

Université de Montréal

**Mécanismes impliqués dans la modulation de la
néovascularisation post-ischémique :
Rôle de la rénine et des microARNs**

Par :
Michel Desjarlais

Département des sciences biomédicales
Faculté de Médecine

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en Sciences Biomédicales

Décembre, 2017

© Michel Desjarlais, 2017

Résumé

Les maladies cardiovasculaires ischémiques demeurent à ce jour la principale cause de morbidité et mortalité dans les pays industrialisés. La sévérité des dommages ischémiques est grandement influencée par la capacité adaptative de l'organisme à former de nouveaux vaisseaux sanguins (néovascularisation). Notre laboratoire a démontré au cours des dernières années que plusieurs facteurs de risques et phénotypes cliniques associés au développement de l'athérosclérose diminuent également la capacité de néovascularisation post-ischémique. Mes travaux de recherche visaient à mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la modulation de la néovascularisation post-ischémique en condition pathologique. Nous avons dans un premier temps étudié le rôle spécifique de la rénine, une composante du système rénine-angiotensine (RAS) dont la stimulation chronique est impliquée à la fois dans la l'athérosclérose, la dysfonction des cellules endothéliales (ECs) et l'inhibition de la néovascularisation. Par la suite, nous avons investigué le rôle potentiel des micro-ARNs (miRs) lors de la modulation de la néovascularisation post-ischémique en condition athérosclérotique. Les miRs sont des petits ARNs non codants qui régulent négativement l'expression de plus de 60% des gènes. Ils sont de plus en plus reconnus comme ayant un rôle essentiel lors des processus biologiques physiologiques et pathologiques. Dans cette thèse, nous avons utilisé un modèle murin d'ischémie de la patte pour tester l'hypothèse que la rénine et les miRs sont impliqués dans de la modulation de la néovascularisation post-ischémique lors de conditions pathologiques.

Les résultats de mon premier article ont permis de démontrer pour la première fois qu'une thérapie avec l'aliskiren, le seul inhibiteur direct de la rénine utilisé cliniquement, permet d'améliorer significativement la néovascularisation post-ischémique *in vivo*. En effet nous avons observé une amélioration de la récupération de la perfusion tissulaire, de la densité capillaire et artériolaire, et de l'expression de facteurs angiogéniques clés (VEGF, NO) dans les muscles ischémiques de souris traitées à l'aliskiren. En bref, nos résultats suggèrent que l'effet bénéfique de l'aliskiren sur la néovascularisation est au moins en partie causé par une action antioxydante qui améliore l'activité fonctionnelle des ECs et des cellules angiogéniques circulantes (PACs). Mon deuxième projet visait à identifier et caractériser le rôle de différents

miRs potentiellement impliqués dans la défaillance de néovascularisation post-ischémique associée aux conditions athérosclérotiques. En utilisant la technologie de séquençage de deuxième génération et le qRT-PCR, nous avons identifié 2 miRs qui sont fortement diminués en condition hypercholestérolémique : le miR-150 (un miR pro-angiogénique) et le miR-146b (un miR anti-inflammatoire). Nous avons démontré que ces 2 miRs sont diminués *in vivo* dans le muscle ischémique des souris hypercholestérolémiques (HC), et également *in vitro* dans des ECs humaines exposé aux oxLDL. La diminution de l'expression du miR-150 et du miR-146b par l'hypercholestérolémie et les oxLDL semble inhiber la néovascularisation post-ischémique par deux mécanismes distincts (article 2 et 3). D'une part, la diminution du miR-150 cause une défaillance des fonctions angiogéniques des ECs et des PACs en stimulant l'expression de SRCIN1, un important inhibiteur endogène de la voie pro-angiogénique Src/Akt/eNOS (article 2). D'autre part et de façon similaire aux oxLDL, l'inhibition du miR146b cause une dysfonction endothéliale en augmentant les niveaux de stress oxydant et d'inflammation, un mécanisme qui implique l'induction du gène pro-inflammatoire TRAF6 (article 3). De façon importante, nos résultats démontrent pour la première fois qu'une injection intramusculaire locale de miR-150 ou de miR-146b permet de récupérer la néovascularisation post-ischémique en condition d'hypercholestérolémie. Nous avons aussi démontré que l'expression forcée du miR-150 ou du miR-146b améliore la fonction angiogénique des ECs humaines exposées aux oxLDL. Finalement, le nombre et l'activité fonctionnelle des PACs isolées de la moelle osseuse des souris HC peuvent aussi être restaurés par miR-150 et miR-146b. En conclusion, nos travaux ont permis d'identifier et de caractériser le rôle de miR-150 et de miR-146b dans la défaillance angiogénique lors de conditions athérosclérotiques. Cette thèse démontre aussi pour la première fois que des thérapies basées sur l'inhibition de la rénine ou la modulation de miRs spécifiques permettent d'améliorer la néovascularisation post-ischémique lors de situations pathologiques. Nos résultats pourraient donc aider au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement des maladies cardiovasculaires ischémiques sévères.

Mots-clés : Néovascularisation, Angiogenèse, Cellule endothéliale (EC), Cellule Pro-Angiogénique (PAC), Athérosclérose, Hypercholestérolémie, micro-ARN (miR), Rénine, Inflammation, Stress oxydant, Ischémie

Abstract

Ischemic cardiovascular diseases remain the leading cause of morbidity and mortality in industrialized countries. The severity of ischemic damages is greatly influenced by the ability of the organism to form new blood vessels (neovascularization). Our laboratory has demonstrated in recent years that several risk factors and clinical phenotypes associated with the development of atherosclerosis can also impair post-ischemic neovascularization. The purpose of my research was to better understand the mechanisms that are involved in the modulation of post-ischemic neovascularization in pathological conditions. We first investigated the specific role of renin, a key component of the renin-angiotensin system (RAS) whose chronic stimulation is involved in atherosclerosis, endothelial cell (EC) dysfunction and the inhibition of neovascularization. Subsequently, we investigated the potential role of microRNAs (miRs) in the modulation of post-ischemic neovascularization under atherosclerotic conditions. miRs are small non-coding RNAs that negatively regulate the expression of more than 60% of genes. They are increasingly recognized as having a vital role in physiological and pathological biological processes. In this thesis, we used a mouse model of hindlimb ischemia to test the hypothesis that renin and miRs are involved in the modulation post-ischemic neovascularization during pathological conditions.

The results of my first article demonstrate for the first time that treatment with aliskiren, the only direct renin inhibitor used clinically, significantly improves post-ischemic neovascularization *in vivo*. Indeed, we observed an improvement of tissue perfusion recovery, capillary and arteriolar densities, and higher expression of key angiogenic factors (VEGF, NO) in ischemic muscles of mice treated with aliskiren. In summary, our results suggest that the beneficial effect of aliskiren on neovascularization is at least in part due to an antioxidant action that enhances the functional activity of ECs and circulating angiogenic cells (PACs). My second project aimed at identifying and characterizing the role of different miRs which could be involved in post-ischemic neovascularization failure associated with atherosclerotic conditions. Using next-generation sequencing technology and qRT-PCR, we identified 2 miRs that are significantly decreased in hypercholesterolemic conditions: miR-150 (a pro-angiogenic miR)

and miR-146b (an anti-inflammatory miR). We have shown that these 2 miRs are decreased *in vivo* in the ischemic muscles of hypercholesterolemic (HC) mice, and also *in vitro* in human ECs exposed to oxLDL. Decreased expression of miR-150 and miR-146b by hypercholesterolemia and oxLDL appears to inhibit post-ischemic neovascularization by two distinct mechanisms (Article 2 and 3). On one hand, decreased expression of miR-150 impairs the angiogenic functions of ECs and PACs by stimulating the expression of SRCIN1, an important endogenous inhibitor of the pro-angiogenic Src / Akt / eNOS pathway (article 2). On the other hand, decreased expression of miR146b causes endothelial dysfunction by increasing oxidative stress and inflammation, a mechanism that involves the induction of the pro-inflammatory TRAF6 gene (Article 3). Importantly, our results demonstrate for the first time that a local intramuscular injection of miR-150 or miR-146b can recover post-ischemic neovascularization in hypercholesterolemic conditions. We also show that forced expression of miR-150 or miR-146b can enhance the angiogenic functions of human ECs exposed to oxLDL. Finally, the number and functional activity of bone marrow PACs isolated from HC mice can also be restored by miR-150 and miR-146b. In conclusion, our work has characterized the role of miR-150 and miR-146b for the angiogenic failure associated with atherosclerotic conditions. This thesis also demonstrates for the first time that therapies based on the inhibition of renin or the modulation of specific miRs can improve post-ischemic neovascularization in pathological situations. Our results could help developing new strategies for the treatment of severe ischemic cardiovascular diseases.

Keywords: Neovascularization, Angiogenesis, Endothelial Cell (EC), Proangiogenic Cell (PAC), Atherosclerosis, Hypercholesterolemia, micro-RNA (miR), Renin, Inflammation, Oxydative stress, Ischemia

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des figures	ix
Liste des abréviations, sigles et acronymes	xi
Remerciements.....	xvii
I-Introduction	1
Chapitre 1. Introduction générale	1
1.1. Problématique	1
1.2. Définition et types de maladies cardiovasculaires	1
1.3. La réponse physiologique de néovascularisation est influencée par les facteurs de risques cardiovasculaires	2
1.4. Objectif général de la thèse.....	3
Chapitre 2. Physiologie du système cardiovasculaire et biologie des vaisseaux	4
2.1. Généralités	4
2.2. Architecture du système circulatoire	4
2.3. Structure et fonctions biologiques des vaisseaux	6
2.3.1. L'aorte.....	6
2.3.2. Structure et composition des artères	6
2.3.3. Les vaisseaux de moyen et petit calibre : artériole et capillaire	8
2.4. Rôle physiologique de l'endothélium	9
2.4.1. Description de l'endothélium vasculaire	9
2.4.2 Type de réponses endothéliales	10
2.4.3. Fonction vasomotrice de l'endothélium.....	10
2.4.4 Fonction anti-thrombotique et pro-coagulante.....	10
2.4.5 Rôle dans l'inflammation.....	11
2.4.6 Fonction de perméabilité.....	11
2.4.7 Endothélium et angiogenèse	12
Chapitre 3. La dysfonction endothéliale à l'origine des maladies cardiovasculaires	13
3.1. Définition et caractéristiques de l'endothélium dysfonctionnel	13
3.2. Le NO, un indicateur de la santé endothéliale	15
3.3. eNOS: structure et régulation.....	16
3.4. Une réduction de la biodisponibilité du NO favorise la dysfonction endothéliale	17
3.5. Le stress oxydant: la principale cause à l'origine de la dysfonction endothéliale	17
3.5.1. Définition du stress oxydant et contribution à la dysfonction endothéliale.....	17
3.5.2. Sources et types de ROS vasculaires.	18
3.6. Rôle du système rénine angiotensine (RAS) dans la dysfonction endothéliale.....	21
3.6.1 Généralité et fonctionnement du système RAS	21
3.6.2. Rôle pathologique de l'Ang2 dans la dysfonction endothéliale	23

3.6.3. Effets bénéfiques potentiels des inhibiteurs de l'enzyme de conversion (ACEI) et des bloqueurs des récepteurs de l'angiotensine (ARB).....	24
3.6.4. Potentiel thérapeutique de l'Aliskiren sur la fonction endothéliale.....	24
3.7. Les oxLDL favorise la dysfonction endothéliale.....	26
3.7.1. Interrelation entre oxLDL et inflammation.....	26
3.7.2. Rôle des oxLDL dans la dysfonction endothéliale.....	26
3.7.3. Mécanismes de signalisation intracellulaires induits par les oxLDL.....	27
3.7.5. Effets des oxLDL sur la capacité angiogénique des ECs.....	29
3.8. Résumé du chapitre.....	30
Chapitre 4. L'athérosclérose.....	31
4.1. Définition et généralité.....	31
4.2. Anatomopathologie de l'athérosclérose : stades évolutifs de la plaque.....	32
4.2.1. Stade 1-3 : cliniquement silencieux.....	32
4.2.2. Stade 4 et 5 : plaque simple, symptomatique ou non.....	33
4.2.3. Stade 6 : plaque compliquée.....	33
4.3. Les différentes théories sur l'origine de l'athérosclérose.....	34
4.3.1. L'hypothèse de la réponse à l'injure.....	35
4.3.2. L'hypothèse de la modification oxydative des LDLs.....	35
4.4. Rôle de l'immunité et de l'inflammation dans l'athérosclérose.....	38
4.4.1. L'hypothèse inflammatoire : historique.....	38
4.4.2. L'hypothèse inflammatoire moderne.....	38
4.4.3. Recrutement des cellules immunes à la paroi des vaisseaux.....	39
4.5. Rôle des cytokines dans l'athérosclérose.....	45
4.5.1 Cytokines pro-athérogéniques : IFN γ , TNF- α et IL-1.....	46
4.5.2. Les cytokines anti-athérogéniques : IL-10, TFG- β et IL-33.....	47
4.5.3. Les chimiokines.....	48
4.5.4 Régulation de la signalisation moléculaire inflammatoire médiée par les cytokines.....	48
4.6. Rôle du stress de cisaillement dans l'athérosclérose.....	49
4.7. Manifestation clinique de l'athérosclérose et résumé de chapitre.....	51
Chapitre 5. Les facteurs de risque cardiovasculaire.....	52
5.1. Généralité.....	52
5.2. Les facteurs de risque non modifiable.....	52
5.2.1 Vieillesse.....	52
5.2.2. Hérité, genre et l'ethnicité.....	53
5.3. Les facteurs de risques modifiables.....	55
5.3.1. L'hypercholestérolémie et la dyslipidémie.....	55
5.3.2. Le tabagisme.....	60
5.3.3. Le diabète.....	62
5.3.4. L'hypertension.....	63
5.4. Résumé du chapitre.....	65
Chapitre 6. La néovascularisation.....	66
6.1. L'angiogénèse : historique et déclenchement.....	69
6.1.1 Type d'angiogénèse : bourgeonnement et intussusception.....	70
6.1.2. Vue d'ensemble des différentes étapes de l'angiogénèse.....	72

6.1.3. Induction de l'angiogenèse par l'hypoxie : rôle du système HIF	73
6.1.4. La phase d'activation : hyperperméabilité, migration et prolifération	74
6.1.5. La phase de maturation : rôle des tip cells et des stalk cells.....	75
6.1.6. La phase de résolution : maturation et stabilisation des vaisseaux.....	77
6.1.7. Régulation de l'angiogenèse : les facteurs angiogéniques et voies de signalisations importantes.....	78
6.1.8. Importance de Src dans l'angiogenèse.....	88
6.1.9. La régulation négative de l'angiogenèse : les facteurs anti-angiogéniques.....	91
6.1.10. Résumé des principales voies de signalisations angiogéniques.....	92
6.2. La vasculogenèse et le rôle des cellules pro-angiogéniques (PACs).....	95
6.2.1. Origine, identification et localisation des EPCs/PACs.....	97
6.2.2. Les activités fonctionnelles des PACs : vue d'ensemble des processus impliqués dans le recrutement des PACs aux sites de néovascularisation	97
6.2.3. Mécanismes de mobilisation périphérique des PACs : rôle du VEGF et du SDF-199	
6.2.4. Recrutement des PACs aux tissus ischémiques : migration, adhésion et invasion	101
6.2.5. Contribution des PACs à la néovascularisation post-ischémique et potentiel thérapeutique pour les maladies cardiovasculaires	103
6.3. L'artériogenèse	105
6.3.1. Rôle des forces mécaniques et des monocytes dans l'artériogenèse	106
6.3.2. Changement morphologique observé durant l'artériogenèse	107
6.4. Influence des facteurs de risques cardiovasculaires sur la néovascularisation	108
6.4.1. Effet délétère de l'hypercholestérolémie et du stress oxydant sur la néovascularisation.....	109
6.4.2. Double influence de l'inflammation sur la néovascularisation.....	111
6.4.3. L'activation chronique du système rénine-angiotensine (RAS) est associée à une défaillance de néovascularisation : ambiguïté et controverse.....	112
6.5. Efficacité des stratégies thérapeutiques de néovascularisation : études cliniques et animales	114
6.6. Résumé de chapitre.....	115
Chapitre 7. Les microARNs.....	117
7.1. Généralité.....	117
7.2. Les ARNs non codants : historique, différence et importance	118
7.3. Biogenèse et mécanisme d'action des miRs	120
7.4. Modulation du profil d'expression des miRs dans les pathologies cardiovasculaires.	123
7.5. Rôle physiologique et pathologique des miRs sur la fonction endothéliale	125
7.6. Rôle des miRs dans le développement de l'athérosclérose : mécanismes associés.....	128
7.7. Rôle général des miRs dans la néovascularisation	130
7.7.1. Régulation de l'angiogenèse et des PACs par les miRs : mécanismes et études animales	131
7.8. Résumé de chapitre et perspectives thérapeutiques	133
II-Hypothèse et objectifs de recherche	137
1. Problématique et hypothèse générale.....	138
2. Projet de recherche #1 : Rôle de la rénine dans la néovascularisation post-ischémique	139
2.1. Mise en contexte	139

2.2. Hypothèse et objectifs spécifiques	139
3. Projet de recherche #2 : Rôle des miRs dans la néovascularisation post-ischémique en condition athérosclérotique	140
3.1. Mise en contexte	140
3.2. Hypothèse et objectifs spécifiques	140
III-Méthodes et résultats	141
1. Premier article	142
2. Deuxième article	169
3. Troisième article	208
IV-Discussion	239
V-Conclusion	270
VI-Bibliographie	272

Liste des figures

Figure 1.	Architecture du système circulatoire.	5
Figure 2.	Structure des vaisseaux sanguins.	7
Figure 3.	Fonctions et caractéristiques de l'endothélium en condition physiologique et pathologique	9
Figure 4.	Mécanismes associés à la dysfonction endothéliale.	14
Figure 5.	Structure et mécanisme de découplage d'eNOS.	16
Figure 6.	Sources et médiateurs intracellulaires générant des espèces réactives d'oxygènes (ROS) dans les vaisseaux.....	19
Figure 7.	Implication du système RAS dans les maladies cardiovasculaires.....	22
Figure 8.	Effets pathologiques des oxLDL sur les ECs et différents types cellulaires impliqués dans l'athérosclérose.	29
Figure 9.	Stades évolutifs de l'athérosclérose.	32
Figure 10.	Mécanismes et éléments associés au développement de l'athérosclérose	37
Figure 11.	Étapes d'adhésion des leucocytes à l'endothélium	40
Figure 12.	Formation de la cellule spumeuse.	42
Figure 13.	Polarisation des macrophages M1 vs M2 : rôles et caractéristiques.....	44
Figure 14.	Régulation de l'inflammation par les cytokines: voies de signalisation impliquées et rôles de NF- κ B.	49
Figure 15.	Régions artérielles sujettes à l'athérosclérose.....	50
Figure 16.	Structure des lipoprotéines, transport du cholestérol et rôle de l'ApoE.	59
Figure 17.	Processus impliqués dans la néovascularisation post-ischémique.	68
Figure 18.	La « switch angiogénique » contrôle le déclenchement de l'angiogenèse.....	70
Figure 19.	Les deux principaux types d'angiogenèse.....	71

Figure 20. Les différentes étapes de l'angiogenèse et molécules impliquées.	73
Figure 21. Le système HIF.	74
Figure 22. Formation du tubule et de la lumière.	77
Figure 23. Liste et fonctions des principaux facteurs angiogéniques.	79
Figure 24. Les récepteurs au VEGF et voies de signalisations impliquées	82
Figure 25. Mécanisme d'activation de Src et voies de signalisations impliquées.	90
Figure 26. Signalisations impliquées dans la prolifération/ migration/survie des ECs.	93
Figure 27. Identification et caractéristiques des 3 principaux sous-types cellulaires impliqués dans la néovascularisation post-ischémique.	96
Figure 28. Étapes chronologiques de la mobilisation des PACs aux sites de néovascularisation.	99
Figure 29. La mobilisation des PACs.	101
Figure 30. Mécanismes de l'artériogenèse.	106
Figure 31. Effets délétères des facteurs de risques de l'athérosclérose sur la néovascularisation post-ischémique.	111
Figure 32. Biosynthèse, localisation génique et « seed sequence » des miRs.	122
Figure 33. miRs modulés par les facteurs de risques de l'athérosclérose et implication dans les pathologies cardiovasculaires.	124
Figure 34. Rôle des miRs dans la biologie vasculaire.	127
Figure 35. Principaux miRs et cibles validées régulant des processus angiogéniques.	131

Liste des abréviations, sigles et acronymes

ABCA1	<i>ATP Binding Cassette Subfamily A</i>
ACE	<i>Angiotensin-Converting Enzyme</i>
ACT	Accident Vasculaire Transitoire
ADMA	<i>Asymmetric DiMethylArgine</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGE	<i>Advanced Glycation End products</i>
Ago	Ago Argonaute 2
Akt	<i>Akt Protein Kinase B</i>
ALK5	<i>transforming growth factor beta receptor 1</i>
ANGPT	<i>Angiopoietin</i>
AP1	<i>Activator protein 1</i>
Apo	<i>Apolipoprotein</i>
ARB	<i>Angiotensin II receptor blockers</i>
ARNm	ARN messenger
ARNnc	ARN non codant
ARNnm	ARN non messenger
Ang1	<i>Angiotensin I</i>
Ang2	<i>Angiotensin II</i>
AT1	<i>Angiotensin II receptor 1</i>
AT2	<i>Angiotensin II receptor 2</i>
AVC	Accident Vasculaire Cérébrale
BAD	<i>BCL2 Associated Agonist of Cell Death</i>
BAX	<i>BCL2 Associated X Protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BH4	<i>TetraHydroBiopterin</i>
CAD	<i>Coronary Artery Disease</i>
CBP	<i>CREB-binding protein</i>
CCL	<i>Chemokine ligands</i>

CCR	<i>Chemokine receptors</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CD40L	<i>Tumor Necrosis Factor (Ligand) Superfamily Member 5</i>
c-Kit	<i>Proto-Oncogene Receptor Tyrosine Kinase KIT</i>
CRP	<i>Protéine réactive C</i>
CSF	<i>Colony Stimulating Factor</i>
CSK	<i>C-terminal Src kinase</i>
CTGF	<i>Connective Tissue Growth Factor</i>
CXCL	<i>Motif Chemokine Ligand</i>
CXCR	<i>Motif Chemokine Receptor</i>
DC	<i>Dendritic Cells</i>
DEP1	<i>Density-Enhanced Phosphatase 1</i>
DGCR8	<i>DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8</i>
DilAcLDL	<i>dil fluorescence Acetylated low-density lipoprotein</i>
Dll4	<i>Delta Like Canonical Notch Ligand 4</i>
Droscha	<i>Double-Stranded RNA-Specific Endoribonuclease</i>
DUOX	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase</i>
EC	<i>Endothelial cell</i>
EDF-1	<i>Endothelial Differentiation related Factor-1</i>
EDRF	<i>Endothelium-Derived Relaxing Factor</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGRF	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
eNOS	<i>Endothelial Nitric Oxide Synthase</i>
EPC	<i>Endothelial progenitor cell</i>
ERK	<i>Extracellular signal-Regulated Kinases</i>
ET-1	<i>Endothelin 1</i>
FAD	<i>Flavin Adenine Dinucleotide</i>
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
FASL	<i>Fas Antigen Ligand</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>

FGFR	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i>
FLT	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>
G-CSF	<i>Granulocyte-Colony Stimulating Factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor</i>
GPx	<i>Glutathion Peroxydase</i>
H ₂ O ₂	<i>Peroxyde d'hydrogène</i>
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HIF-1	<i>Hypoxia-Inducible Factor-1</i>
HOCL	<i>Acide hypochloreux</i>
HOXA	<i>Homeobox A Cluster</i>
HRE	<i>Hypoxia-Response Element</i>
ICAM-1	<i>Inter-Cellular Adhesion Molecule-1</i>
IDL	<i>Intermediate-Density Lipoproteins</i>
INF	<i>Interferon</i>
IGF-1	<i>Insulin-like Growth Factor-1</i>
IgG	<i>Immunoglobuline</i>
IL	<i>Interleukin</i>
iNOS	<i>inducible Nitric Oxide Synthase</i>
IRAK	<i>Interleukin-1 Receptor Associated Kinase</i>
JAK	<i>Janus Kinase</i>
kDa	<i>kilodalton</i>
KDR	<i>Kinase Insert Domain Receptor</i>
KitL	<i>Proto-Oncogene Tyrosine-Protein Kinase Kit Ligand</i>
KO	<i>Knockout</i>
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LDLR	<i>Low Density Lipoprotein Receptor</i>
lincRNA	<i>Long noncoding RNA</i>
LOX-1	<i>Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor 1</i>

LPS	Lipopolysaccharide
M1	Macrophages M1
M2	Macrophages M2
MAPKs	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>
MCP-1	<i>Monocyte Chemotactic Protein-1</i>
M-CSF	<i>Macrophage-Colony-Stimulating Factor</i>
MEC	Matrice extracellulaire
MEK	<i>MAP kinase kinase</i>
IM	Infarctus du myocarde
MIP	<i>Macrophage Inflammatory Proteins</i>
miR	<i>microRNA</i>
MMP	<i>Matrix MetalloProteinases</i>
MP	Microparticule
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MSC	<i>Mesenchymal Stem Cells</i>
MT-MMP	<i>Membrane MetalloProteinases</i>
NADPH	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>
NF- κ B	<i>Nuclear Factor-kappa B</i>
nNOS	<i>Neuronal Nitric Oxide Synthase</i>
NO	<i>Nitric oxyde</i>
NOS3	<i>Nitric Oxide Synthase 3</i>
Notch-1	<i>Notch homolog 1</i>
NOX	<i>NADPH oxydase</i>
NSG	<i>Next Generation Sequencing</i>
O ₂ -	Anion superoxyde
OH-	Radical hydroxyle
ONOO-	Anion peroxydrite
oxLDL	<i>Oxidized low-density lipoprotein</i>
P300	<i>E1A Binding Protein P300</i>
P38	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase P38</i>

PA	<i>Plasminogen Activator</i>
PAC	<i>Proangiogenic cell</i>
PAI-1	<i>Plasminogen Activator Inhibitor-1</i>
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PDGFR	<i>Platelet-Derived Growth Factor Receptor</i>
PECAM-1	<i>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1</i>
PF4	<i>Platelet Factor 4</i>
PGE ₂	<i>Prostaglandin E2</i>
PGI	<i>Prostacycline</i>
PHDs	<i>Prolyl Hydroxylase Domain proteins</i>
PI3K	<i>PhosphoInositide 3-Kinase</i>
PIGF	<i>Placental growth factor</i>
PKC	<i>Protein Kinase C</i>
PLC	<i>PhosphoLipase C</i>
PNN	<i>Polynucléaires neutrophiles</i>
pre/pri-miR	<i>microRNA Precursor Molecules</i>
pVHL	<i>von Hippel–Lindau tumor suppressor</i>
RAC	<i>Rho Family, Small GTP Binding Protein Rac1</i>
RAF	<i>Proto-Oncogene Serine/Threonine Protein Kinase</i>
RAGE	<i>receptor for advanced glycation end products</i>
RANTE	<i>C-C Motif Chemokine Ligand 5</i>
RAS	<i>proto-oncogene RAS</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNS	<i>Reactive nitrogen species</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SAPK	<i>Stress-activated protein kinases</i>
SCA-1	<i>Stem cells antigen-1</i>
SDF	<i>Stromal cell-Derived Factor</i>
SHP	<i>Small Heterodimer Partner</i>
siRNA	<i>Interfering RNA</i>

Sirt1	<i>Silent Information Regulator 1</i>
sKitL	<i>soluble Kit Ligand</i>
SMC	Cellules Musculaires Lisses
SOD	Superoxyde Dismutase
SP1	<i>Transcription factor Sp1</i>
SPRED1	<i>Protein Phosphatase 1</i>
SR	<i>Scavenger Receptors</i>
Src	<i>Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src</i>
SRCIN1	<i>Src Kinase Signaling Inhibitor 1</i>
SSRE	<i>Shear Stress Responsive Elements</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator Of Transcription</i>
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TFG-B R	<i>Transforming Growth Factor Receptor</i>
TH	Lymphocytes T auxiliaires
Tie	<i>Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains</i>
TIMP	<i>Tissue Inhibitor of MetalloProteinases</i>
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TRAF	<i>TNF receptor Associated Factors</i>
TSP	Thrombospondine
TU	<i>Transcription Units</i>
TXA ₂	Thromboxane A ₂
UTR	<i>UnTranslated Regions</i>
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>
VHL	<i>Von Hippel-Lindau protein</i>
VLDL	<i>Very Low-Density Lipoproteins</i>
VPF	<i>Vascular Permeability Factor</i>
vWF	<i>von Willebrand Factor</i>

Remerciements

J'aimerais tout premièrement remercier mon directeur de recherche, ami et mentor, le Dr Alain Rivard, pour son accueil chaleureux au sein de son équipe de recherche, ainsi que pour la confiance qu'il m'a accordée tout au long de mon doctorat. J'ai eu le privilège de participer à la publication de plusieurs articles scientifiques et congrès internationaux durant mes études dans son laboratoire, et Alain y a grandement contribué. En effet, son optimisme, sa disponibilité, son support et ses précieux conseils ont grandement contribué à ma motivation et aux succès obtenus lors de mes études au doctorat. Je tiens également à remercier tous les membres de l'équipe de recherche et collaborateurs et en particulier Sylvie pour son aide précieuse au cours de mon cursus académique. Ce fut un honneur de faire partie de cette équipe de recherche où l'esprit d'équipe et l'enthousiasme font partie de la culture de ce laboratoire. Je voudrais aussi remercier ma conjointe Lysiane, ma fille Kelyane et mon garçon Zack qui ont su me donner l'énergie et la force, par leur amour, de compléter ma formation avec succès. Une mention spéciale pour Serge, Sylvie, Louis et Richard pour leurs supports et leurs encouragements pendant mes études. Sans oublier les membres du jury (Gilles, Martin, Pedro et Michel) d'avoir accepté de lire et d'évaluer cette thèse. Pour finir, je tiens à souligner la contribution du CRCHUM, la FESP de l'Université de Montréal et l'IRSC pour leur diverse contribution financière au cours de mes études doctorales.

I-Introduction

Chapitre 1. Introduction générale

1.1. Problématique

Les maladies cardiovasculaires causées par l'athérosclérose sont encore aujourd'hui la première cause de mortalité mondiale, avec 17 millions de décès annuels (OMS, 2015). De plus, selon les projections de l'OMS, le nombre de morts attribuable à ces maladies augmentera de 35 % d'ici 2025. Les statistiques montrent à quel point la mise en place de nouvelles stratégies dans le traitement de ces pathologies devient un enjeu de société prioritaire. La progression dans la découverte de thérapies novatrices passe en grande partie par la recherche fondamentale et par une meilleure compréhension des mécanismes de régulation moléculaire associés à ces physiopathologies. Plus précisément, il est important de mieux caractériser les processus qui sont impliqués dans la modulation de la réponse physiologique et pathologique de l'organisme à l'ischémie tissulaire. Lors de cette réponse à l'ischémie, la sévérité des dommages aux tissus est directement influencée par la capacité de l'organisme à former de nouveaux vaisseaux sanguins, un processus appelé néovascularisation.

1.2. Définition et types de maladies cardiovasculaires

Selon l'agence de la santé publique du Canada, les maladies cardiovasculaires sont définies comme des pathologies affectant le cœur et le système circulatoire (vaisseaux sanguins) et sont classées en 6 catégories. La première catégorie est la cardiopathie ischémique touchant les artères coronaires. Par définition, le terme ischémie correspond à une diminution sous la normale du taux d'oxygène aux cellules causé par un apport sanguin insuffisant vers les tissus (Buja 2005). La cardiopathie ischémique est la maladie cardiovasculaire la plus répandue dans les pays industrialisés et elle cause des problèmes d'irrigation aux tissus cardiaques (Lloyd-Jones et al. 2009). La sévérité de l'ischémie est dépendante du degré d'obstruction du vaisseau atteint. Par exemple, une obstruction partielle des artères coronaires peut engendrer des

symptômes tels que l'angine de poitrine et l'essoufflement, alors qu'un blocage complet de ces mêmes artères mènera à un infarctus du myocarde (Lloyd-Jones et al. 2009). La deuxième catégorie en importance est la maladie cérébrovasculaire et inclut l'ICT et l'AVC. L'ICT (ischémie cérébral transitoire) correspond à un blocage d'un vaisseau cérébral dont les effets sont inférieurs à 24 h, alors que L'AVC (accident vasculaire cérébral) est caractérisé par un blocage complet dont les effets se manifestent à long terme (Lloyd-Jones et al. 2009). Parmi les autres catégories de pathologies ischémiques, nous retrouvons la maladie vasculaire périphérique causant de l'ischémie au niveau des membres inférieurs. Ce type d'ischémie cause des problèmes allant de la simple douleur à l'amputation du membre inférieur. Les trois dernières catégories incluent l'insuffisance cardiaque, le rhumatisme cardiaque et la cardiopathie congénitale (Lloyd-Jones et al. 2009).

1.3. La réponse physiologique de néovascularisation est influencée par les facteurs de risques cardiovasculaires

La principale cause des maladies cardiovasculaires ischémiques est l'athérosclérose. L'athérosclérose est caractérisée par un remaniement et une diminution variable du diamètre interne des artères de moyen et gros calibre (Bentzon et al. 2014). L'atteinte artérielle peut être localisée ou diffuse et cause en aval de l'obstruction une ischémie tissulaire de gravité variable selon le degré de sténose (Bentzon et al. 2014). La réponse physiologique adaptative de l'organisme à l'ischémie implique la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. La sévérité des dommages ischémiques aux tissus est donc grandement influencée par la capacité de néovascularisation des individus. De façon intéressante, il est maintenant connu que les mêmes facteurs de risques cardiovasculaires impliqués dans le développement de l'athérosclérose (hypercholestérolémie, tabagisme, hypertension, diabète et vieillissement) diminuent aussi la capacité de néovascularisation post-ischémique (Groleau et al. 2011; Haddad et al. 2011; Michaud et al. 2003; Arboix 2015). Les mécanismes impliqués dans l'action délétère de ces facteurs de risques sur la néovascularisation demeurent mal définis et impliqueraient en partie un excès de stress oxydant et d'inflammation causant la dysfonction endothéliale (Soccio et al. 2005; Ebrahimian et al. 2006; Haddad et al. 2011). Toutefois, les mécanismes moléculaires précis demeurent encore inconnus. Lorsque l'athérosclérose est trop diffuse et que les

interventions chirurgicales de revascularisation ne peuvent être effectuées, les thérapies visant à stimuler la néovascularisation deviennent une option thérapeutique intéressante et prometteuse (Deveza, Choi, and Yang 2012).

1.4. Objectif général de la thèse

Au cours de mes études doctorales, je me suis intéressé à mieux comprendre plusieurs mécanismes moléculaires impliqués dans la néovascularisation post-ischémique physiologique, mais aussi en condition pathologique (néovascularisation insuffisante). Plus précisément, divers mécanismes impliqués dans la défaillance de néovascularisation causée par des conditions athérosclérotiques ont été étudiés dans divers modèles *in vivo* et *in vitro*. Également, la caractérisation de ces mécanismes a permis d'évaluer le potentiel thérapeutique de divers traitements géniques et pharmacologiques sur la néovascularisation dans un modèle de souris ischémique. Au cours de cette thèse, je me suis particulièrement intéressé au rôle des micro-ARNs (miRs) dans la néovascularisation post-ischémique en condition hypercholestérolémique. Les miRs sont d'importants régulateurs post-transcriptionnels impliqués dans tous les processus cellulaires (Huang et al. 2011; Tufekci et al. 2014). Toutefois, leurs rôles dans la néovascularisation post-ischémique en condition athérosclérotique demeurent inconnus. Mes travaux effectués dans le cadre de cette thèse ont permis d'approfondir les connaissances sur la fonction des miRs et de leurs cibles moléculaires en condition de néovascularisation déficiente. Également, dans un deuxième projet de recherche, j'ai étudié le rôle du système rénine-angiotensine (RAS) dans la réponse de néovascularisation post-ischémique. L'activation chronique du système RAS est liée à plusieurs pathologies cardiovasculaires, dont l'hypertension, l'athérosclérose et la dysfonction endothéliale (Ferrario 2006; Holtz and Goetz 1994). Dans ce projet, le potentiel thérapeutique de l'aliskiren (le seul inhibiteur direct de la rénine utilisé cliniquement) a été investigué dans un contexte de néovascularisation post-ischémique. Cette thèse couvre de façon élargie différents aspects nécessaires à la compréhension des mécanismes impliqués dans la modulation de la néovascularisation post-ischémique dans un contexte physiologique et pathologique.

Chapitre 2. Physiologie du système cardiovasculaire et biologie des vaisseaux

2.1. Généralités

Le système circulatoire est défini comme un système fermé assurant la distribution du sang dans tout l'organisme via différent type de vaisseaux. Les vaisseaux sanguins ont comme principales fonctions de permettre la survie des tissus par le transport, l'échange biochimique et l'élimination de diverses substances contenues dans le sang (ex : oxygène, nutriment, hormone, CO₂, déchet métabolique). Le maintien de l'intégrité du réseau vasculaire est donc nécessaire à la survie de l'organisme (Aird 2011). Après la naissance, en condition physiologique, peu de changements de vascularisation sont observés mis à part lors de certains processus comme la cicatrisation et le cycle menstruel (Ribatti et al. 1991). Ces processus peuvent donner lieu à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (néovascularisation). La modulation de la néovascularisation survient principalement en état pathologique et est souvent associée à la sévérité de la maladie (ex : cancers, pathologies cardiovasculaires ischémiques, rétinopathie diabétique, etc.) (Timar et al. 2001). Par exemple, dans le cas du cancer, une néovascularisation excessive permet d'alimenter les tumeurs en oxygène et nutriments favorisant leurs progressions. Cette néovascularisation contribuera également au caractère invasif en établissant la formation d'un réseau vasculaire nécessaire à la formation de métastases (Tonini, Rossi, and Claudio 2003). À l'opposé, lors de pathologies athérosclérotiques ischémiques, une néovascularisation insuffisante accentuera les dommages tissulaires (Ng and D'Amore 2001a). Par conséquent, il est impératif de mieux comprendre les mécanismes de régulations géniques et moléculaires modulant la néovascularisation, pour permettre de nouvelles approches thérapeutiques contre ces diverses pathologies.

2.2. Architecture du système circulatoire

Le système circulatoire artériel est composé d'une circulation systémique et d'une circulation pulmonaire (**figure 1**). La circulation systémique a pour rôle d'approvisionner les différents organes en oxygène et en nutriments, alors que la circulation pulmonaire assure la

réoxygénation du sang et l'élimination du CO₂ par les poumons (Aird 2011). Lors d'une contraction cardiaque, le ventricule gauche propulse le sang dans l'aorte qui le redistribue dans les différentes artères et organes subséquents. De façon chronologique, le trajet s'effectue de l'artère vers les artérioles et ensuite vers les capillaires (Aird 2011) (**figure 1**). Le rôle principal des capillaires est d'alimenter les tissus et de recevoir le sang appauvri en oxygène et chargé en CO₂ pour le redistribuer dans le circuit veineux (Aird 2011). Les capillaires forment donc un pont artérioveineux et assurent l'échange biochimique entre le sang et les tissus. Le système cardiovasculaire contient également des vaisseaux lymphatiques dont le principal rôle est de drainer les fluides en excès de l'espace extracellulaire et de remettre des molécules en circulation via le système veineux.

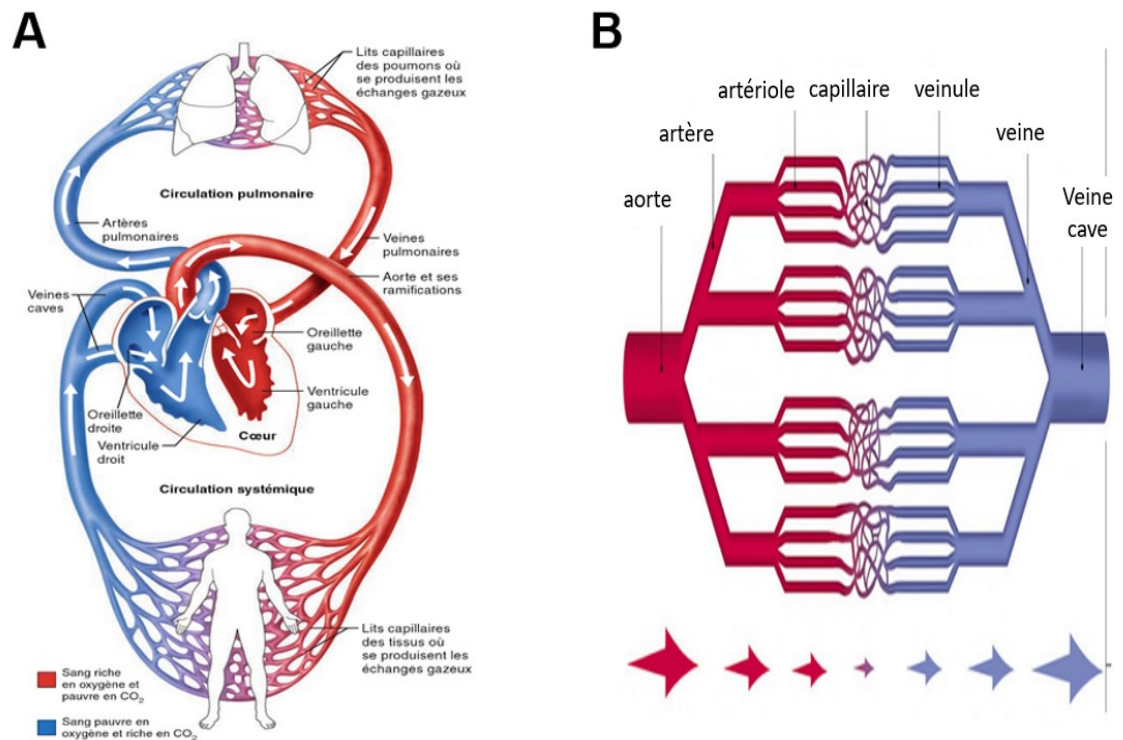


Figure 1. Architecture du système circulatoire. A) Circulation pulmonaire et circulation systémique. B) Trajet du sang dans les vaisseaux. Figure adaptée de : (Collectif 2002; Marieb et al. 2014)

2.3. Structure et fonctions biologiques des vaisseaux

2.3.1. L'aorte

L'aorte est la plus grosse artère du corps humain avec un diamètre moyen de 3 cm au niveau de l'aorte ascendante (Boutin et al. 2015) et elle est le lieu d'embranchement de toutes les artères de l'organisme, sauf l'artère pulmonaire (Marieb et al. 2014). L'aorte prend naissance à la sortie du ventricule gauche pour s'étendre jusqu'à l'abdomen en 2 plus petites artères (artère iliaque commune) alimentant les membres inférieurs. Schématiquement, l'aorte est divisée en 2 parties : l'aorte thoracique comprenant 3 sections (ascendante, horizontale et descendante) et l'aorte abdominale. Les pathologies ischémiques liées à l'athérosclérose touchent préférentiellement certaines artères comme les artères coronaires, les artères carotidiennes (irriguant le cou et la tête) et les artères des membres inférieurs et rénales (Marieb et al. 2014).

2.3.2. Structure et composition des artères

Les artères sont les vaisseaux de plus grand calibre avec un diamètre moyen de 4-8 mm et sont divisées en 3 tuniques concentriques de composition variable (l'intima, la média et l'adventice) (**figure 2**). Il existe deux principaux types d'artères de grand et moyen calibre, les artères élastiques et les artères musculaires. Les artères élastiques sont des artères de gros calibres (ex. aorte) situés à proximité du cœur, alors que les artères musculaires (ex. artère fémorale), sont des artères de moyen calibre très nombreux dans les différents muscles, et sont des ramifications des gros artères élastiques qui permettent d'irriguer les différents organes. L'intima est la structure la plus mince et la plus interne de l'artère. Elle est composée d'un endothélium lisse directement en contact avec le sang et est munie d'une monocouche de cellules endothéliales (ECs) étroitement juxtaposées formant une barrière étanche. L'endothélium agit comme un filtre moléculaire permettant de contenir le sang à l'intérieur des vaisseaux, tout en autorisant l'échange de diverses substances avec le milieu extérieur (Coujard and Poirier 1980). L'endothélium possède différentes fonctions comme le contrôle de la vasomotricité, de la coagulation, ainsi qu'une activité métabolique (Endemann and Schiffrin 2004). Morphologiquement, les ECs sont polarisées et présentent une face apicale en contact

avec le sang et une face basale fixée sur une lame de collagène (Roignot, Peng, and Mostov 2013).

L'intima est séparée de la média par la limitante élastique interne, une mince couche de tissus conjonctifs fibroélastiques. Au centre de l'artère, nous retrouvons la média qui est la tunique la plus épaisse et le constituant principal de l'artère. La média est composée de cellules musculaires lisses (SMC) agencées de façon concentrique appelées unités lamellaires. Ces unités sont entourées de matrice extracellulaire (MEC) composée de collagène et d'élastine. Dans les vaisseaux de grand calibre, la média est séparée de l'adventice par la limitante élastique externe (Coujard and Poirier 1980).

La dernière couche de l'artère est l'adventice qui est la tunique la plus externe. Elle est constituée de tissus conjonctifs peu organisés et riches en fibres élastiques, fibroblastes et adipocytes. L'adventice est irriguée et vascularisée par des capillaires appelés vasa-vasorum et elle contient aussi des fibres nerveuses sympathiques et parasympathiques (Coujard and Poirier 1980).

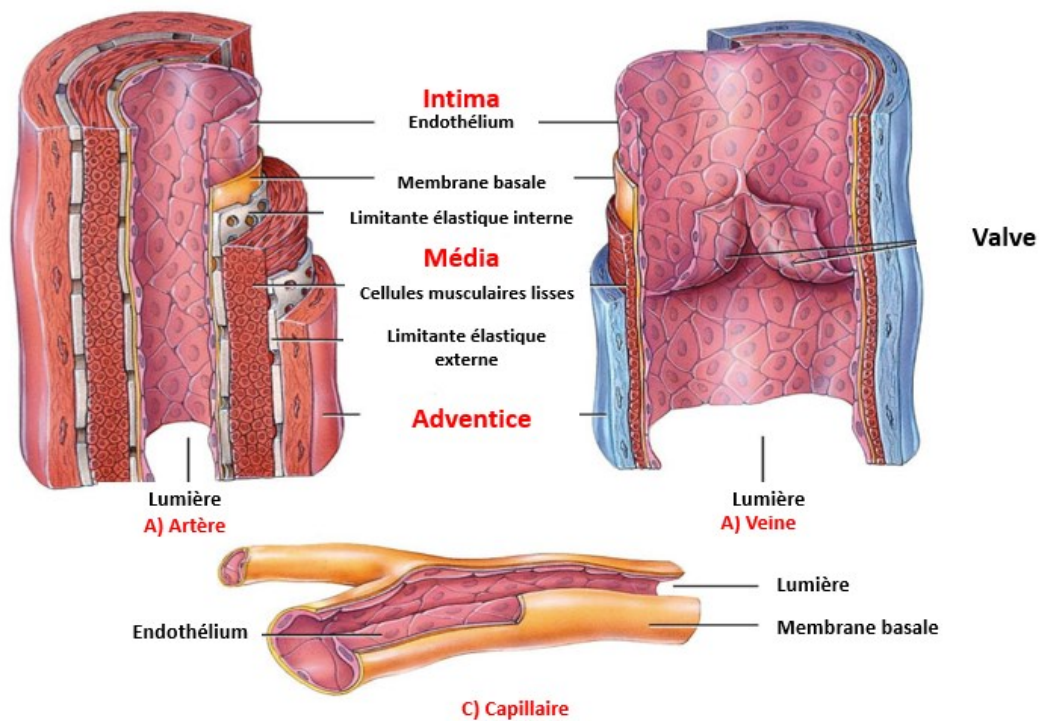


Figure 2. *Structure des vaisseaux sanguins. Figure adaptée de : (Wiley and Sons 2011)*

2.3.3. Les vaisseaux de moyen et petit calibre : artériole et capillaire

Les artérioles sont des vaisseaux de calibre intermédiaire d'environ 40 μm de diamètre et sont raccordées à l'artère et aux capillaires (Boutin et al. 2015). Ils possèdent une structure similaire aux artères mis à part une média de composition variable selon leurs tailles. En effet, les petites artérioles ne possèdent pas de limitante élastique externe et présentent d'une à trois couches de SMCs selon leurs tailles. Les artérioles jouent un rôle vasomoteur fondamental en régulant la résistance vasculaire. En effet, grâce à leurs grandes capacités de contraction, ils peuvent varier fortement leurs diamètres et moduler l'irrigation sanguine aux tissus (Coujard and Poirier 1980).

Les capillaires représentent les plus petits vaisseaux du système sanguin (4-8 μm) formant le réseau de la microcirculation. Ils relient les veinules aux artérioles et permettent de fermer la boucle de la circulation (Coujard and Poirier 1980). Les capillaires possèdent une monocouche d'ECs ancrées sur une fine membrane basale jouant un rôle de barrière. Ils constituent également la partie du système circulatoire où la pression est la plus faible (Coujard and Poirier 1980). En fonction de leurs localisations dans l'organisme, on peut distinguer 3 types de capillaires (continus, fenestrés et sinusoïdes) (Kierszenbaum, Validire-Charpy, and Validire 2006). Les capillaires continus possèdent un revêtement ininterrompu et sont retrouvés dans les muscles, les tissus conjonctifs et pulmonaires. Les capillaires de type fenestrés présentent des micropores très perméables aux liquides et sont localisés principalement dans le rein et l'intestin. Les capillaires de type sinusoïdes ont une paroi inégale et non linéaire favorisant de grands espaces entre les cellules et facilitant la perméabilité aux macromolécules. Ce type de capillaire est retrouvé principalement dans le foie, la rate et les os (Kierszenbaum, Validire-Charpy, and Validire 2006). Globalement, la fonction principale des capillaires est de permettre l'échange biochimique entre les tissus et la circulation sanguine grâce à leurs fines parois (Coujard and Poirier 1980).

2.4. Rôle physiologique de l'endothélium

2.4.1. Description de l'endothélium vasculaire

L'endothélium est une monocouche d'ECs tapissant la surface interne des vaisseaux sanguins et elle représente le plus grand organe humain. En effet, il s'agit d'un lieu d'échange biochimique d'environ 1000 m² correspondant à 2 % de la masse corporelle totale (Féléto 2011). Morphologiquement, les ECs peuvent être différentes selon le type de vaisseau. Par exemple, dans les artères, les ECs auront une forme prismatique alors que dans les capillaires, elles seront sous forme de petit tube permettant au sang de circuler (Féléto 2011). L'endothélium n'est pas qu'une simple barrière physique entre le sang et les tissus, mais un organe dynamique possédant de nombreuses fonctions physiologiques (contrôle du tonus vasculaire et de la perméabilité, hémostasie, rôle dans l'inflammation, réparation et angiogenèse) (Féléto 2011) (**figure 3**).

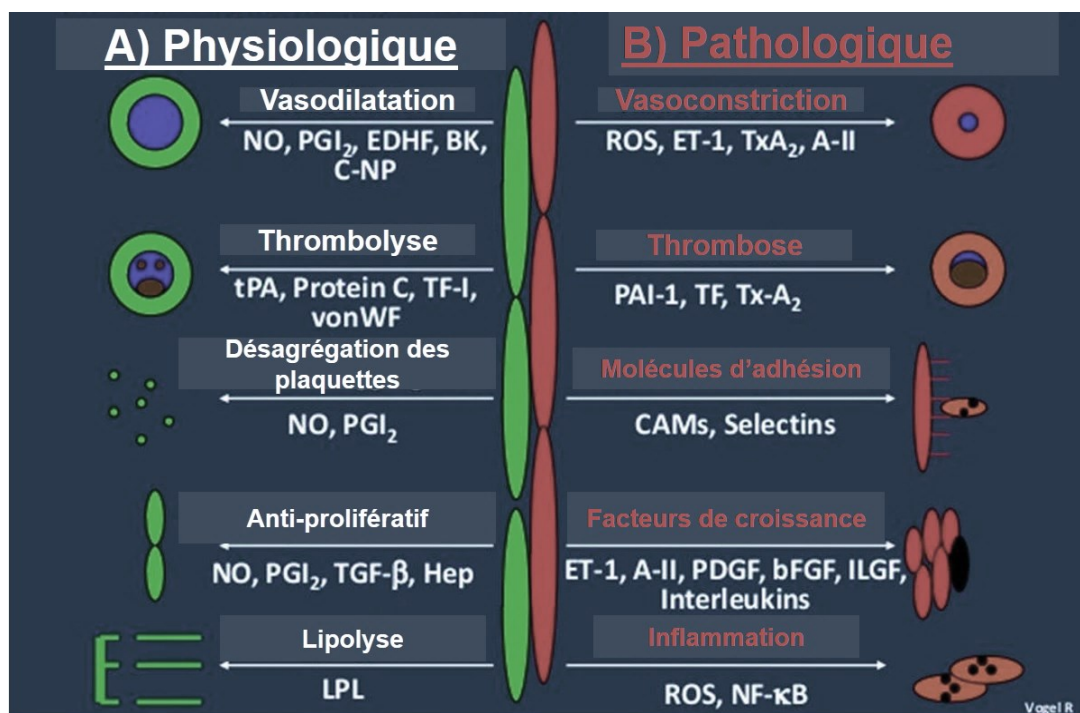


Figure 3. *Fonctions et caractéristiques de l'endothélium en condition physiologique (normal) et pathologique (dysfonctionnelle). Figure adaptée de : (Vogel R).*

2.4.2 Type de réponses endothéliales

En condition physiologique et en réponse à divers stimuli (biochimiques et hémodynamiques), l'endothélium va accomplir différentes fonctions en sécrétant des facteurs endothéliaux (**figure 3**) et en exprimant des protéines membranaires (Gimbrone and Garcia-Cardena 2013). Il existe 2 catégories de réponse adaptative de l'endothélium suite à des stimulations ou activations : rapide (type 1) et lente (type 2) (Alberts et al. 2002). La réponse lente de type 2 implique une synthèse protéique de l'endothélium. Lorsque ce type de réponse est prolongée et exagérée, elle peut entraîner un dysfonctionnement de l'endothélium et jouer un rôle prédominant dans diverses pathologies cardiovasculaires, dont l'athérosclérose (Favero et al. 2014). Avant d'aborder la dysfonction endothéliale, les paragraphes suivants visent à résumer les principales fonctions physiologiques de l'endothélium.

2.4.3. Fonction vasomotrice de l'endothélium

L'endothélium régule le tonus vasculaire par la sécrétion de nombreux facteurs agissant sur le relâchement (vasodilatation) et la contraction (vasoconstriction) du vaisseau sanguin (Sandoo et al. 2010). Cette action permet de moduler l'irrigation sanguine aux différents tissus. Pour ce faire, l'endothélium répond à différents stimuli (hormonaux, chimiques, mécaniques) et module la vasomotricité des cellules musculaires lisses par la sécrétion de nombreux facteurs vasomodulateurs. Parmi les principaux facteurs vasodilatateurs, nous retrouvons l'oxyde nitrique (NO), la prostacycline (PGI_2) et le facteur endothélial hyperpolarisant (EDHF). Les principaux facteurs vasoconstricteurs sont l'endothéline-1 (ET-1), l'angiotensine II (Ang2), le tromboxane (TXA_2) et la prostaglandine E2 (PGE_2). L'équilibre homéostatique entre ces différents facteurs va initier la vasodilatation ou la vasoconstriction du vaisseau (Sandoo et al. 2010).

2.4.4 Fonction anti-thrombotique et pro-coagulante

L'endothélium contrôle également l'hémostase, définie comme l'ensemble des mécanismes qui permet de maintenir la fluidité du sang et d'empêcher les saignements (coagulation) (Wu and Thiagarajan 1996). L'endothélium fonctionnel assure une activité anti-thrombotique de plusieurs façons. Par exemple, les ECs peuvent sécréter diverses substances

favorisant l'inhibition de facteurs de coagulation (serpine), l'inhibition de l'adhésion des plaquettes (NO), mais aussi la dissolution du caillot (héparine). Inversement, lors de dommages ou saignements, l'endothélium relâche différentes protéines comme le facteur de von willebrand (vWF) et l'activateur de plasminogène inhibiteur 1 (PAI-1). Ces facteurs permettent l'agrégation et l'adhésion des plaquettes menant à la formation de caillot et le colmatage de la brèche (Wu and Thiagarajan 1996).

2.4.5 Rôle dans l'inflammation

Une autre fonction importante de l'endothélium est le contrôle du trafic des leucocytes. Cette fonction joue un rôle dans la réponse immunitaire, les processus de réparation tissulaire et l'inflammation chronique (Félétou 2011). L'endothélium peut être activé par divers facteurs et acquérir un phénotype inflammatoire causé par une grande variété de stimuli (infection, cytokines pro-inflammatoires et stress oxydant) qui sont transportés par le sang ou produits par les cellules voisines (Pober and Sessa 2007). L'endothélium activé va alors recruter diverses cellules immunes au site d'inflammation, amplifiant ainsi la réponse inflammatoire (Pober and Sessa 2007). Les mécanismes incluent la sécrétion endothéliale de facteurs chimioattractants (MIP, MCP-1), l'expression de protéines d'adhésion incluant des sélectines (L-sélectine, P-sélectine et E-sélectine) et des intégrines (VCAM-1, ICAM-1, PECAM-1). Ces différents facteurs vont favoriser le recrutement et l'adhésion des cellules inflammatoires à l'endothélium, contribuant à leur infiltration dans l'intima (Félétou 2011).

2.4.6 Fonction de perméabilité

La perméabilité sélective de l'endothélium est une fonction vitale permettant de fournir les nutriments nécessaires aux tissus sous-jacents. En effet, elle joue un rôle crucial dans plusieurs processus physiologiques tels que l'homéostasie des fluides irriguant les tissus, l'angiogenèse, le tonus vasculaire et la défense contre les pathogènes (Sukriti et al. 2014). De façon générale, l'endothélium est perméable aux molécules allant de 0,1 nm (ex : ion de sodium) à 11 nm (IgG) et possède deux systèmes de transport principaux : la voie transcellulaire et la voie paracellulaire (Sukriti et al. 2014). La voie transcellulaire est médiée par des vésicules qui permettent le transport des grosses molécules de plus de 3 nm (albumine, IgG et

macromolécules) (Sukriti et al. 2014). Cette voie implique des cavéoles permettant l'endocytose de macromolécules à la membrane luminale, suivie d'une transcytose à travers la cellule (Yuan and Rigor 2011). Les cavéoles sont des microdomaines formant des invaginations à la membrane plasmique permettant la pénétration intracellulaire des macromolécules (Yuan and Rigor 2011). Le deuxième système de transport est la voie paracellulaire impliquant les molécules de moins de 3 nm (eau, glucose, ions). Elle permet l'entrée des petites molécules dans l'espace sous-endothélial par différents types de jonctions intercellulaires variables selon l'organe (Sukriti et al. 2014). Il existe deux types de jonctions intercellulaires, soit les jonctions adhérentes et les jonctions serrées. Les jonctions adhérentes représentent le type prédominant qui est présent dans tous les lits vasculaires. Les jonctions serrées sont retrouvés en grand nombre dans les vaisseaux irrigant le cerveau et jouent un rôle de barrière supplémentaire empêchant le passage des molécules de moins de 1 kDa (Yuan and Rigor 2011).

2.4.7 Endothélium et angiogenèse

L'endothélium est également le siège de l'angiogenèse, définie comme la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir des vaisseaux préexistants. L'angiogenèse est un processus hautement régulé en condition physiologique et est impliqué dans le développement, la reproduction et la réparation tissulaire. En réponse à divers stimuli (ex. : hypoxie, facteurs de croissance, cytokines), les ECs fonctionnelles possèdent la capacité de proliférer, de migrer et de former de nouveaux tubules (Féléto 2011). L'angiogenèse sera discutée en détail au chapitre 6. Le chapitre suivant vise à illustrer les principaux mécanismes associés à la dysfonction endothéliale et à discuter de son impact sur les maladies cardiovasculaires.

Chapitre 3. La dysfonction endothéliale à l'origine des maladies cardiovasculaires

3.1. Définition et caractéristiques de l'endothélium dysfonctionnel

La dysfonction ou activation endothéliale est un terme qui réfère à l'altération de l'intégrité et à la dérégulation des fonctions physiologiques normales de l'endothélium (Steyers and Miller 2014). Selon le modèle classique, ce phénotype est caractérisé par plusieurs changements communs des ECs (**figure 4**). Par exemple, l'acquisition d'un environnement pro-thrombotique, pro-inflammatoire, vasoconstricteur et une défaillance de la capacité angiogénique sont observés (Hadi, Carr, and Al Suwaidi 2005; Steyers and Miller 2014).

La dysfonction endothéliale est causée par de multiples mécanismes d'origine génétique et environnementale, associés en grande partie aux facteurs de risques cardiovasculaires qui augmentent le niveau de stress oxydant dans les vaisseaux (Hadi, Carr, and Al Suwaidi 2005) (figure 3.1.). Le stress oxydant cause des dommages et altère les fonctions physiologiques de l'endothélium, et ceci est souvent associé à une diminution de la biodisponibilité du NO (Forstermann and Munzel 2006). La dysfonction endothéliale est non seulement une étape initiale clé dans le développement de l'athérosclérose (Davignon and Ganz 2004), mais elle est aussi liée à plusieurs pathologies cardiovasculaires comme l'hypertension, les pathologies des artères coronaires et périphériques, le diabète, la dyslipidémie et vieillissement vasculaire (Endemann and Schiffrin 2004). Les paragraphes suivants mettront en lumière les éléments clés liés à la dysfonction endothéliale, et certains mécanismes spécifiques liés à mes travaux de recherche.

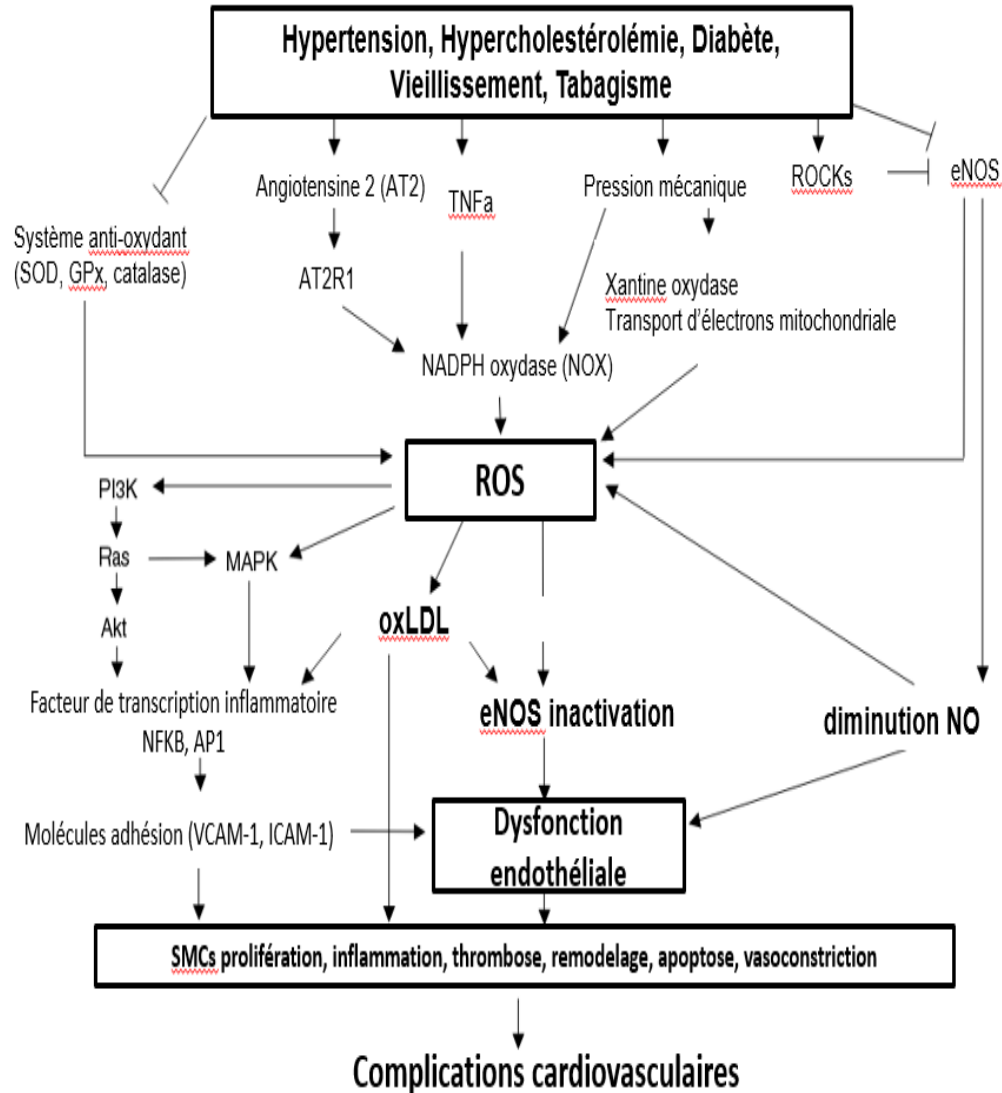


Figure 4. Mécanismes associés à la dysfonction endothéliale. Les facteurs de risques cardiovasculaires sont associés à une augmentation du stress oxydant dans les vaisseaux. L'augmentation du niveau de ROS systémique favorise l'oxydation des LDL, la diminution du NO et la création d'un environnement pro-inflammatoire de l'endothélium qui sont des caractéristiques communes à la dysfonction endothéliale et aux complications cardiovasculaires subséquentes. Figure adaptée de : (Higashi et al. 2009)

3.2. Le NO, un indicateur de la santé endothéliale

Le NO est un gaz soluble continuellement libéré par les ECs. Il est un indicateur de la santé endothéliale globale (Lauer, Kleinbongard, and Kelm 2002). En effet, une diminution de la biodisponibilité physiologique du NO, causée notamment par les facteurs de risques cardiovasculaires, mène à la dysfonction endothéliale et à plusieurs pathologies cardiovasculaires (**figure 4**) (Tousoulis et al. 2012). Le NO est non seulement un important facteur vasodilatateur, mais aussi la principale substance protectrice de l'endothélium. Le NO possède un large éventail de fonctions biologiques dans la vasculature tel que la relaxation des SMCs, des propriétés anti-inflammatoires et anti-thrombotiques. Également, le NO joue un rôle dans la réparation de l'endothélium en stimulant la prolifération cellulaire (Tousoulis et al. 2012). Au niveau de l'angiogenèse, le NO agit comme médiateur clé dans l'induction de plusieurs voies de signalisation pro-angiogéniques (Cooke and Losordo 2002a). Il stimule aussi la migration cellulaire (Murohara et al. 1999) et la mobilisation des cellules endothéliales progénitrices (EPCs) impliquées dans la néovascularisation (Ozuyaman et al. 2005). De plus, le NO possède des propriétés anti-oxydantes qui permettent l'élimination des anions superoxydes (Tomasian, Keaney, and Vita 2000).

Le NO est produit par l'enzyme NOS (nitrique oxyde synthase) qui catalyse la transformation de L-arginine en NO et citrulline. Il existe 3 isoformes de NOS, soit les formes constitutives suivantes : neuronale type 1 (n-NOS), endothéliale type 3 (e-NOS) et inductible type 2 (i-NOS). La n-NOS joue un rôle prépondérant de neuromodulateur. Elle est présente dans le cytosol sous forme soluble et est principalement localisée dans les cellules neuronales, astrocytes et neutrophiles (Forstermann and Sessa 2012). La i-NOS est induite en réponse à des cytokines et à diverses toxines lors d'environnements inflammatoires. Elle est aussi présente dans le cytosol et retrouvée dans plusieurs types cellulaires dont les macrophages (McNeill et al. 2015). Contrairement aux autres isoformes, la e-NOS est liée à la membrane plasmique. Elle représente l'isoforme d'intérêt au niveau vasculaire car elle est exprimée abondamment dans les ECs (Balligand, Feron, and Dessy 2009).

3.3. eNOS: structure et régulation

L'enzyme eNOS est une protéine membranaire de 133 kD encodée par le gène NOS3. Structuralement, elle possède 2 domaines (réductase et oxygénase) et est active sous forme de dimère (**figure 5**). Le domaine oxygénase est situé du côté n-terminal et possède des sites de liaison pour le groupe hème, le cofacteur BH4 et le substrat L-arginine. Le domaine réductase en c-terminal à des sites de liaison pour le NADPH, le FMN et le FAD. Les deux domaines sont reliés ensemble par une séquence de liaison pour la calmoduline (Balligand, Feron, and Dessy 2009). À noter que le cofacteur BH4 est un élément crucial qui permet à l'enzyme de fonctionner. En effet, en absence de BH4, l'eNOS en conformation dimérisée va passer à la forme monomérique inactive (**figure 5**). Ce processus de découplage génère des radicaux libres très réactifs, augmentant ainsi les niveaux de stress oxydant (Yang et al. 2009). Classiquement, l'eNOS peut être activé par phosphorylation sur de multiples sites tyrosine (Y), sérine (S) et thréonine (T) (Rafikov et al. 2011). Toutefois, un des mécanismes les plus connus implique l'activation d'eNOS par phosphorylation sur sa S1177 par la protéine kinase AKT (Dimmeler et al. 1999). Également, d'autres études ont démontré que la protéine Src serait impliquée dans le mécanisme d'activation d'eNOS (Chen et al. 2012; Davis et al. 2001).

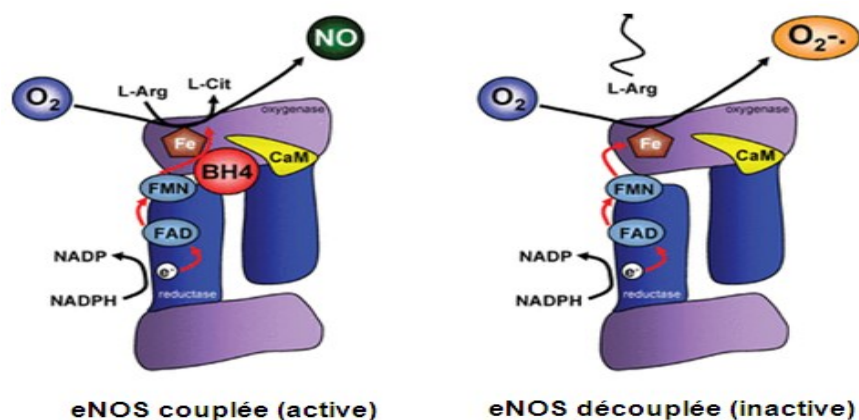


Figure 5. Structure et mécanisme de découplage d'eNOS. eNOS est une enzyme membranaire présente sur les ECs catalysant la génération de NO à partir d'arginine. Le découplage d'eNOS à son cofacteur BH4 inhibe la transformation d'arginine en NO et favorise la génération d'anions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$). Figure adaptée de : (Schmidt and Alp 2007)

3.4. Une réduction de la biodisponibilité du NO favorise la dysfonction endothéliale

Il est maintenant bien établi qu'une réduction de la biodisponibilité du NO favorise la dysfonction endothéliale, la progression de l'athérosclérose et l'apparition de plusieurs pathologies cardiovasculaires (Liu and Huang 2008). La diminution de la production de NO peut être causée par plusieurs mécanismes, pour la plupart liés à une augmentation du stress oxydant (Ho et al. 2013). En effet, un excès de stress oxydant favorise la dégradation du NO, inhibe l'expression et l'activation d'eNOS, diminue le substrat (L-arginine) et le cofacteur BH4 (Liu and Huang 2008).

Il existe actuellement plusieurs stratégies permettant d'augmenter la biodisponibilité du NO. Par exemple, certaines thérapies consistent à stimuler la production de NO par une supplémentation en L-arginine ou en BH4. Également, des inhibiteurs d'arginases peuvent être utilisés afin d'empêcher la dégradation du substrat. D'autres traitements vont cibler des voies de signalisation en agissant comme inhibiteur endogène de l'activation eNOS. Par exemple, des antagonistes du système rénine angiotensine permettent de réduire la production d'anions superoxydes, diminuant ainsi le découplage d'eNOS. Finalement, la stimulation d'eNOS par des polyphénols et des statines ou une supplémentation en NO exogène par des dérivés nitrés pourraient être utilisés (Lundberg, Gladwin, and Weitzberg 2015).

3.5. Le stress oxydant: la principale cause à l'origine de la dysfonction endothéliale

3.5.1. Définition du stress oxydant et contribution à la dysfonction endothéliale

Au cours de la vie cellulaire, plusieurs mécanismes de défense et de réparation sont continuellement activés afin de maintenir l'homéostasie contre les agressions endogènes et exogènes. Une des principales injures de l'endothélium vasculaire est le stress oxydant. Par définition, le stress oxydant correspond à une modulation de l'équilibre oxydoréducteur en

faveur d'un état pro-oxydant. Cet environnement pro-oxydant excessif est causé par une augmentation des espèces réactives oxygénées (ROS), azotées (RNS) et par une diminution des systèmes de défense antioxydants (Thorin-Trescases et al. 2010). Toutefois, il est important de mentionner que les ROS et RNS en faible quantité jouent un rôle au niveau physiologique. Par exemple, ils agissent comme second messenger pour réguler l'expression des gènes, la modification post-traductionnelle et la régulation de voies de signalisation moléculaire de divers processus biologiques. Ils sont également impliqués dans les mécanismes de défense contre les micro-organismes (Schieber and Chandel 2014). Par contre, l'excès de ROS cause divers dommages aux macromolécules (ex. : protéines, lipides, ADN) et aux constituants cellulaires (ex. : mitochondries et membrane plasmique)(Schieber and Chandel 2014). Au niveau vasculaire, une augmentation des ROS par les facteurs de risques cardiovasculaires favorise le développement de la dysfonction endothéliale. Les mécanismes impliqués sont nombreux et sont en grande partie associés à une diminution du NO, l'oxydation des LDL, l'expression de molécules d'adhésion et la création d'un micro-environnement pro-inflammatoire (**figure 4**).

3.5.2. Sources et types de ROS vasculaires.

De façon générale, les ROS peuvent provenir de facteurs externes (exogènes) ou être produits par la cellule (endogènes). Par exemple, les ROS exogènes proviennent de sources variées comme les UV, les radiations, les infections et les agressions chimiques et physiques. Au niveau endothélial, les ROS peuvent être produits de façon endogène par plusieurs enzymes comme la NADPH oxydase (NOX), la xanthine oxydase, les cyclooxygénases, la glucose oxydase, les lipooxygénases et le découplage d'eNOS (Higashi et al. 2009) (**figure 6**). Également, la chaîne de transport d'électron mitochondriale est une autre source majeure générant des ROS. Parmi les ROS de types radicalaires possédant un électron non apparié (radicaux libres), nous retrouvons l'anion superoxyde (O_2^-) et le radical hydroxyle ($OH\cdot$). Les ROS de type non radicalaire incluent le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'acide hypochlorite (HOCL) et le peroxynitrite ($ONOO^-$) (Higashi et al. 2009). La cellule possède également plusieurs mécanismes de défense enzymatiques et non enzymatiques permettant l'élimination des ROS et le retour à l'équilibre. Par conséquent, une diminution du niveau endogène d'enzymes et de différents composés anti-oxydants favorise une augmentation des ROS intracellulaires. Parmi les principaux mécanismes enzymatiques, nous retrouvons la superoxyde

dismutase (SOD) qui catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en H₂O₂, ainsi que la catalase et la glutathion et peroxydase (GP_x) qui dégrade le H₂O₂ en eau. Les systèmes antioxydants non enzymatiques incluent le glutathion, les caroténoïdes, les flavonoïdes et les vitamines C et E (Thorin-Trescases et al. 2010).

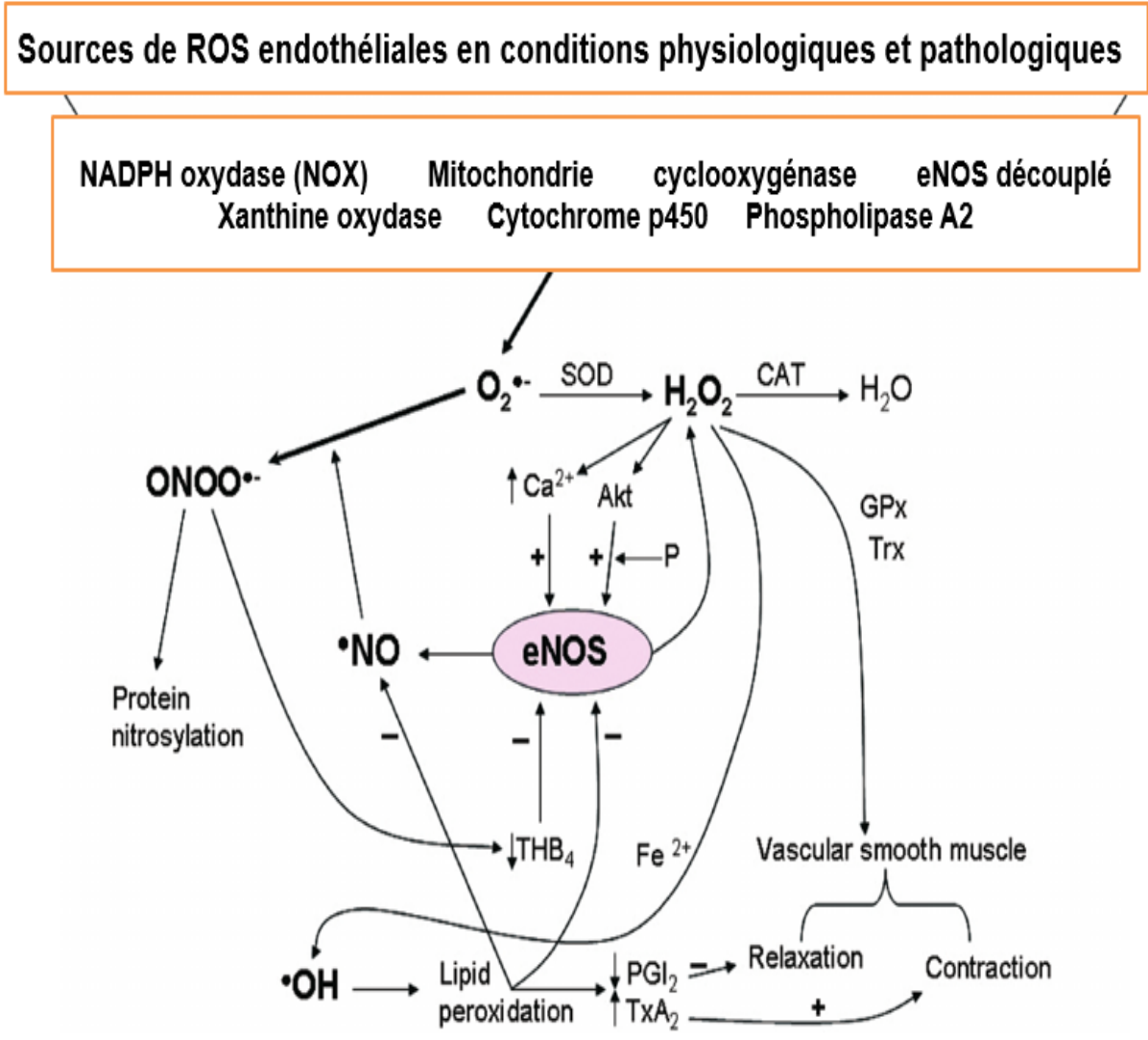


Figure 6. Sources et médiateurs intracellulaires générant des espèces réactives d'oxygènes (ROS) dans les vaisseaux. Figure adaptée de : (Bauer and Sotniková 2010)

Parmi les différents types de ROS, l'anion superoxyde (O_2^-) est le plus important au niveau vasculaire. En effet, il est le plus dommageable par sa grande réactivité avec le NO, mais aussi en tant que progéniteur de plusieurs autres espèces de ROS (Munzel et al. 2002). Au sein de l'endothélium, les NOX sont les principales sources générant des anions superoxydes par le transfert d'électron du NADPH vers l'oxygène (Kim and Byzova 2014). Les NOX sont des enzymes membranaires exprimés également dans d'autres types cellulaires tels que les SMCs, les fibroblastes de l'adventice et les phagocytes. L'activité des NOX est régulée par de multiples facteurs comme l'angiotensine 2, la thrombine, le facteur de nécrose tumorale (TNF- α) et par les forces hémodynamiques. Les NOX sont présentes en 7 isoformes (NOX1, NOX2 ou gp91^{phox}, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 et DUOX2) (Nauseef 2008; Manea et al. 2015). Seulement 4 NOX (NOX1, 2, 4,5) sont exprimées au niveau endothélial. Parmi celles-ci les isoformes 1, 2 et 5 seraient impliquées dans la dysfonction endothéliale (Drummond and Sobey 2014) et particulièrement la NOX2 qui est la plus abondante (Douglas et al. 2012; Lynch et al. 2013). En effets, plusieurs études ont démontré que l'expression de NOX2 joue un rôle important dans le remodelage cardiaque (Zhao, McLaughlin, et al. 2010), l'athérosclérose (Judkins et al. 2010), l'hypertension (Dikalov et al. 2014) et l'inhibition de la néovascularisation post-ischémique par l'hypercholestérolémie (Haddad et al. 2011). Aussi, il a été documenté chez l'humain que la génération de ROS par NOX2 jouerait un rôle pathogène dans la modification des parois artérielles des sujets hypercholestérolémiques et obèses (Loffredo et al. 2012). De façon mécanistique, la génération d'anions superoxydes par NOX2 contribue à la dysfonction endothéliale et favorise une diminution du NO de plusieurs façons. Par exemple, les O_2^- réagissent très rapidement avec le NO pour former du peroxynitrite, causant ainsi une réduction du NO physiologique. Également, ils peuvent oxyder le BH4 et entraîner le découplage et l'inactivation d'eNOS, ce qui contribuera à générer d'autres anions superoxydes (**figure 5**) (Zhang and Shah 2014).

3.6. Rôle du système rénine angiotensine (RAS) dans la dysfonction endothéliale

3.6.1 Généralité et fonctionnement du système RAS

Le système rénine-angiotensine (RAS) est un système hormonal complexe qui, par une cascade endocrinienne enzymatique, régule des processus importants impliqués dans la stabilité hémodynamique (Lumbers 1995). En effet, les principales fonctions du RAS en condition physiologique sont le contrôle de la pression sanguine artérielle et de l'équilibre hydrosodé. Toutefois, l'activation pathologique du RAS mène à l'hypertension, l'hypertrophie cardiaque et à la fibrose tissulaire (Ma et al. 2010a). De plus, la rigidité artérielle causée par la stimulation chronique du RAS contribue à la progression de l'athérosclérose et à diverses complications cardiovasculaires et rénales (Durante et al. 2012). En condition physiologique, le RAS est activé par une baisse de pression artérielle. La cascade enzymatique débute par la sécrétion de rénine par le rein, au niveau de l'appareil juxtaglomérulaire. La rénine va ensuite catalyser la transformation de l'angiotensinogène, une protéine inactive produite par le foie, en angiotensine 1 (Ang1). L'Ang1 (sous forme de peptide inactif) sera clivée par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) qui est sécrétée au niveau pulmonaire, pour former l'angiotensine 2 (Ang2). Finalement, l'Ang2 biologiquement active peut alors se lier et stimuler ses deux récepteurs spécifiques, soit l'AT1 ou l'AT2 (Ma et al. 2010a) (**figure 7**).

