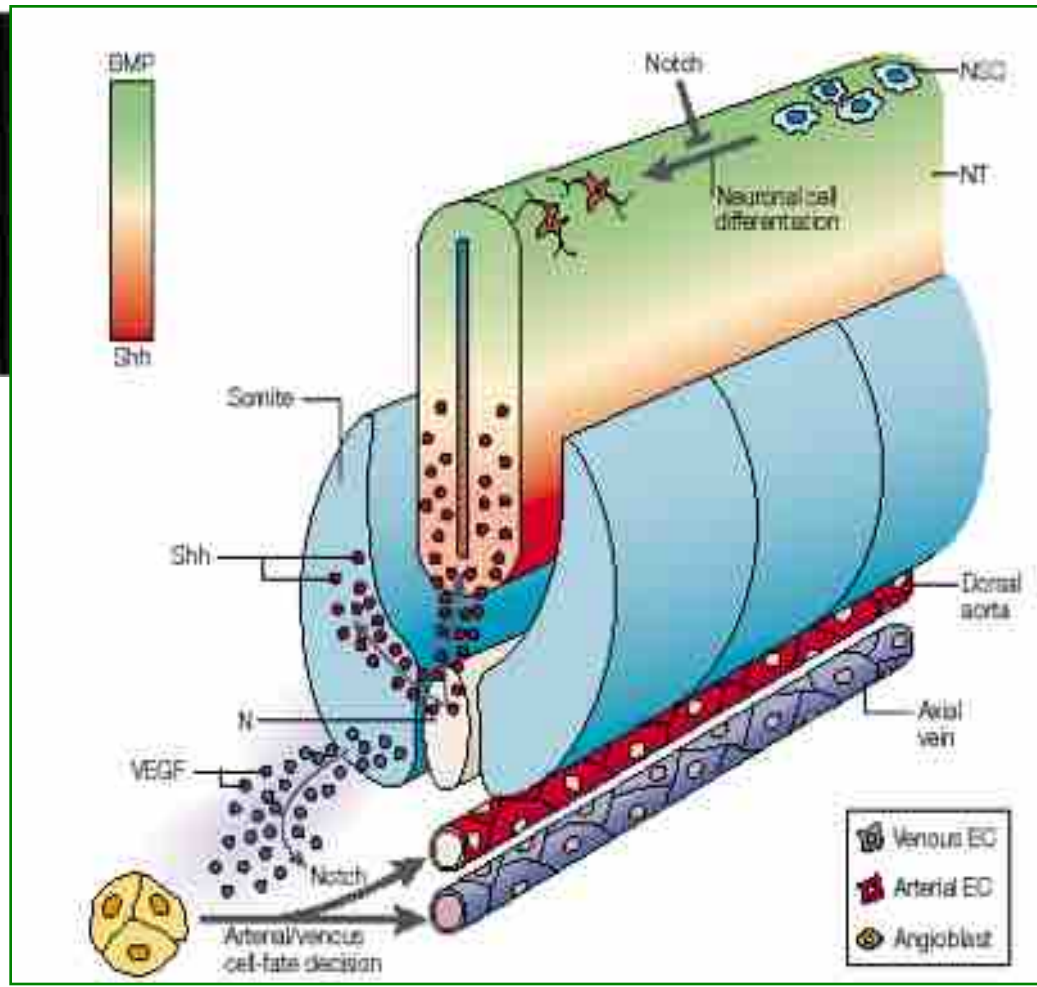
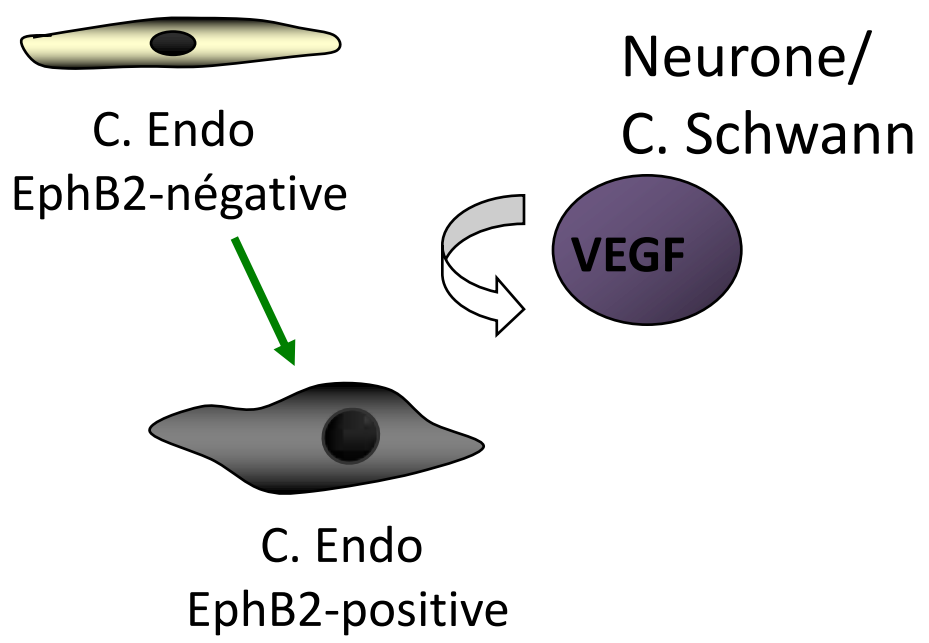
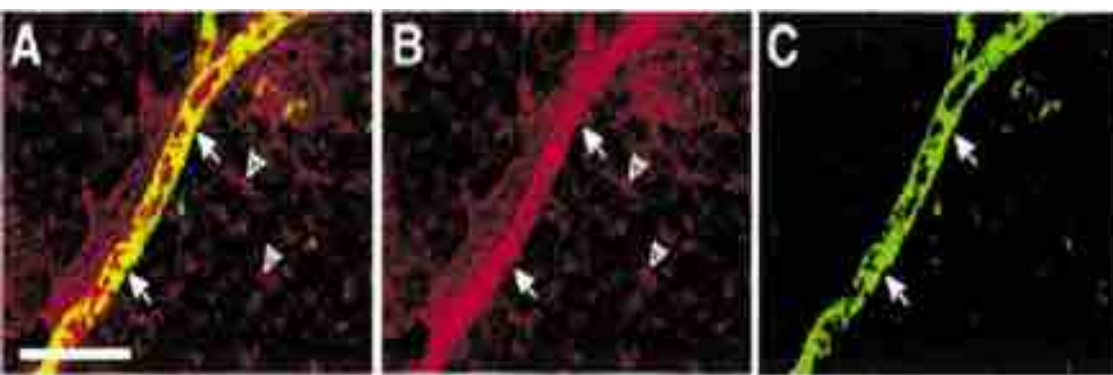


Les contraintes de cisaillement, à des grandeurs de flux artériel, activent la signalisation NOTCH, qui régule positivement GJA4 (couramment Cx37) et l'inhibiteur du cycle cellulaire CDKN1B (p27). Le blocage de l'une de ces étapes provoque une hyperprolifération et une perte de spécification artérielle. La ré-expression de GJA4 ou CDKN1B, ou l'inhibition du cycle cellulaire, rétablit le contrôle de la croissance endothéliale et l'expression du gène artériel.

