

Tlemcen

N° d'ordre : 037/2014

UNIVERSITÉ DE TLEMCCEN ABOU-BEKR BELKAID – FASNVSTU

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et Immunologie



THÈSE DE DOCTORAT

Spécialité Biologie Moléculaire

Thème

**GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE DES MALFORMATIONS VEINEUSES CERVICO-FACIALES
DANS LA REGION DE TLEMCCEN**

Soutenue publiquement

par :

BENGUELLA née BRAHAMI NABILA

Le 18 juin 2014

Directeur de thèse : Professeur Mourad ARIBI

Devant le jury composé de :

CHABANE-SARI Daoudi	Professeur, Université de Tlemcen	Président
ARIBI Mourad	Professeur, Université de Tlemcen	Directeur de Thèse
LEFRANC Gérard	Professeur, Université Montpellier 2	Co-Directeur de Thèse
EL KEBIR Fatima Zohra	Professeur, Université d'Oran	Examinatrice
KHAN Naim	Professeur, Université de Bourgogne	Examineur
SARI Badr-Eddine	Maître de Conférences A Université de Tlemcen	Examineur

18 juin 2014

Résumé

Objectifs. Les malformations veineuses (MV) résultent d'une erreur de la morphogenèse vasculaire. Les formes faciales localisées siègent essentiellement aux lèvres, aux paupières ou à la langue. Des travaux antérieurs ont suggéré l'implication de facteurs génétiques dans leur apparition. Un premier gène, *TEK*, localisé en 9p21 et codant pour un récepteur tyrosine kinase spécifique des cellules endothéliales, a été impliqué dans quelques familles Belges présentant une forme dominante de la maladie. Nous avons effectué une recherche de mutations dans le gène *TEK* chez des patients de la région de Tlemcen (Algérie Nord-Ouest) présentant une MV.

Méthodes. La recherche de mutations dans l'ensemble des 23 exons, ainsi que leurs séquences introniques flanquantes (5' et 3'), a été réalisée par amplification PCR suivi d'un séquençage direct des segments d'ADN amplifiés. De plus, une recherche de mutations sporadiques du gène *TEK* a été effectuée sur un échantillon de trois biopsies, prélevées sur le tissu de la malformation veineuse.

Résultats. Le séquençage des 23 exons du gène *TEK* n'a révélé aucune mutation. De même, l'ADN des biopsies n'a révélé aucune mutation sporadique.

Conclusions. L'absence de mutations dans le gène *TEK* suggère qu'il n'est pas nécessairement impliqué dans l'apparition des MV. Il serait donc intéressant d'analyser d'autres gènes impliqués dans un nombre plus grand de patients. Le séquençage de l'ensemble des exons, ou « *exome sequencing* », serait d'une aide considérable pour démasquer d'autres gènes impliqués. Ce travail permettra d'améliorer les connaissances sur des dysfonctionnements moléculaires et cellulaires dans les voies de signalisation impliquées dans le réseau vasculaire des cellules endothéliales. Il pourrait en résulter de nouvelles approches thérapeutiques de l'angiogenèse anormale chez ces patients.

Mots clés : gène *TEK*, malformations veineuses, séquençage direct, patients de la région de Tlemcen.

Abstract

Background. Venous malformations (VM) result from an error in vascular morphogenesis. Localized facial forms are present essentially on the lips, eyelids, and tongue. Previous studies have suggested the involvement of genetic factors in their occurrence. First, the *TEK* gene, located at chromosomal region 9p21 and encoding the endothelial-specific receptor tyrosine kinase, has been implicated in Belgian families with a dominant form of the disease. Therefore, we investigated whether mutations in this *TEK* gene could explain the MV development in patients of families from Tlemcen region (north-western Algeria).

Methods. The search for mutations in all the 23 exons and in the 5' and 3' intronic sequences flanking the *TEK* gene was performed using PCR amplification and direct sequencing of amplified genomic DNA. Additionally, a search for somatic mutations of the gene *TEK* was performed on a biopsy of the VM from three of the twelve eligible patients.

Results. The sequencing of the 23 exons of the *TEK* gene revealed neither germinal mutation in our twelve nor somatic mutation in the tissue of the biopsy.

Conclusions. The absence of mutation in the *TEK* gene suggests that it is not necessarily involved in the onset of VM. It will be interesting to search on other mutated gene(s) responsible for the development of these malformations on much more patients. The exome sequencing should greatly help to unmask the other involved gene(s). This work will lead to improve the knowledge of the molecular and cellular dysfunctions in the signaling pathway that occur in the formation of the vascular network in endothelial cells. Consequently, better therapeutic approaches to treat the abnormal angiogenesis of these patients could be developed.

Key words: *TEK* gene, venous malformations, direct sequencing, patients from Tlemcen region.

Avant-propos

Cette thèse s'intègre dans le cadre de l'obtention du grade de Docteur en Sciences au sein de l'Université Abou-BekrBelkaid de Tlemcen. Elle a été réalisée dans le cadre du Programme Hubert Curien Partnership (PHC Tassili 10MDU794), codirigé par le Professeur Mourad ARIBI, Directeur du Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et Immunologie (Rocade # 2, Université de Tlemcen, Algérie), et par le Professeur Gérard LEFRANC, Directeur du Laboratoire d'Immunogénétique Moléculaire, Institut de Génétique Humaine, CNRS UPR1142, et Université Montpellier 2 (Montpellier, France).

Je voudrais remercier très sincèrement en tout premier lieu le Professeur ARIBI Mourad de m'avoir accueillie dans son Laboratoire, mais également de m'avoir donné l'autonomie et l'indépendance dont j'avais besoin pour réaliser ce Projet de Doctorat, ainsi que de son encadrement de qualité. J'exprime également mes vifs remerciements et ma profonde gratitude au Professeur Gérard LEFRANC, pour son aide particulièrement appréciée durant toute la durée de cette thèse, aussi bien sur le plan scientifique que sur le plan humain.

Je tiens à remercier tout particulièrement le Docteur Badr-Eddine Docteur SARI, Maître de Conférences A, pour son engagement dans ce Projet, aussi bien dans le recrutement des patients et sujets éligibles, que dans la réalisation de biopsies dans les meilleures conditions, conformément aux règles d'Éthique et de Déontologie.

Aussi, j'aimerais remercier énormément le Professeur Isabelle TOUITOU et le Professeur Thierry MAUDELONDE, le Docteur Mouna BARAT, Madame Nathalie RUIZ-

PALLARES et le Docteur Pierre-Olivier HARMAND, pour leur parrainage Scientifique et Technique inestimable, au sein de l'Unité Médicale des Maladies Auto-Inflammatoires, et au Laboratoire de Biologie Cellulaire et Hormonale à l'Hôpital Arnaud de Villeneuve (Montpellier, France).

Je tiens également à remercier les rapporteurs et examinateurs des Travaux de cette Thèse, à savoir le Professeur Daoudi CHABANE-SARI (Président du Jury), le Professeur Fatima Zohra El KEBIR, et le Professeur Naim KHAN.

Je dois remercier sincèrement mon Mari qui n'a ménagé aucun effort pour me soutenir à tous

les niveaux : Issam, merci mille fois !

Mes Chers Parents, je Vous exprime ma profonde gratitude !

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	iii
Abstract	iv
Avant-propos	v
Table des matières	vii
Sommaire	x
Liste des tableaux	xi
Liste des figures	xii
Liste des abréviations	xiv
Introduction	1
Chapitre 1. Revue de la littérature	5
1.1 Anomalies vasculaires	6
1.1.1 Classification des anomalies vasculaires	6
1.1.2 Tumeurs vasculaires	9
1.1.2.1 Hémangiome infantile	9
1.1.2.2 Hémangiomes congénitaux	11
1.1.2.2.1 Hémangiomes congénitaux « rapidement involutif » RICH	11
1.1.2.2.2 Hémangiomes congénitaux « non-involutifs » NICH	11
1.1.2.3 Hémangiome en touffe et hémangio-endothéliomekaposiforme	11
1.1.3 Malformations vasculaires	12
1.1.3.1 Malformations vasculaires à flux rapide	13
1.1.3.2 Malformations vasculaires à flux lent	14
1.1.3.2.1 Malformations capillaires	14
1.1.3.2.2 Malformations lymphatiques	15
1.1.3.2.3 Malformations veineuses	16
1.1.3.2.3.1 Troubles fonctionnels	17
1.1.3.2.3.2 Douleurs	18
1.1.3.2.3.3 Problème esthétique	18
1.1.3.2.3.4 Formes familiales	18
1.1.3.2.3.4.1 Malformations veineuses cutanées et muqueuses multiples	18
1.1.3.2.3.4.2 Malformations glomuveineuses	20

1.2 Mécanismes de pathogenèse des anomalies vasculaires	23
1.2.1 Développement des systèmes vasculaires et lymphatiques du sang	23
1.2.1.1 Vasculogenèse	24
1.2.1.2 Angiogenèse	25
1.2.2 Principaux facteurs de régulation de l'angiogenèse	26
1.2.2.1 Familles de VEGF et des récepteurs de VEGF	26
1.2.2.2 Récepteurs VEGFRs	28
1.2.2.3 TGF- β et récepteurs	29
1.2.2.4 PDGF-B et récepteur	30
1.2.2.5 Molécules Notch et Jagged	30
1.2.2.6 Intégrines	31
1.2.2.7 Récepteurs TIE et Angiopoïétines	32
1.2.2.7.1 Système Ang-TIE2 et les malformations veineuses	33
1.3 Structure et expression des récepteurs TIE	35
1.3.1 Conséquences intracellulaires de l'activation des récepteurs TIE	37
1.3.1.1 Conséquences intracellulaires de l'activation de TIE2	37
1.3.1.1.1 Survie des cellules endothéliales	38
1.3.1.1.2 Migration des cellules endothéliales	39
1.3.1.1.3 Perméabilité des cellules endothéliales	39
1.3.1.1.4 Quiescence et maturation des cellules endothéliales	40
1.3.1.2 Conséquences intracellulaires de l'activation de TIE1	40
1.3.1.3 Rôles physiologiques du système Ang-TIE	41
1.3.1.4 Rôles pathologiques du système Ang-Tie	43
1.3.1.4.2 Système Ang-TIE et l'angiogenèse tumorale	44
1.4 Problématique et objectifs	47
1.4.1 Problématique	47
1.4.2 Objectifs	48
Chapitre 2. Article. TEK Gene and VM in North-Western Region of Algeria	49
2.1 Patients et méthodes	51
2.1.1 Recrutement des patients	51
2.1.2 Analyse de biopsies	53
2.1.2.1 Examen anatomopathologique	53
2.1.2.2 Extraction d'ADN à partir de biopsies	53

2.1.3. Analyse de l'ADN génomique	53
2.1.3.1. Choix des amorces	54
2.1.3.2 Le logiciel Primer3	55
2.1.4 Amplification de l'ADN in vitro par PCR	57
2.1.4.1 Principe de la PCR	57
2.1.4.2 Mode opératoire	58
2.1.5 Séquençage des produits d'amplification	59
2.1.5.1 Principe du séquençage	59
2.1.5.2 Mode opératoire	61
2.1.5.2 Analyse Bioinformatique	62
2.2 Résultats et interprétation	63
2.2.1 Phénotype des patients	63
2.2.2 Résultats de l'examen anatomopathologique	64
2.2.3 Résultats des tests d'amplification in vitro	65
2.2.4 Résultats de l'analyse bio-informatique	65
2.3 Discussion	68
2.4 Conclusion	70
Chapitre 4. Conclusions et perspectives	71
Chapitre 5. Bibliographie	75
Annexes	91

SOMMAIRE

Résumé	iii
Abstract	iv
Avant-propos	v
Table des matières	vii
Sommaire	x
Liste des tableaux	xi
Liste des figures	xii
Liste des abréviations	xiv
Introduction	1
Chapitre 1. Revue de la littérature	5
1.1 Anomalies vasculaires	6
1.2 Mécanismes de pathogenèse des anomalies vasculaires	23
1.3 Structure et expression des récepteurs TIE	35
1.4 Problématique et objectifs	47
Chapitre 2. Article. TEK Gene and VM in North-Western Region of Algeria	49
2.1 Patients et méthodes	51
2.2 Résultats et interprétation	63
2.3 Discussion	68
2.4 Conclusion	70
Chapitre 4. Conclusions et perspectives	71
Chapitre 5. Bibliographie	75
Annexes	

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques des malformations veineuses à flux lent et leur origine génétique	3
Tableau 2.1 : Séquences des amorces de l'ensemble des exons du gène <i>TEK</i>	56
Tableau 2.2 : Description des patients avec malformations veineuses	63

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Classification des anomalies vasculaires	8
Figure 1.2 : Localisation cytogénétique du gène <i>TEK</i>	19
Figure 1.3 : Étapes de la formation du plexus vasculaire primitif pendant la vasculogénèse	24
Figure 1.4 : Familles des ligands VEGF et les récepteurs associés	27
Figure 1.5 : Propriétés structurales des récepteurs TIE et des ligands de l'angiopoétine	36
Figure 1.6 : Implication de l'activation du récepteur TIE2 dans la survie, la migration et la perméabilité des cellules endothéliales	38
Figure 1.7 : Les effets du système Ang-TIE au cours de l'adaptation vasculaire pathologique	44
Figure 1.8 : Mutations impliquées dans la forme dominante des malformations veineuses	47
Figure 2.1 : Généalogies des douze familles Algériennes analysées pour le gène <i>TEK</i>	52
Figure 2.2 : Principe expérimentale de la réaction de polymérisation en chaîne	58
Figure 2.3 : Étapes de la réaction de séquence	60
Figure 2.4 : Imagerie à résonance magnétique d'une malformation veineuse superficielle	64
Figure 2.5 : Aspect de la malformation veineuse en position proclive, et fragment d'une pièce opératoire	64

Figure 2.6 : Migration de fragments amplifiés de l'exon 17, sur gel d'agarose 1,5 %	65
Figure 2.7 : Résultats du séquençage direct du codon 849 de l'exon 15 chez 6 patients représentant l'ensemble des patients	66
Figure 2.8 : Résultats du séquençage d'une partie de l'intron 15 chez le patient VMF12.II.3	67

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A

A : adénine

AB : Applied Biosystems

ADN : acide désoxy nucléotidique

Akt : *sérine/ thréonine protéine kinase*

Ang : *Angiopoietin*

AP : angiomes plans

APLN : apelin

Arg : Arginine

B

BAD: *BCL2-associated agonist of cell death*

BDT : *big dye terminator*

bFGF: *basic fibroblast Growth Factor*

C

C: cytosine

CD : (i) cluster of differentiation ; (ii) cluster determinant ; (iii) cluster designation

cM: centi Morgan

CSF1: *colonystimulating factor 1*

D

dNTP: déoxynucléotides tri phosphate

ddNTP: didéoxynucléotides tri phosphate

DOK-R: *downstream of kinase receptor*

E

EDTA: *Ethylene diamine tetracetic acid*

EST: *expressed sequence tag sequences*

F

FAV : Fistules artério-veineuse

FOXO1: *forkhead box O1*

G

G : guanine

GLUT: Glucose transporter

Grb: *growth factor receptor bound protein*

GTP: *guanosine triphosphate*

H

HB-EGF: *endothelial heparin-binding epidermal-like growth factor*

HE : hématoxylin-éosine

HGF: *hepatocyte growth factor*

HUVEC: *human umbilical vein endothelial cells*

I

ICAM: *intracellular adhesion molecule*

ISSVA: *International Society for the Study of Vascular Anomalies*

K

KDa: kilo Dalton

M

MAV : malformation artério-veineuse

mDia: *mammalian diaphenous*

MEC : matrice extra-cellulaire

μl : microlitre

μM : micromolaire

MV : malformation veineuse

N

NCK2: *noncatalytic region of tyrosine kinase 2*

ng : nanogramme

NICD: *Notch intracellular domain*

NICH : *non involuting congenital hemangioma*

NO: monoxide d'azote

NOS : *nitric oxide synthase*

NRP: neuropilin

nt: nucléotides

P

p : bras court d'un chromosome

pb : paire de base

PCR : réaction de polymérisation en chaîne (*polymerase chain reaction*)

PDGFB: *platelet-derived growth factor beta*

PDGFR-B: *platelet-derived growth factor receptor beta*

PI3K : *phosphatidyl-inositol-tri-phosphate kinase*

pmol : picomol

Q

q: bras long d'un chromosome

R

RBP: *recombining binding protein*

RhoA: *Ras homolog gene family member A*

RICH : *rapidly involuting congenital hemangioma*

S

Shp2: *Src homology region 2 domain phosphatase 2*

SNP: *single nucleotide polymorphism*

STAT : transmetteur et activateur des signaux de transcription (signal transduction and activation of transcription)

T

T: thymine

Taq: *Thermus aquaticus*

TEK: *tyrosine kinase endothelial*

TGF-beta: *tissue growth factor beta*

TGF- β R: *tissue growth factor betta receptor*

TIE: *endothelium-specific receptortyrosine kinase*

Trp : Tryptophane

U

UTR: *untranslatade region*

V

VCAM: *vascular-cell adhesion molecule*

VE-cadherin: *vascular endothelial cadherin*

VEGF: *vascular endothelial growth factor*

VEGFR: *vascular endothelial growth factor receptor*

VE-PTP: *vascular endothelial-phosphotyrosine phosphatase*

VMF : *venous malformation familly*

VSMC : *vascular smooth muscle cell*

Introduction

Les malformations vasculaires sont des anomalies du développement des vaisseaux pendant la vie intra-utérine. Ces malformations congénitales atteignent environ 0,3 à 0,5% de la population (Boon et Vikkula, 2012). Elles sont parfois découvertes plus tardivement, car elles évoluent au cours de la vie, sous l'action de divers facteurs (modifications hormonales, traumatisme, etc.). La plupart d'entre-elles sont sporadiques, mais certaines sont transmises génétiquement (Boon *et al.*, 2011).

Les vaisseaux capillaires, veineux, lymphatiques ou artériels peuvent être concernés de façon isolée ou associée (Lemarchand-Venencie, 1992 ; Enjolras *et al.*, 1990 ; Bowers *et al.*, 1960).

Comme toutes les malformations vasculaires, les malformations veineuses (MV) résultent d'une erreur de la morphogenèse vasculaire (Sticker et Picard, 1998). Elles sont présentes dès la naissance, et évoluent progressivement et lentement (Lemarchand-Venencie, 1992). Leur pic évolutif est généralement observé à l'adolescence, ou suite à un événement traumatique. Les formes faciales localisées, siègent essentiellement aux lèvres, aux paupières ou à la langue (Deffrennes *et al.*, 2001 ; Enjolras, 1996). L'extension à la muqueuse gingivale peut induire des saignements spontanés ou lors de soins dentaires (DI Giovanni et Revelli, 1996).

Certaines localisations provoquent par effet de masse des déformations squelettiques orbitaires avec enophtalmie et maxillo-mandibulaires, dento-alvéolaires, avec répercussions sur l'articulé dentaire et béance (Deffrennes *et al.*, 2001 ; Enjolras, 1994). Une malformation

labiale importante tend à éverser les lèvres et les rendre incompetentes. De même qu'une malformation géante de la langue peut provoquer une inoclusion dentaire permanente (Di Giovanni et Revelli, 1996 ; Enjolras, 1994). Les MV entraînent des tuméfactions défigurantes, aboutissant à une asymétrie difficilement supportée par les patients (Breviere *et al.*, 1992 ; Herbreteau *et al.*, 1992), souvent à l'origine de répercussions psychologiques et de l'échec scolaire, notamment chez l'enfant et l'adolescent devant la modification de l'image du soi.

Les MV surviennent le plus souvent de manière sporadique dans 94 % des cas, mais 6% d'entre-elles sont transmises génétiquement (les malformations veineuses mucocutanées : MVMC [1%], et les malformations glomuveineuses : MGV [5%]) (Barreau et Domp Martin, 2014)(cf. tableau 1).

Sur le plan étiopathogénique, 50 % des MV sporadiques sont secondaires à une mutation somatique (au sein des lésions) du gène *TEK* (*tyrosine kinase endothelial*) codant pour le récepteur de l'angiopoïétine TIE2 (*endothelium-specific receptor tyrosine kinase*) spécifique des cellules endothéliales vasculaires (Vikkula *et al.*, 1996). Par contre, les malformations veineuses mucocutanées multiples familiales sont liées, dans 60 % des cas, à des mutations germinales de ce même gène (Wouters *et al.*, 2010 ; Boon *et al.*, 2004 ; Calvert *et al.*, 1999 ; Vikkula *et al.*, 1996). Cependant, bien que situées sur un gène identique, les mutations sont différentes dans les lésions sporadiques et héréditaires (Limaye *et al.*, 2009). La mutation héréditaire la plus commune (R849W) n'a, en effet, jamais été observée dans les lésions de MV sporadiques (L914) (Soblet *et al.*, 2013).

Il est important de noter que quelques familles de MVMC ne montrent pas la liaison au niveau du locus *TEK* (Wouters *et al.*, 2010 ; Vikkula *et al.*, 1996), suggérant ainsi l'existence d'autres gènes impliqués dans l'apparition des MV.

Tableau 1 : Caractéristiques des malformations veineuses à flux lent et leur origine génétique (Barreau et Domp martin, 2014).

	MV	MVMC	MGV
Localisation	50% tête et cou	Extrémités, muqueuses	70% extrémités
Couleur	Bleu-violet	Bleu	Rouge-Violet
Aspect	Plat-surélevé	Surélevé en dôme	Surélevé, En plaque Hyperkératosique
Nombre et taille	Unique, large	Multiples, petites (moins de 5cm de diamètre)	Multiples
Tissus atteints	Extension profonde fréquente	Cutané et sous-cutané Plus rarement : muscle, tissugastrointestinal, poumons, cerveau	Cutané et sous-cutané
Histologie	Veines à parois minces	Veines à parois minces	Cellules glomiques
Génétique	Sporadique	Autosomique dominant	Autosomique dominant
Cause	Mutations somatiques du gène <i>TEK</i> codant pour TIE2 (50%)	Mutations germinales provoquant un gain de fonction TIE2	Mutation du gène de la glomuline (perte de fonction)

MV : malformation veineuse, MVMC : malformation veineuse mucocutanée, MGV : malformation glomuveineuse.

Étant donné le taux élevé de consanguinité dans la région de Tlemcen et de son effet sur l'apparition de maladies génétiques, mais aussi la fréquence relativement élevée des MV dans cette même région (Sari et *al.*, 2008), nous nous sommes intéressés à vérifier la présence des mutations du gène *TEK*, déjà mises en évidence jusqu'à présent.

Dans cette étude, douze familles ont été recrutées au Service de Stomatologie et de chirurgie Buccale du Centre Hospitalo-universitaire de Tlemcen sur une période de 36 mois. L'analyse moléculaire du gène *TEK* a été effectuée au niveau du Laboratoire des Maladies Autoinflammatoires de l'Hôpital Arnaud de Villeneuve (Montpellier, France).

Avant d'exposer les résultats expérimentaux de ce travail, quelques rappels de la littérature à propos des différents types d'anomalies vasculaires et des mécanismes pathogéniques responsables de leur survenue, ainsi qu'un descriptif de la molécule TIE2, seront passés en revue.

CHAPITRE 1

REVUE DE LA LITTÉRATURE

1.1 Anomalies vasculaires	6
1.2 Mécanismes de pathogenèse des anomalies vasculaires	23
1.3 Structure et expression des récepteurs TIE	35
1.4 Problématique et objectifs	47

CHAPITRE 1

REVUE DE LA LITTÉRATURE

1.1 Anomalies vasculaires

Les anomalies vasculaires sont définies comme des lésions localisées des vaisseaux lymphatiques et/ou vasculaires. Les anomalies vasculaires sont divisées en deux principaux types : Les tumeurs vasculaires et les malformations vasculaires (Enjolras *et al.*, 2007 ; Stabler et Freyschmidt, 2005 ; Mulliken et Glowacki, 1982).

D'un point de vue histologique, les anomalies vasculaires ont un aspect tortueux et élargi. Les vaisseaux capillaires, veineux, lymphatiques ou artériels peuvent être concernés de façon isolée ou associée (Lemarchand-Venencie, 1992 ; Enjolras *et al.*, 1990 ; Bowers *et al.*, 1960).

1.1.1 Classification des anomalies vasculaires

Jusqu'au début des années 70, le terme « angiome » désignait des anomalies vasculaires variées n'ayant aucun rapport entre elles. En 1996, une nouvelle classification a été établie par l'International Society for the Study of Vascular Anomalies (ISSVA) (Hand et Frieden, 2002 ; Wassef et Enjolras, 1999 ; Enjolras et Mulliken, 1997 ; Mulliken et Glowacki, 1982).

L'ISSVA a adopté un schéma de classification qui distingue les tumeurs vasculaires (lésions comportant une prolifération cellulaire manifeste), des malformations vasculaires, dues à une perturbation innée de la morphogenèse vasculaire (Enjolras et Mulliken, 1997) (cf. figure 1.1).

Cette classification permet de clarifier la nosologie de ce domaine complexe et a pour ambition de fournir un langage commun, permettant une meilleure compréhension entre les différents spécialistes qui doivent concourir, dans une approche multidisciplinaire, au diagnostic et au traitement de ces lésions (Vikkula, 2006 ; Landthaler et Hohenleutner, 1997).

En 1996, lors d'un congrès à Rome, l'ISSVA a élaboré une classification simplifiée des anomalies vasculaires. Cette classification est basée sur des caractéristiques cliniques, radiologiques, hémodynamiques et histologiques (Ernemann *et al.*, 2003 ; Ernemann *et al.*, 2002 ; Wassef et Enjolras, 1999). Elle individualise deux groupes de lésions vasculaires : les tumeurs vasculaires et les malformations vasculaires.

Les tumeurs vasculaires sont ainsi nommées en raison de l'hyperplasie cellulaire constatée et l'implication possible de certains facteurs d'angiogénèse (*basic fibroblast Growth Factor* [bFGF] et le *vascular endothelial growth factor* [VEGF]) (Mulliken, 1992). Leur potentiel évolutif est particulier, puisqu'elles apparaissent à la naissance, croissent et involuent spontanément (Enjolras *et al.*, 1992), hormis les hémangiomes congénitaux non involutifs qui ne régressent jamais (Berenguer *et al.*, 2003). Parmi les tumeurs vasculaires les plus fréquentes, on retrouve : l'hémangiome infantile (Enjolras et Mulliken, 1993), les hémangiomes congénitaux (RICH : rapidly involuting congenital hemangioma et NICH : non involuting congenital hemangioma), l'angiome en touffe et l'hémangio-endothéliome kaposiforme (Nou *et al.*, 2013) (cf. figure 1.1).

Les malformations vasculaires, congénitales, regroupent des lésions où existent des anomalies de la morphogénèse vasculaire. Les vaisseaux sont dysplasiques sans véritable prolifération cellulaire. Les anomalies sont structurales et le turn-over cellulaire endothélial

est normal. Elles ne régressent jamais et peuvent soit rester stables, soit, au contraire évoluer (Enjolras *et al.*, 1992). Ces malformations sont sub-divisées en fonction de caractéristiques histologiques et hémodynamiques (Mulliken, 1992). On distingue (cf. figure 1.1) :

Les malformations hémodynamiquement inactives, à flux lent, qui selon les vaisseaux altérés de manière prédominante sont de type capillaire, veineux ou lymphatique,

Les malformations hémodynamiquement actives, à flux rapide, que sont les malformations artério-veineuses (MAV) et fistules artério-veineuses (FAV).