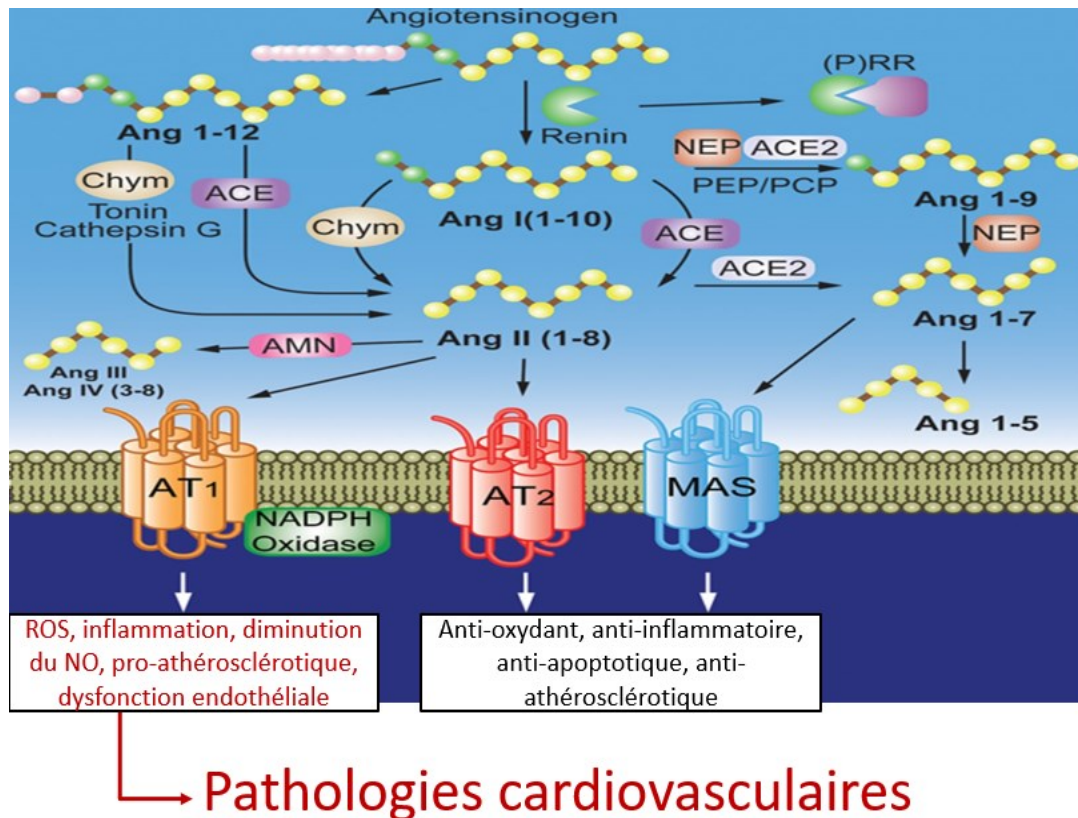


Figure 7. Implication du système RAS dans les maladies cardiovasculaires. La rénine catalyse la transformation d'angiotensinogène en angiotensine 1 (Ang1) qui est ensuite transformé en angiotensine 2 (Ang2) par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE). L'Ang2 produite peut se lier et activer deux récepteurs membranaires (AT1 et AT2) possédant des effets opposés bénéfiques et pathologiques. La rénine et la pro-rénine (forme inactive de la rénine) peuvent également lier le récepteur de la pro-rénine (P)RR et induire des voies de signalisation variées (Nguyen et al, 2010). La rénine peut aussi être activée par un deuxième mécanisme non protéolytique par liaison au récepteur (P)RR causant un changement conformationnel de celle-ci et libérant son site actif pour l'angiotensinogène (Carey et al, 2008). Finalement, l'Ang1 et l'Ang2 peuvent aussi être clivés en différents métabolites peptidiques comme l'Ang 1-7, un ligand pour le récepteur MAS (G protein-coupled receptor MAS) qui peut activer des voies de signalisation alternatives associées à des effets protecteurs au niveau cardiaque, rénal et cérébral (Bader et al, 2014). Figure adaptée de : (Rajagopalan et al. 2013)

3.6.2. Rôle pathologique de l'Ang2 dans la dysfonction endothéliale

Collectivement, les différentes études suggèrent que les principaux effets pathologiques de l'Ang2 sont associés à l'activation de son récepteur AT1. L'AT1 est le récepteur le plus connu et est responsable des effets de vasoconstriction. L'activation de ce récepteur est impliquée dans l'induction de l'activité de l'aldostérone, la réabsorption de sodium par le rein, l'hypertrophie du myocarde, la prolifération des SMCs et la stimulation du système sympathique. Le récepteur AT2 est moins connu et les données actuelles suggèrent qu'il possède des fonctions anti-athérogène inverses à l'AT1. En effet, l'AT2 serait impliqué dans l'apoptose, l'inhibition de la prolifération des SMCs, l'induction de l'angiogenèse et la vasodilatation (Esper et al. 2006). D'un point de vue pathologique, l'Ang2 joue un rôle très varié et favorise la dysfonction endothéliale (**figure 7**). Par exemple, l'Ang2 agit comme médiateur pro-inflammatoire stimulant la production de cytokines et de chimiokines contribuant à la migration de cellules inflammatoires dans les tissus (Ruiz-Ortega et al. 2001). Lors de ce processus, l'Ang2 favorise l'adhésion des monocytes et des neutrophiles à l'endothélium, par l'induction de molécule comme VCAM-1 via l'activation de son récepteur AT1 (Prasad et al. 2001). De façon plus directe, il a été démontré chez le rat que l'Ang2 cause la dysfonction endothéliale en diminuant l'expression de divers facteurs vasodilatateurs et en favorisant la production d'anions superoxydes (Rajagopalan et al. 1996). Des études cliniques ont aussi démontré que l'inhibition d'Ang2 par des antagonistes du système RAS permet d'améliorer la fonction endothéliale qui est altérée en condition pathologique (Donnelly and Manning 2007). Cette restauration serait favorisée par l'augmentation de facteurs vasodilatateurs comme le NO et par un effet antioxydant (Tojo et al. 1996; Lupi et al. 2006). Également, l'Ang2 favorise la production de ROS vasculaires en induisant diverses enzymes NOX (Wang et al. 2001; Griending et al. 1994)1) dont la NOX2 (Araujo et al. 2011). Une étude a confirmé l'importance pathologique de l'action Ang2/NOX2 dans la dysfonction endothéliale en condition diabétique. En effet, il a été démontré que l'inhibition de la signalisation dépendante de l'Ang2 permet de restaurer l'activité d'eNOS et d'inhiber l'expression de NOX2, améliorant ainsi la fonction endothéliale (Oak and Cai 2007).

Globalement, la stimulation chronique du système RAS favorise la dysfonction endothéliale. Les principaux effets pathologiques sont la vasoconstriction, la réduction du NO, le remodelage vasculaire, la création d'un phénotype pro-oxydant et pro-inflammatoire. Également, il a été démontré que l'inhibition du système RAS permet de récupérer la fonction endothéliale par un effet antioxydant (Durante et al. 2012 ; Ma et al. 2010 ; Imanishi et al. 2008).

3.6.3. Effets bénéfiques potentiels des inhibiteurs de l'enzyme de conversion (ACEI) et des bloqueurs des récepteurs de l'angiotensine (ARB).

Jusqu'à présent, les études ont démontré une certaine efficacité des ACEI et des ARB pour améliorer la fonction endothéliale. Par contre, l'efficacité reste ambiguë selon certaines études. Une des causes fondamentales liée à cette problématique est que les différents antagonistes sont associés à une inhibition incomplète du système RAS (Shafiq, Menon, and Victor 2008). Par exemple, l'utilisation d'ARB produit une rétroaction négative sur la sécrétion de rénine. Cette rétroaction favorise la réaugmentation du niveau de pro-rénine plasmatique. Également, les ACEI peuvent par des mécanismes compensatoires causer une réaugmentation d'Ang1, favorisant la restauration partielle de l'Ang2 par des voies de signalisations ACE-indépendantes (Shafiq, Menon, and Victor 2008). Dans cette optique, l'utilisation d'inhibiteurs directs de la rénine pourrait théoriquement empêcher la réaugmentation de la pro-rénine et d'Ang1. En effet, le blocage du site catalytique de la rénine empêche d'une part la conversion d'angiotensinogène en Ang1, une étape limitante dans la production d'Ang2, mais aussi, inactive la pro-rénine plasmatique réaugmentée par le rétrocontrôle négatif (Nussberger et al. 2002).

3.6.4. Potentiel thérapeutique de l'Aliskiren sur la fonction endothéliale

L'Aliskiren (rasilez) est le seul inhibiteur direct de la rénine utilisé cliniquement dans le traitement de l'hypertension (depuis 2007) (Sanoski 2009). L'Aliskiren est un inhibiteur chimique qui agit en liant le site actif de la rénine, bloquant ainsi l'accès pour l'angiotensinogène et inhibant sa transformation en Ang 1. Contrairement aux ACEi, l'Aliskiren est donc un inhibiteur très sélectif ciblant une étape limitante du RAS dans la génération d'Ang 2. En effet, comme l'angiotensinogène est le seul substrat de la rénine et que la diminution d'Ang 1 par

l'inhibition directe de la rénine cause une déplétion importante en Ang1 nécessaire à la formation d'Ang 2, la rénine est considérée comme l'enzyme limitante clé du RAS. En effet, les ACEi ne réduisent pas complètement la production d'Ang2 car l'Ang 1 peut être convertie en Ang 2 par des voies alternatives indépendantes de l'ACE. Au niveau de ses propriétés physicochimiques, l'Aliskiren possède une hydrosolubilité élevée lui conférant une biodisponibilité accrue. De plus, l'Aliskiren possède une affinité très élevée pour la rénine avec un IC50 de 0.6 nM. Il possède une demi-vie d'environ 24h. Chez l'humain, l'Aliskiren exerce un effet antihypertenseur de façon dose dépendante avec des doses cliniques de l'ordre de 150-600 mg/jour. Il est aussi important de noter que l'Aliskiren ne bloque pas l'interaction entre la rénine et le récepteur de la pro-rénine (P)RR dont l'activité est liée à différents effets pathologiques et physiologiques encore mal compris. Toutefois, l'Aliskiren possède l'avantage d'inhiber aussi la rénine activée de façon non protéolytique par liaison rénine/(P)RR (Allikmets, 2007; Sun et al, 2017; Verdecchia et al, 2008).

Comme tous les médicaments, il possède des avantages et des limitations. D'une part, l'aliskiren semble avoir des effets controversés au niveau de l'athérosclérose (Nussberger et al. 2008; Mihai et al. 2013; Nicholls et al. 2013) et d'autre part, des effets bénéfiques sur la fonction endothéliale (Chang et al. 2016; Moriya et al. 2013). Par exemple, une étude clinique a montré que l'aliskiren n'a pas d'impact sur la progression de l'athérosclérose des coronaires chez les patients avec une pré-hypertension (Nicholls et al. 2013). Il a aussi été suggéré que l'Aliskiren pourrait augmenter les plaques aortiques en présence de pathologies cardiovasculaires pré-existantes (Mihai et al. 2013). L'étude de Nussberger et ses collègues a quant à elle démontré que l'aliskiren préviendrait la progression de l'athérosclérose chez les souris hypercholestérolémiques (Nussberger et al. 2008). Les résultats de ces études sont donc contradictoires et une investigation plus poussée au niveau de l'athérosclérose doit être effectuée.

Au niveau endothélial, l'Aliskiren possède des propriétés bénéfiques intéressantes. En effet, plusieurs études ont démontré que l'aliskiren améliore la fonction de vasorelaxation en stimulant l'activation de voies de signalisation impliquées dans la production de NO (Hung et al. 2016; Gu et al. 2016). De plus, l'Aliskiren possède une action anti-inflammatoire et anti-oxydante (Del Fiorentino et al. 2010; Choi et al. 2011). Plus particulièrement, elle permettrait

l'inhibition du TNF- α , un important médiateur inflammatoire dans les cellules endothéliales (Del Fiorentino et al. 2010).

3.7. Les oxLDL favorise la dysfonction endothéliale

3.7.1. Interrelation entre oxLDL et inflammation

L'hypercholestérolémie est un important facteur de risque cardiovasculaire contribuant aux développements des maladies artérielles périphériques et coronariennes (Stapleton et al. 2010). L'hypercholestérolémie mène aussi à la dysfonction endothéliale en diminuant la biodisponibilité du NO, en augmentant le stress oxydant systémique et en créant une forte condition pro-inflammatoire. Ce phénotype cause de profondes injures aux ECs associées à des défaillances de la réactivité vasculaire (Stapleton et al. 2010). Il est bien établi que l'hypercholestérolémie augmente les niveaux de lipides oxydés circulants, particulièrement les LDL oxydés (oxLDL). Les oxLDL stimulent l'inflammation soutenue dans les vaisseaux favorisant ainsi la dysfonction endothéliale (Libby 2002). Il existe donc une boucle pathologique complexe entre l'hypercholestérolémie, les oxLDL et l'inflammation, qui sont tous des éléments clés favorisant la dysfonction endothéliale. Par exemple, l'hypercholestérolémie augmente le niveau d'oxLDL et ceux-ci stimulent l'expression de gènes inflammatoires (Chen and Khismatullin 2015). D'autre part, l'inflammation de l'endothélium lors d'une infection peut causer l'oxydation des LDL par divers mécanismes (Memon et al. 2000). L'impact pathologique de l'hypercholestérolémie sera revu plus en détail au chapitre 5.

3.7.2. Rôle des oxLDL dans la dysfonction endothéliale

Jusqu'à présent, il a été mentionné que la dysfonction endothéliale est caractérisée par une défaillance des fonctions normales de l'endothélium par la création d'un phénotype vasoconstricteur, pro-inflammatoire et pro-oxydant. L'hypercholestérolémie favorise l'acquisition de ce phénotype par de nombreux mécanismes. Plusieurs études ont démontré que l'hypercholestérolémie diminue la biodisponibilité du NO de différentes façons. Par exemple, en augmentant l'expression d'ADMA (asymmetric dimethylarginine), un inhibiteur endogène d'eNOS qui compétitionne avec le substrat L-arginine (Cannon 1998; Vladimirova-Kitova et al. 2008). Également, l'hypercholestérolémie induit la production d'agents vasoconstricteurs

comme le thromboxane (Goodwill et al. 2008) et l'Ang2 (Daugherty et al. 2004), ce qui favorise le découplage d'eNOS et l'élévation du stress oxydant. D'autres études ont démontré que l'hypercholestérolémie stimule les trois systèmes enzymatiques majeurs (NOX, xanthine oxydase et myeloperoxidase) associés à la production de ROS par les cellules vasculaires (Cave 2009) et diminue l'activité du système de défense SOD (Mantha et al. 1993). Il est maintenant clairement établi que l'hypercholestérolémie mène à une réponse inflammatoire soutenue dans la vasculature. En effet, cette réponse est caractérisée par le recrutement de leucocytes à l'endothélium, mais aussi, par une augmentation de l'expression de divers médiateurs pro-inflammatoires (Stapleton et al. 2010).

Il existe donc un circuit pathologique en boucle liant l'hypercholestérolémie, le stress oxydant et l'inflammation. Par exemple, la réduction du NO par l'hypercholestérolémie et les ROS a pour conséquence de diminuer la propriété anti-inflammatoire de l'endothélium. Dans un premier temps, les ECs vont libérer des facteurs de chimiotactismes et exprimer des molécules d'adhésions permettant le recrutement et l'adhérence de cellules inflammatoires à l'endothélium (Cannon 1998). Également, les macrophages vont accumuler des oxLDL pour former des cellules spumeuses. Ces cellules vont alors sécréter plusieurs cytokines amplifiant l'état inflammatoire et aggravant l'injure endothéliale menant à sa dysfonction (Simionescu 2007). De façon intéressante, des études ont démontré qu'il est possible de bloquer les événements inflammatoires par une réduction de l'hypercholestérolémie par divers médicaments hypocholestérolémifiants. Par exemple, l'utilisation de statines permet de diminuer l'expression de marqueurs inflammatoires clés incluant : MCP-1, IL-1, TNF- α , VCAM-1 et NF- κ B. Également, il est documenté que l'abaissement du taux de cholestérol réduit le stress oxydant vasculaire et permet de récupérer les niveaux physiologiques de NO (Yilmaz et al. 2004; Ascer et al. 2004; Antonopoulos et al. 2012). Collectivement, ces résultats confirment le rôle important de l'hypercholestérolémie dans la dysfonction endothéliale.

3.7.3. Mécanismes de signalisation intracellulaires induits par les oxLDL

Une concentration élevée d'oxLDL dans le sang est maintenant considérée comme un facteur de risque cardiovasculaire à part entière (Koenig et al. 2011). Les effets pathologiques de ceux-ci sont très variés. Par exemple, les oxLDL contribuent à l'athérosclérose par la

formation de cellules spumeuses, à la prolifération et à la migration des SMCs causant ainsi directement une dysfonction endothéliale (Pirillo, Norata, and Catapano 2013b). Plusieurs études cliniques ont documenté un taux élevé d'oxLDL circulants chez les patients présentant des facteurs de risques cardiovasculaires (Ramos-Arellano et al. 2014). Lorsque les LDL subissent des modifications oxydatives (oxLDL), ils sont reconnus par des récepteurs de type « scavenger » (SR) incluant ; SR-A, SR-BI, CD36 et LOX-1. Au niveau endothélial, le plus important est le LOX-1 connu sous le nom de lectin-like oxidized lipoprotein receptor-1. Il est normalement indétectable en condition physiologique. En effet, LOX-1 est induit non seulement par les oxLDL, mais aussi par différents stimuli pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1) et pro-athérogéniques (Ang2, endothéline, ROS) (Pirillo et al. 2012; Xu et al. 2013).

LOX-1 est un récepteur membranaire comprenant 4 domaines (cytoplasmique, transmembranaire, extracellulaire lié à l'oligomérisation et extracellulaire avec un site de liaison pour ligands) (Ryoo et al. 2011). À part les oxLDL, plusieurs autres ligands de moindre affinité peuvent activer LOX-1, incluant d'autres formes de LDL modifiées, des produits de glycation avancée (AGE), des plaquettes activées et des corps apoptotiques (Xu et al. 2013; Pirillo, Norata, and Catapano 2013b). La **figure 8** résume les principaux processus pathologiques induits par l'activation de LOX-1 et menant à la dysfonction endothéliale.

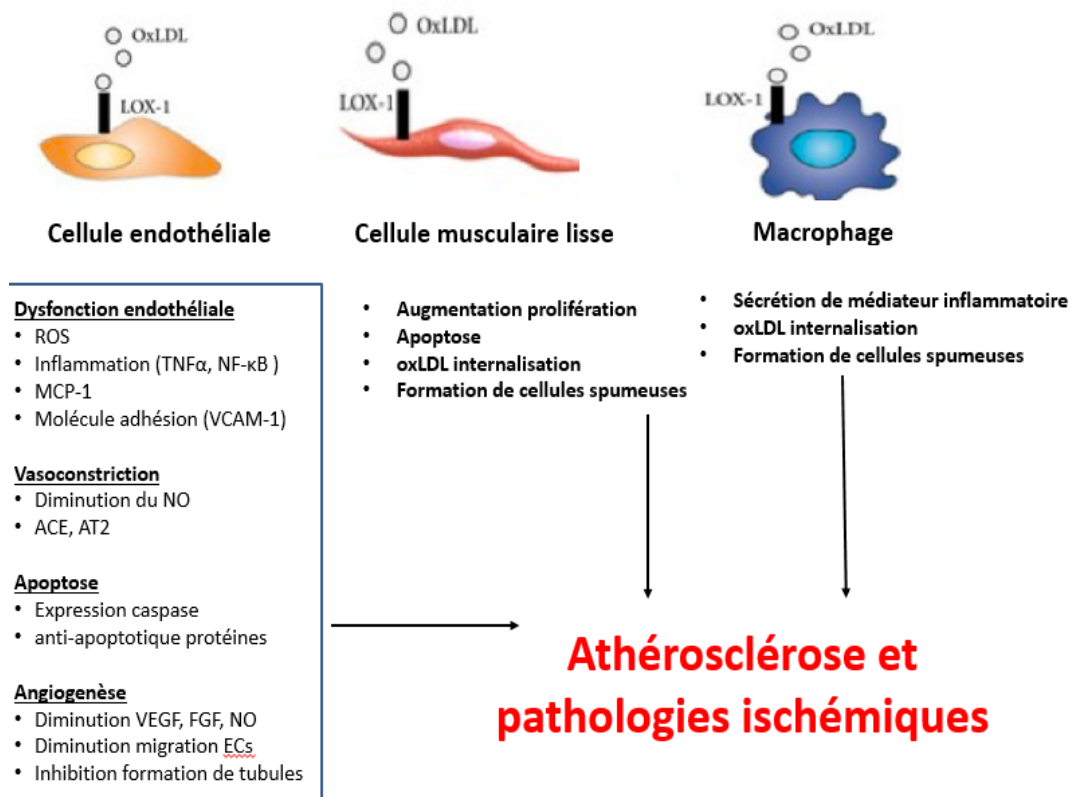


Figure 8. Effets pathologiques des oxLDL sur les ECs et types cellulaires impliqués dans l'athérosclérose. Figure adaptée de : (Pirillo, Norata, and Catapano 2013a)

3.7.5. Effets des oxLDL sur la capacité angiogénique des ECs

La capacité angiogénique des ECs est une fonction hautement régulée en condition physiologique et souvent modulée en condition pathologique (Otrock et al. 2007). Par exemple, dans un contexte athérosclérotique, la stimulation de l'angiogenèse contribue à la formation de plaque et d'autre part, elle est requise afin de réduire des dommages ischémiques causés par l'athérosclérose elle-même (Moulton 2001; Marti and Risau 1999). L'angiogenèse implique plusieurs étapes comme la perte du contact cellule-cellule pour permettre la migration et la prolifération des ECs menant à la formation de nouveaux tubules (Otrock et al. 2007). Nos études au laboratoire ont démontré que l'exposition des ECs à l'oxLDL inhibe les capacités angiogéniques des ECs par divers mécanismes (Haddad et al. 2011; Desjarlais et al. 2017a) qui seront revus au chapitre 6.

Les oxLDL ont également un impact négatif sur les cellules endothéliales progénitrices (EPCs) en causant leur dysfonctionnement (Ma et al. 2009). Les EPCs sont impliqués dans la régénération de l'endothélium et dans le processus de néovascularisation. Les EPCs stimulent la néovascularisation par la sécrétion de facteurs angiogéniques et par leurs intégrations aux structures vasculaires nouvellement formées. Il est maintenant connu que les pathologies ischémiques athérosclérotiques sont associées à une réduction du nombre et à une défaillance fonctionnelle des EPCs (Du et al. 2012). Différentes études suggèrent que les oxLDL causent une diminution du nombre d'EPCs, une induction de leurs sénescences et une défaillance de leurs capacités angiogéniques (Huang, Chen, and Lin 2014b; Imanishi et al. 2003; Imanishi et al. 2004).

3.8. Résumé du chapitre

Dans ce chapitre, il a été démontré que l'endothélium est un organe dynamique possédant plusieurs fonctions biologiques vitales et que la perte de ses propriétés physiologiques mène à la dysfonction endothéliale. L'acquisition de ce phénotype est en grande partie causée par les différents facteurs de risques cardiovasculaires et contribue à diverses pathologies cardiovasculaires, dont l'athérosclérose. Les mécanismes associés sont multiples et impliquent un ensemble de facteurs et d'acteurs moléculaires modulés en condition athérosclérotique. L'élévation du stress oxydant et la diminution du NO favorise la création d'un environnement pro-inflammatoire et pro-athérogénique caractéristique de l'endothélium dysfonctionnel. Le chapitre suivant discutera de l'athérosclérose, une pathologie résultant de la dysfonction endothéliale.

Chapitre 4. L'athérosclérose

4.1. Définition et généralité

L'athérosclérose est une pathologie systémique et progressive, définie par une association variable de remaniement de l'intima des artères de gros et moyen calibres (définition de l'OMS). Elle se manifeste par la formation de plaques constituées d'une accumulation de divers éléments (ex. : cholestérol, glucides complexes, cellules, produits sanguins, tissus fibreux) menant à une réduction progressive de la lumière artérielle (sténose) (Libby 2003). Il s'agit d'une pathologie multifactorielle évoluant sur plusieurs années. En effet, l'athérosclérose débute dès l'enfance à un stade asymptomatique et les premières manifestations cliniques apparaissent en général après l'âge de 40 ans (**figure 9**). Toutefois, la progression de l'athérosclérose est grandement influencée par les interactions entre la paroi artérielle et son micro-environnement. Dans cette optique, l'aspect épigénétique et environnemental contribue à accélérer le développement de l'athérosclérose (Lusis 2000). Les principales artères touchées sont les artères coronaires et carotidiennes, l'aorte abdominale et ses ramifications alimentant les membres inférieurs (VanderLaan, Reardon, and Getz 2004). Également, dans l'arbre artériel, il existe des localisations préférentielles favorisant la formation de plaques athérosclérotiques. Il s'agit de zones à faibles contraintes de cisaillements incluant les points de bifurcations et de courbures des artères (VanderLaan, Reardon, and Getz 2004). La gravité de l'ischémie tissulaire en aval de la plaque dépend du degré de sténose du vaisseau. La complication ultime de l'athérosclérose provient de la rupture de plaque (thrombose) pouvant causer une obstruction complète de l'artère entraînant une nécrose des tissus. Parmi les plus sévères et fréquentes manifestations cliniques, nous retrouvons l'infarctus du myocarde et l'AVC (OMS). Les diverses complications athérosclérotiques seront discutées en détail plus loin.

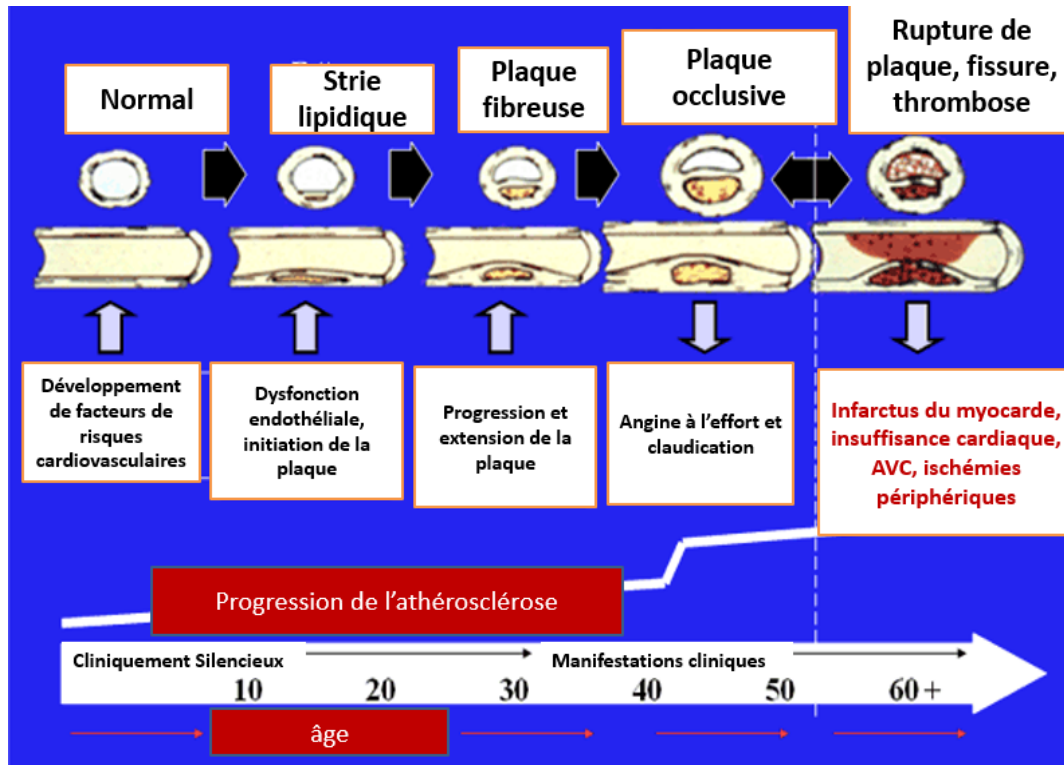


Figure 9. Stades évolutifs de l'athérosclérose. Figure adaptée de : (National Institutes of Health (NIH))

4.2. Anatomopathologie de l'athérosclérose : stades évolutifs de la plaque

4.2.1. Stade 1-3 : cliniquement silencieux

Basée sur des études anatomopathologiques et épidémiologiques, l'évolution de la plaque athérosclérotique a été classée en 6 stades (**figure 9**). Les stades 1 à 3 correspondent à des lésions retrouvées en général chez les sujets de moins de 20 ans et sont cliniquement silencieux. Les lésions de type 1, appelées lésions initiales ou microscopiques, sont présentes chez les moins de 10 ans et chez les adultes résistant à l'athérosclérose. Une infiltration d'un petit nombre de macrophages engorgés de lipides (cellules spumeuses) dans l'intima des artères est observée. Le stade 2 (stries lipidiques) se manifeste en général vers l'âge de 10-15 ans. Ces lésions macroscopiques sont caractérisées par la présence à la surface artérielle interne de surélévations linéaires de couleur jaune contenant des petits amas de cellules spumeuses et un

petit nombre de SMCs. Les lésions de type 3 (pré-athéromateuses et irréversibles) apparaissent normalement vers l'âge de 15-20 ans. Elles sont caractérisées par la présence de gouttelettes lipidiques extracellulaires localisées à proximité des stries lipidiques (Stary et al. 1994).

4.2.2. Stade 4 et 5 : plaque simple, symptomatique ou non

Les lésions de type 4 (athéromateuses) touchent en général les jeunes adultes de 20-30 ans. Elles sont caractérisées par une augmentation de lipides extracellulaires libérés après la dégénérescence des cellules spumeuses. Ces vésicules de lipides vont ensuite fusionner pour former le corps lipidique. Le corps lipidique est en général acellulaire, précède la formation de tissus fibreux et désorganise la structure de l'intima. En effet, des dépôts de calcium et des capillaires apparaissent en bordure du corps lipidique. Les cellules spumeuses se concentrent à la surface de la lésion et une infiltration de cellules inflammatoires et un amincissement de la média sont observés. La plaque évolue ensuite en plaque fibreuse (type 5) ou en plaque rompue (type 6) (Stary et al. 1995).

Les lésions de type 5 (fibroathéromateuses) sont retrouvées généralement après 40 ans et correspondent à la définition type de l'athérosclérose. Elles sont caractérisées par la présence de tissus fibreux dans l'intima riche en collagène et en SMC entourant le centre nécrotique de la plaque et formant la chape fibreuse (type 5a). La plaque peut aussi présenter des calcifications dans le centre nécrotique (type 5 b). Au stade 5, une sténose artérielle significative est en général observée, en particulier dans les artères coronaires, carotidiennes et des membres inférieurs (Stary et al. 1995).

4.2.3. Stade 6 : plaque compliquée

La lésion de type 6 (plaque compliquée) représente une progression majeure de l'athérosclérose après 40 ans. Ce type de plaque est responsable d'événements cliniques aigus (ex. : infarctus myocarde, AVC, anévrisme, hémorragie). Les plaques de type 6a sont caractérisées par des fissures superficielles ou profondes à la surface de la plaque. Elles peuvent causer un relargage massif de lipides dans le sang, favoriser la perforation de la média et générer de faux anévrismes. Ces plaques sont associées à des hémorragies intraplaques causées par la rupture des néovaisseaux et par les contraintes hémodynamiques. Les plaques de type 6b sont

associées à des thromboses menant à des infarctus et des AVCs. En effet, le contact sanguin avec le sous-endothélium et le centre nécrotique déclenche l'adhésion et l'agrégation des plaquettes conduisant à la formation d'un thrombus pariétal. La thrombose peut être rapidement occlusive si elle survient dans les artères de moyen calibre. En absence d'occlusion, l'incorporation du thrombus dans la plaque fissurée va mener à une diminution de la lumière artérielle (Stary et al. 1995). Mis à part les principales manifestations thrombotiques ou ischémiques sévères, les plaques de stade 6 peuvent mener à d'autres types de complications. Par exemple, elles peuvent causer des embolies de cholestérol périphériques par une fissure profonde du corps nécrotique qui libère le contenu lipidique dans le sang. Les plaques susceptibles d'engendrer ce type d'embolies sont retrouvées dans les grosses artères telles que l'aorte et l'artère iliaque. Des embolies multiples dérivant de ces plaques peuvent ensuite affecter les vaisseaux de petits calibres (Eggebrecht et al. 2000; Ben-Horin et al. 2003). Une autre complication est l'anévrisme artériel (ex : anévrismes de l'aorte abdominale). Il est défini comme une dilatation localisée de la paroi artérielle formant une poche de taille variable. Les lésions anévrismales sont caractérisées par un amincissement de la média et par une perte de SMCs remplacées par du tissu fibreux (Xu, Zarins, and Glagov 2001).

4.3. Les différentes théories sur l'origine de l'athérosclérose

Depuis près d'un siècle, plusieurs théories ont été postulées pour expliquer les différents mécanismes à l'origine de l'athérosclérose. Encore aujourd'hui, les mécanismes exacts demeurent partiellement définis. Parce que l'athérosclérose est un processus dynamique, complexe et multifactoriel, aucune théorie n'est vraiment exclusive, mais plutôt complémentaire. Au cours des dernières années, les trois hypothèses les plus acceptées pour expliquer les mécanismes de l'athérogénèse sont l'hypothèse de la réponse à l'injure, l'hypothèse de la modification oxydative des LDL et l'hypothèse inflammatoire. Collectivement, les mécanismes associés à ces trois hypothèses sont reliés et impliquent des événements inflammatoires dans tous les stades de l'athérogénèse. De façon générale, les différentes théories permettent de mettre en lumière tous les mécanismes conceptuels importants de la genèse de la plaque. Les sections suivantes vont discuter des trois hypothèses de l'athérosclérose et de divers éléments clés impliqués dans les mécanismes sous-jacents.

4.3.1. L'hypothèse de la réponse à l'injure

Une des premières hypothèses expliquant le développement de la plaque athérosclérotique a été postulée par Ross et ses collègues en 1973. Cette théorie implique des injures à l'endothélium favorisant une dénudation à l'origine de l'athérosclérose. Cette dégénérescence endothéliale mène ensuite à l'adhérence et à l'agrégation des plaquettes aux sites d'injures, conduisant à un micro-environnement pro-coagulant. Durant ce processus, des facteurs mitogènes sont sécrétés des plaquettes permettant la prolifération des SMCs de l'intima et une déposition de lipides intra- et extracellulaires (Ross, Glomset, and Harker 1977). Au début des années 2000, la théorie a été raffinée et remplacée par l'équivalent du terme dysfonction endothéliale. De façon moderne, la perte des fonctions physiologiques de l'endothélium par diverses injures génétiques et environnementales mène à une réponse compensatoire favorisant un phénotype pro-athérogénique. Pour résumer, similairement à la théorie de la dénudation endothéliale, la dysfonction endothéliale cause l'adhésion des leucocytes et des plaquettes menant à un phénotype pro-coagulant. De plus, la dysfonction endothéliale est caractérisée par une réponse inflammatoire favorisant le recrutement des monocytes à l'endothélium, ainsi que la migration et la prolifération des SMCs (Widlansky et al. 2003; Bonetti, Lerman, and Lerman 2003).

4.3.2. L'hypothèse de la modification oxydative des LDLs

4.3.2.1. Historique

La théorie de la modification oxydative des LDLs dérive de l'hypothèse de la réponse à la rétention émise par Williams et Tabas en 1994. En effet, basé sur le travail de nombreux chercheurs, les auteurs postulaient que la rétention des LDL dans la paroi des artères était le processus initiateur de l'athérosclérose (Williams and Tabas 1995). En effet, cette rétention des LDLs dans l'espace sous-endothélial était associée au déclenchement d'une réponse inflammatoire et à la formation de cellules spumeuses (Williams and Tabas 1995). Cette hypothèse était basée sur plusieurs évidences impliquant des expériences dans des modèles animaux. Par exemple, une rétention de LDL formant des micro-agrégats dans la paroi artérielle était observée deux heures après une injection de LDL chez le lapin (Nivelstein et al. 1991). Cette rétention était localisée dans des sites connus pour le développement de plaques

athérosclérotiques (Schwenke and Carew 1989). Également, il a été documenté que l'initiation de l'athérosclérose était diminuée en présence de faible concentration d'ApoB, une lipoprotéine associée aux LDLs (Mills and Taylaur 1971). Toutefois, d'autres études ont confirmées par la suite qu'une simple rétention de LDLs dans la paroi des artères n'était pas suffisante pour initier le processus athérogénique. En effet, des observations *in vitro* ont démontré que les LDLs n'étaient pas internalisés par les macrophages et que les récepteurs aux LDLs n'étaient pas responsables de la formation de cellules spumeuses (Goldstein and Brown 1977). D'un point de vue mécanistique, le récepteur des LDLs sous forme native possède un site de liaison reconnaissant l'ApoB des LDLs ou l'ApoE des VLDL. Le récepteur est aussi soumis à une régulation négative empêchant son expression lorsque la concentration de cholestérol intracellulaire est supérieure à un seuil critique. Or, ce mécanisme expliquait que les LDLs sous forme native n'étaient pas associés à la formation de cellules spumeuses qui requiert une accumulation excessive de lipides (Stocker and Keaney 2004). Collectivement, ces résultats suggéraient l'implication d'un autre récepteur reconnaissant des formes modifiées de LDL (Goldstein et al. 1979). Par la suite, une étude de Steinberg et ses collègues montrait que les LDLs subissant des modifications oxydatives étaient associés à une augmentation des cellules spumeuses et de l'athérogénèse (Steinberg et al. 1989).

4.3.2.2. Mécanismes

L'hypothèse de la réponse à la modification oxydative des LDLs peut être décrite comme suit (**figure 10**) : les LDL pénètrent et s'accumulent dans l'espace sous-endothélial des artères pour ensuite subir des modifications oxydatives par diverses sources environnementales, intracellulaires et enzymatiques. Le degré d'oxydation peut être minimal ou majeur et influencer la reconnaissance des LDLs par leurs récepteurs. Les LDL oxydés minimalement sont encore reconnus par les récepteurs aux LDLs natifs, alors que les LDLs fortement oxydés sont reconnus par des récepteurs de type scavenger (Stocker and Keaney 2004). D'un point de vue structural, les LDLs doivent subir une modification oxydative entraînant un changement conformationnel de leur ApoB causant la perte de reconnaissance pour le récepteur aux LDLs qui est remplacé par les récepteurs scavengers (Brown et al. 1979).

Dans l'espace sous-endothélial, les oxLDL vont stimuler la production par les ECs de molécules tels que le MCP-1 et le VCAM-1 favorisant ainsi le recrutement et l'adhésion des

monocytes dans l'intima (Stocker and Keaney 2004). Les monocytes ayant pénétré l'intima vont se différencier en macrophages et être séquestrés dans l'espace sous-endothélial. Ces macrophages reconnaissent les oxLDL par leurs récepteurs scavengers et vont ensuite internaliser de grandes quantités de lipides. Il est important de mentionner que la voie des récepteurs scavengers n'est pas régulée négativement et favorise une accumulation massive de lipides dans les macrophages formant les cellules spumeuses (de Winther et al. 2000). Les cellules spumeuses vont ensuite sécréter divers facteurs amplifiant la réponse inflammatoire, induisant la prolifération des SMCs et causant la dysfonction des ECs. La nécrose subséquente des cellules spumeuses va libérer diverses enzymes lysosomales, des débris cellulaires et d'importantes quantités de lipides. Tous ces processus vont favoriser la formation de la plaque athérosclérotique (Stocker and Keaney 2004).

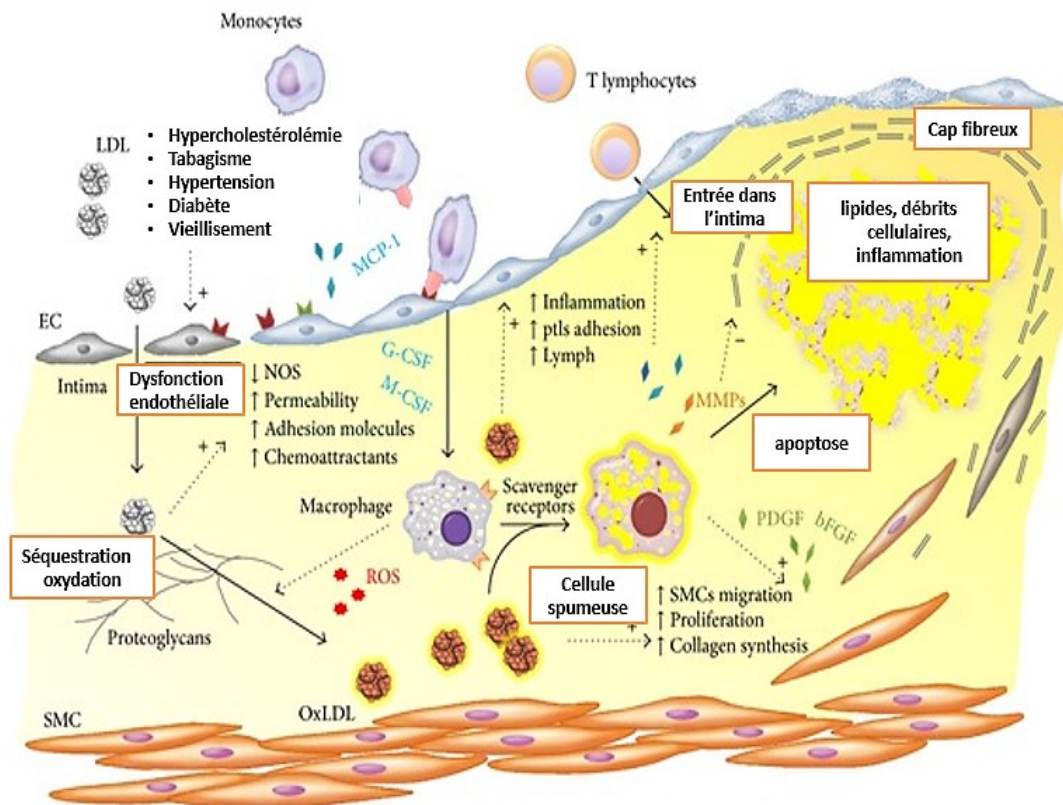


Figure 10. Mécanismes et éléments clés associées au développement de l'athérosclérose : Explication dans le texte. Figure adaptée de : (Maiolino et al. 2013)

4.4. Rôle de l'immunité et de l'inflammation dans l'athérosclérose

4.4.1. L'hypothèse inflammatoire : historique

Au cours des dernières années, les progrès en science fondamentale et en recherche clinique ont permis d'établir que l'inflammation est un processus impliqué dans toutes les étapes du développement de l'athérosclérose (Libby 2002). En effet, il est aujourd'hui possible d'affirmer que l'athérosclérose est une maladie artérielle inflammatoire causée par divers facteurs d'agression dont en particulier les oxLDL. Historiquement, la présence de cellules inflammatoires dans les plaques athérosclérotiques est connue depuis le 19^e siècle. Rudolf Virchow est le premier à avoir reconnu la nature inflammatoire des plaques athérosclérotiques comme un processus gras de ramollissement des artères causé par un état inflammatoire (Libby 2002). Le concept inflammatoire décrit par Virchow était très novateur pour l'époque et a malheureusement été remplacé par d'autres théories jusqu'au début des années 1980. Par exemple, en 1985, Schwartz et ses collègues postulaient que l'athérosclérose était une maladie inflammatoire de la paroi artérielle, impliquant la participation active des monocytes/macrophages (Schwartz et al. 1985). Depuis, de nombreuses publications ont démontré l'importance de l'inflammation dans les différentes étapes de l'athérosclérose (Libby 2012). La dynamique des mécanismes inflammatoires est complexe et multifactorielle. Elle implique diverses cellules immunes et inflammatoires, ainsi qu'une multitude d'acteurs moléculaires dont en particulier les cytokines.

4.4.2. L'hypothèse inflammatoire moderne

D'un point de vue mécanistique, l'hypothèse inflammatoire est la plus acceptée aujourd'hui pour expliquer le développement et la progression de l'athérosclérose. Cette théorie est complémentaire à l'hypothèse de la modification oxydative des LDLs et à la dysfonction endothéliale. En effet, elle met en jeu une chronologie d'événements dynamiques pouvant être résumés ainsi (Hansson 2001): 1) la pénétration, la rétention et l'oxydation des LDL dans l'intima comme stimulus déclencheur de la réponse inflammatoire. 2) L'induction de la dysfonction endothéliale par les oxLDL menant à l'expression de molécules d'adhésions et à la

production de cytokines inflammatoires par les ECs et permettant le recrutement des leucocytes à la paroi vasculaire. 3) La transmigration endothéliale et la différenciation des monocytes en macrophages, l'internalisation d'oxLDL et la formation de cellules spumeuses. 4) La sécrétion par les cellules spumeuses de diverses molécules pro-inflammatoires amplifiant l'inflammation de la plaque et stimulant la prolifération des SMCs. 5) D'autres types cellulaires incluant des lymphocytes T seront aussi recrutés par l'effet des cytokines sécrétées par les cellules spumeuses, les SMCs et les macrophages résidents. 6) Divers éléments tels que des MMPs, des ROS et des facteurs de croissance seront produits par les différentes cellules au sein de la plaque menant à l'amplification du cercle inflammatoire pro-athérogénique (Hansson 2001). Les principales cellules inflammatoires et les mécanismes clés permettant leurs recrutements dans la paroi des vaisseaux seront décrits dans les paragraphes suivants.

4.4.3. Recrutement des cellules immunes à la paroi des vaisseaux

4.4.3.1. Adhésion des leucocytes à l'endothélium

Durant le processus initial de l'athérosclérose, les leucocytes mononucléaires incluant les monocytes et les lymphocytes vont adhérer à l'endothélium (**figure 11**). Pour ce faire, les ECs normalement résistantes à l'adhésion leucocytaire doivent être activées par divers médiateurs (oxLDL, TNF- α , IL-1, ROS) stimulant l'expression de protéines membranaires d'adhésion telles que VCAM-1 et ICAM-1 (Hansson 2001). L'induction de VCAM-1 et ICAM-1 est en grande partie régulée par le facteur de transcription nucléaire (NF- κ B), qui est activé par diverses cytokines et conditions inflammatoires (Collins et al. 1995). L'hypercholestérolémie est un autre facteur important qui favorise l'inflammation de la paroi vasculaire et l'expression de VCAM-1 par l'endothélium (Li et al. 1993). ICAM-1 est principalement exprimé par des mécanismes dépendants des cytokines et par le stress hémodynamique artériel, notamment en condition d'hypertension (Walpola et al. 1995).

Une fois adhérents à l'endothélium, les leucocytes vont migrer dans l'intima par transmigration endothéliale sous l'influence de facteurs chimioattractants. Divers types cellulaires (ex : ECs, SMCs, macrophages) produisent des molécules chimiotactiques nécessaires à l'attraction de cellules inflammatoire dans l'intima artérielle (Hansson 2001).

Parmi ces facteurs, le MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) est le plus important et le plus caractérisé. En effet, il permet la migration et la diapédèse des monocytes adhérents vers l'espace sous-endothélial par sa liaison à son récepteur CCR2 (C-C chemokine receptor type 2) à la membrane monocyttaire (Deshmane et al. 2009).

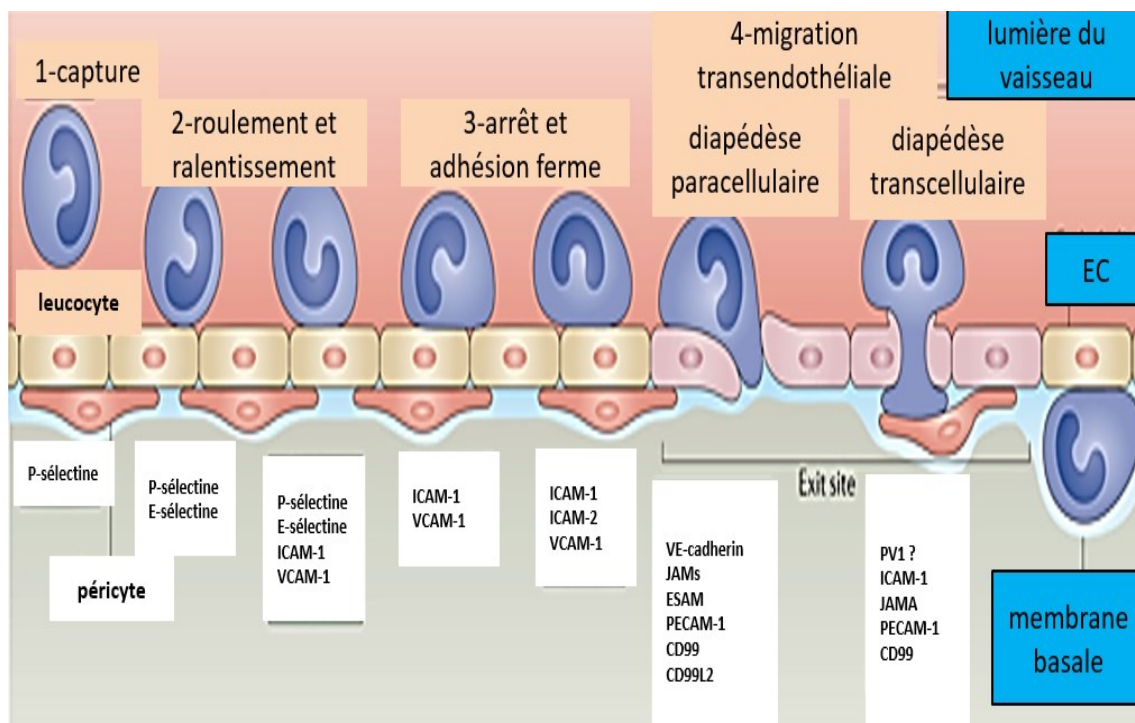


Figure 11. Étapes d'adhésion des leucocytes à l'endothélium et principales molécules impliquées. Figure adaptée de : (Vestweber 2015)

4.4.3.2. Macrophage : processus de différenciation et formation en cellule spumeuse

Les macrophages sont des éléments clés dans l'athérosclérose participant à l'inflammation et à la formation de cellules spumeuses. Leurs actions dépendent largement de leur capacité à produire plusieurs médiateurs pro-athérogéniques comme des ROS, des cytokines, des chimiokines, des facteurs de croissance et des MMPs (Hansson 2001). Les différentes molécules produites vont alors contribuer à amplifier l'inflammation de la plaque, stimuler la prolifération des SMCs, mais aussi, à la déstabilisation de la plaque athérosclérotique. Les macrophages peuvent également déclencher une réponse immunitaire adaptative en présentant des antigènes pour différentes cellules immunes. Durant

l'athérogénèse, les monocytes localisés dans l'espace sous-endothélial vont se transformer en macrophages sous l'influence de facteurs de différenciations comme le M-CSF (macrophage-colony-stimulating-facteur). Le M-CSF est produit et sécrété par différents types cellulaires comme les macrophages, les ECs, les fibroblastes et les lymphocytes (Tojo et al. 1999). Plusieurs études ont confirmé l'importance du M-CSF dans le processus de différenciation des monocytes en macrophages. Par exemple, une diminution significative de l'athérosclérose est observée chez les souris hypercholestérolémiques déficientes en M-CSF (de Villiers et al. 1998; Smith et al. 1995).

Un des processus les plus importants dans l'athérogénèse est la transformation des macrophages résidents de l'intima en cellules spumeuses. Ce processus est caractérisé par une accumulation incontrôlée des oxLDL et du cholestérol estérifié dans les macrophages. Cette accumulation sous forme de gouttelettes lipidiques dans le cytosol des macrophages les transforme en cellules spumeuses (Yu et al. 2013). Afin de capter et d'internaliser les différents lipides, les macrophages doivent exprimer des récepteurs scavenger (SR) responsables de la reconnaissance et de la liaison des oxLDLs (**figure 12**). Les principaux récepteurs pour les oxLDLs sont le LOX-1, le SR-A et le CD36. De façon intéressante, les récepteurs SR-A et CD36 participeraient à 75-90 % de l'internalisation totale des oxLDLs dans les macrophages (Kunjathoor et al. 2002). L'expression de ses récepteurs est finement régulée par diverses cytokines dont les principales sont le TNF- α , IL-4, IL-6 et INF- γ . Ces cytokines sont sécrétées par différentes cellules (macrophages, TH-1, TH-2 et SMCs) (de Villiers et al. 1998). Les cellules spumeuses vont grandement contribuer à la formation du corps lipidique en libérant d'importantes quantités de lipides lors de leur mort par nécrose (Kunjathoor et al. 2002). Également, il est maintenant connu que les macrophages peuvent acquérir deux phénotypes différents (M1 et M2) possédant des fonctions inverses dans l'athérosclérose (Leitinger and Schulman 2013). Ce processus d'acquisition phénotypique est appelé polarisation des macrophages et sera discuté à la section suivante.

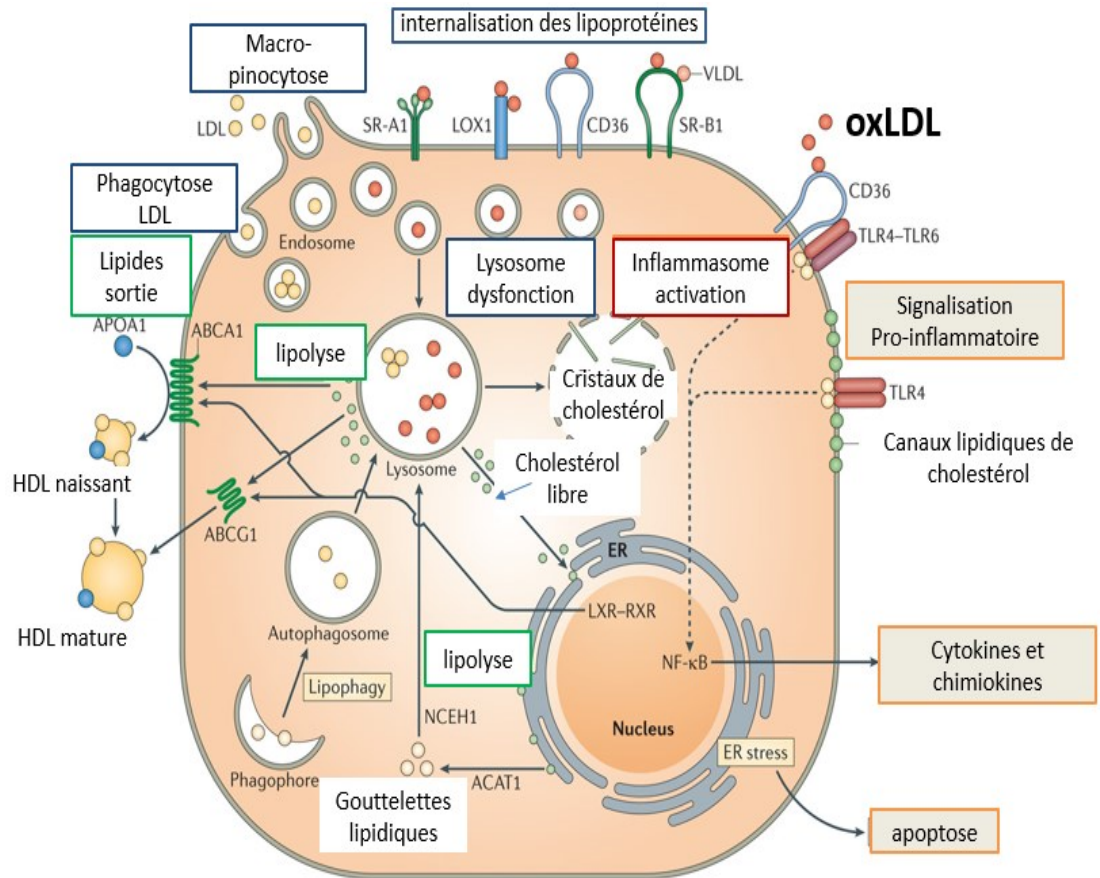


Figure 12. Formation de la cellule spumeuse. Récepteurs et mécanismes d'internalisation (bleu) et d'élimination (vert) des lipides par les macrophages. Voies de signalisation impliquées dans l'induction de l'inflammation et de l'apoptose par les oxLDL (rouge). Figure adaptée de : (Moore, Sheedy, and Fisher 2013b)

4.4.3.3. La polarisation des macrophages : diversité des phénotypes

Au cours des dernières années, plusieurs études se sont intéressées à mieux caractériser la grande diversité des populations de macrophages, notamment leurs différentes fonctions en condition pathologique. Malgré les progrès majeurs, les mécanismes précis menant à l'acquisition d'un phénotype particulier dans l'évolution de l'athérosclérose demeurent controversés. En effet, il est maintenant connu que les macrophages présentent des fonctions hautement hétérogènes, en fonction des stimuli et du micro-environnement dans lequel ils sont

localisés. Par exemple, ils peuvent changer de phénotype lors de dommages tissulaires, ce qui leur confère une grande plasticité (Leitinger and Schulman 2013).

Classiquement, deux sous-types principaux de macrophages (M1 et M2) ayant des rôles inverses sont retrouvés dans les plaques d'athéromes (**figure 13**). Les M1 sont caractérisés pro-inflammatoires et pro-athérogéniques, alors que les M2 possèdent des fonctions inverses. En effet, les M2 sont impliqués principalement dans la phase de résolution inflammatoire, la réparation tissulaire et la régression de l'athérosclérose (Peled and Fisher 2014). Par exemple, il a été démontré que la quantité de M1 et de M2 est augmentée dans les plaques en progression. Toutefois, les M1 sont prédominants dans les plaques instables alors que les M2 sont nombreux dans l'adventice des plaques stabilisées (Stoger et al. 2012). Les stimuli et les mécanismes à l'origine de la polarisation des macrophages sont multifactoriels et divergent selon le micro-environnement. Les paragraphes suivants discuteront du rôle général des M1 et des M2 dans la phase de progression et de régression de la plaque athérosclérotique.

La polarisation des macrophages en M1 peut être induite par plusieurs stimuli tels que des ligands des récepteurs TLR (tool-like-receptor) incluant le LPS et l'IFN γ . Ces deux ligands sont fortement produits en condition hypercholestérolémique par les TH1. Les M1 sont reconnus pour générer de multiples médiateurs pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-1 β , IL-6, IL-12, iNOS et MMPs (Hanna et al. 2012; Peled and Fisher 2014; Leitinger and Schulman 2013). La sécrétion de ces divers facteurs a pour conséquence de maintenir l'environnement inflammatoire favorisant la progression de l'athérosclérose. De plus, la synthèse de MMPs contribue à la dégradation de la MEC menant à la formation de plaques instables et compliquées. La production de facteurs pro-athérogéniques par les M1 stimule l'activation des ECs et des SMCs (Chinetti-Gbaguidi et al. 2011). Aussi, les M1 causent des altérations au métabolisme lipidique en diminuant l'expression d'ABCA1, un important transporteur inverse de cholestérol, ce qui favorise la formation de cellules spumeuses (Maitra, Parks, and Li 2009).

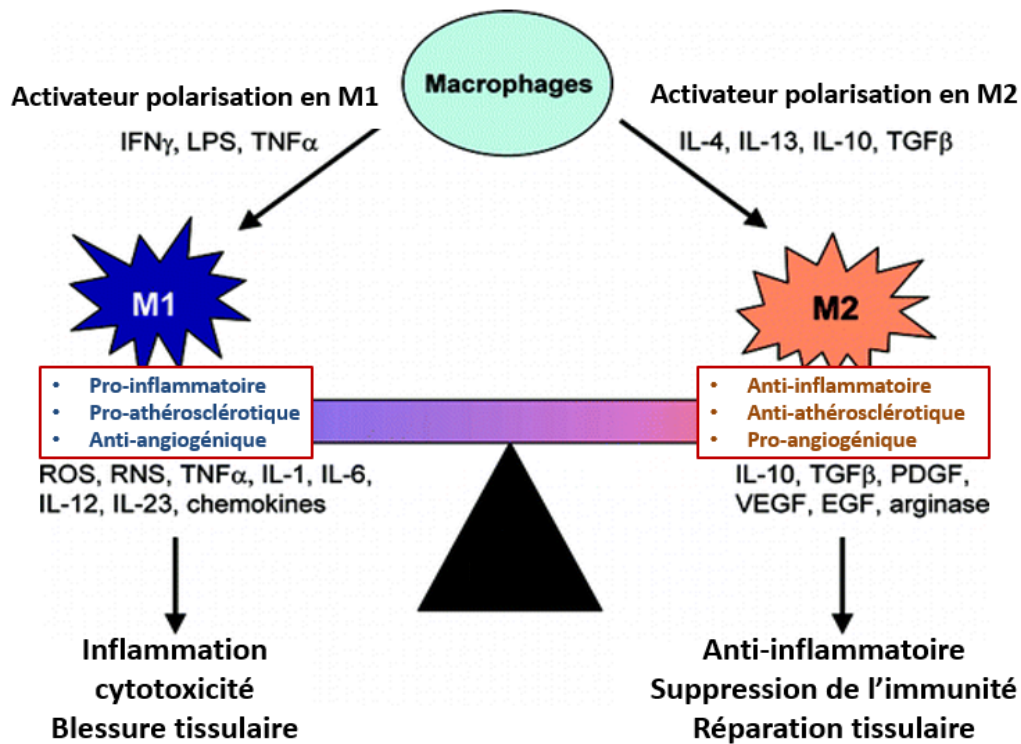


Figure 13. Polarisation des macrophages M1 vs M2 : rôles et caractéristiques. Figure adaptée de : (Laskin 2009)

Contrairement aux M1, la polarisation des macrophages en M2 est induite par des cytokines (IL-4 et IL-13) produites par les TH2 (Tiemessen et al. 2007). Les M2 sont caractérisés par l'expression de marqueurs comme le CD163 et le CD206, la production de cytokines anti-inflammatoires incluant que le TFG- β et l'antagonisme des récepteurs à l'IL-1 et l'IL-10. Basées sur le sécrétome spécifique des M2, des études ont confirmé qu'ils participent activement à la réparation tissulaire et que leur nombre est augmenté significativement dans les plaques d'athéromes en régression (Feig, Rong, et al. 2011; Feig, Parathath, et al. 2011). Toutefois, les mécanismes à l'origine de l'enrichissement en M2 dans les plaques en régression demeurent encore mal compris. Hypothétiquement, des études suggèrent que cet enrichissement pourrait être le résultat de trois processus: 1) le changement de phénotype M1 en M2 par le micro-environnement (Gordon and Martinez 2010), 2) le remplacement des M1 résidents par des M2 attirés aux sites athérosclérotiques (Llodra et al. 2004) et 3) la prolifération des M2 de

l'intima (Davies et al. 2013). La contribution des M2 à la régression de plaque est principalement liée à leur fonction lors du remodelage tissulaire et leur rôle anti-inflammatoire via l'IL-13. Par exemple, chez la souris hypercholestérolémique, l'IL-13 diminue le recrutement des monocytes en inhibant l'induction de VCAM-1. Aussi, le niveau d'expression d'IL-13 est inversement corrélé à la quantité de M1 et associé à une augmentation des M2 dans les plaques athérosclérotiques (Cardilo-Reis et al. 2012). Finalement, il a été démontré que l'hyperglycémie, un important facteur de risque cardiovasculaire, diminue l'enrichissement des M2 (Parathath et al. 2011). Parmi les autres fonctions bénéfiques des M2, nous retrouvons la sécrétion de collagène stabilisant la plaque (Schnoor et al. 2008) et leur capacité à éliminer les débris cellulaires empêchant ainsi l'expansion du corps nécrotique (Zizzo et al. 2012).

4.5. Rôle des cytokines dans l'athérosclérose

Le recrutement, la stimulation et l'activation des cellules impliquées dans les différents processus de l'athérosclérose requièrent un système de communication moléculaire qui est médié en grande partie par les cytokines. Les cytokines sont des molécules solubles sécrétées par les cellules et agissant sur la régulation des voies de signalisations intracellulaires. L'interaction des cytokines avec leurs récepteurs spécifiques se produit de façon paracrine (cellule proche), juxtacrine (cellule en contact), autocrine (sur elle-même) et endocrine (cellule à distance). Les cytokines représentent un groupe de plus de 100 protéines de faible poids moléculaire (<50 KD) divisé en plusieurs familles. Nous retrouvons les interleukines (IL), les chimiokines (CCL, CXCL), le *tumor necrosis factor* (TNF), le *transforming grow factor* (TGF), les interférons (INF), les *colony-stimulating factor* (CSF) (Ramji and Davies 2015). Toutes ces familles sont impliquées dans divers processus biologiques participant à la réponse inflammatoire de l'athérosclérose. Les voies de signalisations stimulées par les cytokines sont complexes, car ils peuvent agir de façon synergique et antagoniste. Globalement, après liaison avec leurs récepteurs, les cytokines provoquent des cascades de signalisations moléculaires activant des protéines kinases et induisant l'expression de divers facteurs transcriptionnels (Autieri 2012). Toutefois, plusieurs études ont permis d'identifier des cytokines pro et anti-athérosclérotiques ayant un rôle important dans la progression de la maladie. Les paragraphes suivants visent à décrire la fonction des principales cytokines jouant un rôle majeur dans l'athérosclérose.

4.5.1 Cytokines pro-athérogéniques : IFN γ , TNF- α et IL-1

Les principales cytokines pro-athérogéniques sont l'IFN γ , le TNF- α et l'IL-1. L'IFN γ est une cytokine de la famille des interférons retrouvée abondamment dans la plaque athérosclérotique. Elle est synthétisée constitutivement par les TH1, alors que les ECs, les macrophages et les SMCs la produisent en réponse à divers stimuli inflammatoires. L'IFN γ est un activateur des voies de signalisation JAK/STAT et SMAD impliquées dans l'induction de gènes pro-inflammatoires et d'adhésions (Paukku and Silvennoinen 2004; Tedgui and Mallat 2006a). Des études ont également démontré que l'IFN γ augmente l'internalisation d'oxLDL par les macrophages favorisant la formation de cellules spumeuses (Whitman et al. 2000).

Le TNF- α est fortement impliqué dans les processus inflammatoires et il joue un rôle pro-athérogénique majeur. Par exemple, l'activation de son récepteur TNF- α R1 induit l'expression de multiples gènes pro-inflammatoires importants par l'intermédiaire de NF- κ B. Le TNF- α est exprimé par les lymphocytes, les macrophages, les monocytes, les ECs et les SMCs (Sprague and Khalil 2009; Autieri 2012). Par l'induction de VCAM-1, le TNF- α promeut l'adhésion des leucocytes à l'endothélium et induit une dysfonction endothéliale en augmentant les niveaux de ROS intracellulaires (Zhang et al. 2009). Chez la souris hypercholestérolémique, il a été démontré que la suppression du gène TNF- α permet de diminuer significativement l'inflammation et la formation de plaques athérosclérotiques (Branen et al. 2004; Ohta et al. 2005).

L'IL-1 β est une importante interleukine pro-athérogénique fortement retrouvée dans les plaques athérosclérotiques. Elle est synthétisée par les monocytes, macrophages, ECs et SMCs en réponse à divers stimuli inflammatoires incluant le LPS et le TNF- α (Frostedgard et al. 1999). Elle induit à son tour la production de nombreuses autres cytokines par des mécanismes dépendants des MAPK kinases et de NF- κ B (Frostedgard et al. 1999). De plus, l'activation de ces voies de signalisations mène à l'expression de molécules d'adhésions impliquées dans le recrutement de diverses cellules inflammatoires (Bevilacqua et al. 1985). IL-1 permet de maintenir l'inflammation locale des lésions athérosclérotiques. En effet, plusieurs modèles animaux ont permis de démontrer que la délétion du gène IL-1 réduit l'athérosclérose en condition d'hypercholestérolémie (Schieffer et al. 2004).

4.5.2. Les cytokines anti-athérogéniques : IL-10, TFG- β et IL-33

Au cours des dernières années, beaucoup d'études se sont concentrées à mieux caractériser la fonction des cytokines jouant un rôle anti-athérogénique et exprimées de façon abondante au sein des plaques athérosclérotiques. Parmi les plus documentées, nous retrouvons l'IL-10, l'IL-33 et le TFG- β . L'IL-10 est l'interleukine anti-inflammatoire la plus étudiée. Elle est produite par plusieurs cellules telles que les macrophages, les monocytes et les lymphocytes T et B (Mallat et al. 1999). Les rôles bénéfiques de l'IL-10 sont nombreux. Par exemple, l'IL-10 favorise la polarisation des cellules T en phénotype TH2 (anti-athérogénique) et inhibe la prolifération des TH1 (pro-athérogénique). Aussi, l'IL-10 diminue l'expression de multiples gènes inflammatoires en inhibant l'activation de NF- κ B par le TNF- α (Rajasingh et al. 2006; von der Thusen et al. 2003).

L'IL-33 fait partie de la famille des IL-1 mais contrairement aux autres membres, elle joue un rôle anti-athérogénique. Elle induit l'expression de diverses cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-5 et l'IL-13 qui sont reconnues pour diminuer la production d'IFN γ (Miller et al. 2008). Chez la souris hypercholestérolémique, l'IL-33 inhibe la formation de cellules spumeuses par plusieurs mécanismes. D'une part, l'IL-33 promeut la réduction de l'internalisation lipidique dans les macrophages par la diminution du récepteur scavenger CD36, et d'autre part, elle induit l'expression de gènes associés au transport inverse du cholestérol (McLaren et al. 2010).

Le TFG- β est la cytokine anti-athérogénique la plus étudiée des 50 membres de la famille des TGF. Il est produit par les macrophages, les lymphocyte T, les ECs et les SMCs (Grainger 2007). Des études ont démontré que le TFG- β est présent en faible quantité dans le sang des patients présentant une athérosclérose sévère (Grainger et al. 1995). Les effets athéroprotecteurs du TFG- β sont multiples. Par exemple, en condition athérosclérotique, le TFG- β inhibe la migration et la prolifération des SMCs, stimule la formation de MEC et exerce une fonction anti-inflammatoire en induisant la polarisation des TH2 (Grainger 2004).

4.5.3. Les chimiokines

Les chimiokines sont une famille de plus de 50 cytokines chimioattractantes de faible poids moléculaire (8-12kd) permettant le recrutement et la migration des cellules immunes à des emplacements inflammatoires spécifiques. Ils sont classés en 4 sous-groupes incluant les CXC, CC, CX3C et les C. Par leurs fonctions chimiotactiques, elles jouent un rôle clé dans la réponse inflammatoire athérosclérotique. Les chimiokines exercent leurs effets par l'activation de récepteurs spécifiques exprimés à la surface des différentes cellules inflammatoires. Il existe plus de 18 récepteurs aux chimiokines capables de lier plusieurs chimiokines différentes. Suite à la liaison à leurs récepteurs, les chimiokines vont activer différentes voies de signalisation intracellulaire telle que la voie du PI3K et des MAPK menant à la migration de la cellule stimulée. Dans la paroi artérielle saine, les chimiokines sont très peu exprimées. Par contre, elles sont induites et sécrétées par différents types cellulaires en réponse à des stimuli inflammatoires tels que le LPS, les oxLDLs et le TNF- α . Également, les contraintes de cisaillements retrouvées dans les régions artérielles présentant des plaques athérosclérotiques induisent la production de chimiokines. Les couples chimiokines/récepteurs les plus étudiés dans l'athérosclérose sont les suivants : MCP-1 (CCL2/CXCR2), RANTE (CCL5/CCR1et5), SDF-1 (CXCL12/CXCR4) (Zernecke and Weber 2014; van der Vorst, Döring, and Weber 2015).

4.5.4 Régulation de la signalisation moléculaire inflammatoire médiée par les cytokines.

Les cytokines peuvent activer différents récepteurs et mener à la transcription de gènes pro- et anti-inflammatoire par la translocation au noyau de différents facteurs transcriptionnels. Parmi ces facteurs, NF- κ B est un médiateur clé à l'origine de la transcription de gènes impliqués dans la régulation de l'inflammation et l'apoptose. Les voies de signalisation impliquées sont complexes et forment un circuit de signalisation menant à des réponses différentes en fonction d'interaction spécifique cytokines/récepteurs (**figure 14**).

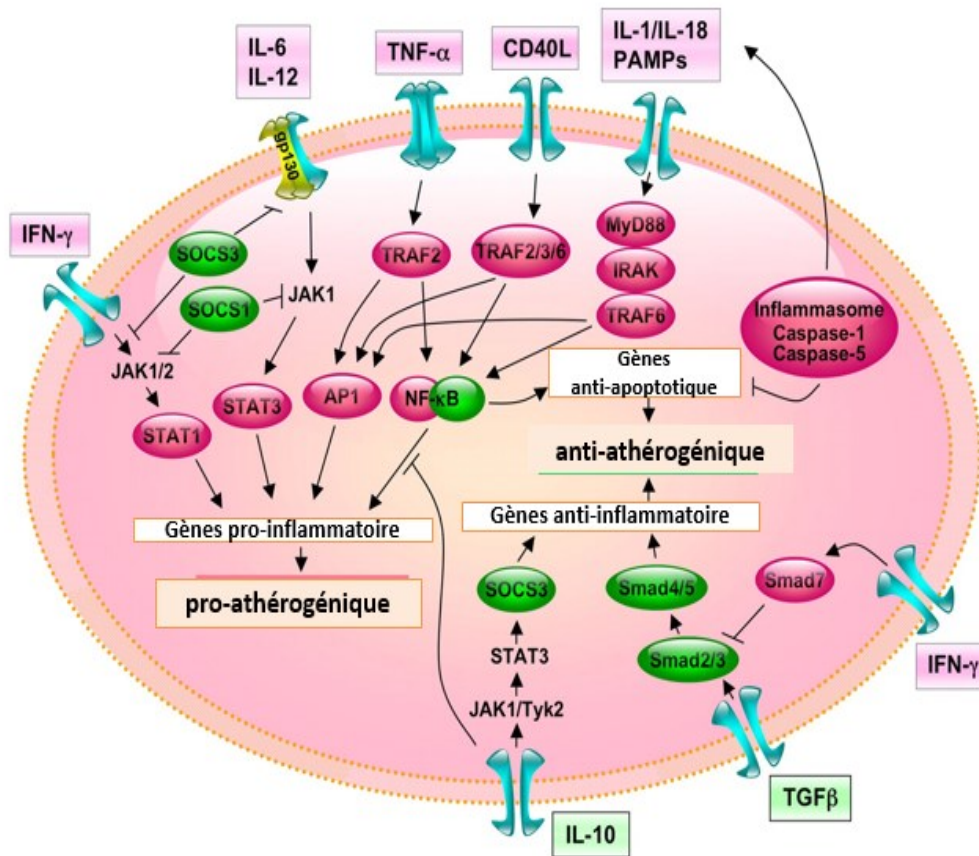


Figure 14. Régulation de l'inflammation par les cytokines : voies de signalisation impliquées et rôles de *NF-κB*. Figure adaptée de : (Tedgui and Mallat 2006b)

4.6. Rôle du stress de cisaillement dans l'athérosclérose

Le développement de plaques athérosclérotiques affecte de façon préférentielle certaines régions des artères telles que les bifurcations et les points d'embranchements (**figure 15**). Plus précisément, ces différentes régions présentent un débit sanguin non uniforme caractérisé par de faibles contraintes hémodynamiques (cisaillement, force de frottement) à la surface de l'endothélium, prédisposant ces régions à développer des plaques. Les forces de cisaillements (shear stress) correspondent aux forces appliquées parallèlement à la paroi vasculaire par l'écoulement sanguin. Alors que les contraintes de cisaillement sont le résultat à la fois du taux de cisaillement et de la viscosité du sang. Les forces de cisaillement ont un effet protecteur dans l'athérosclérose par la régulation de récepteurs sensoriels présents à la surface endothéliale. En

effet, ces récepteurs vont activer des voies de signalisation menant à la transcription de différents gènes possédant dans leurs promoteurs une séquence spécifique nommée SSRE (shear stress response element). Les gènes alors transcrits vont jouer des rôles dans différents processus de l'athérosclérose. En effet, ils vont favoriser l'adhésion de leucocytes, augmenter de la perméabilité endothéliale aux lipides et créer un environnement pro-thrombotique, pro-inflammatoire, pro-oxydant et vasoconstricteur (Cunningham and Gotlieb 2005; Malek, Alper, and Izumo 1999).

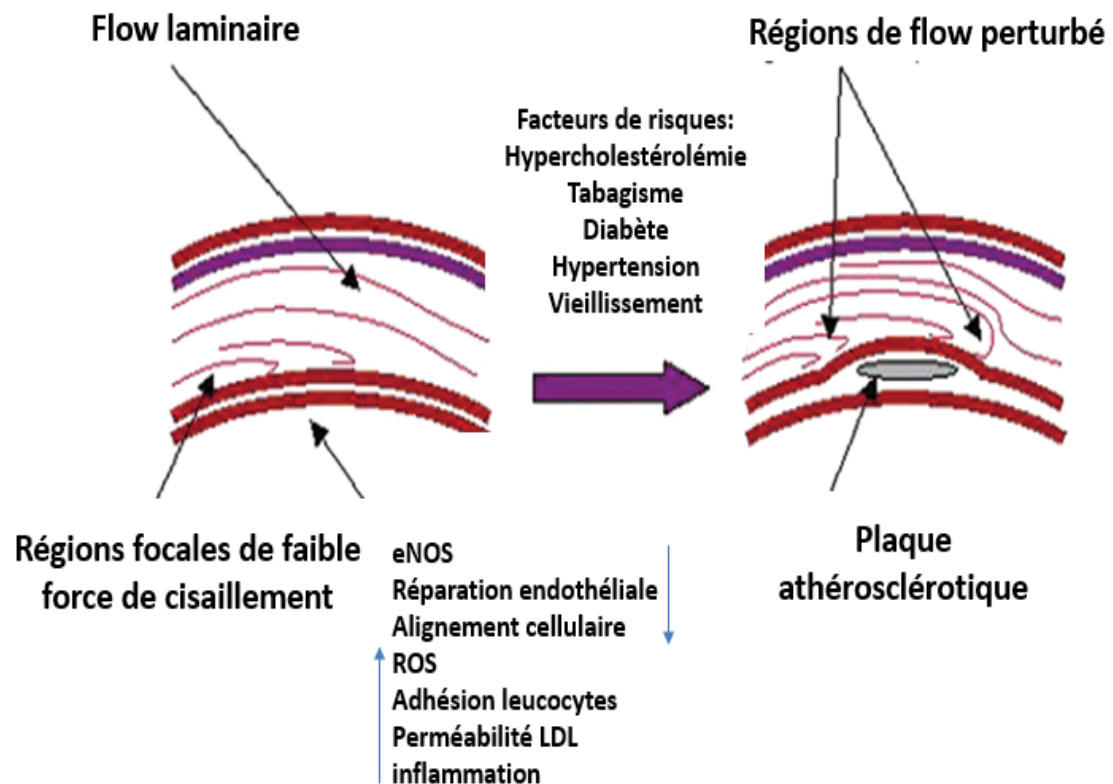


Figure 15. Régions artérielles sujettes à l'athérosclérose. Les régions de faible force de cisaillement dans les artères comme les courbures et les bifurcations sont des endroits préférentiels pour le développement de plaques athérosclérotiques. Figure adaptée de : (Cunningham and Gotlieb 2005)

4.7. Manifestation clinique de l'athérosclérose et résumé de chapitre

Au cours de ce chapitre, il a été démontré que l'athérosclérose est une maladie évoluant sur plusieurs années et provoquant une réduction progressive du calibre interne des artères. Cette sténose a pour conséquence de diminuer l'apport sanguin aux tissus en aval de la région touchée causant une condition d'ischémie. La sévérité des dommages tissulaire est fonction du degré d'obstruction du vaisseau et mène à une ischémie chronique ou aiguë. La rupture de la plaque lors d'évènements thrombotiques est potentiellement mortelle. En effet, elle peut survenir de façon brutale et causer l'infarctus du myocarde et l'AVC par un blocage complet d'une artère coronaire ou cérébrale. D'un point de vue mécanistique, il a été démontré que les processus à l'origine du développement de l'athérosclérose sont dynamiques, complexes et multifactoriels. En effet, ils font intervenir plusieurs types cellulaires et médiateurs moléculaires agissant tous de façon complémentaire. Toutefois, il est possible d'affirmer que l'athérosclérose est le résultat d'une boucle pathologique liant un phénotype inflammatoire et pro-oxydant favorisant la dysfonction endothéliale. Ce phénotype va ensuite engendrer une cascade de processus menant à la rétention et à l'oxydation des LDL dans la paroi artérielle, et à la formation de cellules spumeuses. Parallèlement, une amplification de la réponse inflammatoire, la prolifération de SMC, ainsi que l'augmentation des lipides et de diverses composantes dans la plaque vont contribuer au développement de l'athérosclérose. De façon importante, l'initiation et la progression de l'athérosclérose sont grandement influencées par les facteurs de risques cardiovasculaires classiques. Le chapitre suivant discutera de l'influence des principaux facteurs de risques sur l'athérosclérose, et en particulier de l'hypercholestérolémie qui est l'objet d'une grande partie de mes travaux de recherche.

Chapitre 5. Les facteurs de risque cardiovasculaire

5.1. Généralité

Au cours du chapitre précédent, il a été démontré que les causes et les mécanismes associés au développement de l'athérosclérose sont multifactoriels. Toutefois, grâce aux études épidémiologiques, il est maintenant connu que le développement de l'athérosclérose est grandement influencé par les facteurs de risques cardiovasculaires. Traditionnellement, ils sont divisés en 2 catégories : les facteurs de risque non modifiable (vieillessement, le sexe et l'hérédité) et les facteurs de risque modifiable (l'hypercholestérolémie, le tabagisme, l'hypertension, le diabète et l'obésité) (Wilson 1994; Corti, Fuster, and Badimon 2003). Également, d'autres facteurs secondaires comme le stress, l'alcoolisme, la diète et la sédentarité contribuent à potentialiser l'impact des facteurs de risques modifiables (Américan Heart Association). L'action des facteurs de risques sur les mécanismes moléculaires à l'origine de l'athérosclérose est complexe et reste partiellement définie. Toutefois, ils ont en commun de créer un environnement inflammatoire et pro-oxydant favorisant la dysfonction endothéliale et le développement d'un phénotype pathologique athérosclérotique (Grover-Paez and Zavalza-Gomez 2009; Willerson and Ridker 2004b; Dinh et al. 2014; Jimenez-Rosales et al. 2013). Les prochaines sections visent à définir l'impact des différents facteurs de risques cardiovasculaires sur l'athérosclérose et les principaux mécanismes sous-jacents, en particulier en ce qui concerne l'hypercholestérolémie.

5.2. Les facteurs de risque non modifiable

5.2.1 Vieillessement

Le vieillissement est un important facteur de risque non évitable associé aux maladies cardiovasculaires et au développement de l'athérosclérose. En effet, lors du vieillissement des individus, des changements physiologiques majeurs altérant la structure et les fonctions biologiques des vaisseaux sanguins sont observés (Ribera-Casado 1999). Ces modifications morphologiques vont contribuer à la progression de l'athérosclérose, dont les manifestations cliniques arrivent en général après 40 ans (Kannel and Vasan 2009). De plus, le vieillissement

augmente l'incidence d'autres facteurs de risque comme l'hypertension, le diabète et l'hypercholestérolémie favorisant ainsi la survenue des maladies cardiovasculaires (Wang and Bennett 2012). Le vieillissement physiologique des artères mène à un remodelage vasculaire caractérisé par un épaississement de l'intima et de la média provoquant une raideur artérielle et une perte d'élasticité progressive (Wang and Bennett 2012). Les vaisseaux sanguins âgés montrent des caractéristiques pathologiques retrouvées dans l'athérosclérose. Par exemple, une réduction du nombre de SMCs dans la média, une augmentation du dépôt de collagène et une fracture des lamelles d'élastines mène à une dilatation des vaisseaux et de la lumière artérielle (Wang and Bennett 2012). Également, une augmentation de la glycation des protéines, de l'activité des MMPs et du système RAS sont observées dans les vieilles artères. Collectivement, tous ces processus moléculaires contribuent à une perte d'élasticité et à une augmentation de la rigidité artérielle favorisant l'hypertension (Wang and Bennett 2012). Les vaisseaux âgés sont également caractérisés par une activité inflammatoire élevée dans l'endothélium, augmentant l'entrée des LDLs plasmatique dans l'intima et favorisant l'athérosclérose (Donato et al. 2015). Un des principaux mécanismes pathologiques associés au vieillissement est la sénescence cellulaire. Elle est caractérisée par une dégradation progressive des fonctions basales des cellules (capacité de prolifération, de migration et la modulation de l'expression normale de différents gènes) menant à dysfonction endothéliale (Wang and Bennett 2012). Plusieurs études ont démontré d'importants changements fonctionnels dans plusieurs types cellulaires âgés impliqués dans l'athérosclérose tels que les ECs (Hariri et al. 1988), les SMCs (Gerhard et al. 1996) et les cellules inflammatoires (Chung et al. 2006). Parmi les changements observés nous notons une diminution du potentiel prolifératif ainsi qu'une augmentation des marqueurs de sénescence, de l'apoptose, du stress oxydant et des dommages à l'ADN (Wu et al. 2014; Wang and Bennett 2012). Collectivement, tous ces processus favorisent l'athérosclérose et la dysfonction endothéliale qui est une caractéristique importante associée au vieillissement.

5.2.2. Hérité, genre et l'ethnicité

Le facteur génétique joue un rôle important dans l'athérosclérose. En effet, les progrès en technique de biologie moléculaire ont permis d'identifier un nombre élevé de gènes susceptibles d'influencer le développement de l'athérosclérose. Le risque génétique associé aux maladies cardiovasculaires serait en partie causé par une prédisposition des individus à

développer de l'hypertension, de l'hypercholestérolémie et du diabète (Kovacic and Bakran 2012). Il est bien connu aujourd'hui que l'historique familial peut influencer le taux d'incidence des maladies cardiovasculaires (Lusis, Fogelman, and Fonarow 2004). Par exemple, il a été démontré que le risque de subir un infarctus du myocarde était de 50 % plus élevé que le reste de la population si un membre de la famille en avait subi un avant 55 ans (Broeckel et al. 2002). Des études sur le facteur ethnique suggèrent également que certaines populations sont plus prédisposées aux maladies cardiovasculaires athérosclérotiques parce qu'elles sont plus sujettes au développement de différents facteurs de risques (Paramsothy et al. 2009). Par exemple, il a été démontré que les Caucasiens présentent plus de dyslipidémie que les Afro-Américains et les Hispaniques, alors que ceux-ci ont une prévalence plus élevée de diabète et d'hypertension (Budoff et al. 2006). Une des explications à ce phénomène est que la fréquence de certaines variantes génétiques observées entre les différentes populations serait à l'origine du polymorphisme ethnique. Par exemple, l'altération de différents gènes impliqués dans le métabolisme des lipides tels que le LDLR (récepteur aux LDLs), l'ApoB et l'ApoE favorise l'hypercholestérolémie, un important état pathologique dans l'athérosclérose (Biros, Karan, and Gollledge 2008).