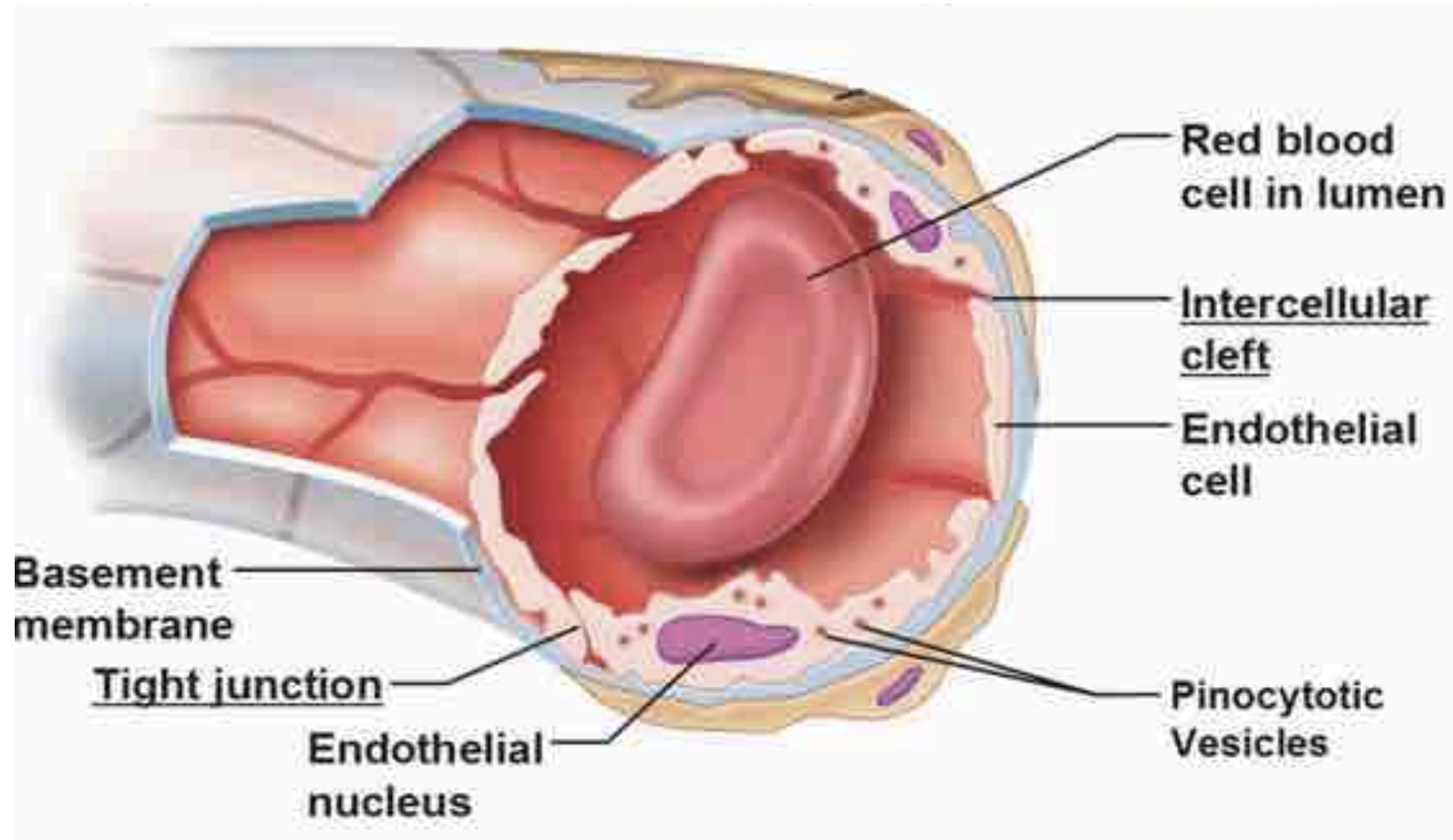
# 1- Différenciation artériovoineuse: système nerveux



VEGF/ $\beta$ III tubulin      VEGF (rouge)       $\beta$ III tubulin (vert)