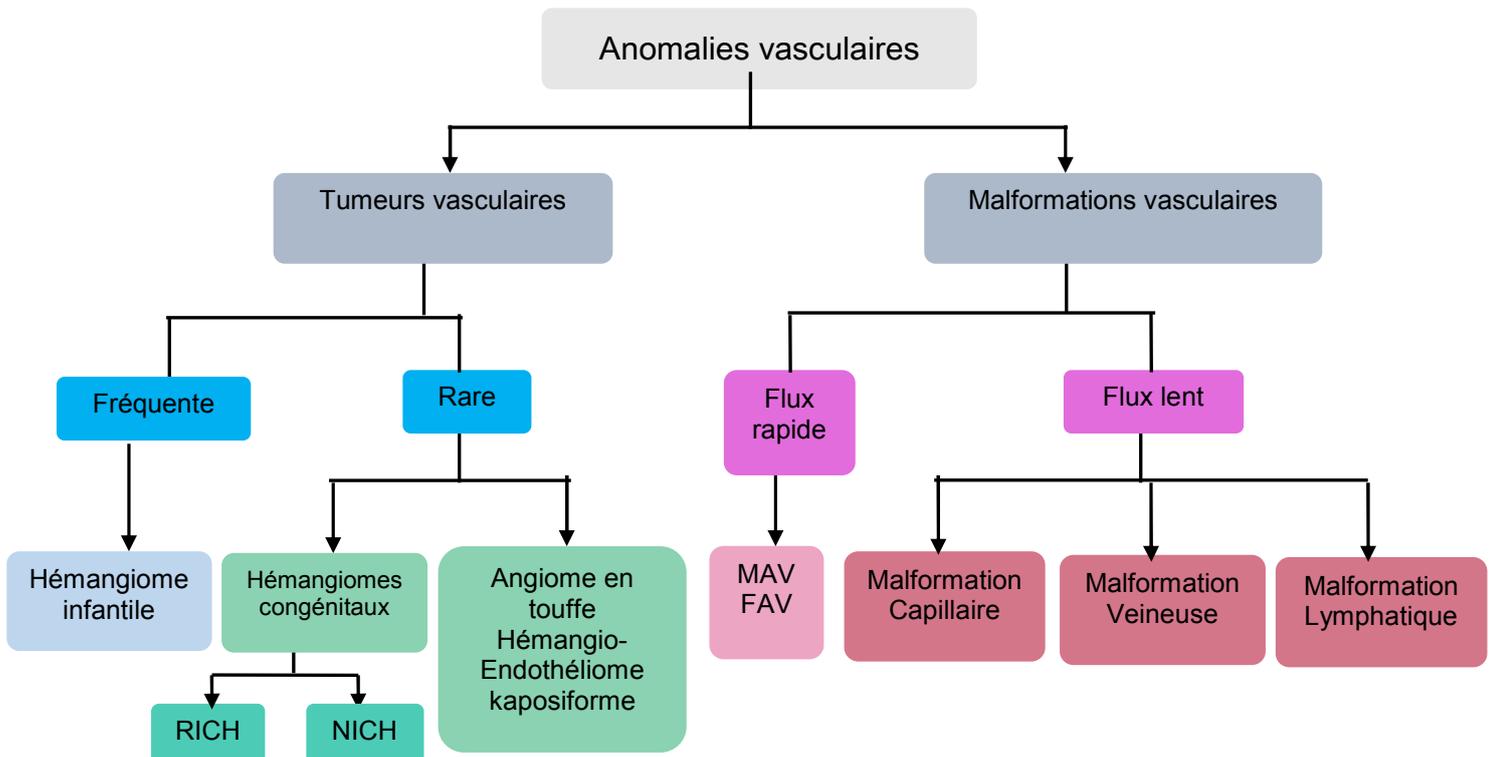


Figure 1.1 : Classification des anomalies vasculaires. Une classification établie par Mulliken et Glowacki en 1982 et validée par l'ISSVA (International Society for the Study of Vascular Anomalies) en 1996, sépare les malformations vasculaires des tumeurs vasculaires (essentiellement les hémangiomes). Histologiquement, les malformations sont constituées de vaisseaux larges et tortueux sans prolifération cellulaire (Mulliken et Glowacki, 1982). Elles sont classées en fonction du type de vaisseau atteint : artériel, veineux, capillaire ou lymphatique. La classification clinico-radiologique et histo-pathologique de l'ISSVA est indispensable pour le diagnostic et la prise en charge de ces patients (Philandrianos *et al.*, 2011 ; Enjolras et Mulliken, 1997).

Figure 1.1. Suite. *RICH* : rapidly involuting congenital hemangioma, *NICH* : non involuting congenital hemangioma, *MAV* : malformations artério-veineuses, *FAV* : fistules artério-veineuses.

De nombreux auteurs comme Lee (Lee *et al.*, 2007) ou Gloviczki (Gloviczki *et al.*, 2009) se basent également sur la classification de Hambourg (Gloviczki *et al.*, 2009) (consensus d'experts sur les malformations vasculaires lors du 7^{ème} workshop à Hambourg en Allemagne en 1988), pour distinguer les différents types de malformations vasculaires congénitales. Cette classification prend en compte des critères tels que l'anatomie, l'histologie, la physiopathologie, l'hémodynamique de la malformation et sa survenue au cours de l'embryogenèse (Nou *et al.*, 2013).

Les malformations survenant tardivement durant l'embryogenèse donnent une atteinte tronculaire se manifestant par des anomalies de taille et de forme des axes vasculaires (agénésie, hypoplasie, dilatation, plicature, absence d'involution de vaisseau embryonnaire, etc.). Celles survenant précocement au cours de l'embryogenèse se manifestent par une atteinte extratronculaire : indissociable des tissus où elles se développent, cela se traduit par des masses tissulaires vascularisées dont la croissance est liée aux structures environnantes (Khau Van Kien *et al.*, 2011). On retrouve également les formes combinées qui regroupent ces deux formes cliniques (Nou *et al.*, 2013).

1.1.2 Tumeurs vasculaires

1.1.2.1 Hémangiome infantile

C'est la plus fréquente et banale des tumeurs vasculaires du nourrisson (Drolet *et al.*, 1999) avec une prédominance féminine. Il apparaît classiquement après quelques jours ou quelques semaines de vie, se développe durant la première année et régresse ensuite en

quelques années (Boscolo et Bischoff, 2009 ; Enjolras, 1996 ; Enjolras, 1994 ; Enjolras et Mulliken, 1993). Les facteurs prédisposant sont un âge maternel élevé, les grossesses multiples, une grande prématurité ou un petit poids de naissance (Amir *et al.*, 1986).

La localisation cervico-faciale est fréquente, variant selon les études de 49 % à 75 % (Berenguer *et al.*, 2003). L'hémangiome est souvent unique, ne dépassant pas 3 cm. Il a été démontré récemment que ces hémangiomes sont plus fréquents dans la population caucasienne et qu'un patient ayant un hémangiome infantile a plus de chance de développer une maladie atopique (Grimmer *et al.*, 2012).

On en distingue trois formes cliniques : superficielle tubéreuse (nappes rouge vif peu palpables), profonde (masses sous-cutanées bleutées sous une peau normale) et la forme mixte (masses sous-cutanées surmontées d'une nappe tubéreuse) (Eichenfield *et al.*, 1998 ; Enjolras, 1996 ; Enjolras *et al.*, 1993).

L'évolution des hémangiomes infantiles est triphasique : phase de croissance, phase de stabilisation et phase lente d'involution (Arbiser *et al.*, 2001 ; Marchuk *et al.*, 2001 ; Fishman et Mulliken, 1993). Ces phases peuvent être déterminées par des marqueurs immunohistochimiques (Takahashi *et al.*, 1994). En phase de croissance, l'aspect histologique de l'hémangiome est celui d'une prolifération cellulaire compacte (cellules endothéliales exprimant le facteur de Willebrand et le CD34 et péricytes exprimant l'actine de muscle lisse), découpée en lobules centrés sur un vaisseau afférent (Warner et Suen, 1999 ; Requena et Sanguenza, 1997 ; Tsang et Chan, 1991).

L'immunomarquage par le Glut-1 (*glucose transporter*) est positif et permet le diagnostic différentiel avec les hémangiomes congénitaux ou les malformations capillaires (Brevière *et al.*, 2010 ; Laurian *et al.*, 2010 ; North *et al.*, 2000).

1.1.2.2 Hémangiomes congénitaux

Il s'agit de tumeurs vasculaires rares Glut-1 négatives et sont divisés en deux groupes : rapidement involutif et non-involutif.

1.1.2.2.1 Hémangiomes congénitaux « rapidement involutif » RICH

Ils ne subissent pas de poussées post-natales et régressent quelques mois après la naissance (Berenguer *et al.*, 2003). L'aspect classique est celui d'une masse saillante, chaude et violacée, leur involution est donc plus rapide que celle des hémangiomes infantiles. La biopsie permet de faire le diagnostic (Laurian *et al.*, 2010 ; Lee *et al.*, 2010).

1.1.2.2.2 Hémangiomes congénitaux « non-involutifs » NICH

Ils sont présents dès la naissance, persistent et ne régressent jamais. Ils peuvent même s'aggraver légèrement au moment de la puberté. Histologiquement ils se différencient des autres hémangiomes par une architecture lobulée avec de larges veines et des vaisseaux lymphatiques (Laurian *et al.*, 2010 ; Bataille et Boon, 2006).

1.1.2.3 Hémangiome en touffe et hémangio-endothéliome kaposiforme

L'hémangiome en « touffe » et l'hémangio-endothéliome kaposiforme sont deux entités très proches et peuvent parfois co-exister chez un même patient. Des publications récentes tendent à réunir ces deux lésions et à en faire des stades évolutifs d'une même entité

(Bienaime *et al.*, 2006). Ces formes très rares d'hémangiomes sont en général acquises mais peuvent être congénitales (Laurian *et al.*, 2010).

Cliniquement il s'agit soit de plaques rouges infiltrées et sensibles, soit d'une tumeur sous-cutané violacée et saillante qui s'infiltré en profondeur (Khau Van Kien *et al.*, 2011). Ils s'associent dans plus de 30 % des cas à une hypersudation en périlésionel. Leur évolution est lente et progressive, mais elles peuvent aussi régresser (Browning *et al.*, 2006). Le diagnostic est histologique, caractérisé par la dispersion dans tout le derme de petites « touffes » capillaires distribuées en « grenailles de plombs ». La plupart de ces « touffes » sont entourées d'un vaisseau en croissant à lumière vide (Bigorre *et al.*, 2011). Le traitement repose sur la corticothérapie générale et, en cas d'échec, sur la vincristine ou l'interféron alpha 2a ou 2b (Wananukul *et al.*, 2003 ; Hesselman *et al.*, 2002).

1.1.3 Malformations vasculaires

Les malformations vasculaires sont des anomalies du développement des vaisseaux pendant la vie intra-utérine. Ces malformations congénitales atteignent environ 0,3 % à 0,5 % de la population (Boon *et al.*, 2012). Elles sont parfois découvertes plus tardivement car elles évoluent au cours de la vie, sous l'action de divers facteurs (modifications hormonales, traumatisme, etc.). La plupart d'entre elles sont sporadiques mais certaines sont transmises génétiquement (Boon *et al.*, 2011).

Elles sont composées de cellules endothéliales matures non prolifératives. Ces lésions sont congénitales, présentes à la naissance ou apparaissent quelques mois ou années après, et ne régressent jamais (Enjolras, 1996 ; Mulliken et Young, 1988). Ce groupe, peut être

subdivisé, anatomiquement selon le type de vaisseaux préférentiellement impliqué (cf. figure 1.1), en plusieurs sous-groupes (Vernhet-Kovacsik *et al.*, 2009) .

1.1.3.1 Malformations vasculaires à flux rapide

Les fistules (FAV) et les malformations artério-veineuses (MAV) se caractérisent par l'existence d'une communication anormale, entre les artères et les veines, avec hémodétournement. C'est-à-dire absence de vascularisation capillaire et retour veineux précoce artériolisé (Mattassi, 1993). En général, le terme de fistule est réservé lorsqu'il n'existe qu'une seule zone de shunt, le terme de malformation artério-veineuse est réservé à l'existence de shunts multiples aboutissant à un peloton vasculaire intermédiaire (nidus) se drainant par une seule ou plusieurs veines (Enjolras, 1994 ; Herbreteau *et al.*, 1992 ; Lemarchand-Venencie, 1991).

Ce sont des malformations vasculaires hémodynamiquement actives à haut débit et potentiellement dangereuses (extention, hémorragies, nécroses, etc.) (Grazon *et al.*, 2007 ; Kohourt *et al.*, 1998), des lésions osseuses sont possibles ainsi qu'un risque de retentissement cardiaque avec décompensation (Lee *et al.*, 2013 ; Laurian *et al.*, 2010).

L'étiopathogénie de la plupart des MAV est inconnue. Elles apparaissent presque toutes sporadiques (Boon et Vikkula, 2012). Cependant, une prédisposition génétique a été identifiée lorsqu'elles font partie de deux maladies : *capillary malformation-arterio-venous malformation* (CM-AVM) et télangiectasies héréditaires hémorragiques ou maladie de Rendu-Osler-Weber (THH) (Barreau et Domp martin, 2014).

1.1.3.2 Malformations vasculaires à flux lent

1.1.3.2.1 Malformations capillaires

Les malformations capillaires sont présentes à la naissance chez 0,3 % des nouveau-nés et ont une distribution équivalente chez les deux sexes (Mulliken et Young, 1998). Elles sont représentées par les angiomes plans (AP) et les télangiectasies. Le diagnostic d'AP est avant tout clinique et se pose devant la classique « tâche de vin » ou une « carte de géographie », froid et non battant, pouvant présenter à sa surface des nodules cutanés, saillants et violacés inesthétiques (Wassef et Enjolras, 1999).

La majorité des malformations capillaires sont localisés au niveau de la peau de la tête ou du cou (Mulliken, 1993). Elles apparaissent dans 85 % des cas en une distribution unilatérale le long d'un dermatome (Fitzpatrick *et al.*, 1995 ; Tallman *et al.*, 1991 ; Enjolras *et al.*, 1990).

Histologiquement, l'AP se manifeste par une dilatation simple des capillaires dermiques, surtout dans le derme réticulaire superficiel (Enjolras, 1996 ; Rydh *et al.*, 1991 ; Smoller et Rosen, 1986). En immunohistochimie, les cellules endothéliales de l'AP ne paraissent pas différentes de celles des capillaires du tégument aux alentours (Neumann *et al.*, 1994 ; Lemarchand-Venencie *et al.*, 1988). Ceci peut signifier que l'atteinte structurale vasculaire qui caractérise les AP est liée à une anomalie fonctionnelle de leur stroma plutôt qu'à une anomalie intrinsèque des parois des vaisseaux (Enjolras *et al.*, 1990 ; Braverman et Ken-Yen, 1983).

Certains APs sont des marqueurs de syndromes dysmorphogénétiques plus complexes. Ainsi, le risque de syndrome de Sturge-Weber-Krabbe ou syndrome neuro-oculo-cutané est annoncé par l'existence d'un AP situé sur le territoire trigéminal V1, et peut parfois s'étendre

sur les territoires V2 et V3 (Enjolras *et al.*, 1992 ; Lemarchand-Venencie *et al.*, 1992). L'atteinte oculaire se manifeste par des angiomes choroïdiens ou un glaucome (Wassef et Enjolras, 1999 ; Herbreteau *et al.*, 1992).

L'analyse génétique de nombreuses familles atteintes de malformation capillaires a démontré son caractère potentiellement héréditaire ; un locus a été identifié sur le chromosome 5q 14-21 (Eerola *et al.*, 2002).

1.1.3.2.2 Malformations lymphatiques

Les malformations lymphatiques sont dans la plupart des cas présentes dès les premières années de la vie. En fait, 90 % des cas apparaissent avant l'âge de deux ans et 65 % à la naissance (Riche, 1992 ; Enjolras *et al.*, 1990). Il s'agit de défauts congénitaux des canaux lymphatiques représentées essentiellement par des lymphangiomes (Laurian *et al.*, 2010 ; Yamaki *et al.*, 2002). Elles peuvent s'associer à des formes syndromiques comme dans le syndrome de Klippel-Trenaunay (Laurian *et al.*, 2010 ; Bastarrika *et al.*, 2007) ou le syndrome de Protée (Laurian *et al.*, 2010 ; Hoeger *et al.*, 2004).

On en distingue deux types, mais qui en fait sont souvent associées chez un même patient :

- Les malformations lymphatiques macrokystiques (lymphangiome kystique).
- Les malformations lymphatiques microkystiques (lymphangiome_ microkystique tissulaire infiltrante) (Garzon et al., 2007)

Ces deux types de malformations lymphatiques peuvent être associés, avec des microkystes ou des macrokystes noyés dans une prolifération tissulaire (Perkins *et al.*, 2008). Les malformations lymphatiques se rencontrent aussi dans le cadre de malformations

vasculaires combinées en particulier veino-lymphatiques : ce sont les hémolympangiomes (Enjolras *et al.*, 1990).

1.1.3.2.3 Malformations veineuses

Les malformations veineuses (MV) appartiennent au groupe des malformations vasculaires qui sont une pathologie rare (0,3 à 0,5 % de la population). Parmi ces malformations, les MV sont les plus fréquentes (2/3 des cas) (Khau Van Kien *et al.*, 2011 ; Brevière *et al.*, 2010 ; Seinturier, 2010 ; Casanova *et al.*, 2006).

Il s'agit de malformations hémodynamiquement inactives à faible débit, concernant le réseau veineux et parfois le réseau capillaire. Elles ont un caractère évolutif lentement progressif (Vikkula *et al.*, 1996).

Ces malformations sont présentes dès la naissance, parfois sous la forme d'une tache cutanée bleutée (cf. figure 2.4, page 64) ; leur augmentation de volume est insidieuse tout au long de la vie. L'agrandissement rapide peut se produire pendant la puberté, la grossesse ou à la suite d'un traumatisme (Mulliken et Young, 1988), avec distension progressive des parois post-capillaires ou veineuses en « grappes de raisin », dans le territoire atteint et infiltration à bas bruit des téguments avoisinants (Lemarchand-Venencie, 1992 ; Mulliken et Glowacki, 1982).

Elles peuvent s'observer en toute localisation, mais se retrouvent le plus souvent à la région cervico-céphalique. Elles gonflent à l'effort, au cri et en position déclive, elles sont facilement vidées par la compression, ou en élevant le membre atteint (Enjolras, 1994 ; Lemarchand-Venencie, 1991). Elles affectent généralement la peau et les muqueuses, mais peuvent

également être impliquées dans des structures plus profondes, à savoir des organes, des os ou des muscles (Domp martin *et al.*, 2010 ; Domp martin *et al.*, 2009 ; Boon *et al.*, 2004).

On distingue des formes localisées, notamment aux lèvres, aux paupières ou à la langue, mais également des formes diffuses et infiltrantes, siégeant le plus souvent au niveau des régions temporo-masseterine, jugulo-labiale ou orbitaire (Deffrennes *et al.*, 2001 ; Enjolras, 1996). L'extension à la muqueuse gingivale peut induire des saignements spontanés ou lors de soins dentaires (DI Giovanni et Revelli, 1996).

Histologiquement, les MVs sont constituées de cavités vasculaires de grandes tailles, mais à paroi fine, pauvres en cellules musculaires, formant un réseau complexe donnant un aspect en « éponge » (Wassef et Enjolras, 1999 ; Vikkula *et al.*, 1996).

Certaines MVs appartiennent à des syndromes complexes comme le syndrome de Bean ou « *blue rubber-bleb naevus* », associant des malformations cutanées et viscérales (Ertem *et al.*, 2001), le syndrome de Maffucci-Kast (Bachert, 1985) ou la glomangiomatose familiale multiple (Casanova *et al.*, 2006).

1.1.3.2.3.1 Troubles fonctionnels

Certaines localisations provoquent, par effet de masse, des déformations squelettiques orbitaires avec enophtalmie et maxillo-mandibulaires (dento-alvéolaires), avec répercussions sur l'articulé dentaire et béance (Deffrennes *et al.*, 2001 ; Enjolras, 1994).

Une malformation labiale importante tend à éverser les lèvres et les rendre incompetentes. De même qu'une malformation géante de la langue peut provoquer une inocclusion dentaire permanente (DI Giovanni et Revelli, 1996 ; Enjolras, 1994).

1.1.3.2.3.2 Douleurs

La circulation étant lente, des thromboses peuvent survenir et se présenter soit sous la forme de phlébolites, soit de végétations papillaires fibreuses (Wassef et Enjolras, 1999), donnant lieu à des épisodes douloureux (Herbreteau *et al.*, 1992 ; Enjolras *et al.*, 1990).

1.1.3.2.3.3 Problème esthétique

Les MVs entraînent des tuméfactions défigurantes, aboutissant à une asymétrie difficilement supportée par les patients (Breviere *et al.*, 1992 ; Herbreteau *et al.*, 1992), souvent à l'origine de répercussions psychologiques notamment chez l'adolescent devant la modification de l'image de soi (Sari *et al.*, 2008)

1.1.3.2.3.4 Formes familiales

1.1.3.2.3.4.1 Malformations veineuses cutanées et muqueuses multiples

Les malformations veineuses cutanées et muqueuses multiples (MVMC) sont localisées au niveau de la peau (Mulliken et Young, 1988). Les lésions apparaissent habituellement à la naissance, bien que dans certains cas elles apparaissent pendant l'enfance ou plus tard dans la vie. Une expansion rapide peut être observée après trauma, après une résection partielle, ou après une modulation hormonale comme pendant la grossesse (Mulliken et Young, 1988).

Les malformations veineuses cutanées et muqueuses multiples peuvent être héritées d'une façon autosomique dominante (Vikkula *et al.*, 1996). Les études génétiques de liaison ont impliqué une région sur le chromosome 9p dans deux familles indépendantes avec malformations veineuses cutanées et muqueuses multiples (Gallione *et al.*, 1995 ; Boon *et*

al., 1994). Cette région de 19 cM contient un cluster des gènes de l'interferon et le gène suppresseur de tumeurs *MTS1* (*melanoma tumor suppressor*) (Kamb *et al.*, 1994 ; Nobori *et al.*, 1994). Le gène de la maladie *TIE2* (*TEK*), codant pour un récepteur tyrosine kinase spécifique des cellules endothéliales, a été plus tard identifié (Wouters *et al.*, 2010 ; Nobuhara *et al.*, 2006 ; Calvert *et al.*, 1999 ; Vikkula *et al.*, 1996), et localisé sur le bras court du chromosome 9, en 9p21 (cf. figure 1.2).

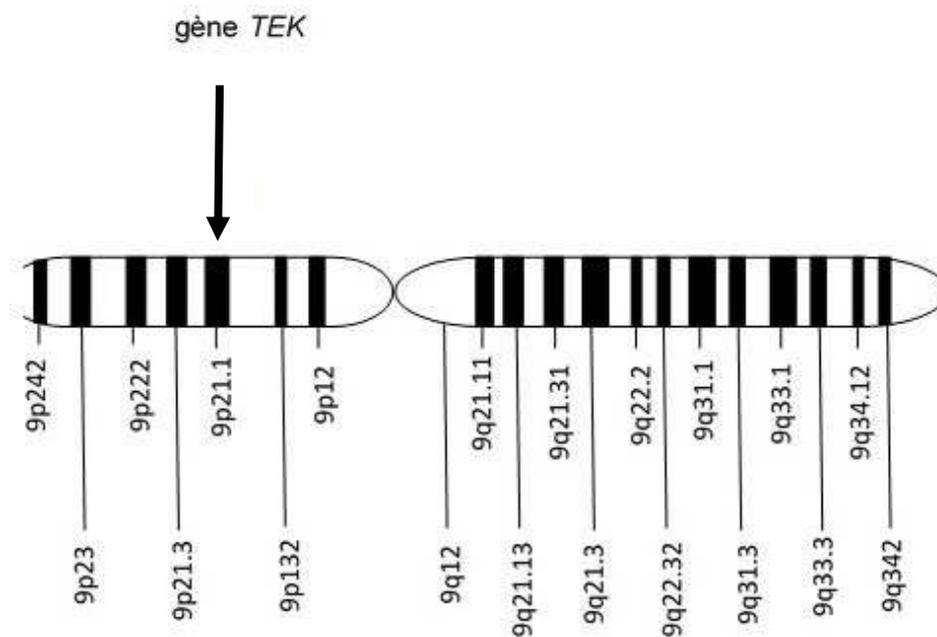


Figure 1.2 : Localisation cytogénétique du gène *TEK*.

La surexpression de la protéine TIE2 mutée dans des essais sur des cellules d'insecte induit une hyperphosphorylation du récepteur, indépendamment du ligand, et par voie de conséquence l'activation de la voie STAT1 (*signal transduction and activation of transcription1*) (Korpelainen *et al.*, 1999).

Une même mutation ponctuelle (substitution simple d'un acide aminé, R849W) a été identifiée dans deux des familles étudiées. Cette même mutation se retrouve dans trois autres familles (Nobuhara *et al.*, 2006 ; Gallione *et al.*, 1995).

Ces observations suggèrent que le développement anormal des vaisseaux dans ces MVMC serait provoqué par une interruption locale de la signalisation endothéliale de la cellule musculaire lisse (Vikkula *et al.*, 1996). Il est important de noter que quelques familles de MVMC ne montrent pas la liaison au niveau du locus *TEK*, suggérant ainsi l'existence d'autres gènes impliqués dans l'apparition des MV.

De plus, une surexpression de nombreux facteurs tel que le TGF-beta (*transforming growth factor beta*) et le beta-FGF (*beta fibroblast growth factor*) a été découverte chez des patients présentant des MVMC (Pavlov *et al.*, 2009). Les récepteurs de progestérone ont également été découverts dans les MVMC, ce qui explique leur croissance rapide pendant les changements hormonaux (Duyka *et al.*, 2009).

1.1.3.2.3.4.2 Malformations glomuveineuses

Une autre analyse de liaison du génome entier a démontré une liaison avec une région du bras court du chromosome 1 (1p22.1) (Irrthum *et al.*, 2001 ; Brouillard *et al.*, 2000 ; Boon *et al.*, 1999). Ces résultats prouvent que les lésions de ces patients ont une base étiologique différente. Cliniquement, ces lésions veineuses ont des caractéristiques spécifiques qui permettent de les différencier des MVMC et des MV sporadiques : elles sont bleu-pourpre, nodulaires et douloureuses à la palpation (Boon et Vikkula, 2008 ; Henning *et al.*, 2007 ; Boon *et al.*, 2004). Elles sont caractérisées par des canaux veineux distendus avec

endothélium plat entouré de cellules murales glomiques (cf. tableau 1, page 2) (Goodman et Abele, 1971).

Le clonage positionnel a permis d'identifier le gène muté, appelé *glomuline* à cause de la présence histologique de cellules murales glomiques (Brouillard *et al.*, 2002) ; il code pour une protéine de liaison FK506 de 48 kD (Brouillard *et al.*, 2002). Son expression est limitée aux cellules musculaires lisses des vaisseaux et non aux cellules endothéliales. Cela suggère que les malformations glomuveineuses (MGV) sont probablement dues à un déficit de différenciation des cellules musculaires des vaisseaux (Mc Intyre *et al.*, 2004).

Les analyses génétiques des patients atteints de MGV ont montré qu'au moins 70 % sont héréditaires (Brouillard *et al.*, 2007 ; Boon *et al.*, 2004).

Une des mutations identifiée, *157delAAGAA* du gène *glomuline* est présente dans plus de 50 % des patients atteints de MGV (Brouillard *et al.*, 2005). Cela s'explique par le partage d'un gène ancestral commun, présent dans la majorité des familles (Vikkula *et al.*, 2006). Les MGV sont transmis selon un mode autosomique dominant avec expressivité variable et une pénétrance incomplète (Brouillard *et al.*, 2000) . Parmi les quarante mutations germinales différentes qui ont été identifiées jusqu'à présent dans plus de 162 familles, 16 sont présentes chez plus de 80 % des patients (Amyere *et al.*, 2013 ; Brouillard *et al.*, 2007 ; O'Hagan *et al.*, 2006 ; Brouillard *et al.*, 2005 ; Brouillard *et al.*, 2002).

Etant donné que la majorité des mutations du gène *glomuline* cause des codons Stop prématurés, il est probable que ces mutations entraînent une perte de fonction de la protéine (Brouillard *et al.*, 2005). En fait, le niveau de transcription de la *glomuline* dans le tissu des MGV est extrêmement bas. Cela suggère la nécessité d'une perte complète de *glomuline*

pour qu'une MGV se développe (Vikkula *et al.*, 2006). Cette hypothèse est renforcée par la découverte d'une seconde mutation dans le gène *glomuline* dans une MGV résequée (Brouillard *et al.*, 2002).

1.2 Mécanismes de pathogenèse des anomalies vasculaires

La compréhension approfondie des mécanismes de la vasculogenèse et de l'angiogenèse a fourni une meilleure compréhension de l'étiopathogénie des anomalies vasculaires (Vikkula, 2006).

Des études utilisant des modèles murins *in vivo*, ainsi que des techniques de biologie cellulaire et moléculaire, ont permis l'identification et la décodification du mécanisme d'action de plusieurs gènes codant pour des facteurs de croissance, des récepteurs ou des facteurs de transcription impliqués dans le développement du système vasculaire (Tille et Pepper, 2004). Cette partie se concentre sur les avancées récentes de la biologie des mécanismes d'angiogenèse/vasculogenèse et de la différenciation des vaisseaux artériels et veineux. Cette connaissance est intégrée avec de nouvelles données obtenues à partir des études génétiques chez l'homme, qui ont indiqué un certain nombre d'éléments impliqués dans le développement des anomalies vasculaires familiales.

1.2.1 Développement des systèmes vasculaires et lymphatiques du sang

Le système cardiovasculaire est le premier système organique fonctionnel formé dans le corps (De Haan, 1965). Chez l'homme, le développement du système circulatoire commence à partir de la troisième semaine de la vie embryonnaire. Le système cardiovasculaire comprend le cœur, les vaisseaux sanguins (artères, capillaires, et veines), et les vaisseaux lymphatiques (Lyons, 1996).