Le genre a également une influence sur les maladies cardiovasculaires athérosclérotiques. En effet, les études épidémiologiques ont démontré que les femmes développent des maladies cardiovasculaires 7 à 8 ans plus tard que les hommes (Maas and Appelman 2010). Aussi, il a été documenté que les femmes ayant eu une ménopause précoce vivent en moyenne 2 ans de moins que celles ayant une ménopause normale (Ossewaarde et al. 2005). Des études suggèrent un rôle hormonal pour expliquer au moins en partie ces différences entre les genres. Parmi les mécanismes proposés, des études ont confirmé que l'œstrogène possède des effets cardioprotecteurs. Par exemple, les œstrogènes diminuent le niveau de LDL plasmatique, l'expression d'Ang2, l'adhésion des monocytes à l'endothélium et augmentent les HDL et le NO. Pour résumer, les œstrogènes, de par leurs propriétés anti-inflammatoires, anti-oxydantes et vasodilatatrices, joueraient un rôle cardioprotecteur chez les femmes (Chakrabarti, Lekontseva, and Davidge 2008; Nathan and Chaudhuri 1997).

5.3. Les facteurs de risques modifiables

5.3.1. L'hypercholestérolémie et la dyslipidémie

Les anomalies liées à un taux anormal de lipides sanguins sont appelées dyslipidémies. Elles sont caractérisées par une concentration élevée ou basse d'un ou de plusieurs types de lipides comme le cholestérol total, les LDL, les HDL et les triglycérides. La dyslipidémie et en particulier l'hypercholestérolémie sont des troubles métaboliques retrouvés chez plus de 80 % des patients présentant des pathologies des artères coronaires (Superko 2000). Cliniquement, les paramètres mesurés lors du profil lipidique sont les niveaux sanguins des différentes lipoprotéines incluant les LDL, les VLDL et les HDL. Les lipoprotéines sont des complexes hydrosolubles formés de lipides et de protéines permettant le transport des lipides dans tout l'organisme (**figure 16**). Les lipoprotéines athérogènes sont les LDL qui sont liés au transport du cholestérol sanguin vers les cellules et les VLDL associé au transport des triglycérides. Les HDL sont anti-athérogènes et sont les transporteurs inverses du cholestérol permettant sa sortie cellulaire pour son élimination par le foie. L'hypercholestérolémie est donc une forme de dyslipidémie principalement favorisée par une diète riche en gras et dans une moindre mesure, par une défaillance des transporteurs de lipides. Plus précisément, il existe 2 types d'hypercholestérolémie soit le type primaire d'ordre génétique et le type secondaire causé par une maladie (ex : diabète), un état (ex : obésité) ou par le mode de vie (tabagisme, diète riche en gras, etc.). Le caractère pathogène de l'hypercholestérolémie est en particulier attribué à un ratio élevé LDL/HDL (santé Canada). En effet, un taux élevé de cholestérol total, de LDL et un faible niveau de HDL sont des facteurs favorisant l'accumulation progressive de cholestérol dans la paroi artérielle (Steinberg 2005). Selon diverses études épidémiologiques, une augmentation de 1 % du cholestérol total augmente le risque de maladies coronariennes de 2 % (Carleton et al. 1991). De façon intéressante, une réduction de 10 % du cholestérol chez les hommes de 40 ans et plus diminue de 50 % les chances de développer des maladies cardiovasculaires lors des 5 prochaines années (selon l'OMS).

5.3.1.1. Les lipoprotéines athérogènes : LDL et VLDL

Au cours du chapitre sur l'athérosclérose, il a été démontré que les LDL sont des lipides très athérogènes, en particulier lorsqu'ils subissent une oxydation. En effet, ils participent à divers processus comme le déclenchement d'une réponse inflammatoire, la dysfonction endothéliale et la formation de cellules spumeuses. Les liens directs entre les LDL et l'athérosclérose ont été documentés par de nombreuses études épidémiologiques (Wadhera et al. 2016). Par exemple, il a été démontré chez les patients présentant une hypercholestérolémie familiale que l'élévation du LDL plasmatique était causée par une défaillance du récepteur au LDL menant à un développement précoce de l'athérosclérose (von Eckardstein 2005). De plus, un niveau élevé de LDL sanguin est corrélé avec une augmentation d'infarctus du myocarde, d'AVC et de pathologies ischémiques des membres inférieurs (Zoungas et al. 2014). L'impact pathogène des LDL a été confirmé par plusieurs thérapies pharmacologiques visant diminuer les niveaux de LDL. Par exemple, il est connu que l'abaissement du taux de LDL par des statines permet de diminuer le risque d'évènements cardiovasculaires sur 5 ans de 10 % (Cholesterol Treatment Trialists 2012). Les statines sont également documentées pour diminuer la taille des plaques athérosclérotiques, de par leurs propriétés anti-oxydantes (Rosenson 2004; Kapur and Musunuru 2008).

Les VLDL permettent le transport des triglycérides et sont corrélés au taux d'évènements cardiovasculaires (von Eckardstein 2005). Toutefois, leur rôle serait ambigu. D'une part, ils ne seraient pas directement athérogènes, mais représenteraient un biomarqueur de risque cardiovasculaire. Leurs associations avec des particules résiduelles athérogéniques et leurs contenus en ApoC-III, une protéine pro-inflammatoire retrouvée dans les VLDL, contribueraient à leurs caractères pathologiques (Talayero and Sacks 2011). D'autre part et de façon similaire aux LDL, les VLDL peuvent être oxydées dans l'espace sous-endothélial et internalisées par les macrophages pour former des cellules spumeuses (Gianturco et al. 1998).

5.3.1.2. Le rôle athéroprotecteur des HDL

Contrairement aux LDL, les HDL sont responsables du transport inverse du cholestérol vers le foie pour son élimination, diminuant son accumulation dans les vaisseaux sanguins. Il

est maintenant clairement établi que les HDL jouent un rôle anti-athérogénique et cardioprotecteur. En effet, les niveaux de HDL sont inversement corrélés au risque d'évènements coronariens (Hersberger and Eckardstein 2003). Des études populationnelles ont démontré qu'une augmentation de 0,1 mmol/L de HDL sanguin diminue l'incidence cardiovasculaire d'environ 12 % (Gordon and Rifkind 1989). Mis à part leur fonction d'élimination du cholestérol, il est maintenant connu que les HDL possèdent des propriétés anti-inflammatoires et anti-oxydantes favorables pour le traitement des pathologies cardiovasculaires (Barter et al. 2004). Au niveau de l'athérosclérose, plusieurs évidences ont démontré l'impact des HDL dans la régression de la plaque. Par exemple, chez les patients à haut risque de pathologies cardiovasculaires, une infusion de HDL pendant 4 à 5 semaines diminue le volume de la plaque athérosclérotique d'environ 3.5% (Tardif et al. 2007; Nissen et al. 2003). Chez la souris, les résultats semblent souvent controversés dû à l'utilisation de différents modèles transgéniques hypercholestérolémiques, ce qui rend l'interprétation difficile. En effet, les souris développent peu ou pas d'athérosclérose sous simple diète grasse. L'utilisation de souris knockout (KO) pour différents gènes du métabolisme lipidique permet d'accélérer le développement de l'athérosclérose (Kapourchali et al. 2014). Les HDL possèdent une panoplie de propriétés anti-athérogènes. Ils peuvent inhiber les molécules d'adhésions aux ECs et la prolifération des SMCs. Ils possèdent des fonctions anti-inflammatoires et anti-apoptotiques et peuvent diminuer la production de ROS (Vergeer et al. 2010).

5.3.1.3. Les apolipoprotéines et l'athérosclérose

Les apolipoprotéines (Apo) sont des constituants majeurs des différentes lipoprotéines (**figure 16**). Elles permettent le transport et la redistribution des molécules hydrophobes telle que les lipides dans le sang. Elles jouent également un rôle dans la régulation du métabolisme par l'activation ou l'inhibition d'enzyme et de récepteurs membranaires (Mahley et al. 1984). Il existe plusieurs classes d'apolipoprotéine (ApoA à E) et plusieurs isoformes qui sont réparties différemment d'une lipoprotéine à une autre. Les différentes isoformes d'Apo permettent aux lipoprotéines d'être capturées par des types cellulaires spécifiques par l'interaction apolipoprotéine/récepteur de la cellule hôte (Mahley et al. 1984). Les plus importantes dans l'athérosclérose sont l'ApoA, l'ApoB, l'ApoD et l'ApoE. L'ApoA et l'ApoD sont présentes en

grande quantité dans les HDL et jouent un rôle athéroprotecteur en permettant l'élimination des lipides des cellules de la paroi artérielle (Walldius and Jungner 2007; Perdomo and Dong 2009). L'ApoB, en particulier l'isoforme ApoB100, est la forme principale des chylomicron, VLDL, IDL et LDL. Elle est pro-athérogénique et représente environ 90 % de la masse des particules de LDL. Elle est responsable de l'entrée de cholestérol dans les cellules et est corrélée au risque cardiovasculaire (Sniderman et al. 2016; Cromwell et al. 2007). De plus, elle joue un rôle central dans le développement de l'athérosclérose en possédant deux séquences de liaisons importantes pour la rétention LDL dans l'intima artérielle (Olofsson and Boren 2005). De façon intéressante, des études ont démontré qu'un ratio élevé ApoB/ApoA représente une variable pour quantifier le risque d'évènements cardiovasculaires (Lu et al. 2011; Walldius et al. 2004). L'ApoE est anti-athérogénique et est retrouvée dans toutes les lipoprotéines mis à part les LDL. Elle joue un rôle de ligand pour les récepteurs présents sur les hépatocytes et les cellules périphériques responsables du catabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides comme les chylomicrons et VLDL. Les modèles de souris KO pour l'ApoE sont grandement utilisés pour diverses études (ex. nutrition, métabolisme et inflammation), mais principalement pour l'athérosclérose (Meir and Leitersdorf 2004).

5.3.1.4. Le rôle athéroprotecteur de l'ApoE

Parce que les souris sont résistantes à l'athérosclérose, les modèles d'études athérosclérotiques requièrent la perturbation de molécules impliquées dans le métabolisme lipidique. La souris déficiente pour le gène ApoE est un modèle hypercholestérolémique d'athérosclérose hautement utilisé (Meir and Leitersdorf 2004). En effet, il est documenté que les souris ApoE ko sur diète normale présentent un taux de cholestérol sanguin 10 fois supérieur aux souris contrôles. De façon intéressante, ce taux augmente de 40 fois avec à une diète riche en gras (Plump et al. 1992). Il est aussi connu que ce modèle de souris développe des plaques atherosclerotiques extensives et présente de l'inflammation, du stress oxydant et une dysfonction endothéliale (Dinh et al. 2017; Jawien 2012). L'ApoE possède plusieurs fonctions anti-athérogènes dont le transport inverse du cholestérol, la diminution de l'oxydation des LDL, la stimulation de la production de NO et la régulation négative de l'expression de cytokines inflammatoires (Davignon 2005) (**figure 16**).

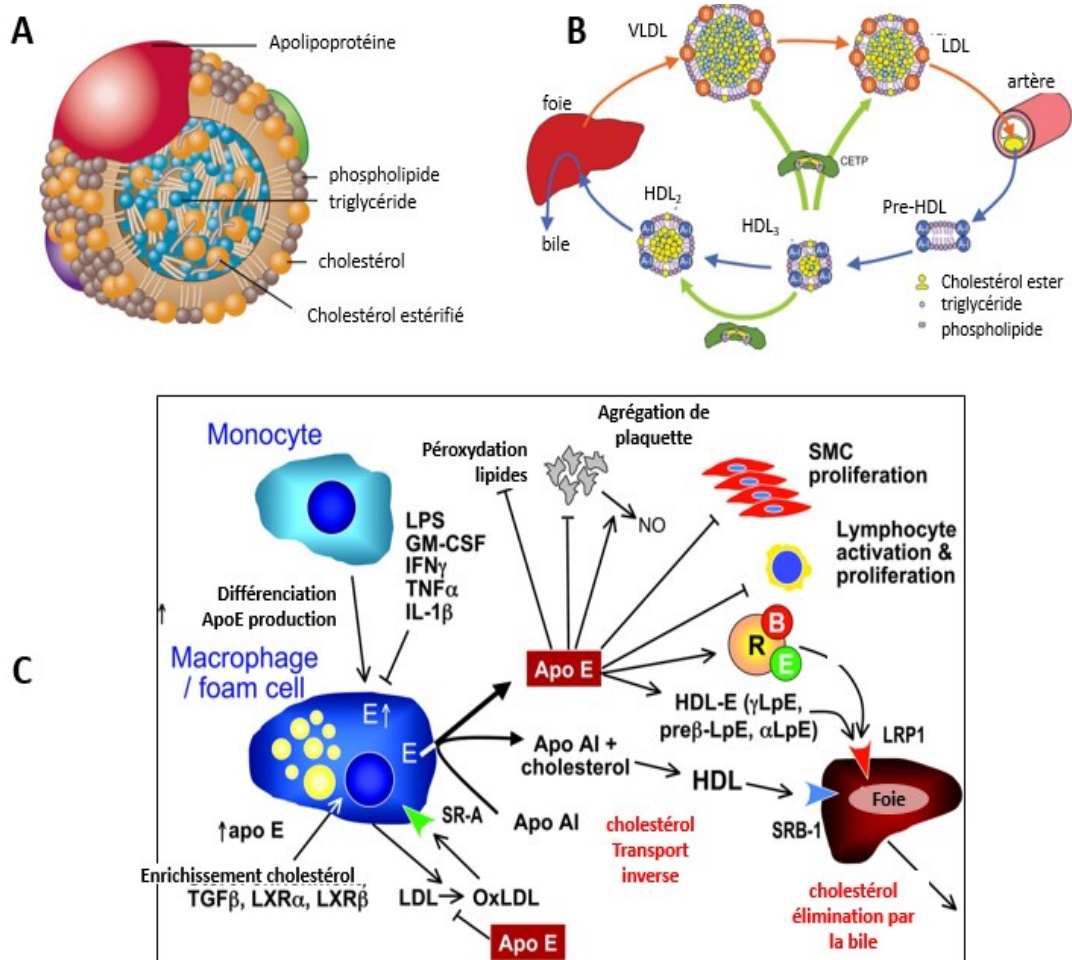


Figure 16. Structure des lipoprotéines, transport du cholestérol et rôle anti-athérosclérotique de l'ApoE. A, Structure générale d'une lipoprotéine. B, Types de lipoprotéines impliquées dans le transport du cholestérol. Les VLDL et les LDL sont des lipoprotéines de faible densité permettant le transport de cholestérol vers la cellule et favorisant le dépôt de cholestérol dans les artères. Les HDL (lipoprotéine de haute densité) sont responsables du transport inverse du cholestérol pour son élimination par le foie. C, l'ApoE est une apolipoprotéine anti-athérogène possédant de multiples fonctions protectrices incluant l'inhibition de l'oxydation des LDL et favorise l'élimination du cholestérol. Figure adaptée de : (Davignon 2005; Shinkai 2012; Genest 2003)

5.3.2. Le tabagisme

Le tabagisme est le plus grand problème de santé publique à travers le monde. Il est responsable de plus de 6 millions de décès par ans des suites d'un infarctus, d'un AVC, d'un cancer et de pneumopathies. Autre statistique importante, il est estimé que le tabagisme a causé la mort de plus de 100 millions d'individus au 20^e siècle et qu'un fumeur sur deux décèdera de façon prématurée d'une maladie liée au tabac (OMS). Au niveau cardiovasculaire, les études épidémiologiques sont unanimes et montrent que l'incidence d'infarctus du myocarde et de pathologies des artères coronaires mortelles est augmentée chez les fumeurs. Le tabagisme a un impact sur toutes les phases de l'athérosclérose allant de la dysfonction endothéliale aux événements cliniques thrombotiques. Encore aujourd'hui, les mécanismes exacts des 4000 composantes chimiques de la cigarette sur l'athérosclérose sont largement incompris. Toutefois, il est connu que le tabagisme augmente l'inflammation et le stress oxydant, deux processus importants dans l'initiation de la dysfonction endothéliale, l'athérosclérose et les complications thrombotiques (Ambrose and Barua 2004).

5.3.2.1. Les propriétés physiques et biochimiques de la fumée de cigarette

La fumée de cigarette comporte une phase particulaire (goudron) contenant les particules de plus de 0.1 μm qui sont retenues par le filtre et une phase gazeuse de substances traversant le filtre. Dans les deux cas, nous retrouvons plus de 1000 radicaux libres par bouffée de cigarette ayant une demi-vie variable (plus longue pour la phase particulaire (heure/mois) (Pryor and Stone 1993). Parmi les multiples composants chimiques de la fumée de cigarette, la nicotine, le monoxyde carbone (CO), les gaz oxydants, l'acroléine et les hydrocarbures polyaromatiques ont été principalement identifiés comme des contributeurs importants du risque cardiovasculaire. La nicotine augmente la fréquence cardiaque et la pression artérielle, la dysfonction endothéliale, l'hypercholestérolémie et la résistance à l'insuline (Benowitz 2003). Le CO est un constituant majeur de la fumée de cigarette qui diminue le transport d'oxygène dans les tissus et accentue l'ischémie des individus atteints de pathologies vasculaires. De plus l'exposition à long terme au Co est corrélée avec une augmentation de la viscosité du sang, contribuant ainsi à l'hypercoagulation (Allred et al. 1989; Benowitz 2003). Le taux élevé

d'agents oxydants chimiques comme les oxydes de nitrogènes et des radicaux libres de la fumée de cigarette reste le principal problème pathologique (Church and Pryor 1985). L'exposition à ces différents agents est aussi associée à une déplétion des niveaux d'anti-oxydants endogènes comme la vitamine C, potentialisant ainsi le stress oxydant systémique (Lykkesfeldt et al. 2000). Le stress oxydant est impliqué dans les pathologies cardiovasculaires en causant de l'inflammation, la dysfonction endothéliale, l'oxydation des LDL et l'activation des plaquettes (Burke and Fitzgerald 2003). L'acroléine, un aldéhyde hautement réactif, est une autre composante dommageable du tabac. En effet, elle peut se lier aux protéines, former des adduits et modifier les HDL (Szadkowski and Myers 2008). Elle peut également inhiber des enzymes anti-oxydantes comme la thioredoxine, favorisant ainsi la dysfonction endothéliale (Park et al. 2007), les thromboses (Gugliucci 2008) et les vasospasmes (Conklin et al. 2006). La fumée de cigarette contient aussi un nombre élevé de métaux comme le cadmium qui peuvent causer divers dommages à la structure cellulaire. Les études épidémiologiques démontrent une association entre le cadmium, l'hypertension et l'infarctus du myocarde (Abu-Hayyeh et al. 2001; Bernhard et al. 2005). Finalement, les hydrocarbures polyaromatiques retrouvés dans la phase goudron accélèrent le développement de l'athérosclérose par l'induction de mutation et d'hyperprolifération dans les SMCs (Penn and Snyder 1996; Penn and Snyder 1988).

5.3.2.2. Effets du tabagisme sur les mécanismes sous-jacents de l'athérosclérose.

Le tabagisme est un facteur prédisposant au développement d'angine stable, d'ischémie coronarienne aiguë, de mort subite et l'AVC. Parmi les processus athérosclérotiques associés à la fumée de cigarette, nous retrouvons la dysfonction vasomotrice, l'inflammation et la dyslipidémie (Ambrose and Barua 2004). La défaillance des fonctions vasodilatatrices artérielle est une des premières manifestations liées à l'athérosclérose et est causée par une diminution de la biodisponibilité du NO (Barua et al. 2001). En effet, le NO joue un rôle protecteur par son activité anti-inflammatoire, anti-thrombotique et en inhibant l'adhésion leucocytaire à l'endothélium (Matthys and Bult 1997). L'inflammation est une composante essentielle dans l'initiation et la progression de l'athérosclérose. Dans la littérature, le tabagisme cause une augmentation de 20 à 25 % du nombre de leucocytes sanguins (Smith and Fischer 2001) et induit de multiples marqueurs pro-inflammatoires tels que la protéine réactive C, l'IL-6, le TNF- α et

VCAM-1 (Ambrose and Barua 2004). La fumée de cigarette peut également favoriser l'athérosclérose en agissant sur le profil lipidique. En effet, il est démontré que les fumeurs présentent un taux sanguin plus élevé en triglycéride et en LDL. Toutefois, les mécanismes impliqués demeurent largement inconnus (Craig, Palomaki, and Haddow 1989).

5.3.3. Le diabète

Le diabète est caractérisé par une défaillance des mécanismes physiologiques de régulation de la glycémie, causant ainsi une hyperglycémie. Selon l'OMS, plus de 422 millions d'individus sont atteints du diabète et plus de 3 millions de personnes meurent de complications liées à cette maladie. En effet, le diabète peut se manifester par des lésions à divers organes tels que la rétine, les reins et les artères coronaires. Le taux de glycémie dépend la capacité des cellules d'absorber le glucose sanguin par l'intermédiaire de l'insuline sécrétée par le pancréas. Il existe 2 principaux types de diabète soit le type 1 et le type 2. Le diabète type 2 représente plus de 90 % des cas et touche en général les adultes de plus de 40 ans. Il est causé généralement par des facteurs modifiables liés à l'hygiène de vie (l'obésité, sédentarité et malnutrition). Les mécanismes responsables impliquent une diminution de la production d'insuline par le pancréas (insulinopénie) ou une résistance à l'insuline (insulinorésistant). Il est important de noter que le diabète de type 2 est souvent lié à d'autres facteurs de risque cardiovasculaire comme l'hypertension et la dyslipidémie. Le diabète de type 1 (insulinodépendant) est héréditaire et représente environ 6 % des cas. Il peut apparaître de façon brutale à tout âge, mais préférentiellement chez l'enfant. Il est caractérisé par une destruction des cellules bêta des îlots de Langerhans pancréatiques qui produisent l'insuline. Cette destruction progressive est le résultat d'une maladie auto-immune causant ultimement une absence d'insuline dans le sang (Blair 2016).

5.3.3.1. Diabète et athérosclérose : mécanismes impliqués

Les études épidémiologiques ont clairement établi que le diabète est un facteur de risque cardiovasculaire majeur associé aux pathologies des artères coronaires, cérébrales et périphériques (Aronson and Rayfield 2002). En effet, l'hyperglycémie est à l'origine de l'accélération de l'athérosclérose et implique plusieurs mécanismes. D'une part,

l'hyperglycémie est souvent associée à d'autres facteurs de risque comme l'hypertension, la dyslipidémie et l'obésité. D'autre part, elle cause des altérations moléculaires et cellulaires favorisant le développement de l'athérosclérose. Le principal mécanisme impliqué dans cet état pathologique est la formation de produit de glycation avancé (AGE). Les AGE sont liés à de multiples processus pro-athérogéniques incluant un excès d'inflammation et de stress oxydant (Aronson and Rayfield 2002). D'un point de vue moléculaire, l'hyperglycémie chronique cause un ensemble de réactions de glycation caractérisé par la fixation irréversible du glucose sur les portions amines des protéines. Cette réaction de glycation non enzymatique des protéines mène ensuite à la formation de composés nocifs et hautement réactifs (AGE). La concentration d'AGE est donc proportionnelle au taux de glycémie en fonction du temps. Les AGE ne peuvent être détruits ou éliminés des cellules dans lesquelles ils ont été formés. Leur accumulation progressive cause une perte de fonction des protéines, active des récepteurs participant à l'inflammation et au stress oxydant, module le métabolisme et cause ultimement la mort cellulaire (Ott et al. 2014; Wautier, Tessier, and Wautier 2014).

Dans la pathogenèse de l'athérosclérose, les AGE agissent par des mécanismes dépendants ou non de leurs récepteurs spécifiques (RAGE). Les RAGE sont présents à la surface des cellules impliquées dans l'athérosclérose (macrophages, ECs et SMCs) (Aronson and Rayfield 2002). L'activation des RAGE favorise l'élévation du stress oxydant et de l'inflammation par l'induction de NF- κ B de VCAM-1 (Schmidt et al. 1995; Yan et al. 1994). Également, l'activité des RAGE des ECs est associée à une augmentation de la rétention de lipides dans l'intima artérielle (Wautier et al. 1996). La stimulation des RAGE sur les macrophages mène à la sécrétion d'IL-1 et de TNF- α augmentant ainsi l'inflammation (Vlassara et al. 1988). Les AGE ont aussi des actions athérogènes indépendantes de leurs récepteurs. Par exemple, ils peuvent causer un changement de conformation des LDL augmentant ainsi leur susceptibilité à subir des modifications oxydatives (Bowie et al. 1993; Bucala et al. 1993).

5.3.4. L'hypertension

Selon la fédération mondiale du cœur, l'hypertension artérielle est le facteur de risque modifiable qui affecte le plus grand nombre d'individus à travers le monde, touchant le tiers de

la population. L'hypertension est définie comme une pression sanguine systolique supérieure à 140 mm Hg et/ou diastolique supérieur à 90 mm Hg. L'hypertension artérielle est un puissant facteur de risque prédisposant aux maladies des artères coronaires et périphériques, et le risque est directement proportionnel au degré d'hypertension (Kannel 1995). De plus, l'hypertension est souvent liée à d'autres facteurs comme le diabète, l'hypercholestérolémie et l'obésité qui sont associés au développement de l'athérosclérose (Lloyd-Jones et al. 2009). Les effets pathologiques de l'hypertension sur le système cardiovasculaire sont multiples et peuvent être causés par l'augmentation du stress mécanique sur les vaisseaux sanguins et par la modulation d'hormones vasoactives comme l'Ang2. L'hypertension cause aussi un épaissement de l'intima et de la média favorisant ainsi un rétrécissement de la lumière artérielle et accélérant l'athérosclérose dans les artères coronaires et cérébrales. Parmi les complications majeures de l'hypertension, nous retrouvons la rupture et l'occlusion thrombotique d'une artère cérébrale (Hollander 1976). Les principaux mécanismes athérosclérotiques sous-jacents incluent une augmentation de la croissance des SMCs et une élévation du stress oxydant. Par exemple, l'épaissement de la média augmente la distance de diffusion de l'oxygène provenant de la lumière artérielle ce qui entraîne une oxydation incomplète et la formation de radicaux libres causant l'oxydation des LDL (Alexander 1995). De plus, l'activation chronique du système RAS en condition hypertensive accentue la production d'anions superoxydes et réduit la biodisponibilité du NO. Plusieurs études ont démontré que les agents antihypertenseurs (ex. ACEI et ARB) diminuent l'athérosclérose, confirmant donc la contribution de l'hypertension dans cette physiopathologie (Chobanian 1990).

5.4. Résumé du chapitre

Dans ce chapitre, il a été démontré que les facteurs de risques cardiovasculaires classiques prédisposent et augmentent l'incidence des maladies cardiovasculaires en influençant la progression de l'athérosclérose par divers mécanismes. De plus, les facteurs de risques modifiables sont souvent associés entre eux et agissent de façon synergique dans cette physiopathologie. D'un point de vue mécanistique, ces facteurs ont en commun d'augmenter le stress oxydant, de créer un environnement pro-inflammatoire soutenu, d'augmenter l'oxydation et la rétention des LDL dans l'intima et de causer la dysfonction endothéliale. Les traitements de l'athérosclérose reposent sur la prise en charge des facteurs de risque par l'utilisation d'agents thérapeutiques tels que les hypocholestérolémiants, les antihypertenseurs, les antiagrégants plaquettaires et par les hypoglycémiantes. Également, dans certains cas, des traitements chirurgicaux de revascularisation (ex. angioplastie ou pontage) sont nécessaires pour irriguer le territoire ischémique. Toutefois, lorsque l'athérosclérose est trop diffuse et que les traitements chirurgicaux ne peuvent être effectués, la sévérité des dommages ischémiques résiduels dépend en grande partie de la capacité de néovascularisation de l'organisme.

Chapitre 6. La néovascularisation

Mise en contexte et définitions.

Le système vasculaire représente le plus large organe du corps humain et est vulnérable à plusieurs maladies, dont en particulier l'athérosclérose. Les obstructions artérielles causées par l'athérosclérose demeurent la pathologie la plus fréquente des vaisseaux sanguins et mènent à une condition d'ischémie tissulaire (Cao et al. 2005). Heureusement, dans un état physiologique normal et selon la gravité de l'ischémie, l'organisme peut par la néovascularisation diminuer les dommages aux tissus. Ce processus est caractérisé par la formation d'un nouveau réseau vasculaire fonctionnel capable d'accueillir une circulation sanguine (Cao et al. 2005). Après la naissance, en condition physiologique, la néovascularisation est rarement modulée sauf dans des processus spécifiques tels que la réparation tissulaire, la cicatrisation et le cycle menstruel. Toutefois, en condition pathologique, une néovascularisation excessive ou insuffisante est présente dans diverses maladies comme le cancer, les maladies cardiovasculaires ischémiques, l'inflammation chronique et la rétinopathie diabétique (Furuya et al. 2005). Dans ce chapitre, la régulation des différents processus et les principaux mécanismes moléculaires gouvernant la néovascularisation post-ischémique seront approfondis.

Distinction entre les différents processus régulant la néovascularisation post-ischémique.

La néovascularisation implique 4 processus distincts et complémentaires permettant la formation d'un nouveau réseau vasculaire fonctionnel: la vasculogénèse, l'angiogénèse, l'artériogénèse et la croissance de collatérales (**figure 17**) (Silvestre, Smadja, and Levy 2013). De façon classique, le terme vasculogénèse était anciennement réservé à l'étape embryonnaire où des précurseurs endothéliaux permettaient la formation d'un réseau vasculaire primitif de novo (Drake 2003). Au début des années 2000, la vasculogénèse chez l'adulte fut décrite comme la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de cellules endothéliales progénitrices (EPCs) circulantes capables d'intégrer les structures vasculaires et de se différencier en ECs (Asahara and Kawamoto 2004). Ces cellules également identifiées comme des « late outgrowth EPCs » ou « endothelial colony forming cells » (ECFCs) peuvent acquérir un phénotype endothélial, proliférer et former

des tubules *in vitro* après deux à trois semaines de culture. Toutefois, au cours des 20 dernières années la compréhension des différentes cellules circulantes impliquées dans la réparation vasculaire et la néovascularisation a beaucoup évolué. Par exemple, il est maintenant reconnu qu'il existe en réalité une très faible proportion de vrais EPCs (late outgrowth EPCs) en circulation et dans les tissus. Également, à l'opposé des « late outgrowth EPC », les « early outgrowth EPCs » (4-10 jours de cultures) qui sont des cellules n'acquérant pas le phénotype endothélial ont été redéfinis de façon plus exacte comme des cellules hématopoïétiques pro-angiogéniques (PACs). Contrairement à la description traditionnelle des EPCs, les PACs ne sont pas de vrais EPCs et possèdent une faible capacité de prolifération, ne se différencie pas en ECs, ne forme pas de tubules *in vitro*. Par contre, ils sont reconnus pour être activement mobilisés aux sites ischémiques à proximité des néo-vaisseaux et pour sécréter une large gamme de facteurs pro-angiogéniques favorisant la néovascularisation (Basile and Yoder 2014; Choi et al. 2015; Hirschi, Ingram, and Yoder 2008; Asahara and Kawamoto 2004). Le rôle distinct et la collaboration entre EPCs (ECFCc) et des PACs dans la néovascularisation sont illustrés à la **figure 17**.

L'angiogenèse correspond à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins organisés à partir des vaisseaux préexistants. L'angiogenèse et la vasculogenèse sont donc les principaux processus initiaux menant à la formation de nouveaux capillaires. L'artériogenèse fait référence à la formation d'artériole à partir des capillaires préexistants, mais aussi, à la croissance et à l'élargissement d'artères collatérales. Dans la littérature, l'artériogenèse et la croissance collatérale sont parfois divisés en deux processus distincts ou décrits comme un seul processus (Basile and Yoder 2014; Silvestre, Smadja, and Levy 2013). Chacun des concepts sera décrit en détail dans les prochaines sections.

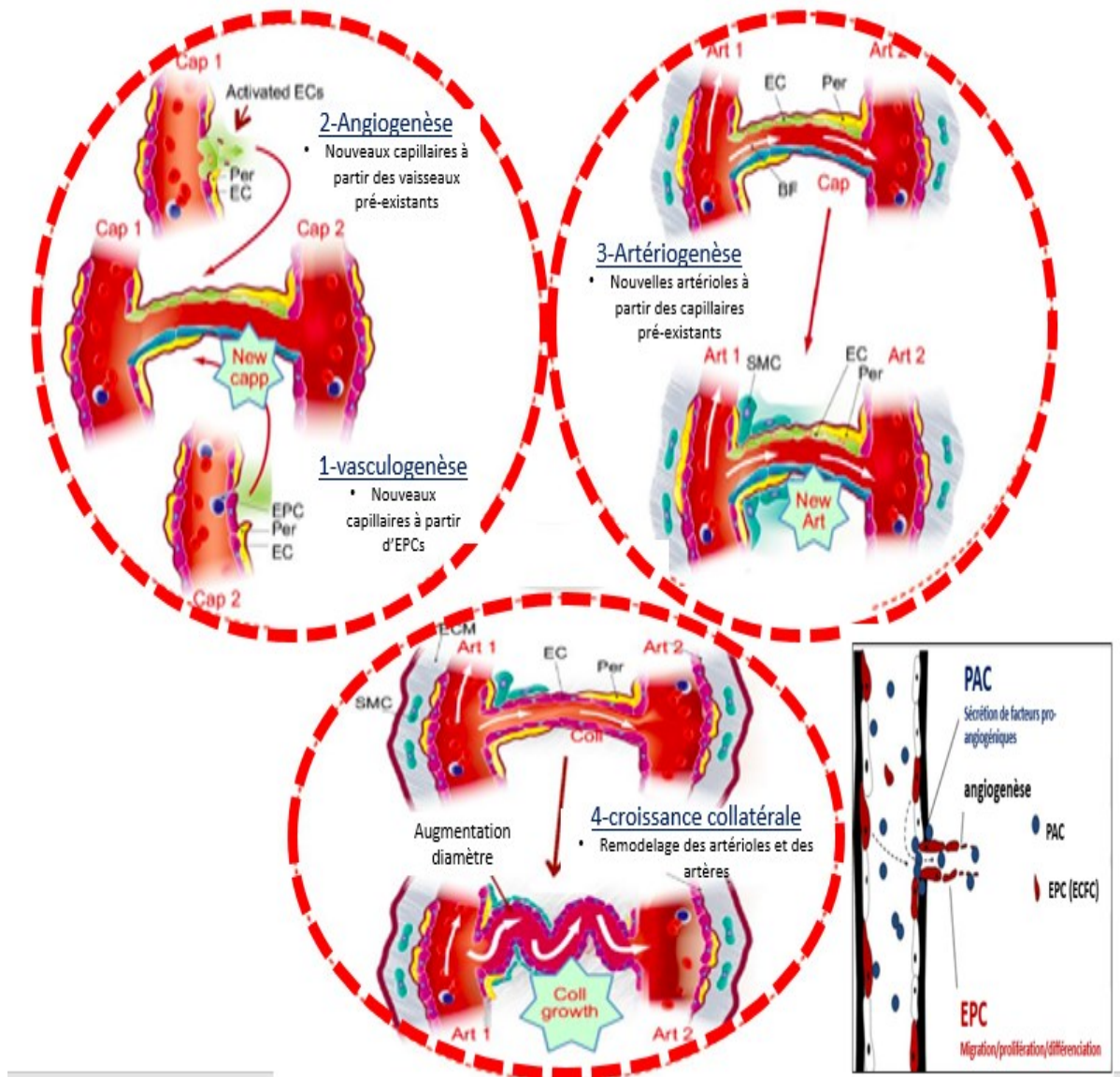


Figure 17. Distinction entre les 4 principaux processus impliqués dans la néovascularisation post-ischémique. L'angiogenèse (1) et la vasculogenèse (2) représentent les deux principaux mécanismes de formation de néo-vaisseaux de type capillaire. L'artériogenèse et la croissance collatérale réfèrent à la formation d'artère (3), au remodelage et à l'élargissement des artères en collatérales de grand calibre (4). Illustration (en bas à droite) montrant le rôle et la collaboration des EPCs et des PACs dans la néovascularisation. Détail dans le texte. Figure adaptée de : (Silvestre, Smadja, and Levy 2013; Basile and Yoder 2014)

6.1. L'angiogenèse : historique et déclenchement

L'angiogenèse correspond à l'extension de l'arbre vasculaire via les capillaires en place. Historiquement, le terme angiogenèse a été utilisé la première fois pour décrire la croissance des vaisseaux dans le bois de rennes en 1787 par le Dr John Hunter. Toutefois, ce n'est qu'en 1971 que l'angiogenèse a été décrite dans un contexte pathologique. En effet, le Dr Judah Folkman, un chirurgien de l'université de Harvard considéré comme le père de l'angiogenèse moderne, postulait qu'elle était requise pour la croissance des tumeurs. À partir des années 1980, plusieurs molécules angiogéniques ont été identifiées dont le VEGF (*vascular endothelial growth factor*). Le VEGF est le plus important facteur de croissance vasculaire connu aujourd'hui. Il a été découvert en 1983 par Donald Sanger du laboratoire du Harold Dvorak et était initialement appelé VPF (*Vascular permeability Factor*). Par la suite, le VPS a été séquencé par le Dr Napoleone Ferrara en 1989, menant à l'identification d'une nouvelle nomenclature pour le VEGF (Stephenson et al. 2013). L'angiogenèse physiologique chez l'adulte est un processus rare et hautement régulé. En effet, elle peut survenir dans des situations précises telles que la réparation et la croissance tissulaire, ainsi que le cycle menstruel (Nishida et al. 2006). Une modulation anormale de l'angiogenèse est un dénominateur commun de plusieurs maladies et peut être souhaitable ou non selon le contexte pathologique (**figure 18**). Par exemple, on cherchera à inhiber l'angiogenèse excessive liée au développement tumoral, alors qu'on voudra la stimuler dans une condition ischémique associée à la maladie cardiovasculaire athérosclérotique (Deveza, Choi, and Yang 2012). D'un point de vue moléculaire, l'activation ou l'inhibition du processus angiogénique est le résultat d'un déséquilibre physiologique entre différents facteurs pro-angiogéniques et anti-angiogéniques (**figure 18**). En effet, un déséquilibre en faveur d'une concentration élevée de facteur pro-angiogéniques et/ou une concentration basse en facteur anti-angiogéniques dans le micro-environnement tissulaire déclenchera le processus. Ce phénomène est connu sous le nom de «switch angiogénique» (Bergers and Benjamin 2003). Avant d'aborder les différentes étapes et mécanismes impliqués dans l'angiogenèse, la section suivante décrira de façon générale les deux principaux types d'angiogenèse incluant le bourgeonnement et l'intussusception.

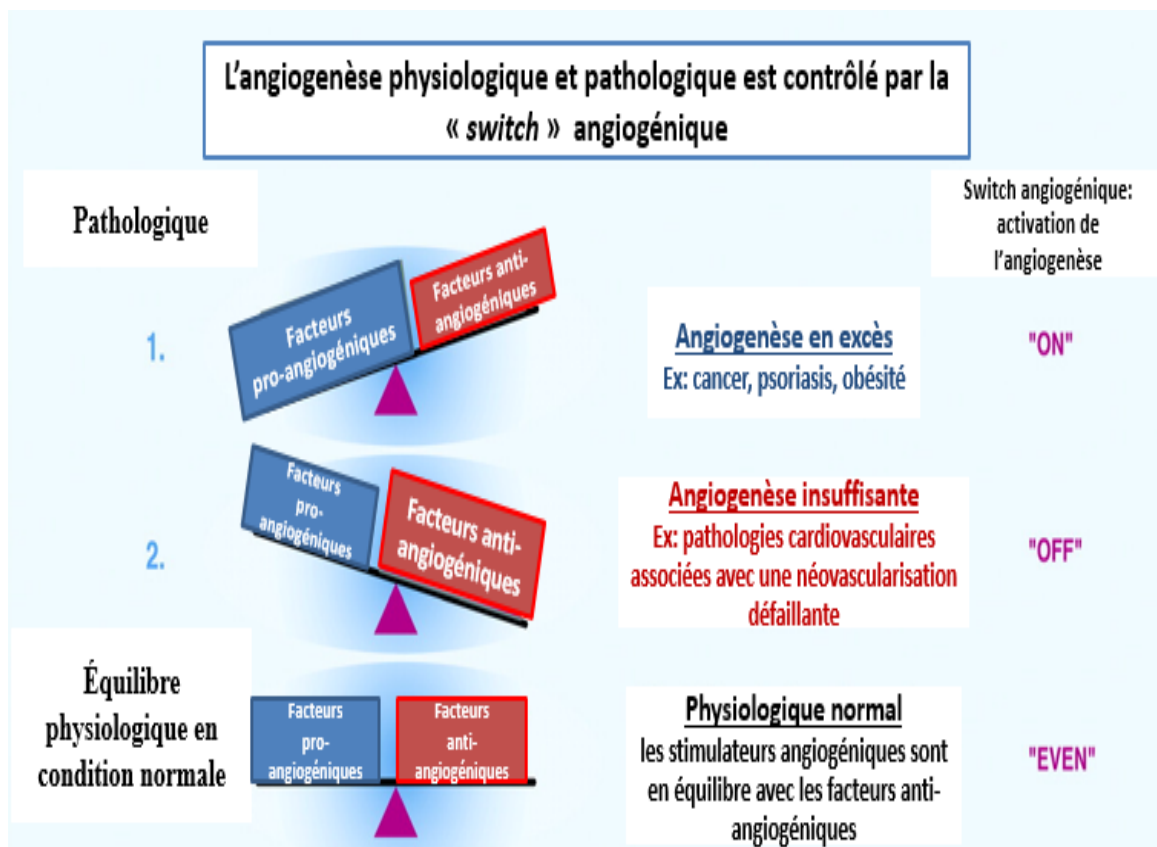


Figure 18. La « switch angiogénique » contrôle le déclenchement de l'angiogenèse. L'activation ou l'inhibition de l'angiogenèse est contrôlée par un équilibre entre les différents facteurs pro et anti-angiogéniques. Figure adaptée de : (Nyberg, Xie, and Kalluri 2005a)

6.1.1 Type d'angiogenèse : bourgeonnement et intussusception

La formation de vaisseaux sanguins par bourgeonnement et celle par intussusception sont les 2 principaux types d'angiogenèse postnatale (**figure 19**). Toutefois, les mécanismes précis impliquant l'intussusception sont encore peu connus. En effet, il s'agit d'un processus découvert vers les années 1990, alors que le bourgeonnement appelé «sprouting» a été identifié il y a deux plus de 200 ans (Adair and Montani 2010). À noter que les mécanismes dans cette thèse font référence à l'angiogenèse par bourgeonnement qui est la forme la plus documentée dans le contexte d'hypoxie. Ce type d'angiogenèse implique une série d'étapes chronologique incluant une phase d'activation et d'hyperperméabilité, la dégradation de la membrane basale, la prolifération et la migration des ECs, la formation de tubules et leurs stabilisations (Adair and

Montani 2010). L'angiogenèse par intussusception, également appelée «splitting angiogenesis», implique une extension et une séparation du vaisseau préexistant dans le sens de la longueur en 2 vaisseaux. Une des caractéristiques importantes de ce type d'angiogenèse est qu'elle est plus rapide que le bourgeonnement, car elle ne requiert pas de prolifération cellulaire. Le mécanisme implique plutôt une réorganisation des vaisseaux. Par sa rapidité, elle jouerait un rôle clé dans le développement embryonnaire nécessitant une croissance accélérée avec des ressources limitées (Adair and Montani 2010).

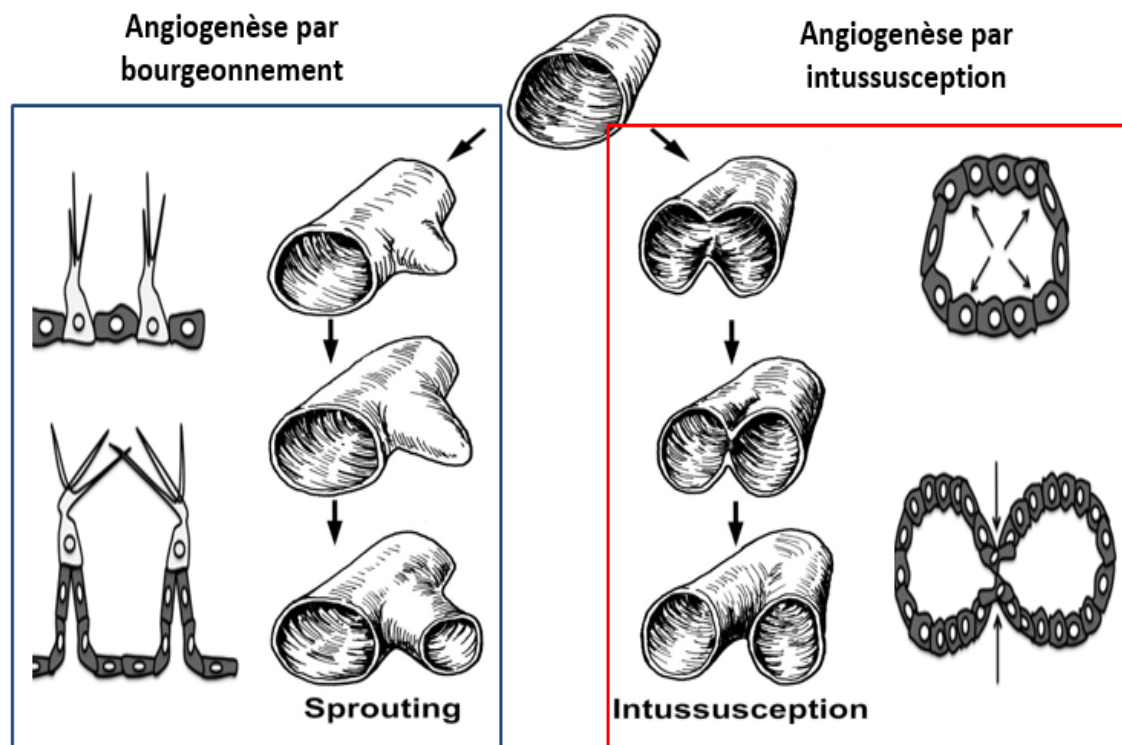


Figure 19. Les deux principaux types d'angiogenèse. L'angiogenèse par bourgeonnement est la forme principale d'angiogenèse post-ischémique et implique le bourgeonnement du vaisseau préexistant et son élongation pour former un néo-tubule. L'angiogenèse par intussusception est caractérisée par une séparation du vaisseau préexistant en deux vaisseaux. Figure adaptée de : (Gianni-Barrera et al. 2011; Prior, Yang, and Terjung 2004)

6.1.2. Vue d'ensemble des différentes étapes de l'angiogenèse

L'angiogenèse par bourgeonnement est un processus complexe qui implique une série d'étapes divisées en 3 phases principales : l'activation, l'élongation et la résolution. La phase d'activation ou d'initiation inclut les étapes menant au bourgeonnement du vaisseau. La phase d'élongation du bourgeon mène à la formation du tubule ainsi que de sa lumière. La phase de résolution implique le remodelage, la maturation et la stabilisation des nouveaux vaisseaux (**figure 20**). En condition physiologique, les vaisseaux sanguins des tissus normaux sont en état de quiescence. Cet état est caractérisé par un endothélium présentant des jonctions cellulaires serrées permettant de former une barrière et de maintenir la perméabilité sélective. Les vaisseaux quiescents sont entourés d'une membrane basale et de différentes cellules murales contribuant à leurs stabilités. La phase d'activation est déclenchée lorsque les vaisseaux sont soumis à des stimuli pro-angiogéniques (ex. VEGF, FGF) libérés par les tissus environnants en hypoxie ou par un état pathologique. Les différents facteurs de croissance angiogéniques vont ensuite activer des récepteurs à la surface des ECs déclenchant l'angiogenèse. Suite à l'activation des différents récepteurs, des cascades de signalisation intracellulaire vont stimuler différents processus impliqués dans l'angiogenèse. Dans les étapes initiales, le VEGF induit une déstabilisation et une dilatation du vaisseau, ainsi qu'une augmentation de la perméabilité membranaire causant l'extravasation des protéines plasmatiques. Par la suite, la dégradation de la membrane basale et de la MEC par des MMPs va permettre aux ECs de proliférer et de migrer pour mener au bourgeonnement du vaisseau. Le bourgeon angiogénique va subir une phase d'élongation coordonnée médiée par des ECs de phénotypes différents (tip cells et stalk cells). L'élongation du bourgeon va mener à la formation du nouveau tubule et à la création de la lumière. La phase finale de résolution implique l'inhibition de la migration et de la prolifération des ECs, ainsi que le remodelage, la maturation et la stabilisation du nouveau vaisseau. Dans cette phase finale, les néovaisseaux fonctionnels vont retourner en état de quiescence alors que les néovaisseaux dysfonctionnels vont régresser (Papetti and Herman 2002; Hanahan and Folkman 1996; Johnson and Wilgus 2014). Les processus clés et les mécanismes moléculaires sous-jacents seront approfondis dans les sections suivantes.

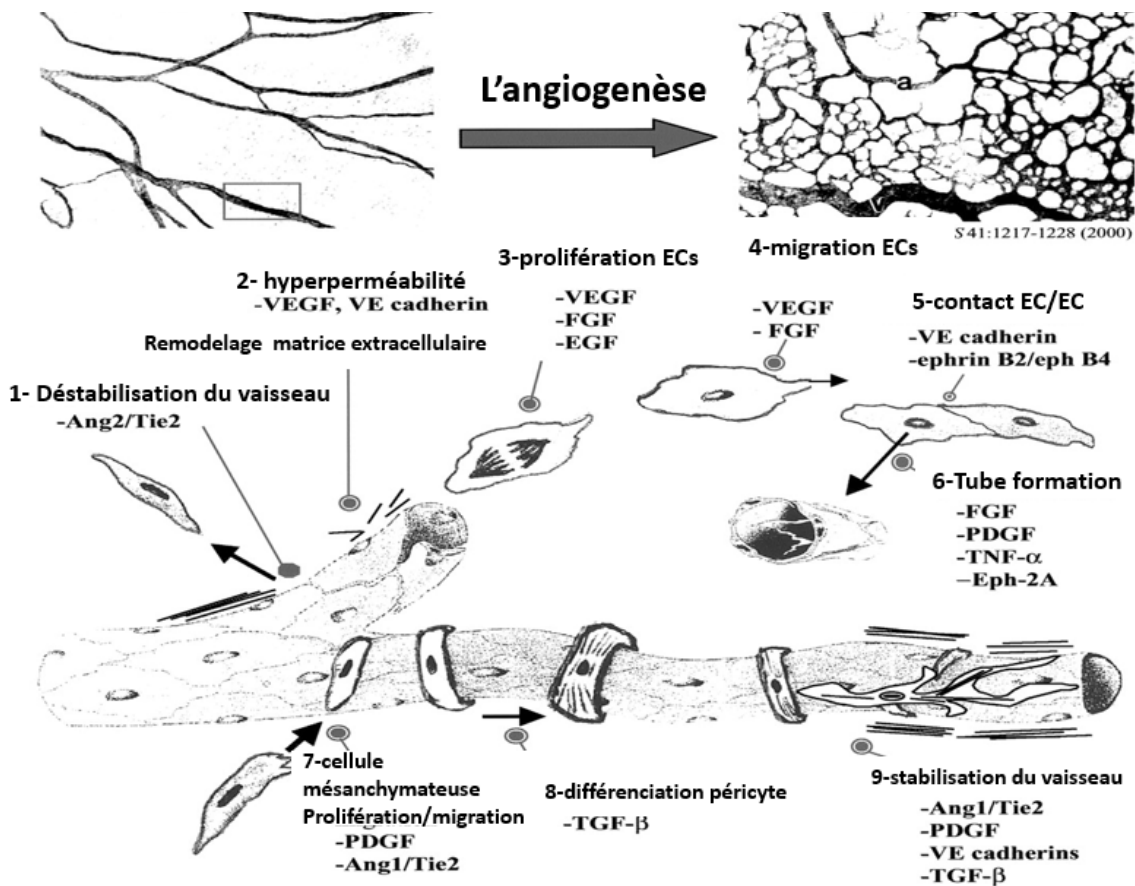


Figure 20. Les différentes étapes de l'angiogenèse et molécules impliquées. Détail dans le texte (6.1.2.). Figure adaptée de : (Papetti and Herman 2002)

6.1.3. Induction de l'angiogenèse par l'hypoxie : rôle du système HIF

L'hypoxie est un puissant stimulateur angiogénique contrôlé par le système HIF (Hypoxia Inductible Factor). Les tissus hypoxiques vont libérer différents facteurs de croissance et de survie, sous le contrôle de la signalisation HIF-1 agissant comme élément central dans la régulation de l'angiogenèse. HIF-1 est un facteur transcriptionnel sensible à l'oxygène. Il assure plusieurs fonctions liées à la survie des cellules en condition hypoxique en stimulant l'expression de centaines de gènes impliqués dans l'angiogenèse (**figure 21**). Structuralement, HIF-1 est une protéine hétérodimérique exprimée de façon constitutive et est composé de 2 sous-unités : HIF-1a est sensible à l'oxygène et HIF-1b est localisé dans le noyau. HIF-1a est très instable en condition de normoxie. En effet, HIF-1a subit une hydroxylation par des enzymes prolyl-hydroxylase (PHD) à sa sortie du noyau et est reconnu par la protéine d'ubiquitination

pVHL (von hippel lindau protein) l'acheminant au protéasome pour sa dégradation. Cependant, en condition hypoxique, HIF-1a est stabilisé et n'est plus hydroxylé et dégradé. HIF-1a est alors transloqué au noyau et se lie à HIF-1b et à d'autres cofacteurs activant la transcription de plusieurs gènes angiogéniques sous la dépendance d'élément de réponse à l'hypoxie (HRE) (Krock, Skuli, and Simon 2011; Zimna and Kurpisz 2015).

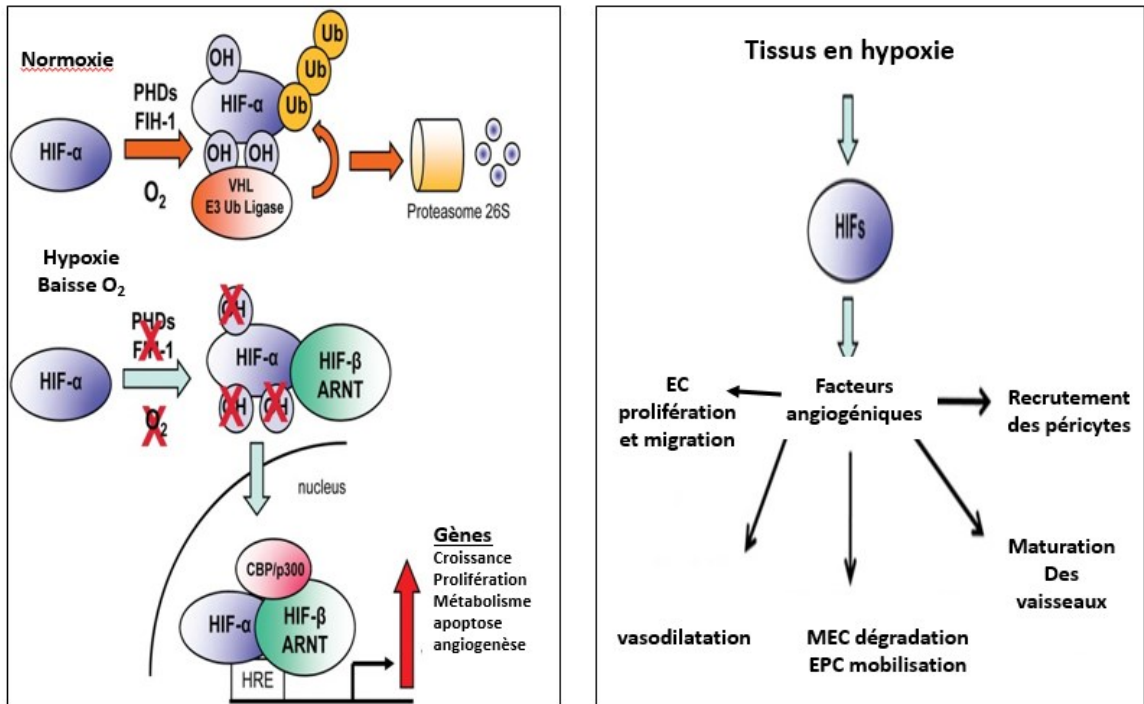


Figure 21. Le système HIF. En condition de normoxie, HIF-1a est hydroxylé et adressé au protéasome pour être dégradé. En condition d'hypoxie, HIF-1a n'est plus hydroxylé et est transloqué au noyau pour former un complexe actif capable d'activer la transcription de divers gènes impliqués dans la survie des cellules hypoxiques (gauche). HIF-1a est le principal facteur de transcription de molécules pro-angiogéniques qui sont impliquées dans plusieurs étapes de l'angiogenèse (droite). Figure adaptée de : (Krock, Skuli, and Simon 2011)

6.1.4. La phase d'activation : hyperperméabilité, migration et prolifération

Les étapes initiales de l'angiogenèse allant du déclenchement à la formation du bourgeon font partie de la phase d'activation. Lors de cette phase, les ECs quiescentes doivent être activées par des signaux pro-angiogéniques (ex. VEGF, FGF) pour démarrer le processus angiogénique.

La liaison du VEGF à ses récepteurs endothéliaux, en particulier le VEGFR2, mène à la stimulation de plusieurs voies de signalisations intracellulaires impliquées dans la vasodilatation, l'hyperperméabilité, la survie, la migration et la prolifération des ECs. Au départ, le VEGF stimule la production de NO par la voie PI3K/AKT/eNOS, favorisant la vasodilatation et l'augmentation de la perméabilité membranaire. Les ECs vont aussi perdre leurs jonctions serrées par l'internalisation de protéines d'adhésions intercellulaires comme la VE-cadherine, causant la disruption du contact cellule-cellule. Également, dans les événements initiaux, les péricytes (cellules murales) vont se détacher de la paroi vasculaire en réponse à l'angiopotine-2 (ANGPT2), déstabilisant ainsi le vaisseau. L'augmentation de la perméabilité est nécessaire à l'extravasation des protéines plasmatiques servant de niche pour la migration initiale. Pour que les ECs puissent proliférer et migrer, une dégradation de la membrane basale et de la MEC est nécessaire. Cette dégradation par les MMPs va aussi permettre la libération de diverses molécules pro-angiogéniques séquestrées dans la MEC, ce qui favorise le bourgeonnement du vaisseau. Le bourgeonnement angiogénique implique une prolifération et une migration organisées qui sont assurées par 2 sous-types d'ECs incluant les tips cells et les stalk cells. Ces deux sous-types présentent une morphologie et des propriétés fonctionnelles différentes. En effet, les tips cells sont des cellules meneuses permettant de guider la migration dans une direction précise. Ils possèdent une forte capacité migratoire et une faible capacité proliférative. Les stalks cells suivent la cellule meneuse (tip cell) et possèdent un fort potentiel prolifératif. Ils permettent l'élongation du bourgeon et la formation de tubules (Ribatti and Crivellato 2012; Papetti and Herman 2002; Carmeliet and Jain 2011). Les voies de signalisation moléculaire régulant la migration et la prolifération sont décrites à la fin du chapitre.

6.1.5. La phase de maturation : rôle des tip cells et des stalk cells

La maturation du bourgeon angiogénique menant à la formation du tubule peut être divisée en 3 phases principales (**figure 22**) : 1) un processus de sélection de la cellule meneuse (tip cell) dans le vaisseau préexistant qui assure la coordination de la migration, 2) un processus d'extension et d'élongation du bourgeon angiogénique générant le tubule. Au cours de ce processus, la tip cell migre selon un gradient de facteurs chimiotactismes et entraîne les cellules suiveuses (stalk cells) pour permettre l'élongation subséquente du tubule naissant, 3) la création

de la lumière est un processus liant l'espace luminal du bourgeon au vaisseau préexistant. En effet, une fois les bourgeons formés, ils se connectent avec les vaisseaux préexistants par anastomose pour générer un tubule étanche (Betz et al. 2016; Ribatti and Crivellato 2012).

L'acquisition du phénotype tip ou stalk cell est complexe et encore mal compris. Toutefois, des études ont montré qu'elle serait contrôlée par la voie de signalisation notch. Pour résumer, le VEGF stimule l'expression de Dll4 (Notch ligand delta like-4), le ligand du récepteur Notch-1. L'activation de Notch-1 par Dll4 mène à la différenciation des ECs en tip cells. Ces cellules vont ensuite produire des filopodes leur permettant de migrer vers les facteurs chimiotactiques de façon coordonnée. Les tip cells vont aussi sécréter des facteurs qui empêchent les stalk cells d'être attirées par les facteurs chimiotactiques, laissant l'exclusivité de la guidance à la cellule meneuse (Hellström, Phng, and Gerhardt 2007; Potente, Gerhardt, and Carmeliet). Les stalk cells jouent un rôle important dans l'élongation du tubule par leur capacité de prolifération. Également, ils permettent d'établir des jonctions avec les cellules voisines et produisent des composantes de la membrane basale assurant l'intégrité du bourgeonnement (Potente, Gerhardt, and Carmeliet). Suite à l'élongation, les tubules naissants doivent former la lumière du néovaisseau qui est essentielle pour le transport des fluides. Les mécanismes impliqués sont complexes et liés à la répulsion des ECs entre elles, le réarrangement des jonctions cellule-cellule et le changement de morphologie (Ribatti and Crivellato 2012). La **figure 22** résume les 3 modèles de formation de la lumière tubulaire les plus connus.

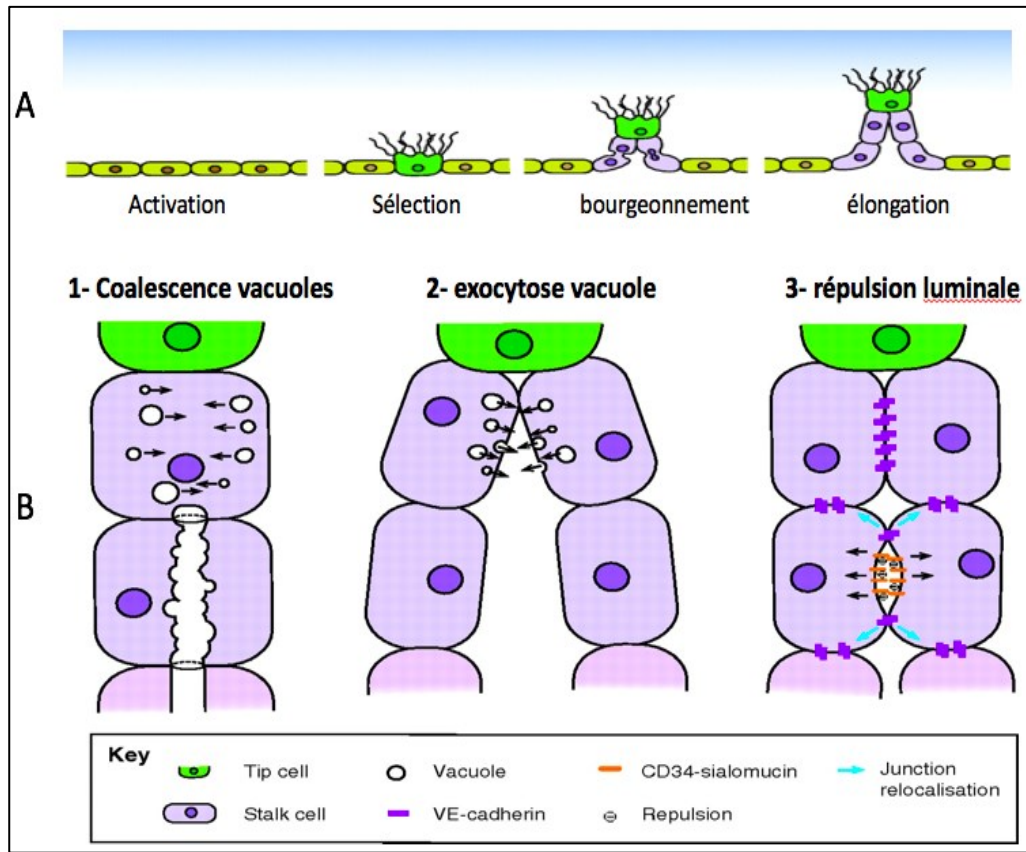


Figure 22. Formation du tubule et de la lumière. A) la formation de tubules implique l'activation des ECs, la sélection d'une EC meneuse (tips cell) assurant la migration et la prolifération coordonnée des ECs suiveuses (stalk cells) pour former le néovaisseau. B) Illustration simplifiée des 3 principaux processus impliqués dans la formation de la lumière tubulaire. 1-Les ECs forment des vacuoles intracellulaires fusionnant et formant la lumière. 2-Les ECs forment la lumière en produisant des vacuoles d'exocytoses qui sont libérées dans l'espace intracellulaire. 3- La lumière est créée par répulsion électrostatique des membranes. Figure adaptée de : (Geudens and Gerhardt 2011)

6.1.6. La phase de résolution : maturation et stabilisation des vaisseaux

Suite à la création de la lumière, une maturation des néovaisseaux doit survenir pour qu'ils deviennent organisés, fonctionnels et stabilisés. Ce processus est appelé la phase de résolution. La phase de résolution implique le rétablissement de la barrière endothéliale, le remodelage des néovaisseaux, le recrutement des cellules murales et la formation de la MEC. La voie de signalisation ANGPT1/Tie-2 est un élément crucial dans la stabilisation des

vaisseaux. En effet, l'activation du récepteur Tie-2 endothélial par l'ANGPT1 permet d'inhiber les actions angiogéniques du VEGF menant au renforcement des jonctions cellule-cellule, ainsi qu'à la reprise de la quiescence du néovaisseau. Les ECs vont également sécréter d'importants facteurs stabilisateurs comme le PDGF-B (*platelet-derived growth factor-B*) et le TFG- β 1 (*transforming growth factor-b1*). Le PDGF-B est principalement impliqué dans le recrutement des péricytes (cellules murales des capillaires) par son action chimiotactique. Il agit en se liant à son récepteur PDGFR-B présent à la surface des cellules murales, stimulant leurs migrations. Le TFG- β 1 permet la différenciation des cellules souches en péricytes et induit leur prolifération et leur migration. Il favorise aussi la production de MEC par différentes cellules et prévient la dégradation de celle-ci par un mécanisme dépendant de son récepteur ALK5 (TFG-B R-1). Le TFG- β 1 permet la quiescence des ECs en inhibant de façon sélective leur prolifération lorsqu'ils sont directement en contact avec les péricytes. Finalement, à tout moment au cours du processus angiogénique, sous l'influence du microenvironnement ou par la formation de néovaisseaux non fonctionnels, l'angiogenèse peut entrer dans une phase de régression par rétractation des bourgeons ou par apoptose (Wietecha, Cerny, and DiPietro 2013; Treps and Gavard 2015; Potente, Gerhardt, and Carmeliet).

6.1.7. Régulation de l'angiogenèse : les facteurs angiogéniques et voies de signalisations importantes

La régulation de l'angiogenèse est assurée par un système de contrôle moléculaire complexe médié par des facteurs pro- et anti-angiogéniques bien connus aujourd'hui (**figure 23**). Ces différentes molécules vont agir en stimulant ou en inhibant l'activation de voies de signalisations intracellulaires impliquées dans les différents processus de l'angiogenèse (ex. migration, prolifération, survie et formation de tubules). La modulation de l'angiogenèse est donc finement régulée par un équilibre physiologique entre ces différents facteurs. Les sous-sections suivantes visent à décrire les principaux facteurs angiogéniques et les voies de signalisations clés impliquées.

Famille	nom du facteur	fonctions dans l'angiogenèse
Angiopoietin	Ang 1	Recrutement péricytes, formation néovaisseaux
	Ang 2	ECs prolifération et migration
Transforming growth factors	TGF- α and β	ECs prolifération et migration, remodelage MEC
Epidermal growth factor	EGF	ECs prolifération et migration
Platelet-derived growth factors	PDGF	Recrutement péricytes
Tumor necrosis factors	TNF α	ECs prolifération et migration, formation tubules
Insulin-like growth factors	IGF-1	ECs prolifération , VEGF production
Vascular endothelial cadherin	VE-cadherin	ECs prolifération et adhésion
Vascular endothelial growth factors	VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, and PlGF	ECs prolifération, migration, bourgeonnement, formation tubules, hyperperméabilité
Matrix metalloproteinases	MMP-1, MMP-2, MMP-9	Dégradation membrane basale et MEC
Interleukins	IL-1, IL-6, IL-8, IL-13	ECs prolifération
Fibroblast growth factors	aFGF, bFGF	ECs prolifération et migration, remodelage MEC
Hypoxia inducible factors	HIF-1 α , HIF-1 β , HIF-2 α	Stimulation production VEGF
Chemokines	(C-C motif) CCL-1	Différenciation ECs et chimiotactisme
	(C-X-C motif) CXCL6, CXCL12	ECs prolifération
Notch/delta like ligand	Notch1-Dll4 (Delta like ligand 4)	Différenciation des tip et stalk cells
Platelet endothelial cell adhesion molecules	PECAM-1	Formation filopodes tip cells, formation de tube des ECs, adhésion
Prostaglandins	PGE-1, PGE-2	ECs prolifération
Plasminogen activator	PA-1	ECs migration

Figure 23. Liste et fonctions des principaux facteurs angiogéniques. Figure adaptée de : (Bali and Bali 2013)

6.1.7.1. Le VEGF

Le VEGF est le facteur angiogénique le plus important et le plus étudié. Il participe non seulement à l'angiogenèse, mais aussi à la vasculogenèse et à la lymphangiogenèse. Il agit comme puissant inducteur de formation de vaisseaux embryonnaires et postnataux (Hoeben et al. 2004b). Initialement, le VEGF a été identifié comme un facteur de perméabilité vasculaire

produit par les tumeurs (Ferrara 2011). Depuis ce jour, il a été largement caractérisé comme une molécule essentielle pour l'angiogenèse physiologique et pathologique. En effet, le VEGF est impliqué dans de multiples étapes du processus angiogénique incluant la perméabilité, la migration, la prolifération et la formation de tubules (Mariotti and Maier 2006).

La famille du VEGF comprend 7 isoformes différentes, les VEGF-A à F et le PlGF (placenta growth factor). Chacune de ces variantes contient un domaine d'homologie similaire composé d'un motif de cystéine impliqué dans les liaisons disulfures inter- et intramoléculaires (Hoeben et al. 2004b). Les différentes isoformes de VEGF se lient et activent 3 récepteurs spécifiques, le VEGFR1 (Flt-1), le VEGFR2 (Flk-1 ou KDR) et le VEGFR3 (Flt-4) (**figure 24**). Ces récepteurs sont impliqués dans la formation des vaisseaux sanguins et des vaisseaux lymphatiques. Le VEGF-A est le membre le plus important et est en général simplement désigné sous le nom de VEGF (Hoeben et al. 2004b). Structuralement, le VEGF-A est une glycoprotéine homodimérique de 34 à 42 kd et existe sous plus de 7 variantes avec des caractéristiques différentes (Hoeben et al. 2004b). Par exemple, chacune de ces variantes possède des affinités de liaison différentes pour l'héparine sulfate. De plus, elles peuvent être solubles ou séquestrées dans la MEC. Le VEGF-A165 est le plus documenté dans l'angiogenèse. Il présente une forte affinité pour l'héparine et est présent autant sous forme soluble que lié à la MEC (Ferrara 2009). De façon générale, le VEGF-A165 exerce son action pro-angiogénique par la liaison aux récepteurs VEGFR1 et VEGFR2.

6.1.7.2. Régulation de l'expression du VEGF

L'expression du VEGF est régulée par plusieurs facteurs transcriptionnels et par divers médiateurs endogènes qui vont moduler directement ou indirectement son expression génique et protéique. Les facteurs de transcription sont des protéines reconnaissant et liant des séquences spécifiques sur l'ADN et capables d'activer la transcription d'un gène menant à son expression (Josko and Mazurek 2004). Il existe une région clé de 50 paires de bases (Pb) en amont du promoteur du VEGF qui est une cible pour un grand nombre de signaux. Cette région répond à l'hypoxie, aux oncoprotéines et à des activateurs de facteurs de croissance qui sont pour la plupart produits par HIF-1 (Josko and Mazurek 2004). D'autres facteurs transcriptionnels peuvent également induire le VEGF mais ne sont pas indispensables à son expression. Par

exemple, nous retrouvons le NF- κ B qui est fortement exprimé en condition inflammatoire, l'AP-1 (activator protein-1) associé à la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire et le SP1 (specificity protein 1) lié à la production d'oncogènes (Josko and Mazurek 2004). Parmi les différents médiateurs influençant l'expression du VEGF, un des plus importants est le NO. En effet, le NO agit comme molécule de signalisation intra et extra cellulaire et possède un large éventail de propriétés biologiques, incluant l'induction de l'expression du VEGF par les SMCs (Dulak et al. 2000). Inversement, certains facteurs endogènes anti-angiogéniques comme le TSP-1 (thrombospondine-1) vont réguler négativement les niveaux de VEGF par internalisation et dégradation (Greenaway et al. 2007). D'autres facteurs comme le PF4 (platelet factor-4) lient le VEGF et bloquent ses actions pro-angiogéniques (Gengrinovitch et al. 1995). Finalement, certains agents et médiateurs vont diminuer indirectement l'expression du VEGF comme les oxLDL (Desjarlais et al. 2017b) et le facteur pro-inflammatoire TRAF6 (TNF- α receptor associated protein-6) (Bruneau et al. 2012).

6.1.7.3. Les récepteurs du VEGF : structure, régulation et rôle biologique

Les différentes isoformes de VEGF vont lier sélectivement 3 récepteurs de type tyrosine kinase localisés à la surface membranaire : VEGFR1, VEGFR2 et VEGFR3. Structuralement, ces récepteurs sont composés d'un domaine extracellulaire d'affinité pour le ligand, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine tyrosine kinase intracellulaire (**figure 24**). L'activation des VEGFR est régulée par liaison du ligand au récepteur causant une homodimérisation (ex. : VEGFR1-VEGFR1) ou une hétérodimérisation (ex. : VEGFR1-VEGFR2). Cette dimérisation mène à un changement conformationnel activant le récepteur par autophosphorylation de tyrosines spécifiques du domaine intracellulaire. La phosphorylation des résidus tyrosines va aussi permettre la création de sites de liaisons pour le recrutement de différents médiateurs contenant un domaine SH2. La liaison de ces différents médiateurs va déclencher des cascades de signalisation intracellulaires menant à différentes réponses biologiques comme la migration, la prolifération et la survie des cellules (**figure 24**). Les VEGFR sont inactivés par déphosphorylation par des tyrosines phosphatases telles que la VEPTP (vascular endothelial phosphotyrosine phosphatases) et la DEP1 (density-enhanced phosphatase 1). L'expression du récepteur peut aussi être régulée négativement par

internalisation et dégradation par le protéasome (Hoeben et al. 2004b; Koch and Claesson-Welsh 2012).

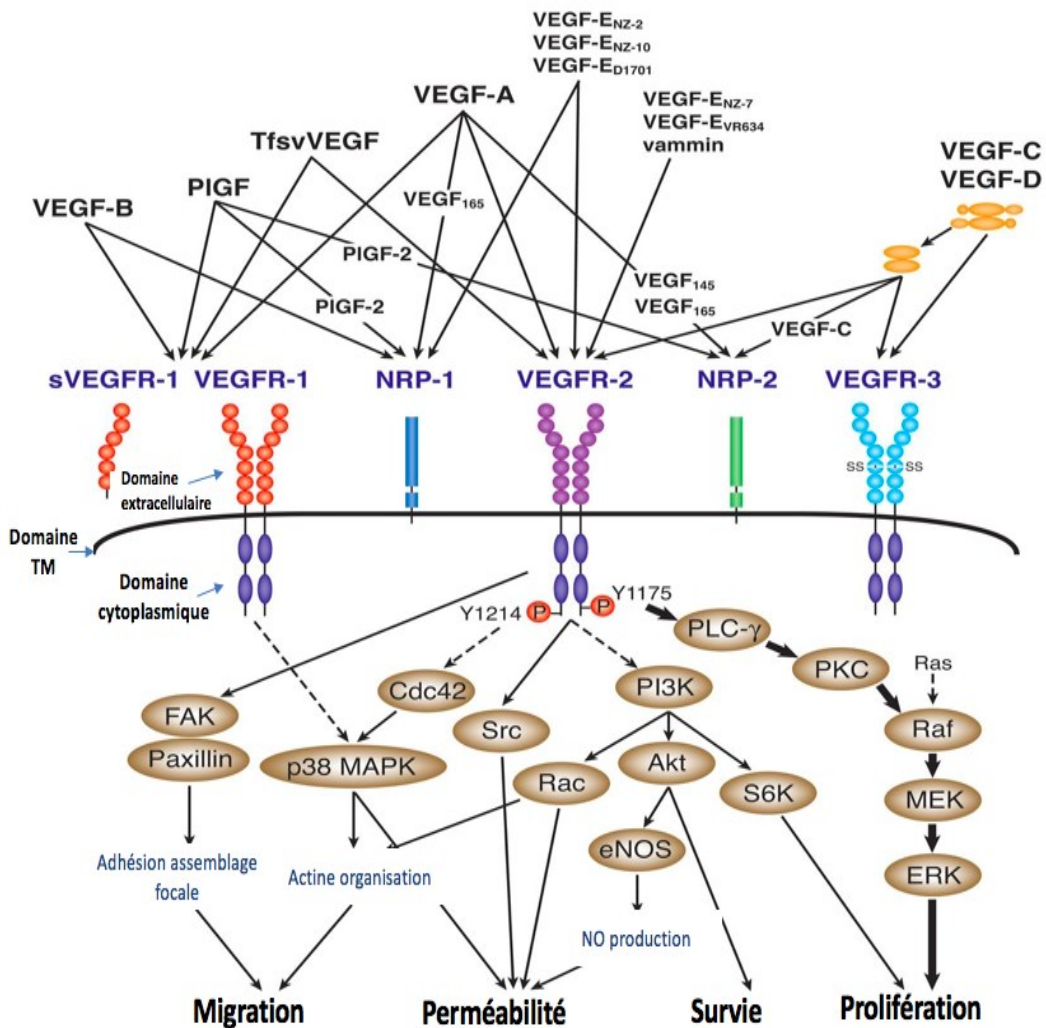


Figure 24. Les récepteurs au VEGF et voies de signalisations impliquées. Les 3 principaux récepteurs au VEGF possèdent un domaine extracellulaire liant différentes isoformes de VEGF (ligand), un domaine transmembranaire (TM) et un domaine cytoplasmique assurant la transmission de signaux intracellulaires. Les VEGFR sont activés par liaison avec les différentes isoformes de VEGF causant une autophosphorylation du récepteur. Le VEGFR2 est le principal récepteur angiogénique des ECs et est impliqué dans plusieurs étapes de l'angiogenèse incluant la perméabilité vasculaire, la migration, la prolifération et la survie des ECs. Figure adaptée de : (Takahashi and Shibuya 2005)

Parmi les 3 VEGFR, le VEGFR2 est le récepteur prédominant le plus important dans l'angiogenèse, son rôle sera décrit dans la section suivante. Bien que le VEGFR1 participe aussi à la signalisation angiogénique, son rôle sur la fonction endothéliale est moins bien défini. Sa fonction serait surtout liée à la régulation de la morphologie des vaisseaux sanguins. En effet, il est documenté que le VEGFR1 est requis pour la formation normale de vaisseaux sanguins durant l'embryogenèse. La délétion du gène VEGFR1 cause la mortalité des embryons de souris par une malformation vasculaire. Le VEGFR1 possède une faible activité kinase comparée au VEGFR2, ce qui se traduit par une faible capacité à stimuler la migration et la prolifération des ECs. Les fonctions pro-angiogéniques les mieux caractérisées du VEGFR1 sont liées à sa capacité d'induire la migration et la différenciation des monocytes. Le VEGFR3 est majoritairement exprimé dans les veines et les vaisseaux lymphatiques et n'est pas exprimé dans les artères après la naissance. Le VEGFR3 est impliqué dans la régulation de la lymphangiogenèse. Il stimule la migration, la prolifération et la survie des ECs lymphatiques en induisant l'activation des MAPK par la voie de signalisation PI3K/AKT (Cébe-Suarez, Zehnder-Fjällman, and Ballmer-Hofer 2006; Hoeben et al. 2004b).

6.1.7.4. VEGFR2 : Le récepteur endothélial clé dans la signalisation angiogénique

Le VEGFR2, appelé KDR chez l'humain et FLK1 chez la souris est le principal récepteur angiogénique des ECs. Il est également exprimé par les cellules hématopoïétiques, neuronales et rétiniennes. Son rôle pro-angiogénique inclut l'induction de la vasodilatation, la perméabilité vasculaire, la migration, la prolifération, la différenciation des EPCs et la survie cellulaire. L'activation du VEGFR2 stimule la prolifération des ECs par plusieurs voies de signalisations. Classiquement, le VEGFR2 active la cascade de signalisation RAS-dépendante (famille des protéines G) stimulant l'activation de MAPK comme ERK1/2 (extracellulaire signaling kinase). Le VEGFR2 active aussi la voie PI3K/AKT impliquée dans la migration et la survie cellulaire. D'autres médiateurs comme le c-SRC et l'eNOS sont également activés par la cascade VEGFR2 dépendante et vont stimuler la migration et la prolifération des ECs. La production de NO subséquente à l'activation du VEGFR2 induit la vasodilatation, la perméabilité membranaire et le recrutement de PACs. Le VEGFR2 régule aussi la réorganisation du cytosquelette et la migration cellulaire par l'activation de FAK (focal adhesion kinase) et de la voie SAPK/p38

(stress activated proteine kinase 2) (Cébe-Suarez, Zehnder-Fjällman, and Ballmer-Hofer 2006; Koch and Claesson-Welsh 2012).

6.1.7.5. Le FGF

Les FGF (fibroblast growth factor) sont également des facteurs pro-angiogéniques importants et représentent une famille de 23 membres connus (FGF-1 à FGF-23) liants 4 récepteurs tyrosine kinase (FGFR1 à FGFR4). Les récepteurs au FGF contiennent 3 domaines extracellulaires (D1 à D3), un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique tyrosine kinase (Beenken and Mohammadi 2009). Les membres les plus connus et les plus importants dans l'induction de l'angiogenèse sont le FGF-1 (acidic FGF) et le FGF-2 (basic FGF) activant les récepteurs FGFR1 et FGFR2. Le FGF-1 et le FGF-2 sont principalement séquestrés sous forme de réservoir dans la membrane basale et dans la MEC. Ils sont aussi induits et sécrétés en condition angiogénique par une large gamme de types cellulaires. Le FGF1 et le FGF2 sont capables de stimuler la prolifération des ECs, des fibroblastes, des macrophages et des SMCs. Le FGF-2 est également connu pour stimuler la production endogène de VEGF. Il possède des fonctions pro-angiogéniques similaires au VEGF et régule la prolifération, l'expression d'intégrine, la perméabilité endothéliale et la migration des ECs. De plus, le FGF-2 favorise la protéolyse et le remodelage de la MEC par l'induction de MMPs et par la production de fibronectine par les ECs (Ucuzian et al. 2010; Sterzynska, Sujka-Kordowska, and Witkiewicz 2011). Toutefois, des études *in vivo* semblent démontrer que les FGFs ne joueraient pas un rôle aussi important que le VEGF dans l'angiogenèse. En effet, les souris déficientes pour le FGF1 et le FGF2 présentent un développement vasculaire normal avec des défauts mineurs dans la cicatrisation des plaies. Collectivement, les études montrent que la FGF2 joue principalement un rôle dans le remodelage des vaisseaux sanguins lors de la réparation tissulaire et ne participe pas aussi activement à l'angiogenèse que le VEGF (Papetti and Herman 2002).

6.1.7.6. Le PDGF

Les PDGF (platelet derived growth factors) sont une famille de facteurs de croissance pro-angiogéniques de structure similaire au VEGF. Ils sont généralement entreposés dans les granules des plaquettes et synthétisés par différents types cellulaires (fibroblastes, péricytes, SMCs, et macrophages). Les PDGF contiennent 4 différentes chaînes polypeptidiques (A, B, C,

D) et forment 5 différentes isoformes par homo ou hétérodimérisation (PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC, PDGF-DD). Les différents PDGF lient 3 récepteurs tyrosines kinases incluant le PDGFR-AA, le PDGFR-AB et le PDGFR-BB. Le PDGFR-BB est le seul récepteur exprimé par les ECs et son activation induit le bourgeonnement angiogénique et la formation de tubules. De plus, le PDGFR-BB stimule la prolifération des SMCs et des péricytes impliqués dans la maturation et la stabilisation des vaisseaux. L'importance du PDGF dans l'angiogenèse et dans le développement embryonnaire a été confirmée *in vivo*. En effet, les souris déficientes en PDGF présentent des vaisseaux sanguins dysfonctionnels, ce qui est léthal chez les nouveau-nés. Également, plusieurs études ont démontré que la modulation de l'expression physiologique du PDGF est associée à plusieurs pathologies. Par exemple, l'expression du PDGF est augmentée lors de pathologies inflammatoires et athérosclérotiques. Collectivement, au niveau de la formation des vaisseaux sanguins, le PDGF joue un rôle clé dans le recrutement et la prolifération des péricytes permettant la stabilisation et la formation de capillaires fonctionnels (Sterzynska, Sujka-Kordowska, and Witkiewicz 2011; Papetti and Herman 2002).