**Capillaires continus:** Nombreuses jonctions serrées – Echanges de solutés.

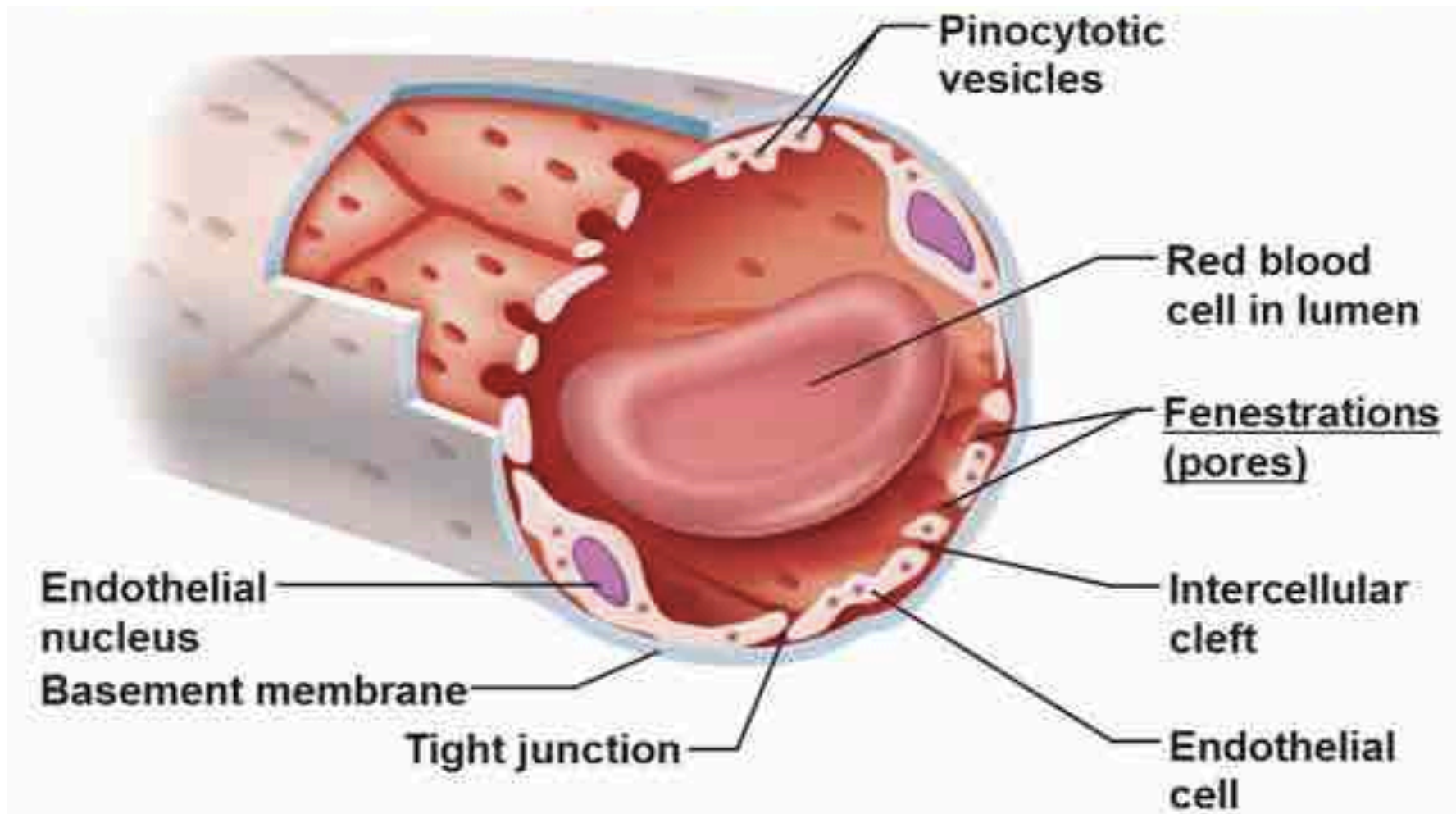


Peau, Muscles



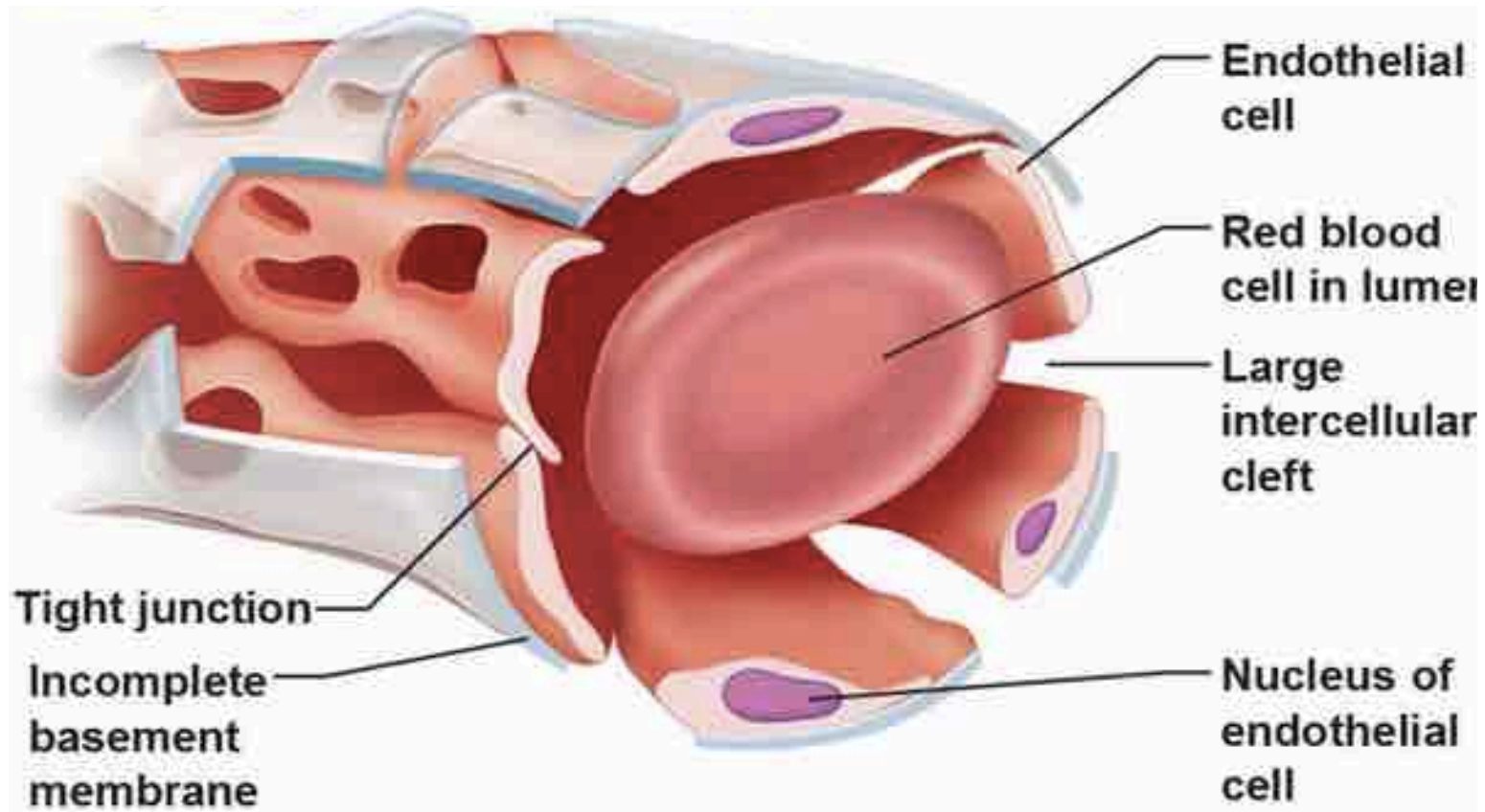
## 2a- Spécialisation tissu spécifique: différents types de capillaires