Pendant l'embryogenèse, le développement du système vasculaire sanguin se fait par l'intermédiaire de deux processus : la vasculogenèse et l'angiogenèse (Timur *et al.*, 2005 ; Risau, 1997).

1.2.1.1 Vasculogénèse

La première étape du développement vasculaire pendant l'embryogenèse est la vasculogénèse qui permet la mise en place d'un plexus vasculaire primitif, non organisé (Daniel et Abrahamson, 2000).

Par croissance et fusion des premiers îlots sanguins embryonnaires le réseau capillaire primitif se forme puis se différencie en système artério-veineux dès le début de la circulation sanguine (Chung *et al.*, 2002 ; Choi *et al.*, 1998). Les cellules destinées à devenir des cellules hématopoïétiques sont localisées au centre des îlots ; ce sont les progéniteurs hématopoïétiques. Les cellules situées à la périphérie des îlots vont donner les précurseurs endothéliaux ou angioblastes (cf. figure 1.3) (Luttun *et al.*, 2002 ; Dieterlen-Lievre *et al.*, 1999 ; Pardanaud *et al.*, 1996 ; Noden, 1989 ; Risau et Lemmon, 1988 ; Risau *et al.*, 1988).

Venant s'ajouter à cette origine anatomique commune, les progéniteurs hématopoïétiques et les progéniteurs endothéliaux partagent des marqueurs antigéniques communs : le CD 34 et certains récepteurs du VEGF (Tobelem, 2001).

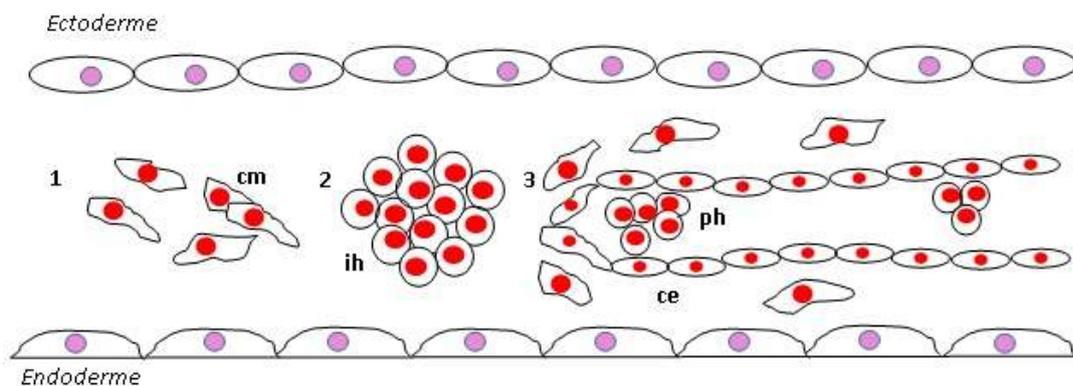


Figure 1.3 : Étapes de la formation du plexus vasculaire primitif pendant la vasculogénèse (Adapté d'après Tobelem, 2001). En 1, les cellules mésodermiques (cm) se multiplient et vont donner naissance aux îlots sanguins primitifs ou hémangioblastiques (ih) en 2. À la périphérie de ces îlots les cellules

Figure 1.3. Suite. endothéliales se différencient et s'organisent (ce) alors que les cellules centrales fournissent les progéniteurs hématopoïétiques (ph). Les angioblastes se réorganisent alors pour former les tubes capillaires qui constituent le plexus vasculaire primaire par différenciation de cellules endothéliales in situ à partir de précurseurs mésenchymateux (Riseau et Flamme, 1995). Une fois que ce plexus vasculaire primaire est formé, les nouveaux capillaires forment les premiers vaisseaux dans un processus appelé angiogénèse. Dans le plexus capillaire primaire, les cellules endothéliales commencent à se différencier en artères et veines (Yancopoulos et al., 1998).

1.2.1.2 Angiogenèse

Le réseau capillaire primitif est remodelé par angiogénèse, permettant son extension et sa réorganisation en un arbre vasculaire hiérarchisé, optimisé pour remplir ses fonctions de conduction et d'échange (Asahara *et al.*, 1997). La maturation des vaisseaux va alors se produire, elle consiste en l'établissement d'un mur vasculaire par recrutement de cellules périendothéliales (cellules musculaires lisses et péricytes), dont l'origine dépend de la localisation dans l'embryon (Gittenberger-de Groot *et al.*, 1999).

L'état du réseau vasculaire est régulé de façon très fine par un équilibre dynamique entre facteurs angiogéniques et angiostatiques, dont la modulation résulte en une induction de l'angiogénèse, ou au contraire une stabilisation, voire une régression des vaisseaux sanguins (Holmgren *et al.*, 1995). Un grand nombre de facteurs de nature très variée interviennent à différentes étapes de l'angiogénèse : molécules signalisatrices (facteurs de croissance et cytokines, chimiokines, hormones, neuropeptides), protéines de la matrice extracellulaire, protéases, ou encore paramètres hémodynamiques (forces de cisaillement liées au flux sanguin) (Flamme *et al.*, 1997).

Les résultats de plusieurs études indiquent que la liaison angiopoïétine/TIE, PDGF-B/PDGFR- β , et la transformation du facteur de croissance (TGF)- β 1/TGF- β R ligand avec le récepteur tyrosine kinase, régulent les systèmes d'interactions endothéliales entre les

péricytes et les cellules musculaires lisses vasculaires (VSMCs) (Ramsauer et D'Amore, 2002).

1.2.2 Principaux facteurs de régulation de l'angiogénèse

1.2.2.1 Familles de VEGF et des récepteurs de VEGF

Jusqu'à présent, quatre membres de la famille de VEGF (*vascular endothelial growth factor*) ont été identifiés, à savoir : VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, et VEGF-D. Les VEGFs sont des glycoprotéines sécrétées, et toutes se fixent aux récepteurs spécifiques impliquant une activité tyrosine kinase de VEGF (VEGFRs : VEGF tyrosine kinase receptors) VEGFR-1, VEGFR-2, et VEGFR-3 (cf. figure 1.4).

a) VEGF-A est l'un des régulateurs les plus importants de l'angiogénèse *in vivo* et le plus abondant chez l'homme. Il y a des isoformes multiples de VEGF-A ; ce sont des polypeptides de 121, 145, 165, 189 et 206 acides aminés (Hicklin et Ellis, 2005). Toutes les isoformes de VEGF-A peuvent se lier aux récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2. VEGF-A est critique pour les premières étapes de la vasculogénèse, parce que les îlots de sang, les cellules endothéliales, et les vaisseaux principaux ne se développent pas dans des embryons dépourvus de VEGF-A. De même, la suppression d'un simple allèle de VEGF-A est mortelle dans la phase embryonnaire, ce qui montre le rôle significatif de la concentration de la molécule VEGF-A pendant le développement embryonnaire (Ferrara, 2001).

b) VEGF-B existe sous deux formes, VEGF-B₁₆₇ et VEGF-B₁₈₆. Les essais sur des modèles murins ont montré que l'inactivation ciblée de VEGF-B affecte la conduction cardiaque, de

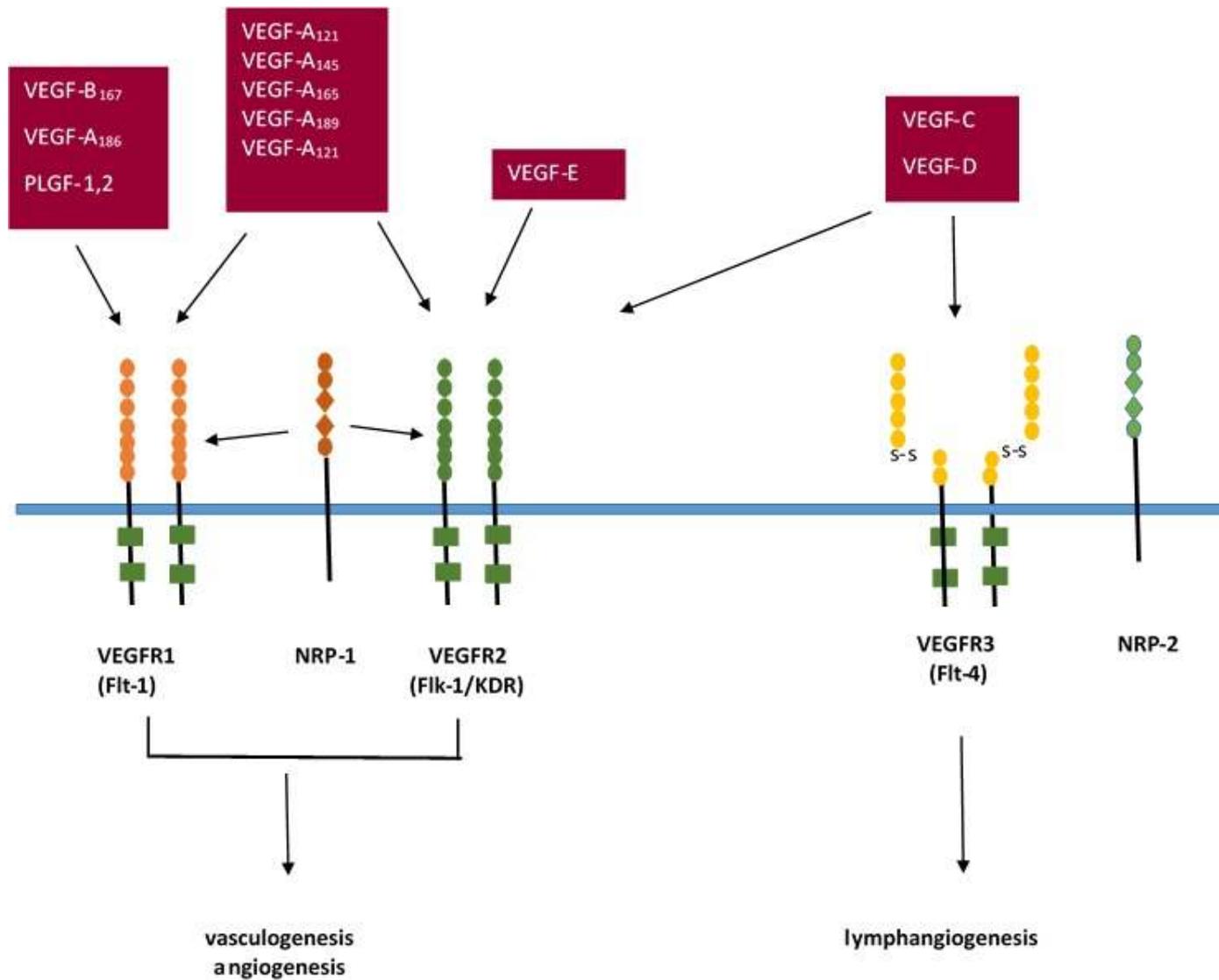


Figure 1.4 : Familles des ligands VEGF et les récepteurs associés. Adaptés d'après Hicklin et Ellis, 2005. *VEGF-A est l'inducteur le plus important de l'angiogenèse physiologique et pathologique. Il augmente la perméabilité vasculaire et stimule la prolifération et la migration des cellules endothéliales via ses récepteurs VEGF-R1 et VEGF-R2 exprimés spécifiquement au niveau de ces cellules. VEGF: vascular endothelial growth factor, VEGFR: vascular endothelial growth factor receptor, NRP: neuropilin.*

même que le recrutement des cellules inflammatoires dans l'arthrite, sans affecter le développement vasculaire embryonnaire (Mould *et al.*, 2003 ; Bellomo *et al.*, 2000).

c) VEGF-C et VEGF-D sont produits comme des zymogènes avec de longues extrémités propeptidiques N-terminale et C-terminale. Le clivage initial protéolytique du segment C, par une convertase, produit une molécule de 30 kDa, ayant une affinité pour VEGFR-3 (Siegfried *et al.*, 2003).

Une deuxième étape protéolytique, médiée par la plasmine, est nécessaire pour produire une molécule d'un poids moléculaire plus réduit (21 kDa), avec une affinité plus élevée pour VEGFR-2 et VEGFR-3 (McColl *et al.*, 2003).

La surexpression de VEGF-C et de VEGF-D chez des souris génétiquement modifiées, induit la formation de vaisseaux lymphatiques hyperplasiques. Réciproquement, l'inhibition de VEGF-C et/ou de VEGF-D par une surexpression de la forme soluble de VEGFR-3 au niveau de la peau, conduit à l'inhibition de la croissance des vaisseaux lymphatiques (Jussila et Alitalo, 2002).

L'inactivation par invalidation des deux allèles de VEGF-C a comme conséquence la mort prénatale. Les cellules endothéliales permettent la prolifération de la lignée lymphatique, mais pas la croissance des veines (Karkkainen *et al.*, 2004). Ceci a comme conséquence l'accumulation des liquides dans les tissus.

1.2.2.2 Récepteurs VEGFRs

L'inactivation du gène VEGFR-1 provoque un afflux accru des hémangioblastes conduisant à une croissance anarchique des cellules endothéliales et à la désorganisation des vaisseaux sanguins (Fong *et al.*, 1999).

La délétion du domaine intracellulaire de VEGFR-1 n'affecte pas le développement vasculaire normal mais altère l'angiogenèse tumorale (Hiratsuka *et al.*, 2001). En effet, il a été rapporté récemment que VEGFR-1 jouerait un rôle dans l'angiogenèse pathologique chez l'adulte, en mobilisant les cellules souches endothéliales de la moelle osseuse (Carmeliet *et al.*, 2001).

L'inactivation du gène VEGFR-2 a comme conséquence un défaut de formation d'îlots sanguins et une mort au stade embryonnaire (Shalaby *et al.*, 1997).

L'activation de VEGFR-2 stimule la prolifération, la migration, la survie des cellules endothéliales, et la perméabilité des vaisseaux sanguins (Ferrara, 2001).

Des études génétiques ont démontré que le lymphœdème primaire est causé par une mutation ponctuelle (une substitution d'acide aminé) dans le récepteur VEGFR-3 (Irrthum *et al.*, 2000 ; Karkkainen *et al.*, 2000) qui joue un rôle crucial dans la lymphangiogenèse normale et pathologique (Jussila et Alitalo, 2002).

1.2.2.3 TGF- β et récepteurs

Les TGF- β (*tissue growth factor betta*) jouent un rôle important dans la vasculogenèse et l'angiogenèse. Pendant l'embryogénèse de souris, TGF- β 1 est exprimé dans beaucoup de tissus, y compris dans les cellules endothéliales et les précurseurs de cellules hématopoïétiques (Akhurst *et al.*, 1990).

L'inactivation de TGF- β 1 a pour conséquence la mort à la mi-gestation de la moitié des souris homozygotes et approximativement d'un quart des souris hétérozygotes (Dickson *et al.*, 1995). La cause primaire de la mort semble être un défaut dans la vascularisation du sac

jaune et du système hématopoïétique. Bien que la différenciation initiale des précurseurs mésodermiques se produise normalement dans les cellules endothéliales, la différenciation suivante dans les tubes capillaires mène à une intégrité réduite de la paroi vasculaire (Dickson *et al.*, 1995).

Les souris déficientes en récepteur du TGF- β 2, présentent un phénotype mutant semblable à celui des souris déficientes en TGF- β 1, suggérant que la signalisation TGF- β est essentielle pour l'entretien de l'intégrité de la paroi vasculaire (Oshima *et al.*, 1996).

1.2.2.4 PDGF-B et récepteur

Pendant le développement du système vasculaire, le PDGF-B (*platelet-derived growth factor beta*) est exprimé par les cellules endothéliales des artères et des pousses de vaisseaux antigéniques, tandis que son récepteur PDGFR- β est exprimé par les cellules périvasculaires des artères, des artérioles et des capillaires. Les vaisseaux nouvellement formés signalent au mésenchyme environnant d'induire l'expression de PDGFR-B aux jeunes cellules périendothéliales. Ces cellules répondent à PDGFR- β sécrété par les cellules endothéliales, par la prolifération et la migration des capillaires tout au long de la germination (Lindahl *et al.*, 1998). De l'inactivation de PDGF-B ou de PDGFR- β résulte la perte de péricytes, ayant pour résultats une dilatation capillaire, une prolifération des cellules endothéliales et une fragilité de la paroi vasculaire, cela conduit à un retard dans l'embryogenèse et à l'hémorragie mortelle (Hellstrom *et al.*, 1999).

1.2.2.5 Molécules Notch et Jagged

Les protéines Notch sont des récepteurs membranaires activés par les ligands Delta et Jagged. Après activation par contact cellule-cellule, les protéines Notch sont clivées par la

sécrétase-gamma, les produits (domaine intracellulaire de Notch, NICD) sont libérés de la membrane et transloqués dans le noyau. NICD interagit avec le facteur de transcription RBP-J (RBP: *recombining binding protein*) pour induire l'expression de gènes, dont Hes1 (Schouwey *et al.*, 2007 ; Moriyama *et al.*, 2006). La famille Notch comporte un certain nombre de protéines transmembranaires qui agissent l'une sur l'autre comme régulatrices des décisions concernant le devenir cellulaire (Shimizu *et al.*, 2000). Delta1, Jagged1, et Jagged2 agissent l'une sur l'autre directement avec Notch3. Les deux dernières sont exprimées exclusivement par les cellules endothéliales artérielles (Iso *et al.*, 2003).

Notch semble être impliquée dans la signalisation mésenchymateuse des cellules endothéliales qui stabilisent la vascularisation ; elle a été également impliquée dans la différenciation artérioveineuse (Shawber et Kitajewski, 2004). Les mutations de Jagged1 affectent des vaisseaux sanguins et mènent au syndrome d'Alagille (Kamath, 2004).

1.2.2.6 Intégrines

Les adhésions entre l'endothélium et la matrice extra-cellulaire (MEC) sont assurées par les intégrines, une famille de récepteurs de surface cellulaire qui se lient aux collagènes, aux laminines, à la vitronectine et à la fibronectine. Les intégrines sont des hétérodimères α/β ayant pour rôle l'adhésion des cellules avec la MEC, mais aussi la transduction intracytosolique des signaux biochimiques (Giancotti et Ruoslahti, 1999).

L'inactivation des intégrines αV et $\beta 8$ mène à la létalité embryonnaire avec des défauts vasculaires dans le placenta, le cerveau, et l'appareil gastro-intestinal (Zhu *et al.*, 2002 ; Bader *et al.*, 1998).

1.2.2.7 Récepteurs TIE et Angiopoïétines

La famille de récepteurs tyrosine kinase se compose de deux membres, TIE1 et TIE2, principalement exprimés par les cellules endothéliales vasculaires (Loughna et Sato, 2001). Plusieurs membres de la famille d'angiopoïétines (ANG), ANG-1 à ANG-4, ont été identifiés comme des ligands pour TIE2. Jusqu'à présent, les ligands pour TIE-1 n'ont pas été mis en évidence. Sachant que l'ANG-1 et l'ANG-4 activent TIE2, l'ANG-2 et l'ANG-3 semblent fonctionner comme antagonistes spécifiques empêchant la signalisation de TIE2 médiée par l'ANG-1 (Ward et Dumont, 2002).

Dans les embryons de souris dépourvus de TIE2, la vasculogenèse se produit normalement. Cependant, les cellules endothéliales et péri-endothéliales forment un réseau vasculaire immature mal organisé dans les gros et petits vaisseaux (Sato *et al.*, 1995).

TIE2 semble donc commander le remodelage vasculaire, et la capacité des cellules endothéliales à recruter les cellules périvasculaires, nécessaires pour stabiliser la structure des vaisseaux. Dans les embryons dépourvus de TIE1, l'intégrité des cellules endothéliales est compromise, provoquant des œdèmes, des hémorragies et la mort (Sato *et al.*, 1995; Puri *et al.*, 1995).

Chez l'embryon, l'ANG-1 est exprimée dans le mésenchyme et dans les cellules musculaires lisses environnant la vascularisation en développement (Davis *et al.*, 1996). La suppression de l'ANG-1 a comme conséquence un défaut de l'angiogenèse très semblable à celui observé chez les souris qui manquent de TIE2 ou qui surexpriment l'ANG-2, y compris l'absence des cellules périvasculaires (Maisonpierre *et al.*, 1997 ; Suri *et al.*, 1996).

Des données récentes suggèrent que l'ANG-2 jouerait un rôle dans le développement lymphatique (Gale *et al.*, 2002). La suppression de l'ANG-2 chez les souris a comme conséquence la désorganisation et l'hypoplasie des vaisseaux lymphatiques intestinaux et cutanés, menant à la mort à la deuxième semaine du développement embryonnaire.

1.2.2.7.1 Système ANG-TIE2 et les malformations veineuses

Différentes mutations du gène *TEK* codant pour le récepteur TIE2 ont été impliquées dans l'apparition des malformations veineuses cutanées et muqueuses multiples chez quelques familles présentant ces malformations (Vikkula *et al.*, 1996). Une même mutation ponctuelle (substitution simple d'un acide aminé, R849W) a été retrouvée pour l'ensemble des familles présentant la forme héréditaire des MVMC (Vikkula *et al.*, 2006).

La substitution R849W est localisée dans le domaine intracellulaire du récepteur tyrosine-kinase TIE2. *In vitro*, cette mutation augmente l'activité de phosphorylation de ce récepteur indépendamment de son ligand (Wouters *et al.*, 2010 ; Limaye *et al.*, 2009 ; Calvert *et al.*, 1999 ; Vikkula *et al.*, 1996). Étant donné que la voie de signalisation régulée par ce récepteur est essentielle pour la survie des cellules endothéliales, il est possible que les malformations veineuses mucocutanées soient causées par une augmentation de la survie des cellules endothéliales (Vikkula *et al.*, 2006). Par ailleurs, l'absence de cellules murales dans les malformations veineuses suggère une altération dans la signalisation entre les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses (Vikkula *et al.*, 2006).

Des études antérieures ont montré qu'une surexpression de la substitution R849W conduit à une hyperactivation de AKT kinase (Morris *et al.*, 2005), ainsi qu'une activation aberrante du

facteur de transcription STAT1 (*signal transduction and activation of transcription*) (Huang *et al.*, 2013 ; Hu *et al.*, 2008 ; Korpelainen *et al.*, 1999).

Une autre mutation du gène *TEK* la plus retrouvée dans quelques formes sporadiques des MVMC : la substitution L914F provoque une hyperphosphorylation de niveau plus élevé que la substitution R849W (Wouters *et al.*, 2010 ; Limaye *et al.*, 2009 ; Calvert *et al.*, 1999 ; Vikkula *et al.*, 1996). De plus, les cellules endothéliales des veines ombilicales humaines (HUVEC ; *human umbilical vein endothelial cells*), exprimant *in vitro* le gène muté *TEK* R849W, montrent une distribution uniforme du récepteur, contrairement au récepteur muté L914F qui s'accumule, dans son état actif, dans l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique (Limaye *et al.*, 2009). Ceci montre que cette mutation est incompatible avec la vie à l'état germinal (Uebelhoer *et al.*, 2013).

1.3 Structure et expression des récepteurs TIE

Les récepteurs TIE sont des monomères présentant un domaine extracellulaire de liaison au ligand, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire à activité tyrosine kinase. TIE1 et TIE2 affichent une structure générale similaire et notamment 73 % d'homologie dans leur partie intracellulaire (Hubbard et Till, 2000). La partie extracellulaire est à 33 % identique ; elle est constituée successivement de deux domaines de type immunoglobuline, de trois domaines d'homologie à l'EGF, d'un troisième domaine de type immunoglobuline, et finalement de trois domaines fibronectine de type III, adjacents au domaine transmembranaire (Augustin *et al.*, 2009) (cf. figure 1.5).

Les récepteurs TIE sont coexprimés dans les cellules endothéliales lymphatiques et vasculaires sanguines. Une expression différentielle des deux types de récepteurs n'a pas été révélée. Par contre, il apparaît que, contrairement à TIE2 dont la régulation transcriptionnelle est limitée, celle de TIE1 est fortement augmentée, par exemple dans les zones où le débit sanguin est turbulent ou au cours de la phase de progression d'un mélanome (Chen-Konak *et al.*, 2003). Les récepteurs TIE sont aussi exprimés par les cellules hématopoïétiques circulantes et par les cellules souches hématopoïétiques localisées dans les niches médullaires (De Palma *et al.*, 2003).

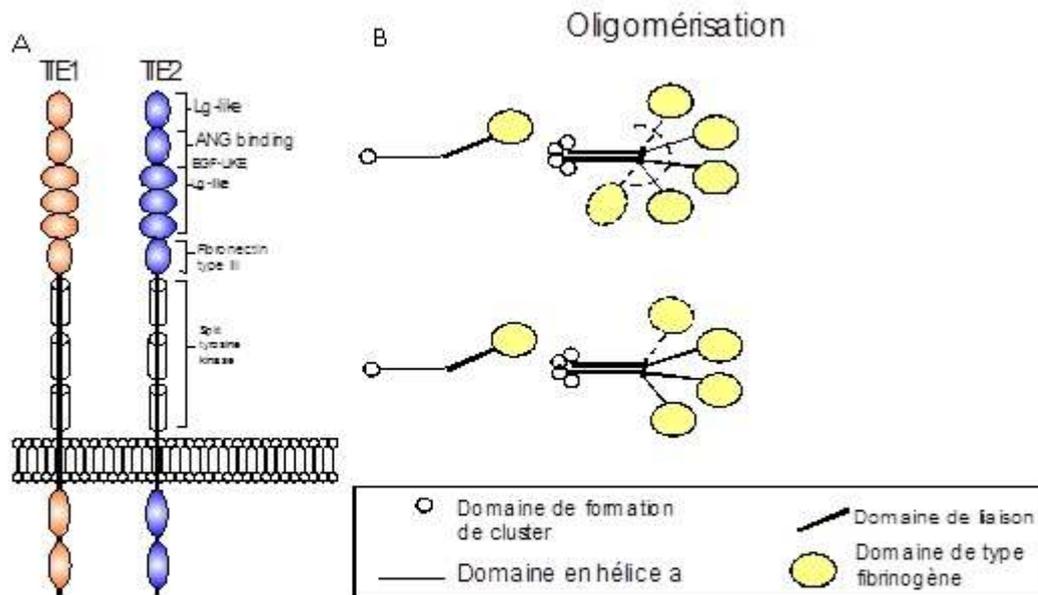


Figure 1.5 : Propriétés structurales des récepteurs TIE et des ligands de l'angiopoétine. Adapté d'après Augustin *et al.*, 2009. Les récepteurs TIE sont des monomères présentant un domaine extracellulaire de liaison au ligand, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire à activité tyrosine kinase. B) Les ANG sont constituées d'un domaine N-terminal comprenant deux résidus cystéine, suivi d'un domaine en hélice α , d'un peptide de liaison et d'un domaine homologue au fibrinogène dans leur partie C-terminale. Le domaine d'homologie au fibrinogène est impliqué dans la fixation au récepteur, les multiples hélices α forment des structures circulaires organisant les dimères en oligomères de tailles variables (Augustin *et al.*, 2009).

En particulier, l'expression de TIE2 par une sous-population de monocytes signe le phénotype pro-angiogénique des macrophages spécifiquement recrutés par les tumeurs (De Palma *et al.*, 2003).

Enfin, les récepteurs TIE sont présents dans de nombreux autres types cellulaires, en particulier dans plusieurs types de cellules tumorales, constituant donc une cible cellulaire antitumorale potentielle. Enfin, une forme soluble de TIE, sTIE, résultant de la protéolyse de l'ectodomaine, a également été détectée dans la circulation. Des taux élevés de sTIE2 ont d'ailleurs été mesurés dans des pathologies néoplastiques ou non néoplastiques conférant un potentiel de biomarqueur certain à cette forme soluble (Kim *et al.*, 2000).

1.3.1 Conséquences intracellulaires de l'activation des récepteurs TIE

Ang1 agit comme un agoniste de TIE2. À l'inverse, les effets d'ANG2 sur le réseau vasculaire semblent circonstanciels. Ainsi, ANG2 inhibe le système ANG-TIE pour déstabiliser l'endothélium d'un réseau vasculaire quiescent. Par contre, ANG2 stimule TIE2 dans l'endothélium activé (Daly *et al.*, 2006).

Les similarités entre la capacité de fixation de ANG1 et ANG2 sur le récepteur TIE2 suggèrent que la structure du ligand ou le degré d'oligomérisation pourrait renseigner sur les propriétés agonistes ou antagonistes de ANG1 et ANG2, comme sur celles, circonstanciels, de ANG2 (Maisonpierre *et al.*, 1997). Des analyses biochimiques révèlent d'ailleurs que ANG1 migre sous la forme d'oligomères, alors que ANG2 migre sous forme de dimères dans un gel en conditions non dénaturantes (Maisonpierre *et al.*, 1997). Enfin, il a été démontré que les oligomères hautement hiérarchisés fonctionnent comme des activateurs de TIE2, alors que les formes dimériques inhibent l'activation endothéliale de TIE2 (Davis *et al.*, 2003).