6.1.7.7. Le TFG- β

Le TFG- β (*transforming growth factor beta*) est un membre d'une famille de 30 cytokines. Il est sécrété sous forme latente et activé par clivage protéolytique. Le TFG- β possède une grande variété de fonctions spécifiques selon le type cellulaire sur lequel il agit. Une exposition des ECs au TFG- β peut stimuler ou inhiber la formation de tubule selon la dose utilisée. Par exemple, les différentes études suggèrent que les effets pro-angiogéniques sont à faibles doses (<0,5 ng/ml) alors qu'une dose élevée (1-5 ng/ml) produirait un effet antagoniste. Le TFG- β est également impliqué dans la stabilisation des vaisseaux en favorisant les interactions ECs/péricytes et en stimulant la prolifération des péricytes. Globalement, le TFG- β permet de solidifier la paroi des vaisseaux par la régulation de la quiescence endothéliale, la stabilité des contacts cellule/cellule et par la différenciation des cellules murales. D'autre part, le TFG- β exerce un effet pro-angiogénique de façon indirecte en stimulant le recrutement de cellules inflammatoires capables de sécréter des facteurs angiogéniques. Le TFG- β exerce donc des effets pléiotropiques en fonction du type cellulaire ciblé (Ucuzian et al. 2010; Papetti and Herman 2002).

6.1.7.8. Les angiopoïétines

Les angiopoïétines (ANGPT) sont des facteurs requis pour le développement des vaisseaux sanguins et sont principalement impliqués dans la stabilité des vaisseaux. Les ANGPT sont une famille de 4 ligands extracellulaires (ANGPT1 à ANGPT4) liant des récepteurs tyrosine kinase endothéliaux (Tie-1 et le Tie-2). L'ANGPT1 et l'ANGPT2 sont les plus importantes dans l'angiogenèse et exercent des effets opposés via le récepteur Tie-2. L'ANGPT1 agit comme agoniste et induit une activation rapide de Tie-2 menant à une augmentation de la signalisation impliquée dans l'angiogenèse et dans la survie des ECs. L'ANGPT1 antagonise aussi l'expression de l'ANGPT2 favorisant la stabilisation des vaisseaux. Inversement, l'ANGPT2 bloque l'activation de Tie-2 par l'ANGPT1 et est principalement associée à la déstabilisation et la régression des vaisseaux. L'ANGPT2 permet aussi d'éviter le bourgeonnement angiogénique et les embranchements excessifs causés par une surstimulation de Tie-2 par l'ANGPT1. Les fonctions angiogéniques de l'ANGPT1 et l'ANGPT2 par Tie-2 demeurent complexes et dépendent de l'environnement local et de la collaboration avec les autres facteurs de croissances, dont le VEGF. Par exemple, en condition physiologique, la signalisation ANGPT1/Tie-2 dépendante est connue pour réguler la maintenance et la quiescence vasculaire. D'autre part, elle promeut des voies de signalisations impliquées dans l'angiogenèse. Lors d'une condition hypoxique, l'ANGPT2 est rapidement exprimée pour inhiber l'action de l'ANGPT1 sur Tie-2 menant à une déstabilisation des vaisseaux. Cette déstabilisation est impliquée dans les événements initiaux de l'angiogenèse. En présence de VEGF, l'ANGPT2 induit la migration et la prolifération des ECs. Inversement, en absence de VEGF, l'ANGPT2 cause l'apoptose des ECs et la régression de vaisseaux. Collectivement, les ANG sont impliqués dans les processus de stabilisations des vaisseaux et collaborent de façon complexe avec le VEGF durant les différentes étapes de l'angiogenèse. La modulation de l'expression de l'ANGPT1 et l'ANGPT2 est donc fonction des différentes phases de l'angiogenèse (Ucuzian et al. 2010 ; Sterzynska et al. 2011 ; Papetti and Herman 2002)

6.1.7.9. Les MMPs

La protéolyse de la MEC est un événement critique pour plusieurs phases de l'angiogenèse incluant la migration, le bourgeonnement et le remodelage des vaisseaux. La dégradation de la membrane basale et de la MEC est médiée par des métalloprotéinases

matricielles (MMPs) possédant une activité catalytique gélatinase et collagénase. L'expression des MMPs est augmentée lors de l'angiogenèse, mais aussi, par l'hypoxie et l'inflammation (Silvestre et al. 2013). Il existe 2 classes de MMPs, les solubles et les membranaires. Les MMPs solubles comme la MMP-2 et la MMP-9 sont très actives lors de l'angiogenèse. Les MMPs membranaires (MT-MMP) comme la MT1-MMP possédant un domaine catalytique capable d'activer d'autres MMPs et un domaine cytoplasmique intracellulaire impliqué dans la transmission de divers signaux intracellulaires. Les MMPs solubles sont sécrétées sous forme inactive et activées par clivage protéolytique par les MT-MMPs ou par d'autres MMPs solubles. Leur activité est contrôlée par des molécules endogènes comme les TIMPs (tissus inhibitor of metalloproteinase). Les MMPs solubles localisées dans la MEC contribuent aussi à l'angiogenèse en libérant des facteurs pro-angiogéniques (ex. VEGF et FGF) séquestrés. Leur capacité de dégradation favorise également le bourgeonnement angiogénique en créant l'espace requis aux ECs pour migrer. Les MT-MMPs peuvent stimuler diverses voies de signalisation angiogéniques par leur domaine cytoplasmique. Par exemple, la MT1-MMP est impliquée dans l'activation d'ERK favorisant la prolifération cellulaire et la stimulation indirecte de l'expression de VEGF (Gingras and Béliveau 2010). Pour résumer, les MMPs contribuent à l'angiogenèse par leur activité catalytique de dégradation et par leur signalisation intracellulaire pro-angiogénique.

6.1.7.10. Le NO : un médiateur pro-angiogénique important

Comme il a été décrit au cours des chapitres précédents, le NO est un important facteur vasodilatateur jouant un rôle protecteur fondamental au niveau de l'endothélium. Dans l'angiogenèse, le NO joue un rôle de premier plan comme molécule de signalisation dans diverses étapes du processus telles que la vasodilatation et la perméabilité, la migration et la prolifération des ECs (Cooke and Losordo 2002b). Le NO induit la vasodilatation par la relaxation des SMCs via l'activation de la voie de signalisation cGMP/PKG et en diminuant les concentrations de calcium intracellulaire. Le NO induit la migration et la prolifération des ECs en stimulant différentes voies de signalisation incluant les MAPK (RAS, RAF, ERK) et les intégrines (Bir et al. 2012). Il est aussi impliqué indirectement dans la dégradation de la MEC, dans l'organisation du réseau tubulaire et dans la formation de la lumière par des mécanismes encore mal compris (Duda, Fukumura, and Jain 2004; Fukumura and Jain 1998). Au cours de

l'angiogenèse, le NO peut être produit en réponse au VEGF par une cascade de signalisation VEGFR2/PI3K/AKT dépendante, menant à l'activation d'eNOS (Koch and Claesson-Welsh 2012). Le NO peut aussi induire l'expression endogène de facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF et le FGF et exercer un effet chimioattractant pour diverses cellules (péricytes et PACs) (Bir et al. 2012). L'importance du NO dans l'angiogenèse a été documentée dans de nombreux modèles animaux. En effet, la délétion du gène eNOS chez la souris est associée à une diminution de la capacité angiogénique et de réparation tissulaire. Les souris KO pour eNOS présentent aussi une réduction de l'expression de facteurs pro-angiogéniques et une diminution de la capacité de migration et de prolifération des ECs (Lee et al. 1999). Inversement, il a été documenté que la surexpression d'eNOS chez la souris mène à une remarquable augmentation de la densité capillaire dans les tissus ischémiques (Amano et al. 2003).

6.1.8. Importance de Src dans l'angiogenèse

Le proto-oncogène c-Src (Src) fait partie d'une famille d'oncogènes codant pour des non-récepteurs tyrosines kinases (CSK). Src est une protéine adaptatrice qui interagit avec des récepteurs tyrosines kinases comme le VEGFR2, des récepteurs couplés aux protéines G et des récepteurs de stéroïdes. Src agit aussi comme transmetteur de signaux intracellulaires et comme activateur transcriptionnel. Toutes les interactions moléculaires médiées par Src mènent à l'induction de voies de signalisations impliquées dans divers processus biologiques (migration, prolifération, survie et angiogenèse) (**figure 25**). La découverte de Src par Bishop et Varmus est à l'origine du prix Nobel de physiologie en 1989 et a grandement contribué à la compréhension moderne du cancer (Wheeler, Iida, and Dunn 2009).

Structuralement, SRC est constitué de 6 régions fonctionnelles : SH4, SH3, SH2, une séquence de liaison, un domaine tyrosine kinase (SH1) et une région régulatrice en C-terminale (**figure 25**) (Wheeler, Iida, and Dunn 2009). Les domaines SH2 (SRC homology 2) et SH3 (SRC homology 3) participent aux interactions protéine-protéine et le domaine SH1 (domaine catalytique) contient le site actif kinase. Le domaine SH3 permet aussi d'adresser Src à la membrane cellulaire. L'activation de Src est contrôlée par phosphorylation sur des sites spécifiques contenant des tyrosines (y416 et y527) et par des interactions avec des partenaires

protéiques permettant à Src de passer d'un état inactif à actif (**figure 25**). L'autophosphorylation de la tyrosine-416 de Src induit un changement conformationnel menant à son activation. L'autre site critique dans la régulation de Src est la tyrosine 527 qui peut être phosphorylée (état inactif de Src) ou déphosphorylée (état actif Src) par diverses protéines comme des tyrosines kinases CSK et des SHP-1 phosphorylases (Frame 2002; Wheeler, Iida, and Dunn 2009). Plusieurs protéines peuvent interagir avec SRC par les domaines SH2 et SH3 régulant son activité. Par exemple, le PDGF, FAK et la tyrosine phosphatase SHP-2 peuvent réguler positivement Src (Amanchy et al. 2009; Burnham et al. 2000). Parmi les régulateurs négatifs de Src, nous retrouvons la protéine SRCIN1 (*Src kinase signaling inhibitor 1*) également connue sous le nom de SNIP. Cette protéine adaptatrice récemment découverte est importante dans l'inhibition endogène de Src. Elle agit en activant CSK, un important régulateur négatif de Src (Cao et al. 2014; Di Stefano et al. 2007). L'action moléculaire de Src est variée et inclut l'activation de différents récepteurs (ex. CSFR1, VEGFR, EGFR), facteurs transcriptionnels (ex. STAT) et molécules de signalisation (ex. MAPK, ERK, FAK). Dans l'angiogenèse, Src stimule l'activation de différentes voies de signalisations impliquées dans la migration et la prolifération (PI3K/AKT/eNOS et ERK/P38) des ECs. Également, Src stimule l'angiogenèse en augmentant la synthèse de VEGF par les MAPK (Wheeler, Iida, and Dunn 2009). L'interaction de Src avec VEGFR2 est également importante pour l'augmentation de la perméabilité endothéliale, une étape critique dans les événements initiaux de l'angiogenèse. Par exemple l'interaction VEGFR2/Src mène à l'activation d'eNOS, ce qui augmente la production de NO, mais participe aussi au réarrangement des jonctions VE-cadherin modulant la perméabilité endothéliale (Sun, Li, et al. 2012). L'importance de Src dans l'angiogenèse tumorale a été démontrée dans plusieurs modèles animaux. Par exemple, il a été documenté que l'inhibition de Src stabilise la barrière endothéliale et supprime l'extravasation tumorale confirmant son importance dans la perméabilité endothéliale lors de l'angiogenèse tumorale (Weis et al. 2004). L'inhibition de Src favorise aussi l'apoptose des ECs (Ischenko et al. 2007) et diminue la croissance tumorale (Irby and Yeatman 2000). Toutefois, le rôle de Src dans l'angiogenèse non tumorale est peu connu.

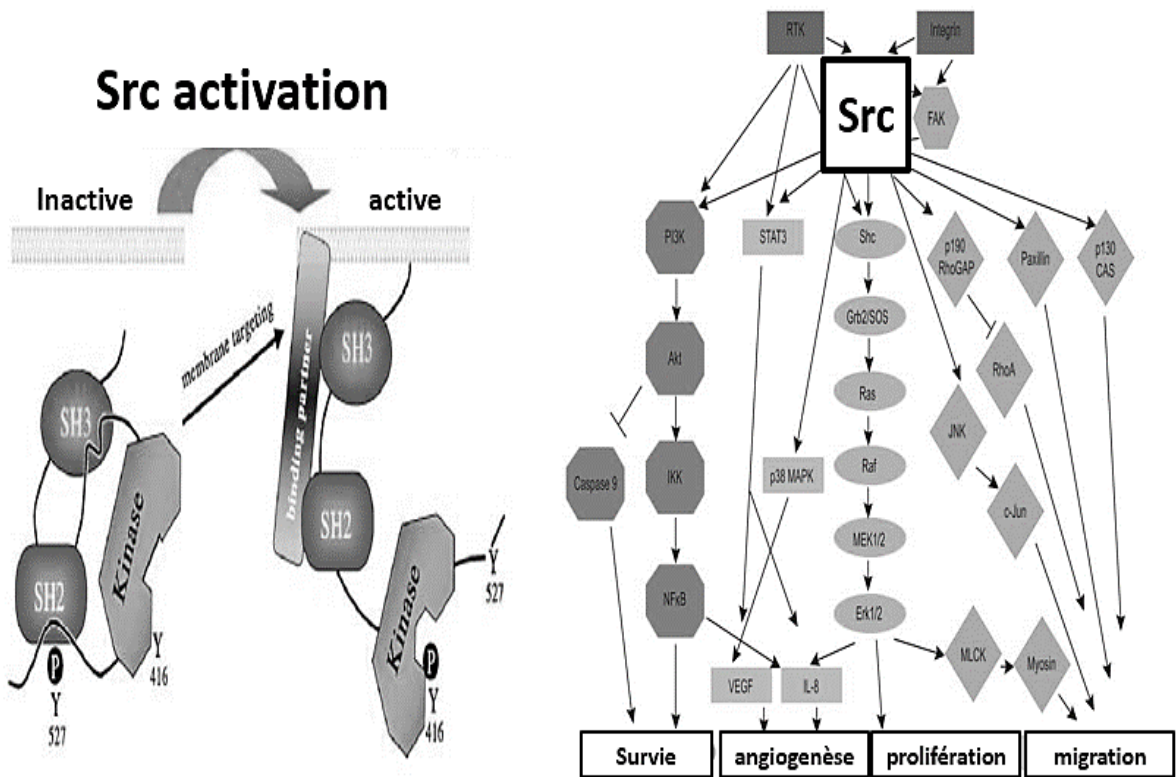


Figure 25. Mécanisme d'activation de Src et voies de signalisations impliquées. *Src est une protéine de type non-récepteur tyrosine kinase et possède 3 domaines avec des fonctions importantes (SH2, SH3, kinase). Les domaines SH2 et SH3 établissent des liaisons avec divers partenaires de liaison pour permettre leur activation ou le fonctionnement de leur activité de signalisation intracellulaire (détail dans le texte). Le domaine SH3 permet également la localisation de Src à la membrane plasmique et le domaine kinase permet l'activation par phosphorylation de diverses protéines impliquées dans la transmission de signaux de survie, de migration et de prolifération (figure droite). Src passe de l'état inactif à actif par phosphorylation de sa tyrosine 416 (Y416) et déphosphorylation de sa Y527, causant un changement de conformation du site actif et permettant ensuite la phosphorylation de diverses protéines (figure gauche). Figure adaptée de : (Wheeler, Iida, and Dunn 2009; Frame 2002)*

6.1.9. La régulation négative de l'angiogenèse : les facteurs anti-angiogéniques

L'inhibition de l'angiogenèse est causée par un déséquilibre entre les facteurs pro et anti-angiogéniques endogènes. Une expression élevée de facteurs anti-angiogéniques dans les tissus maintient l'angiogenèse inactive en condition normale. Les composantes de la membrane vasculaire peuvent moduler le comportement des ECs en plus de fournir un soutien structurel et fonctionnel. Les facteurs anti-angiogéniques les plus connus sont séquestrés dans la MEC et retrouvés dans la membrane basale. Parmi les principaux facteurs anti-angiogéniques nous retrouvons l'endostatin, l'angiostatine, la thrombospondine (TSP), certaines interleukines, l'INF et le PF4 (platelet factor 4) (Nyberg, Xie, and Kalluri 2005b).

L'endostatine est un important facteur anti-angiogénique dérivé du collagène et exerce sa fonction inhibitrice de plusieurs façons. Par exemple, elle interfère avec la transduction de signaux induits par le facteur pro-angiogénique FGF2. Elle inhibe aussi la prolifération endothéliale en ciblant la cyclin D1 et antagonise l'action du VEGF ciblant le VEGFR2. L'endostatine diminue l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la croissance (EGFR, MAPK, FAK) et dans la migration (RAS/RAF, ERK et P38) des ECs. Également, elle inhibe l'activité de plusieurs MMPs, en particulier la MMP2 et la MMP9 qui sont très actives dans l'angiogenèse (O'Reilly et al. 1997; Nyberg, Xie, and Kalluri 2005b). La thrombospondine-1 (TSP-1) est une glycoprotéine anti-angiogénique sécrétée par diverses cellules. Elle est reconnue comme un important inhibiteur d'angiogenèse et de croissance tumorale. Elle agit en bloquant des voies de signalisations activées par le VEGF et le FGF-2. Également, la TSP-1 exerce un effet pro-apoptotique sur les ECs en augmentant l'expression du ligand FASL (Lawler 2002; Nyberg, Xie, and Kalluri 2005b). Les interférons (INF) sont des cytokines anti-angiogéniques qui possèdent des fonctions antivirales, anti-tumorales et pro-apoptotiques. Par exemple, l'INF est reconnu comme un inhibiteur d'angiogenèse tumoral. *In vitro*, l'INF diminue l'expression, la sécrétion et l'activité de facteurs pro-angiogéniques comme l'IL-8, la MMP-9, le bFGF et le VEGF (Nyberg, Xie, and Kalluri 2005b). Parmi les interleukines anti-angiogéniques, nous retrouvons l'IL-4 qui inhibe l'action du FGF, l'IL-12 qui stimule la production d'INF et l'IL-18 qui inhibe la néovascularisation cornéenne et embryonnaire (Morini

et al. 2004; Kim et al. 2003; Nyberg, Xie, and Kalluri 2005b). Finalement, le PF4 (platelet factor-4) est un autre facteur anti-angiogénique libéré par les granules plaquettaires. Il inhibe l'angiogenèse en s'associant directement avec le FGF-2 et en bloquant la liaison à son récepteur endothélial et en inhibant l'activité du VEGF par plusieurs mécanismes (Gengrinovitch et al. 1995; Nyberg, Xie, and Kalluri 2005b).

6.1.10. Résumé des principales voies de signalisations angiogéniques.

Les ECs reçoivent donc de multiples signaux de leur microenvironnement pour contrôler diverses étapes impliquées dans la formation de nouveaux vaisseaux. Jusqu'à maintenant, il a été décrit que les facteurs pro-angiogéniques stimulent des cascades de signaux intracellulaires par l'activation de différents récepteurs endothéliaux menant à la prolifération, la migration et la résistance à l'apoptose (survie). Ces trois processus sont critiques dans l'induction de l'angiogenèse en condition d'hypoxie (Munoz-Chapuli, Quesada, and Angel Medina 2004). Les paragraphes suivants visent à mieux illustrer les principaux récepteurs et les voies de signalisations classiques qui sont impliqués dans ces 3 différents processus.

A-Signalisation intracellulaire impliquée dans la prolifération des cellules endothéliales

Chez l'adulte, en condition physiologique, les ECs sont en état de quiescence et seulement 0,01 % des ECs se divisent et prolifèrent (Hobson and Denekamp 1984). Par contre, en réponse à une stimulation angiogénique, les ECs entrent dans un état prolifératif. Les 7 principaux récepteurs et les principales voies de signalisations menant à la prolifération des ECs sont illustrés à la **figure 26**. Les récepteurs les plus actifs pour la prolifération des ECs sont le VEGFR2 et le FGFR capables d'activer plusieurs voies dont les voies PI3K/AKT/eNOS et PLCy/PKC/ERK, deux voies importantes bien documentées (Munoz-Chapuli, Quesada, and Angel Medina 2004).

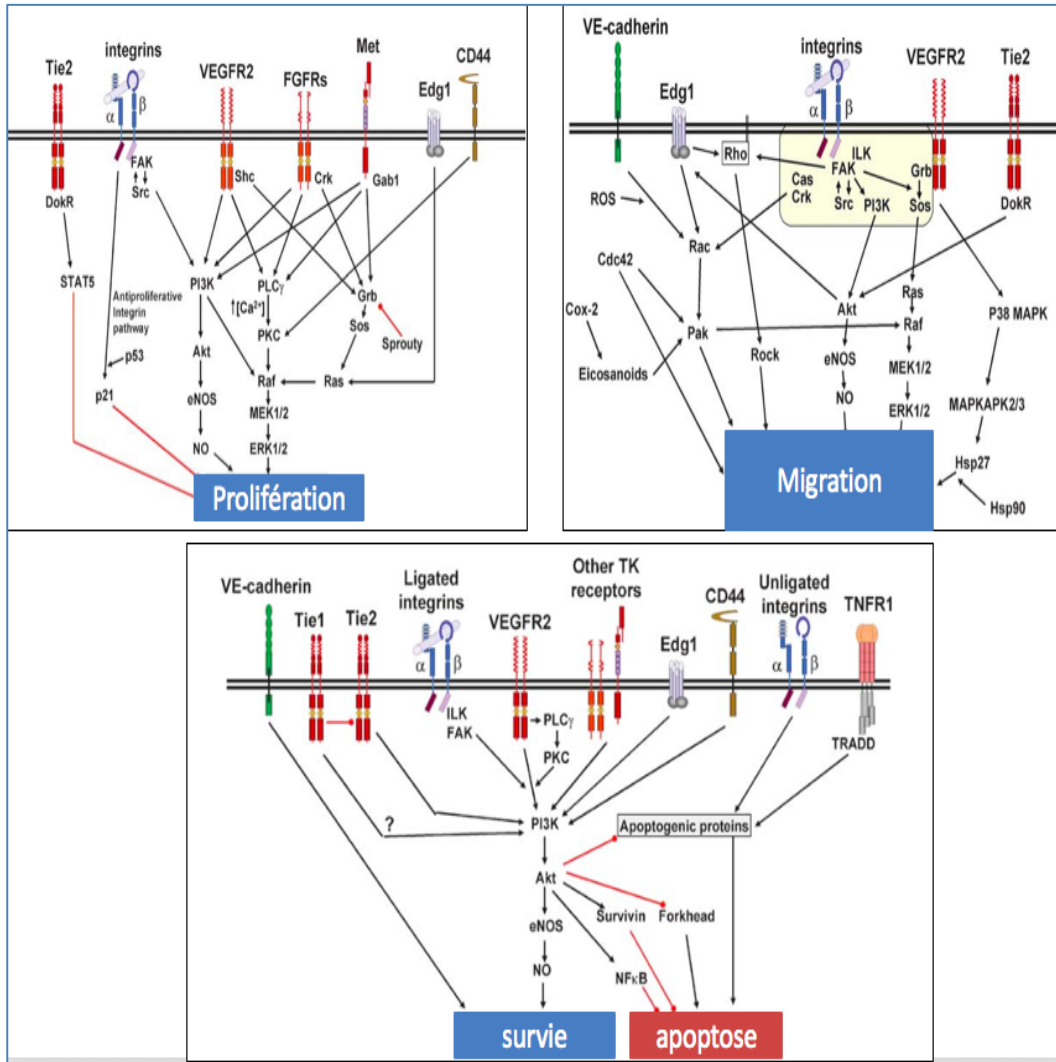


Figure 26. Voies de signalisations impliquées dans la prolifération, la migration et la survie des ECs. Illustration des principaux récepteurs membranaires et des médiateurs intracellulaires impliqués dans la régulation de la migration, de la prolifération et de la survie des ECs. Détail dans le texte. Figure adaptée de : (Munoz-Chapuli, Quesada, and Angel Medina 2004)

B-Signalisation intracellulaire impliquée dans la migration des cellules endothéliales

Les voies de signalisation associées à la migration impliquent des médiateurs communs à celle de la prolifération cellulaire. La voie du VEGFR2 est une des principales activant les voies PI3K/AKT/eNOS, ERK et P38. Également, les intégrines sont grandement impliquées dans la migration des ECs. Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires d'adhésion

cellulaire impliqués aussi dans la transduction de signaux intracellulaires. L'extrémité extracellulaire interagit avec des protéines matricielles alors que la partie cytoplasmique interagit avec des molécules de signalisations intracellulaires régulant la migration, la prolifération, la survie et la différenciation. Les intégrines exercent donc 2 fonctions fondamentales incluant l'adhésion et la signalisation intracellulaire. Les protéines d'adhésion focale (FAK) appartiennent à la famille des kinases et sont exprimées de façon ubiquitaire dans les cellules au niveau du complexe d'adhésion cytoplasmique. Les FAK peuvent être activés par des intégrines, facteurs de croissance et hormones. Une fois activés, ils subissent un changement de conformation libérant un site phosphorylable par d'autres protéines comme Src. L'activation des FAK conduit ensuite à des cascades de signalisation stimulant des voies impliquées dans la migration et la survie cellulaire (Zhao and Guan 2011; Avraamides, Garmy-Susini, and Varner 2008; Munoz-Chapuli, Quesada, and Angel Medina 2004). Les principales voies de signalisation impliquée dans la migration cellulaire sont illustrées à la **figure 26**.

C- Signalisation intracellulaire impliquée dans la survie des cellules endothéliales

En condition hypoxique, le déclenchement de signaux de survie des ECs est nécessaire pour que l'angiogenèse ait lieu. Il existe plusieurs récepteurs endothéliaux impliqués dans la survie et l'apoptose. Toutefois, la plupart convergent vers deux voies de signalisation clé régulant la survie des cellules : la voie PI3K/AKT et la voie du programme de transcription de gènes régulant l'apoptose (**figure 26**). Un des éléments centraux dans la survie des cellules est l'activation d'AKT qui est un point de convergence de plusieurs signaux de survie (Munoz-Chapuli, Quesada, and Angel Medina 2004). AKT promeut la survie de plusieurs façons. Par exemple, il active eNOS favorisant la génération de NO exerçant un rôle anti-apoptotique sur l'endothélium (Dimmeler and Zeiher 1999). AKT peut également inhiber la transcription de molécules et de gènes effecteurs pro-apoptotiques comme les caspases et certains membres de la famille des BCL-2 (Bax, Bad). Il peut aussi agir en activant des médiateurs anti-apoptotiques comme la Survivin (Munoz-Chapuli, Quesada, and Angel Medina 2004). Finalement, l'activation d'AKT joue un rôle protecteur en bloquant l'action pro-apoptotique de différentes molécules inflammatoires comme le TNF- α (Suzuki et al. 2008).

6.2. La vasculogénèse et le rôle des cellules pro-angiogéniques (PACs)

La vasculogénèse est définie comme un processus distinct et complémentaire à l'angiogénèse qui permet la formation de vaisseaux sanguins à partir de cellules endothéliales progénitrices (EPCs) (Asahara and Kawamoto 2004). La vasculogénèse a longtemps été considérée comme un processus de formation de vaisseaux sanguins de novo limité au développement embryonnaire. Toutefois, suite à l'isolation d'EPCs du sang périphérique en 1997 par Asahara et ses collègues, un rôle pour les EPCs dans la néovascularisation postnatale a été considéré. En effet, ces cellules positives pour le marqueur hématopoïétique CD34 et pour le marqueur endothélial VEGFR2, possédaient une grande capacité de prolifération et pouvaient se différencier en ECs *in vitro*. Par la suite, il a été démontré que les EPCs pouvaient s'incorporer aux vaisseaux, et ce dans les emplacements d'angiogénèse active (Tongers, Roncalli, and Losordo 2010; Murohara 2003). Suite à ces différentes observations, le potentiel angiogénique des EPCs a été investigué et confirmé dans de nombreuses études (Murohara 2003). *In vitro*, les EPCs sont en général caractérisées par leurs capacités d'internaliser les LDLs diacétyler (dilaclDL) et par divers essais fonctionnels (ex. capacité à former des colonies et tubules, capacité d'intégration vasculaire). Parmi les autres méthodes conventionnelles d'identifications, l'analyse de la co-expression de marqueurs spécifiques hématopoïétiques (CD133 et CD34) et endothéliaux (VEGFR2, eNOS, CD31) est utilisée (Tongers, Roncalli, and Losordo 2010).

À l'heure actuelle, il existe encore un débat sur les termes utilisés pour identifier les EPCs. Par exemple, le terme utilisé pour qualifier les EPCs varie en fonction de leur provenance (ex. : sang, moelle osseuse), des techniques de culture cellulaire, des marqueurs utilisés pour les identifier et de leurs phénotypes (Urbich and Dimmeler 2004; Tongers, Roncalli, and Losordo 2010). De façon générale, les EPCs font référence à une population très hétérogène de cellules progénitrices pouvant développer un phénotype endothélial et acquérir des propriétés angiogéniques. Elles sont parfois identifiées à tort comme des «*early outgrowth cells*» dont les termes utilisés sont CAC (*circulating angiogenic cells*) et PAC (*proangiogenic cells*). Comme il a été mentionné au début du chapitre, les PACs ne sont pas de vraie EPCs n'acquérant pas le phénotype endothélial et sont maintenant considérés de façon plus précise comme des cellules

ayant une forte activité paracrine pro-angiogénique. Les «*late outgrowth cells*» ou «*endothelial colony forming cells*» fait référence à de vrai EPCs qui se rapprochent du phénotype des ECs matures (**figure 27**) (Rose, Erzurum, and Asosingh 2015; Basile and Yoder 2014). La section suivante vise à mieux définir l'origine et la caractérisation des PACs qui sont les cellules étudiées dans cette thèse.

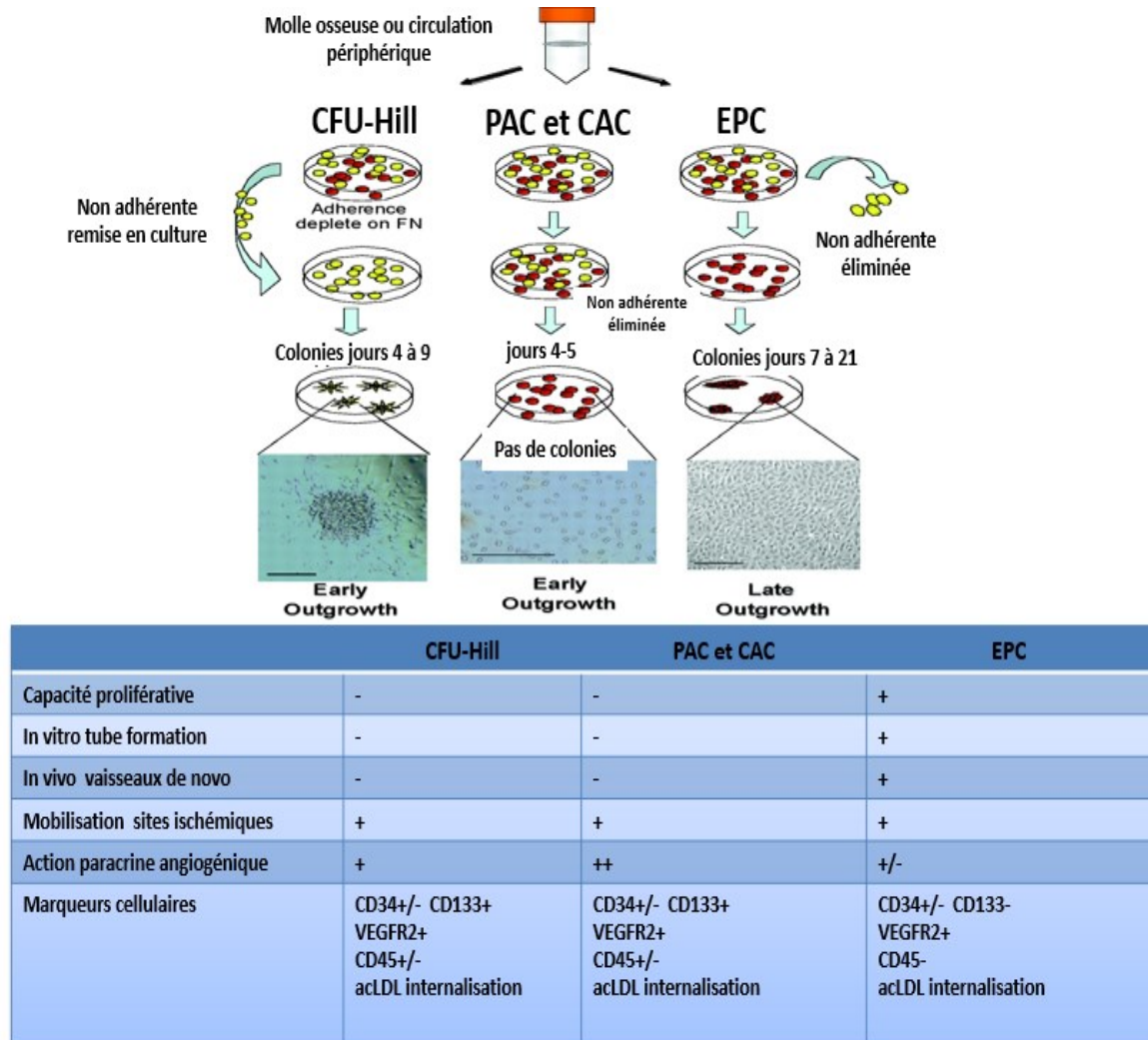


Figure 27. Identification et caractéristiques des 3 principaux sous-types cellulaires impliqués dans la néovascularisation post-ischémique. Figure adaptée de : (Basile and Yoder 2014; Williamson, Stringer, and Alexander 2012)

6.2.1. Origine, identification et localisation des EPCs/PACs

Au cours du développement, l'hématopoïèse et la néovascularisation sont étroitement liées par une cellule souche bipotente commune appelée l'hémangioblaste. Cette cellule produit les cellules hématopoïétiques et les cellules endothéliales. Après la naissance, ce lien est maintenu par un ensemble de cellules progénitrices hématopoïétiques capables de se différencier en EPCs et jouant un rôle essentiel dans la santé vasculaire (Rose, Erzurum, and Asosingh 2015). Les PACs quant à elles sont identifiées par un ensemble de caractéristiques spécifiques. Elles sont en général positives pour un marqueur hématopoïétique (ex. CD34 et CD133) et pour un marqueur endothélial (ex. VEGFR2, CD31, Tie-2). De plus, les PACs possèdent la capacité d'adhérer à la fibronectine, d'absorber des LDL acétylés et de lier la lectine (Bueno-Betí et al. 2013; Rose, Erzurum, and Asosingh 2015). Au niveau de leurs localisations, il existe 3 principales niches de PAC dans l'organisme : 1) une réserve principale dans la moelle osseuse, 2) un petit groupe retrouvé dans la circulation sanguine et 3) un groupe de PAC résident localisé près de l'endothélium (Massberg et al. 2007; Tamma and Ribatti 2017). Selon la littérature, il s'agit d'une même population dérivant de la moelle osseuse et libéré dans la circulation sanguine (Massberg et al. 2007). Pour que les PACs puissent exercer leurs actions pro-angiogéniques, ils doivent migrer à proximité des structures vasculaires des régions ischémiques. Les mécanismes associés seront discutés au cours des sections suivantes.

6.2.2. Les activités fonctionnelles des PACs : vue d'ensemble des processus impliqués dans le recrutement des PACs aux sites de néovascularisation

En condition physiologique, le nombre de PACs périphériques est faible et on les retrouve en grand nombre dans la moelle osseuse. Suite à une injure de l'endothélium et/ou en réponse à une condition d'ischémie, les PACs seront mobilisés à différents sites pour réparer l'endothélium ou participer à la néovascularisation. Ce processus implique une série d'étapes qui sont illustrées à la **figure 28**. Suite à divers signaux de mobilisations (facteurs angiogéniques, cytokines et hormones produites par les tissus distants), les PACs quiescents attachés aux cellules stromales de la moelle osseuse vont se détacher, proliférer et migrer vers la circulation. Cette mobilisation initiale est stimulée par une augmentation de la production de différents facteurs (FGF, CSF, VEGF et SDF-1) libérés dans la circulation (De Falco et al. 2004;

Aicher, Heeschen, et al. 2003). Ces différents facteurs vont aussi induire l'activation d'eNOS et augmenter la production de NO. Le NO régule l'activité enzymatique de la MMP-9 qui joue un rôle clé dans la libération des PACs de la moelle osseuse. En effet, la MMP-9 favorise la mobilisation et la migration des PACs en clivant le kit ligand membranaire (KitL) dans sa forme soluble (sKitL). sKitL active le récepteur c-Kit à la surface des PACs stimulant ainsi leur mobilisation (Heissig et al. 2002; Dimmeler et al. 1999). Une fois en circulation, les PACs seront recrutées aux sites d'intérêts par différentes molécules chimioattractantes comme le SDF-1 qui est sécrété par les tissus ischémiques. Le SDF-1 lie le récepteur CXCR4 des PACs, stimulant ainsi leur migration vers les sites ischémiques (Zhao, Qian, et al. 2010). Une fois recrutées aux sites ischémiques, les PACs adhèrent aux ECs et migrent au travers de l'endothélium pour atteindre les régions de néovascularisation. Une fois intégrés dans les tissus ischémiques, les PACs peuvent rarement se différencier en ECs pour former des tubules ou plus souvent sécréter des molécules pro-angiogéniques. L'atteinte des sites ischémiques par les PACs implique également une invasion de l'espace interstitiel et la dégradation de la MEC par les MMPs (Caiado and Dias 2012; Hynes 2009). Les prochaines sections visent à mieux définir les principaux acteurs impliqués dans ces différents processus.

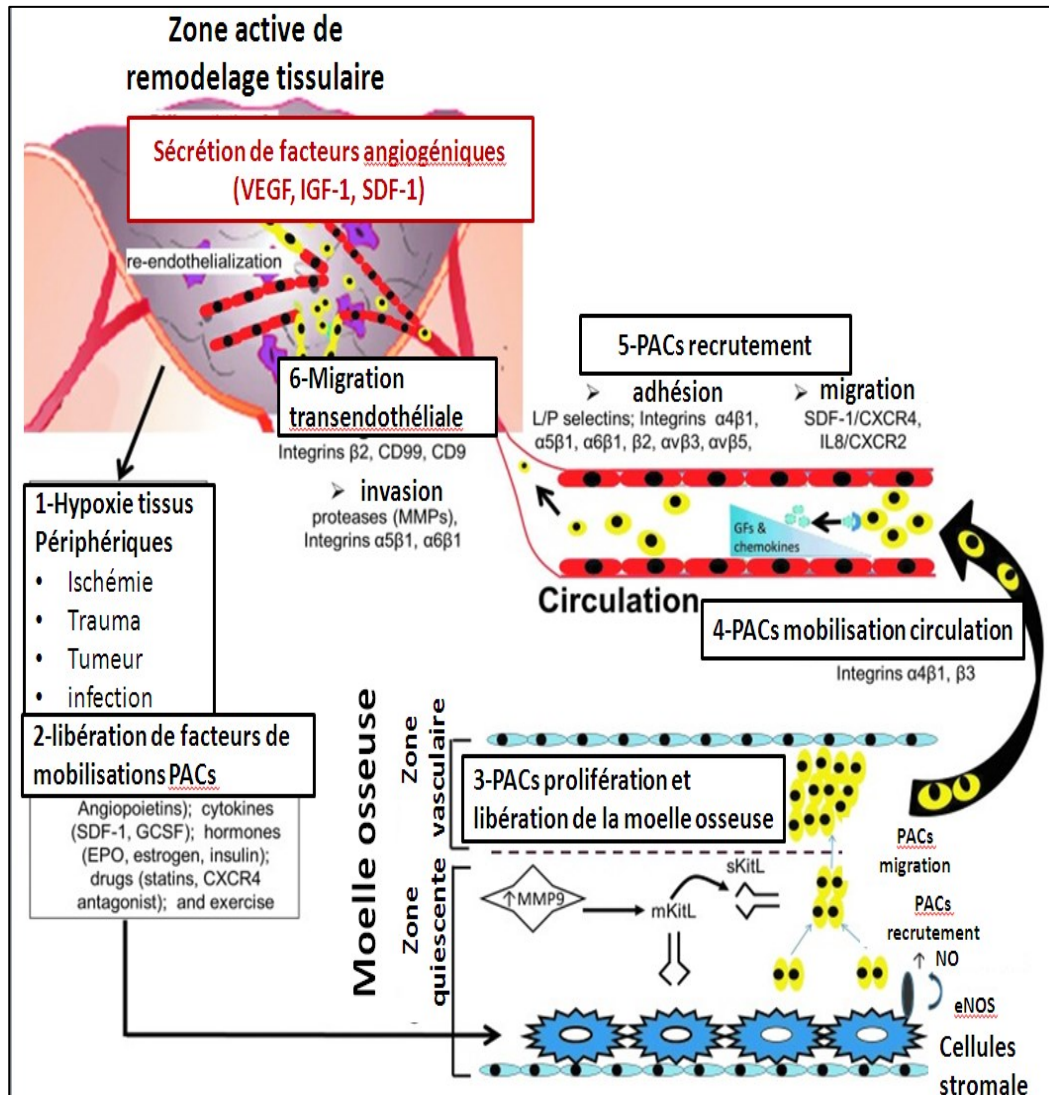


Figure 28. Étapes chronologiques de la mobilisation des PACs aux sites de néovascularisation. Détails dans le texte. Figure adaptée de : (Balaji et al. 2013)

6.2.3. Mécanismes de mobilisation périphérique des PACs : rôle du VEGF et du SDF-1

En condition physiologique les PACs sont en état de quiescence, localisés dans la moelle osseuse et formant une niche. Ils sont retenus dans la moelle osseuse par adhésion aux cellules stromales via des intégrines (Lapidot, Dar, and Kollet 2005; Lapidot and Petit 2002). Lors d'une

condition ischémique, les PACs sont mobilisées vers la circulation périphérique par divers mécanismes qui inhibent leur rétention locale. Cette mobilisation est une étape initiale cruciale pour leur rôle dans la néovascularisation. Toutefois, les mécanismes précis sont encore mal compris. Au cours des dernières années, plusieurs molécules et conditions qui modulent la mobilisation des PACs ont été identifiées (**figure 28 et 29**). Les différentes études suggèrent que les deux principaux facteurs stimulant la mobilisation des PACs sont le VEGF et le SDF-1 (Herrmann, Verrier, and Alini 2015). L'importance du VEGF dans la mobilisation des PACs a été confirmée dans plusieurs études animales et humaines. Par exemple, il a été démontré que le VEGF augmente significativement la mobilisation et le nombre de PACs dans la circulation périphérique, améliorant ainsi la néovascularisation (Asahara, Takahashi, et al. 1999). Également, le VEGF stimule l'expression du G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) qui est impliqué dans la libération des PACs de la moelle osseuse (Bautz et al. 2000; Powell et al. 2005). Une autre fonction importante du VEGF est médiée par son interaction avec son récepteur VEGFR2 qui est présent sur les PACs. L'activation du VEGFR2 stimule la voie de signalisation PI3K/AKT/eNOS et entraîne la production de NO (Cheng, Jiang, et al. 2013). Comme il a été décrit à la section précédente, le NO permet l'activation de la MMP-9 favorisant ainsi le relargage de sKitL et stimulant la mobilisation des PACs (Tilling, Chowienzyk, and Clapp 2009). Le SDF-1 (stromal cell-derived factor-1) joue également un rôle clé dans la régulation de la mobilisation des PACs. En plus d'induire leur libération de la moelle osseuse, le SDF-1 stimule l'adhésion et la migration des PACs vers les sites ischémiques. L'expression du SDF-1 est augmentée en condition d'ischémie et lors de l'inflammation (Ceradini et al. 2004; Tilling, Chowienzyk, and Clapp 2009). L'interaction du SDF-1 au récepteur CXCR4, présent à la surface des PACs, active des cascades de signalisations intracellulaires impliquées dans la mobilisation, le recrutement et l'intégration des PACs aux sites ischémiques (Askari et al. 2003; Tilling, Chowienzyk, and Clapp 2009). Le mécanisme de mobilisation NO/MMP-9/KitL dépendant est illustré à la **figure 29**.

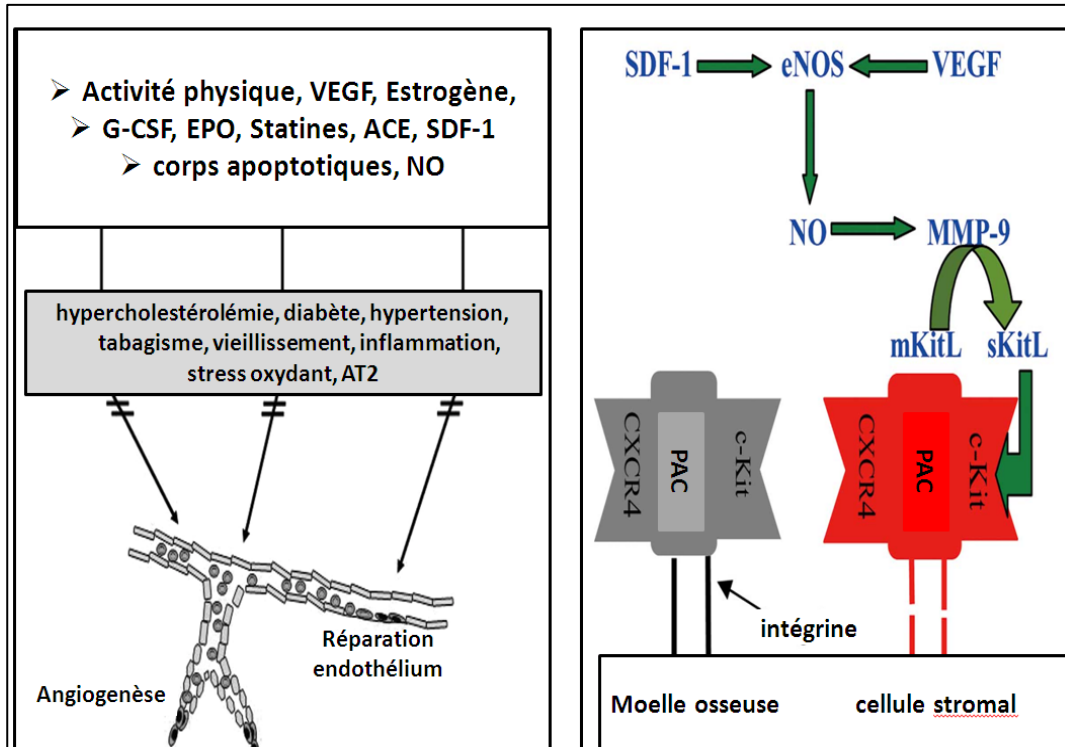


Figure 29. La mobilisation des PACs. Différents facteurs vont affecter positivement (rectangle blanc) ou négativement (rectangle gris) la mobilisation des PACs (image de gauche). Principal mécanisme permettant la libération des PACs de la moelle osseuse (image de droite). Les PACs sont retenues dans la moelle osseuse aux cellules stromal par des intégrines. Le NO stimule la libération des PACs dans un mécanisme dépendant de la MMP-9 qui agit en clivant le KitL membranaire (mKitL) à la surface des PACs générant ensuite le KitL soluble (sKitL). Le sKitL active ensuite le récepteur c-Kit à la surface des PACs stimulant leurs mobilisations. Figure adaptée de : (Li et al. 2012; Werner and Nickenig 2006)

6.2.4. Recrutement des PACs aux tissus ischémiques : migration, adhésion et invasion

Les PACs mobilisées en circulation devront être recrutées, puis migrer et adhérer aux structures vasculaires afin de contribuer à la néovascularisation. L'attraction et la migration des PACs sont principalement médiées par des chimiokines. Ces petites molécules agissent en

créant des gradients de concentration élevés dans les zones ischémiques, permettant ainsi l'attraction des PACs à des endroits spécifiques. Les chimiokines sont une famille de cytokines capable d'attirer des cellules vers des sites précis. Le SDF-1 est la plus puissante chimiokine impliquée dans la migration des PACs. En effet, la formation d'un gradient de concentration élevé de SDF-1 en périphérie des sites ischémiques permet aux PACs de migrer vers ces sites (Ceradini et al. 2004). Le récepteur CXCR4 est le récepteur prédominant du SDF-1 et est exprimé sélectivement par les ECs et les PACs (Gupta et al. 1998; Ceradini et al. 2004). Plusieurs études ont démontré que le niveau de SDF-1 est augmenté dans les tissus ischémiques, agissant ainsi comme un signal de recrutement pour les PACs (Lapidot 2001; Kucia et al. 2005; Peplow 2014). Une autre fonction importante du SDF-1 dans la migration des PACs est l'activation de la voie PI3K/AKT/eNOS et la génération du NO (Zheng et al. 2007). Également, d'autres molécules comme l'IL-6, le MCP-1 et les facteurs de croissance VEGF et G-CSF stimulent la migration des PACs vers les sites ischémiques (Rennert et al. 2012; Fan et al. 2008).

Une fois arrivées aux régions ischémiques, les PACs doivent adhérer et pénétrer la monocouche endothéliale. Le processus implique un roulement des PACs sur l'endothélium, leurs adhésions et une transmigration à travers l'endothélium pour atteindre le tissu ischémique. Le roulement des PACs est assuré par des sélectines (E-sélectine et P-sélectines) exprimées à la surface des ECs. Les sélectines forment des liaisons de faible affinité avec le PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) présent sur les PACs (Nishiwaki et al. 2007; Oh et al. 2007). L'arrêt du roulement et l'adhésion ferme des PACs à l'endothélium seront ensuite médiés par des intégrines exprimées par les PACs. Les intégrines vont former des liaisons de forte affinité avec des molécules d'adhésions présentes sur la surface des ECs (VCAM-1 et ICAM-1). Parmi les interactions les plus importantes entre les sous-unités d'intégrines et les récepteurs endothéliaux, nous retrouvons la sous-unité d'intégrine Beta-2 (β₂). La sous-unité β₂ est exprimée par les PACs et possède une forte affinité pour ICAM-1 exprimée par les ECs. En effet, il a été documenté que la β₂ favorise l'adhésion des PACs aux ECs lors d'une ischémie via ICAM-1 (Caiado and Dias 2012). Parmi les autres mécanismes permettant l'adhésion des PACs, nous retrouvons l'interaction de l'intégrine α₄β₁ liant VCAM-1 et la fibronectine de la membrane endothéliale (Jin et al. 2006). Une fois adhérentes, les PACs vont migrer et pénétrer à travers l'endothélium par diapédèse entre les différentes jonctions cellules-cellules ou au travers

des ECs (Muller 2015). Les PACs ayant traversé l'endothélium vont migrer dans la MEC interstitielle pour atteindre les structures d'injures ou ischémiques. L'invasion des PACs dans l'espace interstitiel est médiée par différentes MMPs qui vont décomposer et remodeler les composantes de la MEC et de la membrane basale permettant le passage des PACs jusqu'à leurs destinations finales (Caiado and Dias 2012). Les principales MMPs impliquées dans l'invasion des PACs sont la MMP-9 et la MMP2 (Balaji et al. 2013; Muller 2015). Finalement, les PACs arrivées aux sites de néovascularisation vont exercer leurs fonctions par incorporation directe des néovaisseaux (rare) ou plus souvent par actions paracrines (Caiado and Dias 2012).

6.2.5. Contribution des PACs à la néovascularisation post-ischémique et potentiel thérapeutique pour les maladies cardiovasculaires

Les ECs matures possèdent une capacité de prolifération limitée et ne peuvent à elles seules assurer une néovascularisation de grande envergure en réponse à une ischémie sévère (Jujo, Ii, and Losordo 2008). Il est maintenant connu que les PACs participent activement aux processus de régénération vasculaire en jouant un rôle de support qui permet à l'organisme de faire face à différentes conditions. Suite à une ischémie, les PACs participent principalement de façon indirecte à la néovascularisation (Asahara, Masuda, et al. 1999b; Jujo, Ii, and Losordo 2008). En effet, les PACs participent à la néovascularisation en sécrétant divers facteurs cytoprotecteurs et pro-angiogéniques (Jujo, Ii, and Losordo 2008). De plus, il a été démontré que les PACs qui migrent vers les tissus ischémiques n'intègrent pas toujours les structures vasculaires et peuvent rester dans l'espace interstitiel et sécréter diverses molécules (VEGF, HGF, ANG-1, SDF-1, IGF-1 et le NO) stimulant l'angiogenèse des ECs à proximité (Hoeben et al. 2004a; Urbich et al. 2005). Les fonctions des PACs dans la néovascularisation sont illustrées à la **figure 28**.

L'efficacité de divers traitements basés sur l'administration de PACs pour stimuler la néovascularisation post-ischémique a été démontrée dans de nombreuses études pré-cliniques. En effet, dans divers modèles animaux ischémiques, une transplantation de PACs cultivées *ex vivo* permet d'augmenter significativement la densité capillaire et le débit sanguin dans les tissus présentant une néovascularisation insuffisante (Asahara, Kawamoto, and Masuda 2011). Collectivement, plusieurs autres études *in vivo* ont confirmé qu'une approche thérapeutique

basée sur l'expansion ex vivo de PACs pré-conditionnées est bénéfique pour stimuler la néovascularisation. Par exemple, une administration systémique de PACs stimulées par divers agents angiogéniques, permet d'améliorer la néovascularisation et la régénération des tissus ischémiques cardiaques, cérébraux et des membres inférieurs (Asahara, Kawamoto, and Masuda 2011). Historiquement, la première transplantation de PACs dans un contexte de néovascularisation a été reportée au début des années 2000 par Kalka et ses collègues. Le groupe a transplanté des PACs provenant de la moelle osseuse humaine chez la souris avec une ischémie de la patte. Les résultats obtenus suggéraient pour la première fois que l'administration exogène de PACs pouvait améliorer la néovascularisation post-ischémique (Kalka et al. 2000). Plusieurs essais cliniques tentent maintenant d'évaluer les effets thérapeutiques des PACs observés chez l'animal, mais aussi par la par transplantation systémique et locale chez l'humain de différents sous-types de cellules ayant des actions bénéfiques sur la réparation tissulaires. Avant 2012, une douzaine d'études cliniques impliquant une transplantation de divers sous-types de PACs (différents marqueurs cellulaires associés aux PACs) dérivées de la moelle osseuse chez des patients atteints de diverses pathologies cardiovasculaires avaient été publiées (Caiado and Dias 2012). Collectivement, ces différentes études ont démontré des effets bénéfiques. Par exemple, une étude de 121 patients présentant une ischémie cardiaque chronique a démontré de bons résultats. En effet, une réduction de différents marqueurs plasmatiques associés à l'insuffisance cardiaque et une réduction de la mortalité globale a été observée chez les patients transplantés avec des PACs injectées de façon intracoronarienne (Assmus et al. 2007). D'autres études chez des patients atteints d'infarctus du myocarde ont démontré des effets bénéfiques par l'utilisation de PACs. Dans l'ensemble, une diminution de la taille de l'infarctus et une augmentation de la fraction d'éjection du ventricule gauche ont été observées (Schachinger et al. 2004; Katritsis et al. 2005; Erbs et al. 2005). Également, une étude de 167 patients atteints d'angine réfractaire a démontré qu'une injection intracardiaque de cellules circulantes CD34 positif augmente la tolérance des patients à l'exercice (Losordo et al. 2011). Finalement, une injection intramusculaire de cellules circulantes CD34 et CD133 positif augmente la perfusion aux tissus ischémique chez des patients présentant une ischémie critique des membres inférieurs (Lara-Hernandez et al. 2010). Malgré ces succès, les études sur l'application thérapeutique des PACs comportent certaines limitations causées par plusieurs facteurs hétérogènes (absence de contrôle approprié, sous-

types variées de PACs, voie de livraison utilisée, dose, fréquence et biodistribution). Toutes ces variables rendent difficiles les comparaisons entre les différentes études (Napoli et al. 2011). Par contre, les différentes études suggèrent que l'injection locale intramusculaire est potentiellement supérieure à l'injection systémique. En effet, une meilleure biodistribution et un taux de survie supérieur des PACs ont été observés (Muller-Ehmsen et al. 2006; Aicher, Brenner, et al. 2003). Finalement, l'historique médical des patients est une variable importante associée à la limitation du succès de transplantation autologue de PACs. En fait, la plupart des patients ayant recours à ce type de transplantation sont des patients présentant des facteurs de risques cardiovasculaires (vieillesse, diabète, hypercholestérolémie et tabagisme) qui pourraient inhiber l'activité fonctionnelle des PACs (Asahara, Kawamoto, and Masuda 2011). Dans cette optique, le préconditionnement de PACs ex vivo afin de stimuler leur nombre et leur activité fonctionnelle devient un axe de recherche prometteur. Collectivement, malgré les résultats bénéfiques obtenus par la thérapie cellulaire sur la néovascularisation, les effets cliniques et les mécanismes associés à la thérapie par les PACs n'est pas encore totalement clairs et requiert une poursuite de la recherche avec des essais cliniques contrôlés de grande envergure.

6.3. L'artériogénèse

L'artériogénèse réfère à la croissance, à l'élargissement et au remodelage des artérioles collatérales préexistantes en artères collatérales fonctionnelles. Il s'agit d'un processus compensatoire permettant de maintenir le flot sanguin des tissus face à une sténose ou à une occlusion artérielle (Schaper and Buschmann 1999). L'artériogénèse est un processus distinct de l'angiogénèse et implique des mécanismes et facteurs artériogéniques différents (**figure 30**). Les artérioles préexistantes impliquées dans la formation d'artères collatérales sont en majorité localisées au niveau coronaire et périphérique (membres inférieures) (Carmeliet 2000). Historiquement, ce n'est qu'en 1971 qu'il a été démontré que les artérioles collatérales préexistantes pouvaient se développer en collatérales artérielles de large calibre dans un mécanisme indépendant d'une simple vasodilatation (Schaper, De Brabander, and Lewi 1971). Par la suite, plusieurs études ont rapporté démontré l'importance vitale de la croissance d'artères collatérales suite à l'infarctus du myocarde, confirmant leurs rôles protecteurs dans la survie des tissus ischémiques (Blanke et al. 1985; Habib et al. 1991; Nohara et al. 1983).

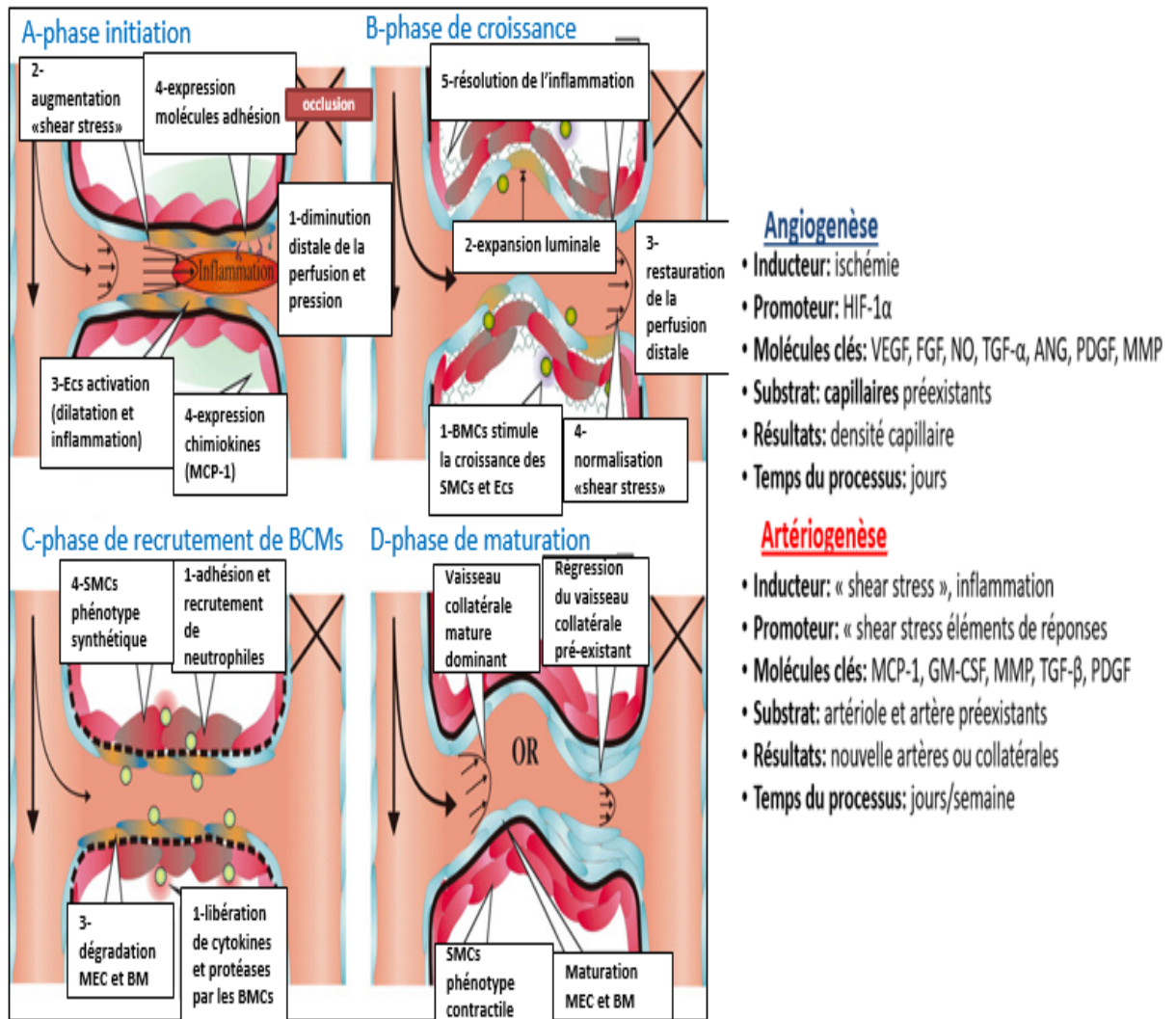


Figure 30. Mécanismes de l'artériogenèse. Phases et processus impliqués dans l'artériogenèse en réponse à une occlusion artérielle (figure de gauche) et principales différences avec l'angiogenèse (figure de droite). Figure adaptée de : (Buschmann and Schaper 1999; Meisner and Price 2010)

6.3.1. Rôle des forces mécaniques et des monocytes dans l'artériogenèse

Contrairement à l'angiogenèse, l'hypoxie n'est pas le facteur stimulateur clé pour l'artériogenèse. En effet, il est connu que les artères collatérales peuvent se développer dans des régions non ischémiques (Ito et al. 1997). Ce phénomène peut être observé chez les patients

avec des pathologies des artères périphériques dont les artères collatérales sont retrouvées loin des territoires ischémiques (Ito et al. 1997). L'artériogénèse est stimulée mécaniquement par des forces de cisaillement (shear stress). Plusieurs études ont confirmé une augmentation du diamètre artériel suite à une élévation du shear stress de la paroi permettant un équilibre des forces mécaniques appliquées (Zarins et al. 1987; Kamiya and Togawa 1980). Aussi, la formation d'artères collatérales est causée par la baisse de pression artérielle en aval d'une sténose ou d'une occlusion. Cela a pour conséquence d'induire une redistribution du flot sanguin et d'augmenter la pression dans les artéριοles préexistantes favorisant la croissance collatérale (Schaper and Pasyk 1976). Parmi les mécanismes, une activation marquée de l'endothélium par le shear stress menant à l'expression de récepteurs endothéliaux impliqués dans l'adhésion de monocytes est observée (Resnick and Gimbrone 1995; Gimbrone, Nagel, and Topper 1997). Parmi les différents facteurs impliqués, le MCP-1 joue un rôle clé dans l'artériogénèse. Il permet l'attraction et l'adhésion des monocytes et leur transformation en macrophages par le GM-CSF, ce qui est une étape nécessaire dans l'artériogénèse (Schirmer et al. 2004; Buschmann et al. 2001). En effet, les macrophages vont sécréter de multiples cytokines et facteurs de croissance impliqués dans le processus artériogénique (figure 6.14). Parmi les autres facteurs, le TNF- α promeut l'environnement inflammatoire local permettant aux vaisseaux collatéraux de se développer. Le b-FGF agit comme agent mitogène pour les ECs et les SMCs. Les MMPs permettent le remodelage de la structure de l'artère créant un espace pour l'expansion collatérale (Arras, Strasser, et al. 1998; Arras, Ito, et al. 1998). Collectivement, les différentes études suggèrent que le MCP-1 et le GM-CSF sont les 2 facteurs les plus importants pour l'artériogénèse et que leurs effets seraient synergiques. Par exemple, il a été documenté dans un modèle de souris de ligature fémorale que l'administration d'une combinaison de MCP-1 et GM-CSF augmente de 40 % la récupération du flot sanguin après une semaine seulement (van Royen et al. 2001).

6.3.2. Changement morphologique observé durant l'artériogénèse

Lors de l'artériogénèse, plusieurs changements morphologiques sont observés. Un des premiers changements est l'activation des ECs par le shear stress en réponse à une occlusion artérielle. L'endothélium activé va acquérir un phénotype caractérisé par une augmentation du nombre de mitochondries et une perte du contrôle de son volume menant à son expansion. Nous

observons également une dégradation de la limitante élastique interne facilitant le trafic des monocytes et SMCs dans la paroi vasculaire (Scholz et al. 2000). Un nombre élevé de divisions mitotiques des ECs et des SMCs est observé. Les différentes études suggèrent que le taux d'expansion des artères collatérales nouvellement formées est variable selon l'emplacement et l'espèce animale. Par exemple, ce taux d'expansion peut être jusqu'à 20 fois chez les modèles canins, 10 fois chez le lapin et 2 fois chez la souris (van Royen et al. 2001).

6.4. Influence des facteurs de risques cardiovasculaires sur la néovascularisation

En condition d'ischémie, la sévérité des dommages aux tissus dépend grandement de la capacité physiologique des individus à former de nouveaux vaisseaux. Il est maintenant connu que cette capacité de néovascularisation est diminuée par plusieurs phénotypes pathologiques liés au développement de l'athérosclérose, comme le stress oxydant, l'inflammation soutenue et la dysfonction endothéliale (Lin et al. 2013; Cai and Harrison 2000b; Silvestre, Smadja, and Levy 2013). Toutefois, les mécanismes moléculaires liant le stress oxydant et l'inflammation dans l'inhibition de la néovascularisation demeurent encore mal compris (Lam 2016; Lin et al. 2013). Ces deux phénotypes sont communs aux différents facteurs de risques cardiovasculaires incluant le tabagisme, l'hypercholestérolémie, l'hypertension et le vieillissement (Willerson and Ridker 2004a; Mansego et al. 2011; Fandos et al. 2009; Reverri et al. 2014). Récemment, plusieurs études ont démontré dans des modèles animaux que les facteurs de risques cardiovasculaires causent une défaillance de néovascularisation suite à l'ischémie. Parmi les mécanismes proposés, les différentes études suggèrent que l'augmentation du stress oxydant serait associée à une diminution de la production de facteurs angiogéniques importants (ex. VEGF, NO), mais aussi à une réduction du nombre et de l'activité fonctionnelle des PACs (Desjarlais et al. 2017a; Dhahri et al. 2017; Michaud et al. 2003; Rivard et al. 1999; Lefevre et al. 2007; Turgeon et al. 2012; Groleau et al. 2011). Globalement, les facteurs de risques cardiovasculaires moduleraient différentes voies de signalisations intracellulaires impliquées dans l'angiogenèse et la vasculogenèse (Silvestre, Smadja, and Levy 2013). Toutefois, les mécanismes moléculaires précis sont mal connus. Les sections suivantes visent à mieux définir

les évidences cliniques et pré-cliniques démontrant les effets délétères de l'hypercholestérolémie et du stress oxydant sur la néovascularisation.

6.4.1. Effet délétère de l'hypercholestérolémie et du stress oxydant sur la néovascularisation

Au cours des dernières années, notre laboratoire a démontré dans un modèle murin d'ischémique de la patte que l'hypercholestérolémie diminue la néovascularisation (Haddad et al. 2011; Desjarlais et al. 2017a; Lefevre et al. 2007). Ces études ont démontré que la défaillance de néovascularisation est associée à une diminution de la densité capillaire, à une augmentation du stress oxydant, à une diminution du nombre et de l'activité angiogénique des PACs. De plus, *in vitro*, les ECs exposées à l'oxLDL présentent une capacité angiogénique réduite causée en partie par une augmentation du stress oxydant. D'un point de vue moléculaire, l'hypercholestérolémie et les oxLDL inhibent l'expression d'importants facteurs angiogéniques comme le VEGF et l'eNOS diminuant la capacité de migration, de survie et la formation de tubule des ECs. D'autre part, l'inhibition d'eNOS diminue la biodisponibilité du NO, un important médiateur impliqué dans la mobilisation des PACs vers les sites ischémiques. L'importance du stress oxydant dans le mécanisme délétère de l'hypercholestérolémie sur la néovascularisation a aussi été documentée dans nos études. En effet, les souris hypercholestérolémiques KO pour le gène NOX2, un générateur important de ROS, ont montré une meilleure récupération de leur capacité de néovascularisation (Haddad et al. 2011). Nos études ont également démontré qu'une consommation de substance antioxydante (vin rouge, vitamines ou probucol) permet d'améliorer la néovascularisation dans une condition de stress oxydant élevé (Turgeon et al. 2010; Lefevre et al. 2007).

D'autres études animales ont aussi confirmé que l'hypercholestérolémie inhibe la néovascularisation dans différentes pathologies (Sasaki et al. 2003; Jang et al. 2000; Boodhwani et al. 2006). L'impact de l'hypercholestérolémie sur l'angiogenèse est également observé chez patients hypercholestérolémiques atteints d'un cancer qui présentent une réduction des facteurs de croissance bFGF et VEGF (Ozdemir, Akcali, and Haberal 2004). Également, l'hypercholestérolémie et les oxLDL sont des conditions liées à la dysfonction des ECs et à la

diminution de leur capacité angiogénique (Chen et al. 1997; Pirillo, Norata, and Catapano 2013a; Henry, Cabello, and Chen 1995). De façon importante, d'autres études ont démontré que les oxLDL diminuent l'expression du VEGFR2 et inhibent la signalisation VEGFR2-dépendante (Zhang and Jiang 2016). Le VEGFR2 est le récepteur le plus important dans l'angiogenèse puisqu'il est impliqué dans tous les processus angiogéniques clés (prolifération, migration, survie, formation de tube, etc.) (Shibuya 2011). Il est aussi documenté que l'hypercholestérolémie affecte le nombre et l'activité fonctionnelle des PACs qui participent à la néovascularisation postnatale (Aragona et al. 2016; Ivanova et al. 2010; Chen et al. 2004). Chez l'humain, les cellules VEGFR2/CD34 positives isolées du sang de patient hypercholestérolémique ont une capacité de prolifération et de migration défailante *in vitro* (Chen et al. 2004). Il est important de mentionner que le même phénomène est observé chez les patients présentant d'autres facteurs de risques cardiovasculaires comme le tabagisme, l'âge, l'hypertension et le diabète (Aragona et al. 2016). Des résultats similaires ont été obtenus *in vitro* par la culture de PACs exposé à l'oxLDL. En effet, l'oxLDL induit la dysfonction des PACs par une augmentation de stress oxydant. Cette défaillance est caractérisée par une augmentation de leur sénescence, de l'apoptose et de leur capacité à participer aux processus de néovascularisation et de réparation post-ischémique (Huang, Chen, and Lin 2014a; Aragona et al. 2016). Les oxLDL réduisent aussi la production par les PACs de NO, un facteur qui est important pour la survie, la migration et la prolifération des ECs (Ma et al. 2006). L'importance de l'hypercholestérolémie comme modulateur de la néovascularisation a aussi été confirmée par l'utilisation de divers agents hypocholestérolémifiants. Par exemple, une étude a démontré que la modulation du taux de LDL cholestérol chez des patients hypercholestérolémiques était directement corrélée au nombre de PACs circulants. De façon intéressante, les patients traités à la rosuvastatine ont démontré une augmentation de 72 % des PACs circulants (Pirro et al. 2009). Une thérapie aux statines *in vivo* permet de diminuer le stress oxydant et l'inflammation, d'augmenter la production de NO et la mobilisation de PACs aux sites ischémiques (Sandhu, Mamas, and Butler 2017). Finalement, il a été documenté que l'hypercholestérolémie est associée à une diminution de l'artériogenèse et de la croissance d'artères collatérales (de Groot, Pasterkamp, and Hoefler 2009; van Weel et al. 2006; Tirziu et al. 2005). La **figure 31** résume les principales actions délétères des facteurs de risques cardiovasculaires sur la néovascularisation.

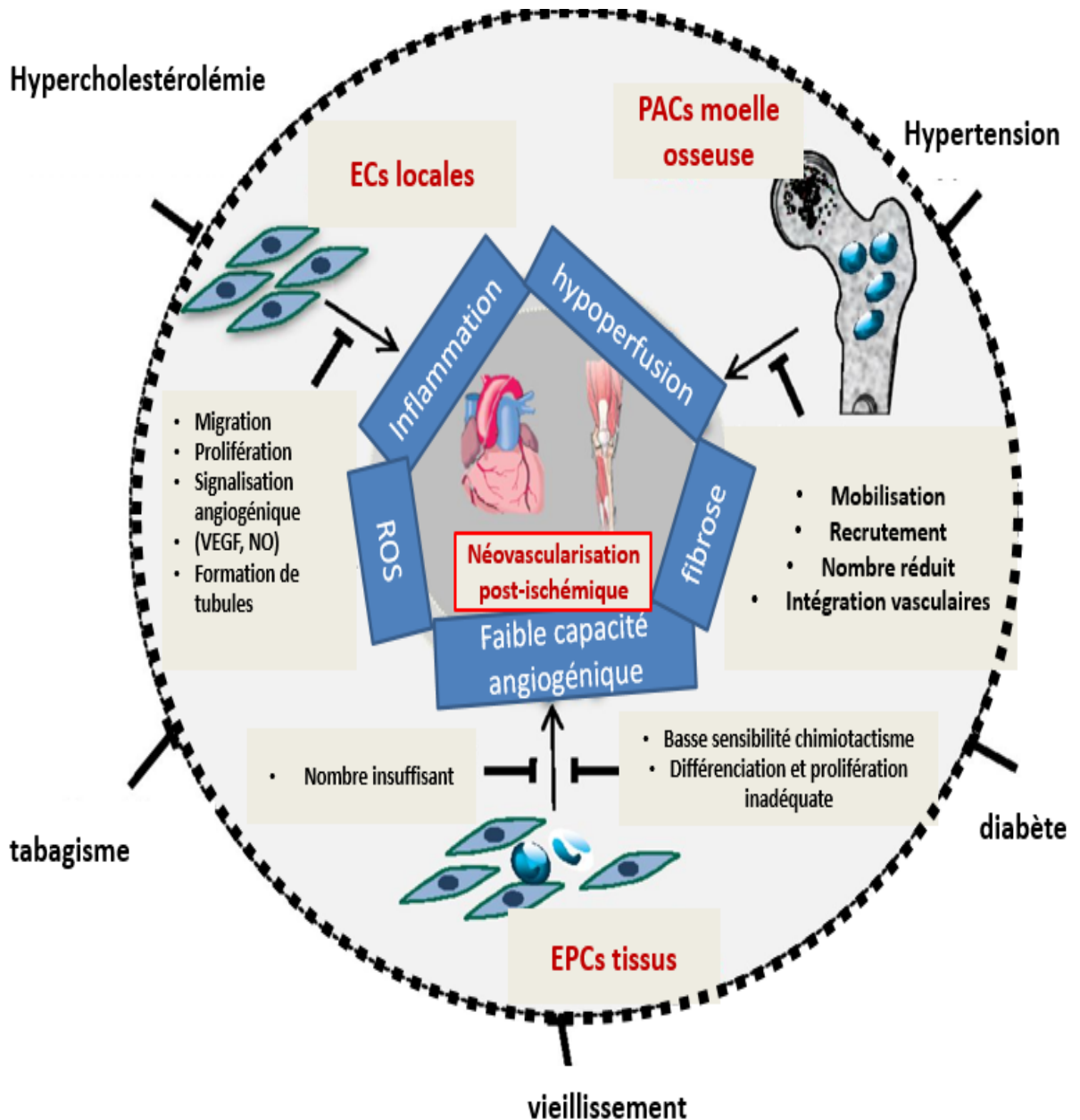


Figure 31. Effets délétères des facteurs de risques de l'athérosclérose sur la néovascularisation post-ischémique. Figure adaptée de : (Silvestre, Smadja, and Levy 2013)

6.4.2. Double influence de l'inflammation sur la néovascularisation

Au cours des chapitres précédents, il a été démontré que l'inflammation est une composante pathologique importante impliquée dans le développement de la dysfonction endothéliale, de l'athérosclérose et des maladies cardiovasculaires en général. L'inflammation

est une caractéristique commune aux différents facteurs de risques cardiovasculaires (Roifman et al. 2011; Libby 2012; Steyers and Miller 2014). Par contre, tout comme le stress oxydant, l'inflammation à un niveau physiologique contribue à la néovascularisation de différentes façons. Par exemple, suite à l'hypoxie, HIF1a induit la synthèse de différents médiateurs inflammatoires permettant de recruter des cellules immunes (monocytes, macrophages, lymphocytes T et neutrophiles) aux sites ischémiques. Ces différentes cellules vont sécréter à leur tour de multiples facteurs pro- ou anti-angiogéniques qui vont agir sur la fonction angiogénique des ECs. Par exemple, ces facteurs vont stimuler ou inhiber la prolifération et la migration des ECs, mais aussi influencer la mobilisation des PACs aux sites ischémiques. L'inflammation et l'angiogenèse sont souvent associées dans un processus complexe et leur action sur l'environnement local dépendent d'une balance entre les régulateurs positifs et les régulateurs négatifs (Naldini and Carraro 2005; Silvestre et al. 2008). À titre d'exemple, il existe une grande hétérogénéité des différents sous-types de macrophage (M1 vs M2), de neutrophiles (N1 vs N2) et d'autres cellules inflammatoires ayant des fonctions inverses sur l'angiogenèse. L'inflammation peut donc moduler positivement et/ou négativement la néovascularisation selon le contexte, le sous-type de cellules inflammatoires impliqué et selon l'intensité et la prolongation de la réponse inflammatoire (Das et al. 2015; Zajac et al. 2013; Fridlender et al. 2009). L'hypercholestérolémie est associée à une intensité inflammatoire importante liée à la dysfonction des ECs et des PACs, ainsi qu'à l'augmentation du stress oxydant systémique (Hong et al. 2015; Issan et al. 2013; Castellon and Bogdanova 2016). De façon intéressante, des études ont démontré par des traitements avec différents agents anti-inflammatoires qu'il est possible de récupérer l'activité fonctionnelle des PACs et des ECs en présence de facteurs de risque cardiovasculaires (Huang et al. 2017; De Toni et al. 2015; Spigoni et al. 2012; Liu, Qi, et al. 2013). Par contre, le rôle précis de l'inflammation dans la réponse de néovascularisation post-ischémique en condition hypercholestérolémique n'est pas bien connu.

6.4.3. L'activation chronique du système rénine-angiotensine (RAS) est associée à une défaillance de néovascularisation : ambiguïté et controverse

L'activation chronique du système RAS, notamment en condition d'hypertension, forme une boucle pathologique liant la dysfonction endothéliale, l'inflammation et le stress oxydant (Volpe et al. 2002). L'hypercholestérolémie, le diabète et le tabagisme sont également

directement associés à une augmentation de l'activité du système RAS, et également de façon indirecte étant eux-mêmes souvent liés à l'hypertension (Delgado et al. 2016; Peti-Peterdi, Kang, and Toma 2008; Daugherty et al. 2008). Comme il a été discuté au chapitre 2, le système RAS et en particulier l'Ang2 et l'AT1 contribuent à diverses pathologies cardiovasculaires ainsi qu'à la dysfonction endothéliale. En effet, l'AT1 est lié à la vasoconstriction, la production de ROS, l'induction de médiateurs inflammatoires et l'athérosclérose (Volpe et al. 2002). Également, l'activation chronique du système RAS est associée à une réduction de la récupération du débit sanguin suite à une ischémie et à une réduction du nombre et de l'activité fonctionnelle des PACs (Imanishi, Hano, and Nishio 2005; Fabre et al. 1999).

Plusieurs études cliniques ont démontré que l'inhibition pharmacologique du système RAS, par des ACEI ou des ARB, est bénéfique sur le système cardiovasculaire. En effet, une diminution de la mortalité, des problèmes cardiaques et des événements ischémiques chez les patients atteints de diverses pathologies cardiovasculaires (hypertension sévère, ischémie des membres inférieurs, infarctus du myocarde, insuffisance cardiaque, etc.) est observée (Volpe et al. 2002). Chez l'animal, les différentes études suggèrent que l'utilisation d'antagonistes du système RAS augmente la biodisponibilité du NO, diminue l'inflammation et le stress oxydant et améliore la fonction endothéliale (Husain et al. 2015; Matsumoto et al. 2014). Le rôle potentiel des ACEI et des ARB sur la modulation de la néovascularisation post-ischémique dans un contexte d'occlusion artérielle est controversé. Par exemple, des études ont démontré que l'utilisation d'ACEI améliore la néovascularisation post-ischémique et favorise la mobilisation de PACs (Sun et al. 2016; Sun et al. 2013; Fabre et al. 1999). D'autres études ont rapporté des résultats conflictuels sur l'angiogenèse montrant des effets pro- et anti-angiogéniques (Willis et al. 2011b). Au niveau clinique, l'efficacité des différents antagonistes du système RAS pour améliorer la fonction endothéliale reste très variable selon les études et en fonction des différents agents utilisés (Ruilope, Redón, and Schmieder 2007; Radenković et al. 2016). Une des raisons expliquant leur efficacité mitigée semble liée à la l'augmentation des niveaux plasmatiques de pro-rénine par un mécanisme de rétrocontrôle (Ma et al. 2010b). Récemment, il a été documenté que l'aliskiren, le seul inhibiteur direct de la rénine utilisé en clinique, permet de contrer ce problème. En effet, en plus d'inhiber à long terme l'activité de la rénine plasmatique, l'aliskiren inhibe la formation d'Ang2 (Pacurari et al. 2014). De plus, l'aliskiren possède des propriétés

bénéfiques similaires ou supérieures aux ARB et aux ACEI sur la fonction endothéliale, le stress oxydant, l'inflammation et l'athérosclérose (Imanishi et al. 2008; Lu, Rateri, Feldman, Charnigo, et al. 2008; Pacurari et al. 2014). Toutefois, l'impact de l'inhibition directe de la rénine par l'aliskiren sur la néovascularisation dans un contexte d'occlusion vasculaire et d'ischémie tissulaire est inconnu.

6.5. Efficacité des stratégies thérapeutiques de néovascularisation : études cliniques et animales

Lorsque l'athérosclérose est trop diffuse et que les interventions de revascularisation ne sont plus envisageables, la néovascularisation thérapeutique pourrait devenir une option intéressante. De nombreuses études chez l'animal ont démontré avec succès qu'il est possible de stimuler à la fois l'angiogenèse, la vasculogenèse et l'artériogenèse par diverses approches de biologie moléculaire. Ces différentes stratégies incluent l'utilisation de facteurs de croissance, la thérapie génique et cellulaire, ainsi que diverses approches pharmacologiques. D'un point de vue clinique, plusieurs essais ont offert des résultats prometteurs dans le traitement de diverses pathologies ischémiques par l'angiogenèse thérapeutique (Ng and D'Amore 2001b). L'objectif de la thérapie angiogénique est non seulement de stimuler la formation de vaisseaux sanguins, mais aussi de le faire en évitant les effets secondaires potentiels. Parmi les essais cliniques qui sont les plus documentés, nous retrouvons l'utilisation de facteurs de croissance comme le VEGF et le FGF sous plusieurs formes. L'administration de facteurs de croissance peut être effectuée sous forme de protéine ou par des vecteurs géniques codants pour la protéine. La thérapie cellulaire est également bien documentée au niveau clinique. Elle consiste à injecter de façon locale ou systémique différents types de cellules (ex. EPCs et PACs) préconditionnées ou non. Dans les deux cas, le but est d'induire une réponse angiogénique au niveau des tissus ischémiques par la libération de signaux paracrins. L'administration de cellules et de gènes codants est complexe et nécessite une libération contrôlée, une dose adéquate et un signal biologique maintenu au niveau temporel et spatial. Dans une situation idéale, les systèmes de libérations doivent permettre une biodistribution progressive dans le temps (jours/semaines) et aussi cibler des tissus et/ou cellules spécifiques. Plusieurs études sont en cours afin d'optimiser ces aspects thérapeutiques. Par exemple, des

études se concentrent sur l'optimisation de différents vecteurs polymères biodégradables, capables de contrôler la libération sur de longues périodes tout en évitant de causer de l'inflammation. Un des principaux problèmes au niveau de l'efficacité de la thérapie angiogénique est lié à l'utilisation d'un seul facteur angiogénique pour stimuler et maintenir la réponse dans le temps. En effet, il est difficile d'obtenir à la fois une stimulation maximale angiogénique et de la maintenir sans excès. En effet, la néovascularisation nécessite plusieurs facteurs angiogéniques clés agissant sur des étapes précises de l'angiogenèse. Toutes ces étapes sont importantes dans la formation du vaisseau sanguin fonctionnel et stabilisé. Par exemple, l'utilisation de VEGF est efficace pour stimuler l'angiogenèse jusqu'à la formation de tubule, mais ces nouveaux tubules doivent ensuite être stabilisés sinon ils régressent en absence de PDGF. Dans cette optique, l'utilisation de stratégie combinant plusieurs facteurs angiogéniques maximise le potentiel thérapeutique (Deveza, Choi, and Yang 2012; Zachary and Morgan 2011; Silvestre, Smadja, and Levy 2013; Ng and D'Amore 2001b). Récemment, la découverte des micro-ARNs (miRs) a révolutionné la compréhension des mécanismes de régulation des processus biologiques physiologiques et pathologiques. Les miRs sont des ARNs non codants qui peuvent cibler de multiples gènes simultanément, réguler leur expression et ainsi moduler plusieurs processus biologiques (ex. : croissance, prolifération, migration, survie, apoptose, différenciation, etc.). De par leurs fonctions, les miRs représente donc de nouvelles cibles thérapeutiques prometteuse faisant l'objet de plusieurs études actuellement. Leurs rôles sera discuté au chapitre suivant.