**Capillaires fenestrés:** Pores à travers cellules endothéliales et membranes basales – Echanges de molécules.

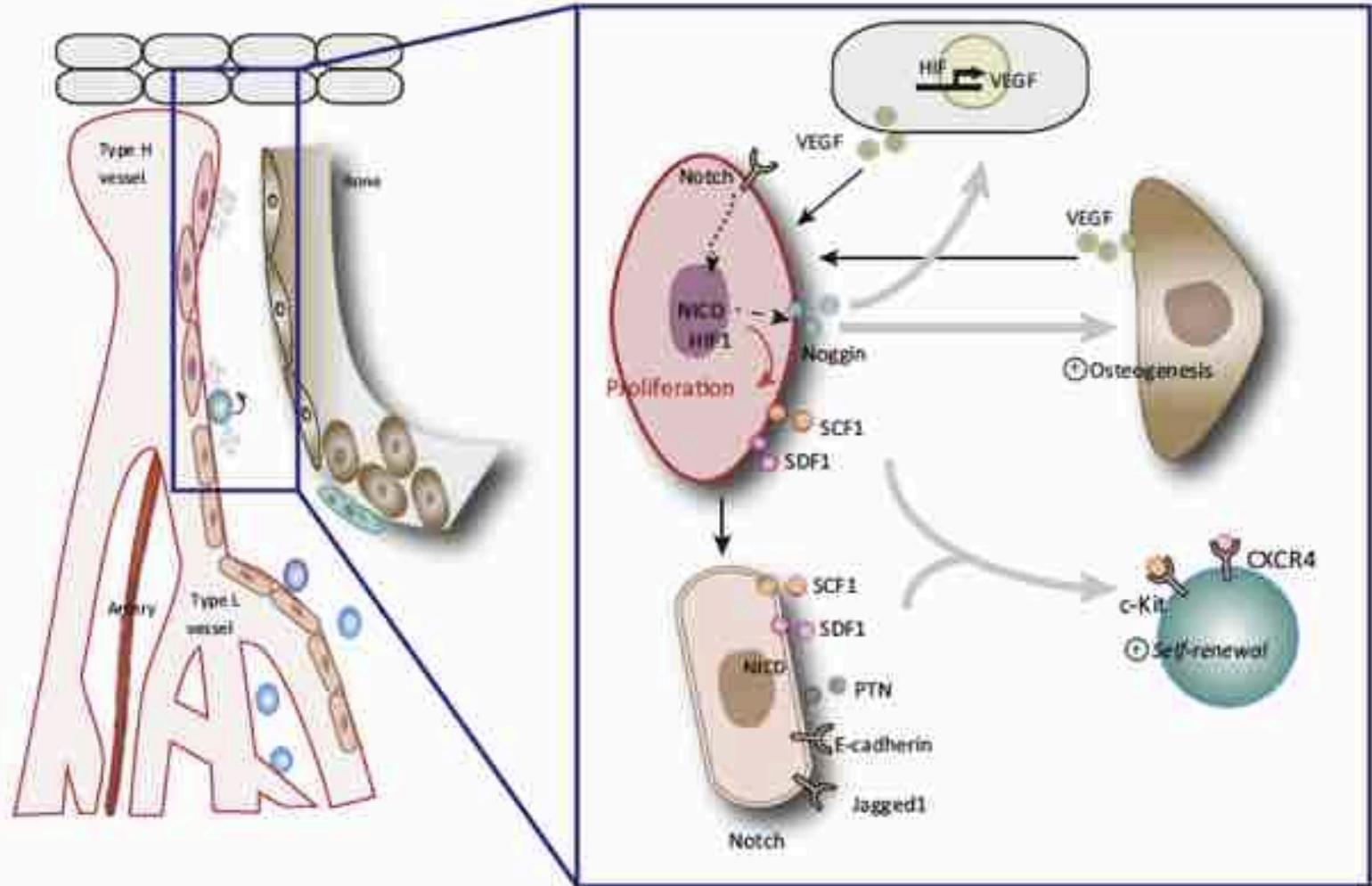


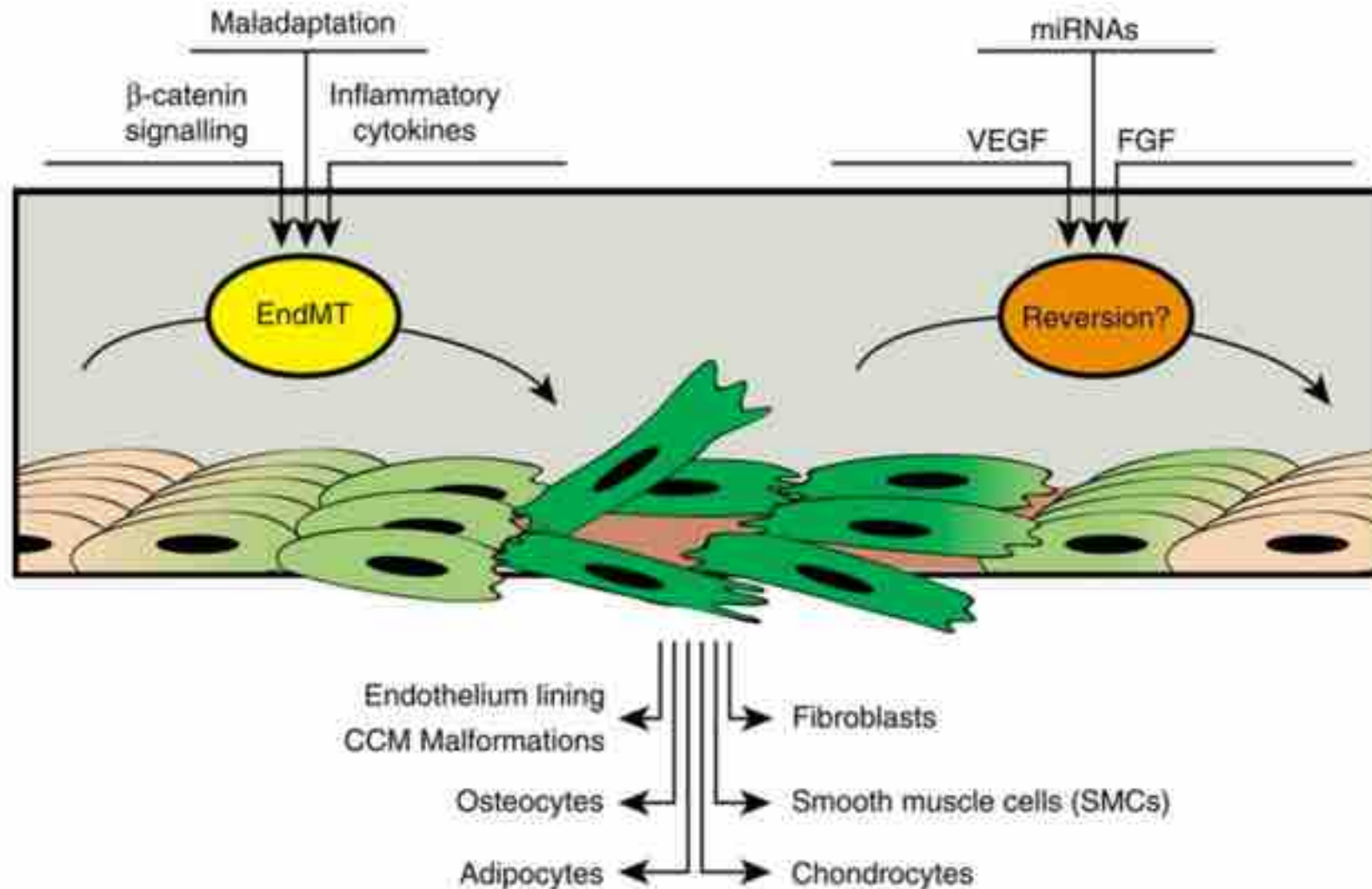
## 2a- Spécialisation tissu spécifique: différents types de capillaires

**Capillaires sinusoidaux:** Peu de jonctions serrées, grands espaces intercellulaires, membranes basales incomplètes – Echanges de macromolécules et cellules.



Dans l'os, les capillaires de type H ont besoin de Notch et du hypoxia-inducible factor (HIF) pour leur maintenance et sécrètent Noggin initiant l'ostéogenèse. Les facteurs angiocrines tels que le stromal cell-derived factor 1/C-X-C motif chemokine 12 (SDF1/Cxcl12) et le stem cell factor(SCF) stimulent également les cellules souches hématopoïétiques (HSCs),



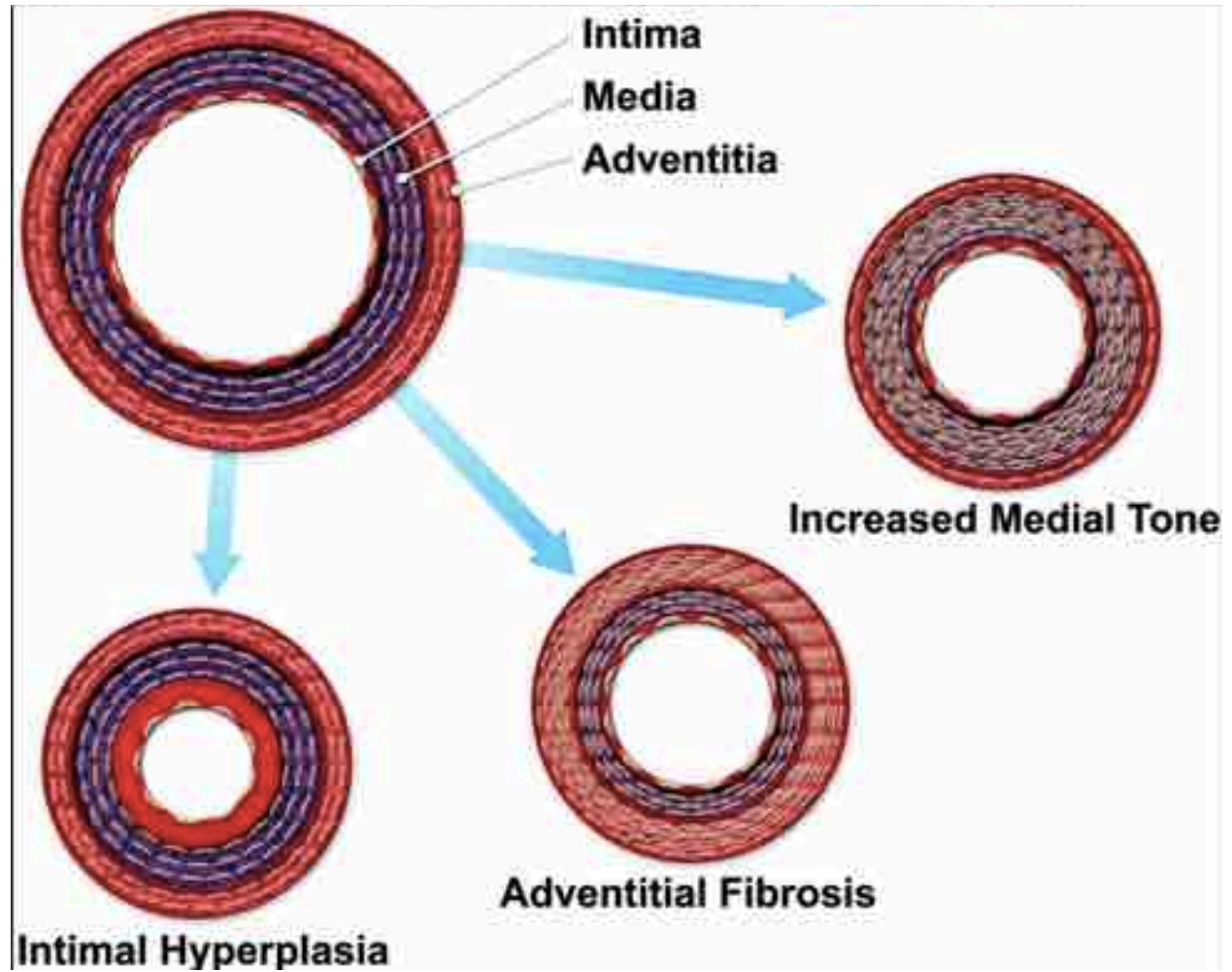


Chez l'adulte, les cellules endothéliales privées de facteurs de croissance ou exposées à des cytokines inflammatoires peuvent subir une transition endothéliale/mésenchymateuse (EMT) et acquérir les caractéristiques des fibroblastes, des cellules musculaires lisses etc...