1.3.1.1 Conséquences intracellulaires de l'activation de TIE2

L'activation de TIE2 conduit à la phosphorylation du récepteur et au recrutement de nombreuses protéines adaptatrices. Cela aboutit à l'activation de nombreuses voies de signalisation intracellulaire qui maintiennent le phénotype quiescent des cellules endothéliales ou transmettent le signal au cours de l'activation des cellules endothéliales (Eklund *et al.*, 2006).

1.3.1.1.1 Survie des cellules endothéliales

La phosphorylation de TIE2 induite par l'ANG1 induit le recrutement de protéines adaptatrices comme la *growth factor receptor bound protein-2* (GRB2), la phosphorylation de la sous-unité p85 de la phosphoinositide 3 kinase (PI3K) et l'activation de la protéine kinase AKT. Celle-ci active des voies impliquées dans la survie, comme l'enzyme endothéliale de synthèse du monoxyde d'azote (NO) ou la survivine (Nyall *et al.*, 2009) (cf. figure 1.6). AKT inhibe les voies pro-apoptotiques comme la caspase 9 et BAD (*BCL2-associated agonist of cell death*). AKT induit également la phosphorylation et l'inactivation du facteur de transcription de type forkhead FOXO-1 (*Forkhead box O1*) qui contrôle l'expression de l'ANG2 (Kim *et al.*, 2000).

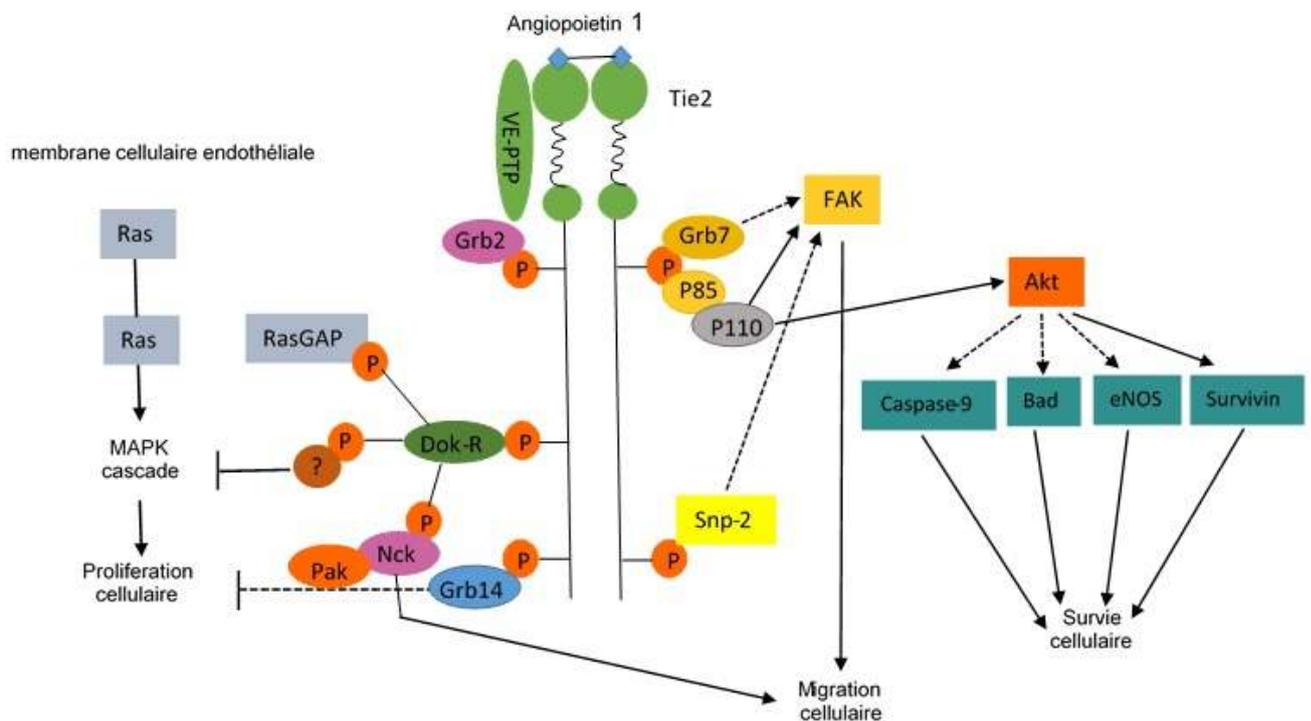


Figure 1.6 : Implication de l'activation du récepteur TIE2 dans la survie, la migration et la perméabilité des cellules endothéliales. Adapté d'après Jones *et al.*, 2001. La sous-unité régulatrice p85 de la phosphatidylinositol-3-OH kinase (PI(3)K) s'associe avec le récepteur TIE2, il en résulte une stimulation de la PI(3)K. L'activation ultérieure de la sérine / thréonine kinase AKT est en corrélation avec une augmentation de la survie cellulaire, bien que le mécanisme exact par lequel cela se produit reste inconnu.

Figure 1.6 Suite. *Alternativement l'activation de la PI(3)K coïncide avec l'adhésion focale, l'activation et la migration cellulaire. La protéine tyrosine phosphatase Shp2 et la protéine GRB7 pourraient également utiliser cette voie pour potentialiser la migration cellulaire et semblent être reliées au récepteur par les résidus tyrosine 1111 et 1100, respectivement. AKT : sérine/ thréonine protéine kinase, GRB7: growth factor receptor-bound protein 7, PI3K: phosphatidyl-inositol-tri-phosphate kinase, SHP2: Src homology region 2 domain phosphatase 2.*

1.3.1.1.2 Migration des cellules endothéliales

De la même manière, l'activation de TIE2 stimule la migration des cellules endothéliales par l'activation de la voie dépendante de la PI3 kinase, qui inclut le recrutement des protéines adaptatrices GRB14 et SHP2 (*Src homology region 2 domain phosphatase 2*) au récepteur TIE2 (Babaei *et al.*, 2003). Le recrutement des protéines DOK-R (*downstream of kinase receptor*) et NCK2 (*noncatalytic region of tyrosine kinase 2*) ou GRB4 semble également jouer un rôle dans le contrôle de la migration des cellules endothéliales (Jones *et al.*, 1998) (cf. figure 1.6).

1.3.1.1.3 Perméabilité des cellules endothéliales

Les cellules endothéliales établissent des jonctions adhérentes plus ou moins serrées qui définissent la perméabilité de la monocouche endothéliale. Les effets inhibiteurs de l'activation de TIE2 sur la perméabilité endothéliale impliquent la séquestration de la protéine à activité tyrosine kinase, SRC, celle-ci participe à l'augmentation de la perméabilité endothéliale induite par le VEGF en induisant la phosphorylation et donc la redistribution de la E-cadhérine, constituant majeur des jonctions adhérentes (Thurston *et al.*, 2000).

La séquestration de SRC se fait grâce à la protéine *mammalian diaphenous* (mDia) une cible de la protéine RhoA-GTPase (*Ras homolog gene family, member A, guanosine triphosphate*); elle est initiée par l'activation de TIE2. Au final, la séquestration de SRC par

mDia déprime les récepteurs du VEGF, un acteur essentiel de la perméabilité de la barrière endothéliale (Eklund *et al.*, 2006).

1.3.1.1.4 Quiescence et maturation des cellules endothéliales

Le maintien d'un phénotype quiescent pour les cellules endothéliales requiert une association étroite avec les cellules péri-endothéliales (péricytes et cellules musculaires lisses). L'activation de TIE2 augmente l'expression de l'*endothelial heparin-binding epidermal-like growth factor* (HB-EGF) qui stimule la migration des cellules musculaires lisses de manière paracrine. L'*hepatocyte growth factor* (HGF) ou encore la sérotonine semblent également constituer des cibles de l'ANG1 dans son effet sur la migration des cellules musculaires lisses. Bien qu'aucun lien formel n'ait été démontré entre le *platelet-derived growth factor- β* (PDGF β), son récepteur et le système ANG-TIE, il apparaît que l'activation de TIE2 par l'ANG1 suffit à restaurer la survie et une architecture adéquate du réseau vasculaire rétinien malgré l'absence complète des cellules péri-endothéliales induite par l'administration d'anticorps dirigés contre les récepteurs au PDGF de type β (Uemura *et al.*, 2002).

1.3.1.2 Conséquences intracellulaires de l'activation de TIE1

À l'inverse de la signalisation induite par TIE2, celle dépendante de TIE1 est méconnue. Des expériences utilisant des récepteurs chimères composés du domaine extracellulaire du récepteur pour le *colonystimulating factor 1* (CSF1) et du domaine intracellulaire de TIE1 ont révélé que TIE1 peut activer la voie de signalisation dépendante de PI3K et de AKT. Ainsi, TIE1 pourrait transmettre des signaux identiques à ceux de TIE2. Cependant, aucun ligand

de TIE1 n'a été identifié ce qui laisse supposer l'existence probable de mécanismes additionnels.

1.3.1.3 Rôles physiologiques du système ANG-TIE

La séquence parfaitement définie du développement vasculaire chez l'embryon a permis, grâce à l'utilisation de souris génétiquement modifiées, de définir les fonctions des morphogènes vasculaires (Sato *et al.*, 1995).

Ainsi, les souris déficientes pour TIE2 meurent entre 10,5 et 12,5 jours de vie embryonnaire. Le réseau vasculaire ne se développe pas au-delà du réseau capillaire primitif et ce dernier reste peu organisé, immature présentant un déficit marqué en péricytes et cellules musculaires lisses (Sato *et al.*, 1995).

L'ensemble des modèles de souris génétiquement modifiées a permis de révéler les différents rôles du système ANG-TIE dans le contrôle du bourgeonnement angiogénique, le remodelage vasculaire et la transition d'un endothélium quiescent vers un état activé :

1) le bourgeonnement vasculaire est un des mécanismes du processus angiogénique. Il est initié par la migration des cellules endothéliales spécifiques, les cellules Tip, en réponse à un gradient de VEGF. Au contact des cellules Tip (cellules situées à l'extrémité des capillaires en bougeonnement), les cellules endothéliales de type Stalk (cellule organisée en tige) prolifèrent et se différencient ; elles sont, à ce stade, peu associées aux péricytes ou aux cellules musculaires lisses. À l'inverse, les cellules endothéliales de type Phalanx sont en étroite interaction avec les péricytes et les cellules musculaires lisses et restent ainsi dans un état quiescent. Les cellules endothéliales de type Stalk et Phalanx expriment les récepteurs Tie et pourraient également stocker l'ANG2 dans les corps de Weibel-Palade. L'ANG2 est

fortement produite par les cellules endothéliales angiogéniques. L'ANG1, par un mécanisme paracrine, pourrait faciliter la formation d'agrégats de TIE2 ;

2) la surexpression d'ANG1 induit un remodelage vasculaire qui aboutit à la formation de vaisseaux de diamètre important. L'activation des cellules endothéliales consécutive à la stimulation de TIE2 contrôle l'expression endothéliale d'apéline qui, *via* son récepteur de type APJ couplé aux protéines G, initie les voies de signalisation impliquées dans le contrôle du diamètre vasculaire ;

3) le phénotype quiescent des cellules endothéliales est maintenu par la signalisation intracellulaire continue résultant de l'interaction d'ANG1 avec TIE2. ANG1 induit des associations de plusieurs molécules de TIE2 au niveau des jonctions cellulaires inter-endothéliales et participe à la survie de l'endothélium. Au cours de la transition entre le phénotype quiescent et le phénotype activé, les cellules endothéliales libèrent les stocks intracellulaires d'ANG2 qui, dès lors, inhibent les effets de l'interaction entre l'ANG1 et TIE2 pour conférer aux cellules endothéliales une sensibilité accrue aux cytokines exogènes. Ainsi, la présence ou l'absence d'ANG2 contribue à la plasticité adaptative de l'endothélium vasculaire.

Au cours de l'inflammation, ANG2 pourrait augmenter indirectement l'expression de molécules d'adhésion comme ICAM1 et VCAM1 et ainsi l'adhésion ferme et la migration transendothéliale. Au cours du développement tumoral, le système ANG-Tie pourrait jouer un rôle initial dans la survie des cellules endothéliales et induire une régression vasculaire mais également participer à l'angiogenèse exagérée au cours des stades tardifs (Augustin *et al.*, 2009).

1.3.1.4 Rôles pathologiques du système ANG-Tie

Le système ANG-Tie est un régulateur fin du phénotype quiescent des cellules endothéliales. De ce fait, il peut être impliqué dans des processus pathologiques qui impliquent la paroi vasculaire, s'échelonnant du processus adaptatif à court terme, comme l'inflammation, à des phénomènes vasculaires prolongés comme l'angiogenèse tumorale.

1.3.1.4.1 Système ANG-Tie et l'inflammation

Le recrutement des leucocytes inflammatoires à travers l'endothélium des veinules post-capillaires implique une succession d'événements. Il débute par le roulement des cellules inflammatoires le long de l'endothélium et leur interaction avec celui-ci contrôlée par les sélectines ; intervient alors la chimioattraction des leucocytes dépendante des chimiokines et enfin l'adhésion ferme des cellules inflammatoires résultant de l'activité des molécules de la superfamille des intégrines et des immunoglobulines.

Les souris déficientes pour l'ANG2 présentent une réponse inflammatoire altérée et une incapacité à augmenter l'expression des molécules d'adhésion en réponse au TNF α (pro-inflammatoire). ANG2 inhibe l'interaction ANG1-TIE2, et contrôle l'adhésion ferme des leucocytes et leur migration transendothéliale. En réalité, l'ANG2 seule n'a pas d'effet sur le programme inflammatoire des cellules endothéliales, mais potentialise les effets du TNF α sur la transcription des gènes induits par les cytokines pro-inflammatoires, comme les molécules d'adhésion ICAM1 et VCAM1 (cf. figure 1.7).

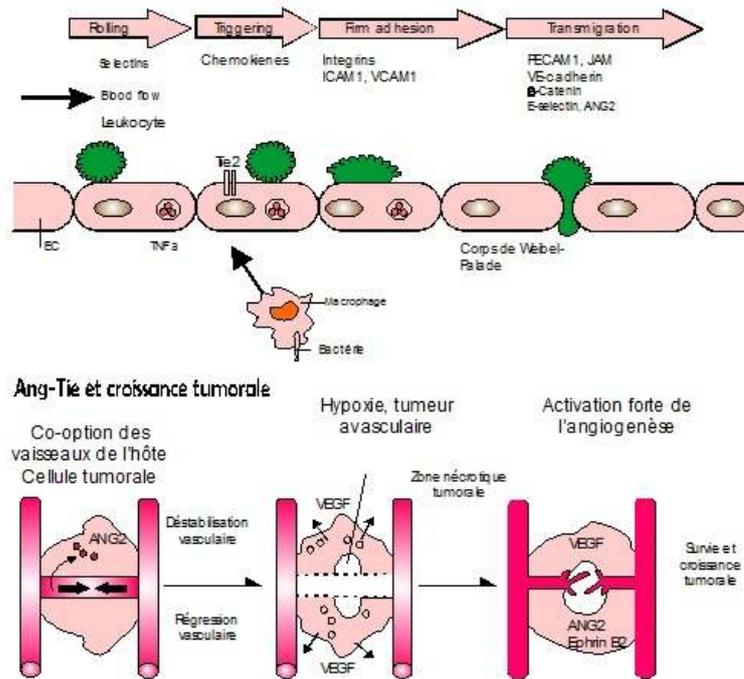


Figure 1.7 : Les effets du système ANG-TIE au cours de l'adaptation vasculaire pathologique. Adapté d'après Augustin *et al.*, 2009. Au cours de l'inflammation, ANG2 pourrait augmenter indirectement l'expression de molécules d'adhésion comme ICAM1 et VCAM1 et ainsi l'adhésion ferme et la migration transendothéliale. Au cours du développement tumoral, le système ANG-Tie pourrait jouer un rôle initial dans la survie des cellules endothéliales et induire une régression vasculaire mais également participer à l'angiogenèse exagérée au cours des stades tardifs (Augustin *et al.*, 2009). ANG: angiopoietin, ICAM: intracellular adhesion molecule, VCAM : vascular-cell adhesion molecule, VEGF: vascular endothelial growth factor.

1.3.1.4.2 Système ANG-TIE et l'angiogenèse tumorale

Le système ANG-TIE exerce un rôle crucial au cours des premières étapes de la vascularisation tumorale. Parmi celles-ci, la tumeur détourne à son profit le réseau vasculaire du tissu hôte. Cela aboutit à l'activation des cellules endothéliales et à une expression marquée d'ANG2 (Carmeliet et Jain, 2000). En retour, l'ANG2 induit la mort cellulaire des cellules endothéliales et la régression du réseau capillaire détourné. Il en résulte une phase avasculaire et une profonde hypoxie locale à l'origine de l'activation de l'expression de VEGF

et du déclenchement d'une angiogenèse massive de la zone péri-tumorale. Après le switch angiogénique, le système ANG-TIE contribue de concert avec le VEGF à l'angiogenèse tumorale (Papetti et Herman 2002) (cf. figure 1.7).

ANG1 est exprimée modérément par les tumeurs et une expression soutenue de TIE2 est observée dans le réseau vasculaire tumoral. La transcription d'ANG2 est augmentée dans l'endothélium des zones tumorales et le niveau d'ANG2 est un biomarqueur important de la progression tumorale dans de nombreux types de tumeurs. La surexpression d'ANG1 dans différents modèles tumoraux induit une réduction variable de la croissance tumorale. Des résultats contradictoires soulignent même que l'ANG1 est stimulatrice de la croissance tumorale, par exemple dans un modèle du gliome chez le rat.

L'ANG1 induit une stimulation de la couverture péricytaire à l'origine d'une normalisation du réseau vasculaire. De même, la normalisation du réseau vasculaire observée après un traitement par des anticorps dirigés contre le VEGF ou les récepteurs du VEGF pourrait être catalysée par l'ANG1. À l'inverse des effets globalement antitumoraux de l'ANG1, la surexpression d'ANG2 par les tumeurs a produit des résultats divers. Le blocage, à des fins thérapeutiques, du système ANG-TIE a été réalisé à partir de l'utilisation de sTIE2. L'ectodomaine de sTIE2 se fixe avec tous les ligands de TIE2 et fonctionne comme un récepteur leurre pour inhiber le système ANG-TIE. Le sTIE2 a été utilisé pour inhiber l'angiogenèse et la croissance tumorale (Holopainen *et al.*, 2009).

De la même manière, le transfert adénoviral d'un fragment d'anticorps dirigé contre la partie intracellulaire de TIE2 diminue l'expression de TIE2 et inhibe la croissance tumorale et l'angiogenèse. D'autres approches pour inhiber la signalisation associée à l'ANG2 incluent

l'utilisation d'anticorps neutralisants dirigés contre la protéine ou de petites molécules qui inhibent l'activité kinase de TIE2 (Fumoleau *et al.*, 2007).

1.4 Problématique et objectifs

1.4.1 Problématique

La plupart des malformations veineuses sont sporadiques. Néanmoins, il existe quelques familles où la malformation se transmet sous le mode autosomique dominant. L'étude génétique (par analyses de liaison) de ces familles a permis d'identifier le facteur responsable des MVMC sur le chromosome 9p.

A ce jour, sept mutations faux-sens du récepteur (Soblet *et al.*, 2013), 2545 C>T dans l'exon 15, 2690 A>G, 2744 G>A, 2752C>T, 2755 G>T et 2773G>T dans l'exon 17, et 3300 G>C dans l'exon 22, ont été identifiées chez des patients Belges présentant des malformations veineuses à transmission dominante (cf. figure 1.8). Elles aboutiraient à un excès de signalisation de l'angiopoïétine 1, ligand du récepteur TIE2, responsable d'une prolifération anormale des cellules endothéliales.

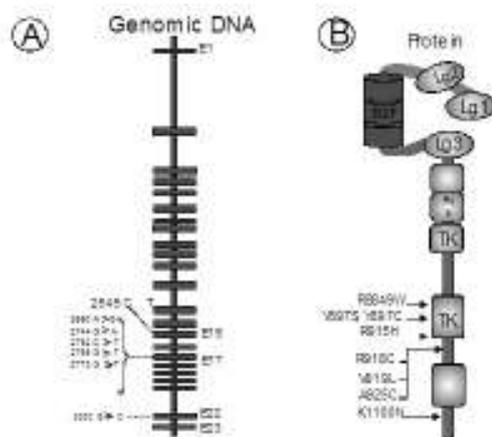


Figure 1.8 : Mutations impliquées dans la forme dominante des malformations veineuses.

Adapté d'après Wouters *et al.*, 2010. A) Structure génomique de TIE2 composée de 23 exons et les changements de bases dans la séquence du gène TIE2. B) représentation schématique de la séquence protéique TIE2 et les changements d'acides aminés dû aux mutations responsables des MVMC.

1.4.2 Objectifs

Objectif principal

Recherche de mutation(s) germinales, du gène *TEK* qui pourraient être impliquée(s) dans l'étiopathologie des malformations veineuses, parmi les mutations déjà décrites dans les trois exons 15, 17 et 22 (cf. figure 1.8) chez des patients avec MV, dans la région de Tlemcen.

Objectifs secondaires

1. Étendre la recherche de néo-mutations aux autres exons du gène *TEK*, pour cela, un séquençage direct de tous les exons, ainsi que de leurs séquences flanquantes introniques en 3' et 5', a été réalisé ;
2. Rechercher des mutations somatiques dans des biopsies de tissus de MV prélevés chez les patients de la région de Tlemcen.

CHAPITRE 2

Article. *TEK* Gene and VM in North-Western Region of Algeria

2.1 Patients et méthodes	51
2.2 Résultats et interprétation	63
2.3 Discussion	68
2.4 Conclusion	70

Cette partie à fait l'objet d'une Publication Internationale auprès d'un Journal avec Comité de lecture spécialisé, *Genetics Research International*

Hindawi Publishing Corporation
Genetics Research International
Volume 2013, Article ID 784789, 7 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2013/784789>



Research Article

Lack of *TEK* Gene Mutation in Patients with Cutaneomucosal Venous Malformations from the North-Western Region of Algeria

Nabila Brahami,¹ Mourad Aribi,¹ Badr-Eddine Sari,^{1,2} Philippe Khau Van Kien,³ Isabelle Touitou,^{4,5,6} Gérard Lefranc,⁷ and Mouna Barat-Houari⁴

¹ Laboratory of Applied Molecular Biology and Immunology, University of Tlemcen, 13000 Tlemcen, Algeria

² Service de Stomatologie et de Chirurgie Buccale du Centre Hospitalier et Universitaire de Tlemcen, 13000 Tlemcen, Algeria

³ Génétique Médicale, Laboratoire de Cytologie Clinique et Cytogénétique, CHU de Nîmes, Place du Professeur Robert Debré, 30029 Nîmes Cedex 9, France

⁴ Unité Médicale des Maladies Auto-Inflammatoires, Département de Génétique, CHRU, Montpellier, 34091 Montpellier Cedex 2, France

⁵ Université Montpellier I, 34091 Montpellier Cedex 2, France

⁶ Génétique des Maladies Auto-Inflammatoires et des Ostéo-Arthropathies Chroniques, INSERM U844, 34091 Montpellier Cedex 5, France

⁷ Laboratoire d'Immunogénétique Moléculaire, Institut de Génétique Humaine, CNRS UPR 1142, et Université Montpellier 2, 34095 Montpellier Cedex 5, France

Correspondence should be addressed to Mourad Aribi; m_aribi@mail.univ-tlemcen.dz

Received 2 August 2013; Accepted 21 October 2013

Academic Editor: Biaoru Li

Copyright © 2013 Nabila Brahami et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background. Venous malformations (VM) result from an error in vascular morphogenesis. The first gene suspected in their development is the *TEK* gene (tyrosine kinase, endothelial). Mutations of this gene have been identified in several Belgian families with a dominant form of the disease. Therefore, we investigated whether mutations in this *TEK* gene could explain the MV development in patients of families from Tlemcen region (north-western Algeria). **Methods.** Genomic DNA was extracted from leucocytes of ten patients. The search for mutations in all the 23 exons and in the 5' and 3' intronic sequences flanking the *TEK* gene was performed using PCR amplification and direct sequencing of amplified genomic DNA. Additionally, a search for somatic mutations of the gene *TEK* was performed on a biopsy of the venous malformation from one of the ten eligible patients. **Results.** The sequencing of the 23 exons of the *TEK* gene revealed neither germinal mutation in our ten patients nor somatic mutation in the tissue of the biopsy. **Conclusion.** The absence of mutation in the *TEK* gene in the population studied suggests that the *TEK* gene is not necessarily involved in the onset of VM; its association with these malformations may differ from one population to another.

Bureau Editorial

gri@hindawi.com

Hindawi Publishing Corporation, 410 Park Avenue, 15th Floor, #287 pmb. New York, NY 10022. USA.

Editeur-en-chef Biaoru Li, USA

Abstracting and indexing

<http://www.hindawi.com/journals/gri/ai/>

1. Academic Search Alumni Edition
2. Academic Search Complete
3. Airiti Library
4. Chemical Abstracts Service (CAS)
5. CNKI Scholar
6. Directory of Open Access Journals
7. EBSCO Discovery Service
8. EBSCOhost Connection

9. EMBASE
10. Expanded Academic Index
11. Google Scholar
12. Health Reference Center Academic
13. HINARI Access to Research in Health Programme
14. Info Trac Custom journals
15. PubMed
16. PubMed Central

CHAPITRE 2

Article. *TEK* Gene and VM in North-Western Region of Algeria

2.1 Patients et méthodes

2.1.1 Recrutement des patients

Après signature d'un consentement éclairé par chaque participant (ou par les parents lorsque le participant était un enfant mineur) conformément aux déclarations d'Helsinki (*British Medical Journal*) (cf. annexe B). Un questionnaire a été rempli, pour chaque patient comprenant les informations des examens cliniques et des antécédents familiaux (cf. annexe A).

Pour cette étude, douze familles ayant un membre présentant une malformation veineuse ; (cf. figure 2.1) ont été recrutées, entre 2009 et 2013, au service de Stomatologie et de chirurgie buccale du centre hospitalo-universitaire de Tlemcen (Ouest algérien). Cinquante-deux prélèvements de sang total ont été réalisés sur EDTA.

Le recrutement des patients a été réalisé sur la base d'un examen clinique identifiant les malformations veineuses, On les reconnaît facilement devant une masse bleutée, molle et dépressible, augmentant de volume en déclive ou proclive, non battante, non soufflante (Enjolras, 1996 ; Enjolras, 1991). Les critères d'inclusion sont la localité géographique (Algérie Nord-Ouest), la localisation strictement labiale de la malformation, sa nature veineuse et l'âge des patients adolescents et jeunes adultes. Les critères d'exclusion sont les malformations artério-veineuses.