6.6. Résumé de chapitre

Dans ce chapitre, il a été démontré que la néovascularisation chez l'adulte est médiée par 3 processus distincts et complémentaires : l'angiogenèse, la vasculogenèse et l'artériogenèse. Ces trois processus agissent de concert afin d'établir la formation d'un nouveau réseau vasculaire fonctionnel. Il a aussi été démontré que la formation de nouveaux vaisseaux capillaires est le résultat de l'angiogenèse, de la vasculogenèse et la contribution des PACs. Le principal stimulus de la néovascularisation est l'hypoxie. D'autre part, l'artériogenèse est induite par le «shear stress» causé par une occlusion artérielle et permet l'élargissement des artères et/ou la croissance d'artères collatérales. D'un point de vue moléculaire, l'angiogenèse est régulée par

un équilibre entre les facteurs pro- et anti-angiogéniques exerçant différents effets sur les ECs. Les différents facteurs angiogéniques agissent en activant des récepteurs endothéliaux impliqués dans plusieurs voies de signalisations associées aux différentes étapes du processus angiogénique. La néovascularisation postnatale implique la mobilisation et le recrutement de PACs aux sites ischémiques pouvant stimuler l'angiogenèse par leurs actions paracrines. Il a aussi été démontré que suite à une occlusion artérielle, la sévérité des dommages ischémiques dépend de la capacité de néovascularisation de l'organisme et que cette capacité est diminuée par les facteurs de risques de l'athérosclérose. Collectivement, ces différents facteurs ont en commun de créer un environnement pro-inflammatoire et pro-oxydant causant la dysfonction des ECs, mais aussi des PACs. De façon intéressante, il a été démontré qu'il est possible de récupérer la capacité de néovascularisation en traitant les facteurs de risques par différents agents pharmacologiques (hypocholestérolémiants, hypotenseurs, agents antioxydants et anti-inflammatoires, etc.). Également, plusieurs essais cliniques ont démontré qu'il est possible de stimuler la néovascularisation par diverses approches thérapeutiques incluant l'administration de facteurs de croissance et par la thérapie cellulaire. Le chapitre suivant discutera du rôle potentiel des miRs dans les maladies cardiovasculaires et dans la néovascularisation.

Chapitre 7. Les microARNs

7.1. Généralité

Les microARNs (miR ou miRNA) sont de petits ARNs simple brin non codant, de 20 à 22 nucléotides de long, capables de réguler négativement l'expression de plus de 60 % des gènes. Ils agissent en dégradant l'ARNm cible ou en inhibant sa traduction (Almeida, Reis, and Calin 2011). De par leurs fonctions régulatrices, ils sont impliqués dans tous les processus biologiques incluant le développement, la croissance, le métabolisme, la survie, l'apoptose, la réparation tissulaire, l'angiogenèse et l'inflammation (Ardekani and Naeini 2010; Gunaratne et al. 2010). Au cours de la dernière décennie, l'avancée des techniques de génomique et de bio-informatique a révolutionné la compréhension des miRs. En effet, leurs biogenèses, leurs mécanismes d'action et leurs rôles comme régulateurs de l'expression génique a fait l'objet de nombreuses études (Giza, Vasilescu, and Calin 2014). Historiquement, le premier miR a été découvert en 1993 par le groupe d'Ambros et impliquait l'identification du miR lin-4 dans un modèle de *C.elegans* (Almeida, Reis, and Calin 2011). Toutefois, ce n'est qu'une décennie plus tard que les rôles physiologiques et pathologiques des miRs furent investigués. En 2010, environ 2200 miRs chez le mammifère et plus de 1000 miRs chez l'humain ont été identifiés (Ardekani and Naeini 2010). Toutefois, l'identification de nouveau miRs semblent en constante évolution car en 2015, aproximativement 2500 miRs sont identifier chez l'humain (Friedländer et al. 2014). Il est maintenant admis que la modulation de l'expression des miRs par l'épigénétique joue un rôle important dans de multiples processus pathologiques (cancers, maladies cardiovasculaires, diabète, désordres cognitifs et infections virales). La compréhension du rôle des miRs dans les mécanismes pathologiques est présentement l'objet de multiples études. Les miRs représentent donc un intérêt potentiel en tant que nouveau biomarqueur et comme nouvelles stratégies thérapeutiques (Giza, Vasilescu, and Calin 2014). Avant d'aborder la biogenèse et les fonctions des miRs dans les diverses pathologies humaines, la section suivante vise à décrire les différents types d'ARNs non codant.

7.2. Les ARNs non codants : historique, différence et importance

Par définition les ARNs non codants (ARNnc), également connus sous le nom d'ARN non-messenger (ARNnm), sont une classe d'ARN provenant de la transcription qui n'est pas traduite en protéine par les ribosomes. Initialement considérés comme de l'ARN poubelle sans fonctions biologiques, il est maintenant reconnu que les ARNnc jouent un rôle clé dans la régulation des processus biologiques. En effet, les études scientifiques se sont longtemps concentrées sur la partie codante de l'ARN qui ne représente que 1 % du génome vs. 99 % pour les ARNnc (Yan and Wang 2012). Historiquement, c'est dans les années 1990 que les premiers ARNnc ont été découverts. Le premier ARNnc identifié est le H19. Il fut décrit de façon simpliste comme un ARN différent d'un ARN messenger et provenant d'un gène inhabituel (Brannan et al. 1990). Par la suite, les progrès technologiques ont permis l'émergence et la découverte de centaines d'ARNnc au moyen des données recueillies lors du projet de séquençage humain. En effet, les techniques modernes de séquençage d'ARN, les micropuces et la bio-informatique ont grandement contribué à l'identification de nouveaux ARNnc (Wang, Gerstein, and Snyder 2009). Au cours des dernières années, l'analyse de l'expression des différents ARNnc a grandement évolué avec le séquençage de deuxième génération (NSG) qui permet une analyse plus poussée de l'ARN. Également appelée « whole transcriptome shotgun sequencing », cette technologie permet d'identifier le contenu total d'ARN d'un échantillon et de déterminer la quantité de chaque séquence représentant un ARN spécifique, connu ou non. Cette technologie a l'avantage d'identifier de nouveaux ARNs contrairement à un « micro Array » qui est basé sur la complémentarité avec des séquences connues. La technologie NSG permet également d'étudier l'épissage alternatif du transcrit, la modification post-transcriptionnelle et la mutation de gènes (Pareek, Smoczynski, and Tretyn 2011; Wang, Gerstein, and Snyder 2009).

Il existe plusieurs types d'ARNnc répartis en deux grandes catégories : les ARNnc n'ayant pas de fonctions de régulation (ARN ribosomique, de transfert, intronique et nucléaire) et les principaux ARNs régulateurs (siARN, miR et lncARN) (Ling, Fabbri, and Calin 2013). Les ARNs régulateurs sont les plus importants dans le contrôle des processus biologiques et sont les plus étudiés (Ling, Fabbri, and Calin 2013). La principale fonction des ARNs

interférents (siRNA et miR) est de permettre l'extinction de l'expression d'un gène, de façon spécifique et sélective par appariement à une séquence complémentaire. Les siARNs et les miRs sont de taille similaire (20-25 nucléotides), mais ont une provenance différente. Les siARNs qu'on dit « exogènes » ne sont pas codés par le génome de leurs propres cellules contrairement aux miRs. En effet, les siARNs sont synthétisés *in vitro* ou *in vivo*, à partir de virus ou de séquences construites artificiellement par technologie génétique. Ils doivent donc être introduits dans la cellule par un vecteur. Les siRNA sont largement utilisés pour permettre l'inactivation spécifique d'un gène d'intérêt à étudier (Ling, Fabbri, and Calin 2013; Davis and Hata 2009; Ichim et al. 2004). Contrairement aux siARNs, les miRs représentent une classe d'ARNnc endogènes codés par leur propre génome et sont retrouvés dans la plupart des organismes multicellulaires. Jusqu'à présent, environ 2500 miRs ont été identifiés chez l'humain et certains sont conservés d'un point de vue évolutif. Ils sont maintenant reconnus comme des régulateurs post-transcriptionnels clés, régulant l'expression de plus de 60 % des gènes. Leur abondance et leur implication dans tous les processus cellulaires en font un sujet d'étude grandissant au niveau physiopathologique. Au cours de la dernière décennie, la modulation physiologique de l'expression des miRs a été associée à de multiples maladies (cancers, maladies cardiovasculaires, maladies génétiques et dégénératives) (Bajan and Hutvagner 2014; Giza, Vasilescu, and Calin 2014; Almeida, Reis, and Calin 2011). Leur importance pour l'homéostasie des systèmes biologiques fait en sorte que la modulation de leurs expressions physiologiques peut mener à des modifications phénotypiques majeures.

La dernière classe d'ARNnc est les ARNnc de longue taille (>200 nucléotides) appelée LncRNA (long non-coding RNA). Contrairement aux siARN et aux miRs, les LncRNAs sont peu connues, car leurs découvertes est plus récentes. Les LncRNA sont retrouvés en quantité plus abondante dans le génome que les petits ARNnc. Par contre, ils sont moins exprimés et plus difficilement détectables. Cela explique qu'il y ait moins d'études sur ce type d'ARN. Les LncARNs ont initialement été qualifiés de bruit de fond transcriptionnel par les chercheurs. En effet, leur identification dépendent à la fois de la haute qualité du transcrit, mais aussi de la précision des positions des sites de départ génomiques et de l'épissage des sites transcrits. Les variables associées à leur identification les rendent plus difficilement détectables que les petits ARNs interférents. De plus, ils possèdent des localisations subcellulaires, des niveaux

d'expressions et de stabilité très variés. Finalement, leurs modes de régulation est plus complexes que les miRs et les siRNA car ils agissent à la fois comme répresseur et stimulateur de l'expression génique (Ulitsky and Bartel 2013; Yan and Wang 2012).

D'un point de vue physiopathologique, les miRs sont les plus intéressants et font donc l'objet de nombreuses études sur le développement plusieurs maladies. En effet, la dérégulation de leur expression physiologique cause une modulation importante de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans l'évolution de diverses pathologies humaines (Giza, Vasilescu, and Calin 2014). Parmi ces différentes pathologies, le rôle des miRs dans le cancer est largement documenté et des profils d'expression spécifiques (signature pathologique de miRs) ont été corrélés à l'agressivité tumorale (McManus 2003). La modulation de l'expression des miRs est aussi observée dans de nombreuses autres pathologies incluant la schizophrénie, le parkinson, l'alzheimer, les maladies auto-immunes et les diverses maladies cardiovasculaires (athérosclérose, infarctus, ischémie, AVC, etc.) (Giza, Vasilescu, and Calin 2014). Globalement, les miRs représentent une nouvelle avenue d'étude pour divers aspects thérapeutiques. Par exemple, l'identification de profils spécifiques associés au diagnostic et au pronostique, l'utilisation des miRs comme nouveaux biomarqueurs plasmatiques et l'utilisation de thérapies basées sur l'administration de miRs représentent des nouveautés prometteuses dans le domaine médical (Giza, Vasilescu, and Calin 2014; Ardekani and Naeini 2010).

7.3. Biogenèse et mécanisme d'action des miRs

Les miRs sont en général décrits comme intergéniques ou introniques selon leur localisation génomique (**figure 32**). Les miRs intergéniques sont transcrits par des unités de transcription (TU) indépendantes. Dans le cas des miRs introniques, ils sont transcrits en même temps que des gènes hôtes codants généralement pour une protéine (Ramalingam et al. 2014). Les miRs synthétisés de façon autonome à partir de leurs propres séquences promotrices localisées entre les gènes représentent la forme principale et est appelée la voie de synthèse canonique (**figure 32**). Ils peuvent être transcrits seuls ou en même temps que d'autres miRs localisés à proximité, sur un même « cluster » partageant un promoteur commun. La biogenèse autonome des miRs par la voie canonique débute par la transcription d'un long transcrit primaire

(pri-miR) de taille variable et de structure tige-boucle médiée par l'ARN polymérase 2. Le pri-miR est ensuite clivé dans le noyau par un complexe RNase (Drosha/DGCR8) pour générer un miR précurseur (pre-miR) de 70 nucléotides de long. Le pre-miR est par la suite exporté du noyau vers le cytoplasme par l'exportin-5 pour subir un processus enzymatique. Ce deuxième clivage est médié par l'enzyme dicer et permet d'éliminer la tige-boucle et de générer un miR duplex (double brin) mature de 22 nucléotides. Le brin 5' est appelé brin guide, alors que le brin 3' est appelé brin passager. Par la suite, un des deux brins sera incorporé au complexe effecteur RISC (*RNA-induced silencing complex*) avec l'aide d'une protéine de la famille des Argonautes (Ago2). L'Ago2 facilite aussi la liaison du miR avec le mRNA cible menant à sa répression subséquente. Les miRs reconnaissent et lient les mRNAs cibles sur leur région 3'-UTR par une séquence spécifique de 8 nucléotides localisée sur la région 5'-UTR du miR et appelée « seed sequence » (**figure 32**). Les mécanismes de répression de l'ARNm cible ne sont pas complètement définis. Par contre, dans la littérature, il est en général accepté que si l'appariement miR/mRNA est parfaitement complémentaire, l'ARNm cible sera dégradé. Dans le cas d'un appariement imparfait, la traduction sera inhibée par divers mécanismes. Dans les deux cas, l'expression du gène cible sera régulée négativement. Les miRs matures et les pré-miRs peuvent être localisés dans les cellules ou sécrétés par celle-ci dans la circulation sous forme libre ou séquestrée dans des microvésicules (exosome, corps apoptotique, microparticule). Les miRs possèdent en général une centaine de cibles (mRNA) (Bartel 2004; Feinberg and Moore 2016; Giza, Vasilescu, and Calin 2014).

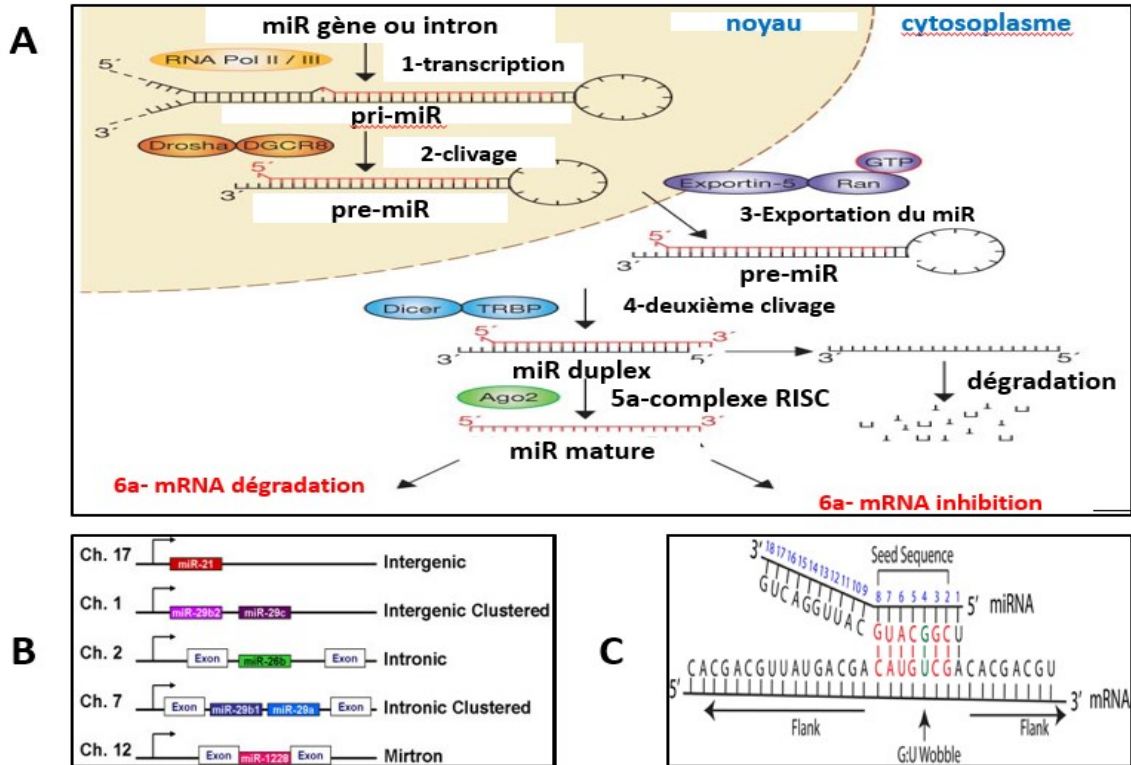


Figure 32. Biosynthèse, localisation génique et « seed séquence » des miRs. *A*, biosynthèse des miRs par la voie canonique. Les miRs sont transcrits par une ARN polymérase (RNA pol 2 ou 3) sous forme de pri-miR dans le noyau. Le pri-miR subit un premier clivage par l'enzyme Drosha pour former un pre-miR qui sera ensuite exporté au cytoplasme par l'exportin-5. Le pre-miR subit un deuxième clivage par l'enzyme dicer pour former un miR duplex doubles brins d'environ 22 nucléotides. Un des brins sera ensuite dégradé (brin passager) alors que l'autre brin (brin guide) va intégrer le complexe RISK formant un miR mature capable de réprimer l'expression d'un ARN messager (mRNA) cible par dégradation ou inhibition de sa traduction. *B*, organisation génomique des miRs et nomenclature. Les gènes des miRs peuvent être intergénique (seul ou en « cluster »), situé sur un intron d'un ARN non codant (intronic) ou sur un gène codant pour une protéine (intronic seul ou en « cluster »). Les mirtrons sont des petites parties d'intron de gènes hôtes pouvant coder pour des miRs. *C*, illustration de la « seed séquence » qui représente une séquence d'interaction entre le miR (nucléotides en position 2-8 du miR en 5') et le mRNA cible. Figure adaptée de : (Kapinas and Delany 2011; Peterson et al. 2014; Winter et al. 2009)

7.4. Modulation du profil d'expression des miRs dans les pathologies cardiovasculaires

Dans les pathologies cardiovasculaires, les miRs sont maintenant considérés comme des biomarqueurs pouvant potentiellement être utilisés dans un contexte pronostique (Schulte and Zeller 2015). Différentes études ont démontré que des miRs spécifiques retrouvés dans différents fluides biologiques (sang, urine, salive) ont un profil d'expression altéré dans plusieurs pathologies cardiovasculaires (Schulte and Zeller 2015) (**figure 33**). Ces différentes pathologies incluent l'infarctus du myocarde (IM), l'athérosclérose, les pathologies des artères coronaires (CAD) et l'insuffisance cardiaque (Nishiguchi, Imanishi, and Akasaka 2015; Schulte and Zeller 2015) (figure 7.2). Par exemple, le miR-208 reconnu pour être spécifiquement exprimé dans le cœur, est augmenté significativement dans le plasma après un MI ou une occlusion des artères coronaires chez le rat. De façon intéressante, l'augmentation dans le temps du miR-208 est similaire à celle de la troponine cardiaque (Gidlof et al. 2013; Wang et al. 2010; Ji et al. 2009). Les miR-499 et miR-1 sont également documentés comme miRs spécifiques aux tissus cardiaques et connus pour être modulés lors d'un MI ou d'une défaillance cardiaque. Il a été démontré que l'expression plasmatique du miR-499 est augmentée plus de 80 fois chez les patients présentant une défaillance cardiaque aiguë (Olivieri et al. 2013). Chez le rat, l'expression du miR-1 est augmentée de plus de 200 fois dans le sérum 6 heures après un IM. De plus, le miR-1 est positivement corrélé avec la taille de l'infarctus et les niveaux de créatine kinase MB dans le sérum (Cheng et al. 2010). De façon intéressante, l'augmentation du miR-1 lors d'un MI est aussi confirmée chez l'humain (Ai et al. 2010). Plusieurs miRs circulants ont aussi été identifiés comme étant modulés chez l'humain présentant des pathologies des artères coronaires (CAD). Par exemple, le groupe de Fichtlscherer et ses collègues ont trouvé des profils d'expression spécifique de certains miRs chez les patients CAD. En effet, ils ont observé que les miRs significativement diminués étaient en général des miRs fortement exprimés dans les ECs (miR-126,-92a,-17), les SMC (miR-145) ou dans des cellules inflammatoires (miR-155) (Fichtlscherer et al. 2010). De façon intéressante, ces types cellulaires sont tous impliqués dans l'athérosclérose. D'un point de vue thérapeutique, plusieurs études ont investigué l'aspect protecteur d'un traitement visant à moduler l'expression de différents miRs dans des modèles

animaux de MI. Par exemple, des études ont démontré que la surexpression du miR-1 et du miR-21 administrés de façon systémique ou intracardiaque permet de diminuer la taille de l'infarctus chez la souris et le rat (Dong et al. 2009; Huang et al. 2013). Inversement, d'autres études ont démontré que l'inhibition de miRs spécifiques permet d'obtenir des effets bénéfiques similaires. Par exemple, dans un modèle de souris de IM, une administration systémique d'anti-miR92a réduit les dommages tissulaires en augmentant la néovascularisation (Bonauer et al. 2009). Il est aussi démontré que l'inhibition du miR-92a chez la souris inhibe l'athérosclérose (Loyer et al. 2014). Des effets cardioprotecteurs dans un contexte de IM ont également été obtenus avec l'inhibition du miR-320 et du miR-29 (Ye et al. 2010; Ren et al. 2009).

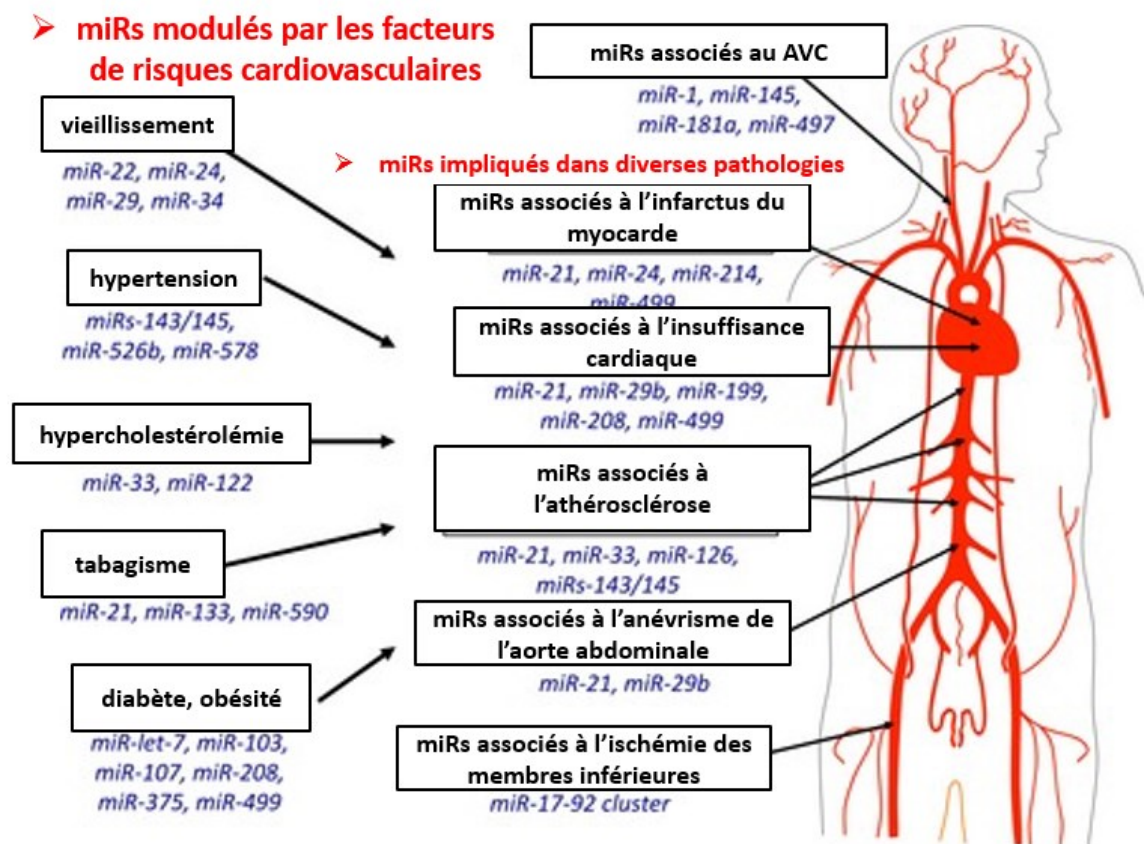


Figure 33. miRs modulés par les facteurs de risques de l'athérosclérose et implication dans les pathologies cardiovasculaires. Figure adaptée de : (Maegdefessel 2014)

7.5. Rôle physiologique et pathologique des miRs sur la fonction endothéliale

Le miR-126 est considéré comme le miR endothélial spécifique le plus important et le plus caractérisé dans la biologie vasculaire. Il est fortement exprimé dans les tissus vasculaires par les ECs et les cellules hématopoïétiques. Il est indispensable pour l'intégrité vasculaire et le développement (Chamorro-Jorganes, Araldi, and Suárez 2013; Wang et al. 2008a). En effet, il a été démontré que la délétion du miR-126 chez la souris cause une défaillance des vaisseaux sanguins, des hémorragies et une mortalité embryonnaire. Ces effets pathologiques sont liés à une perte d'intégrité vasculaire et à une défaillance des fonctions endothéliales (Wang et al. 2008a). Au niveau moléculaire, le miR-126 est connu pour cibler les gènes SPRED1 (sprouty-related protein-1) et PIK3R2/p85-b (phosphoinositol-3 kinase regulatory subunit 2), deux importants régulateurs négatifs de la signalisation du VEGF (Fish et al. 2008). Le miR-126 est aussi connu pour stimuler l'expression de l'ANG-1 qui est impliquée dans la stabilisation et la maturation des vaisseaux (Sessa et al. 2012). Chez la souris, l'inhibition du miR-126 diminue l'angiogenèse post-ischémique dans un contexte physiologique (van Solingen et al. 2009).

Les miRs faisant partie du «cluster» 17-92 (miR-17, miR-18a, miR19a, miR20a, miR19b et miR-92a) sont également bien caractérisés et sont importants pour la fonction endothéliale. Ces miRs sont critiques pour le contrôle du cycle cellulaire et possèdent aussi des fonctions anti-apoptotiques et pro-angiogéniques (Landskroner-Eiger et al. 2015). Par exemple, la surexpression du miR-18 et du miR-19 augmente l'angiogenèse en diminuant l'expression des facteurs anti-angiogéniques CTGF (connective tissue growth factor) et TSP-1 (thrombospondine 1) (Dews et al. 2006; Suárez et al. 2008). Inversement, le miR-16 est anti-angiogénique et possède la capacité de réprimer le VEGFR2, le FGFR1 et le VEGF dans les ECs, inhibant la prolifération, la migration et leurs capacités à former des tubules (Chamorro-Jorganes et al. 2011).

D'autres miRs comme le miR-217 et le miR-146a sont impliqués dans la sénescence des ECs, un processus lié à la dysfonction endothéliale (Vasa-Nicotera et al. 2011; Menghini et al. 2009). Le miR-217 est documenté pour réprimer SirT1 (silent information regulator 1), un gène

protecteur au stress impliqué dans la sénescence. La surexpression du miR-217 induit une sénescence prématurée des ECs (Menghini et al. 2009). Un des mécanismes importants causant la sénescence des ECs est l'augmentation du stress oxydant. Une étude a démontré que la surexpression du miR-146a diminue le stress oxydant en régulant négativement le gène NOX4, un important générateur de ROS (Vasa-Nicotera et al. 2011). Une autre fonction importante des miRs au niveau endothélial est le contrôle du trafic des leucocytes et de l'inflammation. Des études récentes ont documenté que des miRs induits par le TNF- α et le LPS (ex. miR-155, miR-146a, miR-132, miR-125b et le miR-9) contribuent à la régulation de l'inflammation de l'endothélium (Chamorro-Jorganes, Araldi, and Suárez 2013; Sonkoły and Pivarcsi 2009). Par exemple, le miR-10a régule négativement l'expression de NF- κ B, un médiateur pro-inflammatoire clé. De façon intéressante, l'expression du miR-10a est diminuée dans les régions artérielles athérosclérotiques (Fang et al. 2010). Le miR-146 est aussi un important régulateur inflammatoire. Il cible les gènes TRAF6 (TNF- α receptor associated factor-6) et IRAK1 (interleukine recepteur associated kinase-1), deux médiateurs clés stimulant l'inflammation par NF- κ B (Taganov et al. 2006). De façon intéressante, il a été démontré que la surexpression du miR-146a permet d'inhiber l'inflammation sévère et l'adhésion de monocytes en diminuant l'expression de molécules d'adhésion comme VCAM-1 et ICAM-1 (Cheng, Sivachandran, et al. 2013b; Perry et al. 2008). Certains miRs vont aussi moduler la production de ROS endogènes affectant ainsi le niveau de stress oxydant dans les vaisseaux. Par exemple, il a été démontré dans un modèle murin de cardiomyopathie que la délétion du miR-448 augmente drastiquement la production de ROS par NOX2, causant des dommages aux tissus cardiaques (Kyrychenko et al. 2015). Le miR-21 qui est exprimé dans la plupart des cancers humains est connu pour réguler la formation de ROS en ciblant SOD3 et SOD2 (Zhang et al. 2012). D'autres miRs vont réguler la survie et l'apoptose des ECs. Par exemple, chez la souris hypercholestérolémique, le miR-26a exerce un effet protecteur et anti-apoptotique en ciblant le gène TRPC6 (Transient Receptor Potential Cation Channel) (Zhang, Qin, et al. 2015). Les oxLDL sont connues pour causer la dysfonction endothéliale et induire l'apoptose. Le miR-365, un miR pro-apoptotique qui cible BCL-2, est augmenté par les oxLDL ce qui favorise la mort des ECs *in vitro* (Qin et al. 2011). Une autre fonction importante des miRs dans la biologie vasculaire est le contrôle de la production des facteurs vasomoteurs par l'endothélium. Le miR-155 et le miR-24 régulent négativement l'expression d'eNOS affectant la production de NO. Le NO est non seulement un

facteur vasodilatateur important, mais aussi associé à la santé endothéliale par ses actions anti-inflammatoires et anti-thrombotiques (Zhang, Yan, et al. 2015; Sun, Zeng, et al. 2012). Le rôle des différents miRs dans la biologie vasculaire et sur le phénotype endothélial est résumé à la figure 34.

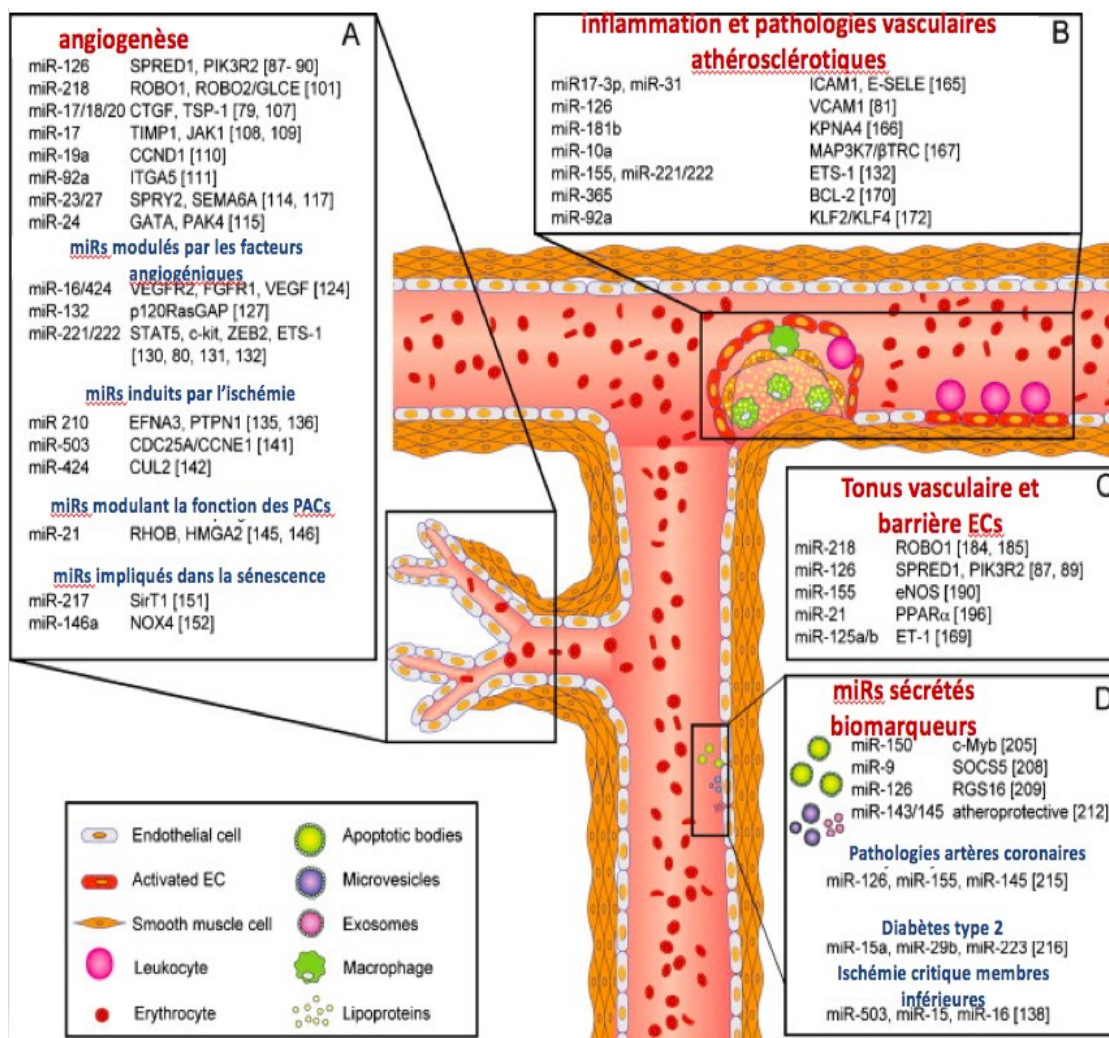


Figure 34. Rôle des miRs dans la biologie vasculaire. Exemple de miRs et de leurs cibles connues et impliquées dans la régulation de l'activité angiogénique des ECs (A), dans les processus inflammatoires et les pathologies vasculaires athérosclérotiques (B), dans la régulation du tonus vasculaire et de la barrière endothéliale (C) et miRs vasculaires circulants utilisés comme biomarqueurs de différentes pathologies vasculaires (D). Figure adaptée de : (Chamorro-Jorganes, Araldi, and Suárez 2013)

7.6. Rôle des miRs dans le développement de l'athérosclérose : mécanismes associés

Comme il a été discuté plus haut, l'athérosclérose est à l'origine des diverses maladies cardiovasculaires ischémiques. Les miRs sont impliqués dans toutes les étapes biologiques liées au développement l'athérosclérose, incluant la dysfonction endothéliale, l'adhésion des monocytes, le développement de la plaque et sa rupture. L'action des miRs dépend de leur capacité à réguler l'expression de multiples gènes impliqués dans les différentes étapes du processus athérogène comme l'inflammation, le stress oxydant et l'activité fonctionnelle des diverses cellules impliquées. Par conséquent, la modulation des miRs par les différents facteurs de risque cardiovasculaires ainsi que par le micro-environnement a des conséquences physiopathologiques importantes (Nishiguchi, Imanishi, and Akasaka 2015).

Au niveau mécanistique, les miRs vont réguler de différentes façons l'homéostasie des LDL, un processus clé dans l'athérosclérose. Par exemple, le miR-122 est impliqué dans le métabolisme des LDL et est fortement exprimé dans le foie (Esau et al. 2006). Des études chez la souris et le primate ont identifié ce miR comme un régulateur critique et indispensable dans la biosynthèse du cholestérol (Elmen, Lindow, Silaharoglu, et al. 2008; Elmen, Lindow, Schutz, et al. 2008; Esau et al. 2006). Inversement, le miR-223 réprime des gènes impliqués dans la biosynthèse du cholestérol et du recaptage des HDL. Il a été démontré que les souris déficientes pour le miR-223 présentent un taux élevé de HDL sanguin et un faible de taux de cholestérol hépatique (Vickers et al. 2014). Le miR-148a cible le récepteur LDLR menant à une diminution de l'élimination des LDL et favorisant ainsi l'hypercholestérolémie. En effet, les souris Ko pour le miR-148a montrent une diminution significative du taux de LDL cholestérol plasmatique (Wagschal et al. 2015; Goedeke et al. 2015). Parmi les miRs les plus documentés dans les modèles animaux athérosclérotiques ciblant la biogenèse des HDL, nous retrouvons le miR-33 (Marquart et al. 2010). Plusieurs études ont démontré que l'inhibition ou la délétion du miR-33 augmente les niveaux de HDL et réduit la taille des plaques athérosclérotiques chez les souris hypercholestérolémiques ApoE ^{-/-} ou LDLR ^{-/-} (Allen et al. 2012; Rayner et al. 2011). De plus, il est documenté que la délétion du miR-33 promeut l'accumulation de macrophages anti-inflammatoires (M2) et favorise ainsi la régression des plaques (Ouimet et al. 2015).

Comme il a été décrit précédemment, l'inflammation de l'endothélium est un processus important pour la progression de la plaque athérosclérotique. L'hyperlipidémie et les oxLDL induisent l'expression de molécules d'adhésion monocyttaire (VCAM-1, I-CAM-1, E-selectin) par les ECs (Libby, Ridker, and Hansson 2011). Les miRs -17-3 p et -31 possèdent la capacité de réguler les molécules d'adhésion endothéliale ICAM-1 et E-selectine (Suarez et al. 2010). Le miR-10a est aussi un important miR anti-inflammatoire et anti-athérogénique. En effet, il a été démontré que sa surexpression permet de diminuer l'athérosclérose en inhibant l'expression de VCAM-1, MCP-1, IL-6 et IL-8 (Fang et al. 2010). Le miR-181b est impliqué dans plusieurs pathologies cardiovasculaires. Il est aussi un inhibiteur critique et de l'inflammation endothéliale ciblant NF- κ B (Sun, Icli, et al. 2012). L'administration systémique du miR-181b chez la souris ApoE *-/-* est suffisante pour supprimer le recrutement des leucocytes et la formation de plaque athérosclérotique (Sun et al. 2014). Des effets anti-inflammatoires et anti-athérogénique similaires chez la souris ont aussi été rapportés pour le miR146a (Raitoharju et al. 2011; Cheng, Sivachandran, et al. 2013a).

Les miRs sont également impliqués dans divers processus menant à la formation des cellules spumeuses. Les miR-125a-5p et -146a réduisent l'internalisation des lipides et la sécrétion de cytokines inflammatoires des macrophages stimulés à l'oxLDL (Yang et al. 2011; Chen, Huang, et al. 2009). Le miR-155 régule la formation des cellules spumeuses en ciblant le gène HBP1, impliqué dans l'internalisation des oxLDL par les macrophages (Tian et al. 2014). Inversement, les miR-148a et -106 b ciblent le gène ABCA1 et favorisent ainsi la formation des cellules spumeuses en inhibant le transport inverse du cholestérol des macrophages (Goedeke et al. 2015; Kim et al. 2012). La progression de l'athérosclérose est associée à une prédominance des macrophages de phénotype M1 (pro-inflammatoire) et à un bas niveau de M2 (anti-inflammatoire) dans les plaques (Moore, Sheedy, and Fisher 2013a). Plusieurs miRs (Let-7c, miR-21, miR146a) régulent la balance entre les phénotypes M1 et M2 par des mécanismes encore mal compris (Vergadi et al. 2014; Wang et al. 2015; Banerjee et al. 2013). Finalement, les miRs régulent aussi les fonctions des SMCs (migration, prolifération et inflammation) impliqués dans la formation de plaques athérosclérotiques (Doran, Meller, and McNamara 2008). Par exemple, le miR-145 module la plasticité des SMCs (quiescence vs phénotype prolifératif) (Cordes et al. 2009). De façon intéressante, l'administration systémique de miR-

145 chez les souris ApoE -/- diminue la taille des plaques athérosclérotiques, le corps nécrotique et l'accumulation de macrophages (Lovren et al. 2012).

7.7. Rôle général des miRs dans la néovascularisation

Pour examiner l'importance des miRs dans la néovascularisation, les premières études ont investigué l'impact de la délétion de *dicer*, une enzyme essentielle pour la maturation des miRs. Les résultats ont démontré que la perte de *dicer* chez la souris menait à une défaillance de vascularisation et à la mort des embryons (Yang et al. 2005; Bernstein et al. 2003). Depuis ce temps, plusieurs miRs possédant des propriétés pro- et anti-angiogéniques ont été identifiés et sont appelés les angiomiRs (Wang and Olson 2009) (**figure 35**). Comme dans l'athérosclérose, les angiomiRs vont réguler la néovascularisation de plusieurs façons. Ils vont cibler différents gènes impliqués dans plusieurs processus de l'angiogenèse et de la vasculogenèse. Au niveau de l'angiogenèse, ces miRs peuvent agir en modulant l'expression de divers gènes codants pour des facteurs angiogéniques. Ils peuvent aussi agir en modulant l'expression de gènes codants pour des médiateurs impliqués dans les voies de signalisation angiogénique des ECs (ex. migration, prolifération, formation de tubule et stabilisations) (Wang and Olson 2009). Les miRs vont aussi affecter la vasculogenèse en modulant l'expression de gènes impliqués dans la mobilisation et le recrutement des PACs aux tissus, mais aussi, en modulant l'activité fonctionnelle des PACs (Jakob and Landmesser 2012). Le rôle des miRs dans l'angiogenèse est documenté dans plusieurs modèles *in vitro* et *in vivo* mais principalement dans un contexte d'angiogenèse tumoral. Leur rôle spécifique dans un contexte d'angiogenèse physiologique et d'ischémie est moins bien défini. Également, l'influence des facteurs de risques cardiovasculaires sur la modulation des angiomiRs n'est pas bien connue. Les sous-sections suivantes visent à décrire les fonctions de différents miRs lors de la néovascularisation.

miRs. Cibles validées ECs		Rôle dans l'angiogenèse et fonctions pro (+) ou anti-angiogénique (-)
Let-7 family	TIMP-1 (Let7b and miR17b)	Stimule la migration et prolifération des ECs <i>in vitro</i> . +
miR-10a	MAP3K7; TAK1 βTRC	Régule le phénotype pro-inflammatoire des ECs. +
miR-17-92	(A) TSP-1(miR18a) (B) TIMP-1 (miR17-5) (C) ITG5a (miR92a) (D) Jak1 (miR17-5/miR20a)	Régule la prolifération, la migration, le bourgeonnement angiogénique et la formation du Réseau tubulaire des ECs. <i>in vitro</i> . Régule la néovascularisation <i>in vivo</i> . +
miR-126	SPRED-1, PIK3R2, VCAM1	Indispensable pour l'intégrité vasculaire et l'angiogenèse <i>in vivo</i> . +
miR-130a	GAX, HOXA5	Régule la migration, la prolifération et la formation de tubules. +
miR-132	p120RasGAP	Régule la prolifération et la formation de tubules <i>in vitro</i> et module l'angiogenèse tumorale <i>in vivo</i> . +
miR-210	EphrinA3, NPTX1	Module la capacité angiogénique des ECs. +
miR-218	Robo1, Robo 2, glucuronyl C5-epimerase (GLCE)	Module l'angiogenèse de la rétine. +
miR-221/222	c-KIT	Module la migration et la formation de tubule en réponse au CSF. -
miR-222	STAT5a	Module l'inflammation et le remodelage vasculaire. +/-
miR-296	HGS	Module l'angiogenèse tumorale. +
miR-320	IGF-1	Module l'angiogenèse des ECs en condition diabétique. -

Figure 35. Principaux miRs et cibles validées régulant des processus angiogéniques.

Figure adaptée de : (Landskroner-Eiger, Moneke, and Sessa 2013)

7.7.1. Régulation de l'angiogenèse et des PACs par les miRs : mécanismes et études animales

Plusieurs études ont démontré que les miRs présentent des profils d'expression spécifiques aux tissus ou aux types cellulaires (Sood et al. 2006; He et al. 2012). La première grande étude liée au profil d'expression des miRs dans les ECs a été effectuée *in vitro*, dans un modèle de HUVECs. Lors de cette étude, 15 miRs fortement exprimés ciblant des facteurs

angiogéniques ont été identifiés (Poliseno et al. 2006). Par la suite, certains miRs ayant un profil d'expression associé à des cibles angiogéniques ont été confirmés dans diverses études (Suarez et al. 2007; Kuehbachner et al. 2007).

Parmi les miRs les mieux documentés dans l'angiogenèse, nous retrouvons les miRs anti-angiogéniques -221/222 connu pour cibler c-KIT, un récepteur angiogénique du ligand CSF. Le c-KIT est connu pour favoriser la survie, la migration et la formation de tubules par les HUVECs (Matsui et al. 2004; Poliseno et al. 2006). La surexpression des miR-221/222 dans les HUVECs mène à une diminution de la migration et de la formation de tubules en réponse au CSF, mais aussi, à une diminution de l'expression d'eNOS (Suarez et al. 2007; Poliseno et al. 2006). De façon inverse, l'expression des miR-221/222 exerce un rôle pro-angiogénique et stimule la prolifération des cellules tumorales en ciblant le gène suppresseur de tumeurs p27 (le Sage et al. 2007). Collectivement, ces résultats montrent que l'action des miRs est spécifique au type cellulaire et au contexte pathologique. Les miRs let-7f et -27 b sont documentés comme étant des miRs pro-angiogéniques. Ils stimulent la migration, la prolifération et la formation de tubules *in vitro*, mais aussi, ils induisent l'angiogenèse chez la souris (Dhahri et al. 2017; Veliceasa et al. 2015; Melo and Kalluri 2012). Comme il a été décrit précédemment, le miR-126 est le plus important pour l'intégrité et la fonction endothéliale. *In vitro*, le miR-126 régule positivement la migration et la prolifération des ECs, stabilise les tubules et régule positivement l'expression de facteurs angiogéniques clés comme le VEGF et bFGF (Wang et al. 2008b; Fish et al. 2008). *In vivo*, différents modèles de souris ko pour le miR-126 montrent une défaillance de néovascularisation (Kuhnert et al. 2008; Fish et al. 2008). Le miR-92a est un autre miR anti-angiogénique largement documenté. *In vitro*, il est connu pour réguler négativement la formation de bourgeons angiogéniques, la formation du réseau tubulaire et la migration des ECs. De plus, l'injection d'un anti-miR-92a chez la souris stimule la néovascularisation suite à une ischémie (Bonauer et al. 2009).

Le rôle des miRs lors de la modulation de la vasculogenèse postnatale est moins caractérisé que l'angiogenèse. Toutefois, plusieurs études ont démontré que les miRs vont influencer la mobilisation et le recrutement des PACs ainsi que leur activité angiogénique fonctionnelle. Par exemple, dans les PACs d'humains âgés, l'expression du miR-22 est

augmentée et est corrélée à une augmentation la sénescence. De façon intéressante, l'inhibition du miR-22 *in vitro* permet de restaurer la fonction des PACs âgés (Zheng and Xu 2014). Le miR-21 peut diminuer la capacité de migration et de prolifération des PACs, et augmenter les niveaux intracellulaires de ROS (Fleissner et al. 2010; Zuo et al. 2015). La surexpression du miR-34a mène à la sénescence des PACs et diminue leur capacité angiogénique (Zhao, Li, and Chen 2010). D'autres études ont démontré que l'expression des miR-221/222 est augmentée dans le sang des patients présentant des pathologies des artères coronaires, et est corrélée à une diminution du nombre de PACs circulants. Il est aussi documenté que la diminution de ces deux miRs par l'atorvastatin, un hypocholestérolémiant, corrèle avec la récupération du nombre de PACs circulants (Minami et al. 2009). Chez la souris, le miR-150 est connu pour réguler la mobilisation des PACs en ciblant CXCR4 (Tano, Kim, and Ashraf 2011). Le miR-126 est aussi documenté pour réguler la mobilisation des cellules progénitrices SCA-1+/LIN- en condition d'ischémie en ciblant le SDF-1 (van Solingen et al. 2011). Finalement, l'expression du miR-223 est associée à une dysfonction des PACs par une augmentation du stress oxydant (Wang et al. 2016; Qu et al. 2015).

7.8. Résumé de chapitre et perspectives thérapeutiques

Dans ce chapitre, il a été démontré que les miRs sont de petits ARNs non codants endogènes, régulant négativement plus de 60 % des gènes impliqués dans tous les processus biologiques. Il a aussi été démontré que la modulation de leur expression physiologique par différents contextes pathologiques est associée à diverses maladies importantes. Dans la biologie vasculaire, les miRs régulent différentes fonctions des ECs incluant leur capacité de migration, de prolifération, de survie et d'angiogenèse. La modulation de l'expression de miRs est impliquée dans l'inflammation, le stress oxydant, le métabolisme des lipides, la dysfonction des ECs et l'athérosclérose. Il a aussi été démontré que chez l'animal, un traitement basé sur la modulation de l'expression de miRs spécifiques peut être bénéfique pour traiter différentes pathologies. Par exemple, il est possible de diminuer la progression de l'athérosclérose et de réduire la sévérité des dommages lors de maladies cardiovasculaires comme l'infarctus du myocarde, les pathologies des artères coronaires et l'insuffisance cardiaque. Aussi, il a été démontré qu'il est possible de moduler l'angiogenèse par des thérapies basées sur les

angiomiRs. Toutefois le rôle précis des miRs pour la néovascularisation en présence de facteurs de risques cardiovasculaires est présentement peu connu. De même, leur efficacité thérapeutique potentielle pour stimuler la néovascularisation dans un contexte ischémique pathologique demeure à être démontrée.

D'un point de vue médical chez l'humain, l'émergence récente des miRs représente une avenue thérapeutique intéressante. D'une part, les miRs présentent des signatures d'expression spécifique dans divers fluides biologiques et pourraient donc être utilisés comme biomarqueurs. D'autre part, plusieurs études dans des modèles animaux suggèrent qu'un traitement à base de miRs pourrait être associé à des effets bénéfiques lors de maladies cardiovasculaires ischémiques. Par exemple, les études montrent qu'il est possible de diminuer le stress oxydant, l'inflammation, l'athérosclérose et les dommages post-ischémiques dans l'infarctus du myocarde. Collectivement, les données suggèrent que les miRs présentent un potentiel intéressant pour stimuler la néovascularisation en ciblant plusieurs processus à la fois. Contrairement aux thérapies modulant une seule cible, chaque miRs est capable de cibler de multiples ARNm. La caractérisation des miRs devient importante et pourrait permettre d'influencer un ou plusieurs réseaux de signalisations et ainsi modifier la fonction angiogénique des ECs et des PACs. La thérapie par les miRs représente donc une avenue novatrice très prometteuse pour la stimulation angiogénique dans le traitement des maladies cardiovasculaires ischémiques.

II-Hypothèse et objectifs de recherche

1. Problématique et hypothèse générale

Les maladies cardiovasculaires ischémiques causées par l'athérosclérose représentent la première cause de mortalité mondiale. L'athérosclérose est une maladie progressive qui se manifeste à l'âge adulte et dont le développement est grandement influencé par les facteurs de risque cardiovasculaire (tabagisme, hypercholestérolémie, diabète, vieillissement et hypertension). L'athérosclérose est caractérisée par une réduction et un remaniement du calibre interne des artères, causant ainsi une condition d'ischémie. Dans les cas les plus sévères, l'athérosclérose peut mener à l'infarctus du myocarde, l'AVC et l'insuffisance cardiaque. La sévérité des dommages ischémiques aux tissus dépend donc du degré d'occlusion, mais aussi de la capacité physiologique de l'organisme à former spontanément de nouveaux vaisseaux sanguins (néovascularisation). De façon intéressante, plusieurs études ont démontré que les facteurs de risque associés au développement de l'athérosclérose (e.g. hypercholestérolémie) diminuent aussi la capacité de néovascularisation suite à une ischémie. Ces facteurs de risque cardiovasculaire sont souvent associés à une activation de la rénine (RAS) et à des niveaux élevés de stress oxydant et d'inflammation. D'un autre côté, les miRs sont des facteurs modulateurs importants impliqués lors de tous les processus physiologiques et pathologiques, incluant l'inflammation et le stress oxydant. Les mécanismes moléculaires précis qui expliquent l'effet délétère des facteurs de risque athérosclérotique sur la néovascularisation post-ischémique ne sont pas connus. *Cette thèse est donc basée sur l'hypothèse générale suivante :*

La rénine et les microARNs sont impliqués lors de la modulation de la néovascularisation post-ischémique, et ces facteurs peuvent être ciblés pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Pour tester cette hypothèse générale, 2 projets de recherche ont été effectués.

2. Projet de recherche #1 : Rôle de la rénine dans la néovascularisation post-ischémique

2.1. Mise en contexte

L'activation chronique du système RAS par les facteurs de risque cardiovasculaire est associée à l'hypertension, la dysfonction endothéliale et l'athérosclérose. Les mécanismes associés à cet état pathologique sont liés à la génération d'Ang2 qui cause une élévation du stress oxydant et entraîne une dysfonction endothéliale. L'étape limitante permettant la génération d'angiotensine 2 est la rénine qui catalyse la transformation de l'angiotensinogène en angiotensine 1. Récemment, plusieurs études ont démontré que l'inhibition de la rénine par l'aliskiren, le seul inhibiteur direct de la rénine utilisé en clinique, améliore la fonction endothéliale et diminue la progression de l'athérosclérose. Toutefois, l'effet de l'aliskiren sur la réponse physiologique de néovascularisation post-ischémique est inconnu.

2.2. Hypothèse et objectifs spécifiques

Hypothèse : L'inhibition directe de la rénine par l'aliskiren peut améliorer les fonctions angiogéniques des ECs et des PACs et stimuler la néovascularisation suite à une ischémie.

Objectifs. 1) Évaluer l'effet de l'aliskiren sur la néovascularisation dans un modèle murin d'ischémie de la patte en caractérisant l'impact sur la récupération de la perfusion sanguine, la densité capillaire, le stress oxydant et le nombre et l'activité fonctionnelle des PACs. 2) Évaluer l'effet de l'aliskiren sur la fonction des cellules endothéliales et l'angiogenèse *in vitro*, et déterminer les mécanismes impliqués.

3. Projet de recherche #2 : Rôle des miRs dans la néovascularisation post-ischémique en condition athérosclérotique

3.1. Mise en contexte

L'émergence récente des miRs comme régulateurs clés de l'expression génique a révolutionné la compréhension des processus biologiques liés aux pathologies humaines. Les miRs agissent comme régulateurs négatifs en réprimant l'expression d'ARNm spécifiques. De plus en plus d'études démontrent que la modulation des miRs est associée à diverses maladies humaines, dont les maladies cardiovasculaires. Au niveau de la néovascularisation, les miRs régulent les fonctions angiogéniques des ECs et des PACs en modulant l'expression de divers médiateurs impliqués dans les voies de signalisation angiogénique. De plus, les miRs sont impliqués dans la régulation de médiateurs pro-oxydants et pro-inflammatoires, deux facteurs importants pour la fonction endothéliale. Toutefois, le rôle spécifique des miRs dans la néovascularisation post-ischémique en condition athérosclérotique est inconnu.

3.2. Hypothèse et objectifs spécifiques

Hypothèse. L'hypercholestérolémie et les oxLDL modulent l'expression de miRs spécifiques et ceci entraîne une diminution de la néovascularisation post-ischémique. La restauration de l'expression de ces miRs pourrait permettre de récupérer la néovascularisation défailante causée par une condition athérosclérotique.

Objectifs. 1) Identifier des miRs pro-angiogéniques qui sont diminués et/ou des miRs anti-angiogéniques qui sont augmentés par l'hypercholestérolémie *in vivo* et les oxLDL *in vitro*. 2) Identifier les mécanismes impliqués dans la modulation de l'angiogénèse et de la néovascularisation par ces miRs. 3) Caractériser l'impact d'une thérapie basée sur la modulation de miRs spécifiques sur l'angiogénèse et la néovascularisation post-ischémique en condition athérosclérotique.

III-Méthodes et résultats

1. Premier article

Publié dans Atherosclerosis 2015 Oct;242(2):450-60.

Direct Renin Inhibition with Aliskiren Improves Ischemia-Induced Neovascularization: Blood Pressure-Independent Effect

Short title: **Renin Inhibition and Neovascularization**

Michel Desjarlais, Sylvie Dussault, Wahiba Dhahri, Raphael Mathieu and Alain Rivard

From the Department of Cardiovascular Research
Centre Hospitalier de l'Université de Montréal
Montréal, Québec
Canada

Address for correspondence:

Alain Rivard, MD
Centre de recherche du CHUM
Tour Viger, R08.466
900 rue St-Denis
Montreal, Quebec, Canada, H2X 0A9
Tel (514)890-8000 ext:25776
alain.rivard@umontreal.ca

ABSTRACT

Background: Renin is the rate limiting step for the activation of the renin-angiotensin-aldosterone system, which is linked to the development of endothelial dysfunction, hypertension and atherosclerosis. However, the specific role of renin during physiological responses to tissue ischemia is currently unknown. Aliskiren is the only direct renin inhibitor that is clinically used as an orally active antihypertensive drug. Here we tested the hypothesis that aliskiren might improve neovascularization in response to ischemia.

Methods and Results: At a dose that did not modulate blood pressure (10 mg/kg), aliskiren led to improved blood flow recovery after hindlimb ischemia in C57BL/6 mice (Doppler flow ratios 0.71 ± 0.07 vs. 0.55 ± 0.03 ; $P < 0.05$). In ischemic muscles, treatment with aliskiren was associated with a significant increase of vascular density, reduced oxidative stress levels and increased expression of VEGF and eNOS. Aliskiren treatment also significantly increased the number of bone marrow-derived endothelial progenitor cells (EPCs) after hindlimb ischemia. Moreover, the angiogenic properties of EPCs (migration, adhesion, integration into tubules) were significantly improved in mice treated with aliskiren. *In vitro*, aliskiren improves cellular migration and tubule formation in HUVECs. This is associated with an increased expression of nitric oxide (NO), and a significant reduction of oxidative stress levels. Importantly, the angiogenic properties of aliskiren *in vitro* and *in vivo* are completely abolished following treatment with the NOS inhibitor L-NAME.

Conclusion: Direct renin inhibition with aliskiren leads to improved ischemia-induced neovascularization that is not dependant on blood pressure lowering. The mechanism involves beneficial effects of aliskiren on oxidative stress and NO angiogenic pathway, together with an increase in the number and the functional activities of EPCs.

Keywords: Neovascularization, angiogenesis, renin, aliskiren, nitric oxide, endothelial progenitor cells, oxidative stress

INTRODUCTION

The capacity of the organism to counteract the negative effects of vascular occlusions depends in large part on its ability to develop new vessels (neovascularization)[1]. Postnatal neovascularization necessitates angiogenesis, a process that involves activation, proliferation and migration of mature endothelial cells[2]. The endothelial cell specific mitogen Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) is essential for the induction of angiogenesis[3]. In addition, nitric oxide (NO) is recognized as a critical factor for endothelial cell migration, VEGF-induced angiogenesis[4, 5], and ischemia-induced neovascularization[6]. On the other hand, it has recently been demonstrated that postnatal neovascularisation not only depends on the extension of the pre-existing vasculature, but also necessitates the action of bone marrow-derived endothelial progenitor cells (EPCs)[7, 8]. EPCs have been shown to reach sites of neovascularization where they can differentiate into mature ECs and/or secrete angiogenic growth factors[9].

Unfortunately, the conditions leading to the development of atherosclerosis in patients are also often associated with impaired neovascularization in response to ischemia[1]. Several cardiovascular diseases have been linked to an increased activation of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAS). Activation of RAS leads hypertension, endothelial dysfunction and atherosclerosis[10]. Chronic stimulation of RAS is also associated with impaired blood flow recuperation following ischemia[11], and a reduction in EPC number and function[12]. Clinically, inhibition of RAS has classically been performed using angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors and angiotensin II receptor blockers (ARBs). Although the beneficial effects of these therapies in patients with atherosclerotic diseases and heart failure are well established[10], their potential role for the modulation of ischemia-induced neovascularization in the context of vascular occlusions is unclear. For example, while treatment with the ACE inhibitor quinaprilate improved neovascularization and angiogenesis in a rabbit model of hindlimb ischemia, the ACE inhibitor captopril did not have any significant effect compared to placebo in the same model[11]. Published studies regarding ARB effects on angiogenesis in cardiovascular disease models have also shown conflicting results. Some studies reported pro-

angiogenic effects of ARBs while other studies documented reduced angiogenesis following treatment with ARBs[13].

Renin can be considered the rate limiting step involved in the activation of RAS, since it catalyzes the formation of angiotensin I from angiotensinogen with very high substrate specificity. This characteristic makes it an ideal target for the therapeutic blockade of RAS. Aliskiren is the only direct renin inhibitor that is clinically used as an orally active antihypertensive drug. In addition to its beneficial effect on blood pressure, recent evidence suggests that aliskiren improves endothelial function and might prevent the development and/or the progression of atherosclerotic diseases[14, 15]. However, the effect of aliskiren on blood flow recuperation and neovascularization in the setting of vascular occlusion and tissue ischemia is currently unknown. In the present report, we studied the effect of aliskiren on postnatal neovascularization using a mouse model of hindlimb ischemia. We also investigated potential mechanisms that could be involved in that physiopathology including the role of NO, oxidative stress and EPCs.

METHODS

Experimental animals and treatments

The protocol was approved by the Comité Institutionnel de Protection des Animaux (CIPA) of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM). 6 to 8 week-old C57BL/6 mice were obtained from Charles River (St. Constant, Canada). Mice were maintained in 12 hours light-dark cycle and fed ad libitum. Aliskiren (Novartis, Dorval, Canada) was administered in drinking water to achieve a dose of 10 or 50 mg/kg/day. The treatment was started two weeks prior to surgery and maintained throughout the whole study. In some experiments, mice were also treated with the NOS inhibitor NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME 1 mg/kg) in combination with Aliskiren in drinking water.

Murine ischemic hindlimb model and monitoring of blood flow

Unilateral hindlimb ischemia was surgically induced and hindlimb blood flow was monitored with a Laser Doppler perfusion imager (LDPI) system (Moor Instrument Ltd., Axminster, UK) as previously described[16]. To account for variables such as ambient light and temperature, the results are expressed as the ratio of perfusion in the left (ischemic) vs. right (non-ischemic) hindlimb[16]. Ambulatory impairment was evaluated using a scale from 1 to 4[17]. Blood pressure was measured using a tail-cuff pressure instrument (BP-2000, Visitech Systems, Apex, NC).

Tissue preparation and immunochemistry

Whole ischemic hindlimb muscles were immediately fixed in tissue-fix overnight or preserved in OCT. Identification of endothelial cells was performed by immunostaining for mouse platelet endothelial cells adhesion molecule-1 (PECAM-1 or CD31) with a rat monoclonal antibody (Pharmingen, San Diego, CA)[16]. Arterioles were identified using an elastin stain kit (Sigma). To evaluate local oxidative stress levels in ischemic muscles, dihydroethidium staining (DHE, Molecular probes, Eugene, OR) was used as previously described[18].

Plasma NO release

NO production was determined indirectly using a commercial kit that measures the concentration of the stable end products nitrate and nitrite based on the Griess reaction (R&D systems Inc., Minneapolis, MN) [18].

Western blot analysis

Hindlimb muscles or HUVECs were rinsed in PBS, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Protein extracts were obtained after homogenization of muscles or HUVECs in ice-cold lysis buffer[16]. The membranes were probed with the following antibodies: 1:500 VEGF (Santa Cruz Biotechnology), 1:1000 phospho eNOS (Cell Signaling Technology, Boston, MA), 1:1000 eNOS (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), 1:2000 NOX2/GP91 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), and 1:2000 beta-Actin (Santa Cruz Biotechnology). Protein expression was quantified by high-resolution optical densitometry (image J software). Results are expressed as density values normalized to the loading control.

Endothelial Progenitor Cells isolation and characterization (early outgrowth EPCs)

Mouse bone marrow mononuclear cells were isolated from the femora and tibiae, plated on 0.005% fibronectin and cultured in complete medium 200 with 20% FBS as previously described[18]. After 4 days in culture, non-adherent cells were removed by washing with PBS. Adherent cells were then stained with 1,1'-di(4-dimethylaminopropyl)carbocyanine perchlorate-acetylated low-density lipoprotein (DiI-acLDL, Invitrogen, OR, USA) and FITC-labeled lectin BS-1 (*Bandeiraea simplicifolia*, Sigma). Bone marrow EPCs were characterized as adherent cells positive for both DiI-acLDL uptake and lectin binding. Quantification was performed by examining several random microscopic fields[18].

Flow cytometry analysis of EPCs

The percentages of EPCs contained in the bone marrow or in the total viable cell population derived from the spleen was measured by flow cytometry (FACSCalibur flow cytometer, Becton Dickinson, Oakville, Ontario, Canada) using the fluorescence-coupled cell markers CD34-FITC and VEGFR-2 (Flk1)-PE (eBioscience, CA, USA)[19]. Cell phenotypes were determined by the analysis of 300 000 events.

Matrigel tubule assay

Growth factor reduced Matrigel Matrix (Becton Dickinson Labware, Bedford, MA) was thawed and placed in 96-well plates at 37°C to allow solidification. DiI-labeled EPCs (3000) were co-plated with HUVECs (12,000) and cultured at 37°C for 8 hours with 50 ng/ml of VEGF. The number of incorporated EPCs in tubules was determined in 10 random fields[20]. Total number of tubules, tubule length and tubule branching were similar between groups in all the experiments (data not shown).

EPC migration and adhesion assays

EPC migration was assessed using a modified Boyden chamber assay[21]. The adhesion of EPCs to a monolayer of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) was assessed as previously described[21].

HUVEC culture and treatments

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were obtained from Cascade Biologics (Portland, OR, USA) and cultured in medium 200 supplemented with 10% FBS and low serum growth supplement. Cells were grown at 37°C and 5% CO₂. HUVECs were passaged when they reached 90% confluence and passages 2–5 were used for all experiments[16]. Cells were treated for 24 hours with Aliskiren (0.1, 1, 5 and 10 µM) in the presence or absence of L-NAME (5 mM). Measurement of migration in confluent HUVECs was assessed using an adapted wound assay as previously described[21].

HUVEC Capillary-like tube formation on Matrigel

HUVECs were plated in 96-well plates coated with 50 µl of growth factor reduced Matrigel Matrix (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) and cultured at 37°C for 6 hours with 50 ng/ml of VEGF or 0.1 µM Aliskiren in the presence or absence of L-NAME (0.5 mM). Quantification of capillary-like tube formation was performed as described[21].

Detection of intracellular superoxide (O_2^-) and nitric oxide (NO) in HUVECs

Generation of O_2^- and NO in cells were assessed with the fluoroprobes dihydroethidium (DHE, Molecular probes) and diaminofluorescein-2-diacetate (DAF-2DA, Cell Technology) as previously described[18]. Fluorescence intensities were quantified using image J, with the same threshold for each experiment.

Statistical analysis

All results are presented as mean \pm SEM. Statistical significance was evaluated by ANOVA followed Newman-Keuls post hoc test for multi group comparison. A value of $P < 0.05$ was interpreted to denote statistical significance.

RESULTS

Effect of aliskiren on blood flow recuperation following hindlimb ischemia

Aliskiren administered in drinking water was well-tolerated by the animals. Water consumption and weights were similar in mice treated with aliskiren vs. controls (**Figure 1A**). Treatment with 50 mg/kg of aliskiren was associated with a significant reduction of systolic blood pressure, while the 10 mg/kg treatment did not significantly modulate blood pressure (**Figure 1B**). After the surgical induction of ischemia, hindlimb perfusion was evaluated by serial LDPI studies (**Figure 1C**). Following the surgery (day 0), Doppler flow ratios (DFR) between the ischemic and normal hindlimbs reached comparable low levels, indicating that the severity of the ischemia was similar in the 3 groups (**Figure 1C**). Blood flow recovery was significantly improved in mice treated with 10 mg/kg of aliskiren compared to controls at day 14 (DFR 0.69 ± 0.05 vs. 0.55 ± 0.05 , $P < 0.05$) and day 21 (DFR 0.71 ± 0.07 vs. 0.55 ± 0.03 , $P < 0.05$) after surgery (**Figure 1C**). Interestingly the high dose of aliskiren (50 mg/kg) reduced blood pressure, but was not associated with an improvement of blood flow recuperation after ischemia (**Figure 1C**). We therefore concluded that the beneficial effect of aliskiren on blood flow recuperation is independent of its effect on blood pressure, and subsequent experiments were performed using the lower dose of aliskiren (10 mg/kg). Clinically, the improvement of blood flow in animals treated with aliskiren was associated with a significant reduction of ambulatory impairment compared to controls (**Figure 1D**). Because NO has been shown to be an important factor for postnatal neovascularization, we compared nitrite levels in mice treated or not with aliskiren. As shown in **Figure 1E**, nitrite levels in the serum were significantly increased in mice treated with aliskiren compared to controls. Moreover, we found that the beneficial effect of aliskiren on blood flow recuperation was abolished when mice were also treated with the NOS inhibitor L-NAME (**Figure 1F**).

Effect of aliskiren in ischemic tissues

At the microvascular level, treatment with aliskiren was associated with a significant increase of capillaries (**Figure 2A and 2C**) and arterioles (**Figure 2D**) in ischemic hindlimb muscles at day 21 after surgery. Since increased oxidative stress levels have been associated with impaired angiogenesis, we compared superoxide formation in the ischemic tissues of mice treated or not with aliskiren. As shown in **Figure 2B and 2E**, mice treated with the renin inhibitor aliskiren exhibited a significant reduction of superoxide levels in ischemic muscles (DHE staining). This was associated with a reduced expression of Nox2-containing NADPH oxidase, a major source of reactive oxygen species (**Figure 2F**). We next investigated the effect of aliskiren on the induction of VEGF and NO angiogenic pathways in ischemic muscles. As shown in **Figure 2F**, the expressions of both VEGF and eNOS were significantly increased in the ischemic muscles of mice treated with aliskiren.

Effect of aliskiren on EPC number and EPC functional activities

EPCs have been shown to reach sites of neovascularization where they can contribute to the formation of new blood vessels. The spleen acts as a peripheral reservoir of EPCs that are mobilized after ischemia[22, 23]. Here we determined the effect of aliskiren on the number and the functional activities of EPCs. The number of EPCs in the bone marrow and in the spleen was significantly increased in mice treated with aliskiren compared to control mice (**Figure 3A-C**). Additionally, we observed that EPCs isolated from mice treated with aliskiren showed increased integration into endothelial cell tubules (**Figure 3D and 3F**), increased adhesion to endothelial cells (**Figure 3E and 3G**), and improved cellular migration (**Figure 3H**) compared to EPCs isolated from untreated mice.

Effects of Aliskiren on mature endothelial cells *in vitro*

To better characterize the angiogenic effects of aliskiren, *in vitro* studies were conducted in human umbilical vascular endothelial cells (HUVECs). We performed a dose response and found that 0.1 uM was the optimal concentration to induce tube formation and cell migration. Higher concentrations of aliskiren had reduced (1 uM) or no effects (5 and 10 uM) on endothelial cell functions (data not shown). Aliskiren (0.1 uM) was as potent as VEGF to induce tube formation (**Figure 4A and 4C**) and cellular migration (**Figure 4B and 4D**) in endothelial cells.

Interestingly, the beneficial effects of aliskiren on endothelial cell angiogenic functions are completely abolished when the cells are also treated with the NOS inhibitor L-NAME (**Figure 4A-D**). We found that aliskiren induces the expression of VEGF and phospho-eNOS in HUVECs (**Figure 4E-F**). Moreover, treatment with aliskiren decreases the levels of ROS as assessed by DHE staining (**Figure 5A and 5C**) and significantly increases NO expression as assessed by DAF staining (**Figure 5B and 5C**). Overall, an inverse correlation was observed between oxidative stress levels and NO expression following treatment with increasing doses of aliskiren (**Figure 5D**).

DISCUSSION

To our knowledge, the present study is the first one to document the positive effect of direct renin inhibition with aliskiren on ischemia-induced neovascularization. Activation of the RAS is believed to play an essential role in the development of cardiovascular diseases, including hypertension, atherosclerosis and heart failure[10, 13]. Renin might be considered the optimal target for RAS inhibition, as it is involved in the conversion of angiotensinogen to angiotensin I, the initial and rate-limiting step responsible for angiotensin II formation. In addition, renin inhibition prevents the formation of all angiotensin peptides, which might constitute an advantage compared to classical treatments with ACE inhibitors or ARBs[10, 13]. Aliskiren is the only direct renin inhibitor that is currently available clinically. Aliskiren has recently been shown to be effective for the treatment of hypertension, congestive heart failure, and proteinuria either as monotherapy or in combination with ACE inhibitors or ARBs[10, 13]. It was also demonstrated to be as effective as an ARB to attenuate LV hypertrophy in hypertensive patients[24]. In experimental animal models, Aliskiren has been shown to inhibit hypercholesterolemia-induced atherosclerosis[14, 15] and protect against myocardial ischemia/reperfusion injury[25]. The present study uncovered a novel and potentially very important property of aliskiren. It demonstrates for the first time that this direct renin inhibitor can stimulate the physiological reparative abilities of the organism in response to ischemia, including the capacity to develop new blood vessels (i.e. neovascularization).

We used a well-characterized mouse model of hindlimb ischemia to precisely define the effects of aliskiren on post-natal neovascularization[26]. Experiments were performed in normotensive C57Bl6 mice, and the treatment was well-tolerated by the animals. Interestingly, we found that only the lower dose of aliskiren (10 mg/kg), which did not significantly alter blood pressure, was associated with improved blood flow recuperation after hindlimb ischemia. By contrast the higher dose of aliskiren (50 mg/kg), which significantly reduced blood pressure, was associated with a similar rate of blood flow recovery compared to controls. The precise explanation for this phenomenon is currently unclear. Although mice treated with 50 mg/kg of aliskiren appeared healthy and did not show any obvious behavioural change, it is possible that

the lower blood pressure achieved in this group in the context of a recent surgically-induced arterial occlusion was suboptimal to promote neovascularization. This might have counteracted other potential beneficial effects provided by aliskiren. On the other hand, the fact that the lower dose of aliskiren did promote blood flow recuperation after ischemia indicates that this beneficial effect is independent of blood pressure lowering. Similarly, previous reports have shown that inhibition of atherosclerosis in hypercholesterolemic mice can be achieved at doses of aliskiren that do not reduce blood pressure[14]. It is now well-recognized that in addition to systemic RAS activation, peripheral tissues express components of the RAS and can synthesize angiotensin II[27-29]. It is possible that inhibition of RAS in tissues is even more important than systemic RAS inhibition in order to promote neovascularization. This concept would be consistent with a previous report indicating that ACE inhibitors with high tissue affinity may be potentially useful for therapeutic angiogenesis in ischemic tissues[11].

Treatment with aliskiren led to improved blood flow recuperation at the macrovascular level, and to increased number of capillaries and arterioles in ischemic muscles at the microvascular level. The mechanisms by which aliskiren could improve ischemia-induced neovascularization are potentially diverse. We found that oxidative stress levels in ischemic tissues and in HUVECs were significantly reduced following treatment with aliskiren, as assessed by DHE immunostaining. Neovascularization has been shown to be impaired in conditions where oxidative stress levels are increased, a situation that can be improved by antioxidant therapies or genetic manipulations[18, 20, 30]. For instance mice deficient for Nox2-containing NADPH oxidase, an important source of ROS in the vasculature, have been shown to be protected against ischemia in conditions of increased oxidative stress[18, 31]. Interestingly, here we found that Nox2 expression in ischemic muscles was significantly reduced in mice treated with aliskiren. Therefore, reduced Nox2 expression and oxidative stress levels could contribute to explain improved blood flow recuperation and capillary density following ischemia in mice treated with aliskiren.

Another potential factor that could be involved in the beneficial effect of aliskiren on neovascularization is modulation of the VEGF/NO signaling pathway. VEGF is considered to be a critical limiting factor for the initiation and the maintenance of angiogenesis[3], while NO

has been shown to be essential for VEGF-induced angiogenesis[4] and neovascularization following ischemia[6]. On the other hand, ROS can impair both NO bioactivity and VEGF-dependent angiogenesis[20, 30, 32]. Here we found that VEGF and eNOS levels were significantly increased in the ischemic muscles and in HUVECs following treatment with aliskiren. *In vivo*, nitrite levels were also increased in the serum of mice treated with aliskiren. Importantly, the essential role of NO was confirmed by demonstrating that the beneficial effects of aliskiren on blood flow recuperation *in vivo* and on angiogenesis *in vitro* are completely abolished following co-treatment with the NOS inhibitor L-NAME. Angiotensin II (Ang II) levels are known to be reduced in patients treated with aliskiren[33], and Ang II is an important factor associated with oxidative stress, impaired eNOS activity and reduced NO levels[34]. Moreover, it was previously demonstrated that eNOS phosphorylation can be stimulated both by aliskiren and the angiotensin II receptor blocker valsartan[15]. Therefore, it is conceivable that reduced angiotensin receptor activation by Ang II contributes to the beneficial effect of aliskiren on eNOS activity and NO levels. The increased bioactivity of NO seems to be related to the antioxidant properties of aliskiren, as we found an inverse correlation between ROS and NO levels following treatment with increasing doses of aliskiren *in vitro*. Globally, our study suggests that NO is an essential factor involved in the induction of ischemia-induced neovascularization by aliskiren. This is consistent with previous studies demonstrating that aliskiren protects against atherosclerosis and myocardial ischemia/reperfusion injury by activating nitric oxide synthase signaling[15, 25].

The results of the present study suggest that EPCs could also be involved in the stimulation of neovascularization by aliskiren. Previous studies have shown that aliskiren can increase the number of EPCs in the context of atherosclerosis in hypercholesterolemic mice[35], and in patients with type 2 diabetes and hypertension[36]. However, the potential role of aliskiren to modulate EPCs in the setting of ischemia-induced neovascularization has not been studied. EPCs have been shown to reach ischemic tissues where they can improve neovascularization either directly by incorporating into new vessels, or indirectly through paracrine secretion of angiogenic growth factors[9]. Here we found that the number of EPCs following surgically-induced hindlimb ischemia was significantly increased in mice treated with aliskiren. Moreover, we demonstrate that the functional activities of EPCs (migration,

adhesion, integration into tubules) are improved following treatment with aliskiren. The positive effect of aliskiren on EPCs might be at least in part related to lower ROS levels. Recent studies have shown that excessive oxidative stress leads to impaired EPC angiogenic activities[19, 20, 37, 38]. In addition to a reduction of ROS, treatment with aliskiren was also associated with increased levels of NO, a critical factor for EPC number and function[22]. Therefore, increased NO bioavailability following treatment with aliskiren might constitute an important conceptual link between reduced oxidative stress levels, increased EPC number and function, and postnatal neovascularization in response to ischemia. It is probable that other factors not investigated in the current study might also have contributed to the beneficial effects of aliskiren. For instance the kallikrein-kinin-system (KKS), an important factor involved in EPC angiogenic activities[39, 40], was shown to be induced in the myocardium following treatment with aliskiren[41]. Moreover, the KKS has also been demonstrated to be involved in the beneficial effects of aliskiren in the heart following ischemia-reperfusion injury[42].

In conclusion, our study demonstrates for the first time that direct renin inhibition with aliskiren improves therapeutic neovascularization in response to ischemia. The positive effect of aliskiren on neovascularization does not appear to be dependent on blood pressure lowering. We propose that potential mechanisms involved in the beneficial effects of aliskiren on ischemia-induced neovascularization include reduced oxidative stress levels in ischemic tissues, improve activation of the VEGF/NO angiogenic pathway, and increase in the number and the functional activities of EPCs. Our results suggest that direct renin inhibition could represent an interesting novel therapeutic strategy to improve neovascularization and reduce functional impairment in patients with severe ischemic vascular diseases.

Sources of Funding

This study was supported by grants from the Canadian Institute of Health Research (CIHR MOP-123490) and the Heart and Stroke Foundation of Canada (HSFC) to AR.

Disclosures:

None.