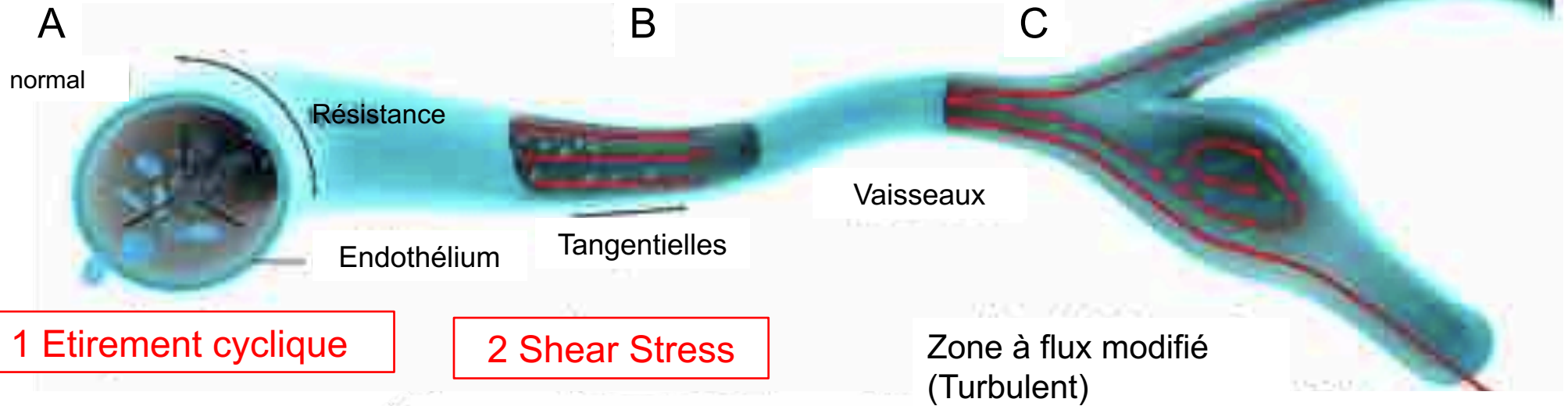
Modification de la structure du vaisseau (diamètre du vaisseau et épaisseur de la paroi artérielle) en réponse à un stimulus

Processus physiologique et/ou pathologique

Artères de résistance et de conductance



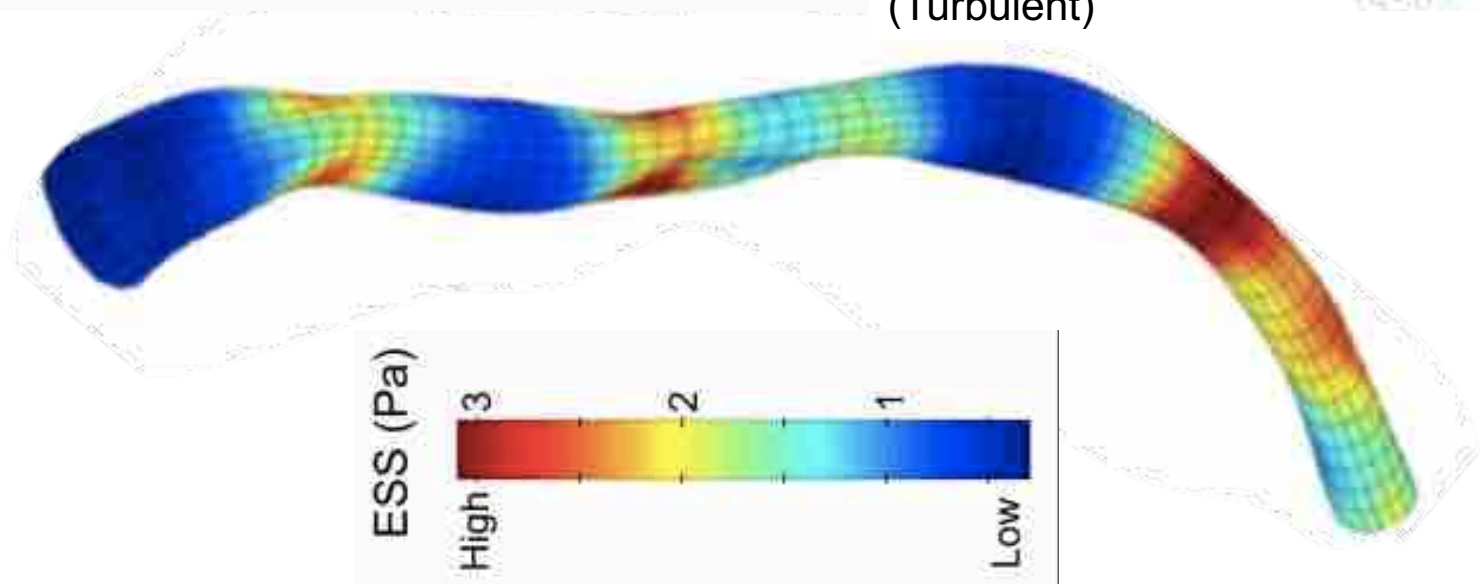
## Forces physiques affectant les cellules vasculaires



1 Etirement cyclique

2 Shear Stress

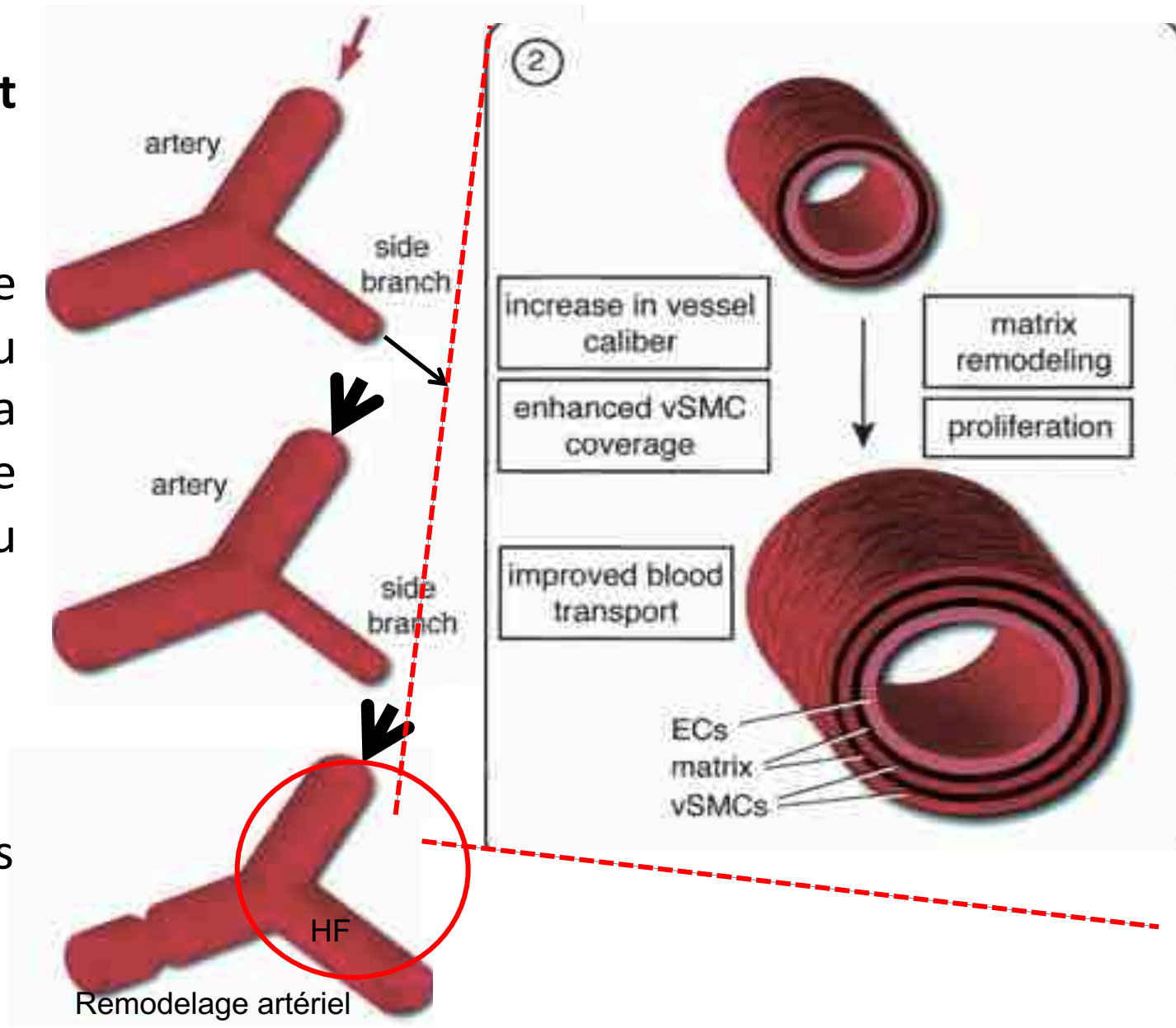
Zone à flux modifié (Turbulent)