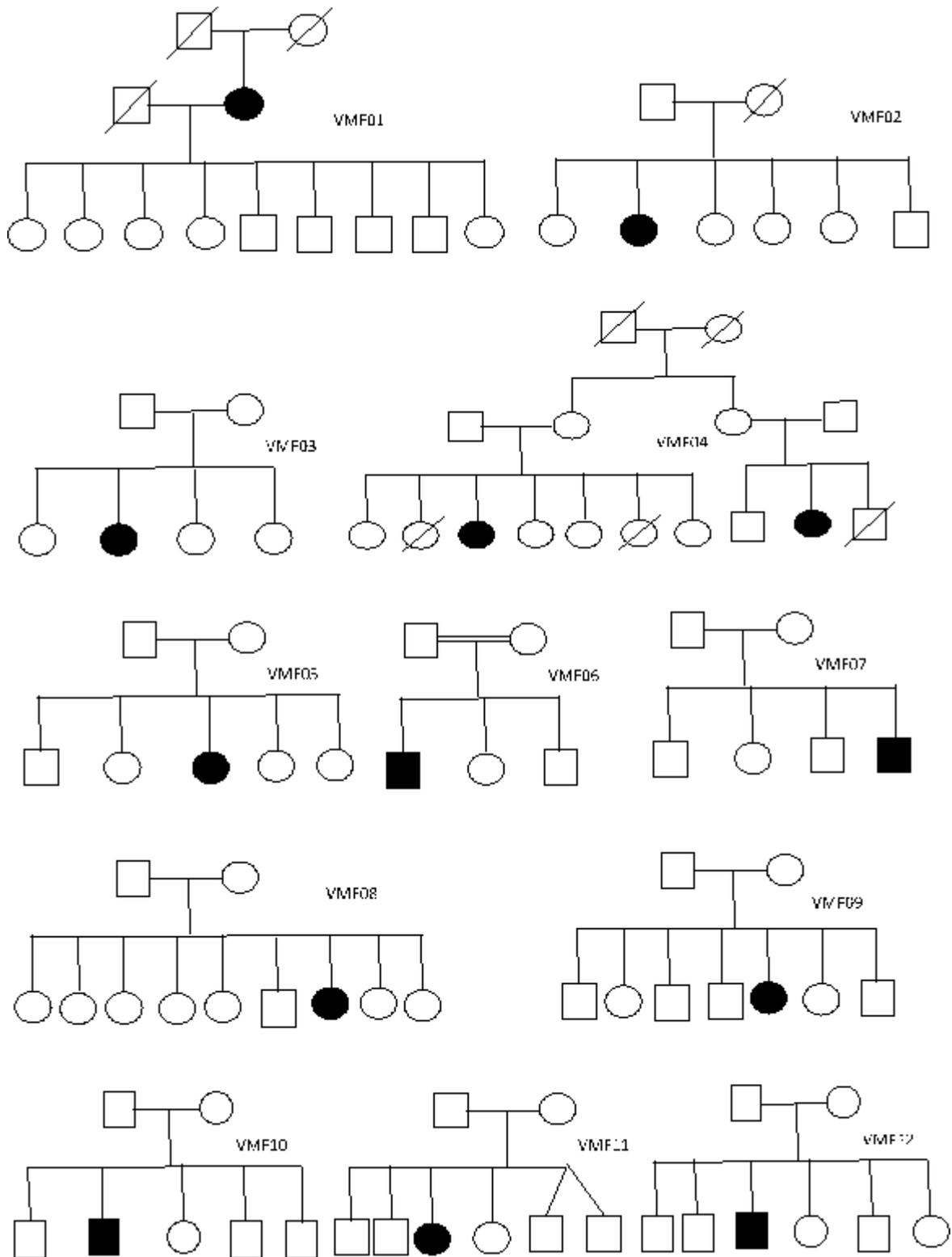


Figure 2.1 : Généalogies des douze familles Algériennes analysées pour le gène *TEK*. Dans cette figure deux nouvelles familles ont été incluses. VMF : venous malformation family.

2.1.2Analyse de biopsies

2.1.2.1 Examen anatomopathologique

L'examen anatomopathologique complémentaire au diagnostic clinique s'est fait sur des coupes histologiques des pièces opératoires colorées à l'hématoxylin-éosine (HE).

2.1.2.2Extraction d'ADN à partir de biopsies

Des tissus de MV ont été prélevés chez les patients des familles 3,11 et 12 et placés immédiatement dans de l'azote liquide. L'extraction d'ADN a été réalisée, à partir de tissus congelés, grâce au *kitDNeasy Blood and Tissue* selon les recommandations du fabricant(Qiagen, Hilden, Germany).

2.1.3. Analyse de l'ADN génomique

Pour tous les échantillons, l'ADN génomique est extrait grâce à un midi kit Qiagen, à partir de sang total, selon les recommandations du fabricant (Qiagen, Hilden, Germany). La concentration de l'ADN est ensuite mesurée par un spectrophotomètre ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE).

La recherche de mutations dans l'ensemble des 23 exons, ainsi que dans leurs séquences introniques flanquantes (5' et 3') du gène *TEK* a été réalisée par amplification PCR suivi d'un séquençage direct des segments d'ADN amplifiés, au Laboratoire des Maladies Autoinflammatoires (Montpellier, France).

2.1.3.1 Choix des amorces

Les amorces sont de courtes séquences oligonucléotidiques d'ADN monocaténaire, utilisées lors des PCR pour borner l'amplicon. Elles sont spécifiques de la séquence à amplifier, stables et compatibles entre elles.

La conception d'amorces est l'étape la plus cruciale. Avant d'entamer la PCR, il faut bien définir ces amorces selon les critères suivants :

- Spécificité
 - Taille : 15 à 30 nt
 - Contenu en GC : 40 à 60 %
 - Séquence spécifique à la zone d'intérêt et site unique d'hybridation
 - T_m (*melting temperature*) comprise entre 45 et 70°C
- Stabilité
 - Faible formation de dimères et de structures secondaires
 - Extrémité 3' : présence de quelques bases GC en 3' (point de départ de la polymérisation), même chose pour l'extrémité 5' (fixation de l'amorce)
- Compatibilité
 - Différence des T_m des deux amorces inférieure à 4°C.

2.1.3.2 Le logiciel Primer3

Primer3 est un programme largement utilisé pour la conception des amorces PCR, qui est un outil essentiel et omniprésent dans la génétique et la biologie moléculaire (Rozen et Skaletsky, 2000). Primer3 peut également concevoir des sondes d'hybridation et des amorces de séquençage.

Les séquences des amorces, lors de cette étude, ont été spécifiquement conçues pour amplifier chaque exon (cf. tableau 2.1), en utilisant Primer3 version 0.4.0 (Rozen et Skaletsky, 2000) en faisant référence à la séquence du gène *TEK* (ENSG00000120156) publié dans Ensembl (Hubbard *et al.*, 2002).

Tableau 2.1 : Séquences des amorces de l'ensemble des exons du gène *TEK*.

Exon	Amorce sens (5'-3')	Amorce antisens (5'-3')	Produits PCR
Exon1.1	AGTCTGAGAAGGATTGGTCATCA	CTGTCTGAGCACAGGGAGTTT	333 pb
Exon1.2	CAGCCCTGCTGATACCAAAT	CACTGATGAGATTTGGGGAGA	409 pb
Exon2	GTTTACCCAATGGGGTCATG	AGCAGCTGCCAAGACAAAAG	448 pb
Exon3	AACGCATTAGCCACCACTGT	ACATCTGCCACAAGACCA	360 pb
Exon4	CTGAATAGTTCAGCATTTCATTCT	CAATGCCTGGTTTTTGCTTA	422 pb
Exon5	CTCCTTGTCTTTGTTTCTGTCTG	AAATTCTAGATCCAGCAACGATG	399 pb
Exon6	GTTTACCTACCATGCCACA	TGATTCAAATCCTGTTGTCCA	413 pb
Exon7	AGTTGGCATGATAGGAGCTCA	GGATGGAAACAAAAGAGGCTT	453 pb
Exon8	TCATCCACATCACAGGTGTCT	GTCAGTTCTGCCTCTCCAGG	469 pb
Exon9	TGGGGTCAATGTTATGGACC	TCCTGGAAATTACCCCAAAG	335 pb
Exon10	ATCACAAAACCTCAAAGCCG	AGCCACCACCTTGAGGTAGA	331 pb
Exon11	TTTCAAAGCCTAATTTTCTCA	CACCCATTCAAAGCGAACT	462 pb
Exon12.1	AGTTGGCATGATAGGAGCTCA	GGATGGAAACAAAAGAGGCTT	453 pb
Exon12.2	TGGGGTCAATGTTATGGACC	TCCTGGAAATTACCCCAAAG	335 pb
Exon13	GCATAATGATCTAGGCCATGG	CCTATAGGGCTGCACGGTAA	413 pb
Exon14	GCTGCTGTAAAGTTCCATTACA	AAGCCAAAGAGAAGATGAGGC	397pb
Exon15	GTTTACCTACCATGCCACA	TGATTCAAATCCTGTTGTCCA	413 pb
Exon16	TTTGGTTGTATACAGTTGATGGTGA	AGGCAAACCACAGCACAGTC	404 pb
Exon17	GTTTACCCAATGGGGTCATG	AGCAGCTGCCAAGACAAAAG	448 pb
Exon18	TCTTCTGCCAAGATGTGGTG	CAGGGGAGTACCTCGGAAA	358 pb
Exon19	CTACCCAGCAATCATTTGTGG	TGCTAATTTATTTCTGAGCTTTTT	310 pb
Exon20	GTGCAAGGGCCTATCCTAGG	CCAAGTCACATCTGGTAGAACCA	304 pb
Exon21	ATGTGCAGTGAGTTTGCCAA	CGGCTGACTTTGCTAGAGTC	338 pb
Exon22	GTTTACCCAATGGGGTCATG	AGCAGCTGCCAAGACAAAAG	448 pb
Exon23.1	AGGTGGAATCAAAGCAGCCT	CACGCCTTCTATGAAGTCC	414 pb
Exon23.2	AATCAGAATGCCTGTTTGTGG	TTCTTAGGCTTGTAAGCAATGAG	452 pb
3'UTR	TCTCAATTTTATCCCTCACCTG	TAAAGTATAATAAGGACATGTGGCA	472 pb

pb: paire de base. *3'UTR*: 3' untranslated region.

2.1.4 Amplification de l'ADN *in vitro* par PCR

2.1.4.1 Principe de la PCR

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) a été mise au point par K. Mullis en 1987 (Mullis et Faloona, 1987). Elle permet d'amplifier *in vitro* de l'ADN, en tirant partie du mode de synthèse de l'ADN *in vivo* : chacun des deux brins de l'ADN sert de matrice pour la synthèse du brin complémentaire. Deux oligonucleotides de synthèse, complémentaires des extrémités 3' du fragment à amplifier, sont utilisés ; comme amorces pour la réplication de l'ADN. La quantité de la séquence recherchée est ainsi multipliée de façon exponentielle (cf. figure 2.2), puisque chaque brin nouvellement synthétisé par la polymérase peut servir de matrice dans le cycle d'amplification suivant.

La PCR est une réaction cyclique, chaque cycle étant subdivisé en 3 phases :

- une phase de dénaturation de l'ADN double brin par la chaleur (92°C – 95° C) ;
- une phase d'hybridation avec les deux amorces spécifiques entre 55°C et 60°C ;
- une phase d'extension par l'ADN polymérase à partir des amorces entre 70°C et 72°C.

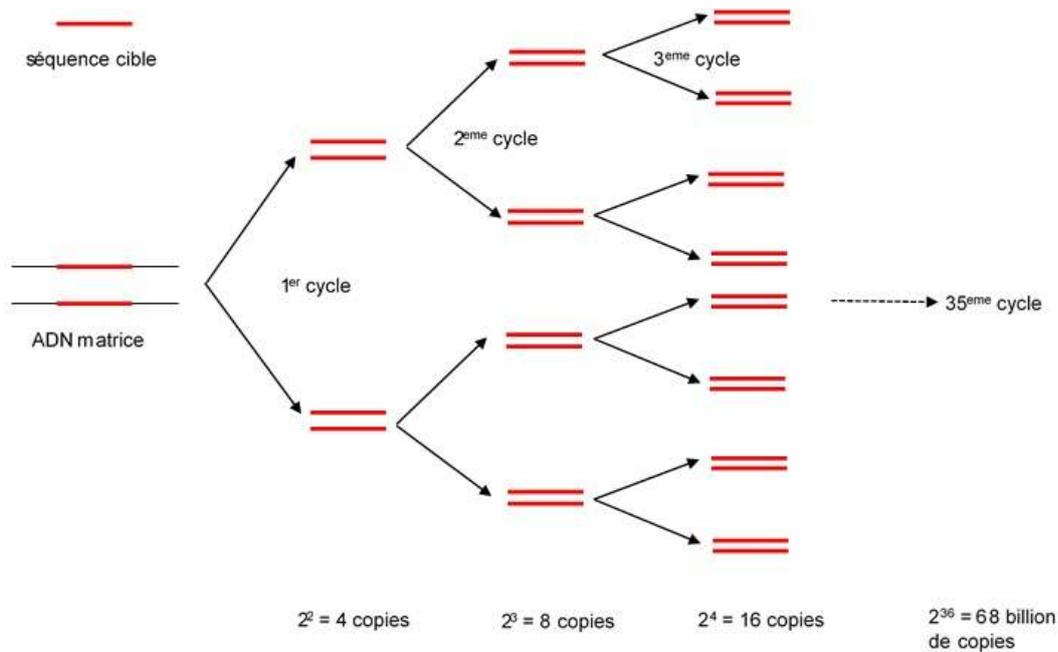


Figure 2.2 : Principe expérimental de la réaction de polymérisation en chaîne.

2.1.4.2 Mode opératoire

Nous avons réalisé, pour l'ensemble de notre étude, de nombreux tests d'amplifications des ADN, afin de déterminer les conditions d'amplification optimales, en particulier la température d'hybridation des amorces, le nombre de cycles, la concentration de certains réactifs de PCR.

L'ADN a été amplifié dans un thermocycleur (Applied Biosystems, Foster City, CA) par PCR utilisant les amorces décrites précédemment. Le milieu réactionnel de l'amplification est composé de 50ng d'ADN, 25 μ M de chaque Amorce, et 2X Master Mix (Promega). Les conditions de PCR sont : 5 minutes à 95°C, puis 35 cycles chacun comprenant une dénaturation à 95°C pendant 30 secondes, une hybridation des amorces à 60°C pendant 30 secondes et une élongation à 72°C, suivies par un cycle à 72°C pendant 10 minutes.

2.1.5 Séquençage des produits d'amplification

2.1.5.1 Principe du séquençage

Le séquençage de l'ADN, est la détermination de la séquence des nucléotides, plus exactement des bases ATGC, le constituant. C'est aujourd'hui une technique de routine pour les laboratoires de biologie. La réaction de séquence que l'on utilise au laboratoire repose sur la méthode de SANGER ou méthode des interrupteurs de chaîne (Sanger *et al.*, 1977), adaptée à la fluorescence. Son principe repose sur l'incorporation aléatoire, par une ADN polymérase thermorésistante, de didéoxynucléotides (ddNTP) interrupteurs de chaîne, en plus des déoxynucléotides (dNTP) présents également dans le milieu réactionnel.

Les ddNTP diffèrent des dNTP par l'absence d'un groupement OH en position 3'. En effet, lorsqu'une ADN polymérase utilise un ddNTP au lieu d'un dNTP, cette modification empêche la formation de la liaison phosphodiester entre le ddNTP incorporé dans la chaîne et le nucléotide suivant. L'allongement de la chaîne est alors interrompu.

Une migration électrophorétique du produit de cette réaction de séquence sur un gel très résolutif (polyacrylamide) va séparer tous les fragments présents en fonction de leur masse moléculaire (taille). Les plus petits fragments vont migrer plus rapidement que les grands. La grande résolution de ce gel permet de distinguer des fragments différents entre eux d'une seule paire de bases. L'identification du ddNTP présent à l'extrémité 3' de chaque fragment déterminera la séquence nucléotidique du brin matrice initial (cf. figure 2.3).

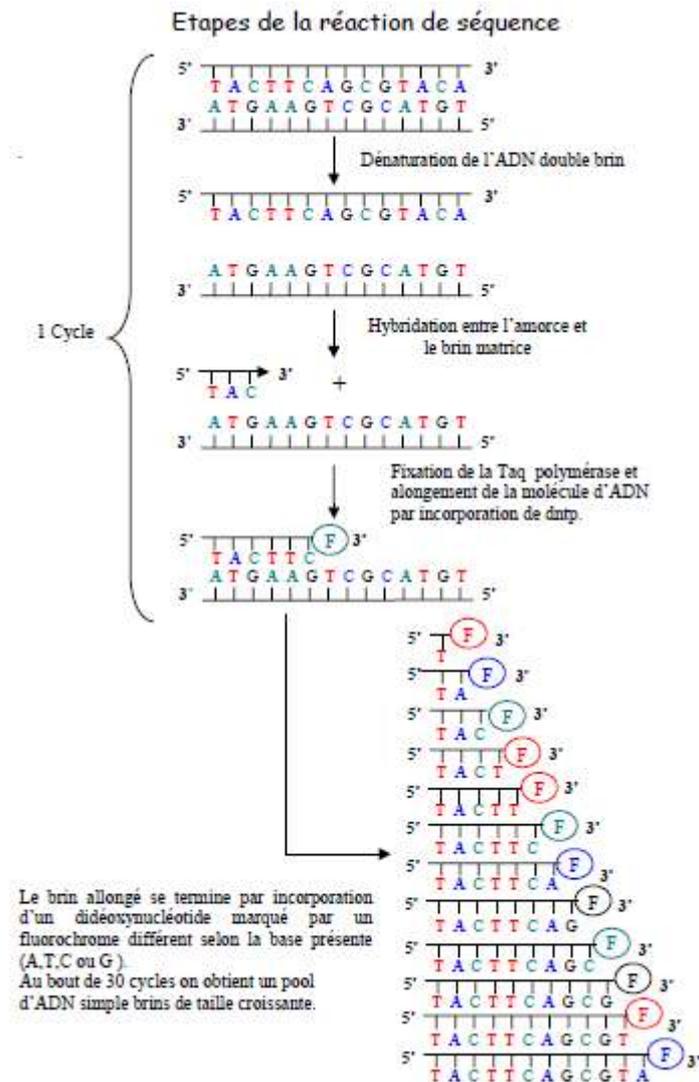


Figure 2.3 : Étapes de la réaction de séquence.

dntp : déoxynucléotide

Actuellement, des séquenceurs automatiques sont capables de réaliser les réactions de séquence puis de les lire. Une fois la réaction de séquence terminée, la taille des fragments obtenus est déterminée par une chromatographie. Le séquenceur détecte la fluorescence sortant des colonnes de chromatographie, repérant ainsi les fragments d'ADN et leur taille précise, grâce à l'incorporation des 4 ddNTP marqués par un fluorophore différent à la même réaction de séquence. Les systèmes les plus modernes permettent même de lire les quatre nucléotides à partir d'une seule colonne de chromatographie. Le résultat est présenté par la

machine sous forme de courbes présentant la fluorescence détectée, et l'interprétation qui en est faite en termes de nucléotides.

Les séquenceurs permettent de lire plusieurs centaines de nucléotides avec une très bonne qualité jusqu'à 1000 pour les appareils les plus performants.

2.1.5.2 Mode opératoire

Après vérification des produits d'amplification dans un gel d'agarose à 1,5%, la réaction de séquence est réalisée comprenant 30 cycles d'amplification sur le thermocycleur (cf. figure 2.3). Un cycle correspond à :

- Une étape de dénaturation de l'ADN à 96°C pendant 10 secondes pour obtenir l'ADN sous forme simple brin.
- Une étape d'hybridation à 50°C pendant 5 secondes (température moyenne d'hybridation pour la majorité des amorces utilisées). Elle va permettre la fixation de l'amorce spécifique sur l'ADN matrice monobrin. Cette amorce va permettre l'initiation de l'élongation par la Taq polymérase.
- Une étape d'élongation de l'ADN par la Taq polymérase à 60°C pendant 4 minutes. Cette température faible ralentit la Taq et va déplacer l'équilibre pour permettre une meilleure incorporation des ddNTP. La plupart du temps, l'élongation se termine par incorporation d'un ddNTP. Il arrive cependant qu'elle se termine par l'incorporation d'un dNTP. Dans ce cas, l'absence de fluorochromes sur les dNTP permet de ne pas visualiser ces faux stop.

Le milieu réactionnel de l'amplification de séquence est composé de 1µl d'ADN du précipité PCR, 0.5pmol de l'une des amorces (*Forward ou reverse*), 2 µl de BDT version 3.1 *Big Dye*

Terminator 10X de tampon, ces deux derniers sont fournis par le kit « *Cycle Sequencing Ready Reaction kit* » (Applied Biosystems : ABI/ Perkin Elmer) dans un volume final de 10 µl.

Une fois l'étape de thermocyclage effectuée, il est nécessaire de purifier la réaction de séquence, afin d'éliminer les fluorochromes en excès. Plusieurs techniques sont possibles comme la précipitation (Acétate de sodium / Alcool). Nous avons utilisé la chromatographie d'exclusion par Sephadex G50 qui va permettre le piégeage de particules de bas poids moléculaire sur une colonne Sephadex G50 constituée de billes perforées dont les trous ont un diamètre déterminé.

La réaction de séquence est purifiée par chromatographie pour piéger les ddNTP libres, en excès. En effet, ces ddNTP libres non incorporés lors de la réaction pourraient parasiter les signaux de fluorescence spécifiques. Les sels éventuellement présents sont piégés de la même manière que les ddNTP.

La séquence nucléotidique de chaque exon du gène *TEK* est ensuite déterminée grâce à une électrophorèse capillaire en conditions dénaturantes qui va séparer les produits de la réaction de séquence purifiée. L'enregistrement et l'analyse spectrale de la fluorescence spécifique du ddNTP permettra alors d'assigner la base correspondante et de déterminer la séquence nucléotidique du brin matrice. Ces différentes étapes de séparation et d'analyse sont réalisées sur l'Analyseur Génétique ABI3100 (Applied Biosystem).

2.1.5.2 Analyse Bioinformatique

Les séquences nucléotidiques des 23 exons ainsi que leurs régions flanquantes, ont été comparées avec la séquence nucléotidique du gène *TEK* publié dans Ensembl (Hubbard *et al.*, 2002), en utilisant le logiciel SeqScape v2.5 (ABI).

2.2 Résultats et interprétation

2.2.1 Phénotype des patients

Le tableau 2.2 montre les informations cliniques de treize patients ayant une malformation veineuse, parmi eux onze portent la MV au niveau labial, un patient à une MV au niveau lingual et un patient porte une MV siégeant au niveau de la joue (un des treize patient n'est pas inclus dans l'analyse moléculaire). Neufs sujets sont de sexe féminin ; une des douze familles (VMF04) comporte deux patientes ayant une malformation veineuse (cf. figure 2.1).

Tableau 2.2 : Description des patients avec malformations veineuses

Famille	Symbole du patient	Genre	Nombre de lésions	Localisation de la lésion	Autres patients dans la famille
VMF01	VMF01.II.2	F	1	Labiale	Non
VMF02	VMF02.II.2	F	1	Labiale	Non
VMF03	VMF03.II.2	F	1	Labiale	Non
VMF04	VMF04.III.3	F	1	Labiale	Oui
VMF04	VMF04.III.9	F	1	Labiale	Oui
VMF05	VMF05.II.3	F	1	Labiale	Non
VMF06	VMF06.II.1	M	1	Labiale	Non
VMF07	VMF07.II.4	M	1	Lingual	Non
VMF08	VMF08.II.7	F	1	Labiale	Non
VMF09	VMF09.II.5	F	1	Labiale	Non
VMF10	VMF10.II.2	M	1	Labiale	Non
VMF11	VMF11.II.3	F	1	Labiale	Non
VMF12	VMF12.II.3	M	1	Temporo-masseterine	Non

M : sexe masculin, F : sexe féminin, VMF: venous malformation family.

2.2.2 Résultats de l'examen anatomopathologique

Pour chaque patient un examen d'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) a été réalisé, tel que celui montré dans la figure 2.4. La figure 2.5 montre, quant à elle, le prélèvement d'une biopsie de malformation veineuse.

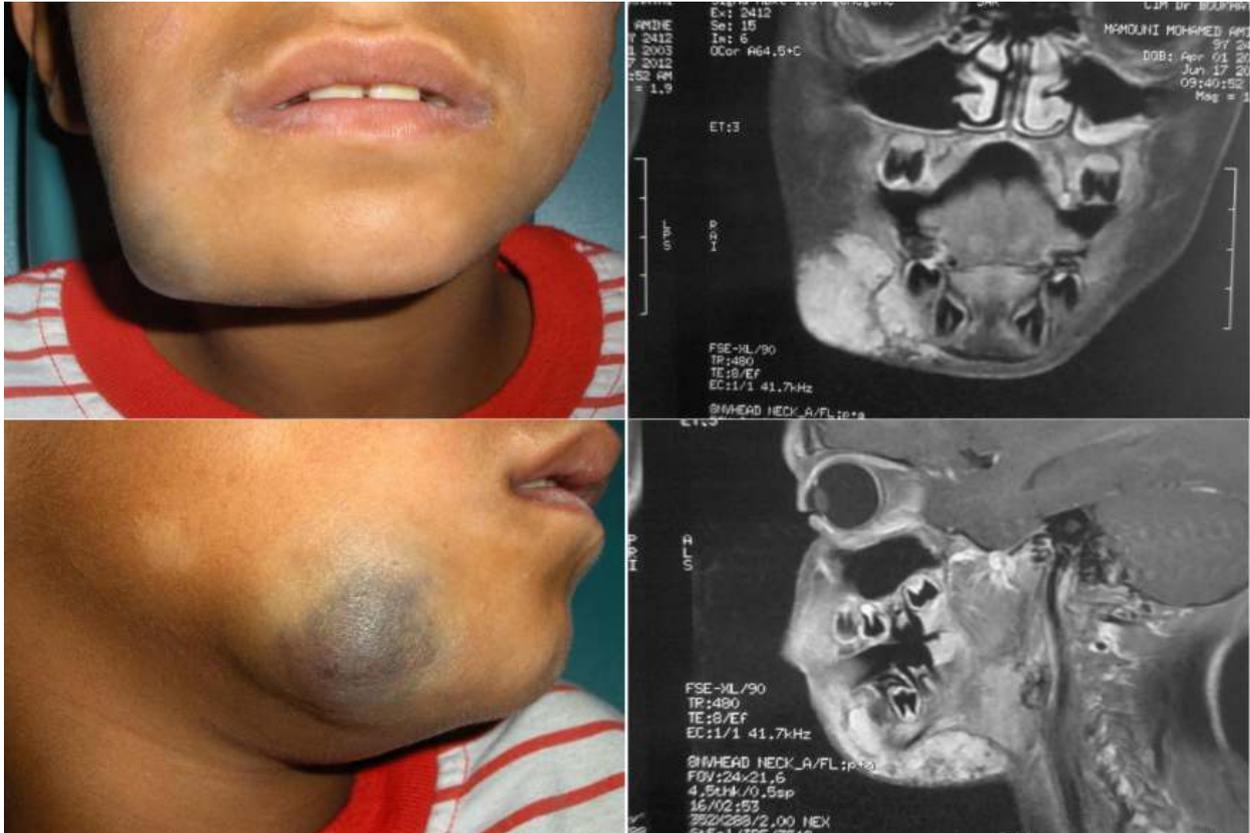


Figure 2.4 : Imagerie par Résonance Magnétique d'une malformation veineuse superficielle.



Figure 2.5 : Aspect de la malformation veineuse en position proclive, et fragment d'une pièce opératoire.

2.2.3 Résultats des tests d'amplification *in vitro*

De très bons résultats d'amplification ont été obtenus pour l'ensemble des 27 couples d'amorces comme le montre la figure 2.6 témoignant d'une bonne conception d'amorces, sans bandes aspécifiques, et d'une bonne optimisation des conditions de PCR. La figure 2.6 montre le résultat d'amplification de l'exon 17 dans un gel d'agarose à 1,5 %.



Figure 2.6 : Migration de fragments amplifiés de l'exon 17, sur gel d'agarose à 1,5%. Pour l'ADN génomique de 10 patients pour les puits de 1 à 10 et pour l'ADN de la biopsie pour le puits 11. SM correspond au marqueur de taille.

2.2.4 Résultats de l'analyse bio-informatique

Après séquençage direct des produits d'amplifications spécifiques à chaque patient pour l'ensemble des 23 exons du gène *TEK*, les résultats obtenus ont été comparés à la séquence de référence du gène *TEK* (Hubbard *et al.*, 2002) grâce au logiciel SeqScape v2.5 (ABI). Tous

les changements de nucléotides constatés ont été soumis aux bases de données dbSNP et dbEST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/> et <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/>) pour savoir s'il s'agissait de polymorphismes déjà répertoriés.

Aucune mutation significative n'a été trouvée chez aucun patient comme le montre la figure 2.7 qui représente une partie de la séquence de l'exon 15 pour 6 patients ayant une MV ; le codon 849 est mis en évidence pour montrer l'absence de la mutation c.2545 C>T, p.Arg 849Trp CGG>TGG.