REFERENCES

- [1] Losordo DW and Dimmeler S. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease: part I: angiogenic cytokines. *Circulation*. 2004;109:2487-91
- [2] D'Amore PA and Thompson RW. Mechanisms of angiogenesis. *Annu Rev Physiol*. 1987;49:453-64
- [3] Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb J*. 1999;13:9-22.
- [4] Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Madri JA, et al. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest*. 1997;100:3131-9.
- [5] Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A, et al. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:2604-9.
- [6] Murohara T, Asahara T, Silver M, et al. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest*. 1998;101:2567-78
- [7] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275:964-7
- [8] Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone Marrow Origin of Endothelial Progenitor Cells Responsible for Postnatal Vasculogenesis in Physiological and Pathological Neovascularization. *Circ Res*. 1999;85:221-8
- [9] Urbich C and Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res*. 2004;95:343-53
- [10] Ma TK, Kam KK, Yan BP, et al. Renin-angiotensin-aldosterone system blockade for cardiovascular diseases: current status. *British journal of pharmacology*. 2010;160:1273-92
- [11] Fabre JE, Rivard A, Magner M, et al. Tissue inhibition of angiotensin-converting enzyme activity stimulates angiogenesis *in vivo*. *Circulation*. 1999;99:3043-9
- [12] Imanishi T, Hano T and Nishio I. Angiotensin II accelerates endothelial progenitor cell senescence through induction of oxidative stress. *Journal of hypertension*. 2005;23:97-104
- [13] Willis LM, El-Remessy AB, Somanath PR, et al. Angiotensin receptor blockers and angiogenesis: clinical and experimental evidence. *Clinical science*. 2011;120:307-19
- [14] Lu H, Rateri DL, Feldman DL, et al. Renin inhibition reduces hypercholesterolemia-induced atherosclerosis in mice. *J Clin Invest*. 2008;118:984-93

- [15] Imanishi T, Tsujioka H, Ikejima H, et al. Renin inhibitor aliskiren improves impaired nitric oxide bioavailability and protects against atherosclerotic changes. *Hypertension*. 2008;52:563-72
- [16] Michaud SE, Menard C, Guy LG, et al. Inhibition of hypoxia-induced angiogenesis by cigarette smoke exposure: impairment of the HIF-1 α /VEGF pathway. *Faseb J*. 2003;17:1150-2
- [17] Turgeon J, Dussault S, Maingrette F, et al. Fish oil-enriched diet protects against ischemia by improving angiogenesis, endothelial progenitor cell function and postnatal neovascularization. *Atherosclerosis*. 2013;229:295-303
- [18] Haddad P, Dussault S, Groleau J, et al. Nox2-Containing NADPH Oxidase Deficiency Confers Protection From Hindlimb Ischemia in Conditions of Increased Oxidative Stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29:1522-8
- [19] Turgeon J, Dussault S, Haddad P, et al. Probucol and antioxidant vitamins rescue ischemia-induced neovascularization in mice exposed to cigarette smoke: potential role of endothelial progenitor cells. *Atherosclerosis*. 2010;208:342-9
- [20] Lefevre J, Michaud SE, Haddad P, et al. Moderate consumption of red wine (cabernet sauvignon) improves ischemia-induced neovascularization in ApoE-deficient mice: effect on endothelial progenitor cells and nitric oxide. *FASEB J*. 2007;21:3845-52
- [21] Dussault S, Maingrette F, Menard C, et al. Sildenafil increases endothelial progenitor cell function and improves ischemia-induced neovascularization in hypercholesterolemic apolipoprotein E-deficient mice. *Hypertension*. 2009;54:1043-9
- [22] Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, et al. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med*. 2003;9:1370-6
- [23] Patschan D, Krupincza K, Patschan S, et al. Dynamics of mobilization and homing of endothelial progenitor cells after acute renal ischemia: modulation by ischemic preconditioning. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006;291:F176-85
- [24] Solomon SD, Appelbaum E, Manning WJ, et al. Effect of the direct Renin inhibitor aliskiren, the Angiotensin receptor blocker losartan, or both on left ventricular mass in patients with hypertension and left ventricular hypertrophy. *Circulation*. 2009;119:530-7
- [25] Zhang W, Han Y, Meng G, et al. Direct renin inhibition with aliskiren protects against myocardial ischemia/reperfusion injury by activating nitric oxide synthase signaling in spontaneously hypertensive rats. *Journal of the American Heart Association*. 2014;3:e000606
- [26] Couffinhal T, Silver M, Zheng LP, et al. Mouse model of angiogenesis. *Am J Pathol*. 1998;152:1667-79
- [27] Cassis LA, Lynch KR and Peach MJ. Localization of angiotensinogen messenger RNA in rat aorta. *Circ Res*. 1988;62:1259-62

- [28] Dostal DE and Baker KM. The cardiac renin-angiotensin system: conceptual, or a regulator of cardiac function? *Circ Res.* 1999;85:643-50
- [29] De Mello WC and Danser AH. Angiotensin II and the heart : on the intracrine renin-angiotensin system. *Hypertension.* 2000;35:1183-8
- [30] Michaud SE, Dussault S, Groleau J, et al. Cigarette smoke exposure impairs VEGF-induced endothelial cell migration: role of NO and reactive oxygen species. *Journal of molecular and cellular cardiology.* 2006;41:275-84
- [31] Ebrahimian TG, Heymes C, You D, et al. NADPH oxidase-derived overproduction of reactive oxygen species impairs postischemic neovascularization in mice with type 1 diabetes. *Am J Pathol.* 2006;169:719-28
- [32] Urbich C, Dernbach E, Aicher A, et al. CD40 ligand inhibits endothelial cell migration by increasing production of endothelial reactive oxygen species. *Circulation.* 2002;106:981-6
- [33] Nussberger J, Wuerzner G, Jensen C, et al. Angiotensin II suppression in humans by the orally active renin inhibitor Aliskiren (SPP100): comparison with enalapril. *Hypertension.* 2002;39:E1-8
- [34] Cai H and Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 2000;87:840-4
- [35] Poss J, Werner C, Lorenz D, et al. The renin inhibitor aliskiren upregulates pro-angiogenic cells and reduces atherogenesis in mice. *Basic research in cardiology.* 2010;105:725-35
- [36] Raptis AE, Markakis KP, Mazioti MC, et al. Effect of aliskiren on circulating endothelial progenitor cells and vascular function in patients with type 2 diabetes and essential hypertension. *American journal of hypertension.* 2015;28:22-9
- [37] Groleau J, Dussault S, Haddad P, et al. Essential Role of Copper-Zinc Superoxide Dismutase for Ischemia-Induced Neovascularization Via Modulation of Bone Marrow-Derived Endothelial Progenitor Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30:2173-81
- [38] Ingram DA, Krier TR, Mead LE, et al. Clonogenic endothelial progenitor cells are sensitive to oxidative stress. *Stem Cells.* 2007;25:297-304
- [39] Krankel N, Katare RG, Siragusa M, et al. Role of kinin B2 receptor signaling in the recruitment of circulating progenitor cells with neovascularization potential. *Circ Res.* 2008;103:1335-43
- [40] Spinetti G, Fortunato O, Cordella D, et al. Tissue kallikrein is essential for invasive capacity of circulating proangiogenic cells. *Circ Res.* 2011;108:284-93
- [41] Campbell DJ, Zhang Y, Kelly DJ, et al. Aliskiren increases bradykinin and tissue kallikrein mRNA levels in the heart. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2011;38:623-31

- [42] Koid SS, Ziogas J and Campbell DJ. Aliskiren reduces myocardial ischemia-reperfusion injury by a bradykinin B2 receptor- and angiotensin AT2 receptor-mediated mechanism. *Hypertension*. 2014;63:768-73

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Effect of aliskiren on body weights, blood pressure, and blood flow recuperation after hindlimb ischemia. **A-B.** Evaluation of body weight (**A**) and systolic blood pressure (**B**) changes over time in the different groups of mice. **C.** Pictures of representative Laser Doppler measurements 21 days after hindlimb ischemia. A color scale illustrates blood flow variation from minimal (dark blue) to maximal perfusion (red). Arrows indicate ischemic hindlimbs. The graph represents quantification of Laser Doppler perfusion ratios at different time points after ischemia. **D-E:** Effect of aliskiren treatment on ambulatory impairment (**D**) and plasma nitrite levels (**E**). **F.** Effect of aliskiren and L-NAME on Laser Doppler perfusion ratios at day 21 after ischemia. Data are mean±SEM (n=8-10/group). CTL=control. * $P<0.05$ vs. CTL; # $P<0.05$ vs. aliskiren.

Figure 2: Effect of aliskiren in ischemic tissues. Capillary (**A and C**) and arteriolar (**D**) densities in ischemic muscles harvested at day 21 after surgery in the different groups of mice (n=8-10/group). **B and E.** Oxidative stress levels (DHE staining) in ischemic muscles at day 7 after surgery (n=5/group). **F.** Representative Western blots and quantitative analyses of Nox2, P-eNOS and VEGF in ischemic muscles at day 7 after surgery (n=4-5 per group). Data were normalized over loading controls and are presented as mean±SEM. * $p<0.05$ vs. CTL.

Figure 3: Effect of aliskiren on the number and the functional activities of EPCs. Bone marrow-derived EPCs were characterized using DiIacLDL, FITC-lectin, and DAPI stains (**A**). The percentage of EPCs in the bone marrow (**B**) and in the spleen (**C**) was quantified by cytometry using the markers CD34-FITC and Flk1-PE. In a matrigel tubule assay (**D and F**), 3000 EPCs were labeled with a DiI fluorescent marker (red) and cocultured with HUVECs (transparent) to form tubular-like networks on matrigel. To assess EPC adhesion (**E and G**), EPCs were labelled with a DiI fluorescent marker and allowed to adhere to a monolayer of tumor necrosis factor- α -stimulated HUVECs. VEGF-induced EPC migration (**H**) was assessed using a modified Boyden chamber assay. Data are mean±SEM (n=5/group). * $P<0.05$ vs. CTL.

Figure 4: Effect of aliskiren on mature endothelial cells *in vitro*. Representative pictures and quantitative analyses of tube formation (**A** and **C**) and cellular migration (**B** and **D**) in HUVECs treated with 50 ng/ml VEGF or 0.1 μ M Aliskiren in the presence or absence of L-NAME (0.5 mM). **E-F.** Representative Western blots (**E**) and quantitative analyses (**F**) of VEGF and P-eNOS in HUVECs treated or not with aliskiren (0.1 μ M). Data were normalized over loading controls and are presented as mean \pm -SEM. * $P < 0.05$ vs. CTL; # $P < 0.05$ vs. aliskiren.

Figure 5: Effect of aliskiren on oxidative stress levels and NO generation in mature endothelial cells. Nitric oxide (**A**) and superoxide anion (**B**) generation were assessed by DAF and DHE staining, respectively. HUVECs were treated or not with Aliskiren (0.1 μ M) for 24 hours. **C-D.** Dose-response (**C**) and correlation (**D**) between DAF and DHE staining in HUVECs treated with increasing doses of Aliskiren (0.1, 1, 5 μ M). Data are mean \pm -SEM.

* $P < 0.05$ vs. CTL.

Figure 1.

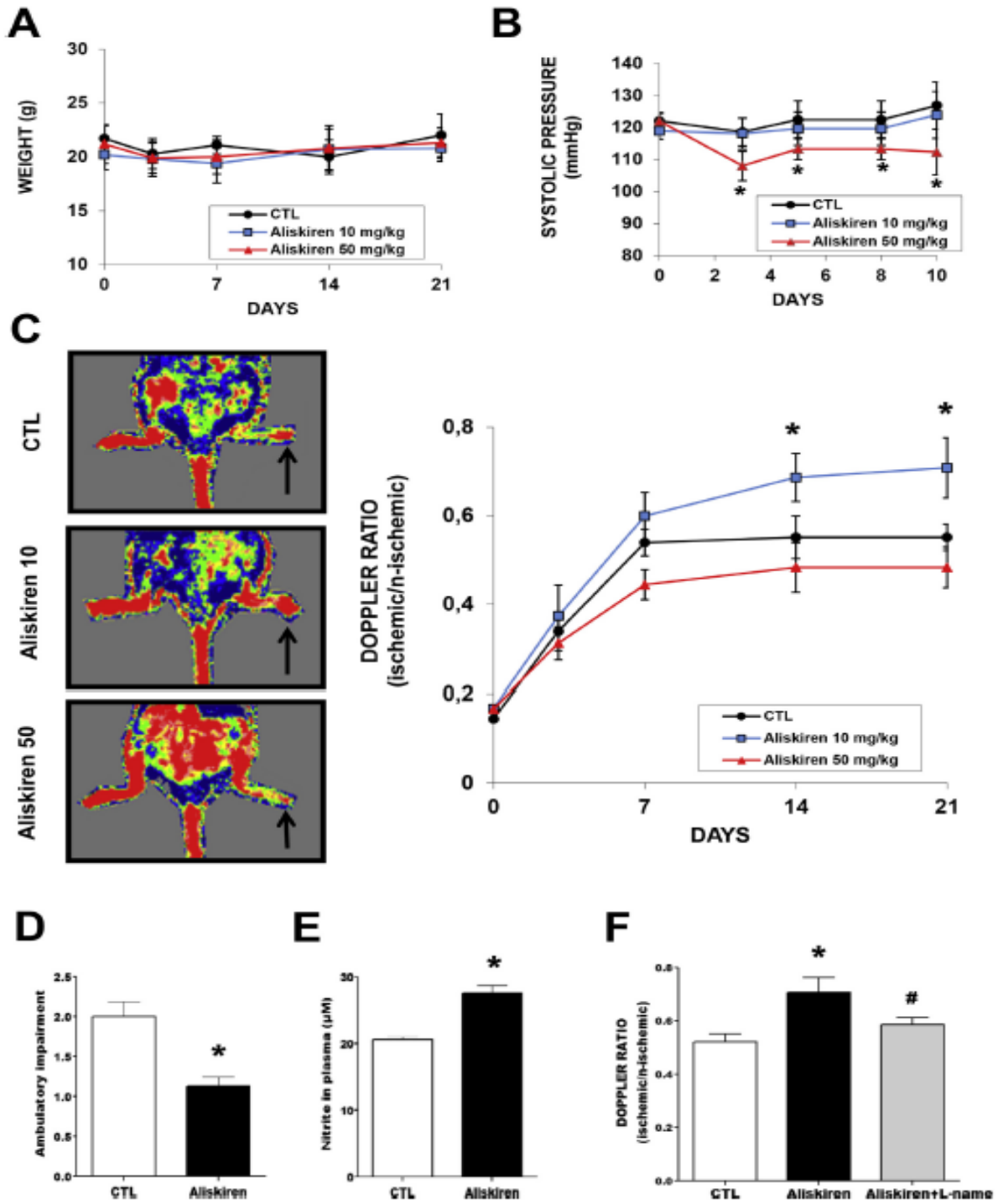


Figure 2.

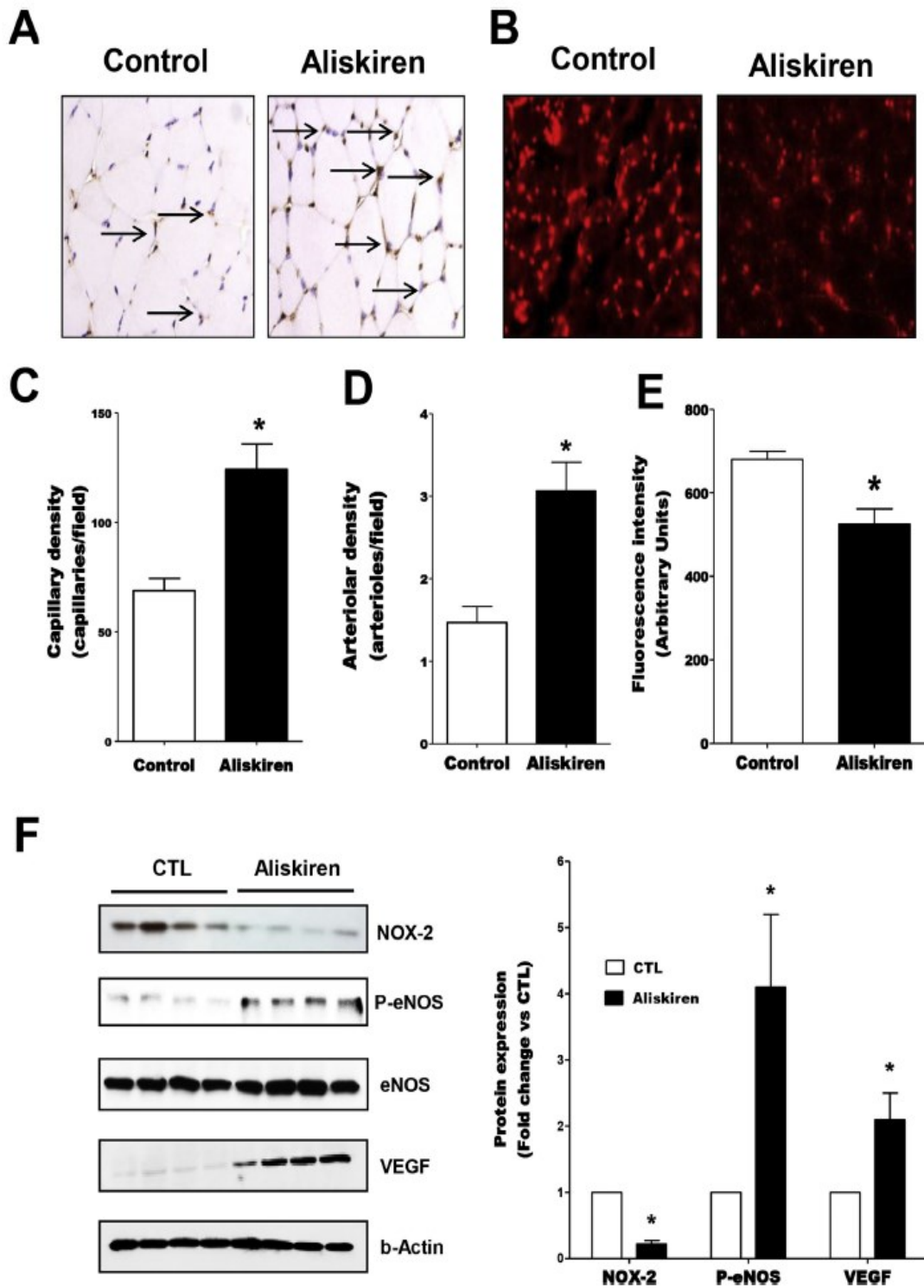


Figure 3.

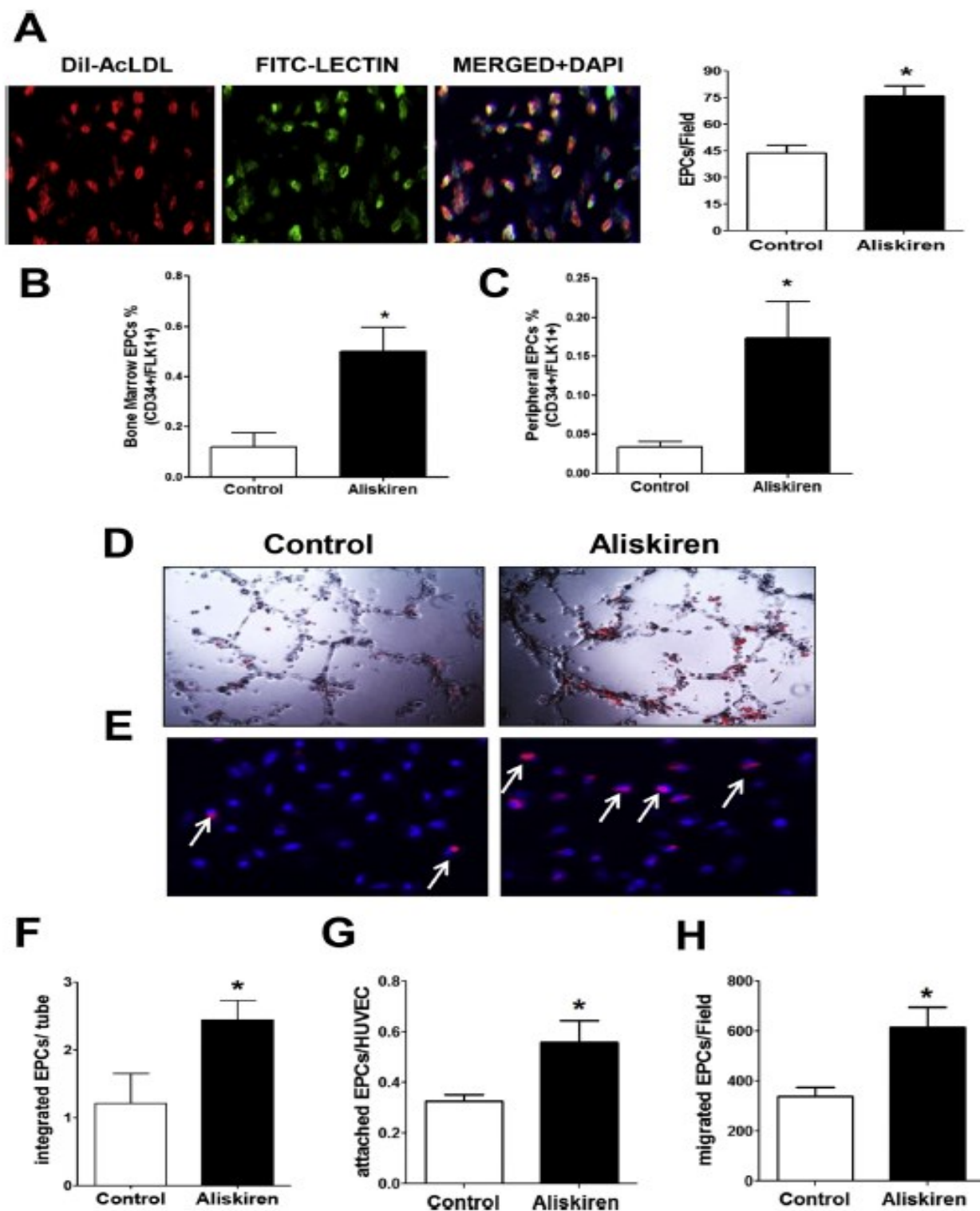


Figure 4.

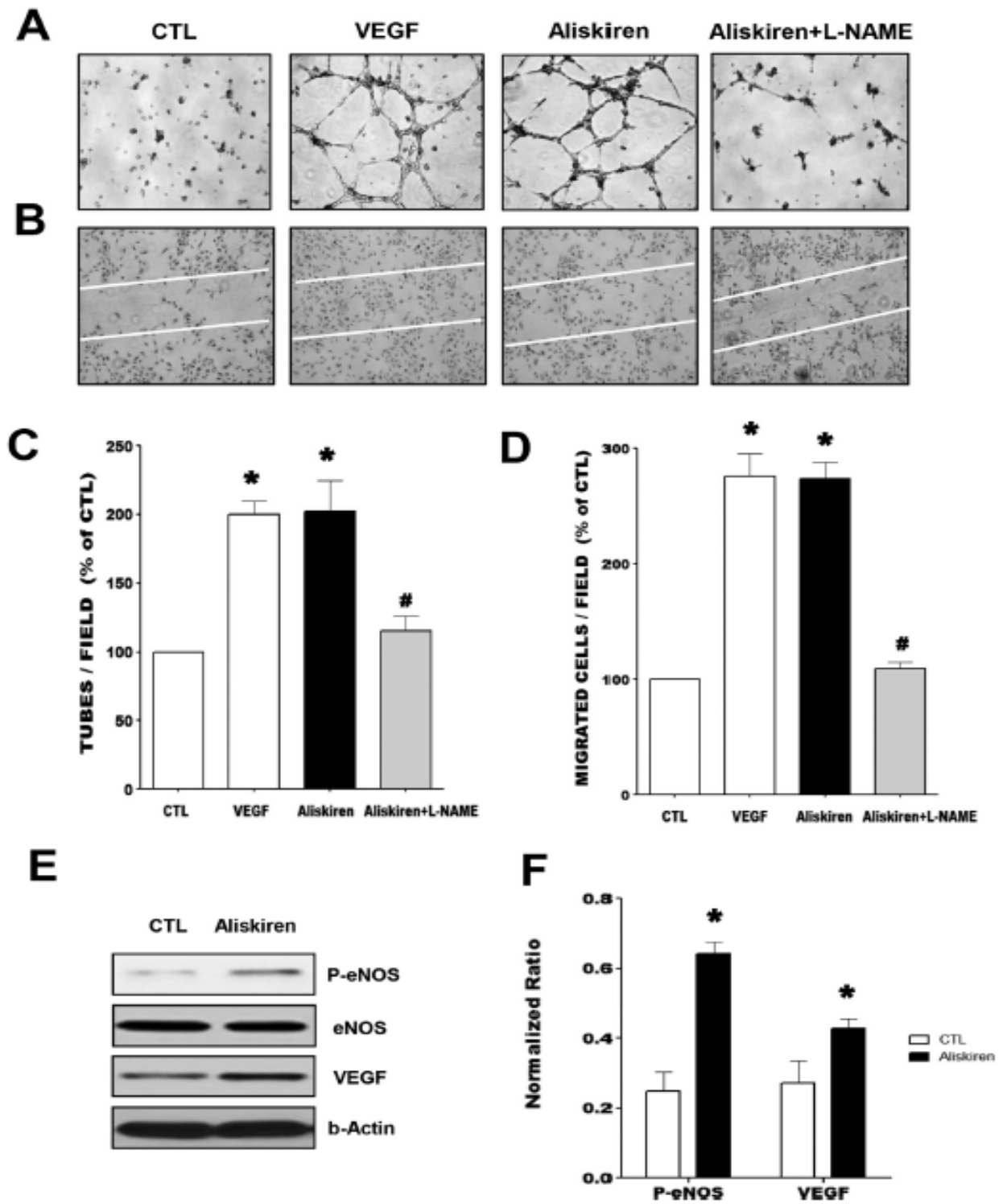
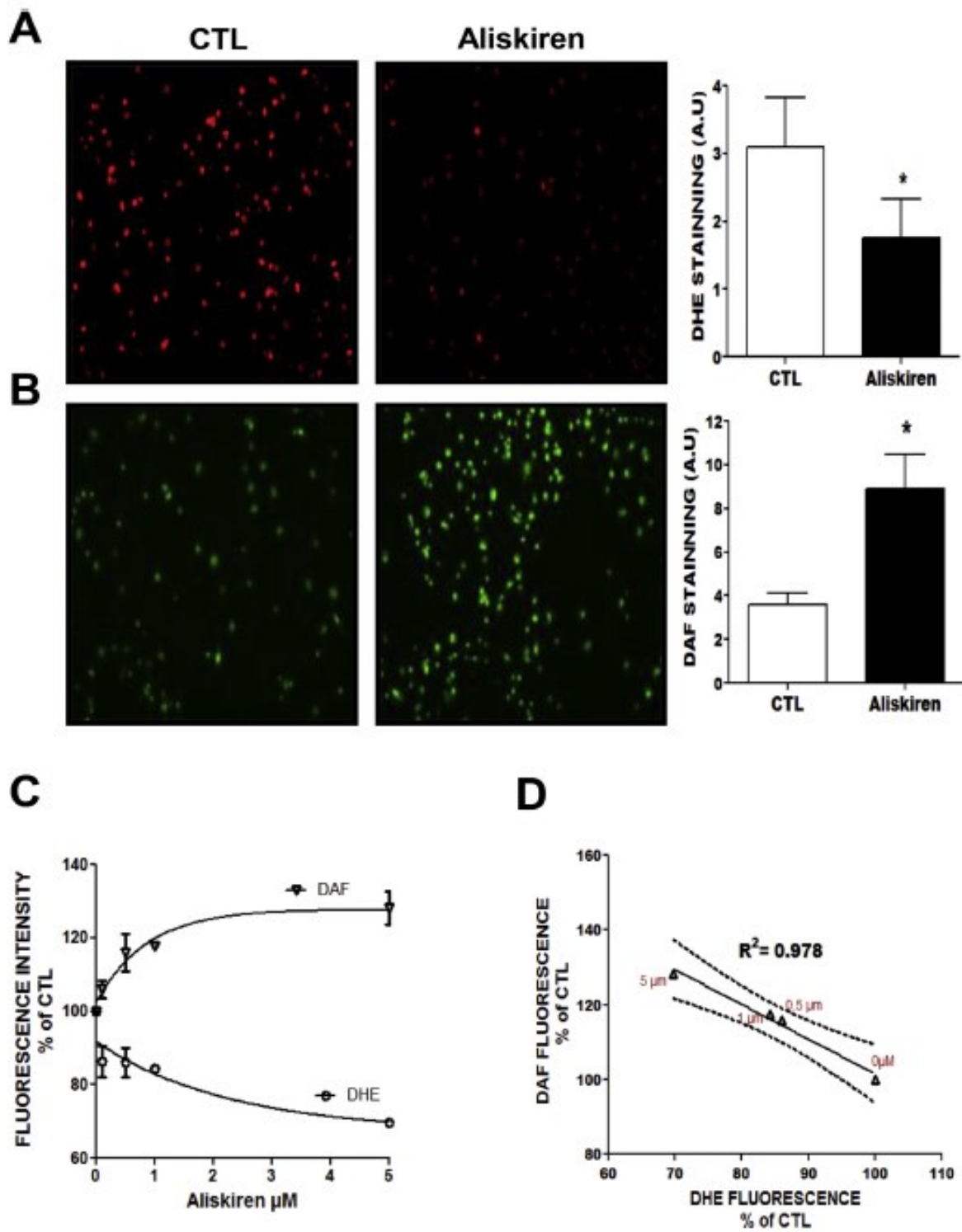


Figure 5.



2. Deuxième article

*Publié dans Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology (ATVB). 2017
May;37(5):900-908.*

**microRNA-150 modulates ischemia-induced neovascularization in
atherosclerotic conditions**

Short title: **miR-150 and Ischemia-Induced Neovascularization**

Michel Desjarlais, Sylvie Dussault, Wahiba Dhahri, Raphael Mathieu and Alain Rivard

From the Department of Cardiovascular Research
Centre Hospitalier de l'Université de Montréal
Montréal, Québec
Canada

Address for correspondence:

Alain Rivard, MD
Centre de recherche du CHUM
Tour Viger, R08.466
900 rue St-Denis
Montreal, Quebec, Canada, H2X 0A9
Tel (514)890-8000 ext:25776
alain.rivard@umontreal.ca

ABSTRACT

Objective: Hypercholesterolemia is an atherosclerotic condition that is associated with impaired neovascularization in response to ischemia. This study sought to define the role of microRNAs (miRNAs) in that pathophysiology.

Approach and Results: Next generation sequencing and qRT-PCR analyses identified miR-150 as a pro-angiogenic miRNA which expression is significantly reduced in the ischemic muscles of hypercholesterolemic ApoE-deficient (ApoE^{-/-}) mice, and in HUVECs exposed to oxLDL. Forced expression of miR-150 using a miR mimic could rescue oxLDL-mediated impairment of endothelial cell migration and tubule formation *in vitro*. In a mouse model of hindlimb ischemia, intramuscular injection of miR-150 mimic restored blood flow recuperation, vascular densities in ischemic muscles, and functional mobility in ApoE^{-/-} mice. Treatment of ApoE^{-/-} mice with miR-150 also increased the number and the activities of pro-angiogenic cells (PACs). miR-150 targets SRC kinase signaling inhibitor 1 (SRCIN1), an important regulator of Src activity. Here we found that hypercholesterolemia and oxLDL exposure are associated with increased SRCIN1 expression and decreased Src activity. However, treatment with miR-150 mimic reduces SRCIN1 expression and restores Src and downstream eNOS and Akt activities both *in vitro* and *in vivo*. We also demonstrate the interrelation between miR-150 and SRCIN1 and their importance for endothelial cell angiogenic activities.

Conclusions: Hypercholesterolemia is associated with reduced expression of miR-150, impaired Src signaling and inefficient neovascularisation in response to ischemia. Forced expression of miR-150 using a miR mimic could constitute a novel therapeutic strategy to improve ischemia-induced neovascularization in atherosclerotic conditions.

Keywords: angiogenesis; apolipoprotein; hypercholesterolemia; microRNA; neovascularization

ABBREVIATIONS:

Akt: Protein kinase B

ApoE : Apolipoprotein E

DFR: doppler flow ratios

eNOS: endothelial nitric oxide synthase

HUVECs: human umbilical vein endothelial cells

miRNA: micro RNA

oxLDL: oxidized low-density lipoprotein

PI3K: phosphoinositide 3-kinase

PAC: pro-angiogenic cell

Src: Proto-oncogene tyrosine-protein *kinase Src*

SRCIN1: Src Kinase Signaling Inhibitor 1

VEGF: vascular endothelial growth factor

INTRODUCTION

Following ischemia, one of the most important physiological responses is the capacity to develop new blood vessels (neovascularization) in order to maintain the perfusion and the integrity of tissues¹. Neovascularization necessitates the activation, the proliferation and the migration of mature endothelial cells that will extend the pre-existing vascular network (i.e. angiogenesis)². In addition to angiogenesis, it has been demonstrated that postnatal neovascularization also depends on the action of bone marrow-derived pro-angiogenic cells (PACs)^{3, 4}. PACs have been shown to reach sites of ischemia where they promote neovascularization mainly through paracrine secretion of growth factors and cytokines⁵.

Angiogenesis is modulated by the microenvironment and by different growth factors. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) has a critical rate limiting role in this process⁶, and the tyrosine kinase Src has been shown to be required during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability⁷. Once activated, Src may in turn stimulate PI3K/Akt, a pathway that is involved in endothelial cell survival, migration and angiogenesis⁸. Src also activates endothelial nitric oxide synthase (eNOS)⁹, an enzyme that has been shown to have a crucial role for endothelial cell migration, VEGF-induced angiogenesis and neovascularization after limb ischemia^{10, 11}.

It is now recognized that pathological conditions and risk factors involved in the development of atherosclerosis are also often associated with impaired neovascularization in response to ischemia¹. Hypercholesterolemia, an important cardiovascular risk factor, has been shown to be associated with impaired blood flow recuperation and angiogenic response in several animal models¹²⁻¹⁴. Even in the absence of clinically apparent atherosclerotic diseases, hypercholesterolemia by itself was also shown to reduce the number and the function of PACs in patients¹⁵. However, the precise mechanisms responsible for the detrimental effects of hypercholesterolemia on vascular function, angiogenesis and neovascularization are still largely unknown.

MicroRNAs (miRNAs) represent a novel class of endogenous non-coding small RNA molecules (20-25 nucleotides) that regulate a wide range of physiological and pathological processes. Although miRNAs are increasingly recognized as important factors involved in angiogenesis^{16, 17}, their specific role for the modulation of ischemia-induced neovascularization in atherosclerotic conditions remains largely unknown. In the present report, we identified miR-150 as a pro-angiogenic miRNA which expression is significantly reduced in hypercholesterolemic conditions. This is associated with impaired Src signaling, and inefficient neovascularisation in response to ischemia. Our results also suggest that forced expression of miR-150 could constitute a novel therapeutic strategy to improve ischemia-induced neovascularization in atherosclerotic conditions.

MATERIALS and METHODS

Cell culture

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were purchased from Life Technologies (Carlsbad, CA) and cultured in medium 200 (Life technologies) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Wisent, St-Jean-Baptiste, QC, Canada), 100 IU/ml penicillin/0.1 mg/ml streptomycin (Wisent) and low serum growth supplement (LSGS; 2% FBS, 3 ng/ml bFGF, 10 mg/ml heparin, 1 mg/ml hydrocortisone, and 10 ng/ml EGF; Life Technologies). In some experiments, HUVECs were treated for 24 hours with LDL, oxLDL or with the specific SRC inhibitor SKI-1 (0.1, 1, 10, 30 μ M, Sigma-Aldrich). LDL were isolated from human plasma via ultra-centrifugation (1.019-1.063g/cc) and oxidized using 20mM CuSO₄ (oxidant) in PBS (Biomedical Technologies). We performed a dose-response with oxLDL and found that 50 ug/ml was the optimal concentration to inhibit angiogenesis *in vitro* (matrigel assay) without affecting cell viability. Therefore the concentration of 50 ug/ml was used in all the experiments. Cells were grown at 37 °C, 5% CO₂ and 95% air, and the medium was changed every 2 days. HUVECs were passaged when they reached 90% confluence and passages 3-6 were used for all experiments. Viability was consistently found to be > 90% (Hoechst-Propidium Iodine staining).

RNA isolation and Next Generation Sequencing analyses

RNA was extracted from ischemic hindlimb muscles (1 day after surgery) using the Ambion mirVana™ miRNA isolation kit (Life Technologies) according to the manufacturer's protocol. Quantification of total RNA was made with a nanodrop and 1 ug of total RNA was used for library preparation. Quality of total RNA was assessed with the BioAnalyzer Nano (Agilent) and all samples had a RIN above 8. Library preparation was done with the Truseq Small RNA librarypreparation kit (Illumina, Cat no. RS-200-0012). 11 PCR cycles was required to amplify libraries. Libraries were quantified with a nanodrop and the quality was assessed with the BioAnalyzer High Sensitivity (Agilent). All libraries were diluted to 10nM, normalized and pooled to equimolar concentration based on Miseq v2 50 cycles using 7pM of pooled library. Sequencing was performed with the Illumina Hiseq2000 using the Hiseq Reagent Kit v3 (200 cycles, pairedend) and 1.7 nM of the pooled library. Around 70M paired-end reads was

generated per sample. Quantification includes the raw read count, as well as normalized expression level as RPM values (reads per million reads mapped) to account for the variability in the library size.

qRT-PCR evaluation of miRNA expression

50 ng of total RNA was reverse transcribed using the TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies) as described by the manufacturer. Before use, RT samples were diluted 1:5. Gene expression level was determined using Taqman MicroRNA assays (Cat. # 4427975, Life Technologies). qPCR reactions were performed using 1-5 ng of cDNA samples, using Perfecta qPCR Fastmix II (Quanta) and 2 μM of miR-150 primer. The Viia7 qPCR instrument (Life Technologies) was used to detect the amplification level and was programmed with an initial step of 20 sec at 95°C, followed by 40 cycles of: 1 sec at 95°C and 20 sec at 60°C. Relative expression ($RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$) was calculated using the Expression Suite software (Life Technologies), and normalization was done using both U6snRNA and SnoRNA202.

miRNA and siRNA transfection in HUVECs

Transfections were carried out at a concentration of 50 nM using Lipofactamine RNAiMAX Reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's protocol as previously described¹. HUVECs were transfected 24 hours with after being plated in 6-well plates with the following miRs purchased from Dharmacon (GE Healthcare Dharmacon, Lafayette, CO): miRIDIAN miR mimic negative control #1, miRIDIAN miR mimic hsa-miR150-5p, miRIDIAN anti-miR negative control #1, miRIDIAN anti-miR hsa-miR150-5p. siRNAs were purchased from Thermo fisher Scientific (Thermo fisher Scientific, Grand island, NY): silencer siRNA control #1, siRNA anti-SRCIN1. After 24 hours, the transfection medium was replaced with antibiotic-free complete M200 medium and cells were exposed or not to oxLDL for 24h. Transfection efficiency was measured using a mimic transfection control Dy547 (Dharmacon) and found to be 80-90%.

HUVECs capillary-like tube formation on Matrigel

The angiogenic activity of HUVECs was determined using the Matrigel tube formation assay as previously described². Briefly, after transfection, HUVECs were plated at a density of 20 000

cells/well in 96-well plates precoated with 50 μ l of growth factor reduced Matrigel Matrix (Becton Dickinson Labware, Bedford, MA). Capillary-like tubes were observed under a light microscope. Images were obtained at a 50x magnification, and all tubules and branches were counted.

Scratch assay

Measurement of migration was performed by an adapted scratch assay in confluent HUVECs as previously described³. The cells were transfected and grown to near confluence in 24-well plates. Mechanical disruption of the monolayer was realized by scraping with a pipette tip. The cells were then stained with crystal violet for 10 minutes at room temperature. Migration was assessed using an inverted microscope at a magnification of 200x by an investigator blinded to the experimental conditions. Three fields per well were evaluated and all experiments were performed in duplicate.

Murine ischemic hindlimb model

The protocol was approved by the Comité Institutionnel de Protection des Animaux (CIPA) of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM). 6 to 8 week-old female hypercholesterolemic ApoE^{-/-} mice (C57BL/6 background) were purchased from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) and put on a western-type diet (1.25% cholesterol, 15% cocoa butter, 0.5% sodium cholate, Teklad 90221) that was started 4 weeks before the experiments. ApoE^{-/-} mice were compared to normocholesterolemic C57BL/6 mice. Unilateral hindlimb ischemia was surgically induced after anesthesia with 2% isoflurane as previously described⁴. The hindlimb ischemic model we used is the one originally described by Coufinhal et al⁵. It involves not only the ligation of the femoral artery, but its complete removal together with all major collateral branches. As reviewed by Limbourg et al⁶, although this model precludes analysis of collateral growth, it is associated with more ischemia and more ischemia-induced angiogenesis compared to a model that involves only ligating the femoral artery. However, although major collateral branches are removed, it is possible that expansion of smaller collateral vessels not removed during surgery could contribute to increase flow to the ischemic area. Mice were injected intramuscularly with 5 mg/kg of *in vivo* ready mirVana® miRNA mimic mmumiR150-5p, or mirVana® miRNA mimic negative control #1 (Life technologies).

This dose was chosen based on preliminary experiments showing optimal transfection efficiency in muscles. miRNAs were administered in a solution of Max suppressor RNA-LANCER II (Bio Scientific, Austin, TX) according to the manufactory's recommendations. Ambulatory impairment was evaluated using a scale from 1 (normal walking) to 4 (walking with the leg dragging behind)⁷. The mice were killed at predetermined arbitrary time points after surgery with an overdose of sodium pentobarbital.

Monitoring of blood flow

Hindlimb blood flow (8-10 mice/group) was monitored with a Laser Doppler perfusion imager (LDPI) system (Moor Instrument Ltd., Axminster, UK) after anesthesia with a ketamine dexmedetomidine solution (50 mg/kg and 0.5 mg/kg, IP)⁴. Laser Doppler measurements were performed by a single observer blinded to the treatment group at days 0, 3, 7, 14 after surgery. After LDPI measurements, dexmedetomidine was antagonized with a solution of Atopamezole (1mg/kg, SC). To account for variables such as ambient light and temperature, the results are expressed as the ratio of perfusion in the left (ischemic) vs. right (non-ischemic) hindlimb

Capillary and arteriolar histochemistry

Whole ischemic hindlimbs were harvested 14 days after surgery and immediately fixed in Tissufix (Chaptec, Montreal, QC, Canada) overnight. After bones were carefully removed, 3 mm thick tissue transverse sections of the hindlimbs were cut at the level of the gastrocnemius muscle and paraffin-embedded so that the whole leg could be analyzed on each section. Identification of endothelial cells was performed by immunohistochemistry for CD31 with a rat monoclonal antibody directed against mouse CD31 (BD Pharmigen, San Diego, CA, USA). Negative control was performed by omitting the primary antibody. Arterioles were identified using an elastin stain kit (Sigma). Capillaries and arterioles were counted by a single observer blinded to the treatment regimen at a 200x magnification. Results were expressed as capillaries or arterioles per field⁴.

PACs isolation and characterization

14 days after hindlimb ischemia, mouse bone marrow mononuclear cells were isolated from the femora and tibiae by flushing the bone marrow cavities using culture medium, and kept on fibronectin-coated (Sigma, St. Louis, MO) plates. After 4 days in culture, non-adherent cells were removed by thorough washing with PBS. Adherent cells were stained with DAPI (0.5 mg/ml; Life Technologies), low-density lipoprotein (DiI-acLDL, 2.5 mg/ml for 1 h, Life Technologies) and FITC-labelled lectin BS-1 (*Bandeiraea simplicifolia*, 10 mg/ml for 1 h, Sigma, St-Louis, MO). Pro-angiogenic cells (PACs), also known as ‘Early outgrowth EPCs’ express endothelial markers but also myeloid markers such as CD45 and CD14, attesting for a probable monocytic origin. In our experiments, spindle-shaped cells were observed, and the vast majority of adherent cells (95%) were found to be double-positive for the uptake of DiI-labeled acetylated LDL and binding of FITC-labeled lectin. We have performed additional experiments to characterize our mouse bone marrow EPC population by FACS analysis and found that 83% of adherent cells express CD45, 57% CD14, 18% CXCR4, 9% CD31 and 8% Sca-1. These values are similar to previous studies in mice⁸ and consistent with a probable monocytic origin. We also found that these cells can migrate in response to VEGF stimulation and are capable of incorporating into a network of tubular-like structures when cocultured with mature endothelial cells. On the basis of these morphological and functional characteristics and in line with previous studies, these cells were characterized and referred to in the manuscript as PACs.

PACs migration assay

PACs migration was assessed using a modified Boyden chamber assay⁴. 15 000 cells in growth factor deprived medium were added to the upper chamber of a transwell insert (pore size 8 µm; Corning, Corning, NY) coated with 0,1% gelatin. The inserts were placed in a 24-well plate containing medium 200 with 50 ng/ml VEGF. After incubation for 6 h at 37 °C the cells which did not migrate were removed by wiping the upper surface with an absorbant tip. Migrated cells were fixed for 10 min with 3.7% formaldehyde and stained with hematoxilin. The number of cells that had migrated was counted in three different representative high power (200x) fields per insert. All experiments were performed in duplicate.

PACs adhesion to an endothelial monolayer

A monolayer of HUVECs (passage 4-6) was prepared in 24 well plates. HUVECs were pretreated for 16 h with tumour necrosis factor- α (1 ng/ml; BD Biosciences), fixed and stained with DAPI (0.5 mg/ml; Life Technologies). PACs were labelled with DiI-AcLDL and 15 000 cells were added to each well (2 wells/mouse) and incubated for 3 h at 37 °C. Non-attached cells were gently removed with PBS and adherent PACs were fixed with 2% paraformaldehyde and counted in three random fields per well⁴.

Incorporation of PACs into HUVECs tubules

PACs (3000) labeled 1 hour with DiI-acLDL were co-plated with HUVECs (20 000) in 96-well plates that had been precoated with 50 μ l of growth factor reduced Matrigel Matrix (Biosciences, San Diego, CA, USA) and cultured at 37°C for 6 h with 50 ng/ml of VEGF. Tubular-like structures were photographed and the number of incorporated EPCs was determined in 6 random fields. A tube was defined as a straight cellular segment connecting two cell masses (nodes). No difference in the total number of tubes or in tube length was observed between the different groups (data not shown). The data are presented as number of incorporated EPCs/tube⁹.

Western blot analysis

Protein levels were analysed by western blots in ischemic muscles homogenates and in HUVECs and PACs extracts. For total protein extraction, isolated muscles from whole hindlimbs were rinsed in PBS to remove excess blood, snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C until use. Whole-cell protein extracts were obtained after homogenization of ischemic muscles of the different groups of mice in icecold RIPA buffer (pH=8) containing 50 mM Tris-HCL, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton 100x, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS with a cocktail of proteases and phosphatases inhibitors (MiniComplete, PhosphoStop and PMSF, Roche, Bâle, Switzerland). HUVECs and PACs were lysed with 50 μ l of RIPA lysis buffer per well in 6 wells plates, harvested and sonicated. 50 μ g of protein per muscle homogenate sample and 20 μ g of protein per cells lysates sample were separated on an SDS-polyacrylamide gel and electroblotted on nitrocellulose membranes. Non-specific binding sites were blocked with 5% skim milk powder in TBS-T (50 mM Tris-HCL, 140 mM NaCL, 0.05% Tween 20) for 1 h. The membranes were probed overnight at 4°C with the following antibodies:

SRCIN1 (1:1000, SNIP/pCAP140, Cell signaling Technology, Danvers, MA), phospho-SRC and SRC (1:1000, phosphoTYR146- SRC, Cell signaling Technology, Danvers, MA), phospho-AKT and AKT (1:1000, Cell signaling Technology, Danvers, MA), phospho-eNOS and eNOS (1:1000, Cell signaling Technology, Danvers, MA), phospho-p53 and p53 (1:1000, Cell signaling Technology, Danvers, MA) or β - actin (1:2000, Santa Cruz Biotechnology). Membranes were then washed three times for 10 minutes with TBS-T and incubated with secondary antibodies conjugated with HRP (1:2000) for 1 hour and washed with TBS-T. Specific proteins were detected by chemiluminescent reaction (GE Healthcare, Piscataway, NJ) followed by exposure to Hyperfilm ECL (GE Healthcare). Protein expression was quantified using ImageJ and the results are expressed as density values normalized to the loading control (β -actin) or total protein for phosphorylated proteins (p- SRC/SRC, p-AKT/AKT, p-eNOS/eNOS, p-p53/p53).

Statistical analysis

All results are mean \pm SEM. Statistical significance was evaluated by ANOVA, followed by a Newman Keuls post hoc test. For the Laser Doppler measurements, a 2-way repeated measures ANOVA was used. A value of $P < 0.05$ was interpreted to denote statistical significance.

RESULTS

Effect of atherosclerotic conditions on miRNA expression

We used next generation sequencing (NGS) analyses to evaluate the expression of miRNAs in the ischemic muscles of hypercholesterolemic ApoE-deficient (ApoE^{-/-}) mice and in normocholesterolemic control mice. miRNAs that were significantly expressed in hindlimb muscles (at least 1000 reads per million reads mapped-RPM) and that were modulated by 20% or more were selected. As seen on **Figure 1A** and **Supplemental Figure I**, hypercholesterolemia was mainly associated with a downregulation of miRNAs in ischemic muscles. 10 miRNAs were found to be upregulated, but the 8 miRNAs most strongly upregulated are specific to mice and not found in humans. Among downregulated miRNAs, miR-150 showed the most important modulation in the ischemic muscles of ApoE^{-/-} mice (**Figure 1A** and **Supplemental Figure I**). miR-150 is present in mammals, including mice and humans. Using RT-PCR, we found that the expression of miR-150 in muscles is reduced following ischemia. Moreover, the expression of miR-150 is significantly impaired in hypercholesterolemic ApoE^{-/-} mice, both in non-ischemic and ischemic muscles (**Figure 1B**). The expression of miR-150 is also significantly reduced in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) exposed to oxLDL (**Figure 1C**), but not in HUVECs exposed to native LDL (**supplemental Figure II**). miR-150 transcription has been shown to be repressed by p53¹⁸. Our results indicate p53 is activated in the ischemic muscles of hypercholesterolemic ApoE^{-/-} mice and in HUVECs exposed to oxLDL (**supplemental Figure III**). This suggests that hypercholesterolemia and oxLDL could downregulate miR150 at least in part via p53. Interestingly, miR-150 was previously shown to enhance endothelial cell migration *in vitro*¹⁹. Therefore, in the following experiments, we focused on characterizing the specific role of miR-150 in the modulation of angiogenesis and neovascularization in atherosclerotic and hypercholesterolemic conditions.

miR-150 rescues oxLDL-induced impairment of angiogenesis in endothelial cells

To investigate the role of miR-150 *in vitro*, we performed gain-of-function experiments by transfecting HUVECs with a miRNA mimic. Transfection efficiency was established to be more than 80%, as assessed using a labelled miRNA mimic control (data not shown). As seen on

Figure 2A and 2C, exposure to oxLDL (but not native LDL, **supplemental Figure II**) reduced tube formation in HUVECs. However, treatment with miR-150 significantly improved tube formation in HUVECs exposed to oxLDL. In addition, miR-150 completely rescued oxLDL-induced impairment of cell migration in HUVECs (**Figure 2B and 2D**).

Effect of miR-150 on ischemia-induced neovascularization in atherosclerotic conditions

Hindlimb perfusion was evaluated after surgically-induced ischemia by serial Laser Doppler perfusion imaging (LDPI) studies (**Figure 3A and 3B**). Compared to controls, blood flow recuperation was significantly impaired in hypercholesterolemic ApoE^{-/-} mice at day 14 after surgery (Doppler flow ratio (DFR) 0.39±0.03 vs. 0.55±0.05; p<0.05). However, ApoE^{-/-} mice treated intramuscularly with a miR-150 mimic showed dramatic improvements of perfusion (0.71±0.07 vs. 0.39±0.03; p<0.05) and were therefore completely protected against hypercholesterolemia-induced impairment of blood flow recuperation (**Figure 3B**). Clinically, this was correlated with a reduction of ambulatory impairment in mice treated with miR-150 mimic (**Figure 3C**). A similar effect was observed at the microvascular level. Hypercholesterolemic ApoE^{-/-} mice exhibited reduced capillary and arteriolar densities in ischemic muscles (**Figure 3D-F**). However, intramuscular treatment with miR-150 mimic significantly increased vascular densities in the ischemic muscles of ApoE^{-/-} mice.

miR-150 rescues the number and the functional activities of PACs

PACs have been shown to reach sites of neovascularization where they can contribute to the formation of new blood vessels⁵. However the number and the functional activities of PACs are impaired in patients presenting atherosclerotic conditions, including hypercholesterolemia¹⁵. Here we found that the number of bone marrow-derived PACs is significantly reduced in hypercholesterolemic ApoE^{-/-} mice (**Figure 4A and 4B**). Moreover, the functional activities of PACs including migration (**Figure 4C**), integration into endothelial cell tubules (**Figure 4D**) and attachment to endothelial cells (**Figure 4E**) were all impaired in ApoE^{-/-} mice. However, treatment with miR-150 mimic restored the number and the functional activities of PACs in hypercholesterolemic ApoE^{-/-} mice (**Figure 4A-F**).

miR-150 promotes angiogenesis via activation of Src pathway

miR-150 has previously been shown to directly target SRC kinase signaling inhibitor 1 (SRCIN1), an important regulator of Src activity²⁰. Src is a tyrosine kinase that is known to be required during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability⁷. Here we found that SRCIN1 expression is significantly increased in the ischemic muscles of hypercholesterolemic ApoE^{-/-} mice (**Figure 5A-B**). This is associated with a reduced activation of Src, together with an inhibition of Src downstream signaling including Akt and eNOS. Interestingly, Src angiogenic pathway is completely restored in ApoE^{-/-} mice that are treated with a miR-150 mimic (**Figure 5A-B**). Similar findings are also observed in HUVECs, where exposure to atherosclerotic oxLDL leads to increased expression of SRCIN1 and inhibition of Src, Akt and eNOS activities (**Figure 5C**). However, miR-150 treatment can reduce SRCIN1 expression and restore Src signaling pathway in HUVECs exposed to oxLDL (**Figure 5D**). We found that the angiogenic activities of miR-150 in HUVECs (tube formation and cell migration) are abolished when the cells are also treated with the specific Src kinase inhibitor SKI-1 (**Figure 5E-F**). In addition, inhibition of miR150 using an antimiR increases SRCIN1 expression and reduces endothelial cell migration and tube formation (**Figure 6A-B**). We also demonstrate that similarly to miR150 induction, down-regulation of SRCIN1 using siRNA can restore Src pathway and angiogenic functions (migration, tube formation) in endothelial cells exposed to oxLDL (**Figure 6C-D**). Our data also suggest that Src pathway is involved in PACs, as we found that isolated PACs exposed to oxLDL exhibit increased expression of SRCIN1 and impaired activation of Src that can be rescued by forced expression of miR-150 (see **supplemental Figure IV**).

DISCUSSION

To our knowledge, the present study is the first one to document the effect of hypercholesterolemia on the modulation of microRNAs in ischemic tissues. It is also the first demonstration of the essential role of a microRNA (miR-150) for the modulation of angiogenesis and ischemia-induced neovascularization during atherosclerotic conditions. Although miRNAs are increasingly recognized as essential factors involved in a variety of physiological processes, their specific role for the modulation neovessel development during different pathological conditions remains to be defined. Moreover, the effect of cardiovascular risk factors on the expression levels of miRNAs, and how this might influence the angiogenic response following ischemia is currently unknown. Patients with atherosclerotic diseases often exhibit several conditions that have been shown to impair neovascularization in response to ischemia¹. This could at least in part explain the lack of efficacy of pro-angiogenic therapies in atherosclerotic patients, compared to the positive results obtained in young and healthy animals²¹. Hypercholesterolemia is one of the most important conditions associated with the development of atherosclerotic diseases. It is involved in the initiation and growth of the atherosclerotic lesion, which progressively causes vascular obstruction, leading to acute or chronic tissue ischemia²². On the other hand, hypercholesterolemia has also been associated with defective reparative processes occurring in response to ischemia. For instance, reduced ischemia-induced neovascularization has been described in several hypercholesterolemic animal models^{12-14, 23}. Moreover, the number and the functional activities of PACs are reduced in hypercholesterolemic patients with or without clinically apparent atherosclerotic diseases^{15, 24}. However, the specific mechanisms that are involved in the inhibition of neovascularization and PAC function by hypercholesterolemia are not completely understood. The present study uncovered a novel mechanism by which modulation of miRNA expression could contribute to inhibit ischemia-dependent reparative responses in hypercholesterolemic conditions. It demonstrates for the first time that reduced expression of miR-150 in atherosclerotic conditions leads to impairment of neovascularization and blood flow recuperation after tissue ischemia.

miR-150 is evolutionarily conserved and found in mammals, including mice and humans. Recent evidence suggests that miR-150 is involved in the regulation of embryogenesis²⁵ as well as normal and malignant haematopoiesis²⁶. miR-150 has also been shown to promote the proliferation and migration of cancer cells²⁰, and is thought to play an important role in solid tumours²⁷. Interestingly, miR-150 was recently shown to be involved in endothelial cell differentiation and vasculogenesis²⁸. In the current study, we demonstrate that miR-150 is also crucial for the physiological response to tissue ischemia in atherosclerotic conditions. We found that the expression of miR-150 is reduced both in endothelial cells exposed to oxLDL and in the ischemic muscles of hypercholesterolemic mice. Although we did not specifically investigate the mechanism(s) involved in the downregulation of miR150, it was previously shown that p53 binds to regulatory sequences in the upstream of miR-150 and represses its transcription¹⁸. We found that p53 is activated in the ischemic muscles of hypercholesterolemic ApoE^{-/-} mice and in HUVECs exposed to oxLDL. This suggests that hypercholesterolemia and oxLDL could downregulate miR150 at least in part via p53. Interestingly, the expression of miR-150 is reduced in the serum of hypercholesterolemic patients²⁹ and in patients with coronary artery diseases (CAD)³⁰. In the current study, supplementation of miR-150 with a miR mimic could restore the angiogenic properties of endothelial cells exposed to oxLDL. More importantly, using a well characterized model of hindlimb ischemia, we show that miR-150 supplementation could have important therapeutic effects in the setting of ischemia. Hypercholesterolemic animals treated with miR-150 demonstrated significant improvement of blood flow recovery and overall mobility compared to controls. At the microvascular level, this was associated with increased capillary and arteriolar densities in ischemic muscles of treated animals. These pro-angiogenic effects of miR-150 are consistent with previous studies demonstrating that secreted monocytic miR-150 enhances endothelial cell migration *in vitro*¹⁹ and promotes angiogenesis *in vivo* in a matrigel plug assay³¹. Neutralization of miR-150 has also been shown to reduce angiogenesis and tumour development *in vivo*³². On the other hand, other studies have reported that miR-150 could have anti-angiogenic effects in specific conditions such as poststroke cerebral angiogenesis³³ and pathological ocular neovascularization³⁴. Globally, these results indicate that the physiological effects of miR-150 might vary according to the pathological situation and the specific cell type studied.

The mechanism by which miR-150 modulates angiogenesis and neovascularization after ischemia appears to involve Src pathway. One of the direct targets of miR-150 is SRC kinase signaling inhibitor 1 (SRCIN1)²⁰. SRCIN1, also known as p140 Cas-associated protein (p140CAP), is an important regulator of Src. It can shift the balance from active to inactive Src by phosphorylating the inhibitory Tyr527³⁵. In cancer cells, the silencing of SRCIN1 favours cell proliferation, motility and invasion *in vitro* as well as tumour growth *in vivo*³⁵. Interestingly, miR-150 was recently shown to promote the proliferation and migration of lung cancer cells by targeting SRCIN1²⁰. The specific role of SRCIN1 in angiogenesis and ischemia-induced neovascularization is unknown. However, Src is recognized as an important modulator of VEGF-induced angiogenesis⁷. Moreover, Src activation can stimulate other important pathways that are involved in angiogenesis and neovascularization such as PI3K/Akt, and eNOS⁹. In the current study, we found that reduced miR-150 levels correlated with increased expression of SRCIN1 in the ischemic muscles of hypercholesterolemic mice and in HUVECs exposed to oxLDL. Increased levels of SRCIN1 were in turn associated with a significant reduction of phosphorylated Src. Importantly, miR-150 treatment could reduce SRCIN1 expression and restore Src activity, both *in vitro* and *in vivo*. We also demonstrate that miR-150 supplementation can stimulate Src/Akt/eNOS pathways and improve angiogenesis and neovascularization in these conditions. The importance of Src pathway is also illustrated by the fact that a direct inhibitor of Src abolished the pro-angiogenic activities of miR-150 in endothelial cells. We also found that inhibition of miR150 increases SRCIN1 expression and reduces endothelial cell migration and tube formation. Moreover, similarly to miR150 induction, down-regulation of SRCIN1 using siRNA can restore Src pathway and angiogenic functions in endothelial cells exposed to oxLDL. Taken together, our results suggest that reduced expression of miR-150 in atherosclerotic conditions increases SRCIN1 levels, which leads to impaired Src activity and defective angiogenesis. It is important to recognize however that miRNAs may have dozens or even hundreds of targets. Therefore, our study does not rule out the possibility that apart from SRCIN1, other factors could contribute to the pro-angiogenic effects of miR-150. For instance, in other experimental conditions, miR-150 has previously been shown to promote angiogenesis by directly or indirectly modulating targets such as c-myb¹⁹ and VEGF³².

The results of the present study suggest that PACs could also be involved in the modulation of neovascularization by miR-150. PACs have been shown to reach ischemic tissues where they can improve neovascularization either directly by incorporating into new vessels, or more often indirectly through paracrine secretion of angiogenic growth factors⁵. Here we found that both the number and the functional activities of PACs were reduced in hypercholesterolemic mice. However, treatment with miR-150 mimic following surgically-induced hindlimb ischemia could restore the number and the functional activities of PACs (migration, adhesion, integration into tubules) in these animals. miRNAs are increasingly recognized as important regulators of stem and progenitor cells³⁶. The stimulating effect of miR-150 on PACs in the current study is consistent with previous reports demonstrating the importance of this miRNA for the development of cell lineages involved in immune response³⁷ and vascular development²⁸. The specific mechanisms responsible for the modulation of PAC functions by miR-150 remain to be determined. Isolated PACs exposed to oxLDL exhibit increased expression of SRCIN1 and impaired activation of Src that can be rescued by forced expression of miR-150. Therefore, similarly to what was found in mature endothelial cells, it is possible that Src pathway is also involved in the modulation of PACs by miR-150. For instance, a critical role of Src family kinase was recently described in SDF-1/CXCR4-mediated bone marrow progenitor cell recruitment to the ischemic heart³⁸. Moreover, Src can activate endothelial nitric oxide synthase (eNOS)⁹, a factor that has been shown to have an essential role for the modulation of PAC number and function³⁹. Therefore, it is plausible that miR-150 improves PAC functions by stimulating Src pathway, an effect that could be impaired in atherosclerotic conditions such as hypercholesterolemia.

In conclusion, our study demonstrates for the first time that reduced miR-150 expression contributes to reduce angiogenesis and ischemia-induced neovascularization in atherosclerotic conditions. The mechanism involves increased expression of SRCIN1, downstream inhibition of the angiogenic Src pathway, together with impaired angiogenic activities of mature endothelial cells and PACs. Our results also suggest that forced expression of miR-150 using a miR mimic could constitute a novel therapeutic strategy to improve ischemia-induced neovascularization in atherosclerotic conditions such as hypercholesterolemia.

Sources of Funding

This study was supported by grants from the Canadian Institute of Health Research (CIHR MOP-123490) and the Heart and Stroke Foundation of Canada (HSFC) to AR.

Disclosures:

None.

REFERENCES

1. Losordo DW, Dimmeler S. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease: Part 1: Angiogenic cytokines. *Circulation*. 2004;109:2487-2491
2. D'Amore PA, Thompson RW. Mechanisms of angiogenesis. *Annu Rev Physiol*. 1987;49:453-464
3. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275:964-967
4. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*. 1999;85:221-228
5. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: Characterization and role in vascular biology. *Circ Res*. 2004;95:343-353
6. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (vegf) and its receptors. *Faseb J*. 1999;13:9-22.
7. Eliceiri BP, Paul R, Schwartzberg PL, Hood JD, Leng J, Cheresch DA. Selective requirement for src kinases during vegf-induced angiogenesis and vascular permeability. *Mol Cell*. 1999;4:915-924
8. Jiang BH, Zheng JZ, Aoki M, Vogt PK. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling mediates angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:1749-1753
9. Fulton D, Church JE, Ruan L, Li C, Sood SG, Kemp BE, Jennings IG, Venema RC. Src kinase activates endothelial nitric-oxide synthase by phosphorylating tyr-83. *J Biol Chem*. 2005;280:35943-35952
10. Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A, Izumi Y, Ang J, Yun CO, Buerk DG, Huang PL, Jain RK. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:2604-2609.
11. Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, Kalka C, Kearney M, Chen D, Symes JF, Fishman MC, Huang PL, Isner JM. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest*. 1998;101:2567-2578
12. Van Belle E, Rivard A, Chen D, Silver M, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Bauters C, Isner JM. Hypercholesterolemia attenuates angiogenesis but does not preclude augmentation by angiogenic cytokines. *Circulation*. 1997;96:2667-2674

13. Couffignal T, Silver M, Kearney M, Sullivan A, Witzensichler B, Magner M, Annex B, Peters K, Isner JM. Impaired collateral vessel development associated with reduced expression of vascular endothelial growth factor in apoe^{-/-} mice. *Circulation*. 1999;99:3188-3198
14. Tirziu D, Moodie KL, Zhuang ZW, Singer K, Helisch A, Dunn JF, Li W, Singh J, Simons M. Delayed arteriogenesis in hypercholesterolemic mice. *Circulation*. 2005;112:2501-2509
15. Chen JZ, Zhang FR, Tao QM, Wang XX, Zhu JH. Number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood in patients with hypercholesterolaemia. *Clin Sci (Lond)*. 2004;107:273-280
16. Urbich C, Kuehbach A, Dimmeler S. Role of micornas in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovasc Res*. 2008;79:581-588
17. Suarez Y, Sessa WC. Micornas as novel regulators of angiogenesis. *Circ Res*. 2009;104:442-454
18. Ghose J, Bhattacharyya NP. Transcriptional regulation of micorna-100, -146a, and -150 genes by p53 and nfkappab p65/rela in mouse striatal sthhd(q7)/ hdh(q7) cells and human cervical carcinoma hela cells. *RNA Biol*. 2015;12:457-477
19. Zhang Y, Liu D, Chen X, Li J, Li L, Bian Z, Sun F, Lu J, Yin Y, Cai X, Sun Q, Wang K, Ba Y, Wang Q, Wang D, Yang J, Liu P, Xu T, Yan Q, Zhang J, Zen K, Zhang CY. Secreted monocytic mir-150 enhances targeted endothelial cell migration. *Mol Cell*. 2010;39:133-144
20. Cao M, Hou D, Liang H, Gong F, Wang Y, Yan X, Jiang X, Wang C, Zhang J, Zen K, Zhang CY, Chen X. Mir-150 promotes the proliferation and migration of lung cancer cells by targeting src kinase signalling inhibitor 1. *European journal of cancer*. 2014;50:1013-1024
21. Annex BH. Therapeutic angiogenesis for critical limb ischaemia. *Nat Rev Cardiol*. 2013;10:387-396
22. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115-126
23. Boodhwani M, Nakai Y, Mieno S, Voisine P, Bianchi C, Araujo EG, Feng J, Michael K, Li J, Sellke FW. Hypercholesterolemia impairs the myocardial angiogenic response in a swine model of chronic ischemia: Role of endostatin and oxidative stress. *Ann Thorac Surg*. 2006;81:634-641
24. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res*. 2001;89:E1-7

25. Lin YC, Kuo MW, Yu J, Kuo HH, Lin RJ, Lo WL, Yu AL. C-myb is an evolutionary conserved mir-150 target and mir-150/c-myb interaction is important for embryonic development. *Mol Biol Evol.* 2008;25:2189-2198
26. He Y, Jiang X, Chen J. The role of mir-150 in normal and malignant hematopoiesis. *Oncogene.* 2014;33:3887-3893
27. Wang F, Ren X, Zhang X. Role of microrna-150 in solid tumors. *Oncol Lett.* 2015;10:11-16
28. Luo Z, Wen G, Wang G, Pu X, Ye S, Xu Q, Wang W, Xiao Q. Microrna-200c and -150 play an important role in endothelial cell differentiation and vasculogenesis by targeting transcription repressor zeb1. *Stem Cells.* 2013;31:1749-1762
29. Karolina DS, Tavintharan S, Armugam A, Sepramaniam S, Pek SL, Wong MT, Lim SC, Sum CF, Jeyaseelan K. Circulating mirna profiles in patients with metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97:E2271-2276
30. Weber M, Baker MB, Patel RS, Quyyumi AA, Bao G, Searles CD. Microrna expression profile in cad patients and the impact of acei/arb. *Cardiol Res Pract.* 2011;2011:532915
31. Li J, Zhang Y, Liu Y, Dai X, Li W, Cai X, Yin Y, Wang Q, Xue Y, Wang C, Li D, Hou D, Jiang X, Zhang J, Zen K, Chen X, Zhang CY. Microvesicle-mediated transfer of microrna-150 from monocytes to endothelial cells promotes angiogenesis. *J Biol Chem.* 2013;288:23586-23596
32. Liu Y, Zhao L, Li D, Yin Y, Zhang CY, Li J, Zhang Y. Microvesicle-delivery mir-150 promotes tumorigenesis by up-regulating vegf, and the neutralization of mir-150 attenuate tumor development. *Protein & cell.* 2013;4:932-941
33. He QW, Li Q, Jin HJ, Zhi F, Suraj B, Zhu YY, Xia YP, Mao L, Chen XL, Hu B. Mir-150 regulates poststroke cerebral angiogenesis via vascular endothelial growth factor in rats. *CNS neuroscience & therapeutics.* 2016;22:507-517
34. Liu CH, Sun Y, Li J, Gong Y, Tian KT, Evans LP, Morss PC, Fredrick TW, Saba NJ, Chen J. Endothelial microrna-150 is an intrinsic suppressor of pathologic ocular neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112:12163-12168
35. Di Stefano P, Damiano L, Cabodi S, Aramu S, Tordella L, Praduroux A, Piva R, Cavallo F, Forni G, Silengo L, Tarone G, Turco E, Defilippi P. P140cap protein suppresses tumour cell properties, regulating csk and src kinase activity. *EMBO J.* 2007;26:2843-2855
36. Heinrich EM, Dimmeler S. Micrnas and stem cells: Control of pluripotency, reprogramming, and lineage commitment. *Circ Res.* 2012;110:1014-1022
37. Bezman NA, Chakraborty T, Bender T, Lanier LL. Mir-150 regulates the development of nk and inkt cells. *J Exp Med.* 2011;208:2717-2731

38. Cheng M, Huang K, Zhou J, Yan D, Tang YL, Zhao TC, Miller RJ, Kishore R, Losordo DW, Qin G. A critical role of src family kinase in sdf-1/cxcr4-mediated bone-marrow progenitor cell recruitment to the ischemic heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;81:49-53
39. Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ihling C, Technau-Ihling K, Zeiher AM, Dimmeler S. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med.* 2003;9:1370-1376

REFERENCES of MATERIALS and METHODS

1. Bonauer A, et al. MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice. *Science.* 2009;324:1710-1713
2. Michaud SE, et al. Cigarette smoke exposure impairs vegf-induced endothelial cell migration: Role of no and reactive oxygen species. *J Mol Cell Cardiol.* 2006;41:275-284
3. Dussault S, et al. Sildenafil increases endothelial progenitor cell function and improves ischemia-induced neovascularization in hypercholesterolemic apolipoprotein e-deficient mice. *Hypertension.* 2009;54:1043-1049
4. Maingrette, et al. Psychological stress impairs ischemia-induced neovascularization: Protective effect of fluoxetine. *Atherosclerosis.* 2015;241:569-578
5. Couffinhal T, et al. Mouse model of angiogenesis. *Am J Pathol.* 1998;152:1667-1679
6. Limbourg A, et al. Evaluation of postnatal arteriogenesis and angiogenesis in a mouse model of hind-limb ischemia. *Nat Protoc.* 2009;4:1737-1746
7. Turgeon J, et al. Fish oil enriched diet protects against ischemia by improving angiogenesis, endothelial progenitor cell function and postnatal neovascularization. *Atherosclerosis.* 2013;229:295-303
8. Huang PH, et al. Matrix metalloproteinase-9 is essential for ischemia-induced neovascularization by modulating bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29:1179-1184
9. Groleau J, et al. Essential role of copper-zinc superoxide dismutase for ischemia-induced neovascularization via modulation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30:2173-2181

HIGHLIGHTS

- Development of new blood vessels after ischemia (neovascularization) is impaired in patients presenting atherosclerotic conditions, including hypercholesterolemia.
- microRNA-150 is reduced in atherosclerotic conditions, which leads to inactivation of Src pathway and impaired angiogenic activities of mature endothelial cells and pro-angiogenic cells (PACs).
- Forced expression of miR-150 using a miR mimic could constitute a novel therapeutic strategy to improve ischemia-induced neovascularization in atherosclerotic conditions.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Effect of atherosclerotic conditions on miRNA expression. **A.** Relative expression of miRNAs (pool of 3 mice/group) in the ischemic muscles of hypercholesterolemic ApoE knockout mice (HC) and in normocholesterolemic control mice (NC) as assessed by next generation sequencing (NGS). **B-C.** Relative expression of miR-150 in non-ischemic muscles (n=6) and in ischemic muscles (n=3) of NC and HC mice (**B**) and in HUVECs exposed or not to 50 µg/ml of oxLDL (**C**, n=3) as quantified by real-time qPCR. CTL=controls. Data are mean ± SEM. * $P < 0.05$ vs. CTL or non-ischemic NC, # $P < 0.05$ vs. ischemic NC.

Figure 2: Effect of oxLDL exposure and miR-150 treatment on angiogenesis in endothelial cells. **A-C.** Evaluation of angiogenesis *in vitro* using a matrigel assay in HUVECs exposed or not to oxLDL (50 µg/ml) and treated or not with miR-150 mimic. **B-D.** Evaluation of cell migration *in vitro* using a scratch assay in HUVECs exposed or not to oxLDL (50 µg/ml) and treated or not with miR-150 mimic. Control groups (CTL and oxLDL) were treated with a scrambled miR mimic control. Data are mean ± SEM (n=4). * $P < 0.05$ vs. CTL; # $P < 0.05$ vs. oxLDL. Scale bar=100 µm.

Figure 3: Effect of hypercholesterolemia and miR-150 treatment on ischemia-induced neovascularization. Representative results (**A**) and quantification (**B**) of Laser Doppler measurements after hindlimb ischemia in normocholesterolemic control mice (NC) and hypercholesterolemic ApoE knockout mice (HC) treated or not with miR-150. Control groups (NC and HC) were treated with a scrambled miR mimic control. A color scale illustrates blood flow variations from minimal (dark blue) to maximal (red) values. Arrows indicate left ischemic hindlimbs. **C.** Evaluation of ambulatory impairment in the different groups. **D-F.** Representative images of CD31 immunostaining (**D**) and quantification of capillaries (**E**) and arterioles (**F**) in ischemic muscles of the different groups. Negative control (insert in NC) was performed by omitting the primary CD31 antibody. Data are mean ± SEM (n=8/group). * $P < 0.05$ vs. NC; # $P < 0.05$ vs. HC. Scale bar=50 µm.

Figure 4: Effect of hypercholesterolemia and miR-150 treatment on PAC number and function. Representative pictures (A) and quantification (B) of triple-stained PACs (DAPI, BS-1 lectin-FITC and DiI-acLDL) isolated 14 days after hindlimb ischemia in normocholesterolemic control mice (NC) and hypercholesterolemic ApoE knockout mice (HC) treated or not with miR-150. Control groups (NC and HC) were treated with a scrambled miR mimic control. C. VEGF-induced PAC migration was assessed using a modified Boyden chamber assay. D-E. Representative pictures and quantification of PAC (red) integration into HUVEC tubules in matrigel (D) and adhesion to a HUVEC monolayer (E) in the different groups. Data are mean \pm SEM (n=8/group). * P <0.05 vs. NC; # P <0.05 vs. HC. Scale bar=50 μ m (A) and 100 μ m (D and E).

Figure 5: miR-150 promotes angiogenesis via activation of Src pathway. A-D. Representative western blots and quantitative analyses of SRCIN1, P-Src, P-Akt and P-eNOS expression in the ischemic muscles of normocholesterolemic control mice (NC) and hypercholesterolemic ApoE knockout mice (HC) treated or not with miR-150 (n=5/group) (A-B) and in HUVECs treated or not with oxLDL and miR-150 (n=3) (C-D). Data are mean \pm SEM. * P <0.05 vs. CTL; # P <0.05 vs. HC. E-F. Representative images (E) and quantification (F) of tube formation and cell migration in HUVECs treated or not with miR-150 and increasing concentrations of the specific Src kinase inhibitor SKI-1 (n=3). * P <0.05 vs. cells treated with miR-150 only. Scale bar=100 μ m.

Figure 6: Interrelation between miR-150 and SRCIN1 and their role for endothelial cell angiogenic activities. A-B. Western blot analyses of SRCIN1 and P-Src (A) and quantitative analyses of tube formation and cell migration (B) in HUVECs transfected with anti-miR150 or anti-miR control (CTL). C-D. Western blots analyses of SRCIN1 and P-Src (C) and quantitative analyses of tube formation and cell migration (D) in HUVECS treated with oxLDL and transfected with siSrambled (siCTL) or siSRCIN1. Data are mean \pm SEM (n=3). * P <0.05 vs. CTL. Scale bar=100 μ m.

Supplemental Figure I. Detailed list of the relative expression of miRNAs in the ischemic muscles of hypercholesterolemic ApoE knockout mice (HC) compared to normocholesterolemic control mice (NC), as assessed by next generation sequencing (NGS).

Supplemental Figure II. Effect of native LDL on miR-150 expression and angiogenesis in HUVECs. Evaluation of miR-150 expression by RT-PCR (A), tube formation in a matrigel assay (B) and cell migration in scratch assay (C) in HUVECs exposed or not to 50 µg/ml of native LDL. Data are mean ± SEM (n=3).

Supplemental Figure III. Effect of hypercholesterolemia and oxLDL on p53 activation in ischemic muscles and HUVECs. A. Western blot analysis of phospho-p53 in ischemic muscles of normocholesterolemic mice (NC) and hypercholesterolemic mice (HC), 3 days after surgery. B. Western blot analysis of phospho-p53 in HUVECs exposed or not to oxLDL (50 µg/ml). Data are mean ± SEM (n=5). * $P < 0.05$ vs CTL or NC.

Supplemental Figure IV. Effect of oxLDL exposure and miR-150 treatment on Src pathway in PACs. Western blot analyses of SRCIN1, phospho-Src and phospho-eNOS in PACs exposed or not to oxLDL (50 µg/ml) and treated or not with miR-150 mimic *in vitro*. Data are mean ± SEM (n=3). * $P < 0.05$ vs CTL; # $P < 0.05$ vs. oxLDL

Figure 1.

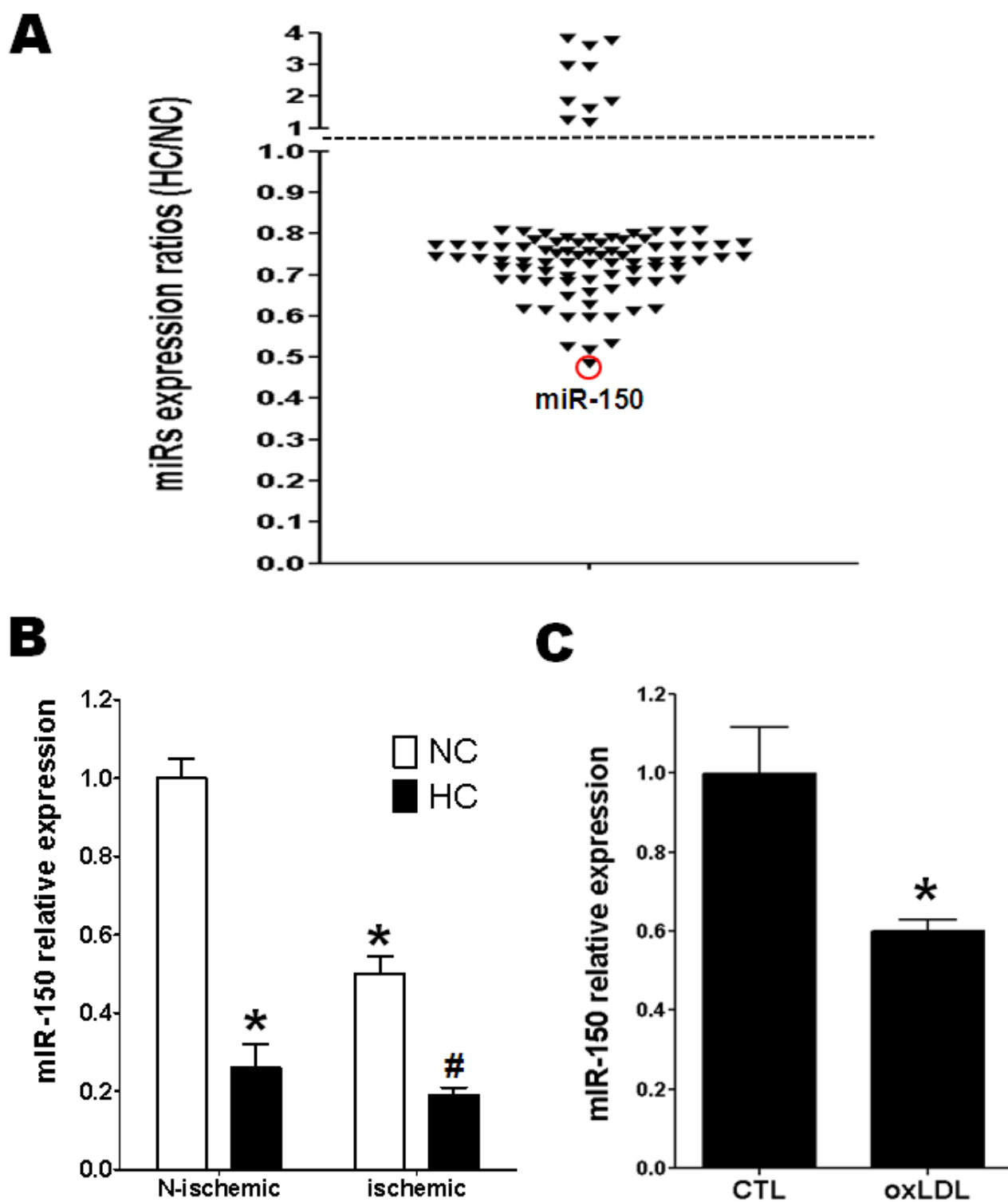


Figure 2.

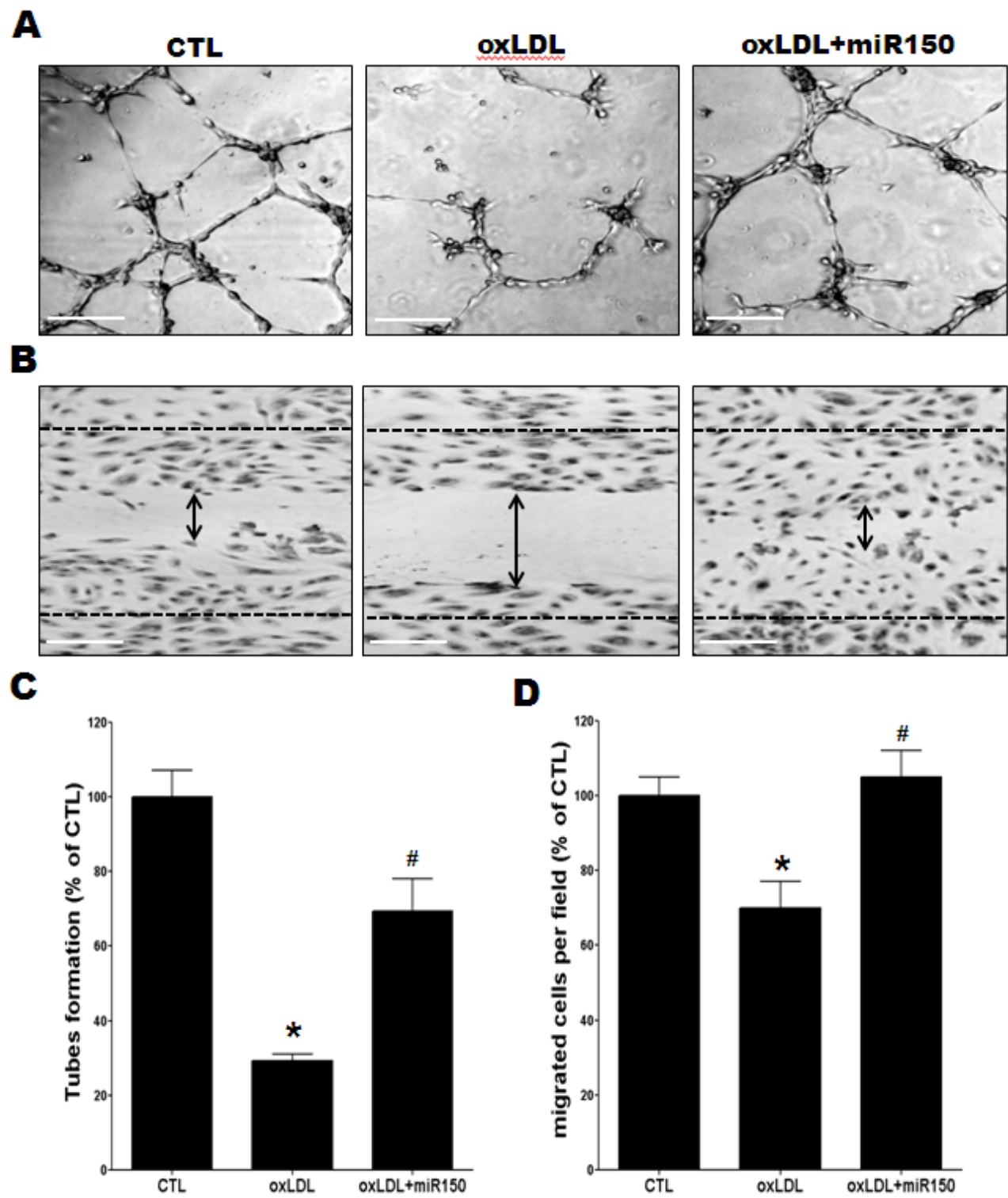


Figure 3.

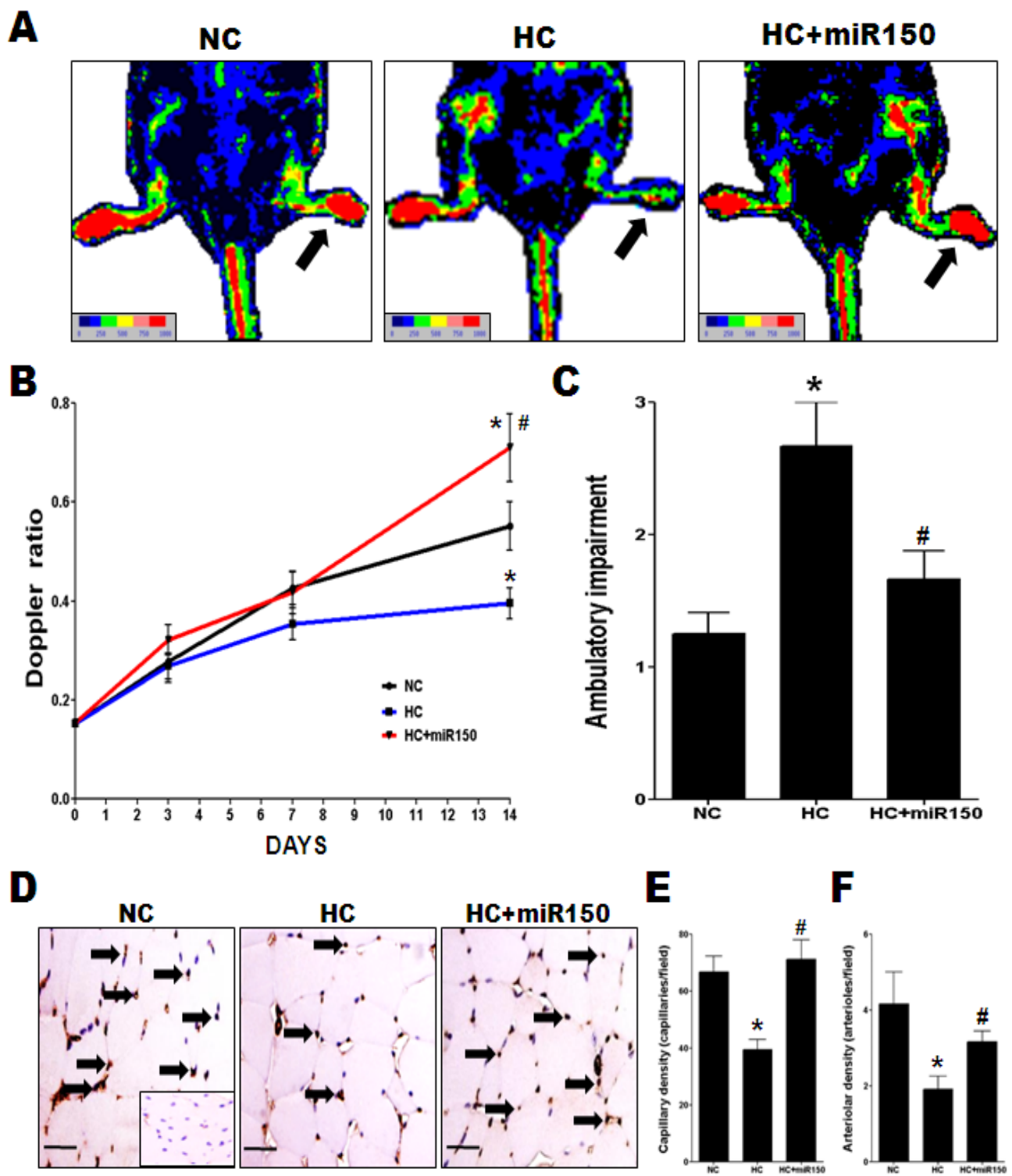


Figure 4.