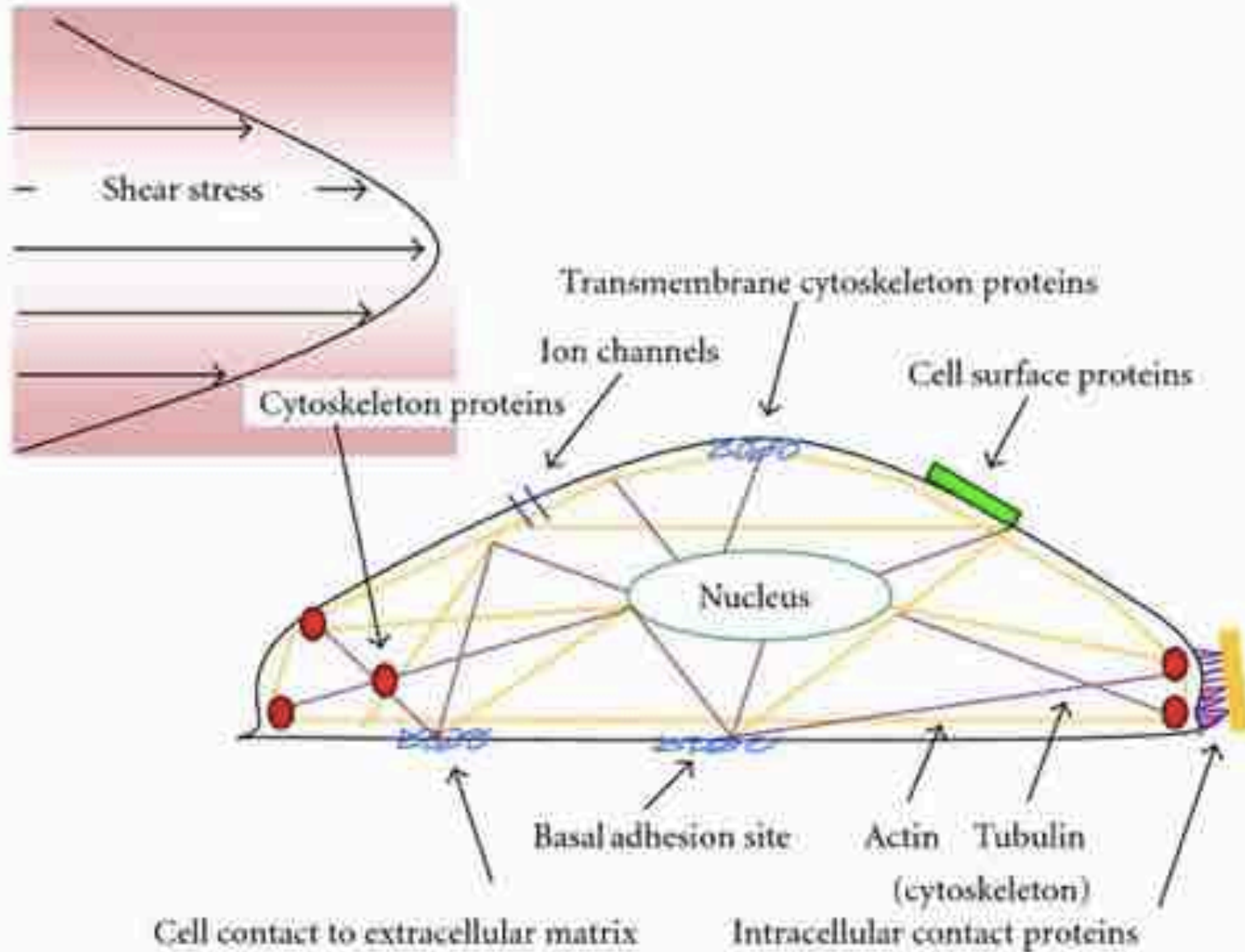
## Augmentation du débit sanguin

Modification de la structure du vaisseau (diamètre du vaisseau et épaisseur de la paroi artérielle) en réponse à une augmentation du débit sanguin