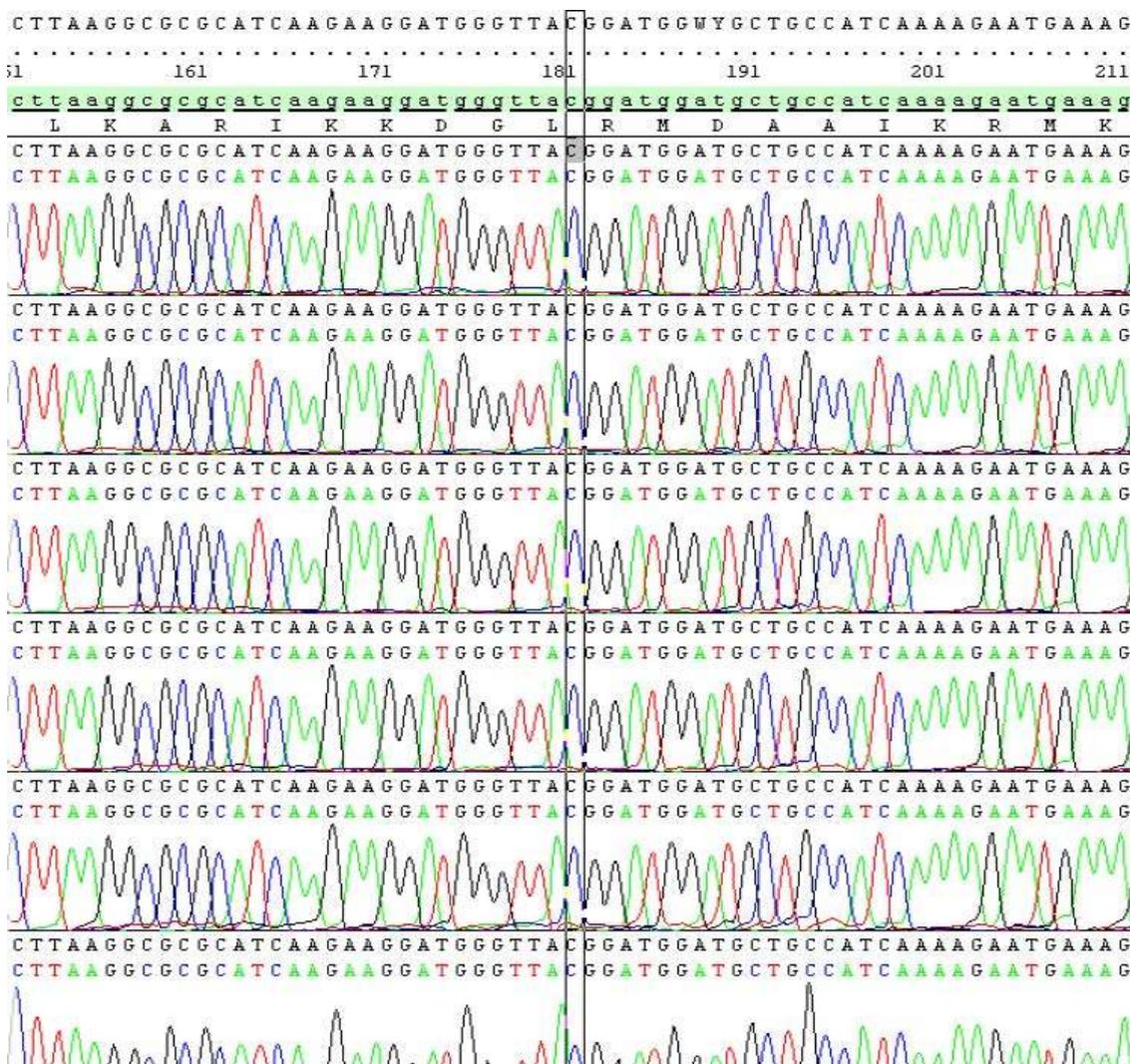


Figure 2.7 : Résultats du séquençage direct d'une partie de l'exon 15, encadrant codon 849, chez 6 patients (les résultats sont identiques pour l'ensemble des 6 patients).

Pour le patient VMF12.II.3, une délétion de deux nucléotides a été trouvée, au niveau de l'intron 15, tant dans l'ADN germlinal que dans l'ADN extrait de la biopsie (cf. figure 2.8).

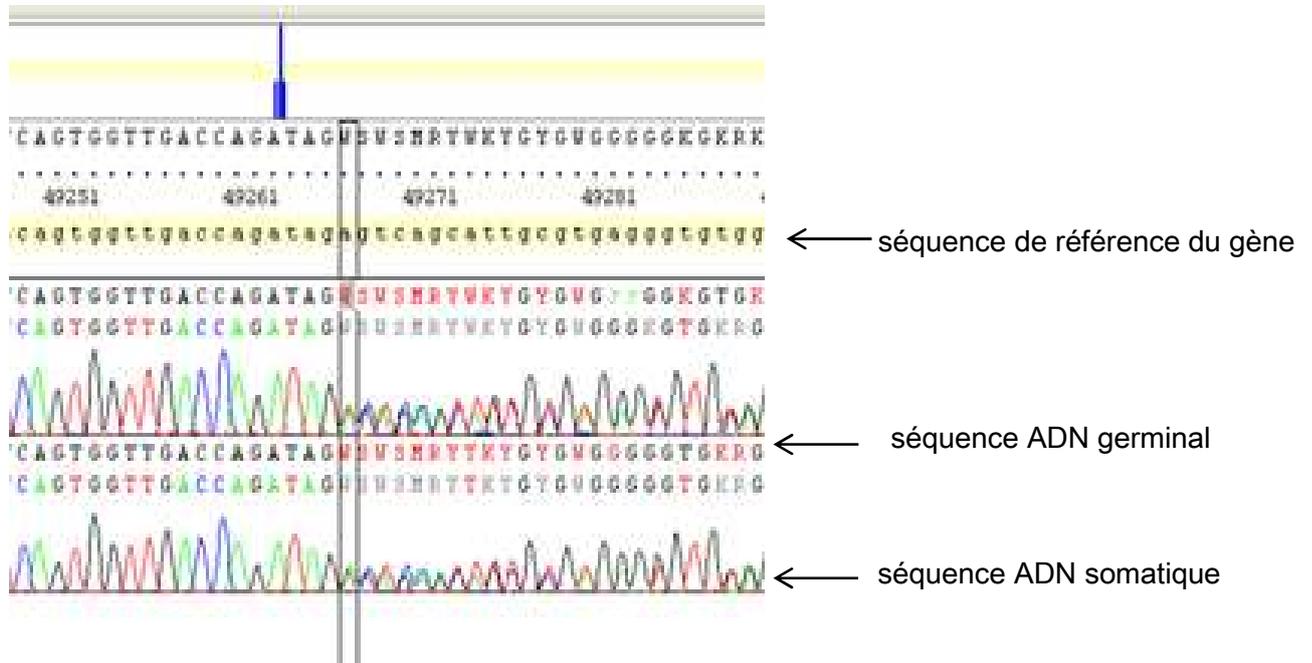


Figure 2.8 : Résultats du séquençage d'une partie de l'intron 15 chez le patient VMF12.II.3. Montrant un décalage dans le cadre de lecture des bases, à partir du nucléotide 49267, dû à une délétion de deux nucléotides CT.

L'analyse des conséquences de cette délétion intronique sur l'épissage de l'exon 15, par le programme « *Splice site analysis* » dans *Human Splicing Finder* version 2.4.1 (Desmet *et al.*, 2009), montre qu'il n'y a pas de création de site cryptique donneur et qu'il n'y a pas non plus de site cryptique accepteur d'épissage d'intérêt. Cette mutation n'a donc probablement pas de répercussion au niveau de l'épissage de cet exon. Nous pouvons donc la classer comme mutation non-pathogène.

2.3 Discussion

Dans cette étude, nous présentons les résultats du séquençage du gène *TEK* chez douze patients non apparentés, originaires de Tlemcen, dans le nord-ouest algérien, présentant des malformations veineuses.

En premier lieu, nous avons recherché les différentes mutations germinales décrites précédemment, à savoir sept mutations faux-sens du récepteur, 2545 C>T dans l'exon 15, 2690 A>G, 2744 G>A, 2752 C>T, 2755 G>T et 2773 G>T dans l'exon 17, et 3300 G>C dans l'exon 22 (Wouters *et al.*, 2010 ; Limaye., 2009 ; Vikkula *et al.*, 1996), chez des patients Belges, présentant des malformations veineuses à transmission dominante. Nous avons élargi ensuite notre analyse à l'ensemble des 23 exons du gène *TEK*.

En raison de l'absence de toute mutation faux-sens et non-sens dans l'ADN germinale de l'ensemble des douze patients analysés, des mutations somatiques ; ont été recherchées au niveau de l'ADN extrait du tissu où siège la malformation veineuse. Ici, encore, aucune mutation n'a été trouvée. Ces résultats nous amènent à faire l'hypothèse d'un autre gène muté ou d'un autre facteur impliqué dans l'apparition de malformations veineuses dans notre population.

Le récepteur Tyrosine kinase TIE2 des cellules endothéliales vasculaires joue un rôle crucial dans le développement angiogénique et cardiovasculaire (Jones *et al.*, 2001 ; Dumont *et al.*, 1992). Ses ligands, les angiotensines, induisent une dimérisation et une phosphorylation du récepteur (Eklund et Olsen, 2006), mais l'ANG-1 et l'ANG-4 activent TIE2, alors que l'ANG-2 et l'ANG-3 semblent fonctionner comme antagonistes spécifiques empêchant la signalisation de TIE2 médiée par l'ANG-1 (Ward et Dumont, 2002).

D'autres mutations dans les gènes des facteurs intervenant dans la voie de signalisation du récepteur TIE2, peuvent être suspectées à l'origine du même phénotype, notamment le gène de la protéine TIE-1 qui peut former des hétérodimères avec TIE2 (Yuan *et al.*, 2007 ; Saharinen *et al.*, 2005), les gènes des ligands ANG (Kim *et al.*, 2006 ; Maisonpierre *et al.*, 1997), ainsi que celui de la protéine tyrosine phosphatase endothéliale vasculaire (VE-PTP), qui régule spécifiquement l'activation du récepteur TIE2 (Dominguez *et al.*, 2007 ; Fachinger *et al.*, 1999).

L'activation du récepteur TIE2 par ANG-1 a été récemment impliquée dans l'expression de l'Apelin, un ligand du récepteur G-protéine, dans les cellules endothéliales. Ce système, qui régule le calibre des vaisseaux sanguins (Kidoya *et al.*, 2008), pourrait être impliqué dans la dilatation des vaisseaux dans les malformations veineuses.

La recherche de mutations dans d'autres gènes candidats (*ANG1*, *ANG2*, *Tie-1*, *VE-PTP* et les gènes *APLM*) dans l'ADN extrait de biopsies de MV est envisagée comme prochaine étape.

Si aucune mutation n'est trouvée, une analyse « *exome sequencing* » ou « *whole genome sequencing* » sera nécessaire pour comparer les séquences obtenues dans l'ADN de biopsies et les séquences de l'ADN germlinal des patients de notre population.

2.4 Conclusions

L'analyse moléculaire des malformations veineuses est importante car celles-ci représentent l'anomalie vasculaire la plus fréquente et restent la pathologie la plus couramment rencontrée dans les cliniques spécialisées.

Les MV entraînent des gênes fonctionnelles et esthétiques et leurs traitements sont invasifs : sclérothérapie et chirurgie. Malgré cela des reliquats de ses MV peuvent apparaitre chez certains patients, d'où l'importance de connaître les mécanismes moléculaires responsables de leur apparition. Nous avons démontré l'absence de mutations dans le gène *TEK* dans l'ADN germlinal des douze patients originaires de l'Ouest Algérien, ainsi que l'absence de mutations somatiques dans trois biopsies.

Cette étude nous a permis d'exclure l'implication du gène *TEK* dans la genèse des MV chez les patients de l'ouest Algérien. Il est important d'explorer d'autres gènes impliqués dans les mécanismes de pathogenèse des malformations vasculaires.

CHAPITRE 3

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CHAPITRE 3

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'absence de mutations germinales et somatiques dans le gène *TEK* dans la population étudiées suggère que ce gène n'est pas impliqué dans l'apparition des malformations veineuses dans notre échantillon de la population de l'Ouest Algérien, et que, probablement, il n'est pas le seul gène impliqué dans la genèse de ces MV.

Il est actuellement clairement établi que l'angiogenèse joue un rôle crucial dans le développement embryonnaire et l'apparition de diverses maladies. C'est la raison pour laquelle un nombre croissant de facteurs angiogéniques et/ou antiangiogéniques ont été identifiés et deviennent d'excellents candidats pour déterminer les causes et étudier les mécanismes étiopathogéniques des anomalies vasculaires.

La recherche de mutations dans d'autres gènes candidats (*ANG1*, *ANG2*, *TIE1*, *VEGF* et les gènes *APLM*) dans l'ADN extrait de biopsies de MV est envisagée comme prochaine étape.

Si cela n'aboutit pas, une analyse « exomesequencing » sera nécessaire ou le séquençage de l'ensemble du génome afin de comparer les séquences obtenus dans l'ADN de biopsies et les séquences de l'ADN germinale des patients de notre population.

L'identification d'un ou de plusieurs autre(s) gène(s) dans les familles avec des malformations vasculaires accroîtra nos connaissances sur la compréhension de l'angiogenèse et de la lymphangiogenèse. Dans beaucoup de cas, le défi est, maintenant, de

déterminer la fonction des gènes identifiés. Ceci permettrait l'émergence de nouvelles thérapies en complément des traitements conventionnels existants.

Puisque la plupart des malformations vasculaires se produisent sporadiquement, il serait intéressant de déterminer si des néo-mutations germinales surviennent dans ces cas, ou, si les mutations somatiques sont suffisantes pour causer le même phénotype.

Il y a une prédilection de tissu ou d'organe dans ces malformations vasculaires transmises par mutation germinale. Par conséquent, le double mécanisme étiologique est une possibilité probable dans l'hémangiome, la MV et la MGV. Il se pourrait également que les mutations somatiques secondaires affectent d'autres gènes qui interagissent avec le gène causal de la maladie. La microdissection au laser des différents composants endothéliaux des malformations vasculaires ou des cellules musculaires lisses vasculaires, devrait permettre une détection plus précise des types de cellules portant des mutations somatiques dans les gènes impliqués.

De plus, la compréhension approfondie des mécanismes de l'angiogenèse et de la vasculogenèse a fourni un aperçu considérable sur les molécules impliquées en physiopathologie des hémangiomes et des malformations vasculaires. Cette partie se concentre sur les avancées récentes de la biologie des mécanismes d'angiogenèse ou de la vasculogenèse et de la différenciation des vaisseaux artériels et veineux. Cette connaissance est intégrée avec de nouvelles données obtenues à partir des études génétiques chez l'homme, qui ont indiqué un certain nombre d'éléments impliqués dans le développement des anomalies vasculaires familiales.

La formation de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogenèse) joue un rôle essentiel dans la progression tumorale et conduit à la formation de métastases. La connaissance approfondie des mécanismes et des voies de signalisation affectés lors de la genèse des MVva accroît notre compréhension sur l'angiogenèse tumorale. En effet, les connaissances actuelles ne permettent pas d'expliquer l'arrêt de la progression de l'angiogenèse lors de la formation des anomalies MV, alors qu'elle continue au cours de la formation des métastases. L'investigation de ces mécanismes pourrait identifier de nouvelles opportunités de traitements anticancéreux.

Ce projet vise à transférer ces nouvelles connaissances pour modéliser l'angiogenèse *ex vivo*. Le but futur est de bloquer ou de normaliser l'angiogenèse aberrante. Ceci pourrait être utile lors de la réparation de tissus, où une re-vascularisation organisée est nécessaire pour restaurer l'intégrité et la fonction tissulaires. De la même manière, la normalisation de la vascularisation tumorale pourrait être un moyen efficace pour augmenter la « livraison » de drogues anti-cancéreuses pour détruire la tumeur.

Le développement ultérieur des modèles transgéniques de souris pour plusieurs de ces lésions devrait, de même, être utile pour développer de nouvelles stratégies pour empêcher la croissance et l'apparition des malformations vasculaires existantes.

Chapitre 4

Bibliographie

Chapitre 4

Bibliographie

A

Amir J, Metzker A, Krikler R, Reisner SH. **Strawberry hemangioma in preterm infants.** *PediatrDermatol.*1986; **3**:331–332.

Amyere M, Aerts V, Brouillard P, McIntyre BAS, Duhoux FP, et al. **Somatic Uniparental isodisomy: an Explanation for Multifocality of Glomuvenous Malformations.** *Am J Hum Genet* 2013;**92**:188–196.

Arbiser JL, Weiss SW, Arbiser ZK, Bravo F, Govindajaran B, Caceres-Rios H, Cotsonis G, Recavarren S, Swerlick RA, Cohen C. **Differential expression of active mitogen-activated protein kinase in cutaneous endothelial neoplasms: Implications for biologic behavior and response to therapy.** *J Am Ac Dermatol.* 2001;**44**:193-197.

Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, vander Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. **Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis.** *Science.* 1997;**275**:964–967.

Augustin HG, Koh GY, Thurston G, Alitalo K. **Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system.** *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;**10**:165–177.

Bachert C. **A special case of multiple hemangiomas in the head and neck area: a variation of the Maffucci syndrome?** *HNO.* 1985;**33**:472-474.

Barreau M, Domp Martin A. **Non-syndromic cutaneous vascular malformations.** *Ann DermatolVenereol.*2014;**141**:56-67.

Bastarrika G et al. **New Techniques for the evaluation and therapeutic planning of patients with Klippel-Trenaunay syndrome.** *J Am AcadDermatol.* 2007;**56**:242-9

Bataille AC, Boon LM. **Clinical aspects of capillary malformations.** *Ann ChirPlastEsthet.* 2006;**51**:347-56.

Berenguer B, Mulliken JB, Enjolras O, Boon LM, Wassef M, Josset P, Burrows PE, Perez-Atayde AR, Kozakewich HP. **Rapidly involuting congenital hemangioma: clinical and histopathologic features.** *PediatrDevPathol.*2003;**6**: 495-510.

Bienaime A, Rojat-habib MC, Hesse S, Pellissier JF, Bonerrandi JJ. Tumeur vasculaire géante de l'adulte : **angiome en touffe ou hémangioendothéliomekaposiforme.** *Ann DermatolVenerol.*2006;**103**: 553-6.

Bigorre M et al.Hémangiome infantile du nourrisson, Traité de médecine vasculaire tome2, chapitre 18, 2011, Elsevier Masson Editions.

Boon LM, Ballieux F, Vikkula M. **Pathogenesis of vascular anomalies.** *ClinPlast Surg.* 2011;**38**:7-19.

Boon LM, Vikkula M. Vascular malformations. In: Lowell A, editor. Fitzpatrick's dermatology in general medicine. New York: McGraw Hill; 2012. P.2076-94.

Boon LM, Mulliken JB, Vikkula M, et al. **Assignment of a locus for dominantly inherited venous malformations to chromosome 9p.** *Hum Mol Genet.* 1994;**3**:1583-7.

Boon LM, Brouillard P, Irrthum A, Karttunen L, Warman ML, Rudolph R, Mulliken JB, Olsen BR, Vikkula M. **A gene for inherited cutaneous venous anomalies ("glomangiomas") localizes to chromosome 1p21-22.** *Am J Hum Genet.* 1999;**65**:125–133.

Boon C, Den Hartog DN, Boselie P, et al.**The relationship between perceptions of HR practices and employee outcomes: examining the role of person-organisation and person-job fit.** *The International Journal of Human Resource Management.*2011;**22**: 138-162.

Boon LM, Mulliken JB, Enjolras O, Vikkula M. **Glomuvenous malformation (glomangioma) and venous malformation: distinct clinicopathologic and genetic entities.** *Arch Dermatol.* 2004;**140**:971-976.

Boon LM, Vikkula M. Vascular malformations. In Fitzpatrick's dermatology in general medicine 2008 7thed Vol. 2, pp. 1651-1666. McGraw-Hill, New York.

BoscoloE, BischoffJ. **Vasculogenesis in infantile hemangioma.** *Angiogenesis.*2009;**12**:197-207.

Bowers RE, Graham EA, Thomlinson KM. **The naturel history of the strawberry nevus.** *Arch Dermatol.* 1960;**82**:667-680.

Braverrnan IM and Ken-Yen A. **Ultrastructure and three-dimensional reconstruction of several macular and papularteangiectases.** *J Invest Derrmatol.*1983;**81**: 489 497.

Brouillard P, Vikkula M. **Genetic causes of vascular malformations.** *Hum Mol Genet.*2007;**16**:140-149.

Brouillard P, Ghassibe M, Penington A, Boon LM, Domp martin A, Temple IK et al. **Four common glomulin mutations cause two thirds of glomuvenous malformations ("familial glomangiomas"): evidence for a founder effect.** *J Med Genet.* 2005;**42**:13.

Brouillard P, Boon LM, Mulliken JB, Enjolras O, Ghassibe M, Warman ML et al. **Mutations in a novel factor, glomulin, are responsible for glomuvenous malformations ("glomangiomas").** *Am J Hum Genet.* 2002;**70**:866-874.

Brouillard P., Olsen BR., Vikkula M. **High-resolution physical and transcript map of the locus for venous malformations with glomus cells (VMGLOM) on chromosome 1p21-p22.** *Genomics.*2000;**67**:96–101.

Brevière GM, Degrugillier-Chopinnet C, Bisdorff-Bresson A. **Anomalies vasculaires superficielles.** Elsevier Masson SAS 2010 ; 11-940-G-10.

Breviere G.M., Enjolras O, Lemarchand-Venencie F. **Les hémangiomes immatures de l'enfant.** *Rev Prat* 1992; **42**: 2011-7.

Brouillard P, Enjolras O, Boon LM, Vikkula M. Glomulin and glomuvenous malformation. In: Epstein C.J., Erickson R.P., Wynshaw-Boris A., editors. *Inborn Errors of Development.* Oxford University Press; New York: 2008. pp. 1561–1565.

Browning J, Frieden I, Baselga E, Wagner A, Metry D. **Congenital, self-regressing tufted angioma,** *Arch Dermatol* 2006;**142**: 749-51.

C

Calvert GA, Brammer M, Bullmore E, Campbell R, Iversen SD, David A. **Response amplification in sensory-specific cortices during crossmodal binding.** *NeuroReport.*1999;**10**:2619-2623.

Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, De Mol M, Wu Y, Bono F, Devy L, Beck H, Scholz D, Acker T, DiPalma T, Dewerchin M, Noel A, Stalmans I, Barra A, Blacher S, Vandendriessche T, Ponten A, Eriksson U, Plate KH, Foidart JM, Schaper W, Charnock-Jones DS, Hicklin DJ, Herbert JM, Collen D, Persico MG. **Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions.** *Nat Med.* 2001;**7**:575–583.

Carmeliet P, Jain RK. **Angiogenesis in cancer and other diseases.** *Nature.* 2000;**407**:249-257.

Casanova D, Boon LM, Vikkula M. **Les malformations veineuses: aspects cliniques et diagnostic différentiel.** *Ann ChirPlast Esth.* 2006;**51**:373-387.

Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papaditriou JC, Keller G. **A common precursor for hematopoietic and endothelial cells.** *Development.* 1998;**125**:725-32.

Chung YS, Zhang WJ, Arentson E, Kingsley PD, Palis J, Choi K. **Lineage analysis of the hemangioblast as defined by FLK1 and SCL expression.** *Development.* 2002;**129**:5511-20.

D

Deffrennes D, Enjolras O, Salvan D, Herbreteau D. Traitement chirurgical des malformations vasculaires superficielles et des hémangiomes de la face. *Encycl Med Chir. Techniques chirurgicales – Chirurgie plastique reconstructive et esthétique*, 45146, 2001, 17 p.

Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Beroud G, Claustres M, Beroud C. **Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals.** *Nucleic Acid Research.* 2009;**37**:67.

Dickson MC, Martin JS, Cousins FM, Kulkarni AB, Karlsson S, Akhurst RJ. **Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor- β 1 knock out mice.** *Development.* 1995;**121**:1845-1854.

Dieterlen-Lievre F, Jaffredo T, Pardanaud L. **Emergence of the endothelial network during embryonic development.** *PatholBiol.* 1999;**47**: 301-6.

Dieterlen-Lievre F. **Ontogenèse des cellules souches hématopoiétiques: modèles animaux.** *Hématologie.* 1995; **4**:295-302.

DI Giovanni A, Revelli L. **Venous angiodysplasias with endoral manifestation: the problems of therapy minerva.** *Stomatol.* 1996;**45**: 113-9.

Dominguez MG, Hughes VC, Pan L, Simmons M, et al. **Vascular endothelial tyrosine phosphatase (VE-PTP)-null mice undergo vasculogenesis but die embryonically because of defects in angiogenesis.** *Proc Natl Acad Sci.* 2007;**104**:3243-3248.

Domp Martin A, Ballieux F, Thibon P, Lequerrec A, Hermans C, et al. **Elevated D-dimer level in the differential diagnosis of venous malformations.** *Arch Dermatol.* 2009;**145**:1239-1244.

Domp Martin A, Vikkula M, Boon LM. **Venous malformation: update on aetiopathogenesis, diagnosis and management.** *Phlebology.* 2010;**25**:224–235.

Drolet BA, Esterly NB, Frieden IJ. **Hemangiomas in children.** *N Engl J Med.* 1999;**341**:173–181.

Dumont DJ, Yamaguchi TP, Conlon RA., Rossant J and Breitman ML. **Tek, a novel tyrosine kinase gene located on mouse chromosome 4, is expressed in endothelial cells and their presumptive precursors.** *Oncogene.* 1992;**7**:1471-1480.

Duyka LJ, Fan CY, Coviello-Malle JM, Buckmiller L and Suen JY. **Progesterone receptors identified in vascular malformations of the head and neck.** *Otolaryngology-Head and Neck Surgery.* 2009;**141**:491–495.

E

Eichenfield LF et al. **Evolving knowledge of hemangiomas and vascular malformations, Beyond strawberries and port wine.** *Arch Dermatol.* 1998;**134**:740-2.

Eerola I, Boon LM, Watanabe S, Grynberg H, Mulliken JB, Vikkula M. **Locus for susceptibility for familial capillary malformation ("port-wine stain") maps to 5q.** *Eur J Hum Genet.* 2002;**10**:375–80.

Eklund L, Olsen BR. **Tie receptors and their angiopoietin ligands are context-dependant regulators of vascular remodeling.** *Exp Cell Res.* 2006;**312**:630-641.

Enjolras O., Riche M.C., Mulliken J.B., Merland J. Atlas des hémangiomes et malformations vasculaires superficielles. Paris Medsi Mc Graw Hill 1990.

Enjolras O, Herbreteau D, Lamarchand F et al. **Hémangiomes et malformations vasculaires superficielles : classification.** *J Mal Vasc.* 1992;**17**:2-19.

Enjolras O, Borsik M, Herbreteau D, Merland JJ, Hadjean E, Tranba Huy P. **Indications chirurgicales dans les angiomes de la face.** *J Chir.* 1993;**10**: 416-21.

Enjolras O, Mulliken JB. **Vascular tumors and vascular malformations (new issues).** *In: Advances in dermatology.* Mosby Year Book. 1997;**13**: 375-423.

Enjolras O, Mulliken JB. **The current management of vascular birthmarks.** *Pediatr Dermatol.* 1993;**10**: 311-33.

Enjolras O, Wassef M, Chapot R: Introduction: ISSVA Classification. Cambridge University Press. Excerpt from Color Atlas of Vascular Tumors and Vascular Malformations. 2007.

Enjolras O. Angiomes : hémangiomes et malformations vasculaires. *Encycl Med Chir (Elsevier, Paris), Dermatologie*, 12-715-A10, 1996, 9 p.

Enjolras O. **Anomalies vasculaires de localisation endo et peri-buccales.** *Act Odontostomatol.* 1994;**185**: 51-9.

Enjolras O. Angiomes. In *therapeutique dermatologie Dubertret (Louis)*. 1ère Edition Flammarion (Paris) 1991:54-8.

Ernemann U, Hoffmann J, Grönewäller E, Breuninger H, Rebmann H, Adam C, Reinert S. **Hemangiomas and vascular malformations in the area of the head and neck.** *Radiologe.* 2003; **43**: 958-966.

Ernemann U, Hoffmann J, Breuninger H, Reinert S, Skalej M. **Interdisciplinary concept for classification and treatment of vascular anomalies in the head and neck.** *Mund Kiefer Geschtschir.* 2002; **6**: 402-409.

Ertem D, Acar Y, Kotiloglu E, Yucelten D, Pehlivanoglu E. **Blue rubber bleb nevus syndrome.** *Pediatrics.* 2001;**107**:418–20.

F

Fachinger G, Deutsch U and Risau W. **Functional interaction of vascular endothelial-protein-tyrosine phosphatase with the angiopoietin receptor Tie-2.** *Oncogene.* 1999;**18** 5948–5953.

Ferrara N. **Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis.** *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001;**280**:1358–1366.

Fishman SJ, Mulliken JB. **Hemangiomas and vascular malformations of infancy and childhood.** *Pediatr Clin North Am.* 1993;**40**:1177–1200.

Fitzpatrick TB, Johnson RA, Polano MK, Suurmond D, Wolff K. *Dermatologie clinique : Atlas commenté en couleur.* 2ème édition Arnette-Blackwell (Paris) 1995;158-170.

Flamme I, Frolich T, Risau W. **Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis.** *J Cell Physiol.* 1997;**173**:206–210.

Fumoleau P, Campone M, Coudert B, Mayer F, Favier L, Ferrant E. Autres traitements ciblés (trastuzumab exclu). *Cancer du sein : Compte rendu du cours supérieur francophone de cancérologie.* Springer Paris. 2007, pp453-498.