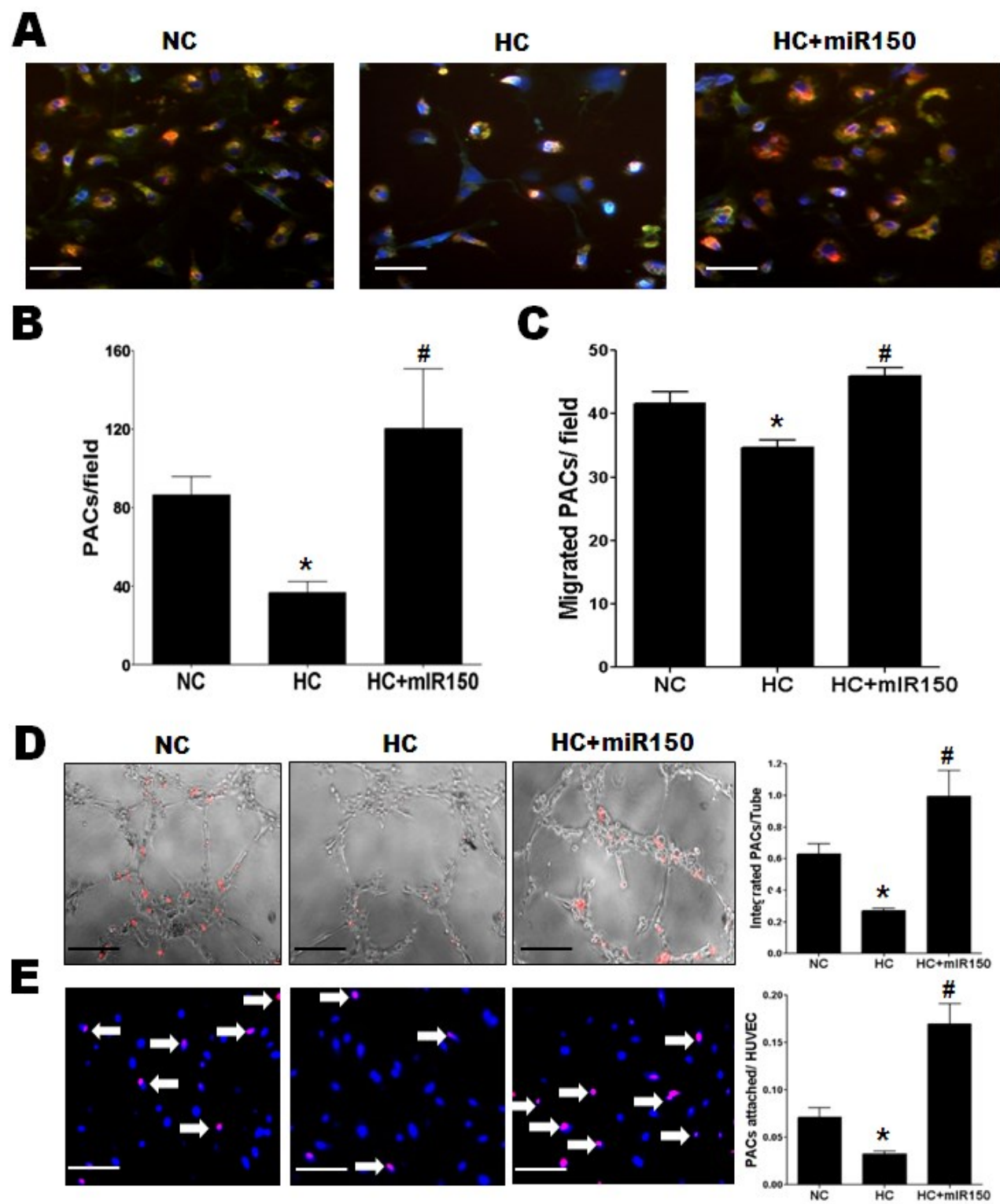


Figure 5.

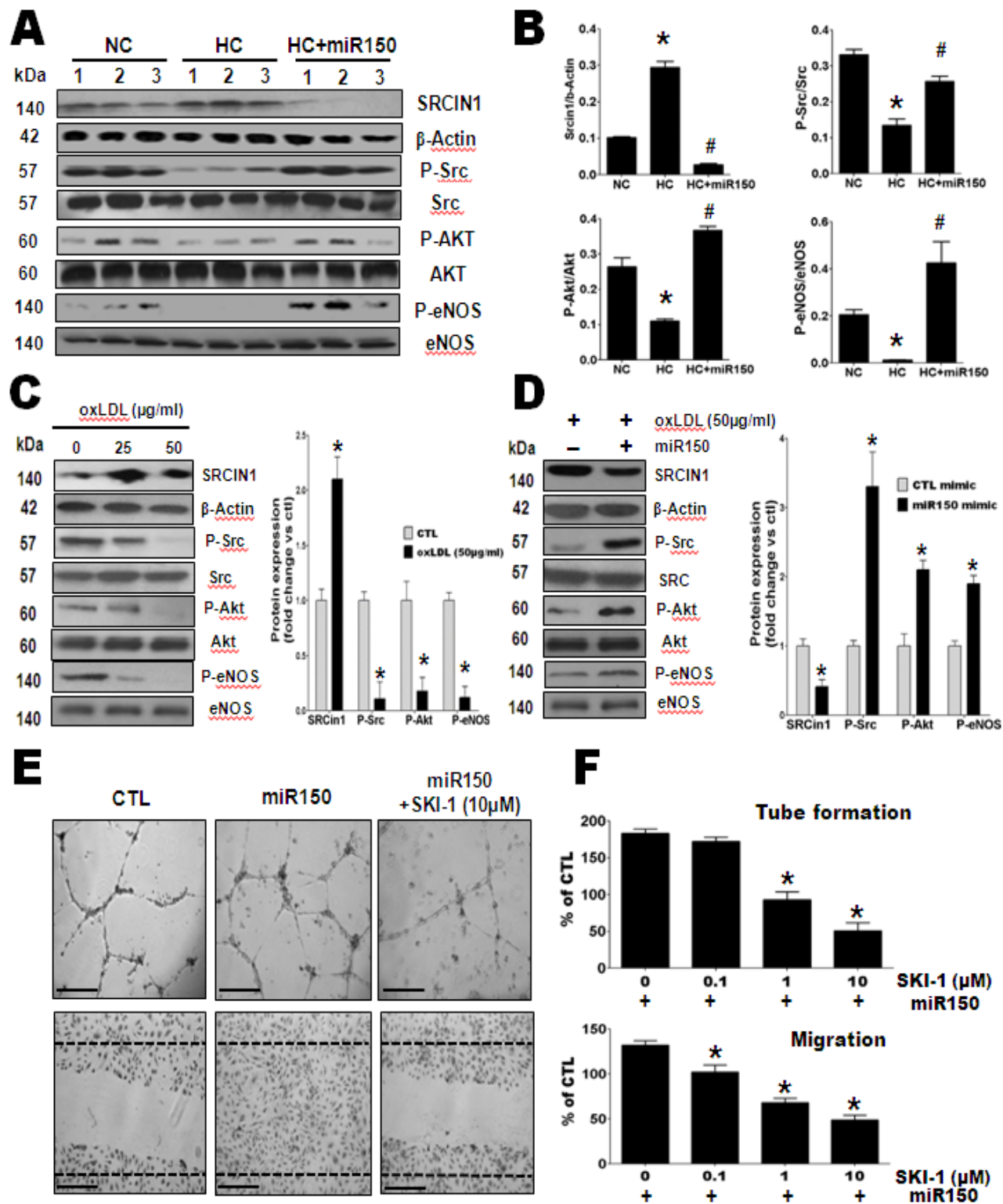
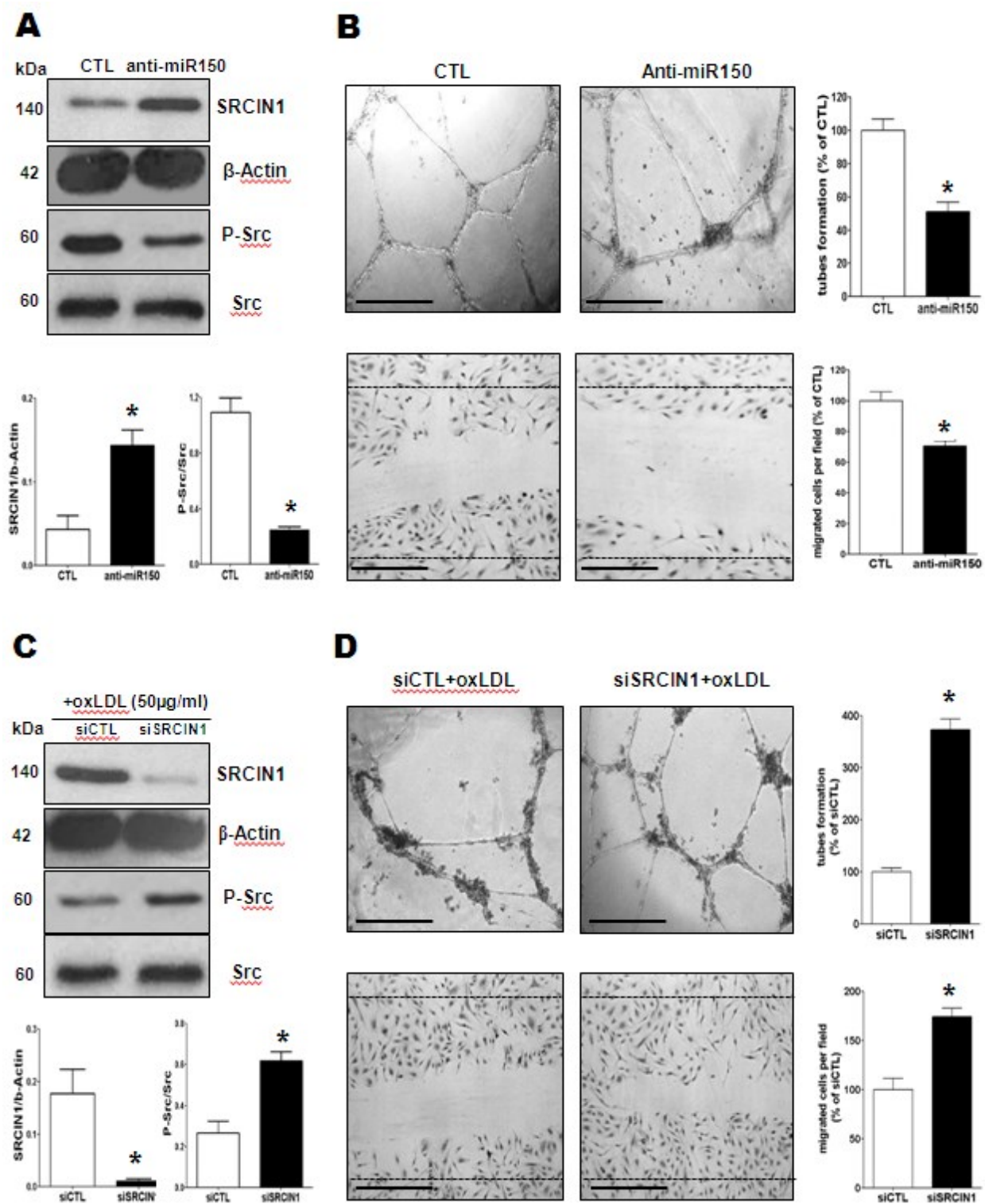


Figure 6.



Supplemental Figure I.

upregulated miRs

mmu-mir-5099	3,832
mmu-mir-6243	3,759
mmu-mir-6240	3,599
mmu-mir-6236	2,969
mmu-mir-5109	2,931
mmu-mir-3096a	1,848
mmu-mir-3096b	1,847
mmu-mir-5105	1,609
mmu-mir-144	1,258
mmu-mir-434	1,204

dornregulated miRs

mmu-mir-150	0,486
mmu-mir-183	0,517
mmu-mir-381	0,527
mmu-mir-182	0,533
mmu-mir-141	0,596
mmu-let-7f-2	0,598
mmu-let-7f-1	0,598
mmu-mir-341	0,611
mmu-mir-146b	0,615
mmu-mir-3107	0,617
mmu-mir-486	0,617
mmu-mir-378b	0,628
mmu-mir-676	0,647
mmu-mir-1843b	0,659
mmu-mir-222	0,666
mmu-mir-181c	0,683
mmu-mir-19b-1	0,683
mmu-mir-19b-2	0,684
mmu-mir-181d	0,685
mmu-mir-192	0,688
mmu-mir-92a-2	0,688
mmu-mir-92a-1	0,688
mmu-mir-574	0,690
mmu-let-7i	0,697
mmu-mir-1839	0,702
mmu-mir-101a	0,710
mmu-mir-151	0,712

dornregulated miRs

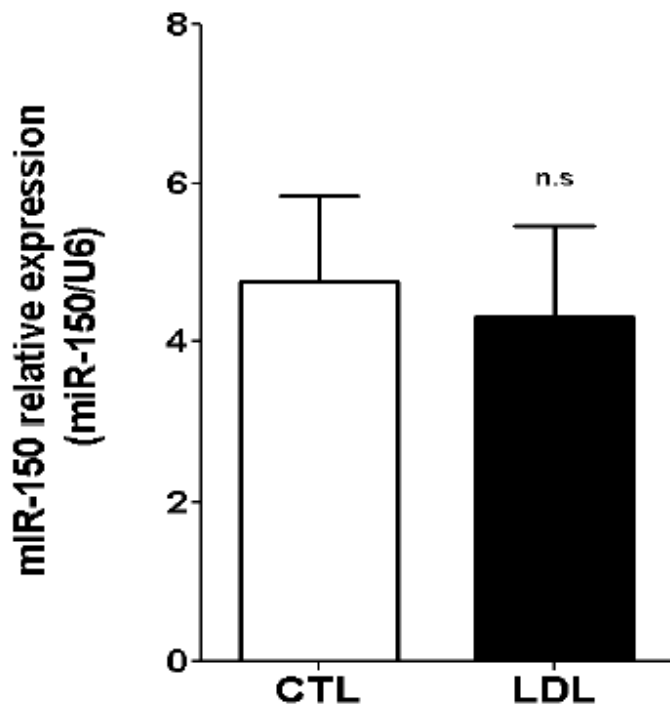
mmu-mir-148a	0,717
mmu-mir-203	0,719
mmu-mir-125a	0,720
mmu-mir-30a	0,720
mmu-mir-411	0,726
mmu-mir-103-2	0,729
mmu-mir-103-1	0,729
mmu-mir-107	0,729
mmu-mir-378d	0,730
mmu-mir-204	0,731
mmu-mir-664	0,732
mmu-mir-378a	0,733
mmu-mir-532	0,734
mmu-mir-351	0,734
mmu-mir-378c	0,739
mmu-mir-1843a	0,741
mmu-mir-143	0,741
mmu-mir-497	0,745
mmu-mir-23b	0,746
mmu-let-7g	0,746
mmu-let-7e	0,747
mmu-mir-98	0,747
mmu-mir-30b	0,752
mmu-mir-101b	0,757
mmu-mir-30c-1	0,758
mmu-mir-30c-2	0,759
mmu-mir-872	0,759

dornregulated miRs

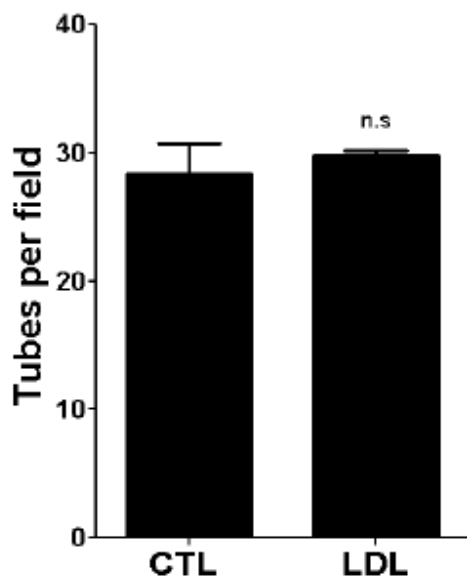
mmu-mir-193b	0,761
mmu-mir-30f	0,768
mmu-mir-30e	0,768
mmu-mir-322	0,769
mmu-mir-93	0,770
mmu-mir-484	0,770
mmu-mir-206	0,771
mmu-mir-340	0,772
mmu-mir-25	0,772
mmu-mir-300	0,774
mmu-mir-21a	0,777
mmu-mir-23a	0,778
mmu-mir-145a	0,778
mmu-mir-99b	0,780
mmu-mir-3065	0,786
mmu-mir-338	0,786
mmu-mir-301a	0,788
mmu-mir-27b	0,789
mmu-mir-155	0,790
mmu-mir-708	0,792
mmu-mir-214	0,800
mmu-mir-125b-1	0,800
mmu-mir-26a-1	0,805
mmu-mir-26a-2	0,805
mmu-mir-125b-2	0,807
mmu-mir-221	0,808
mmu-mir-10b	0,809

Supplemental Figure II.

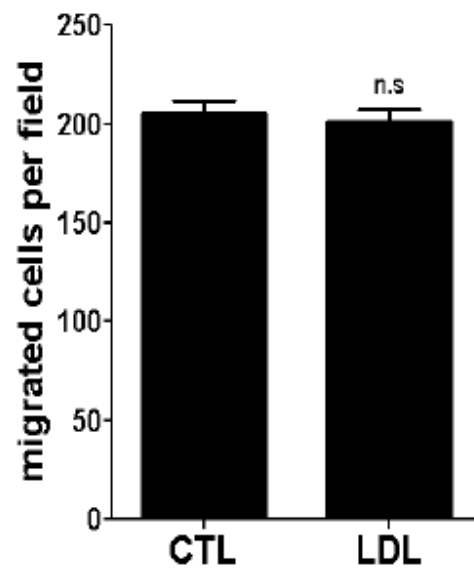
A



B

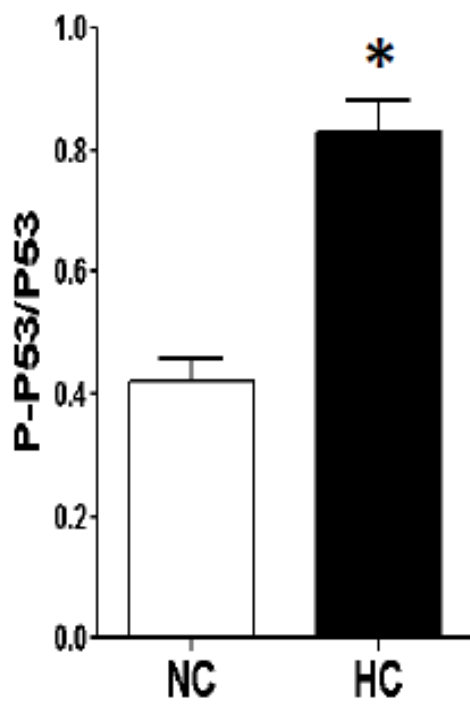
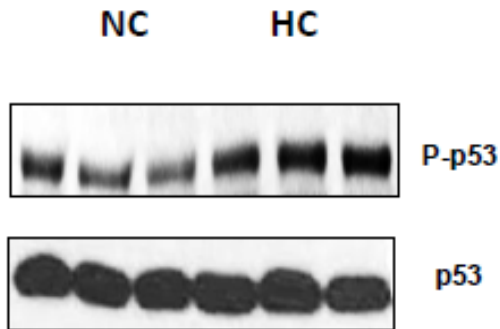


C

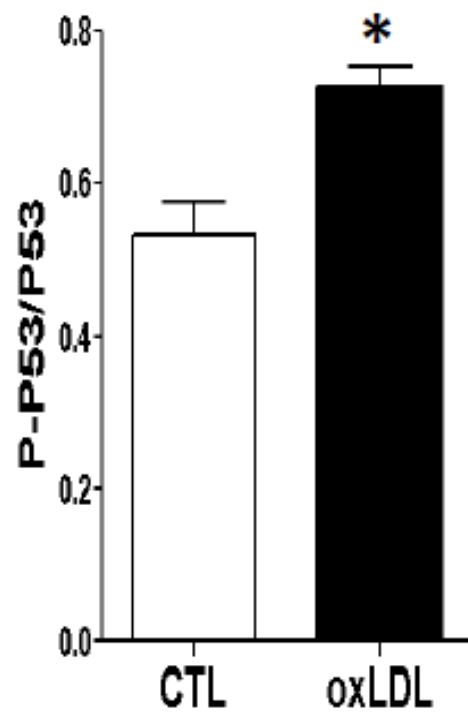
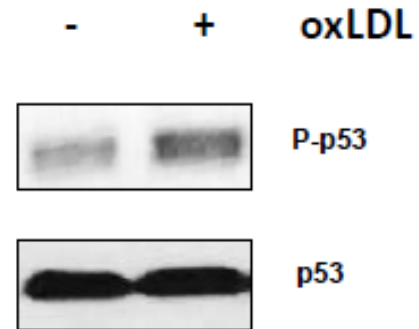


Supplemental Figure III.

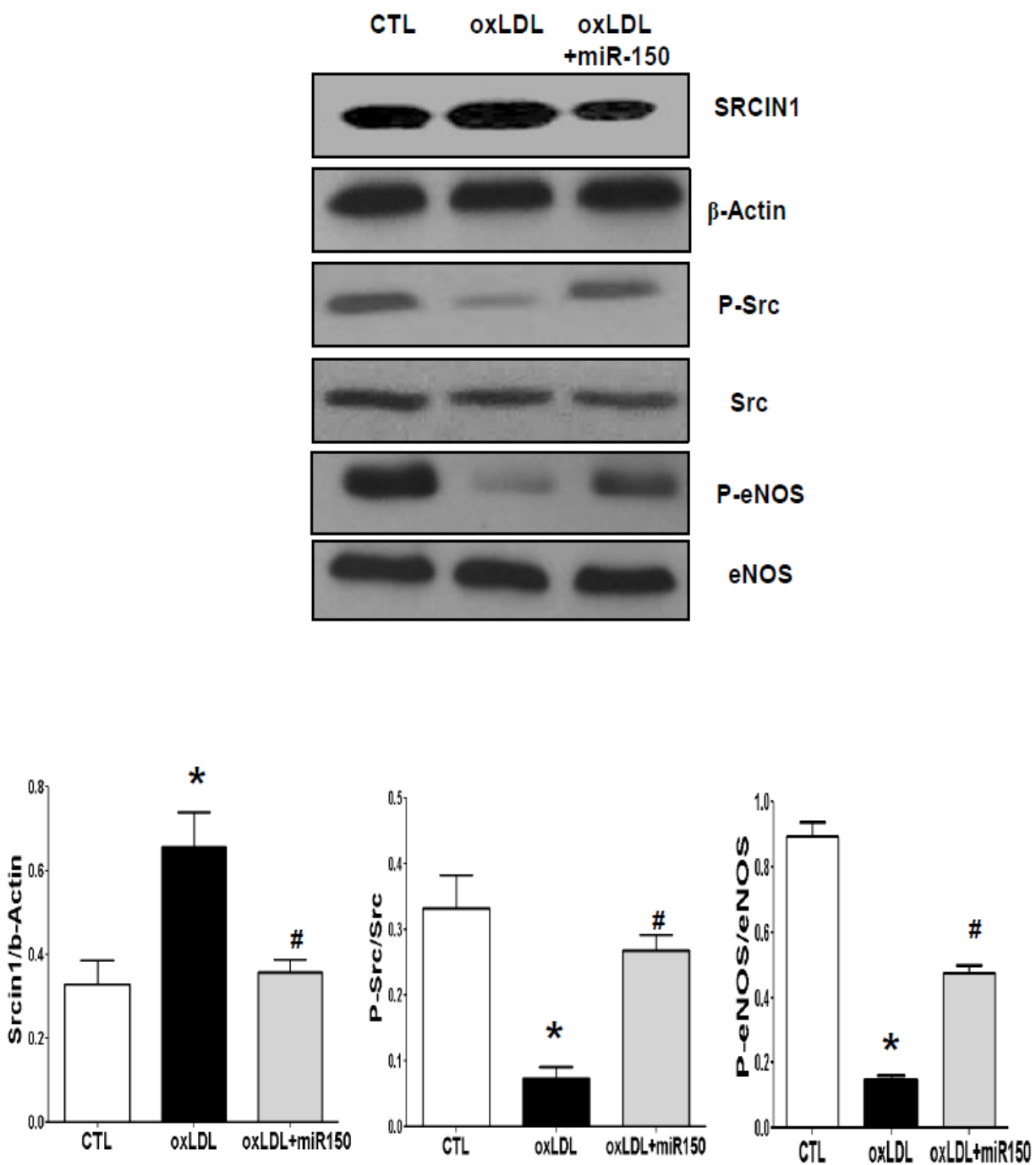
A



B



Supplemental Figure IV.



3. Troisième article

En préparation

Reduced expression of microRNA-146b contributes to impair ischemia-induced neovascularization in hypercholesterolemic conditions

Short title: miR-146b and Ischemia-Induced Neovascularization

Michel Desjarlais¹, Sylvie Dussault¹, Sharon Harel², Veronica Sanchez², Sabah Hussain² and
Alain Rivard¹

1-From the Department of Cardiovascular Research
Centre Hospitalier de l'Université de Montréal
Montréal, Québec, Canada

2-From the Department of Medecine
McGill University
Montréal, Québec, Canada

Address for correspondence:

Alain Rivard, MD
Centre de recherche du CHUM
Tour Viger, R08.466
900 rue St-Denis
Montreal, Quebec, Canada, H2X 0A9
Tel (514)890-8000 ext:25776
alain.rivard@umontreal.ca

ABSTRACT

Objective: Hypercholesterolemia is an atherosclerotic condition associated with endothelial dysfunction and impaired neovascularization in response to ischemia. This study sought to define the role of the anti-inflammatory microRNA 146b (miR-146b) in that pathophysiology.

Approach and Results: qRT-PCR analyses showed that the expression of miR-146b is significantly reduced in the ischemic muscles of hypercholesterolemic ApoE-deficient (ApoE^{-/-}) mice, and in HUVECs exposed to oxLDL. Inhibition of miR-146b (antimiR-146b) in native HUVECs impairs angiogenesis *in vitro*. On the other hand, forced expression of miR-146b using a miR mimic can rescue oxLDL-mediated impairment of endothelial cell migration and tubule formation. Using a mouse model of hindlimb ischemia, we found that intramuscular injection of miR-146b mimic restores blood flow recuperation, increases vascular densities in ischemic muscles, and reduces ischemic damages in hypercholesterolemic ApoE^{-/-} mice. In addition, miR-146b treatment also increases the number and the functional activities of pro-angiogenic cells (PACs). Specific luciferase assays in HUVECs indicate that TNF- α -associated- factor-6 (TRAF6) is a direct target of miR-146b, and that this pathway is involved in the anti-inflammatory and angiogenic effects of miR-146b. Moreover, in atherosclerotic conditions, miR-146b treatment of HUVECs *in vitro* and ischemic muscles *in vivo* can prevent the induction of TRAF6 and the downstream activation of inflammatory factors such as TNF- α and VCAM1.

Conclusions: Hypercholesterolemia is associated with reduced expression of miR-146b, increased activation of pro-inflammatory factors and inefficient neovascularisation in response to ischemia. Forced expression of miR-146b using a miR mimic could constitute a novel therapeutic strategy to reduce inflammation and improve ischemia- induced neovascularization in atherosclerotic conditions.

Keywords: angiogenesis; oxLDL; hypercholesterolemia; microRNA; neovascularization

ABBREVIATIONS:

ApoE: Apolipoprotein E

DFR: doppler flow ratios

HUVECs: human umbilical vein endothelial cells

HC: hypercholesterolemia

miR: microRNA

oxLDL: oxidized low-density lipoprotein

PAC: pro-angiogenic cell

TNF- α : tumor necrosis factor-alpha

TRAF6: TNF Receptor Associated Factor 6

VCAM-1: Vascular Cell Adhesion Molecule 1

INTRODUCTION

Hypercholesterolemia and oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) are two atherosclerotic conditions involved in the development of endothelial dysfunction, an initial key step involved in several cardiovascular diseases [1-5]. These atherosclerotic conditions are known to stimulate the production of several pro-inflammatory cytokines, which creates a sustained inflammatory microenvironment in blood vessels and causes injuries to the vascular endothelium. Among the different cytokines induced by hypercholesterolemia and oxLDL, tumor necrosis factor alpha (TNF- α) is known to play an important role in the endothelial dysfunction [6, 7]. On one hand, TNF- α is a key pro-inflammatory mediator that can activate nuclear factor kappa B (NF- κ B), a transcription factor involved in the stimulation of several pro-atherogenic molecules including vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). VCAM-1 is expressed by dysfunctional endothelial cells (ECs) and allows adhesion of monocytes to the endothelium which amplifies the inflammatory loop [7-9]. On the other hand, TNF α is also known to induce intracellular reactive oxygen species (ROS), another factor involved in endothelial dysfunction and vascular diseases [7, 9, 10].

Following vascular occlusion, the severity of ischemic damages to tissues depends on the physiological capacity of the organism to form new blood vessels (neovascularization) [11]. Postnatal neovascularization depends on the ECs present in pre-existing blood vessels, but also involves the contribution of bone marrow-derived pro-angiogenic cells (PACs) [12, 13]. PACs have been shown to be mobilized and recruited in ischemic sites. They can stimulate neovascularization through the secretion of several pro-angiogenic molecules [12, 13]. Interestingly, previous studies have shown that clinical atherosclerotic conditions including hypercholesterolemia, smoking, aging and diabetes are also associated with impaired neovascularisation in response to ischemia in various animal models [14-20]. These risk factors are also known to increase the level of oxidative stress and inflammation, 2 factors involved in EC and PAC dysfunction [21, 22]. However, the precise role of inflammation in the modulation of ischemia-induced neovascularization, especially in atherosclerotic conditions, is currently unknown. In fact inflammation has been associated with increased or decreased

neovascularization depending on the pathological context, the inflammatory cell types involved and the intensity and duration of the inflammatory response [23-24].

The recent emergence of microRNAs (miRs) as post-transcriptional regulators of gene expression has revolutionized the understanding of biological processes. miRs are endogenous non-coding small RNA (20-25 nucleotides) known to repress the expression of a wide range of specific messenger RNA (mRNA) involved in different physiological and pathological processes. It is now recognized that the modulation of miR expression by atherosclerotic conditions is associated with several cardiovascular diseases including stroke, heart failure and peripheral ischemia [25,26]. Recent studies using animal models have reported that a therapy based on the modulation of specific miRs can decrease the development of atherosclerosis [27] and improve endothelial function [28]. It has also been recently shown that it is possible to modulate neovascularization by targeting angiogenic miRs [14, 29-31]. However, the specific role of miRs for the modulation of inflammation in the context of physiological ischemia-induced neovascularization is currently unknown.

In the present report, we investigated the role of miR-146b in the impairment of ischemia-induced neovascularization in hypercholesterolemic conditions. miR-146 is a negative regulator of several pro-inflammatory molecules including tumor necrosis factor associated protein-6 (TRAF6), an important mediator involved in the TNF α pathway [32-34]. Our results show that the expression of miR-146b is significantly reduced by hypercholesterolemia and oxLDL, and that this correlates with increased activation of TNF- α /TRAF6 inflammatory pathway and impaired angiogenic functions of ECs and PACs. In addition, our results show for the first time that forced expression of miR-146b improves post-ischemic neovascularisation in hypercholesterolemic mice. miR-146b supplementation could constitute a novel therapeutic strategy to improve endothelial function and increase ischemia-induced neovascularisation in atherosclerotic conditions.

METHODS

Cell culture

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were purchased from Life Technologies (Carlsbad, CA) and cultured in medium 200 (Life technologies) supplemented with 8% fetal bovine serum (FBS, Wisent, St-Jean-Baptiste, QC, Canada), 100 IU/ml penicillin/0.1 mg/ml streptomycin (Wisent) and low serum growth supplement (LSGS; 2% FBS, 3 ng/ml bFGF, 10 mg/ml heparin, 1 mg/ml hydrocortisone, and 10 ng/ml EGF; Life Technologies). In some experiments, HUVECs were exposed at different time points (3h, 66, 24h) with oxLDL (50 µg/ml, Biomedical Technologies). Cells were grown at 37 °C, 5% CO₂ and 95% air, and the medium was changed every 2 days. HUVECs were passaged when they reached 90% confluence and passages 3-6 were used for all experiments. In additional experiment, Human leukemia monocyte cell line (THP-1) was used and cultured in suspension in RPMI 1640 (Wisent #350-000-CL) supplemented with 10% FBS, 100 IU/ml penicillin/0.1 mg/ml streptomycin. THP-1 were grown at 37 °C, 5% CO₂ and 95% air, and the medium was changed every 2 days.

miR isolation and qRT-PCR analysis

miRNA was extracted from ischemic hindlimb muscles (1 day after surgery) or in HUVECs exposed or not with oxLDL for 24h using the Ambion mirVana™ miRNA isolation kit (Life Technologies) according to the manufacturer's protocol. Quantification of total RNA was made with a nanodrop and 50 ng of total RNA was reverse transcribed using the TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies) as described by the manufacturer. Before use, RT samples were diluted 1:5. Gene expression level was determined using Taqman MicroRNA assays (Cat. # 4427975, Life Technologies). qPCR reactions were performed using 1-5 ng of cDNA samples, using Perfecta qPCR Fastmix II (Quanta) and 2 µM of miR-146b primer. The Viiia7 qPCR instrument (Life Technologies) was used to detect the amplification level and was programmed with an initial step of 20 sec at 95°C, followed by 40 cycles of: 1 sec at 95°C and 20 sec at 60°C. Relative expression ($RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$) was calculated using the Expression Suite software (Life Technologies), and normalization was done using both U6snRNA and SnoRNA202.

miRNA transfection in HUVECs

Transfections were carried out at a concentration of 50 nM using Lipofactamine RNAiMAX Reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's protocol. HUVECs were transfected 24 hours after being plated in 6-well plates with the following miRs purchased from Dharmacon (GE Healthcare Dharmacon, Lafayette, CO): miRIDIAN miR mimic negative control #1, miRIDIAN miR mimic hsa-miR146b-5p, miRIDIAN anti-miR negative control #1, miRIDIAN anti-miR hsa-miR146b-5p hairpin inhibitor. After 24 hours, the transfection medium was replaced with antibiotic-free complete M200 medium and cells were exposed or not to 50µg/ml of oxLDL for 24h. For luciferase assay experiments, miRNA transfection was performed 24h after vector transfection. Transfection efficiency was measured using a mimic transfection control Dy547 (Dharmacon) and found to be 80-90%.

Luciferase constructs and vectors transfection

3' UTR Luciferase constructs pMIR-REPORT™ plasmids containing 500 bp of wild-type 3' UTRs of TRAF6 (TRAF6-wt UTR) were cloned downstream of a CMV-driven Firefly Luciferase cassette. Mutated versions of these constructs (TRAF6- mut-UTR) carrying 4-bp substitutions in the miR-146b target sites were constructed by site-directed mutagenesis. To analyse the interrelation of miR-146b and TRAF6 in HUVECs activated or not by oxLDL, HUVECs were co-transfected using 50 nM using Lipofactamine RNAiMAX Reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's protocol with one of these plasmids (TRAF6-wt UTR or TRAF6-mut UTR) and a Renilla luciferase control vector (pRL-TK) for 24h. HUVECs were allowed to recover for 24h in complete medium (see cell culture) before oxLDL treatment experiments or miR-146b mimic transfection experiments (see miRNA transfection in HUVECs). Firefly and Renilla luciferase activities were quantified using a Dual-Luciferase Reporter Assay System and Firefly luciferase activity was normalized for Renilla activity to control for transfection efficiency differences.

Detection of intracellular reactive oxygen species (O₂⁻)

Generation of superoxide anions (O₂⁻) in HUVECs were assessed with the fluoroprobes dihydroethidium (DHE, Molecular probes). Fluorescence intensities were quantified using image J, with the same threshold for each experiment.

THP-1 monocyte adhesion assay

Monocyte adhesion to ECs was assessed by co-incubation of THP-1 and HUVECs for 1h. Briefly, 50 000 THP-1 cells pre-stained with Calcein AM (Life Technologies) were co-incubated with confluent HUVECs in 24-wells plate. Cells were washed three times with PBS and adhered THP-1 cells were counted in 10 fields per well using fluorescence microscopy. Before the incubation of THP-1, HUVECs were transfected or not with miR-146b mimic, anti-miR-146b or appropriate controls for 24h and exposed or not to 50µg/ml of oxLDL for 24h.

HUVECs capillary-like tube formation on Matrigel

The angiogenic activity of HUVECs was determined using the Matrigel tube formation assay. Briefly, after transfection, HUVECs were plated at a density of 20 000 cells/well in 96-well plates precoated with 50 µl of growth factor reduced Matrigel Matrix (Becton Dickinson Labware, Bedford, MA) and cultured at 37 C for 24h with 10% of FBS. HUVECs were transfected or not with miR-146b mimic, anti-miR-146b or appropriate controls for 24h, and exposed or not with 50µg/ml of oxLDL for 24h. Capillary-like tubes were observed under a light microscope. Images were obtained at a 50x magnification, and all tubules and branches were counted.

Scratch assay

Measurement of migration was performed by an adapted scratch assay in confluent HUVECs. The cells were transfected and grown to near confluence in 24-well plates and exposed or not to 50µg/ml of oxLDL. Mechanical disruption of the monolayer was realized by scraping with a pipette tip. Migration was assessed using an inverted microscope at a magnification of 200x by an investigator blinded to the experimental conditions. Three fields per well were evaluated and all experiments were performed in duplicate. Migration is represented as the % of migration area.

Murine ischemic hindlimb model

The protocol was approved by the Comité Institutionnel de Protection des Animaux (CIPA) of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM). 6 to 8-week-old hypercholesterolemic ApoE^{-/-} mice were purchased from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME)

and put on a western-type diet (1.25% cholesterol, 15% cocoa butter, 0.5% sodium cholate, Teklad 90221 for 5 weeks before the ischemia. Unilateral hindlimb ischemia was surgically induced after anesthesia with 2% isoflurane as previously described[35]. Mice were injected intramuscularly with 5 mg/kg of *in vivo* ready mirVana® miRNA mimic mmu-miR146-5p, or mirVana® miRNA mimic negative control #1 (Life technologies). This dose was chosen based on preliminary experiments showing optimal transfection efficiency in muscles. miRNAs were administered in a solution of Max suppressor RNA-LANCER II (Bioo Scientific, Austin, TX) according to the manufactory's recommendations. Ischemic damages were evaluated using a scale from 1 (no damage) to 4 (lost finger)[36]. The mice were killed at predetermined arbitrary time points after surgery with an overdose of sodium pentobarbital.

Monitoring of blood flow

Hindlimb blood flow (6-8 mice/group) was monitored with a Laser Doppler perfusion imager (LDPI) system (Moor Instrument Ltd., Axminster, UK) after anesthesia with a ketamine-dexmedetomidine solution (50 mg/kg and 0.5 mg/kg, IP)[35]. Laser Doppler measurements were performed by a single observer blinded to the treatment group at days 7 after surgery. After LDPI measurements, dexmedetomidine was antagonized with a solution of Atopamezole (1mg/kg, SC). To account for variables such as ambient light and temperature, the results are expressed as the ratio of perfusion in the left (ischemic) vs. right (non-ischemic) hindlimb.

Capillary histochemistry

Whole ischemic hindlimbs were harvested 7 days after surgery and immediately fixed in Tissufix (Chaptec, Montreal, QC, Canada) overnight. After bones were carefully removed, 3 mm thick tissue transverse sections of the hindlimbs were cut at the level of the gastrocnemius muscle and paraffin-embedded so that the whole leg could be analyzed on each section. Identification of endothelial cells was performed by immunohistochemistry for CD31 with a rat monoclonal antibody directed against mouse CD31 (BD Pharmigen, San Diego, CA, USA). Negative control was performed in same condition without the primary antibody (CD31). Capillaries were counted by a single observer blinded to the treatment regimen at a 200x magnification. Results were expressed as capillaries or arterioles per field[35].

PACs isolation and characterization

7 days after hindlimb ischemia, mouse bone marrow mononuclear cells were isolated from the femora and tibiae by flushing the bone marrow cavities using culture medium, and kept on fibronectin-coated (Sigma, St. Louis, MO) plates. After 4 days in culture, non-adherent cells were removed by thorough washing with PBS. Adherent cells were stained with DAPI (0.5 mg/ml; Life Technologies), 1,10-dioleoyl-3,3',3'',3''' acetylated low-density lipoprotein (DiI-acLDL, 2.5 mg/ml for 1 h, Life Technologies) and FITC-labelled lectin BS-1 (*Bandeiraea simplicifolia*, 10 mg/ml for 1 h, Sigma, St-Louis, MO). Bone marrow PACs were characterized as adherent cells that were positive for both DiI-acLDL uptake and lectin binding as previously described[35].

PACs adhesion to an endothelial monolayer

A monolayer of HUVECs (passage 4-6) was prepared in 24 well plates. HUVECs were pretreated for 16 h with tumour necrosis factor- α (1 ng/ml; BD Biosciences), fixed and stained with DAPI (0.5 mg/ml; Life Technologies). PACs were labelled with DiI-AcLDL and 15 000 cells were added to each well (2 wells/mouse) and incubated for 3 h at 37 °C. Non-attached cells were gently removed with PBS and adherent PACs were fixed with 2% paraformaldehyde and counted in three random fields per well[35].

Incorporation of PACs into HUVECs tubules

PACs (3000) labeled 1 hour with DiI-acLDL were co-plated with HUVECs (20 000) in 96-well plates that had been precoated with 50 μ l of growth factor reduced Matrigel Matrix (Biosciences, San Diego, CA, USA) and cultured at 37°C for 24 h with 10% FBS. Tubular-like structures were photographed and the number of incorporated EPCs was determined in 6 random fields. A tube was defined as a straight cellular segment connecting two cell masses (nodes). No difference in the total number of tubes or in tube length was observed between the different groups (data not shown). The data are presented as number of incorporated EPCs/tube[37].

PACs proliferation assay

PACs proliferative capacity was determined using MTS (Celltiter 96 aqueous non-radioactive cell-proliferation) assay obtained from Promega (Madison, WI). Briefly, 3000(?) PACs were

plated in 96 well plates and incubated for 24h with 10% FBS. MTS was added to each well to achieve final concentrations of 0.04 mg/ml. Proliferation was quantified after 4 h by densitometric analysis of MTS tetrazolium compound. Optical density was recorded with a microplate reader at 490 nm. Readings were corrected for background optical density by subtracting the readings from EBM/MTS incubated at the same time in the absence of PACs. The results performed in triplicates are represented.

Western blot analysis

Protein levels were analysed by western blots in ischemic muscles homogenates and in HUVECs extracts. For total protein extraction, isolated muscles from whole hindlimbs were rinsed in PBS to remove excess blood, snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C until use. Whole-cell protein extracts were obtained after homogenization of ischemic muscles of the different groups of mice in ice cold RIPA buffer (pH=8) containing 50 mM Tris-HCL, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton 100x, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS with a cocktail of proteases and phosphatases inhibitors (MiniComplete, PhosphoStop and PMSF, Roche, Bâle, Switzerland). HUVECs were lysed with 50 µl of RIPA lysis buffer per well in 6 wells plates, harvested and sonicated. 50 µg of protein per muscle homogenate sample and 20 µg of protein per cells lysates sample were separated on an SDS-polyacrylamide gel and electroblotted on nitrocellulose membranes. Non-specific binding sites were blocked with 5% skim milk powder in TBS-T (50 mM Tris-HCL, 140 mM NaCL, 0.05% Tween 20) for 1 h. The membranes were probed overnight at 4°C with the following antibodies: TRAF6 (1:1000, Cell signaling Technology, Danvers, MA), TNF- α (1:1000, phosphoTYR146-SRC, Cell signaling Technology, Danvers, MA), VCAM-1 (1:1000, Cell signaling Technology, Danvers, MA), or β -actin (1:2000, Santa Cruz Biotechnology). Membranes were then washed three times for 10 minutes with TBS-T and incubated with secondary antibodies conjugated with HRP (1:2000) for 1 hour and washed with TBS-T. Specific proteins were detected by chemiluminescent reaction (GE Healthcare, Piscataway, NJ) followed by exposure to Hyperfilm ECL (GE Healthcare). Protein expression was quantified using ImageJ and the results are expressed as density values normalized to the loading control (β -actin).

Statistical analysis

All results are mean \pm SEM. Statistical significance was evaluated by unpaired *T* test or ANOVA followed by a Newman Keuls post hoc test. A value of $P < 0.05$ was interpreted to denote statistical significance.

RESULTS

Hypercholesterolemia leads to decreased miR-146b expression and activation of TRAF6 inflammatory pathway.

Previous studies have shown that decreased physiological expression of miR-146b is associated with inflammation and endothelial dysfunction [32-34, 38-39]. However, the effects of hypercholesterolemia and oxLDL on the expression of miR-146b in a context of tissue ischemia is unknown. Using qRT-PCR, we found that the expression of miR-146b is significantly reduced in ischemic muscles of hypercholesterolemic ApoE^{-/-} mice (HC) compared to normocholesterolemic mice (NC) (**Figure 1C**). The expression of miR-146b is also reduced by more than 90% in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) exposed to oxLDL (**Figure 1A**). miR-146b has previously been shown to negatively regulate TRAF6, an important mediator of inflammation through TNF- α and VCAM-1 activation. Here we found that TRAF6 and TNF- α expression are significantly increased in the ischemic muscles of HC mice, and that this correlates with decreased expression of miR-146b (**Figure 1D**). Similar results were also obtained in HUVECs exposed to oxLDL (**Figure 1B**). In the following experiments, we focused on characterizing the effects of miR-146b on the modulation of the TRAF6 pathway, angiogenesis and neovascularization in hypercholesterolemic conditions.

Forced expression of miR-146b inhibit oxLDL-induced TRAF6 pathway.

To better characterize the role of miR-146b on oxLDL-dependent induction of TRAF6 pathway, we modulated TRAF6 expression by transfecting HUVECs with a miR-146b mimic before oxLDL exposure. We also inhibited miR-146b expression in HUVECs using an anti-miR. Transfection efficiency was established to be more than 90%, as assessed using a labelled miRNA mimic control (data not shown). As seen on **Figure 2A and 2B**, similarly to oxLDL exposure, direct inhibition of miR-146b in HUVECs led to an increased expression of TRAF6 and downstream molecules including TNF- α and VCAM-1. On the other hand, forced expression of miR-146b can inhibit TRAF6, TNF- α and VCAM-1 induction in HUVECs exposed to oxLDL (**Figure 2B**). To confirm that miR-146b can directly regulate TRAF6 induction by oxLDL, HUVECs were transfected with wild-type (wt-TRAF6) or mutated TRAF6 (mut-TRAF6) 3'UTR luciferase reporter plasmids before miR-146b mimic transfection (**Figure**

2D) or oxLDL exposure. As show in **figure 2D and 2C**, luciferase activity of wt-TRAF6 was significantly lower in HUVECs transfected with miR-146b mimic compared to miR mimic control (CTL) (**Figure 2D**) or in HUVECs exposed to oxLDL (**Figure 2C**). In addition, HUVECs transfected with a mut-TRAF6 plasmid showed no difference in luciferase activity in these conditions (transfection with a miR-146b or oxLDL exposure compared to control). These results confirm that the mutation of TRAF6 targeting the seed sequence of miR-146b reverses its effect. Globally, our data suggest that miR-146b can directly target TRAF6 to modulate its expression level and oxLDL exposure increases TRAF6 expression by decreasing miR-146b expression.

Decreased expression of miR-146b leads to angiogenic impairment.

To investigate the role of miR-146b in oxLDL-induced endothelial dysfunction, we performed gain and loss of function experiments by transfecting HUVECs with a miR-146b mimic or with an anti-miR-146b. Transfection efficiency was established to be more than 90%, as assessed using a labelled miRNA mimic control (data not shown). We found that exposure to oxLDL or miR-146b inhibition increase oxidative stress levels (**Figure 3A and 3C**) and activate the inflammatory response which is characterized by increased adhesion of monocytes to HUVECs (**Figure 3B and 3D**). In addition, forced expression of miR-146b inhibits oxLDL-induced ROS formation and inflammatory response in HUVECs. As seen on **Figure 3E and 3F**, similarly to oxLDL exposure, direct inhibition of miR-146b reduced cell migration and tube formation in HUVECs. However, treatment with miR-146b mimic improves tube formation and cell migration in HUVECs exposed to oxLDL.

miR-146b treatment improves neovascularization in hypercholesterolemic conditions.

In our previous studies, we have demonstrated that hypercholesterolemic ApoE^{-/-} mice exhibit decreased neovascularization compared to normocholesterolemic mice [14,42]. To evaluate the role of miR-146b on post-ischemic neovascularization in hypercholesterolemic conditions, mice were treated by intramuscular injection of miR-146b or control miR (CTL) at the time of surgery. Hindlimb perfusion was evaluated after surgically-induced ischemia by serial Laser Doppler perfusion imaging (LDPI) at day 7 after surgery (**Figure 4A and 4C**). Blood flow was significantly improved in hypercholesterolemic ApoE^{-/-} mice treated intramuscularly with a

miR-146b mimic compare to the control miR (CTL) (Doppler flow ratio (DFR) 0.33 ± 0.03 vs. 0.42 ± 0.02 ; $p<0.05$). A similar effect was observed at the microvascular level. Intramuscular treatment with miR-146b mimic significantly increased vascular densities in the ischemic muscles of ApoE^{-/-} mice (**Figure 4B and 4D**). Clinically, this was associated with a reduction of ischemic damage in mice treated with miR-146b mimic (**Figure 4E**). miR-146b treatment decreases TRAF6 and TNF- α expression in ischemic muscles of ApoE^{-/-} mice (**Figure 4F**).

miR-146b increases the number and the functional activities of PACs.

PACs have been shown to reach ischemic tissues where they can contribute to the formation of new blood vessels. However, the number and the functional activities of PACs are impaired in patients presenting atherosclerotic conditions, including hypercholesterolemia [17]. Here we found that the number of bone marrow-derived PACs is significantly increased in hypercholesterolemic ApoE^{-/-} mice treated with miR-146b mimic compare to CTL (**Figure 5A**). In addition, the functional activities of PACs including proliferation capacity (**Figure 5B**), attachment to endothelial cells (**Figure 5C**) and integration into ECs tubules (**Figure 5D**) are significantly increased in mice treated with miR-146b.

DISCUSSION

To our knowledge, the present study is the first one to document the essential role of miR-146b for angiogenesis and ischemia-induced neovascularization in hypercholesterolemic conditions. In addition, this study is also the first to demonstrate that a therapy based on miR supplementation with anti-inflammatory properties can improve ischemic tissue neovascularization *in vivo*. Although miRs have emerged as a key regulator of gene expression modulating a broad range of physiological processes, their specific role for the modulation of neovascularization following tissue ischemia remains largely unexplored, in particular in pathological conditions. Moreover, the effect of risk factors involved in the development of atherosclerosis on miRs expression level, and how this might influence the angiogenic response following ischemia is currently unknown. Patients with atherosclerotic diseases often exhibit several conditions that have been shown to impair angiogenic response to ischemia [20]. This could at least in part explain the lack of efficacy of pro-angiogenic therapies in atherosclerotic patients, compared to the positive results obtained in young and healthy animals [40]. Hypercholesterolemia is one of the most important conditions associated with the development of atherosclerosis, a disease that can lead to acute or chronic tissue ischemia [41]. On the other hand, hypercholesterolemia has also been linked with deleterious effects on reparative processes occurring in response to ischemia. This includes a reduction of the number and the functional activities of PACs and also an impairment of the angiogenic capacity of endothelial cells [17, 42]. All these factors contribute to the reduced ischemia-induced neovascularization which has been described in several hypercholesterolemic animal models [18, 19, 43]. However, the specific mechanisms that are involved in the inhibition of neovascularization and PAC function by hypercholesterolemia are not completely understood.

The present study uncovered a novel mechanism by which modulation of a miR involved in inflammatory processes could contribute to inhibit ischemia-dependent reparative responses in hypercholesterolemic conditions. It demonstrates for the first time that reduced expression of miR-146b in atherosclerotic conditions leads to endothelial dysfunction and reduce neovascularization after tissue ischemia. The miR-146 family (miR-146a and miR-146b) is

reported to be an important negative regulator of the inflammatory process in several cell types. miR-146 acts through the inhibition of different pro-inflammatory molecules including IL-1, TNF- α , IRAK1, TRAF6 and NF- κ B [32-34, 44]. High inflammatory level in blood vessels is an important contributing factor to endothelial dysfunction and the development of atherosclerosis [45]. In this current study, we demonstrate that miR-146b is also crucial for the physiological response to tissue ischemia in atherosclerotic conditions. We found that the expression of miR-146b is reduced both in endothelial cells exposed to oxLDL and in the ischemic muscles of hypercholesterolemic mice and this correlate with increased expression of inflammatory markers including TRAF6, TNF- α and VCAM-1. Interestingly, the expression of miR-146b has also been reported to be downregulated in the monocytes of obese patients [46]. Obesity is an important risk factor often associated with hypercholesterolemia, hypertension and diabetes. Similarly to what is observed after oxLDL exposure, our results demonstrate that direct inhibition of miR-146b with an anti-miR leads to increased activation of TRAF6 pathways in endothelial cells and that this contributes to impair the angiogenic response. Our results also indicate that forced expression of miR-146b protects endothelial cell function in the presence of oxLDL by directly targeting TRAF6 pathway. This leads to a reduction of oxidative stress and monocyte adhesion to endothelial cells. Our results are consistent with a previous study showing that overexpression of miR-146b in HUVECs inhibits LPS-induced inflammatory response and monocyte adhesion by downregulating TRAF6 and IRAK1 [34]. We also demonstrate for the first time that forced expression of miR-146b completely rescues the angiogenic capacity of endothelial cells exposed to oxLDL. However, our study does not address the precise mechanism responsible for the recovery of the angiogenic activity of HUVECs by miR-146b. One potential mechanism could be related to VEGF, as selective suppression of TRAF6 was previously shown to increase VEGF promoter activity *in vitro* [47]. The improvement of the angiogenic function of HUVECs could also be related to the antioxidant action of miR-146b. Indeed, it has been shown that ROS decrease the expression of key angiogenic factors (ex.VEGF, NO), migration and tubule formation of endothelial cells [14, 48-50].

Using a well-characterized model of hindlimb ischemia, we show *in vivo* that miR-146b supplementation can have beneficial therapeutic effects in the setting of ischemia.

Hypercholesterolemic mice treated with miR-146b by intramuscular injections demonstrated significant improvement of blood flow recovery, and a reduction of ischemic damages. At the microvascular level, this was associated with an increase of capillary density in ischemic muscles of treated animals, and a reduction of the inflammatory markers TRAF6 and TNF- α . The beneficial action of miR-146b on neovascularization could be caused by its antioxidant and anti-inflammatory properties, but also by the direct repression of TRAF6. It has been shown that treatment with antioxidants (vitamin, red wine) [50-51] or anti-inflammatory agents such as cholesterol-lowering agents (statins) [52-53] improve neovascularization following ischemia *in vivo*. On the other hand, the selective deletion of TRAF6 in leukocytes [54] and endothelial cells [55] decreases the progression of atherosclerosis in mice. Our results also demonstrate that miR-146b reduces the expression of TNF α . Similarly, inhibition of TNF α has been reported to improve physiological angiogenesis of the retina [56]. The results of the present study suggest that PACs could be another factor contributing to the improvement of neovascularization of hypercholesterolemic mice following miR-146b supplementation. Here we found that both the number and the functional activities of PACs were increased by miR-146b treatment following surgically-induced hind limb ischemia in these animals. miRNAs are increasingly recognized as important modulator of stem and progenitor cells [57]. The stimulating effect of miR-146b on PACs in the current study is consistent with previous report. Indeed, it has been shown that the suppression of TRAF6 and IRAK1 by miR-146b improves the migration and proliferation of PACs in a murine model of cerebral ischemia [58].

In conclusion, our study demonstrates for the first time that hypercholesterolemia is associated with reduced expression of miR-146b in ischemic muscles, which leads to increased activation of pro-inflammatory factors and inefficient neovascularisation. Our results also suggest that forced expression of miR-146b using a miR mimic could constitute a novel therapeutic strategy to reduce inflammation and improve ischemia- induced neovascularization in atherosclerotic conditions.

Sources of Funding

This study was supported by grants from the Canadian Institute of Health Research (CIHR MOP-123490) and the Heart and Stroke Foundation of Canada (HSFC) to AR.

Disclosures:

None.

REFERENCES

1. Félix-Redondo, F.J., M. Grau, and D. Fernández-Bergés, *Cholesterol and Cardiovascular Disease in the Elderly. Facts and Gaps*. Aging Dis, 2013. **4**(3): p. 154-69.
2. Gradinaru, D., et al., *Oxidized LDL and NO synthesis—Biomarkers of endothelial dysfunction and ageing*. Mechanisms of Ageing and Development, 2015. **151**(Supplement C): p. 101-113.
3. Henry, P.D., O.A. Cabello, and C.H. Chen, *Hypercholesterolemia and endothelial dysfunction*. Curr Opin Lipidol, 1995. **6**(4): p. 190-5.
4. Stapleton, P.A., et al., *Hypercholesterolemia and microvascular dysfunction: interventional strategies*. J Inflamm (Lond), 2010. **7**: p. 54.
5. Trpkovic, A., et al., *Oxidized low-density lipoprotein as a biomarker of cardiovascular diseases*. Crit Rev Clin Lab Sci, 2015. **52**(2): p. 70-85.
6. Zhang, C., et al., *TNF-alpha contributes to endothelial dysfunction in ischemia/reperfusion injury*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(3): p. 475-80.
7. Zhang, H., et al., *Role of TNF-alpha in vascular dysfunction*. Clin Sci (Lond), 2009. **116**(3): p. 219-30.
8. Schutze, S., et al., *TNF-induced activation of NF-kappa B*. Immunobiology, 1995. **193**(2-4): p. 193-203.
9. Zhang, C., *The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction*. Basic Res Cardiol, 2008. **103**(5): p. 398-406.
10. Sprague, A.H. and R.A. Khalil, *Inflammatory Cytokines in Vascular Dysfunction and Vascular Disease*. Biochem Pharmacol, 2009. **78**(6): p. 539-52.
11. Losordo, D.W. and S. Dimmeler, *Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease: part II: cell-based therapies*. Circulation, 2004. **109**(22): p. 2692-7.
12. Silvestre, J.S., *Pro-angiogenic cell-based therapy for the treatment of ischemic cardiovascular diseases*. Thromb Res, 2012. **130** Suppl 1: p. S90-4.
13. Choi, Y.E., et al., *Proangiogenic cells enhanced persistent and physiologic neovascularization compared with macrophages*. Exp Mol Med, 2015. **47**(9): p. e186-.
14. Desjarlais, M., et al., *MicroRNA-150 Modulates Ischemia-Induced Neovascularization in Atherosclerotic Conditions*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2017. **37**(5): p. 900-908.
15. Dhahri, W., et al., *Reduced expression of let-7f activates TGF-beta/ALK5 pathway and leads to impaired ischaemia-induced neovascularization after cigarette smoke exposure*. J Cell Mol Med, 2017. **21**(9): p. 2211-2222.

16. Tamarat, R., et al., *Impairment in Ischemia-Induced Neovascularization in Diabetes: Bone Marrow Mononuclear Cell Dysfunction and Therapeutic Potential of Placenta Growth Factor Treatment*. Am J Pathol, 2004. **164**(2): p. 457-66.
17. Chen, J.Z., et al., *Number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood in patients with hypercholesterolaemia*. Clin Sci (Lond), 2004. **107**(3): p. 273-80.
18. Tirziu, D., et al., *Delayed arteriogenesis in hypercholesterolemic mice*. Circulation, 2005. **112**(16): p. 2501-9.
19. Van Belle, E., et al., *Hypercholesterolemia attenuates angiogenesis but does not preclude augmentation by angiogenic cytokines*. Circulation, 1997. **96**(8): p. 2667-74.
20. Losordo, D.W. and S. Dimmeler, *Therapeutic Angiogenesis and Vasculogenesis for Ischemic Disease*. Part I: Angiogenic Cytokines, 2004. **109**(21): p. 2487-2491.
21. Lin, C.P., et al., *Endothelial Progenitor Cell Dysfunction in Cardiovascular Diseases: Role of Reactive Oxygen Species and Inflammation*. Biomed Res Int, 2013. **2013**.
22. Galle, J., et al., *Endothelial dysfunction and inflammation: What is the link?* Kidney International, 2003. **63**(Supplement 84): p. S45-S49.
23. Fridlender, Z.G., et al., *Polarization of Tumor-Associated Neutrophil (TAN) Phenotype by TGF- β : "N1" versus "N2" TAN*. Cancer Cell, 2009. **16**(3): p. 183-94.
24. Zajac, E., et al., *Angiogenic capacity of M1- and M2-polarized macrophages is determined by the levels of TIMP-1 complexed with their secreted proMMP-9*. Blood, 2013. **122**(25): p. 4054-67.
25. Urbich, C., A. Kuehbach, and S. Dimmeler, *Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis*. Cardiovasc Res, 2008. **79**(4): p. 581-8.
26. Suarez, Y. and W.C. Sessa, *MicroRNAs as novel regulators of angiogenesis*. Circ Res, 2009. **104**(4): p. 442-54.
27. Feinberg, M.W. and K.J. Moore, *MicroRNA regulation of atherosclerosis*. Circ Res, 2016. **118**(4): p. 703-20.
28. Nemezc, M., et al., *Role of MicroRNA in Endothelial Dysfunction and Hypertension*. Curr Hypertens Rep, 2016. **18**(12): p. 87.
29. Bonauer, A., et al., *MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice*. Science, 2009. **324**(5935): p. 1710-3.
30. Dhahri, W., et al., *Reduced expression of let-7f activates TGF-beta/ALK5 pathway and leads to impaired ischaemia-induced neovascularization after cigarette smoke exposure*. J Cell Mol Med, 2017.
31. Shen, J.K., et al., *MicroRNAs Regulate Ocular Neovascularization*. Mol Ther, 2008. **16**(7): p. 1208-16.

32. Park, H., et al., *MicroRNA-146a and microRNA-146b regulate human dendritic cell apoptosis and cytokine production by targeting TRAF6 and IRAK1 proteins*. J Biol Chem, 2015. **290**(5): p. 2831-41.
33. Curtale, G., et al., *Negative regulation of Toll-like receptor 4 signaling by IL-10-dependent microRNA-146b*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(28): p. 11499-504.
34. Echavarria, R., et al., *Angiopoietin-1 inhibits toll-like receptor 4 signalling in cultured endothelial cells: role of miR-146b-5p*. Cardiovasc Res, 2015. **106**(3): p. 465-77.
35. Maingrette, F., et al., *Psychological stress impairs ischemia-induced neovascularization: Protective effect of fluoxetine*. Atherosclerosis, 2015. **241**(2): p. 569-78.
36. Turgeon, J., et al., *Fish oil-enriched diet protects against ischemia by improving angiogenesis, endothelial progenitor cell function and postnatal neovascularization*. Atherosclerosis, 2013. **229**(2): p. 295-303.
37. Groleau, J., et al., *Essential role of copper-zinc superoxide dismutase for ischemia-induced neovascularization via modulation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(11): p. 2173-81.
38. Cheng, H.S., et al., *MicroRNA-146 represses endothelial activation by inhibiting pro-inflammatory pathways*. EMBO Mol Med, 2013. **5**(7): p. 949-66.
39. Hulsmans, M., et al., *Decrease of miR-146b-5p in Monocytes during Obesity Is Associated with Loss of the Anti-Inflammatory but Not Insulin Signaling Action of Adiponectin*. PLoS One, 2012. **7**(2).
40. Annex, B.H., *Therapeutic angiogenesis for critical limb ischaemia*. Nat Rev Cardiol, 2013. **10**(7): p. 387-96.
41. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. **340**(2): p. 115-26.
42. Vasa, M., et al., *Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease*. Circ Res, 2001. **89**(1): p. E1-7.
43. Boodhwani, M., et al., *Hypercholesterolemia impairs the myocardial angiogenic response in a swine model of chronic ischemia: role of endostatin and oxidative stress*. Ann Thorac Surg, 2006. **81**(2): p. 634-41.
44. Roos, J., et al., *miR-146a-mediated suppression of the inflammatory response in human adipocytes*. Sci Rep, 2016. **6**.
45. Libby, P., *Inflammation in atherosclerosis*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 868-74.
46. Hulsmans, M., et al., *Decrease of miR-146b-5p in monocytes during obesity is associated with loss of the anti-inflammatory but not insulin signaling action of adiponectin*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e32794.

47. Bruneau, S., et al., *TRAF6 inhibits proangiogenic signals in endothelial cells and regulates the expression of vascular endothelial growth factor*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012. **419**(1): p. 66-71.
48. Desjarlais, M., et al., *Direct renin inhibition with aliskiren improves ischemia-induced neovascularization: blood pressure-independent effect*. *Atherosclerosis*, 2015. **242**(2): p. 450-60.
49. Haddad, P., et al., *Nox2-derived reactive oxygen species contribute to hypercholesterolemia-induced inhibition of neovascularization: effects on endothelial progenitor cells and mature endothelial cells*. *Atherosclerosis*, 2011. **217**(2): p. 340-9.
50. Lefevre, J., et al., *Moderate consumption of red wine (cabernet sauvignon) improves ischemia-induced neovascularization in ApoE-deficient mice: effect on endothelial progenitor cells and nitric oxide*. *FASEB J*, 2007. **21**(14): p. 3845-52.
51. Turgeon, J., et al., *Probucol and antioxidant vitamins rescue ischemia-induced neovascularization in mice exposed to cigarette smoke: potential role of endothelial progenitor cells*. *Atherosclerosis*, 2010. **208**(2): p. 342-9.
52. Emanuelli, C., et al., *Nitropravastatin stimulates reparative neovascularisation and improves recovery from limb Ischaemia in type-1 diabetic mice*. *Br J Pharmacol*, 2007. **150**(7): p. 873-82.
53. Ma, F.X. and Z.C. Han, *Statins, nitric oxide and neovascularization*. *Cardiovasc Drug Rev*, 2005. **23**(4): p. 281-92.
54. Lutgens, E., et al., *Deficient CD40-TRAF6 signaling in leukocytes prevents atherosclerosis by skewing the immune response toward an antiinflammatory profile*. *J Exp Med*, 2010. **207**(2): p. 391-404.
55. Polykratis, A., et al., *Conditional Targeting of TRAF6 Reveals Opposing Functions of TLR Signaling in Endothelial and Myeloid Cells in a Mouse Model of Atherosclerosis*. *Circulation*, 2012.
56. Gardiner, T.A., et al., *Inhibition of Tumor Necrosis Factor- α Improves Physiological Angiogenesis and Reduces Pathological Neovascularization in Ischemic Retinopathy*. *Am J Pathol*, 2005. **166**(2): p. 637-44.
57. Heinrich, E.M. and S. Dimmeler, *MicroRNAs and stem cells: control of pluripotency, reprogramming, and lineage commitment*. *Circ Res*, 2012. **110**(7): p. 1014-22.
58. Su, Z.-F., et al., *Regulatory effects of miR-146a/b on the function of endothelial progenitor cells in acute ischemic stroke in mice*. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 2017. **33**(8): p. 369-378.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Effect of oxLDL and hypercholesterolemia on miR-146b expression and on TRAF6 inflammatory pathway. **A** and **C**, Relative expression of miR-146b in HUVEC exposed or not to 50µg/ml of oxLDL for 24h (**A**) and in ischemic muscles of normocholesterolemic control mice (NC) and in hypercholesterolemic ApoE knockout mice (HC) 24h after ischemic surgery (**C**) was assessed by real-time qPCR. **B** and **D**, Representative western blots and quantitative analysis of TRAF6, TNF- α and VCAM-1 expression in HUVECs exposed or not to 50µg/ml of oxLDL for 3, 6 and 24h (**B**) and in the ischemic muscles of NC and HC mice 3 day post-ischemia (**D**). CTL=controls. Data (n=3) are mean \pm SEM. * $P<0.05$ vs. CTL or NC, # $P<0.05$ vs. ischemic NC.

Figure 2: Effect of miR-146b modulation on TRAF6 pathway in endothelial cells. **A** and **B**, To evaluate the function of miR-146b in the regulation of the TRAF6 pathway in basal endothelial cells (ECs) phenotype and in oxLDL stimulated ECs, the expression level of miR-146b was modulated using a miR-146b mimic or an anti-miR-146 before oxLDL exposure or not. Representative western blots and quantitative analysis of TRAF6, TNF- α and VCAM-1 expression in HUVECs transfected with an anti-miR-146b or a control anti-miR (CTL) for 24h (**A**), with an miR-146b mimic or a miR mimic control (CTL) before oxLDL exposure (50µg/ml for 24h) (**B**). To evaluate the direct regulatory effects of miR-146b on TRAF6 expression in basal or oxLDL stimulated HUVECs we used a luciferase reporter assay system. HUVECs were pre-transfected with luciferase reporter plasmids expressing wild type TRAF6 (wt-TRAF6) or a mutated 3' UTR TRAF-6 (mut-TRAF6) for 24h before oxLDL exposure or miR-146b mimic transfection. **C** and **D**, relative luciferase activity of wt-TRAF6 and mut-TRAF6 in HUVECs exposed to 50µg/ml for 24h (**C**) or in HUVEC transfected with a miR-146b mimic or control miR mimic (CTL mimic) (**D**). CTL=controls. Data (n=3) are mean \pm SEM. * $P<0.05$ vs. CTL anti-miR (**A** and **C**), oxLDL (**B**), CTL mimic (**D**).

Figure 3: Role of miR-146b in oxLDL-induced endothelial dysfunction and angiogenic impairment. To evaluate the role of miR-146b in endothelial dysfunction, we performed a gain and loss of function experiment. HUVECs were transfected with an anti-miR-146b, an miR-146b mimic or a control miR (CTL), followed or not by oxLDL exposure (50 μ g/ml for 24h). **A-F**, Representative pictures and quantifications analysis of superoxide anion generation in HUVECs assessed by DHE staining (**A** and **C**) and monocyte adhesion capacity to endothelial cells assessed by a co-culture of THP-1 and HUVECs for 1h (**B** and **D**). **E** and **F**, evaluation of angiogenesis and cell migration *in vitro* using respectively a matrigel assay and a scratch assay in HUVEC. Data are mean \pm SEM (n=4). * $P < 0.05$ vs. CTL; # $P < 0.05$ vs. oxLDL.

Figure 4: Effect miR-146b treatment on ischemia-induced neovascularization in hypercholesterolemic ApoE knockout mice (HC). Representative pictures and quantification of blood flow recovery (**A** and **C**) and capillary density (**B** and **D**) assessed by laser Doppler and CD31 immunostaining at 7 days after hindlimb ischemia in HC mice treated with miR-146b or a scrambled miR mimic control (CTL). A color scale illustrates blood flow variations from minimal (dark blue) to maximal (red) values and arrows indicate left ischemic hindlimbs (**A**). **E**. Evaluation of ischemic damages in the different groups. **F**. Representative western blots and quantitative analysis of TRAF6 and TNF- α expression normalized on b-Actin, 7 days after hindlimb ischemia in the two groups of mice. Data are mean \pm SEM (n=6-8/group). * $P < 0.05$ vs. CTL

Figure 5: Effect of miR-146b treatment on PAC number and function. **A**. Quantification of triple-stained PACs (DAPI, BS-1 lectin-FITC and DiI-acLDL) isolated 7 days after hindlimb ischemia in hypercholesterolemic ApoE knockout mice (HC) treated with miR-146b or with a scrambled miR mimic control (CTL). **B**. PACs proliferative capacity was assessed by MTS assay in the different groups. **C** and **D**. Representative pictures and quantification of PACs (red) adhesion to a HUVEC monolayer (**C**) and integration into HUVEC tubules in matrigel (**D**) in the different groups. Data are mean \pm SEM (n=5/group). * $P < 0.05$ vs. CTL

Figure 1.

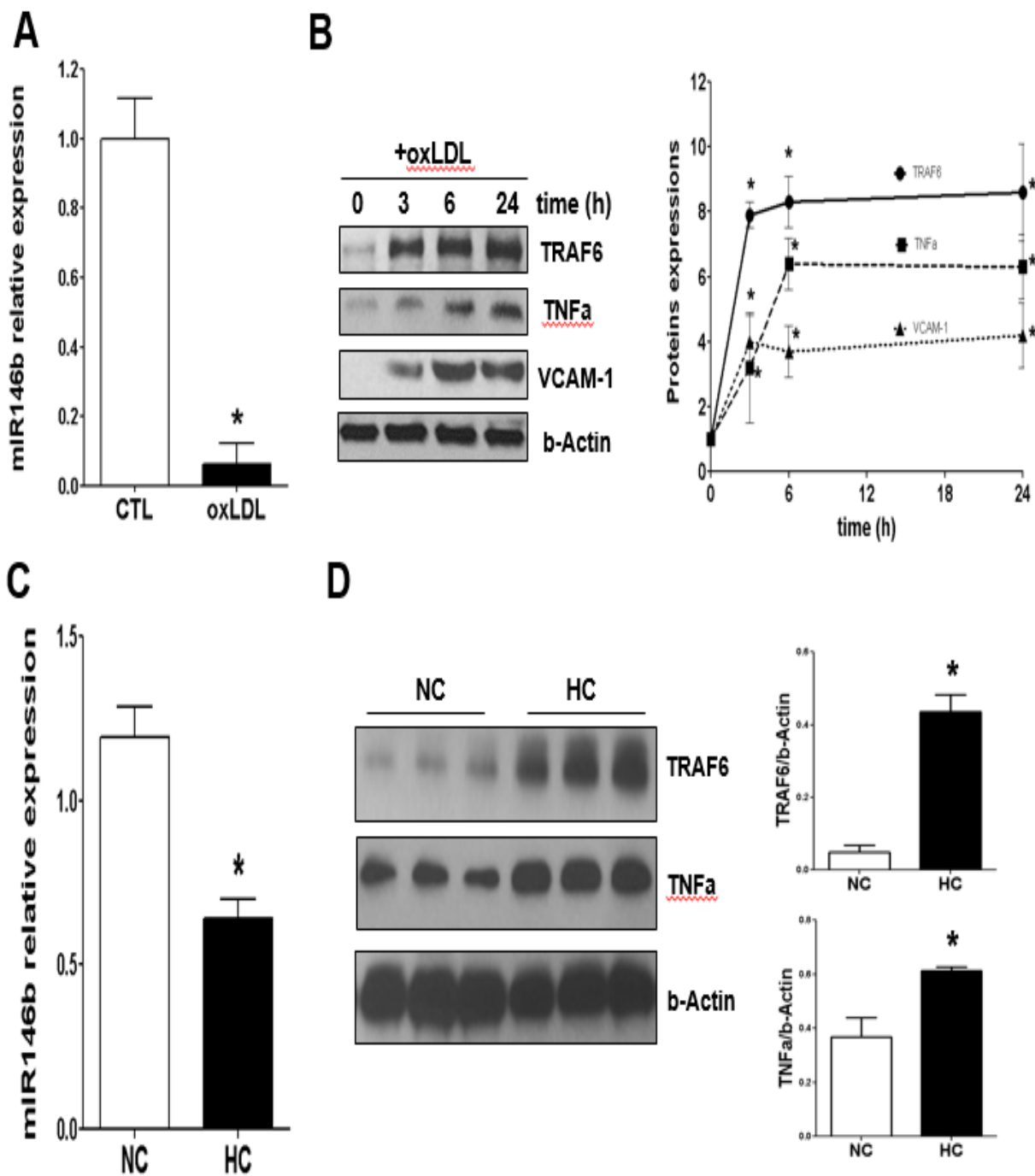


Figure 2.

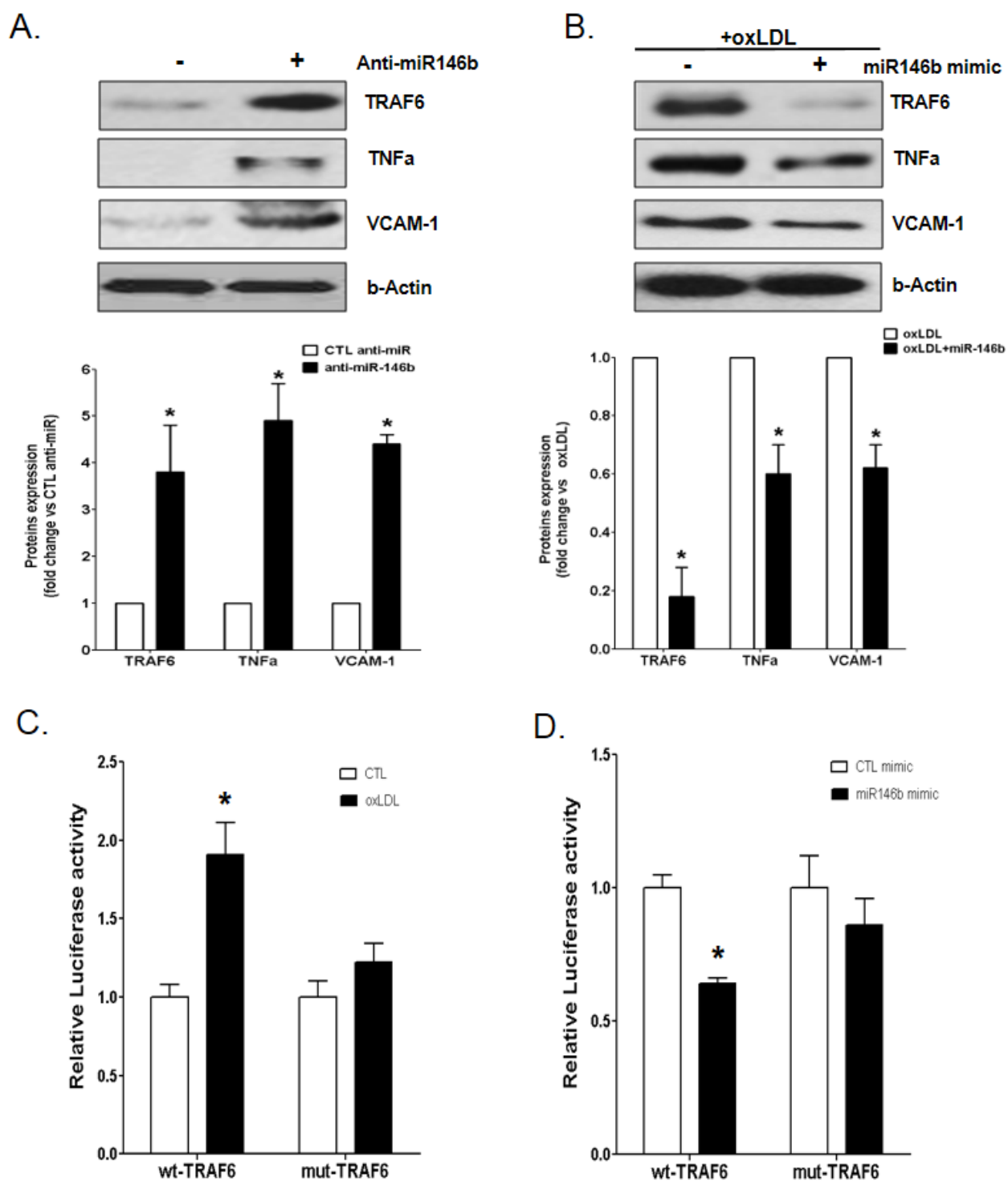


Figure 3.

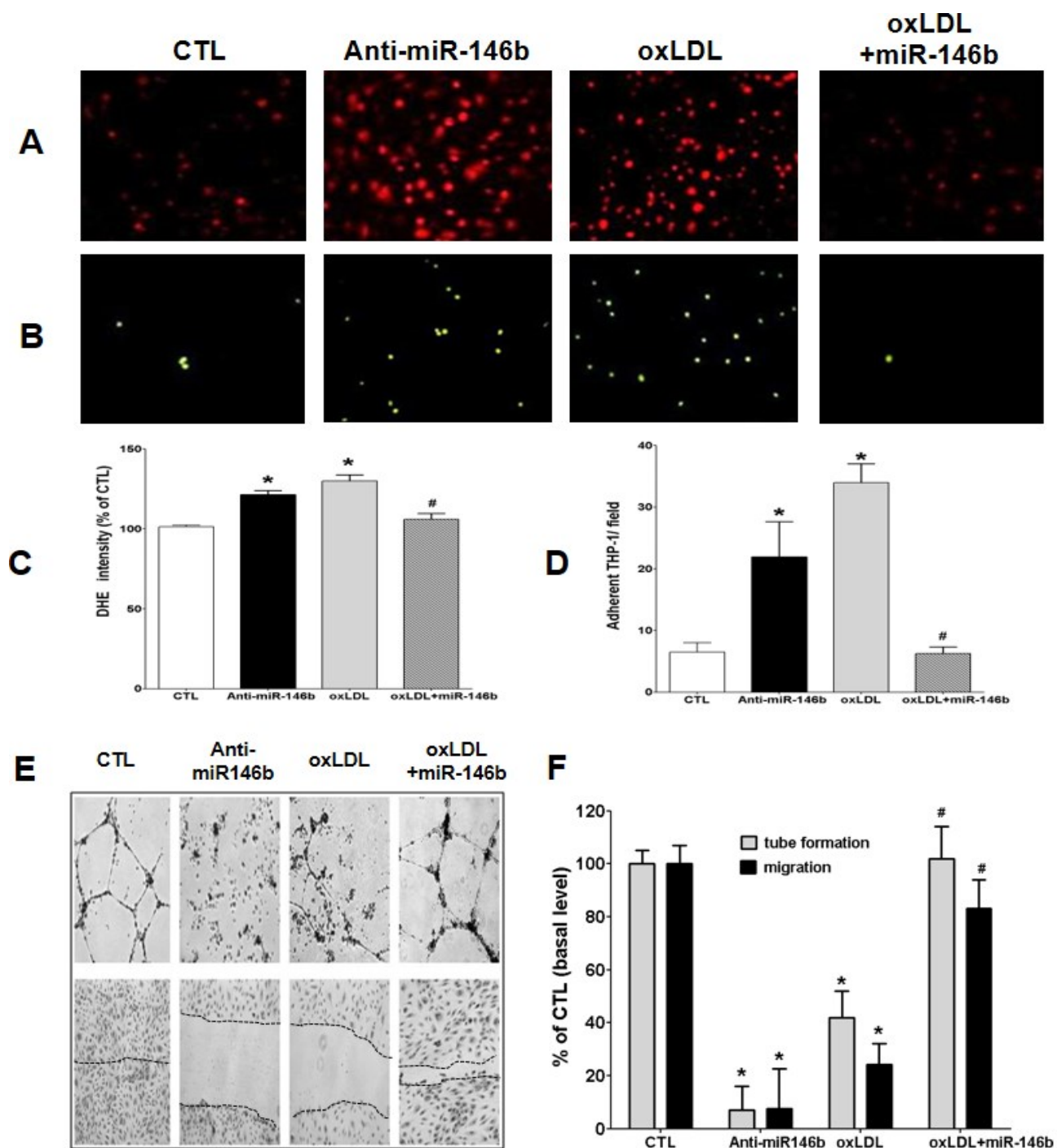


Figure 4.