- ✓ Cellules endothéliales
- ✓ Cellules musculaires lisses

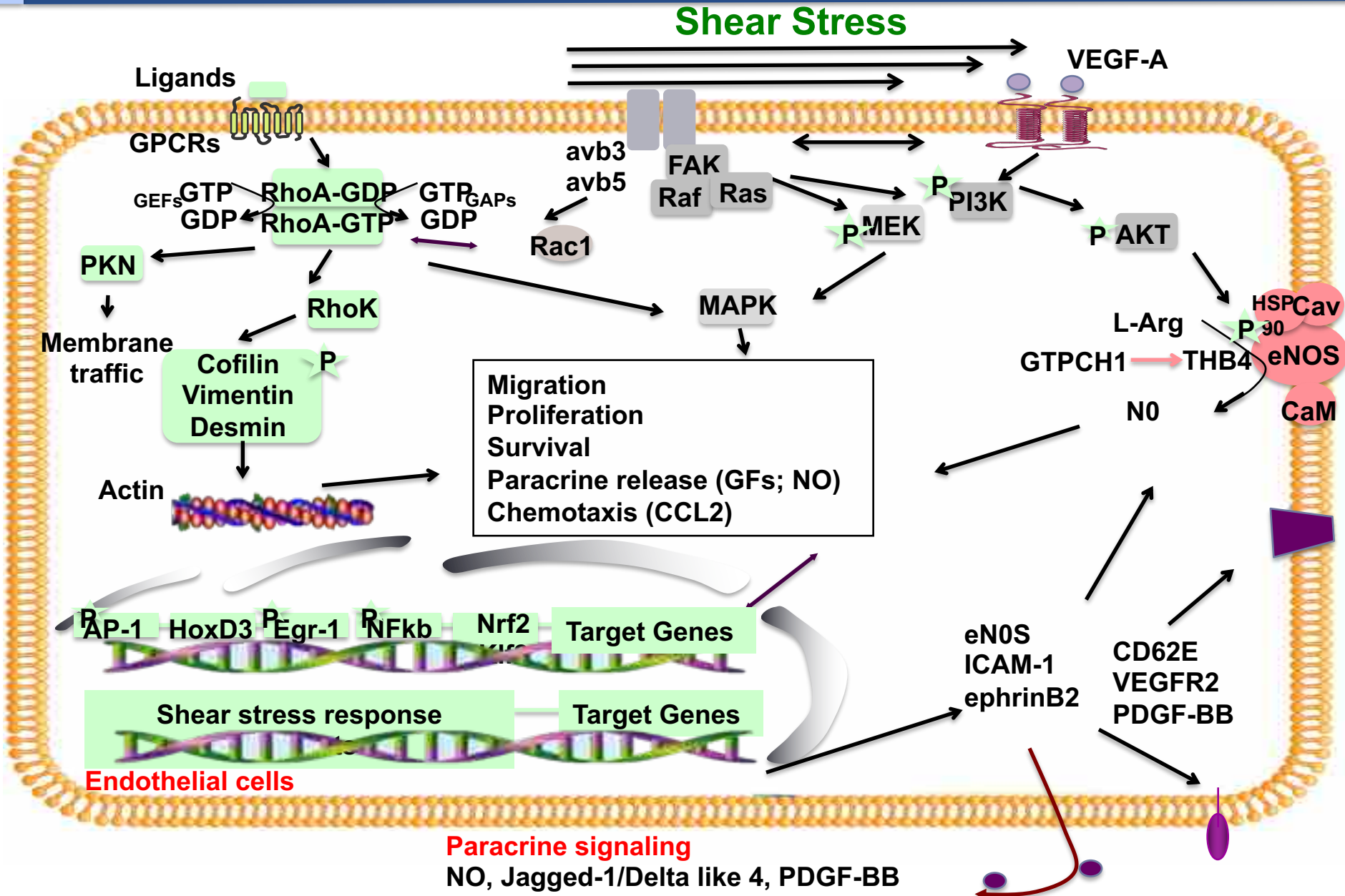


# A1- Rôle des contraintes mécaniques-cellules endothéliales

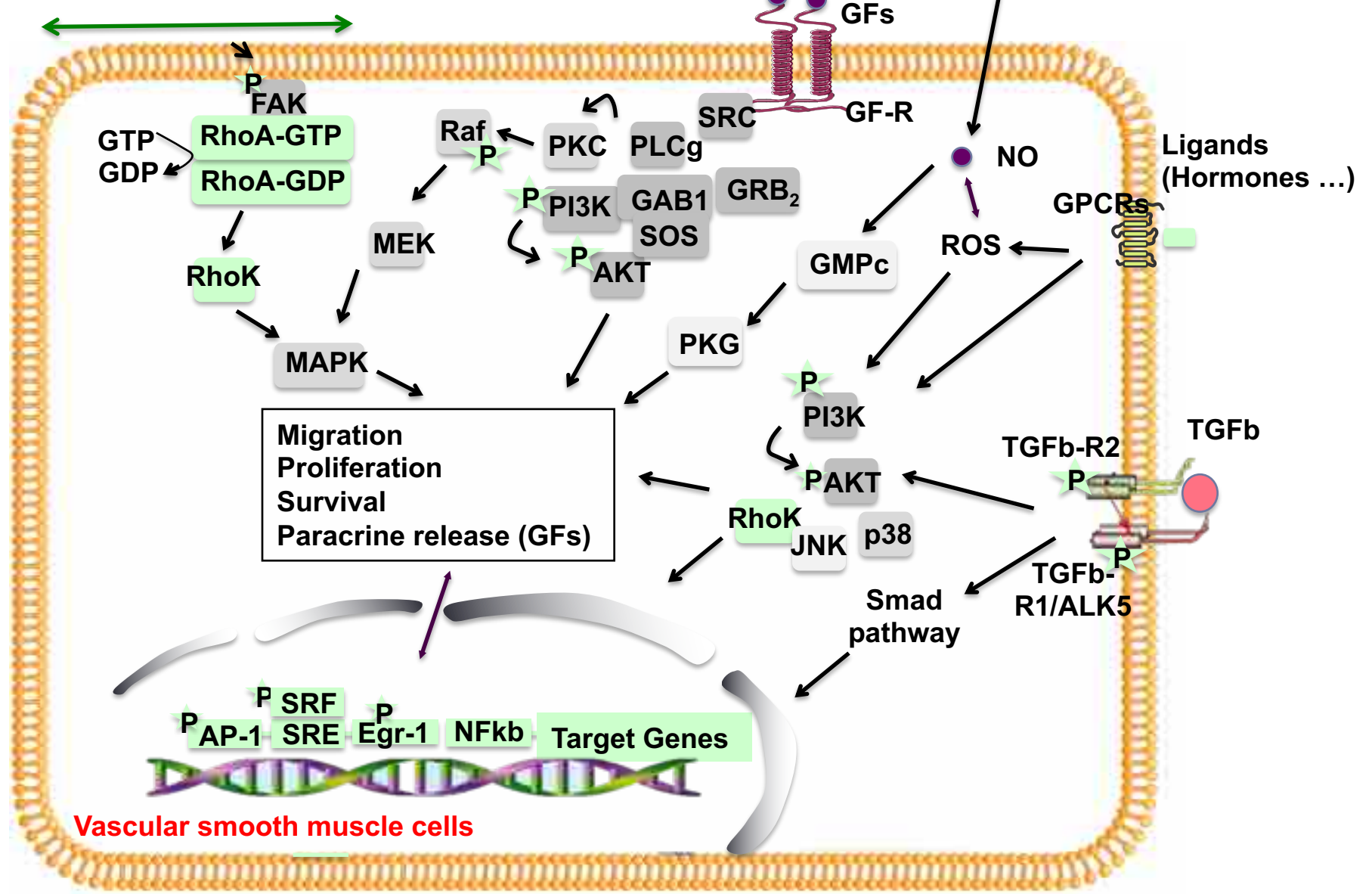




# A1- Rôle des contraintes mécaniques-cellules endothéliales

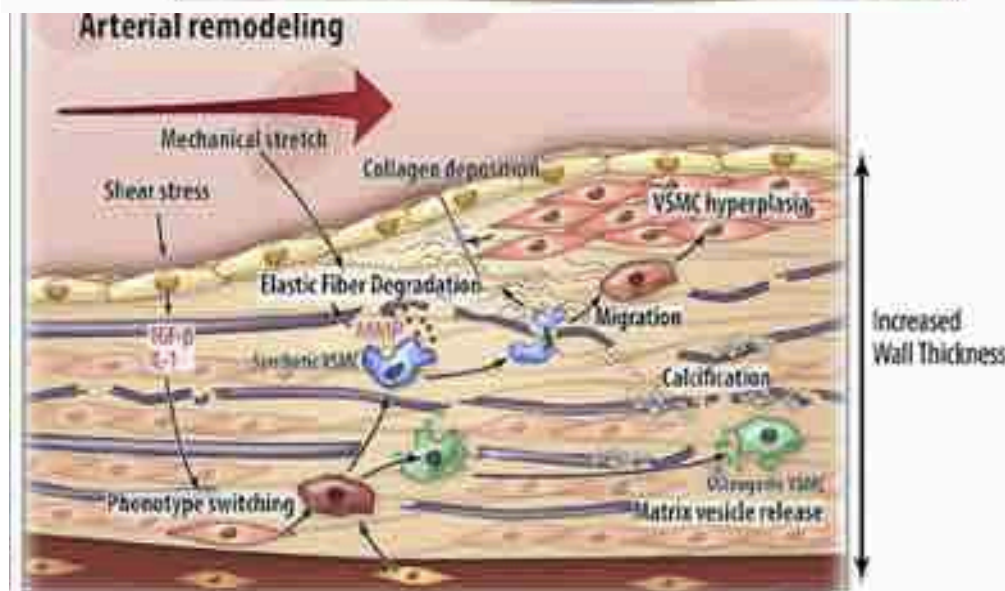
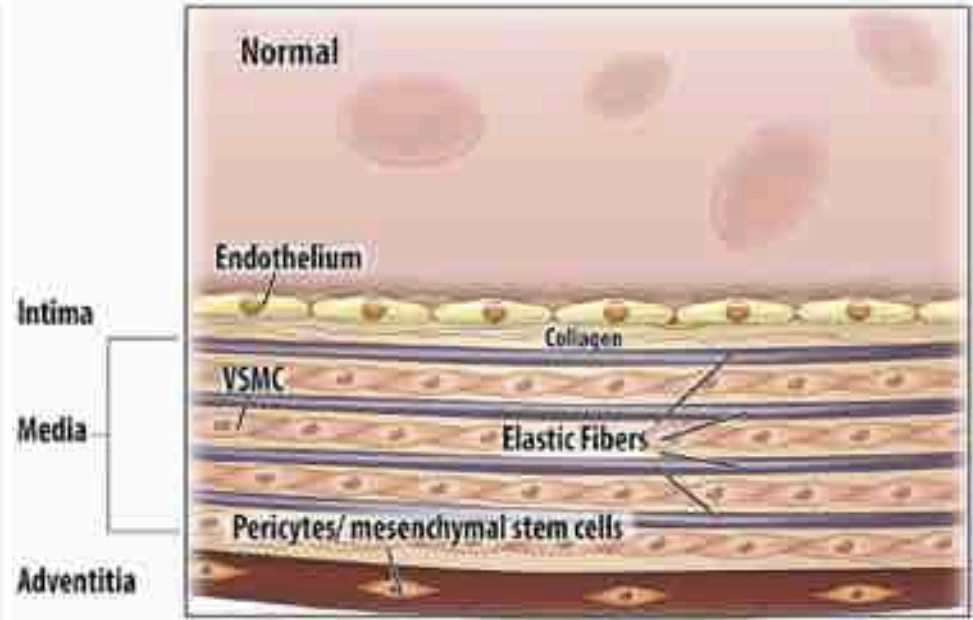
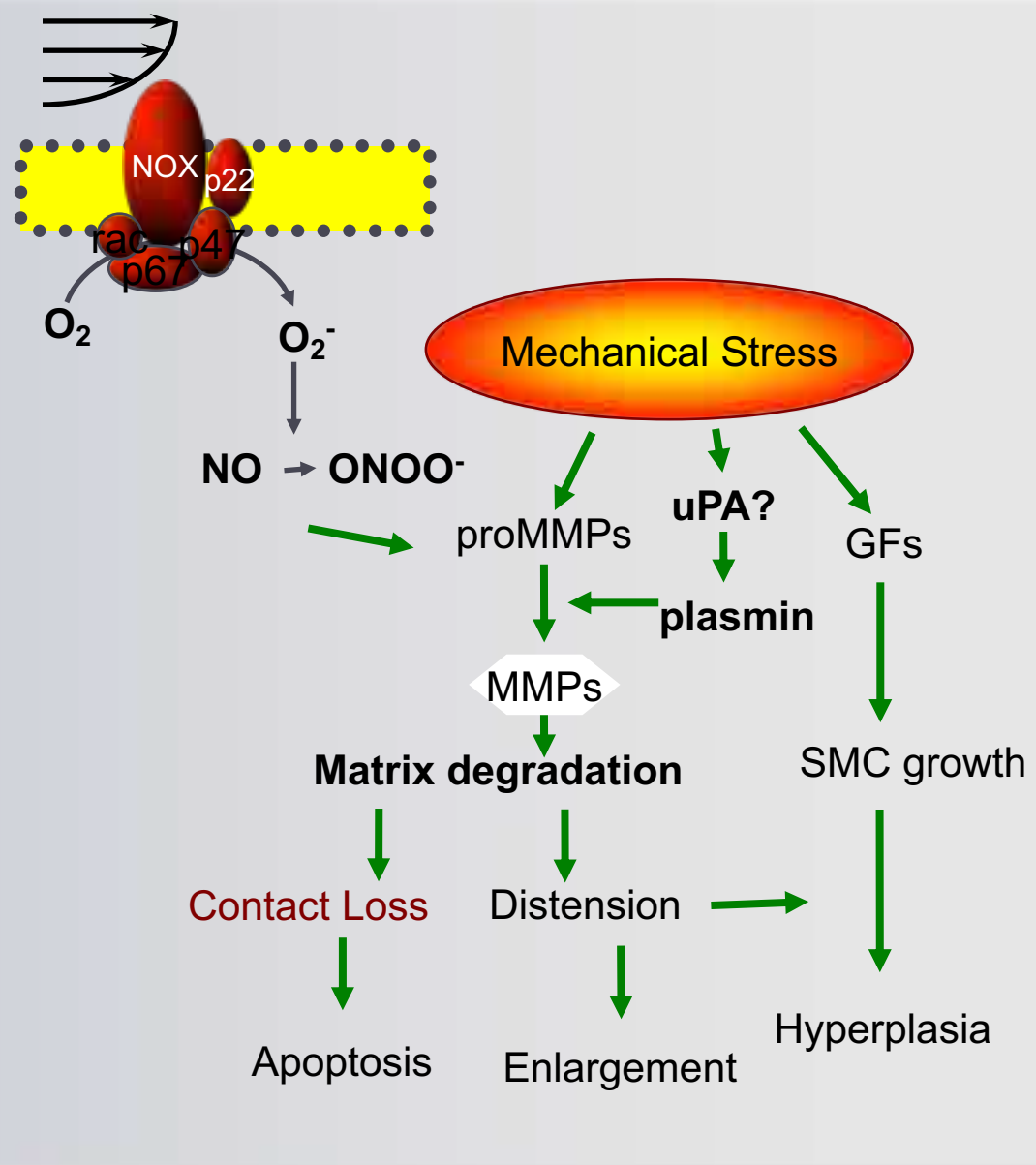