G

Gallione CJ, Pasyk KA, Boon LM, Lennon F, Johnson DW, Helmbold EA, et al. **A gene for familial venous malformations maps to chromosome 9p in a second large kindred.** *J Med Genet.* 1995;**32**:197–9.

Gittenberger-de Groot AC, DeRuiter MC, Bergwerff M, Poelmann RE. **Smooth muscle cell origin and its relation to heterogeneity in development and disease.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;**19**:1589-94.

Gloviczki P, Duncan A, Kalra M, Oderich G, Ricotta J, Bower T, Mc Kusick M, Bjarnason H, Driscoll D. **Vascular malformations an update.** *Perspect Vasc Surg Endovasc Ther.* 2009; **21**: 133-48.

Goodman TF, Abele DC. **Multiple glomus tumors. A clinical and electron microscopic study.** *Arch Dermatol.* 1971;**103**:11–23.

Grazon MC, Huang JT, Enjolras O, Frieden IJ. **Vascular malformations: part 1.** *J Am Acad Dermatol.* 2007;**56**:353-70.

Grimmer JF, Williams MS, Pimentel R, et al. **Hemangioma is associated with atopic disease.** *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2012;**146**:206–209.

H

Hand JL, Frieden IJ. **Vascular birthmarks of infancy: resolving nosologic confusion.** *Am J Med Genet.* 2002;**108**:257-64.

Henning JS, Kovich OI, Schaffer JV. **Glomuvenous malformations.***DermatolOnline J.* 2007;**13**:17.

Herbreteau D, Enjolras O, Lemarchand F, Brette MD, Laurian L, Riche MC, et al. **Strategie d'exploration des malformations vasculaires superficielles.** *J Mal Vasc.* 1992;**17**: 26-32.

Hesselman et al. **Case report: Kasabach-Meritt syndrome; a review of the therapeutic options and a case of successful treatment with radiotherapy and interferon alpha.** *Br J Radiol.* 2002; **75**:180-4.

Hoeger PH, Martinez A, Maerker J, Harper JI. **Vascular anomalies in Proteus syndrome.** *ClinExpDermatol.* 2004;**29**:222–30.

Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. **Dormancy of micrometastases: Balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression.** *Nat Med.* 1995;1:149–153.

Holopainen T, Huang H , Chen C , Kim KE , Zhang L , Zhou F , Han W , Li C , Yu J , Wu J , Koh GY , Alitalo K , Il Y .**Angiopoietin-1 surexpression module endothélium vasculaire tumoral afin de faciliter la diffusion de la cellule et l'établissement de métastases.***Cancer Res.* 2009;**69**:4656-4664.

Hubbard T, Baker D, Birney E, Cameron G, Chen Y, Clark L, Cox T, Cuff J, Curwen V, Down T, Durbin R, Eyras E, Gilbert J, Hammond M, Huminiecki L, Kasprzyk A, Lehvaslaiho H, Lijnzaad P, Melsopp C, Mongin E, Pettett R, Pockock M, Potter S, Rust A, Schmidt E, Searle S, Slater G, Smith J, Spooner W, Stabenau A, Stalker J, Stupka E, Ureta-Vidal A, Vastrik I, Clamp M. **The Ensemblgenomedatabaseproject.** *Nucleic Acids Res.* 2002;**30**:38-41.

I

Irrthum A, Brouillard P, Enjolras O, Gibbs N.F, Eichenfield L.F, Olsen B.R, Mulliken J.B, Boon L.M, Vikkula M. **Linkage disequilibrium narrows locus for venous malformation with glomus cells (VMGLOM) to a single 1.48 Mbp YAC.** *Eur J HumGenet.* 2001;**9**:34–38.

Isner JM, Asahara T. **Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization.** *J Clin Invest.* 1999;**103**: 1231-6.

J

Jones A, Fujiyama C, Blanche C, Moore JW, Fuggle S, Cranston D, Bicknell R and Harris AL. **Relation of vascular endothelial growth factor production to expression and regulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha and hypoxia-inducible factor-2 alpha in human bladder tumors and cell lines.** *Clin Cancer Res.*2001;**7**: 1263-1272

K

Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, et al. **A cell cycle regulator potentially involved of many tumor types.** *Science.*1994;**264**:436-40.

Khau Van Kien A et al. Malformations veineuses, Traité de médecine vasculaire tome 2, chapitre 19, 2011. Elsevier Masson Editions.

Kidoya H, Ueno M, Yamada Y, Mochizuki N, Nakata M, Yano T, Fujii R, Takakura N. **Spatial and temporal role of the apelin/APJ system in the caliber size regulation of blood vessels during angiogenesis.** *EMBO J.* 2008;**27**, 522-34.

Kim KL, Shin IS, Kim JM, et al. **Interaction between Tie receptors modulates angiogenic activity of angiopoietin2 in endothelial progenitor cells.** *Cardiovasc Res.* 2006;**72**:394–402.

Kohout MP, Hansen M, Pribaz JJ, Mulliken JB. **Arteriovenous malformations of the head and neck: natural history and management.** *PlastReconstr Surg.* 1998;**102**:643-54.

Korpelainen EI, Karkkainen M, Gunji Y, Vikkula M, Alitalo K. **Endothelial receptor tyrosine kinases activate the STAT signaling pathway: mutant Tie-2 causing venous malformations signals a distinct STAT activation response.** *Oncogene.* 1999;**18**:1–8.

L

Landthaler M, Hohenleutner U. **Classification of vascular abnormalities and neoplasms.** *Hautarzt.*1997;**48**: 622-628.

Laurian C, Enjolras O et al. Hemangiomes et malformations vasculaires, Elsevier Masson SAS 2010;19-1730

Lemarchand-Venencie F, Riche MC, Hadjean E et al. **Recherche de marqueurs endotheliaux des différents types cliniques et hémodynamiques d'angiomes.** *PathBiol.* 1988;**36**:313.

Lemarchand-Venencie F. **Classification des angiomes : hemangiomes et malformations vasculaires superficielles.** *Rev Prat.* 1992;**42**:1998-2004.

Lemarchand-Venencie F. Angiomes. In : Dermatologie et Vénérologie. 2ème édition Masson (Paris) 1991:426-431.

Lee BB, Laredo J, Lee TS, Huh S, Neville R. **Terminology and classification of congenital vascular malformations.** *Phlebology.* 2007;**22**:249-52.

Lee BB, Baumgartner I, Berlien HP, Bianchini G, Burrows P, Do YS, Ivancev K, Kool LS, Laredo J, Loose DA, Lopez-Gutierrez JC, Mattassi R, Parsi K, Rimon U, Rosenblatt M, Shortell C, Simkin R, Stillo F, Villavicencio L, Yakes W. **Consensus Document of the International Union of Angiology (IUA)-2013. Current concept on the management of arterio-venous management.** *IntAngiol.* 2013;**32**:9-36.

Lee IJ, Kim CS, Seo SJ, Lim SY, Song HS, Park MC. **A case of non-involuting congenital haemangioma with multiple epidermal cysts.** *J PlastReconstrAesthet Surg.* 2010;**63**:19-22.

Limaye N, Wouters V, Uebelhoer M, Tuominen M, Wirkkala R, et al. **Somatic mutations in angiopoietin receptor gene TEK cause solitary and multiple sporadic venous malformations.** *Nat Genet.* 2009;**41**: 118–124.

Lyons G. **Vertebrate heart development.** *Curr Opinion Genet Dev.* 1996;**6**:454-460.

M

Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C et al. **Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis.** *Science.* 1997;**277**:55–60.

Mattassi R. **Differential diagnosis in congenital vascular-bone syndromes.** *SeminVasc Surg.* 1993;**6**:233.

Marchuk DA. **Pathogenesis of hemangioma.** *J Clin Invest.* 2001;**107**:665–666.

McIntyre BAS, Brouillard P, Aerts V, Gutierrez-Roelens I, Vikkula M. **Glomulin is predominantly expressed in vascular smooth muscle cells in the embryonic and adult mouse.** *Gene Expr Patterns.* 2004;**4**:351–358.

Mulliken JB, Glowacki J. **Hemangiomas and vascular malformations in infants and children: a classification based on endothelial characteristics.** *Plast Reconstr Surg.* 1982; **69**: 412-22.

Mulliken JB, Young MA, *Vascular Birthmarks: Hemangiomas and Vascular Malformations.* Philadelphia: W.B. Saunders Co; 1998.

Mulliken JB. **A biological approach to cutaneous vascular anomalies.** *Pediatr dermatol.* 1992; **9**: 356-7.

Mulliken JB. **Cutaneous vascular anomalies.** *Semin Vasc Surg.* 1993;**6**:204-18.

Mullis KB and Faloona FA. **Specific synthesis of DNA in vitro by a polymerase catalysed chain reaction.** *Methods in enzymology.* 1987;**155**:335-350.

N

Neumann R, Leonhartsberger H, Knobler R et al. **Immunohistochemistry of port-wine stains and normal skin with endothelium - specific antibodies PAL-E, anti-ICAM-1, anti-ELAM-1, and anti-factor VIII rAg.** *Arch Dermatol.* 1994;**130**:879-883.

Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA. **Deletions of the cyclin-dependent Kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers.** *Nature.* 1994;**368**:753-6.

Nobuhara Y, Onoda N, Fukai K, Hosomi N, Ishii M, Wakasa K et al. **TIE2 gain-of-function mutation in a patient with pancreatic lymphangioma associated with blue rubber-bleb nevus syndrome: report of a case.** *Surg Today.* 2006;**36**:283–286.

Noden DM. **Embryonic origins and assembly of blood vessels.** *Am Rev Respir Dis.* 1989;**140**:1097–1103.

North PE, Waner M, Mizeracki A, Mihm MC Jr. **GLUT1: a newly discovered immunohistochemical marker for juvenile hemangiomas.** *Hum Pathol.* 2000;**31**:11–22.

Nou M, Laroche JP, Quéré I, Bigorre M, Kovacsik H, Tapon M, Labau D, Dautat M, Khau Van Kien A. Tumeurs et malformations vasculaires. 2013, Formation Médicale Continue ; p29-43.

O

O'Hagan AH, Moloney FJ, Buckley C, Bingham EA, Walsh MY, McKenna KE, McGibbon D, Hughes AE. **Mutation analysis in Irish families with glomuvenous malformations.** *Br J Dermatol.* 2006;**154**:450-452.

P

Papetti M and Herman IM. **Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis.** *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002;**282**:947-970.

Pardanaud L, Luton D, Prigent M, Bourcheix LM, Catala M, Dieterlen-Lievre F. **Two distinct endothelial lineages in ontogeny, one of them related to hemopoiesis.** *Development.* 1996;**122**:1363-71.

Pardanaud L, Dieterlen-Lievre F. **Manipulation of the angiopoietic/hemangiopoietic commitment in the avian embryo.** *Development.* 1999;**126**:617-27.

Pavlov KA, Dubova EA, Shchyogolev AI and Mishnyov OD. **Expression of growth factors in endotheliocytes in vascular malformations.** *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2009;**147**:366–370.

Perkins J A, Maniglia C, Magit A, Sidhu M, Manning SC and Chen EY. **Clinical and radiographic findings in children with spontaneous lymphatic malformation regression.** *Otolaryngology-Head and Neck Surgery.* 2008;**138**:772–777.

Philandrianos C, Degardin N, Casanova D, Petit P, Bartoli JM, Bardot J, et al. **Diagnostic et prise en charge des anomalies vasculaires.** *Ann Chir Plast Esthet.* 2011;**56** :241-53.

Philandrianos C, Dégardin N, Koch N, Casanova D, Bardot J, Magalon G. **Les malformations veineuses : le point de vue du chirurgien plasticien.** *Phlébologie.* 2010;**3**:19-22.

R

Requena L, Sanguenza OP. **Cutaneous vascular proliferation. Part II. Hyperplasias and benign neoplasms.** *J Am Acad Dermatol.*1997;**37**:887–919.

Riche M.C. **Les lymphangiomes.** *Rev de Prat* 1992;**42**: 2041-3

Risau W. **Mechanisms of angiogenesis.** *Nature.* 1997;**386**: 671-4.

Risau W, Flamme I. **Vasculogenesis.** *Ann Rev Cell Dev Biol.* 1995;**11**: 73-91.

Risau W and Lemmon V.**Changes in the vascular extracellular matrix during embryonic vasculogenesis and angiogenesis.** *Dev Biol.*1988;**125**:441–450.

Risau, W, Sariola H, Zerwes H.G, Sasse, J, Ekblom, P, Kemler R and Doetschman T.**Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies.** *Development.*1988;**102**:471–478.

Rozen S, Skaletsky H. **Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers.** *Methods Mol Biol.* 2000;**132**:365-386.

Rydh M, MalmM, Jernbeck J and Dalsgaard CJ. **Ectatic blood vessels in port-wine stains lack innervation: possible role in pathogenesis.** *Plastic and Reconstructive Surgery.* 1991;**87**: 419-422.

S

Saharinen P, Kerkela K, Ekman N et al. **Multiple angiopoietin recombinant proteins activate the Tie1 receptor tyrosine kinase and promote its interaction with Tie2.** *J Cell Biol.*2005;**169**:239–243.

Sanger F, Nicklen S and CoulsonAR. **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.** *ProcNatlAcad Sci.*1977;**74**:5463-5467.

Sari BE, Aribi M, Saari B. **Effect of endogamy consanguinity on the development of labial vanous malformations in area of Tlemcen (West Algeria).***The Open Genomics Journal.*2008;**1**:1-5.

Seinturier C. **Les malformations vasculaires veineuses.** *Phlébologie.* 2010;**63**:13-18.

Smoller BR and Rosen S. **Port-wine stains: a disease of altered neural modulation of blood vessels?** *Archives of Dermatology*. 1986;**122**:177-179.

Soblet J, Limaye N, Uebelhoer M, Boon LM, Vikkula M. **Variable somatic *TIE2* mutations in half of sporadic venous malformations.** *Molecular Syndromology*. 2013;**4**:179-183.

Stricker M, Picard L. Tumeurs vasculaires de la face : hémangiomes et malformations vasculaires. *Encycl Med Chir. Stomatologie* 1998; 22-062-E-15, 23p.

Stäbler A, Freyschmidt J. **Vascular tumors – Manual diagnostic radiology 2.** *Springer Berlin Heidelberg*. 2005; 299-311.

T

Takahashi K, Mulliken JB, Kozakewich HP, Rogers RA, Folkman J, Ezekowitz RA. **Cellular markers that distinguish the phases of hemangioma during infancy and childhood.** *J Clin Invest*. 1994;**93**:2357–2364.

Tallman B, Tan OT, Morelli JG, Piepenbrink J, Stafford TJ, Trainor S, Weston WL. **Location of port-wine stains and the likelihood of ophthalmic and/or central nervous system complications.** *Pediatrics*. 1991;**87**:323–327.

Timur AA, Driscoll DJ, Wang Q. **Biomedicine and diseases: the Klippel-Trenaunay syndrome, vascular anomalies and vascular morphogenesis.** *Cell Mol Life Sci*. 2005;**62**:1434–1447.

Tobelem G. **Les cellules souches vasculaires: une nouvelle étape vers la régénération des vaisseaux.** *Sang Thrombose Vaisseaux*. 2001;**10** :521-8.

Tsang WYW, Chan JKC. **Kaposi-like hemangioendothelioma. A distinctive vascular neoplasm of the retroperineum.** *Am J Surg Pathol*. 1991;**15**: 982-9.

V

Vernhet-Kovacsik H, Bommart S, Bigorre M, Quéré I, Laroche JP, Vidal V. **Exploration des malformations vasculaires.** *Sang Thrombose Vaisseaux*. 2009;**21**:23-9.

Vikkula M, Boon LM, Carraway KL 3rd, Calvert JT, Diamonti AJ, Goumnerov B, Pasyk KA, Marchuk DA, Warman ML, Cantley LC, Mulliken JB, Olsen BR. **Vascular dysmorphogenesis**

caused by an activating mutation in the receptor tyrosine kinase TIE2. *Cell*.1996; **87**:1181-90.

Vikkula M. **Pathogenesis and genetics of vascular anomalies.** *Annales de chirurgie plastique esthétique*.2006;**51**:282-286.

W

Wananukul S, Nuchprayoon I, Seksarn P. **Treatment of Kasabach-Meritt syndrome: a stepwise regimen of prednisolone, dipyridamol and interferon.** *Int J Dermatol*.2003;**42**:741-8.

Warner M, Suen JY. Hemangiomas and Vascular Malformations of the Head and Neck. Wiley-Liss, Inc; 1999:99–27.

WardNL, Dumont DJ. **The angiopoietins and Tie2/Tek: adding to the complexity of cardiovascular development.** *SeminCellDevBiol*.2002;**13** :19-27.

Wassef M, Enjolras O. **Les malformations vasculaires superficielles : classification et histopathologie.** *Ann Pathol*. 1999;**19**: 253-64.

Willenberg T, Baumgartner I. **Vascular birthmarks.** *Vasa*.2008;**37**: 5-17.

Wouters V, Limaye N, Uebelhoer M, Irrthum A, Boon LM, Mulliken JB, Enjolras O, Baselga E, Berg J, Domp Martin A et al.**Hereditary cutaneomucosal venous malformations are caused by TIE2 mutations with widely variable hyper-phosphorylating effects.** *Eur J Hum Genet*.2010;**18**:414-420.

Y

Yamaki M, Isono K, Takada Y, Abe K, Akasaka T, Tanzawa H, Koseki H. **The mouse Edr2 (Mph2) gene has two forms of mRNA encoding 90- and 36-kDa polypeptides.** *Gene*. 2002;**288**: 103–110.

Yuan HT, Venkatesha S, Chan B, et al.**Activation of the orphan endothelial receptor Tie1 modifies Tie2-mediated intracellular signaling and cell survival.** *Faseb J*. 2007;**21**:3171-3183.

ANNEXES

ANNEXE A

QUESTIONNAIRE

a) Données démographiques

Nom et prénom	Date de naissance	Sexe		Lieu de naissance et pays d'origine	Résidence	Ethnie	Tél./Mob.
		1 (Masculin)	2 (Féminin)				

b) Motifs de consultation

Douleur		Gêne fonctionnelle		Gêne esthétique		Autres
1	2	1	2	1	2	3

c) Histoire de la maladie et diagnostic

c.1) Histoire de la maladie

Naissance	Petite enfance
1	2

(2) Evolution, (1) Date d'apparition

Stable	Evolutive		
1	2		
	A la puberté	Après traumatisme	Autres
	1	2	3

c.2) Diagnostic

c.2.1) Clinique

Lèvre	Supérieure		1	
	Inférieure		2	
Médian	Supérieur		1	
	Inférieur		2	
Latéral	Supérieur	Gauche	1	
		Droit	2	
	Inférieur	Gauche	1	
		Droit	2	
Commissure	Gauche		1	
	Droite		2	
Coloration	Rouge vif		1	
	Bleutée		2	

Volume	Augmentation en position déclive	1	
		2	
Chaleur locale	Normale	1	
	Augmentée	2	
Pulsatile	1		
	2		
Forme	Localisée	1	
	Diffuse	2	
Trouble de l'occlusion	1		
	2		
Déformation dento-alvéolaire			
Autres signes			

c.2.2) Examen radiologique

Retentissement osseux	1	
	2	

c.2.3) Examen histologique

Interprétation	
-----------------------	--

Conclusion	
-------------------	--

c.2.4) Etude génétique

c.2.4.1) Arbre généalogique : histoire de la maladie dans la famille

Nature de la parenté	1 (premier degré)	
	2 (collatéraux)	
Date de naissance		
Genre		
An diagnostic/apparition		
Décédé	1	
	2	

c.2.4.2) Génotypage moléculaire

ANNEXE B

CONSENTEMENT ÉCLAIRÉ

M. :

M^{elle} :

Né (e) le : à

Demeurant à :

Certifie avoir été informé (e) par le Dr. B. SARI de la procédure thérapeutique (séances d'injections de substances sclérosantes et chirurgie), et des risques encourus, à savoir :

1. hypersensibilité à l'un des composants de la substance sclérosante,
2. nécrose tissulaire,
3. hémorragie,
4. risque infectieux,
5. échecs opératoires, fonctionnel ou esthétique,
6. en-cas de résultat (s) défavorable (s) je m'engage à ne réclamer aucune indemnité de quelque nature que ce soit.

De même, j'autorise le Dr. B. SARI et ses collaborateurs :

1. à me recruter en tant que patient (e) éligible dans son étude sur les malformations vasculaires labiales,
2. à effectuer des prélèvements sanguins périphériques,
3. à prendre toutes les photographies sur ma personne nécessaires à son étude,
4. à publier les résultats obtenus et diffuser les photographies prises dans le cadre de son travail.

**Signature du patient ou du tuteur
(Précédé de la mention lu et approuvé) :**

Tlemcen, le.....

Research Article

Lack of *TEK* Gene Mutation in Patients with Cutaneomucosal Venous Malformations from the North-Western Region of Algeria

Nabila Brahami,¹ Mourad Aribi,¹ Badr-Eddine Sari,^{1,2} Philippe Khau Van Kien,³ Isabelle Touitou,^{4,5,6} Gérard Lefranc,⁷ and Mouna Barat-Houari⁴

¹Laboratory of Applied Molecular Biology and Immunology, University of Tlemcen, 13000 Tlemcen, Algeria

²Service de Stomatologie et de Chirurgie Buccale du Centre Hospitalier et Universitaire de Tlemcen, 13000 Tlemcen, Algeria

³Génétique Médicale, Laboratoire de Cytologie Clinique et Cytogénétique, CHU de Nîmes, Place du Professeur Robert Debré, 30029 Nîmes Cedex 9, France

⁴Unité Médicale des Maladies Auto-Inflammatoires, Département de Génétique, CHRU, Montpellier, 34961 Montpellier Cedex 2, France

⁵Université Montpellier 1, 34961 Montpellier Cedex 2, France

⁶Génétique des Maladies Auto-Inflammatoires et des Ostéo-Arthropathies Chroniques, INSERM U844, 34091 Montpellier Cedex 5, France

⁷Laboratoire d'Immunogénétique Moléculaire, Institut de Génétique Humaine, CNRS UPR 1142, et Université Montpellier 2, 34095 Montpellier Cedex 5, France

Correspondence should be addressed to Mourad Aribi; m.aribi@mail.univ-tlemcen.dz

Received 2 August 2013; Accepted 21 October 2013

Academic Editor: Biaoru Li

Copyright © 2013 Nabila Brahami et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background. Venous malformations (VM) result from an error in vascular morphogenesis. The first gene suspected in their development is the *TEK* gene (tyrosine kinase, endothelial). Mutations of this gene have been identified in several Belgian families with a dominant form of the disease. Therefore, we investigated whether mutations in this *TEK* gene could explain the MV development in patients of families from Tlemcen region (north-western Algeria). **Methods.** Genomic DNA was extracted from leucocytes of ten patients. The search for mutations in all the 23 exons and in the 5' and 3' intronic sequences flanking the *TEK* gene was performed using PCR amplification and direct sequencing of amplified genomic DNA. Additionally, a search for somatic mutations of the gene *TEK* was performed on a biopsy of the venous malformation from one of the ten eligible patients. **Results.** The sequencing of the 23 exons of the *TEK* gene revealed neither germinal mutation in our ten patients nor somatic mutation in the tissue of the biopsy. **Conclusion.** The absence of mutation in the *TEK* gene in the population studied suggests that the *TEK* gene is not necessarily involved in the onset of VM; its association with these malformations may differ from one population to another.

1. Introduction

Vascular malformations (VM) are benign vascular lesions that are described as structural congenital anomalies [1]. These lesions are always present at birth, but may not be visible until days, weeks, or even years after birth [2]. VM are classified according to the type of involved vessels, such as arterial, venous, lymphatic, capillary malformations, or a combination of different vessels [1–3].

VM result from an error in vascular morphogenesis [4]. They are present at birth and their growth is usually gradual and steady during the first year of life [3]. Their evolutionary peak is generally observed in adolescence or after a traumatic event [5]. Localized facial forms are present essentially on the lips, eyelids, and tongue [5, 6]. The extension of the gingival mucosa can result in bleeding, which can occur spontaneously and/or after certain dental procedures and treatments [7].

Some locations cause, by mass effect, skeletal deformities in the frontoorbital region with enophthalmos and maxillo-mandibular and dentoalveolar defects, with repercussions on the dental bite and open bite [5, 8]. An important lip deformity tends to make them incompetent. Likewise, giant VM of the tongue can cause permanent changes in normal dental occlusion [7, 8]. Additionally, superficial VM can lead to disfigurement, resulting in an asymmetry hardly supported by patients [9, 10]. This condition is often the cause of low self-esteem and school failure in children and adolescents.

Although the real causes of the development of VM are still poorly understood, previous studies have suggested the involvement of genetic factors in their occurrence [11]. First, the *TEK* gene (also called *TIE-2*, tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domain 2), located at chromosomal region 9p21 and encoding the endothelial-specific receptor tyrosine kinase, has been implicated in Belgian families with a dominant form of the disease [11, 12].

To date, seven missense mutations were identified in these Belgian patients with dominant transmission, including 2545C>T in exon 15, 2690A>G, 2744G>A, 2752C>T, 2755G>T, and 2773G>T in exon 17, and 3300G>C in exon 22 [11, 13, 14]. These mutations lead to an excess of angiopoietin 1 signaling, a ligand for TIE-2 receptor, and consequently to an abnormal proliferation of endothelial cells [11].

The relatively high frequency of VM in Tlemcen region (north-western Algeria) compared to others [15] led us to search in all exons of the *TEK* gene for either already described mutations or other not yet identified.

2. Materials and Methods

2.1. Patients and Families. A total of ten (10) families, each with a patient with VM (3 men and 7 women), were recruited in Stomatology and Oral Surgery Department of Tlemcen University Medical Centre (Figure 1).

The characteristics of the patients and family members were recorded using a detailed questionnaire. The mean age (\pm standard error) of the patients at diagnosis was 12 ± 1 years. The recruitment of the patients was carried out on the basis of clinical examination. Such malformations are characterized by a soft, compressible, nonpulsatile tissue mass that does swell in inclined or proclive position [6, 16] (Figure 2).

A magnetic resonance imaging (MRI) was performed in the case of malformations that are simultaneously superficial and deep (Figure 3). The main inclusion criteria were the geographical location of patients exclusively in the region of Tlemcen and inactive malformations. The exclusion criteria were especially arteriovenous malformations. All participants or their parents or guardians have signed an informed consent in accordance with the latest version of the Helsinki Declaration. This study was approved by the Local Ethics Committee and supported by the Hubert Curien Partnership (PHC Tassili, Code 10MDU794).

2.2. Samples. A total of 52 blood samples were collected into EDTA-containing Vacutainer tubes (BD Vacutainer EDTA,

USA). VM tissues were taken from one patient after surgery (VMF03.III.2/family VMF03), immediately placed into a sterile collection tube in liquid nitrogen and, then, stored at -80°C in dry ice.

2.3. DNA Analysis. For all samples, DNA was extracted from blood cells using QIAamp DNA Blood Midi Kit Qiagen, as recommended by the manufacturer (Qiagen Valencia, CA, USA). The tissue DNA was isolated using spin columns with the QIAamp DNA Blood Mini Kit Qiagen. The DNA concentration was then measured by spectrophotometer NanoDrop ND-1000 at 260 nm and then at 280 nm (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE).

The search for mutations in all the 23 exons as well as in the 5' and 3' intronic sequences flanking the exons of the *TEK* gene was performed by PCR amplification followed by direct sequencing of amplified DNA segments. Such analyses were performed in the Genetics Laboratory of the Medical Unit for Auto-Inflammatory diseases, Hospital Arnaud de Villeneuve, Montpellier, France.

The primer sequences were specifically established to amplify each exon (Table 1), using the Primer3 program [17] (v.0.4.0), referring to the *TEK* gene sequence (ENSG00000120156) published in Ensembl [18].

The DNA was amplified in a thermocycler for PCR (Applied Biosystems, Foster, CA), using the primers described in Table 1. The medium of the DNA amplification reaction was composed of 50 ng of DNA, 25 μM of each primer, and 2X Promega PCR Master Mix (Promega). The PCR conditions were as follows: 5 minutes at 95°C followed by 35 cycles of 30 seconds of denaturation at 95°C , primer annealing at 60°C for 30 seconds, and elongation at 72°C followed by one cycle at 72°C for 10 minutes.

After checking the quality and size of the PCR products by agarose gel (1.5%) electrophoresis, a bidirectional sequencing was performed. The amplification products were bidirectionally sequenced with Mix BigDye Terminator kit version 3.1 (ABI). The sequences of the 23 exons and their flanking regions were compared with the *TEK* gene reference sequence published in Ensembl [18], using the SeqScape v2.5 software (ABI).