## Mechanical Stretch

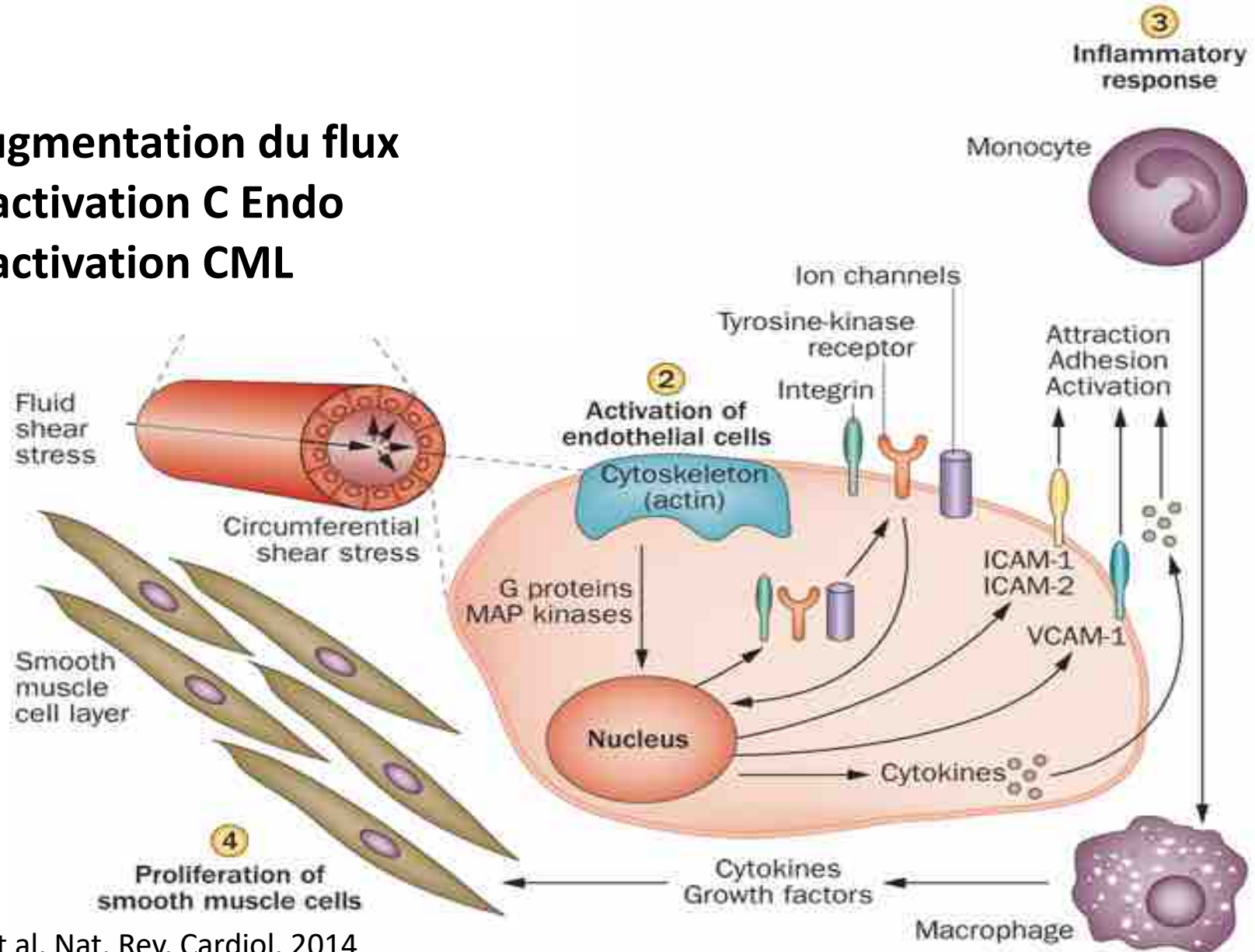


Vascular smooth muscle cells

# A2- Rôle des contraintes mécaniques-cellules musculaires lisses



**Augmentation du flux**  
**√ activation C Endo**  
**√ activation CML**



## Cas particulier de remodelage artériel = Collatéralisation

Modification de la structure de l'artériole collatérale (diamètre du vaisseau et épaisseur de la paroi artérielle) en réponse à une occlusion de l'artère principale

✓ modification du flux

✓ réaction inflammatoire