3. Results

3.1. Phenotype of Patients. Table 2 shows the clinical data of eleven patients with VM, ten of which had a lip malformation and one had a genio-cervical malformation (one of the eleven patients was not included in the molecular study). Eight patients are female; one of the ten families (VMF04) accounts for two patients with venous malformation (Figure 1).

3.2. Molecular Analysis of the *TEK* Gene. The amplification fragments were obtained for each of the 23 exons of the *TEK* gene, using DNA from blood samples of ten patients and VM lip tissues from one patient (VMF03.III.2) after surgery. Figure 4 shows the amplification fragments of exon 17 from genomic DNA of the ten patients included in this study and from somatic DNA of patient VMF03.III.2.

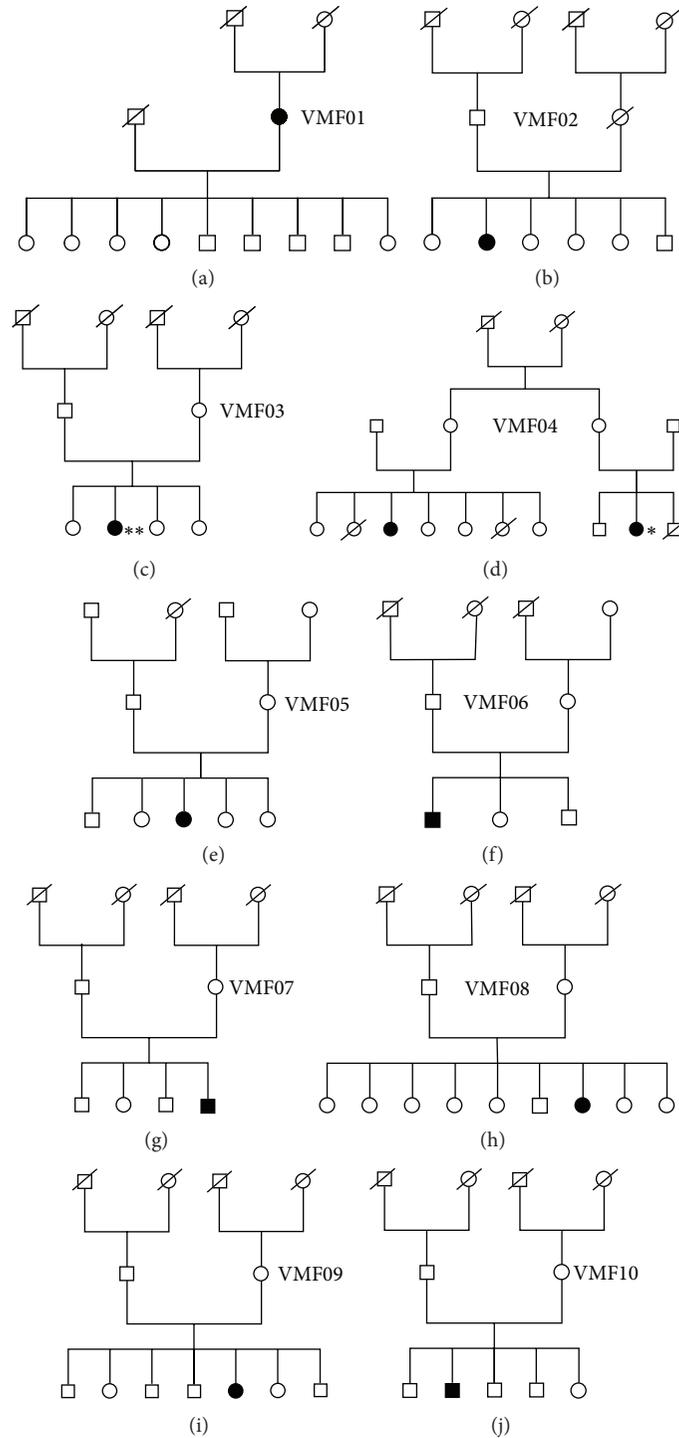


FIGURE 1: Genealogical trees of ten Algerian families analyzed for *TEK* gene. * Patient VMF04.III.3 not included in the molecular study. ** For patient VMF03.III.2, the DNA in the tissue of the biopsy was sequenced.

None of the mutations previously described, including even the mutation of the CGG codon 849 (2545C>T) in exon 15, reported by Wouters et al. [13], in six out of twelve Belgian families with a hereditary form of VM, has been detected after ten blood and one VM tissue DNA analyses of all the 23 exons of the *TEK* gene (Figure 5).

4. Discussion

In this study, we present the results of the *TEK* gene sequencing in ten unrelated patients from Tlemcen in the north-western region of Algeria with VM.

According to the previous analyses for different mutations in the germline DNA [11, 13, 14], we have to firstly look

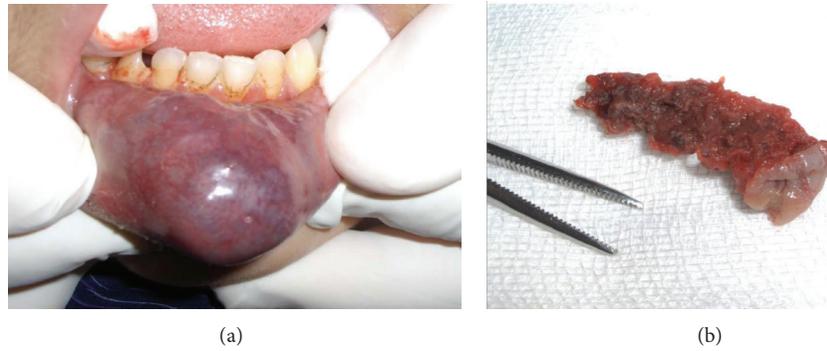


FIGURE 2: Aspect of the labial venous malformation seen after inclined position and surgical fragment collected following resection using multiple times of transmucosal embolization.

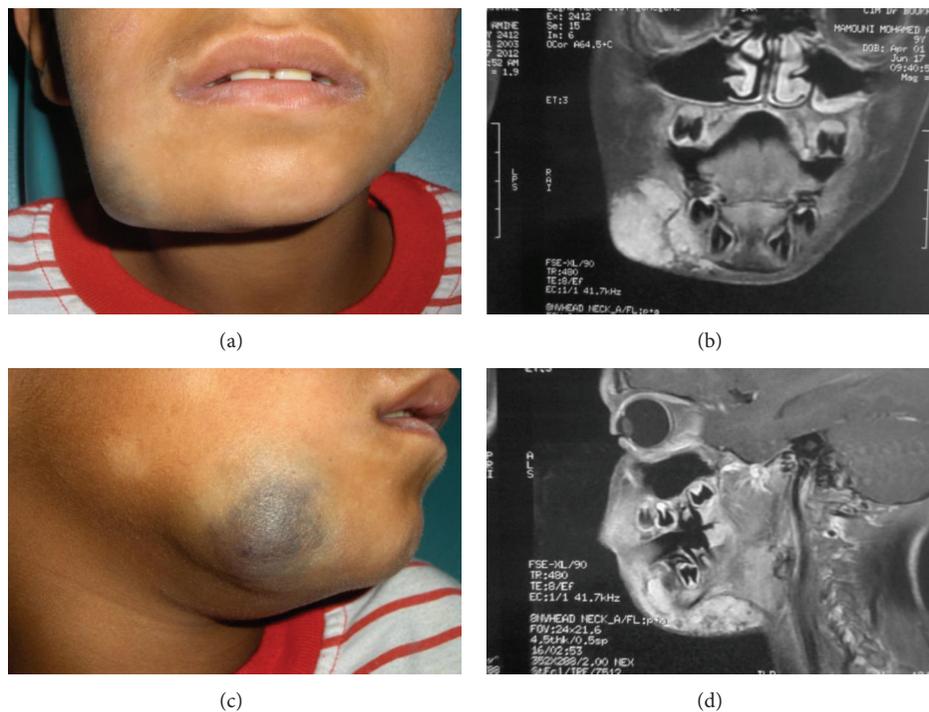


FIGURE 3: A magnetic resonance imaging (MRI) of superficial and deep venous malformation. The technique was performed in three planes with T2 fat-saturation (T2-FS), axial T1, 2D time-of-flight (2D TOF), magnetic resonance angiography (MRA) of supra-arterial trunks, and three planes T1-FS for the cervical region.

for these mutations, and, then, we extended analyses to all the 23 exons of the *TEK* gene. Since no germinal mutation was found in all the samples, we searched for somatic mutations in tissues of a VM biopsy.

The lack of mutation suggests that there is a mutated gene other than *TEK* or other factors which would be involved and responsible for VM development in our population.

The vascular endothelial cell (EC) specific receptor tyrosine kinase *TEK* plays a crucial role in angiogenesis and cardiovascular development [19–27]. Its ligands, the angiopoietins (Ang), induce receptor dimerization and phosphorylation [28], with Ang-1 acting as an agonist and Ang-2 as context-dependent antagonist or weak agonist [29, 30].

Other mutation players within the *TEK* pathway, especially those proximal to the receptor, could also be expected to yield similar, specific phenotypes. These include TIE-1, which can heterodimerise with *TEK* [31, 32]; the Ang ligands [29–35]; and the vascular endothelial protein tyrosine phosphatase (VE-PTP), which can specifically regulate *TEK* activation [36, 37].

Ang-1 stimulation of *TEK* has recently been found to induce the expression of Apelin, a ligand for the G-protein-coupled receptor (GPCR, also known as the APJ receptor), in ECs. This system in turn regulates the caliber of blood vessels [38] making it an attractive, as yet untested, candidate pathway through which the dilated channels in VM may occur.

TABLE 1: Primer sequences of all the exons of the *TEK* gene.

Exon	Amorce sens (5'-3')	Amorce antisens (5'-3')	PCR product
Exon1.1	AGTCTGAGAAGGATTGGTCATCA	CTGTCTGAGCACAGGGAGTTT	333 bp
Exon1.2	CAGCCCTGCTGATACCAAAT	CACTGATGAGATTTGGGGAGA	409 bp
Exon2	GTTTACCCAATGGGGTTCATG	AGCAGCTGCCAAGACAAAAG	448 bp
Exon3	AACGCATTAGCCACCACTGT	ACATCTGCCCAAGACCA	360 bp
Exon4	CTGAATAGTTCAGCATTTTCATTCT	CAATGCCTGGTTTTTGTCTTA	422 bp
Exon5	CTCCTTGTCTTTGTTTCTGTGC	AAATTCTAGATCCAGCAACGATG	399 bp
Exon6	GTTTCATCCTACCATGCCACA	TGATTCAAAATCCTGTTGTCCA	413 bp
Exon7	AGTTGGCATGATAGGAGCTCA	GGATGGAAACAAAAGAGGCTT	453 bp
Exon8	TCATCCACATCACAGGTGTCT	GTCAGTTCTGCCTCTCCAGG	469 bp
Exon9	TGGGGTCAATGTTATGGACC	TCCTGGAAATTACCCCAAAG	335 bp
Exon10	ATCACAAAACCTCAAAGCCG	AGCCACCACCTTGAGGTAGA	331 bp
Exon11	TTTCAAAAAGCCTAATTTTCCTCA	CACCCATTCAAAGCGAACT	462 bp
Exon12.1	AGTTGGCATGATAGGAGCTCA	GGATGGAAACAAAAGAGGCTT	453 bp
Exon12.2	TGGGGTCAATGTTATGGACC	TCCTGGAAATTACCCCAAAG	335 bp
Exon13	GCATAATGATCTAGGCCATGG	CCTATAGGGCTGCACGGTAA	413 bp
Exon14	GCTGCTGTTAAGTTCCCATTACA	AAGCCAAAGAGAAGATGAGGC	397 bp
Exon15	GTTTCATCCTACCATGCCACA	TGATTCAAAATCCTGTTGTCCA	413 bp
Exon16	TTTGGTTGTATACAGTTGATGGTGA	AGGCAAACCACAGCACAGTC	404 bp
Exon17	GTTTACCCAATGGGGTTCATG	AGCAGCTGCCAAGACAAAAG	448 bp
Exon18	TCTTCTGCCAAGATGTGGTG	CAGGGGAGTACCTCGGAAA	358 bp
Exon19	CTACCCAGCAATCATTTGTGG	TGCTAATTTATTTCTGAGCTTTTT	310 bp
Exon20	GTGCAAGGGCCTATCCTAGG	CCAAGTCACATCTGGTAGAACCA	304 bp
Exon21	ATGTGCAGTGAGTTTGCCAA	CGGCTGACTTTGCTAGAGTC	338 bp
Exon22	GTTTACCCAATGGGGTTCATG	AGCAGCTGCCAAGACAAAAG	448 bp
Exon23.1	AGGTGGAATCAAAGCAGCCT	CACGCCTTCTATGAAGTCC	414 bp
Exon23.2	AATCAGAATGCCTGTTTGTGG	TTCTTAGGCTTGTAAGCAATGAG	452 bp
3'UTR region	TCTCAATTTTATCCCTCACCTG	TAAAGTATAATAAGGACATGTGGCA	472 bp

bp: base pair.
3'UTR: 3' untranslated region.



FIGURE 4: Amplified fragments detected on 1.5% agarose gel electrophoresis of exon 17 for DNA from blood cells (lanes 1 to 10) and tissue of the biopsy (lane 11) of patients with venous malformation. Lane SM: 100 base-pair ladder (size markers).

Venous anomalies represent a significant fraction of patients seen at centers specialized in treating VM, as they can

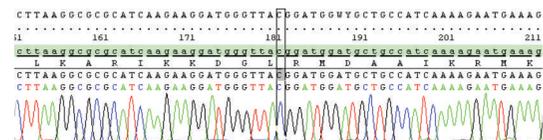


FIGURE 5: Result of direct sequencing of codon 849 of exon 15 in all the studied patients with venous malformation.

cause pain and affect appearance or organ function, due to their size, localization, and expansion.

The majority of VM are sporadic in nature and characterized by extensive, unifocal lesions of variable size, which can infiltrate deep into underlying tissues.

The search for mutations in other candidate genes (*ANG1*, *ANG2*, *TIE1*, *VE-PTP* [vascular endothelial protein tyrosine phosphatase] and the *APLN* genes) in the DNA from biopsies is the next step. If this proves unsuccessful, it will be necessary to achieve exome sequencing analysis, or whole genome sequencing, and to compare the sequences with those of exons and the entire genome of germline DNA from leukocytes of corresponding patient.

TABLE 2: Descriptions of patients with venous malformation.

Family	Patient symbol	Gender	Number of lesions	Location	Other patients in family
VMF01	VMF01.II.2	F	1	Lip	No
VMF02	VMF02.III.2	F	1	Lip	No
VMF03	VMF03.III.2	F	1	Lip	No
VMF04	VMF04.III.3	F	1	Lip	Yes
VMF04	VMF04.III.9	F	1	Lip	Yes
VMF05	VMF05.III.3	F	1	Lip	No
VMF06	VMF06.III.1	M	1	Lip	No
VMF07	VMF07.III.4	M	1	Genio-cervical	No
VMF08	VMF08.III.7	F	1	Lip	No
VMF09	VMF09.III.5	F	1	Lip	No
VMF10	VMF10.III.2	M	1	Lip	No

F: female; M: male.

5. Conclusions

The absence of mutation in the *TEK* gene in the population studied suggests that the *TEK* gene is not necessarily and not the sole gene involved in the onset of VM. It will be interesting to search on other mutated gene(s) responsible for the development of these malformations on much more patients. The exome sequencing should greatly help to unmask the other involved gene(s), which will be validated only after a study of random samples of the Tlemcen population, in order to ensure that it is not a neutral polymorphism, and that the mutation(s) is or are not found in healthy subjects. If so, the knowledge of the molecular and cellular dysfunctions in the signaling pathway that occur in the formation of the vascular network in endothelial cells will be greatly improved. Consequently, better therapeutic approaches to treat the abnormal angiogenesis of these patients could be developed.

Conflict of Interests

The authors declare that they have no competing interests.

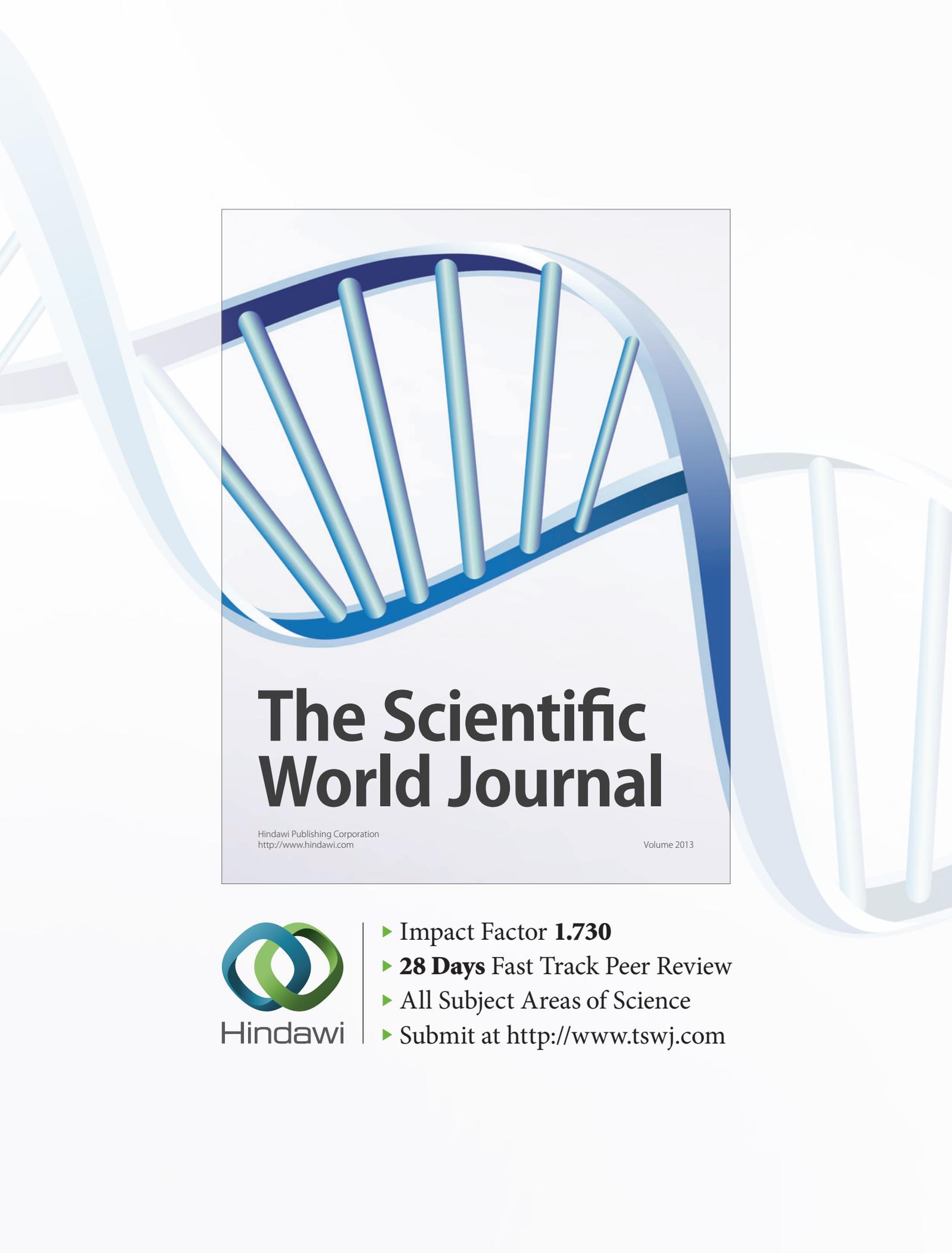
Acknowledgments

The authors are grateful to the patients and their families for their participation in this study. They would also like to address special thanks to Nathalie Ruiz-Pallares, Department of Genetics, CHRU, Montpellier, France. This research was supported by the Hubert Curien Partnership (PHC Tassili 10MDU794) and grants from the Ministry of Foreign and European Affairs (Ministère des Affaires Étrangères et Européennes, MAEE) and the Ministry of Higher Education and Research of Algeria (Ministère Algérien de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique, MESRS).

References

- [1] R. G. Elluru, "Cutaneous vascular lesions," *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*, vol. 21, no. 1, pp. 111–126, 2013.
- [2] O. Enjolras, "Hemangiomes," in *Atlas des Hémangiomes et Malformations Vasculaires Superficielles*, O. Enjolras, M. C. Riche, J. B. Mulliken, and J. J. Merland, Eds., pp. 17–54, Medsi McGraw-Hill, Paris, France, 1990.
- [3] F. Lemarchand-Venencien, "Classification of angiomas: hemangiomas and superficial vascular malformations," *Revue du Praticien*, vol. 42, no. 16, pp. 1998–2004, 1992.
- [4] D. A. Marchuk, S. Srinivasan, T. L. Squire, and J. S. Zawistowski, "Vascular morphogenesis: tales of two syndromes," *Human Molecular Genetics*, vol. 12, no. 1, pp. R97–R112, 2003.
- [5] J. Murthy, "Vascular anomalies," *Indian Journal of Plastic Surgery*, vol. 38, no. 1, pp. 56–62, 2005.
- [6] G. T. Richter and A. B. Friedman, "Hemangiomas and vascular malformations: current theory and management," *International Journal of Pediatrics*, vol. 2012, Article ID 645678, 10 pages, 2012.
- [7] A. Di Giovanni and L. Revelli, "Venous angiodysplasias with endoral manifestation. The problems of therapy," *Minerva stomatologica*, vol. 45, no. 3, pp. 113–119, 1996.
- [8] L. B. Kaban and J. B. Mulliken, "Vascular anomalies of the maxillofacial region," *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, vol. 44, no. 3, pp. 203–213, 1986.
- [9] J. A. Werner, A. A. Dünne, B. J. Folz et al., "Current concepts in the classification, diagnosis and treatment of hemangiomas and vascular malformations of the head and neck," *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, vol. 258, no. 3, pp. 141–149, 2001.
- [10] D. Herbreteau, O. Enjolras, and M. C. Riché, "Superficial venous malformations," *Revue du Praticien*, vol. 42, no. 16, pp. 2025–2030, 1992.
- [11] M. Vikkula, L. M. Boon, K. L. Carraway III et al., "Vascular dysmorphogenesis caused by an activating mutation in the receptor tyrosine kinase TIE2," *Cell*, vol. 87, no. 7, pp. 1181–1190, 1996.
- [12] L. M. Boon, J. B. Mulliken, M. Vikkula et al., "Assignment of a locus for dominantly inherited venous malformations to chromosome 9p," *Human Molecular Genetics*, vol. 3, no. 9, pp. 1583–1587, 1994.
- [13] V. Wouters, N. Limaye, M. Uebelhoer et al., "Hereditary cutaneous mucosal venous malformations are caused by TIE2 mutations with widely variable hyper-phosphorylating effects," *European Journal of Human Genetics*, vol. 18, no. 4, pp. 414–420, 2010.
- [14] N. Limaye, L. M. Boon, and M. Vikkula, "From germline towards somatic mutations in the pathophysiology of vascular anomalies," *Human Molecular Genetics*, vol. 18, no. 1, pp. R65–R74, 2009.

- [15] B. Sari, M. Aribi, and B. Saari, "Effect of endogamy and consanguinity on the development of labial venous malformations in area of Tlemcen (West Algeria)," *The Open Genomics Journal*, vol. 1, pp. 1-5, 2008.
- [16] O. Enjolras, M. C. Riche, and J. J. Merland, "Superficial arterial and venous malformations: clinical features and complementary investigations," *Annales de Chirurgie Plastique et Esthetique*, vol. 36, no. 4, pp. 271-278, 1991.
- [17] S. Rozen and H. Skaletsky, "Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers," *Methods in Molecular Biology*, vol. 132, pp. 365-386, 2000.
- [18] T. Hubbard, D. Barker, E. Birney et al., "The Ensembl genome database project," *Nucleic Acids Research*, vol. 30, no. 1, pp. 38-41, 2002.
- [19] D. J. Dumont, T. P. Yamaguchi, R. A. Conlon, J. Rossant, and M. L. Breitman, "Tek, a novel tyrosine kinase gene located on mouse chromosome 4, is expressed in endothelial cells and their presumptive precursors," *Oncogene*, vol. 7, no. 8, pp. 1471-1480, 1992.
- [20] H. Schnurch and W. Risau, "Expression of tie-2, a member of a novel family of receptor tyrosine kinases, in the endothelial cell lineage," *Development*, vol. 119, no. 3, pp. 957-968, 1993.
- [21] T. N. Sato, Y. Qin, C. A. Kozak, and K. L. Audus, "Tie-1 and tie-2 define another class of putative receptor tyrosine kinase genes expressed in early embryonic vascular system," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 90, no. 24, pp. 9355-9358, 1993.
- [22] D. J. Dumont, G. Gradwohl, G. H. Fong et al., "Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo," *Genes and Development*, vol. 8, no. 16, pp. 1897-1909, 1994.
- [23] D. J. Dumont, G. H. Fong, M. C. Puri, G. Gradwohl, K. Alitalo, and M. L. Breitman, "Vascularization of the mouse embryo: a study of flk-1, tek, tie, and vascular endothelial growth factor expression during development," *Developmental Dynamics*, vol. 203, no. 1, pp. 80-92, 1995.
- [24] T. N. Sato, Y. Tozawa, U. Deutsch et al., "Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation," *Nature*, vol. 376, no. 6535, pp. 70-74, 1995.
- [25] C. Suri, P. F. Jones, S. Patan et al., "Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis," *Cell*, vol. 87, no. 7, pp. 1171-1180, 1996.
- [26] J. Partanen and D. J. Dumont, "Functions of Tiel and Tie2 receptor tyrosine kinases in vascular development," *Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol. 237, pp. 159-172, 1999.
- [27] N. Jones, K. Iljin, D. J. Dumont, and K. Alitalo, "Tie receptors: new modulators of angiogenic and lymphangiogenic responses," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 2, no. 4, pp. 257-267, 2001.
- [28] L. Eklund and B. R. Olsen, "Tie receptors and their angiopoietin ligands are context-dependent regulators of vascular remodeling," *Experimental Cell Research*, vol. 312, no. 5, pp. 630-641, 2006.
- [29] P. C. Maisonpierre, C. Suri, P. F. Jones et al., "Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis," *Science*, vol. 277, no. 5322, pp. 55-60, 1997.
- [30] S. Loughna and T. N. Sato, "Angiopoietin and Tie signaling pathways in vascular development," *Matrix Biology*, vol. 20, no. 5-6, pp. 319-325, 2001.
- [31] P. Saharinen, K. Kerckelä, N. Ekman et al., "Multiple angiopoietin recombinant proteins activate the Tiel receptor tyrosine kinase and promote its interaction with Tie2," *Journal of Cell Biology*, vol. 169, no. 2, pp. 239-243, 2005.
- [32] H. T. Yuan, S. Venkatesha, B. Chan et al., "Activation of the orphan endothelial receptor Tiel modifies Tie2-mediated intracellular signaling and cell survival," *FASEB Journal*, vol. 21, no. 12, pp. 3171-3183, 2007.
- [33] D. M. Valenzuela, J. A. Griffiths, J. Rojas et al., "Angiopoietins 3 and 4: diverging gene counterparts in mice and humans," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 96, no. 5, pp. 1904-1909, 1999.
- [34] I. Cascone, L. Napione, F. Maniero, G. Serini, and F. Bussolino, "Stable interaction between $\alpha 5 \beta 1$ integrin and Tie2 tyrosine kinase receptor regulates endothelial cell response to Ang-1," *Journal of Cell Biology*, vol. 170, no. 6, pp. 993-1004, 2005.
- [35] K. L. Kim, I. S. Shin, J. M. Kim et al., "Interaction between Tie receptors modulates angiogenic activity of angiopoietin2 in endothelial progenitor cells," *Cardiovascular Research*, vol. 72, no. 3, pp. 394-402, 2006.
- [36] G. Fachinger, U. Deutsch, and W. Risau, "Functional interaction of vascular endothelial-protein-tyrosine phosphatase with the Angiopoietin receptor Tie-2," *Oncogene*, vol. 18, no. 43, pp. 5948-5953, 1999.
- [37] M. G. Dominguez, V. C. Hughes, L. Pan et al., "Vascular endothelial tyrosine phosphatase (VE-PTP)-null mice undergo vasculogenesis but die embryonically because of defects in angiogenesis," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, no. 9, pp. 3243-3248, 2007.
- [38] H. Kidoya, M. Ueno, Y. Yamada et al., "Spatial and temporal role of the apelin/APJ system in the caliber size regulation of blood vessels during angiogenesis," *EMBO Journal*, vol. 27, no. 3, pp. 522-534, 2008.



The Scientific World Journal

Hindawi Publishing Corporation
<http://www.hindawi.com>

Volume 2013



Hindawi

- ▶ Impact Factor **1.730**
- ▶ **28 Days** Fast Track Peer Review
- ▶ All Subject Areas of Science
- ▶ Submit at <http://www.tswj.com>