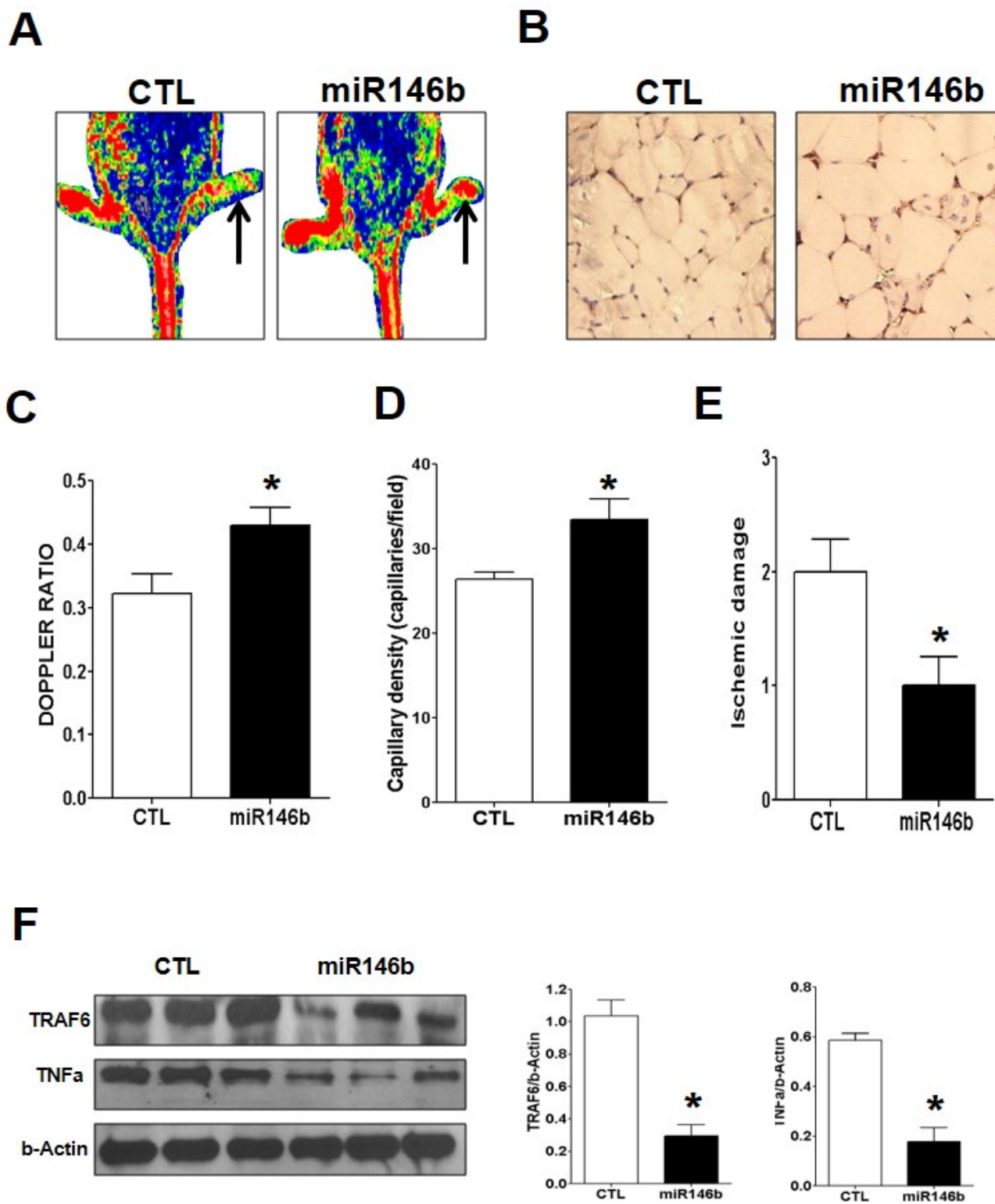
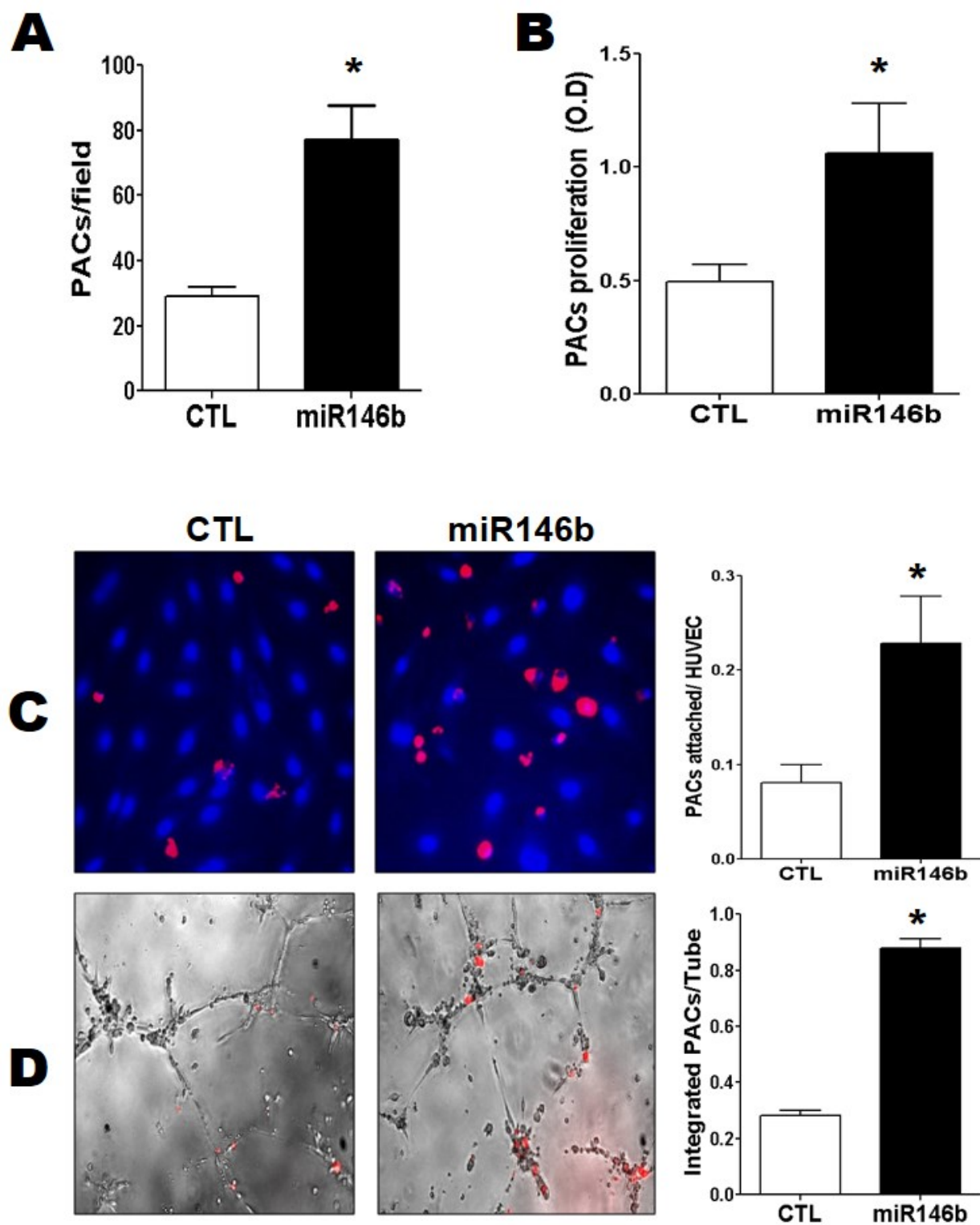


Figure 5.



IV-Discussion

Au cours de la dernière décennie, les progrès en sciences biomédicales ont permis une avancée majeure dans la compréhension des maladies humaines et l'élaboration de nouvelles thérapies novatrices pour le traitement de diverses pathologies (Botstein 2012). Cependant, encore aujourd'hui, les maladies cardiovasculaires ischémiques causées par l'athérosclérose demeurent la principale cause de mortalité mondiale (Finegold, Asaria et al. 2013). Il devient donc impératif d'investiguer des mécanismes essentiels qui régulent le développement de l'athérosclérose, mais aussi de mieux caractériser la fonction des gènes impliqués dans la régulation de la réponse adaptative de néovascularisation. Dans cette thèse, nos travaux ont permis d'investiguer de nouvelles approches thérapeutiques potentielles afin d'améliorer la néovascularisation post-ischémique par l'inhibition de la rénine et/ou par une supplémentation de miRs spécifiques. Mes travaux ont aussi permis d'identifier et de caractériser pour la première fois deux miRs dont l'expression est dérégulée en conditions athérosclérotiques et qui sont impliqués dans la défaillance de néovascularisation. Cette caractérisation a permis de démontrer *in vivo* dans un modèle murin d'ischémie de la patte qu'une injection intramusculaire de miR-150 et de miR-146b permet de récupérer la néovascularisation diminuée par ces conditions pathologiques.

Le modèle murin d'ischémie de la patte utilisé dans nos travaux simule une situation d'ischémie sub-aigue des membres inférieurs chez l'humain et non une ischémie aigue de type nécrotique. Dans ce type d'ischémie chronique des membres inférieurs, la sévérité des dommages aux tissus est grandement influencée par la néovascularisation, un processus qui lui-même est modulé négativement par diverses conditions pathologiques associées à l'athérosclérose. Cette capacité de néovascularisation est donc un élément critique qui permet de préserver la perfusion sanguine dans la zone ischémique pour atténuer les dommages tissulaires (Silvestre, Smadja et al. 2013). Lorsque l'athérosclérose est très diffuse et que les

techniques classiques de revascularisation ne peuvent être effectuées avec succès, la stimulation thérapeutique de la néovascularisation pourrait devenir une option intéressante et ceci fait partie de l'objet de mes travaux de recherche (Ylä-Herttuala, Bridges et al. 2017).

Les mécanismes impliqués dans la néovascularisation sont complexe et impliquent de multiples gènes et médiateurs moléculaires régulant l'angiogenèse, la vasculogenèse et l'artériogenèse. Ces facteurs agissent de concert afin d'établir un nouveau réseau vasculaire fonctionnel (Silvestre, Smadja et al. 2013). L'impact délétère des conditions liées au développement de l'athérosclérose sur les gènes régulant la fonction angiogénique des ECs reste peu documenté. La néovascularisation post-natale implique la mobilisation au site ischémique de différents types cellulaires (Basile and Yoder 2014), dont en particulier les PACs qui sont reconnues pour sécréter différentes molécules pro-angiogéniques (Rose, Erzurum et al. 2015). Ces cellules jouent donc un rôle de support crucial à la néovascularisation et ont été étudiées au cours de cette thèse. Par contre, les mécanismes précis modulant leurs activités fonctionnelles n'ont été que partiellement définis dans nos travaux.

De façon intéressante, il a été démontré au cours des dernières années que plusieurs situations cliniques associées au développement de l'athérosclérose causent une défaillance de néovascularisation post-ischémique dans divers modèles animaux (Michaud, Menard et al. 2003, Tamarat, Silvestre et al. 2004, Ebrahimian, Heymes et al. 2006, Michaud, Dussault et al. 2006, Groleau, Dussault et al. 2011, Haddad, Dussault et al. 2011, Dhahri, Dussault et al. 2017). Aussi, plusieurs études cliniques ont observé une défaillance de la capacité angiogénique des ECs et des PACs chez les patients présentant divers facteurs de risques cardiovasculaires (Umemura, Soga et al. 2008, Rossi, Bertone et al. 2010, Silvestre, Smadja et al. 2013, Lee and Poh 2014). Selon notre hypothèse de départ, nous pensons que l'inhibition des fonctions angiogéniques des ECs et des PACs contribuait à créer un environnement propice à une néovascularisation insuffisante suite à l'ischémie. Parmi les facteurs communs retrouvés dans le développement de l'athérosclérose, nous retrouvons un niveau élevé de stress oxydant systémique et une inflammation soutenue dans les vaisseaux (Lin, Lin et al. 2013, Lam 2016). Le stress oxydant et l'inflammation sont souvent interreliés dans un cercle pathogène menant à la dysfonction endothéliale, une étape clé dans l'athérosclérose mais aussi dans la défaillance

angiogénique des ECs. Également, plusieurs études ont démontré autant chez l'humain que chez l'animal que le stress oxydant et l'inflammation soutenue peuvent réduire le nombre de PACs en circulation et causer leur dysfonction (Landmesser, Spiekermann et al. 2002, Case, Ingram et al. 2008, Pesaro, Serrano et al. 2012, Dopheide, Geissler et al. 2016). La dysfonction endothéliale et un faible niveau de PACs circulant sont des éléments clés dans la plupart des pathologies cardiovasculaires et pourraient aussi contribuer à la défaillance de néovascularisation. Au cours des dernières années, notre laboratoire a démontré dans un modèle de souris ischémique du membre inférieur que plusieurs facteurs de risques cardiovasculaires comme le tabagisme, l'hypercholestérolémie et le vieillissement diminuent la néovascularisation suite à l'ischémie (Michaud, Menard et al. 2003, Michaud, Dussault et al. 2006, Turgeon, Dussault et al. 2010, Groleau, Dussault et al. 2011, Haddad, Dussault et al. 2011, Turgeon, Haddad et al. 2012). Nos travaux ont confirmé que cet effet pathologique sur la néovascularisation était en partie associé à une augmentation du stress oxydant. Notre laboratoire a également observé qu'il était possible de récupérer la néovascularisation physiologique chez la souris en diminuant le stress oxydant par divers traitements. De plus nous avons démontré de façon directe que la délétion du gène NOX2, un important générateur endogène d'anions superoxyde, permet d'augmenter la néovascularisation *in vivo* chez la souris. Ces différentes études avaient pour but de caractériser l'impact général des facteurs de risques cardiovasculaires et du stress oxydant sur la néovascularisation. Ainsi, suite à ces différentes observations, une investigation plus poussée des mécanismes moléculaires pouvant potentiellement être impliqués dans l'effet pathologique du stress oxydant sur la réponse de néovascularisation a fait l'objet de mon premier projet de recherche (Desjarlais, Dussault et al. 2015).

L'objectif de ma première étude visait à évaluer l'effet de l'inhibition directe de la rénine sur la réponse physiologique de néovascularisation post-ischémique. La rénine est une enzyme clé du système RAS faisant partie de l'étape limitante permettant la génération d'Ang2, un important générateur d'anions superoxydes (Volpe, Savoia et al. 2002). Plusieurs études ont démontré qu'une augmentation de l'activité de RAS mène à l'hypertension, la dysfonction endothéliale et l'athérosclérose (Volpe, Savoia et al. 2002, Daugherty, Rateri et al. 2004, Daugherty, Lu et al. 2008, Ma, Kam et al. 2010). D'autres études ont également documenté que

l'activation chronique de RAS est aussi associée à une diminution de la récupération du flot sanguin suite à une ischémie (Fabre, Rivard et al. 1999) et à une réduction du nombre et de l'activité fonctionnelle des PACs (Imanishi, Hano et al. 2005). Cliniquement, l'inhibition de RAS est en général effectuée par l'utilisation d'ACEI et d'ARB. Ces différents agents pharmacologiques présentent en général des effets bénéfiques chez les patients avec des pathologies athérosclérotiques (Ma, Kam et al. 2010). Par contre, leurs rôles dans la modulation de la néovascularisation post-ischémique dans un contexte d'occlusion vasculaire demeurent controversés. Par exemple, les différents ACE ne montrent pas les mêmes effets sur la néovascularisation dans un même modèle animal (Willis, El-Remessy et al. 2011). En effet, l'ACEI quinaprilate améliore la néovascularisation chez le lapin alors que l'ACEI captopril ne présente aucun effet (Fabre, Rivard et al. 1999). Le même phénomène est observé lors de l'utilisation d'ARB qui présentent des effets pro- ou anti-angiogéniques selon l'agent utilisé (Willis, El-Remessy et al. 2011). À la lumière de ces informations, l'inhibition directe de la rénine par l'aliskiren devenait intéressante dans un contexte de néovascularisation. Également, du fait que l'aliskiren inhibe l'étape limitante du RAS et que plusieurs études ont démontré que cet agent possède une action bénéfique sur la fonction endothéliale et l'athérosclérose, l'aliskiren constituait une cible thérapeutique idéale pour notre étude (Imanishi, Tsujioka et al. 2008, Lu, Rateri et al. 2008).

Pour étudier l'effet de l'aliskiren sur la néovascularisation *in vivo*, nous avons utilisé un modèle murin d'ischémie de la patte. Ce modèle consiste à effectuer une ablation chirurgicale de l'artère fémorale et une excision des vaisseaux adjacents afin d'induire une ischémie sévère dans la patte de la souris. À noter que ce même modèle est utilisé pour toutes les études *in vivo* dans cette thèse. Suite à la chirurgie d'ischémie, la récupération du flot sanguin est mesurée par Laser Doppler à divers temps (jusqu'à 3 semaines) post-chirurgie. Au niveau microvasculaire, nous mesurons la densité capillaire et artériolaire du muscle ischémique par marquage des tissus au CD31 et à l'élastine respectivement. Ce modèle murin d'ischémie a initialement été développé chez le lapin et décrit chez la souris par Couffinhal en 1998. Il s'agit maintenant d'un modèle fréquemment utilisé pour évaluer la néovascularisation réparatrice (Couffinhal, Dufourcq et al. 2009). Ce modèle permet de diminuer significativement le flot sanguin et de simuler la condition clinique des patients présentant une ischémie sévère du membre inférieur.

Pour la première étude de cette thèse, nous avons utilisé des souris C57Bl6. Les souris ont été prétraitées deux semaines avant la chirurgie avec deux doses d'aliskiren (10 ou 50 mg/kg/jours) ou avec le véhicule. Le traitement s'est ensuite poursuivi jusqu'à la fin de l'étude. Nos résultats ont démontré une augmentation significative de la récupération du flot sanguin et de la densité vasculaires dans le muscle ischémique chez les souris traitées avec une faible dose d'aliskiren (10mg/kg/j) comparées aux souris contrôles (CTL). De façon intéressante nous avons aussi observé que seule la faible dose d'aliskiren (10mg/kg/j), une dose qui ne modifiait pas la pression artérielle, avait un effet bénéfique sur la néovascularisation. Ces résultats suggèrent que l'effet bénéfique de l'aliskiren sur la néovascularisation est indépendant de son action hypotensive. Par contre, les souris traitées avec une haute dose d'aliskiren (50 mg/kg/j) montraient une néovascularisation similaire aux souris CTL. Bien que le mécanisme impliqué n'est pas défini, il est possible de penser que l'hypotension associée à de fortes doses d'aliskiren pourrait être sous-optimale pour la néovascularisation dans un contexte d'ischémie. De façon intéressante, des observations similaires ont été documentées chez les souris hypercholestérolémiques dans un contexte d'athérosclérose. En effet, les effets anti-athérosclérotiques de l'aliskiren ont été observés seulement à faibles doses (Lu, Rateri et al. 2008). Pour évaluer l'effet angiogénique de l'aliskiren sur les ECs, nous avons utilisé un modèle *in vitro* avec des HUVECs. Les HUVECs sont des cellules endothéliales humaines de la veine ombilicale et sont fréquemment utilisées pour les études sur l'angiogénèse (DeCicco-Skinner, Henry et al. 2014). Nos résultats ont démontré que l'aliskiren stimule la migration et la formation de tubules de façon supérieure à un traitement au VEGF (contrôle positif). Au niveau moléculaire, nous avons observé que cette stimulation angiogénique des HUVECs par l'aliskiren est accompagnée d'une augmentation significative de la production de VEGF endogène. Toutefois, les résultats obtenus *in vitro* ne permettent pas d'adresser le mécanisme exact à l'origine de l'augmentation de VEGF par l'aliskiren.

Premièrement, nous avons observé que l'Aliskiren induit une augmentation de NO, un facteur qui est induit par le VEGF mais qui est également impliqué dans l'induction du VEGF, formant ainsi une boucle de régulation réciproque VEGF/NO et NO/VEGF (Kimura et al, 2003). Il a aussi été démontré que le NO induit en normoxie l'expression de HIFa, un important facteur de transcription du VEGF (Kasumo et al, 2004). Le NO est aussi documenté pour être facteur

de mobilisation des PACs qui sont recrutées dans les tissus ischémiques et sécrètent du VEGF (Tiling et al, 2009; Ozuyaman et al, 2009). Aussi, il a été démontré que les ROS en excès inhibent l'expression du VEGF (Edirisingue et al, 2010; Kanazawa et al, 2005). Les caractéristiques antioxydantes de l'Aliskiren observées dans notre étude pourraient donc expliquer en partie l'augmentation de la production de VEGF. De façon plus directe, si on regarde l'effet de la délétion des différentes composantes de RAS sur la production de VEGF, les études semblent conflictuelles. Par exemple, il a été documenté que l'angiotensine 2 (Ang2) augmente la production de VEGF (Kang et al, 2006), alors que d'autres études montrent que des agents diminuant la production de l'Ang2 (ACEi) ou des antagonistes de l'AT1 inhibent l'expression du VEGF (Sauter et al, 2007; Higgins et al, 2003). L'augmentation du VEGF pourrait aussi être le résultat de la stimulation de voies alternatives liées au système RAS. Par exemple, il est connu qu'une diminution de l'Ang2 par des ACEi est associée à une augmentation de la bradykinine (Gauthier et al, 2013; Su et al, 1999). Or, l'activation du récepteur 2 de la bradykinine est aussi impliquée dans l'induction de l'expression de VEGF (Ishihara et al, 2002; Li et al, 2008). Tous comme les ACEi, Il est possible de penser que l'Aliskiren pourrait potentiellement augmenter le VEGF par une diminution de l'activité de l'AT2. Il a aussi été démontré que la répression du récepteur 2 de l'angiotensine 2 (AT2) chez les souris diabétiques augmente l'action du VEGF en diminuant SHP-1, un inhibiteur endogène du VEGFR2 (Paquin-Veillette et al, 2017). Le VEGFR2 stimule l'activation de la voie PI3K/AKT/eNOS et comme il a été discuté plus haut, le NO peut stimuler l'expression du VEGF. Finalement, comme l'Aliskiren est associé à une augmentation de la rénine plasmatique et qu'il ne bloque pas la liaison entre la rénine et le PRR (Satufuka et al, 2006; Verdecchia et al, 2008), il est possible de spéculer qu'une augmentation de l'activité de signalisation de PRR pourrait stimuler à son tour des voies de signalisation impliquées dans la production de VEGF. Par contre, le rôle exact du PRR est présentement mal compris.

Nos résultats suggèrent que les mécanismes responsables de l'augmentation de la néovascularisation par l'aliskiren sont multiples. Premièrement, nos résultats ont démontré que l'aliskiren diminue le niveau d'anions superoxydes dans le muscle ischémique des souris, mais également dans les HUVECs *in vitro*. Un niveau de stress oxydant élevé mène à la dysfonction endothéliale et cause une défaillance des capacités angiogéniques des ECs et des PACs. Aussi,

nos études précédentes au laboratoire ont permis de démontrer que la délétion du gène NOX2, un important générateur d'anions superoxydes dans la vasculature, est suffisant pour augmenter significativement la néovascularisation chez la souris (Haddad, Dussault et al. 2011). De façon intéressante, nos résultats ont démontré que l'aliskiren diminue l'expression de NOX2 dans le muscle ischémique et dans les HUVECs. Parmi les autres facteurs pouvant expliquer en partie l'effet bénéfique de l'aliskiren sur la néovascularisation, nous avons observé une augmentation significative de VEGF dans le muscle ischémique et une augmentation du niveau de NO dans le sérum des souris traitées. Le VEGF est un facteur pro-angiogénique clé impliqué dans plusieurs étapes de l'angiogenèse (Asahara, Takahashi et al. 1999) et le NO est documenté comme un facteur stimulant la migration des ECs et la mobilisation des PACs (Babaei and Stewart 2002, Ozuyaman, Ebner et al. 2005). Le NO est aussi essentiel pour l'induction de l'angiogenèse par le VEGF (Papapetropoulos, Garcia-Cardena et al. 1997) et pour la néovascularisation post-ischémique (Murohara, Asahara et al. 1998). Plusieurs études ont démontré que les ROS peuvent inhiber la phosphorylation d'eNOS, causer une diminution de la biodisponibilité du NO et inhiber l'induction de l'angiogenèse par le VEGF (Urbich, Dernbach et al. 2002, Michaud, Dussault et al. 2006, Lefevre, Michaud et al. 2007). Toutes ces évidences suggèrent donc que l'action antioxydante de l'aliskiren documentée dans notre étude pourrait expliquer l'augmentation du VEGF, du NO et la stimulation subséquente de l'activité angiogénique des ECs. De façon importante, nos résultats *in vitro* ont aussi démontré une corrélation inverse entre les anions superoxydes et le NO dans les ECs traitées à l'aliskiren. Ce résultat suggère que l'action pro-angiogénique de l'aliskiren pourrait être reliée à l'augmentation du NO. Afin de tester cette hypothèse, un groupe supplémentaire de souris a été co-traité avec l'aliskiren et l'inhibiteur d'eNOS, L-NAME. Nos résultats ont démontré que l'action bénéfique de l'aliskiren sur la néovascularisation *in vivo* est complètement abolie en présence de L-NAME, démontrant l'importance du NO dans ce mécanisme d'action. Le même phénomène a été observé *in vitro* dans les HUVECs co-traitées avec aliskiren et L-NAME. Plus précisément, l'inhibition d'eNOS abolie l'induction de la migration des HUVECs et la formation de tubules induites par l'aliskiren. Globalement, ces résultats suggèrent que l'aliskiren agit par un mécanisme dépendant de l'axe de signalisation VEGF/eNOS. Les résultats obtenus sont donc conformes aux études antérieures qui ont démontré que l'activation d'eNOS peut être stimulée par l'aliskiren et le valsartan (un ARB) (Imanishi, Tsujioka et al. 2008, Zhang, Han et al. 2014).

Afin de mieux caractériser l'effet de l'aliskiren sur la néovascularisation, nous avons isolé les PACs de la moelle osseuse et de la rate des souris afin de comparer leur nombre et leur activité angiogénique. À noter que les PACs présents dans la rate reflètent le niveau de PACs circulants. Les PACs jouent un rôle clé dans la néovascularisation post-natale en intégrant les tissus aux sites ischémiques pour sécréter divers facteurs angiogéniques. Nos résultats ont démontré que les souris traitées à l'aliskiren ont approximativement 4 fois plus de PACs CD34+/FLK1+ dans la moelle osseuse et en circulation que les souris non traitées. De façon intéressante, nous avons aussi observé une amélioration significative de l'activité fonctionnelle des PACs chez les souris traitées à l'aliskiren comparées aux souris contrôles. En effet, une augmentation de leur habileté à migrer et à intégrer les tubules formés par les HUVECs a été observée. Ces résultats concordent avec de précédentes études qui ont démontré que l'aliskiren, utilisé dans un contexte de traitement anti-athérosclérotique, augmente le nombre d'EPCs chez les souris hypercholestérolémiques (Poss, Werner et al. 2010) et chez les patients diabétiques et hypertendus (Raptis, Markakis et al. 2015). Nos travaux ont documenté pour la première fois l'effet de l'aliskiren sur les PACs dans un contexte de néovascularisation post-ischémique. Le mécanisme d'action à l'origine de l'effet bénéfique de l'aliskiren sur les PACs pourrait encore une fois être lié indirectement aux propriétés antioxydantes de l'aliskiren et à sa fonction stimulatrice sur NO et VEGF. En effet, il a été déjà démontré qu'un excès de stress oxydant cause une défaillance de l'activité angiogénique des PACs (Lefevre, Michaud et al. 2007, Turgeon, Dussault et al. 2010, Groleau, Dussault et al. 2011, Turgeon, Haddad et al. 2012, Raptis, Markakis et al. 2015) et que le NO et le VEGF sont des facteurs importants pour leurs fonctions angiogéniques (Asahara, Takahashi et al. 1999, Aicher, Heeschen et al. 2003).

Nos travaux ont donc démontré pour la première fois que l'inhibition directe de la rénine par l'aliskiren améliore la néovascularisation suite à une condition d'ischémie. Également, nos données suggèrent que l'effet antioxydant de l'aliskiren améliore la fonction angiogénique des ECs et des PACs par un mécanisme qui dépend de l'activation de la voie de signalisation VEGF/eNOS. Notre étude suggère que l'inhibition directe de la rénine pourrait représenter une nouvelle option thérapeutique pour améliorer la néovascularisation dans un contexte d'ischémie.

De façon intéressante, une étude récente a démontré que l'aliskiren améliore aussi la néovascularisation chez la souris diabétique (Chang, Wu et al. 2015). Comme dans notre étude, ces auteurs ont également obtenu des effets bénéfiques à une dose qui n'induisait pas d'hypotension. Ils ont aussi documenté que l'aliskiren induit le SFD-1, un important facteur impliqué dans l'artériogénèse (Buschmann and Schaper 1999) et dans la mobilisation des PACs (De Falco, Porcelli et al. 2004). Cette étude suggère donc que l'induction du SDF-1 par l'aliskiren pourrait aussi contribuer à expliquer l'augmentation de la densité artériolaire et du nombre de PACs observée dans notre étude. Récemment, il a aussi été documenté que certains agents hypotenseurs (incluant l'aliskiren) peuvent diminuer la génération de microparticules endothéliales qui sont associées à plusieurs pathologies cardiovasculaires (Jain, Bhosale et al. 2017). *In vitro*, ces microparticules peuvent causer du stress oxydant et favoriser une défaillance angiogénique des ECs (Mezentsev, Merks et al. 2005). Il est aussi connu que les microparticules provenant des ECs augmentent l'action inhibitrice de l'hypercholestérolémie sur l'angiogénèse cardiaque chez la souris, en diminuant l'activité d'eNOS (Ou, Chang et al. 2011). Ces différents résultats pourraient contribuer à expliquer l'action bénéfique de l'aliskiren sur la néovascularisation obtenue dans notre étude. En effet, l'amélioration de la néovascularisation que nous avons observée pourrait aussi être liée à une diminution des microparticules endothéliales menant à une diminution du stress oxydant dans le muscle ischémique.

Notre étude comporte aussi des limitations à plusieurs niveaux. Premièrement, le modèle de souris utilisé pour notre étude (C57Bl6) ne comporte pas de facteurs de risques cardiovasculaires et présente donc une néovascularisation normale suite à une ischémie (Scholz, Ziegelhoeffer et al. 2002, Zaragoza, Gomez-Guerrero et al. 2011, Brenes, Jadlowiec et al. 2012). Il faut aussi se rappeler que l'impact pathologique de l'activation du RAS sur la fonction endothéliale et l'athérosclérose est associé à une stimulation élevée et chronique dans un contexte de facteurs de risques cardiovasculaires (Ma, Kam et al. 2010, Pacurari, Kafoury et al. 2014). Dans cette optique, l'utilisation de différents modèles animaux présentant des facteurs de risque de l'athérosclérose pourrait être pertinente. Par exemple, l'utilisation de souris exposées à la fumée de cigarette, de souris hypercholestérolémiques (ApoE^{-/-} ou LDLR^{-/-}), de vieilles souris ou de souris hypertendues pourrait être envisagée. De plus, ces modèles murins sont connus pour présenter une néovascularisation insuffisante en réponse à l'ischémie, une

caractéristique plus représentative des patients atteints de pathologies ischémiques athérosclérotiques (Michaud, Menard et al. 2003, Michaud, Dussault et al. 2006, Ma, Kam et al. 2010, Groleau, Dussault et al. 2011, Haddad, Dussault et al. 2011, Dussault, Dhahri et al. 2014, Pacurari, Kafoury et al. 2014, Dhahri, Dussault et al. 2017). Le même principe s'applique *in vitro* car les HUVECs ne sont pas exposés à des facteurs pathologiques dans notre étude. Dans ce contexte, l'utilisation d'HUVECs exposées à des extraits de fumée de cigarette, aux oxLDL ou bien à différents agents stimulant l'activité du système RAS pourrait être appropriée. Finalement, il est difficile de déterminer si l'effet bénéfique sur la néovascularisation retrouvé dans notre étude est directement ou indirectement lié à l'inhibition de la rénine. D'une part, il est possible de penser que l'action antioxydante de l'aliskiren pourrait provenir de la diminution de la production de diverses molécules du système RAS comme l'Ang2. D'autre part, il est aussi plausible que la diminution indirecte du récepteur pro-athérogénique AT1 puisse être impliquée. Afin de mieux caractériser le mécanisme d'action et le rôle direct de la rénine dans la néovascularisation, il serait intéressant de moduler directement l'expression de la rénine et des différentes composantes du système RAS en absence et en présence d'aliskiren. Pour ce faire, des souris KO pour la rénine, l'Ang2 ou l'AT1 pourrait être utilisées. L'utilisation de siRNAs, de plasmides ou de virus afin d'inactiver ou stimuler ces gènes pourrait également être une alternative.

L'objectif général de mon deuxième projet était d'étudier le rôle des miRs dans la néovascularisation post-ischémique dans un contexte athérosclérotique. Les miRs sont de petits ARNs non codants régulant négativement l'expression de plus de 60% des gènes. Ils sont impliqués dans la régulation de tous les processus biologiques. Plusieurs études ont documenté une modulation de l'expression de miRs spécifiques dans divers contextes pathologiques et dans le développement de plusieurs maladies. Au niveau cardiovasculaire, des profils d'expressions spécifiques de différents miRs ont été observés dans plusieurs pathologies incluant l'infarctus du myocarde, l'insuffisance cardiaque et le développement de l'athérosclérose. Il a aussi été démontré dans divers modèles animaux que des traitements visant à moduler l'expression de divers miRs permettent de diminuer l'athérosclérose, la dysfonction endothéliale, l'inflammation et le stress oxydant. Par contre, le rôle des miRs dans la réponse de néovascularisation post-ischémique et en particulier en condition athérosclérotique est en

grande partie inconnu. L'objectif de mes études 2 et 3 visait donc à identifier des miRs qui sont modulés en condition athérosclérotique et qui pourraient être impliqués dans la défaillance de néovascularisation chez les souris hypercholestérolémiques. Plus précisément, nous voulions identifier des miRs ciblant des gènes impliqués dans l'angiogenèse et/ou dans différents processus (ex. inflammation et stress oxydant) associés à la dysfonction des ECs et des PACs. Suite à l'étude de différents miRs modulés, 2 miRs candidats ont été sélectionnés (miR-150 et miR-146b) afin de caractériser leurs rôles dans les mécanismes associés à la défaillance de néovascularisation par l'hypercholestérolémie. Le but de ces études était d'une part d'étudier la fonction de ces miRs dans la néovascularisation post-ischémique, et d'autre part d'évaluer l'efficacité d'une thérapie basée sur ces miRs pour améliorer la néovascularisation déficiente chez la souris hypercholestérolémique. Ce projet a permis de démontrer pour la première fois *in vivo* qu'il est possible de récupérer la néovascularisation post-ischémique diminuée par l'hypercholestérolémie, au moyen d'un traitement basé sur une supplémentation de miRs. Pour les expériences *in vivo*, nous avons utilisé des souris normocholestérolémiques C57BL6 (NC) qui ont été comparées à des souris hypercholestérolémique (HC). Les souris HC utilisées sont des ApoE -/- sous diète riche en gras de type western, un modèle murin hypercholestérolémique fréquemment utilisé pour les études d'athérosclérose (Kapourchali, Surendiran et al. 2014). Ce modèle présente un niveau élevé de stress oxydant et d'inflammation, deux caractéristiques importantes qui sont liées à la dysfonction endothéliale et la défaillance de néovascularisation (Kapourchali, Surendiran et al. 2014). *In vitro*, les capacités angiogéniques des ECs matures ont été évaluées en utilisant des HUVECs exposées ou non à oxLDL afin de mimer le phénotype hypercholestérolémique.

La première étape a été d'identifier des miRs pro-angiogéniques dont l'expression est diminuée et/ou des miRs anti-angiogéniques dont l'expression est augmentée dans le muscle ischémique des souris HC vs. NC. Pour ce faire, nous avons utilisé la technologie de séquençage nouvelle génération à haut débit (NSG) qui permet d'obtenir le nombre de copies total de chaque miRs exprimé dans un échantillon (Gunaratne, Coarfa et al. 2012). Le NSG est la méthode la plus rapide et la plus efficace pour étudier un large profil d'expression de miRs d'un échantillon biologique (Liu, Jennings et al. 2011). De plus, parmi les trois principales techniques utilisées pour mesurer l'expression des miRs (NSG, qRT-PCR et microarray), le NSG permet de

découvrir de nouveaux miRs et d'obtenir le profil total d'expression génique d'un échantillon, contrairement aux deux autres techniques qui sont basées sur l'appariement de séquence connue (Liu, Jennings et al. 2011).

Nos résultats initiaux ont démontré que l'expression d'environ 90 miRs est modulée d'un facteur supérieur à 20 % dans le muscle ischémique des souris HC vs NC. Également, ces miRs présentent au moins 1000 copies par millions de lectures (RPM) dans le muscle ischémique. De façon intéressante nous avons observé que l'expression de seulement 10 miRs est augmentée par l'hypercholestérolémie, dont 8 qui sont spécifiquement retrouvés chez la souris et non chez l'humain. Les deux autres miRs augmentés ne possédaient pas de cibles connues ou prédictives pour des gènes impliqués dans l'angiogenèse, rendant leur sélection complexe pour notre étude. À partir de ces données, nous nous sommes donc concentrés sur les miRs diminués par l'hypercholestérolémie dans le processus de sélection d'un premier miRs candidat pour l'étude 2. Afin de déterminer ce miR candidat, nous avons procédé par élimination. Premièrement, nous avons comparé le niveau d'inhibition de chacun des miRs par l'hypercholestérolémie et nous avons confirmé que ces miRs sont aussi exprimés chez l'humain. Finalement, nous avons tenté d'identifier des cibles potentielles anti-angiogéniques connues ou prédictives pour chacun des miRs retenus. Cette démarche a permis d'identifier clairement le miR-150 comme un miR pro-angiogénique dont le niveau d'expression est le plus diminué dans le muscle ischémique de souris hypercholestérolémiques.

Le miR-150 est conservé dans l'évolution et est retrouvé chez les mammifères incluant la souris et l'humain. Avant notre étude, il a été documenté que le miR-150 est impliqué dans l'embryogenèse, l'hématopoïèse, la différenciation des ECs et dans la vasculogenèse (Vasa, Fichtlscherer et al. 2001, Luo, Wen et al. 2013, He, Jiang et al. 2014). De plus, le miR-150 est également documenté comme stimulateur de migration et de prolifération de cellules tumorales (Cao, Hou et al. 2014), deux processus qui sont importants dans l'angiogenèse. Toutes ces informations confirmaient l'intérêt potentiel du miR-150 pour notre étude. À notre connaissance, notre étude est la première à démontrer un rôle du miR-150 dans la réponse des tissus ischémique en condition athérosclérotique. Premièrement, nos résultats ont démontré que l'expression du miR-150 est significativement réduite dans le muscle ischémique des souris HC,

mais aussi dans les HUVECs exposées aux oxLDL. Notre étude ne permet malheureusement pas d'adresser le mécanisme exact associé à la diminution du miR-150 par l'hypercholestérolémie et les oxLDL. Toutefois, nos résultats ont permis d'observer que l'hypercholestérolémie et les oxLDL stimulent l'activation de la protéine p53 qui est connue pour réprimer la transcription du miR-150 en se liant à sa séquence régulatrice (Ghose and Bhattacharyya 2015). Cette observation suggère que l'hypercholestérolémie et les oxLDL pourraient en partie diminuer l'expression du miR-150 via une augmentation de l'activation de p53. Chez l'humain, il a aussi été démontré que l'expression du miR-150 est diminuée dans le sang des patients hypercholestérolémiques et des patients avec des pathologies des artères coronaires (Weber, Baker et al. 2011, Karolina, Tavintharan et al. 2012). Avant de tester l'efficacité thérapeutique du miR-150 chez la souris, nous avons donc voulu confirmer son efficacité pro-angiogénique *in vitro* dans des HUVECs exposées ou non aux oxLDL. Nos résultats ont démontré qu'une supplémentation de miR-150 stimule la migration et la formation de tubules des HUVECs. De plus, l'expression forcée du miR-150 permet de récupérer totalement la capacité angiogénique des HUVECs qui est réduite par l'oxLDL. Par la suite, nous avons étudié le rôle direct du miR-150 dans l'induction de la dysfonction angiogénique des HUVECs par l'oxLDL. Comme nous avons démontré que la diminution du miR-150 par l'oxLDL corrèle avec la dysfonction angiogénique des HUVECs, la question était de savoir si la répression directe du miR-150 avait le même impact que les oxLDL. Pour répondre à cette question, nous avons donc utilisé un anti-miR-150 pour réprimer son expression dans les HUVECs. Nous avons observé que de façon similaire à l'oxLDL, l'inhibition directe du miR-150 cause une défaillance de la migration et de la formation de tubules des HUVECs. Ce résultat confirme un rôle clé du miR-150 dans la régulation des propriétés angiogéniques des HUVECs. À partir de ces évidences, nous avons ensuite investigué *in vivo* l'effet thérapeutique d'une supplémentation de miR-150 sur la néovascularisation post-ischémique. Pour la conception expérimentale, nous avons utilisé des souris NC comme contrôles qui ont été comparées à des souris HC traitées avec le miR-150 ou un miR contrôle. L'administration du miR-150 a été effectuée au moment de la chirurgie par injection locale dans le muscle ischémique des souris, à une dose de 5 mg/kg dans un véhicule lipidique (RNAlancer). Nous avons choisi l'administration par injection locale au lieu de systémique (IV) pour plusieurs raisons. Premièrement, la littérature montre que la concentration de miRs dans le tissu ciblé est

supérieure et reste confinée en grande partie au lieu d'injection (Zhang, Wang et al. 2013). En effet, nous avons observé au laboratoire que l'administration par voie IM permet de délivrer 20 fois plus de miRs dans le muscle que la voie IV. De plus, nous avons observé que l'utilisation d'un véhicule lipidique permet d'augmenter le taux de livraison de miR de 10 fois par rapport à une injection sans ce type de véhicule. Nous avons choisi ce type de véhicule basé aussi sur sa faible toxicité (Zhang, Wang et al. 2013). Finalement, l'administration locale limite aussi les effets non spécifiques à d'autres organes et induit moins d'effets secondaires (Zhang, Wang et al. 2013).

Nos résultats ont démontré une augmentation significative de la néovascularisation chez les souris HC traitées au miR-150 comparées à celles traitées avec un miR contrôle. Étonnamment, cette néovascularisation des souris HC supplémentées en miR-150 était même supérieure à celle des souris NC en bonne santé. En effet, nous avons observé une restauration complète de la récupération du flot sanguin, de la densité capillaire et artériolaire, ainsi qu'une meilleure mobilité chez les souris HC traité au miR-150. Ces observations concordent donc avec d'autres études où il a été démontré que le miR-150 possède diverses propriétés pro-angiogéniques incluant la capacité à stimuler la migration des ECs *in vitro* et d'induire l'angiogenèse *in vivo* dans un contexte physiologique non ischémique (Zhang, Liu et al. 2010, Li, Zhang et al. 2013). Un autre groupe de recherche a aussi démontré que l'inhibition du miR-150 diminue l'angiogenèse tumorale *in vivo* (Liu, Zhao et al. 2013). De façon controversée d'autres études ont reporté un rôle anti-angiogénique pour le miR-150, dans des contextes pathologiques comme l'angiogenèse cérébrale suite à l'AVC et la néovascularisation oculaire (Liu, Sun et al. 2015, He, Li et al. 2016). Collectivement, toutes ces études confirment que d'une part le miR-150 joue un rôle dans la régulation de l'angiogenèse et que d'autre part, son effet varie en fonctions de la situation pathologique et du type cellulaire sur lequel il agit.

Afin de mieux comprendre comment le miR-150 agit au niveau moléculaire pour exercer son effet stimulateur sur la néovascularisation dans notre modèle d'ischémie, nous avons tenté d'élucider au moins en partie les mécanismes d'actions impliqués. Premièrement, nous voulions comprendre comment le miR-150 induit la migration et de la formation de tubule des HUVECs. Comme il a été démontré dans l'introduction, chaque miR peut posséder plus de cent cibles

(mRNA) rendant difficile la détermination exacte de leurs mécanismes d'action sur un processus précis tel que la néovascularisation. Il faut également considérer le fait que la modulation d'un seul miR peut affecter l'expression de plusieurs gènes simultanément menant à de multiples modifications de l'homéostasie des systèmes biologiques. Dans ce contexte, nous avons choisi de cibler et d'investiguer l'impact du miR-150 sur la voie de signalisation pro-angiogénique Src, pouvant potentiellement expliquer les effets stimulateurs du miR-150 sur la néovascularisation. Ce choix a été effectué après avoir examiné une liste de cibles potentielles du miR-150 connues dans la littérature, mais également à partir de séquences prédictives. Nous nous sommes donc basés sur le fait que le miR-150 a précédemment été documenté pour cibler directement l'ARN de SRCIN1, un important inhibiteur endogène de l'activité de Src dans les cellules cancéreuses (Cao, Hou et al. 2014). SRCIN1 agit en inactivant Src par phosphorylation de sa tyrosine inhibitrice Tyr527 (Di Stefano, Damiano et al. 2007). De plus, la suppression du gène SRCIN1 dans les cellules cancéreuses augmente la prolifération, la migration et l'invasion tumorale *in vitro* (Di Stefano, Damiano et al. 2007). Aussi, il a été démontré que le miR-150 stimule la prolifération et la migration de cellules cancéreuses du poumon en ciblant SRCIN1 (Cao, Hou et al. 2014). Src est impliqué dans la stimulation de plusieurs voies de signalisation qui induisent l'angiogenèse par le VEGF (Eliceiri, Paul et al. 1999) et par la voie PI3K/AKT/eNOS (Fulton, Church et al. 2005). À partir de ces évidences, nous pensons que l'action pro-angiogénique du miR-150 observée lors de notre étude pouvait en partie être causée par une diminution de SRCIN1 qui mènerait à une augmentation de l'activité de Src. Également, le fait que le rôle de SRCIN1 dans la néovascularisation post-ischémique *in vivo* n'était pas connue en faisait une cible d'investigation intéressante. Dans un premier temps, nos résultats ont confirmé que l'expression de SRCIN1 est significativement augmentée dans le muscle des souris HC, mais aussi dans les HUVECs exposées aux oxLDL. Nous avons aussi trouvé que cette augmentation de SRCIN1 est associée à une diminution importante de l'activation de Src et de sa signalisation incluant AKT et eNOS. De façon intéressante, nos résultats ont démontré qu'un traitement de miR-150 inhibe l'expression de SRCIN1 et permet de récupérer l'activation de Src/AKT/eNOS qui est réduite en conditions athérosclérotiques, et ce *in vivo* et *in vitro*. Afin de confirmer l'importance de l'axe SRCIN1/Src dans le mécanisme d'induction angiogénique du miR-150 *in vitro*, nous avons utilisé un inhibiteur de phosphorylation de Src avant de traiter les HUVECs avec le miR-150. Nos résultats ont

démontré une diminution significative de l'effet pro-angiogénique du miR-150 lorsque Src est inhibé, confirmant un mécanisme dépendant de Src pour l'action du miR-150. Afin de pousser plus loin l'investigation du rôle de l'axe miR-150/SRCIN1 dans la fonction angiogénique des HUVECs, nous avons aussi inhibé l'expression du miR-150 et de SRCIN1. Nos résultats démontrent que l'inhibition directe du miR-150 augmente l'expression de SRCIN1 de façon similaire aux oxLDLs et que la répression directe de SRCIN1 par un siRNA augmente l'activité de Src et la fonction angiogénique des HUVECs. Globalement, nos données suggèrent que le miR-150 améliore la capacité angiogénique des ECs en réprimant SRCIN1, ce qui conduit à une meilleure néovascularisation en réponse à l'ischémie.

Comme les miRs sont de plus en plus reconnus comme d'importants régulateurs de l'activité des cellules hématopoïétique et progénitrices, nous avons évalué l'effet du miR-150 sur le nombre et l'activité fonctionnelle des PACs (Heinrich and Dimmeler 2012). Pour ce faire, nous avons isolé les PACs de la moelle osseuse des différents groupes de souris 14 jours après la chirurgie d'ischémie, pour les mettre en culture et effectuer divers essais de fonctions. Nos résultats suggèrent que les PACs sont impliqués dans le mécanisme de modulation de la néovascularisation par l'hypercholestérolémie et le miR-150. Premièrement, nous avons observé une diminution du nombre et de l'activité fonctionnelle des PACs chez les souris HC vs NC. De façon intéressante, nous avons aussi observé une restauration complète du nombre PACs et de leur capacité de migration, d'adhésion aux ECs et d'intégration aux tubules chez les souris HC traitées avec le miR-150. L'effet pathologique de l'hypercholestérolémie et l'effet stimulateur du miR-150 sur les PACs qui ont été observés dans notre étude semblent consistants avec d'autres études dans la littérature. Premièrement, une diminution du nombre de PACs et de leur activité fonctionnelle est observée chez les patients présentant des facteurs de risque de l'athérosclérose et en particulier les patients hypercholestérolémiques. Au niveau du miR-150, des études ont aussi documenté son importance dans le développement des lignées cellulaires impliquées dans la réponse immune et dans le développement vasculaire (Beznan, Chakraborty et al. 2011, Luo, Wen et al. 2013). Aussi, il a été documenté dans un modèle murin d'infarctus du myocarde que le miR-150 régule la migration et la mobilisation des cellules mononuclées de la moelle osseuse aux tissus cardiaques ischémiques (Tano, Kim et al. 2011). Les résultats de ces différentes études supportent donc nos résultats sur l'effet stimulateur du miR-150 sur les

PACs, en confirmant un rôle potentiel de celui-ci dans des processus vasculaires et ischémiques. Notre étude n'explique pas tous les mécanismes spécifiques qui sont responsables de la modulation des PACs par le miR-150. Entre autre, fait que le miR-150 est injecté localement dans le muscle ischémique et que l'effet sur les PACs est obtenu à distance dans la moelle osseuse est intrigant. Il est possible le miR-150 qui est injecté dans le muscle puisse par la suite recirculer pour agir sur les PACs à distance. Cette hypothèse est basée sur plusieurs études suggérant que les miRs intracellulaires peuvent être sécrétés pour recirculer via des vésicules, et jouer un rôle dans la communication entre les cellules (Rayner and Hennessy 2013, López and Granados-López 2017). Il est aussi possible que l'effet du miR-150 observé chez les PACs dans notre étude provienne d'une action paracrine. Par exemple, l'activité angiogénique des cellules du muscle ischémique ayant intégré le miR-150 pourrait potentiellement être augmentée par celui-ci et mener à la production de diverses molécules pro-angiogéniques libérées dans la circulation. Dans cette optique, pour déterminer si le mécanisme est lié à un effet paracrin ou par recirculation du miR-150, il serait intéressant de doser le miR-150 dans le plasma et dans les PACs à différent temps après l'injection. Nous aurions aussi pu doser différents facteurs angiogéniques plasmatiques qui sont connus pour jouer un rôle sur l'activité fonctionnelle des PACs. Cette étude de caractérisation supplémentaire aurait par contre été complexe, car il est difficile de déterminer le bon temps pour quantifier les miRs, étant donné que la cinétique de dégradation de ceux-ci est encore peu documentée. De plus, cette analyse aurait demandé un nombre élevé d'animaux pour effectuer divers prélèvements sur 14 jours. Par contre, nous avons isolé les PACs de souris NC et avons modulé l'expression du miR-150 pour évaluer son action sur la voie SRCIN/Src/eNOS. Nos résultats ont démontré que de façon similaire au résultat obtenu précédemment dans les HUVECs, les PACs isolées et exposées au oxLDL présentent une augmentation de SRCIN1 associée à une défaillance d'activation de Src et eNOS qui peut être restaurée par l'expression forcée du miR-150. Si l'on émet l'hypothèse que le miR-150 est redistribué à un niveau significatif dans la circulation après l'injection dans le muscle ischémique, la stimulation de la voie Src dans les PACs par celui-ci pourrait expliquer l'augmentation de l'activité angiogénique de ces cellules. De plus, des études ont confirmé que Src joue un rôle clé dans le recrutement de cellules progénitrices de la moelle osseuse dans le cœur ischémique par un mécanisme impliquant SDF-1/CXCR-4 (Cheng, Huang et al. 2015). Le SDF-1 est impliqué dans la mobilisation et la migration des PACs (Cheng and Qin 2012).

Finalement, il est aussi connu que l'activation de Src stimule à son tour l'activation d'eNOS qui produit du NO, un facteur clé dans la modulation du nombre et de la fonction des PACs (Aicher, Heeschen et al. 2003, Fulton, Church et al. 2005).

Pour résumer, la deuxième étude de cette thèse montre pour la première fois que la diminution du miR-150 par l'hypercholestérolémie contribue à défaillance de néovascularisation post-ischémique en condition athérosclérotique. Notre étude montre aussi que le mécanisme d'action délétère implique en partie une augmentation de SRCIN1 causant l'inhibition de Src et contribuant à la dysfonction angiogénique des ECs et des PACs. Nos résultats démontrent également qu'une injection intramusculaire de miR-150 dans le muscle ischémique améliore la néovascularisation et pourrait constituer une nouvelle stratégie thérapeutique pour le traitement des pathologies ischémiques.

Plusieurs expériences pourraient être effectuées afin de compléter cette étude. Premièrement, il serait intéressant d'évaluer la modulation de l'expression du miR-150 par l'hypercholestérolémie dans les différentes cellules du muscle ischémique et notamment dans les ECs directement isolées du muscle. Au niveau des PACs, il serait aussi intéressant d'étudier l'effet du miR-150 sur leur mobilisation aux sites ischémiques dans notre modèle. Également, il serait pertinent d'inhiber le miR-150 dans des souris normocholestérolémique afin d'évaluer si cette suppression cause la même défaillance de néovascularisation observée dans une condition hypercholestérolémique. De façon inverse, pour confirmer l'importance de l'inhibition de SRCIN1 dans l'action bénéfique du miR-150 sur la néovascularisation, l'utilisation d'un siRNA contre SRCIN1 dans des souris HC pourrait être effectuée. L'efficacité thérapeutique du miR-150 pourrait aussi être investiguée dans d'autres modèles de souris présentant des facteurs de risques cardiovasculaires comme le tabagisme, le diabète et le vieillissement. Finalement, comme les miRs peuvent cibler plus d'une centaine de gènes simultanément, il serait pertinent d'effectuer une caractérisation plus élargie des mécanismes responsables de la défaillance de néovascularisation corrélée à la diminution du miR-150 par l'hypercholestérolémie. En effet, en plus de l'action pro-angiogénique du miR-150, celui-ci pourrait potentiellement moduler différents processus comme le stress oxydant, l'inflammation et d'autres processus pathologiques associés à l'effet délétère de l'hypercholestérolémie. Dans cette optique, notre troisième étude

visait à étudier le rôle d'un miR pouvant cette fois moduler des processus comme l'inflammation et le stress oxydant qui sont associés à la dysfonction des ECs et des PACs, deux phénomènes contribuant à la défaillance de néovascularisation par l'hypercholestérolémie.

Afin de sélectionner un miR candidat pour cette troisième étude, nous avons dans un premier temps examiné sous un nouvel angle les données du NSG obtenu lors du projet précédent. L'objectif était d'identifier un miR fortement exprimé et modulé dans le muscle ischémique des souris HC, qui pourrait être impliqué dans des processus liés à la dysfonction endothéliale. À partir de ces critères, nous avons identifié le miR-146b comme candidat pour cette troisième étude. Il est connu que le miR-146b possède des propriétés anti-inflammatoires (Hulsmans, Van Dooren et al. 2012, Comer, Camoretti-Mercado et al. 2014, Xie, Shu et al. 2014, Fulzele, El-Sherbini et al. 2015). Nos résultats obtenus par NSG ont montré une diminution d'environ 45 % de son expression dans le muscle ischémique des souris HC. Plusieurs études ont démontré dans divers modèles cellulaires *in vitro* qu'une diminution de l'expression du miR-146 est associée à une élévation de divers gènes inflammatoires dans plusieurs types cellulaires (Curtale, Renzi et al. 2012, Hulsmans, Van Dooren et al. 2012, Comer, Camoretti-Mercado et al. 2014, Lee, Kim et al. 2016), ce qui peut causer la dysfonction des ECs et PACs (Chang, Tsai et al. 2017, Su, Sun et al. 2017). À partir de ces informations, notre hypothèse de départ était qu'une diminution de l'expression du miR-146b dans le muscle ischémique par l'hypercholestérolémie pourrait créer un environnement pro-inflammatoire de forte intensité et causer une défaillance de néovascularisation. Le rôle de l'inflammation dans la réponse physiologique de néovascularisation des tissus ischémiques demeure controversé. En effet, des études suggèrent qu'un niveau physiologique minimum est nécessaire pour stimuler la néovascularisation (Silvestre, Mallat et al. 2008), alors qu'une intensité élevée favoriserait la dysfonction endothéliale et la survenue de pathologies cardiovasculaires (Galle, Quaschnig et al. 2003, Zhang 2008, Castellon and Bogdanova 2016). À notre connaissance, notre étude est la première à définir le rôle d'un miR anti-inflammatoire (miR-146b) pour la modulation de la néovascularisation post-ischémique en condition athérosclérotique.

La première étape de cette étude a été de confirmer par PCR que l'expression du miR-146b est diminuée dans nos modèles *in vivo* et *in vitro*. Également, nous voulions confirmer que

cette diminution est corrélée à une augmentation des marqueurs inflammatoires régulés par le miR-146b. Nos résultats ont démontré pour la première fois *in vivo* que l'expression du miR-146b est significativement diminuée (environ 45 % de diminution) dans le muscle ischémique par l'hypercholestérolémie et encore plus drastiquement *in vitro* dans les HUVECs exposés aux oxLDL (plus de 90 % de diminution). De façon intéressante, une étude précédente a aussi démontré que l'expression du miR-146b est diminuée dans les monocytes des patients obèses (Hulsmans, Van Dooren et al. 2012). L'obésité est un facteur de risque associé au développement de l'athérosclérose et les patients obèses présentent souvent d'autres facteurs de risque cardiovasculaire comme l'hypercholestérolémie, le diabète et l'hypertension (Burke, Bertoni et al. 2008, Lavie, Milani et al. 2009). Au niveau mécanistique, le miR-146b a été documenté pour réguler négativement le gène pro-inflammatoire TRAF6 (Echavarria, Mayaki et al. 2015, Jiang, Liu et al. 2015), un important médiateur de signaux impliqués dans la signalisation des récepteurs inflammatoires comme le CD40 (Mukundan, Bishop et al. 2005, Habibi, Ghadiri Soufi et al. 2016). TRAF6 est également connu comme protéine adaptatrice impliquée dans l'activation de NF- κ B, un important facteur transcriptionnel régulant positivement l'inflammation (Dickson, Bhakar et al. 2004). Par exemple, le NF- κ B induit l'expression de diverses molécules pro-inflammatoires comme le TNF- α et VCAM-1 (Tak and Firestein 2001, Hoesel and Schmid 2013, Habibi, Ghadiri Soufi et al. 2016) qui sont impliquées dans la dysfonction endothéliale et l'adhésion des monocytes à l'endothélium (Picchi, Gao et al. 2006, Chen, Andresen et al. 2008). À la lumière de ces informations, nous voulions confirmer que l'hypercholestérolémie et les oxLDL induisent bien l'expression de TRAF6 et de sa signalisation incluant le TNF- α et VCAM-1. Comme nous le pensions, nos résultats ont démontré une corrélation inverse entre le miR-146b et le niveau d'expression des marqueurs inflammatoires TRAF6, TNF- α et VCAM-1. Ces résultats suggèrent donc que la diminution du miR-146b par ces conditions athérosclérotiques pourrait être en partie responsable de l'augmentation de l'inflammation par la voie de signalisation impliquant TRAF6. Pour confirmer l'importance du miR-146b dans l'induction de la réponse inflammatoire et de la dysfonction endothéliale par les oxLDL, nous avons inhibé son expression dans les HUVECs et effectué divers essais cellulaires (ROS, adhésion de monocytes, angiogenèse, etc.). L'endothélium dysfonctionnel est caractérisé par un niveau élevé de ROS intracellulaire, l'expression de molécules d'adhésion monocytaire comme VCAM-1, et une diminution de la

fonction angiogénique. Nous avons trouvé que de façon similaire aux oxLDL, l'inhibition directe du miR-146b par un anti-miR mène directement à la dysfonction des HUVECs. En effet, une augmentation significative des marqueurs pro-inflammatoires (TRAF6, TNF- α et VCAM-1), des ROS intracellulaires et de l'adhésion des monocytes a été observée dans les HUVECs traitées avec un anti-miR-146b. De plus, nos résultats montrent pour la première fois que l'inhibition du miR-146b mène à une importante défaillance de la capacité de migration et de formation de tubules des HUVECs. Ces résultats suggèrent que l'effet pathologique des oxLDL sur la fonction des HUVECs est au moins en partie causé par l'inhibition du miR-146b. Nos résultats semblent cohérents avec d'autres études. En effet, il a été documenté que la diminution de l'expression du miR-146b chez les patients obèses mène à une augmentation des ROS mitochondriale et du TNF- α (Hulsmans, Van Dooren et al. 2012). De plus, il est connu qu'un niveau élevé de TNF- α augmente la production de ROS dans plusieurs lignées cellulaires (Corda, Laplace et al. 2001, Yang, Elner et al. 2007) et favorise l'adhésion des monocytes en stimulant l'expression de VCAM-1 (Ende, Poitz et al. 2014, Oberoi, Schuett et al. 2016). Au niveau de la défaillance angiogénique observée dans les HUVECs, il est possible de penser qu'elle pourrait être causée par l'élévation du stress oxydant, un phénomène observé dans nos études précédentes au laboratoire (Lefevre, Michaud et al. 2007, Turgeon, Dussault et al. 2010, Groleau, Dussault et al. 2011, Haddad, Dussault et al. 2011, Desjarlais, Dussault et al. 2015) .

Avant d'évaluer le potentiel thérapeutique du miR-146b *in vivo*, nous avons d'abord étudié son rôle dans l'induction de la dysfonction des HUVECs par les oxLDL. Nous avons traité les HUVECs avec un mimic de miR-146b avant de les exposer au oxLDL. Nos résultats montrent que la surexpression du miR-146b permet de protéger les HUVECs de l'effet pathologique des oxLDL. En effet, l'expression forcée du miR-146b diminue le stress oxydant et l'adhésion des monocytes induite par les oxLDL, et restaure complètement la capacité de migration et de formation de tubules des HUVECs. Au niveau moléculaire, la surexpression du miR-146b bloque de façon presque complète l'induction de TRAF6 par les oxLDL et diminue significativement l'induction de VCAM-1 et du TNF- α .

Il est également important de mentionner que lors de nos expériences préliminaires, nous n'avons observé aucun effet pro-angiogénique du miR-146b dans des HUVECs en condition

basale (i.e. HUVECs non exposées aux oxLDL). De façon générale, cela nous indique que le miR-146b n'exerce pas un effet pro-angiogénique pur mais protège plutôt contre les effets inflammatoires et pro-oxydants des oxLDL. Toutefois, les mécanismes exacts restent à définir. Il est cependant possible de penser que cette récupération des fonctions des HUVECs par le miR-146b impliquerait une diminution de l'inflammation et du stress oxydant causée par l'inhibition de TRAF6. De façon intéressante, une étude récente a démontré *in vitro* que l'inhibition du gène TRAF6 dans des ECs augmente significativement l'activité du promoteur de VEGF (Bruneau, Datta et al. 2012). Cette donnée indique que la récupération de la fonction angiogénique des HUVECs par le miR-146b pourrait aussi impliquer une restauration du niveau de VEGF causée indirectement par la diminution de TRAF6. Toutefois, le rôle potentiel de TRAF6 dans l'angiogénèse est inconnu et reste à être investigué.

Afin de confirmer si le miR-146b diminue TRAF6 de façon directe ou indirecte dans notre modèle *in vitro*, nous avons utilisé un rapporteur luciférase. Ce système est le modèle le plus souvent utilisé pour les études sur l'interaction miR/cible (Clement, Salone et al. 2015). Le principe expérimental consiste à cloner dans un vecteur contenant le reporteur luciférase la région 3' UTR du mRNA (sauvage ou muté) qui est prédite comme étant ciblée par le miR étudié. Le niveau de luciférase mesuré permet ensuite de déterminer si le miR étudié se lie au mRNA d'intérêt (Clement, Salone et al. 2015). Les constructions plasmidiques utilisées dans notre étude contiennent soit un vecteur codant pour le gène sauvage de TRAF6 (wt-TRAF6) ou bien pour le gène de TRAF6 muté (mut-TRAF6) pour la région de liaison du miR-146. Une partie de chaque vecteur code aussi pour la luciférase qui est utilisée comme agent reporteur et qui est mesurée en bioluminescence. Pour ces expériences nous avons pré-transfecté les HUVECs avec le wt-TRAF6 ou le mut-TRAF6 suivi d'un traitement avec le miR-146b mimic ou d'une exposition aux oxLDL. Nos résultats ont démontré que le miR-146b diminue la luciférase associée au wt-TRAF6 et que cette diminution n'est plus observée chez les cellules transfectées avec le mut-TRAF6. Cela indique que le miR-146 cible directement TRAF6 pour diminuer son expression. Nous avons aussi démontré que les oxLDL induisent l'expression de TRAF6 de façon miR-146b-dépendante, puisque l'induction de TRAF6 n'est pas observée avec le mut-TRAF6. Le rôle de TRAF6 dans la néovascularisation post-ischémique n'est pas connu. Deux études sur l'angiogénèse dans des contextes pathologiques différents ont documenté des

effets inverses pour TRAF6. Par exemple, la première étude a démontré dans des HUVECs que la répression de TRAF6 augmente la signalisation angiogénique dépendante du VEGF, suggérant un rôle anti-angiogénique pour TRAF6 (Bruneau, Datta et al. 2012). Inversement, dans des cellules tumorales, une autre étude a démontré que TRAF6 jouerait un rôle pro-angiogénique en étant requis pour l'expression de HIF1a (Sun, Li et al. 2013). Au niveau des pathologies cardiovasculaires, il a été documenté chez la souris hypercholestérolémique que l'inhibition de la liaison TRAF6/CD40 dans les leucocytes protège contre le développement de l'athérosclérose (Lutgens, Lievens et al. 2010). De façon intéressante, une autre étude a démontré *in vivo* que la déficience sélective de TRAF6 dans les ECs ou dans les cellules myéloïdes des souris ApoE^{-/-} peut avoir des effets opposés sur l'athérosclérose en fonction du type cellulaire. En effet les résultats de cette étude montrent que les ECs déficientes en TRAF6 favorisent l'athérosclérose, alors que les cellules myéloïdes déficientes en TRAF6 favorisent une diminution de l'athérosclérose et de l'inflammation (Polykratis, van Loo et al. 2012). Toutes ces études suggèrent que le rôle de TRAF6 peut varier selon le type cellulaire et le contexte pathologique.

Suite à nos résultats *in vitro* indiquant que le miR-146b peut améliorer la fonction des HUVECs présentant un phénotype athérosclérotique, nous avons testé son effet thérapeutique *in vivo* dans notre modèle d'ischémie. Pour cette étude avons donc traité les souris HC avec un miR contrôle ou miR-146b mimic de façon identique à l'étude précédente (même dose, même mode d'injection, etc.). Nous avons observé une amélioration rapide et significative de la récupération du flot sanguin et de la densité capillaire chez les souris traitées avec le miR-146b au jour 7 post-chirurgie. Cliniquement, les souris traitées au miR-146b ont montré une réduction des dommages ischémiques au niveau de la patte opérée, et ceci était associé à une réduction de l'expression des marqueurs inflammatoire TRAF6 et TNF- α . Nous avons aussi observé une augmentation significative du nombre de PACs extraits de la moelle osseuse ainsi qu'une amélioration de leur activité fonctionnelle (capacités de prolifération et d'intégration aux tubules). Le nombre plus élevé de PACs retrouvé chez les souris traitées au miR-146b est cohérent avec l'augmentation de la capacité de prolifération observée dans ce groupe.

La comparaison de nos résultats avec d'autres études ayant investigué l'effet du miR-146b sur diverses fonctions des PACs reste difficile car seulement 2 études sont disponibles (publiées en 2017). De plus, des fonctions angiogéniques contraires ont été rapportées dans ces études. Une première étude a démontré dans un modèle murin d'ischémie cérébrale que le miR146a et le miR-146b stimulent la prolifération et la migration des EPCs en diminuant l'expression de TRAF6 et IRAK1 (Su, Sun et al. 2017). De façon inverse, l'autre étude a démontré que la répression du miR-146b dans des ECFC (endothelial colony forming cells) extraites de patients coronariens augmentait la migration et la formation de tubules (Chang, Tsai et al. 2017). Ces résultats suggèrent encore une fois que le miR-146b posséderait des fonctions angiogéniques différentes en fonction du contexte pathologique et du type cellulaire. L'action bénéfique du miR-146b sur la fonction des PACs retrouvée dans nos travaux pourrait aussi être liée à son action anti-inflammatoire et anti-oxydante. En effets, il est connu que l'inflammation et le stress oxydant modulent négativement l'activité biologique des PACs et que l'utilisation de médicaments avec des propriétés anti-inflammatoire et/ou antioxydante améliore la fonction biologique des EPCs des patients avec des pathologies cardiovasculaires (Lin, Lin et al. 2013). Le rôle de l'inflammation dans la néovascularisation reste difficile à définir de façon précise. Par exemple, plusieurs facteurs inflammatoires présents en faible quantité comme le TNF- α , l'IL-1 et le SDF-1 contribuent à induire la mobilisation et le recrutement des PACs (Lin, Lin et al. 2013). Plusieurs évidences indiquent aussi que l'inflammation joue un rôle de stimulation sur la néovascularisation lorsqu'elle est transitoire et restreinte, alors qu'une d'inflammation élevée aurait un effet inverse (Lin, Lin et al. 2013). Une diminution du nombre de PACs en circulation a été observée lors de phénomène inflammatoire intense (Andreou, Tousoulis et al. 2006). Également, un niveau élevé de TNF- α , dans le sang est associé à une diminution du nombre d'EPCs circulants chez l'humain, et un traitement anti-TNF- α permet d'augmenter leur nombre (Seeger, Haendeler et al. 2005, Ablin, Boguslavski et al. 2006, Martini, Biscaro et al. 2015). Une autre étude a documenté que le TNF- α augmente le niveau d'apoptose des PACs et réduit les niveaux de VEGFR1, SDF-1 et eNOS, des molécules qui sont importantes pour la fonction angiogénique des PACS (Chen, Zhong et al. 2011). Collectivement, ces différentes études vont dans le même sens que nos résultats et suggèrent que l'effet bénéfique du miR-146b sur la néovascularisation retrouvé dans nos travaux pourrait probablement être lié à une action anti-inflammatoire. En effet, la diminution de TRAF6 et du TNF- α corrèle avec l'amélioration

de la fonction des HUVECs et des PACs qui était diminuée par les oxLDL et l'hypercholestérolémie. Il ne faut toutefois pas exclure la possibilité que le miR-146b exerce des effets pro-angiogéniques en ciblant divers facteurs en parallèle de ces effets anti-inflammatoires. Jusqu'à maintenant, les différentes études semblent démontrer un potentiel bénéfique assez large du miR-146b au niveau des maladies cardiovasculaires en général. En effet, le miR-146b posséderait des fonctions anti-athérosclérotiques et cardioprotectrices importantes (Hulsmans, Van Dooren et al. 2012, Di, Li et al. 2017, Paterson, Chuppa et al. 2017).

En résumé, les résultats de cette troisième étude ont permis de démontrer que la diminution du miR-146b est associée à la dysfonction endothéliale induite par les oxLDL, et est également liée à la défaillance de néovascularisation en condition hypercholestérolémique. Nous avons également démontré *in vivo* pour la première fois qu'une supplémentation d'un miR anti-inflammatoire permet d'améliorer la néovascularisation post-ischémique. Cette étude permet de mieux apprécier l'importance et le rôle spécifique des miRs dans la régulation de la néovascularisation.

Pour compléter cette troisième étude, plusieurs expériences supplémentaires pourraient être envisagées. Par exemple, notre étude n'adresse pas le mécanisme exact associé à l'augmentation de la néovascularisation par le miR-146b mais montre plutôt une corrélation potentielle entre des marqueurs pro-inflammatoires (TRAF6/TNF- α) et la fonction des ECs. Premièrement, l'inhibition du miR-146b pourrait être effectuée dans des souris saines C57Bl6 afin de valider que ceci augmente l'inflammation et cause une défaillance de néovascularisation similaire aux souris hypercholestérolémiques. Aussi, afin de confirmer l'importance de TRAF6 et du TNF- α dans le mécanisme d'action du miR-146, un traitement visant à surexprimer spécifiquement ces molécules en présence ou non de miR-146b pourrait être effectuée. Une comparaison de l'expression de différents marqueurs angiogéniques dans nos deux groupes de souris pourrait être effectuée par « microarray » de facteurs angiogéniques dans les tissus ischémiques, les PACs et le sérum afin de trouver de nouvelles cibles potentielles. L'utilisation de souris avec différents facteurs de risque cardiovasculaire pourrait être pertinente afin d'évaluer l'efficacité thérapeutique du miR-146b dans d'autres contextes pathologiques. Une

analyse des niveaux de ROS dans le muscle ischémique et dans les PACs des souris traitées ou non au miR-146b pourrait aussi être effectuée pour valider les résultats obtenus dans les HUVECs.

Les résultats de nos deux études sur les miRs montrent que d'une part, la dérégulation de l'expression de différents miRs par l'hypercholestérolémie module différents processus (ex. angiogenèse, inflammation, stress oxydant), ce qui crée un phénotype pathologique et diminue la capacité de l'organisme à former de nouveaux vaisseaux sanguins suite à une ischémie. D'autre part, nos travaux montrent qu'il est possible de bloquer ces processus pathologiques en rétablissant les niveaux physiologiques de miRs spécifiques. Dans l'ensemble, les résultats des deux études sur les miRs proposent de nouvelles alternatives thérapeutiques pouvant être exploitées afin d'améliorer la condition des patients atteints de pathologies cardiovasculaires ischémiques.

L'étude de l'interrelation entre les miRs et le RAS pourrait aussi être une avenue intéressante pour de futures études. En effet, il a été démontré que des miRs spécifiques sont modulés par différentes composantes du RAS. Par exemple, l'Ang 2 diminue l'expression du miR-29b dans le cortex rénal. miR-29b est connu pour cibler le TGF β . Inversement, l'Ang 2 induit l'expression de miRs comme le miR-132 et miR-212 dans le cœur, la paroi artérielle et dans les reins. Ces miRs sont connus pour cibler l'AT1 et ERK1/2 qui est impliqué dans la prolifération cellulaire. Il a aussi été démontré que les différents inhibiteurs du RAS modulent l'expression de miRs spécifiques. Le captopril est documenté pour augmenter l'expression du miR-16 qui cible le VEGF, alors que l'Enalapril induit l'expression du miR-181a qui cible le TNF- α . En lien avec nos études sur les miRs, il a été démontré que l'Atorvastatin diminue l'expression du miR-146b qui cible TRAF6 alors que l'Aliskiren diminue l'expression du miR-106, du miR-27a et du miR-18b. Tous ces miRs sont connus pour cibler le EGFR, un important récepteur de croissance endothéliale. Il est donc possible de penser que l'Aliskiren pourrait aussi indirectement augmenter la néovascularisation en diminuant ces miRs et en causant une augmentation d'EGRF (Pacurari et Tchounwou, 2015; Deiliiis et al, 2014; Kemp et al, 2014). Finalement, une thérapie par les miRs ciblant différentes composantes du RAS pourrait être envisagée dans le futur.

À l'heure actuelle, seulement 7 études cliniques chez l'humain sont en cours pour évaluer les miRs d'un point de vue thérapeutique, et la plupart sont des études de phase 1 ((Rupaimoole and Slack 2017). Parmi ces 7 études, 4 sont basées sur l'utilisation d'anti-miRs ciblant des pathologies telles que le cancer, l'hépatite C et le diabète. Les 3 autres études cliniques ciblent le cancer et la sclérose en plaque en utilisant des miR-mimics (Rupaimoole and Slack 2017). L'étude la plus avancée (phase 2) est effectuée par la compagnie Santaris Pharma and Hoffman-Laroche (NCT01200420). Cette étude vise à traiter l'hépatite C par un anti-miR122 (Rupaimoole and Slack 2017) et montre des résultats thérapeutiques intéressants. Malheureusement, aucune de ces études cliniques thérapeutiques ne cible encore des pathologies cardiovasculaires pour le moment. La thérapie par les miRs est un axe de recherche en pleine effervescence et de plus en plus d'essais cliniques seront effectués au cours des prochaines années. Ceci démontre l'importance d'une caractérisation approfondie des fonctions biologiques fondamentales des miRs dans les modèles animaux.

Critique de nos modèles et limitations de nos études

Nos études suggèrent que des conditions athérosclérotiques comme l'hypercholestérolémie et les oxLDL diminuent la capacité de néovascularisation post-ischémique par divers mécanismes. Nos travaux démontrent également qu'il est possible d'améliorer la néovascularisation par différentes approches thérapeutiques incluant l'inhibition de la rénine par l'aliskiren et par une supplémentation de miR-150 et de miR-146b. Nous avons utilisé différentes approches expérimentales et différents modèles *in vivo* et *in vitro*. Ces modèles comportent tous des limitations. De plus, il est difficile d'extrapoler chez l'humain les résultats obtenus dans un modèle animal présentant seulement quelques caractéristiques de la pathologie étudiée (e.g. athérosclérose, néovascularisation). Le même phénomène s'applique dans l'extrapolation des résultats *in vitro* d'un environnement contrôlé absent d'interaction dynamique (Shanks, Greek et al. 2009). En effet, la néovascularisation *in vivo* met en jeu plusieurs éléments incluant une réponse à l'ischémique, une réponse inflammatoire et de nombreux types cellulaires impliqués dans l'angiogenèse (Silvestre, Smadja et al. 2013).

Pour nos travaux *in vivo*, nous avons choisi un modèle murin d'ischémie de la patte. Ce modèle consiste à induire chirurgicalement une ischémie sévère dans la patte, par ablation de l'artère fémorale et de ses vaisseaux collatéraux. Ce modèle simule une ischémie sévère du membre inférieur chez l'humain (Couffinhal, Dufourcq et al. 2009, Niiyama, Huang et al. 2009). Nous avons choisi ce modèle d'ischémie pour plusieurs raisons. Premièrement, il s'agit d'un modèle bien documenté que nous avons également très bien caractérisé au fil des ans dans notre laboratoire. Il permet d'induire une ischémie sévère et d'obtenir une bonne modulation de la néovascularisation, ce qui est nécessaire pour apprécier l'impact stimulateur de différents agents thérapeutiques. De plus, ce modèle d'ischémie permet d'obtenir un niveau minimal de complication (saignement, infection et mortalité) tout en induisant une ischémie sévère. En effectuant l'ischémie dans une seule patte, le modèle permet d'utiliser la patte contra-latérale comme contrôle interne non ischémique. Il est également possible dans ce modèle d'analyser en continu la récupération du débit sanguin par Laser Doppler, une technique qui est non-invasive et qui requière une simple anesthésie. Le laser doppler permet également de confirmer la qualité de la chirurgie d'ischémie immédiatement après l'ablation de l'artère fémorale. Il est important de noter que la ligature artérielle est un autre modèle d'ischémie très utilisé. Par contre, il produit une ischémie beaucoup moins sévère et la récupération du flot sanguin est souvent trop rapide (Couffinhal, Dufourcq et al. 2009, Niiyama, Huang et al. 2009). La ligature de différentes artères (ex. coronaires et carotidiennes) est utilisée dans des modèles l'infarctus du myocarde et d'AVC (Couffinhal, Dufourcq et al. 2009, Niiyama, Huang et al. 2009). Dans ce type d'ischémie aiguë, un rétablissement rapide du flot sanguin est nécessaire pour permettre la survie. La néovascularisation thérapeutique est moins pertinente dans ce contexte, mais très favorable dans une ischémie de type chronique. Les patients avec des pathologies occlusives périphériques présentent en général des manifestations cliniques distinctes. Par exemple, la ligature de l'artère fémorale simule plus la claudication intermittente, ou les patients ont une diminution du flot sanguin dans les extrémités surtout à l'effort. Par contre, l'ablation chirurgicale de l'artère fémorale et de ses branches collatérales crée une ischémie sévère qui s'apparente cliniquement aux patients présentant une ischémique critique des membres inférieurs (Couffinhal, Dufourcq et al. 2009, Niiyama, Huang et al. 2009). Notre modèle permet également d'effectuer diverses mesures de score clinique comme la récupération de la capacité de marche de la souris ainsi qu'une évaluation visuelle des dommages ischémiques au niveau de la patte. Notre modèle

murin d'ischémie comporte également plusieurs limitations. Premièrement, des variations de l'injure et de la récupération du flot sanguin ont été observées entre les différentes espèces animales, mais aussi entre les types de souris (Niiyama, Huang et al. 2009). De plus, il est difficile d'extrapoler les résultats à d'autres modèles d'ischémie effectués par une ligature. En effet, la localisation de la ligature artérielle, la présence ou non de vaisseaux collatéraux en périphérie et la variabilité entre les espèces sont des facteurs qui modulent l'intensité de l'ischémie (Niiyama, Huang et al. 2009). Également, dans les modèles de ligature, l'artériogénèse et la croissance collatérales prédominent au site de ligature alors que l'angiogénèse domine dans le lit distal ischémique (Couffinhal, Dufourcq et al. 2009). Pour résumer, nous pensons notre modèle chirurgical d'ischémie est fiable pour évaluer la modulation de la néovascularisation. Nous pensons qu'il permet de simuler une ischémie sévère de type chronique chez l'humain et permet de comparer l'impact de différents agents thérapeutiques entre deux groupes de souris.

Pour analyser la néovascularisation nous utilisons le Laser Doppler. C'est une approche indirecte qui ne visualise pas directement les vaisseaux sanguins mais permet de mesurer la récupération du flot sanguin. Le Laser Doppler donne donc une idée globale de la néovascularisation au niveau de la patte ischémique. Le principe est basé sur une numérisation séquentielle d'une structure vivante par un laser qui détecte les fluides en mouvement (sang) et génère une image colorée représentant la distribution du sang dans un tissu (Couffinhal, Silver et al. 1998). Un des désavantages du laser doppler est que les souris ne doivent pas être traitées avec des agents vasomoteurs pouvant affecter le flot sanguin pendant la prise de mesure. Il existe aussi plusieurs autres méthodes qui permettent de visualiser directement les vaisseaux comme le micro-CT, l'échographie de contraste et l'IRM (Couffinhal, Dufourcq et al. 2009). Toutefois, il s'agit de méthodes plus complexes qui nécessitent la plupart du temps une perfusion en continue avec des produits de contraste (Couffinhal, Dufourcq et al. 2009). Afin de valider les résultats de Laser Doppler nous effectuons aussi une analyse histologique du nombre de capillaires et d'artérioles. De plus, pour solidifier la validité de nos observations obtenues *in vivo*, nous effectuons en général des analyses complémentaires et variées de différents paramètres impliqués dans la néovascularisation. Par exemple, l'étude du nombre et de la

fonction des PACs, les expériences *in vitro* sur la fonction angiogénique des HUVECs et l'analyse de divers biomarqueurs angiogénique peuvent appuyer nos résultats.

Pour le choix du modèle de souris athérosclérotiques pour nos études *in vivo*, il est important de mentionner que nous n'étudions pas l'athérosclérose mais l'effet délétère d'un phénotype athérosclérotique (i.e. hypercholestérolémie) sur la néovascularisation. Dans cette optique, la formation de plaques athérosclérotiques significatives n'était pas recherchée dans nos études. Notre modèle murin devait en premier lieu mimer une hypercholestérolémie importante associée à un état inflammatoire et pro-oxydant élevé, deux caractéristiques impliquées dans la défaillance de néovascularisation (Couffinhal, Silver et al. 1998, Turgeon, Dussault et al. 2010, Haddad, Dussault et al. 2011, Silvestre, Smadja et al. 2013). Comme les souris contrôles sont résistantes à l'athérosclérose et qu'ils développent difficilement de l'hypercholestérolémie sous simple diète riche en gras, l'utilisation d'un modèle transgénique était appropriée (Getz and Reardon 2012). Les deux modèles murins athérosclérotiques les plus utilisés sont les LDLR^{-/-} et les ApoE^{-/-}. Nous avons choisi les ApoE^{-/-} car contrairement au LDLR^{-/-}, ces souris présentent un taux élevé de cholestérol plasmatique de base même sous diète normale. De plus, l'hypercholestérolémie est plus marquée par rapport aux LDLR^{-/-} lorsque les souris sont soumises à une diète riche en gras (Zaragoza, Gomez-Guerrero et al. 2011, Getz and Reardon 2012). Finalement, ces souris sont connues pour développer un phénotype athérosclérotique similaire à celui retrouvé chez l'humain (Emini Veseli, Perrotta et al. , Zaragoza, Gomez-Guerrero et al. 2011). Également, ces souris présentent un état pro-inflammatoire important et un stress oxydant élevé, deux facteurs impliqués lors du développement de la dysfonction endothéliale (d'Uscio, Baker et al. 2001, Meyrelles, Peotta et al. 2011, Lo Sasso, Schlage et al. 2016).

Pour nos études *in vitro*, nous avons choisi les HUVECs, un modèle souvent utilisé pour les études angiogéniques (Staton, Reed et al. 2009). Il est important de réaliser que les HUVECs sont des ECs de macrovaisseaux veineux et ne proviennent pas de capillaires ou d'artères. Au niveau des limitations de notre modèle *in vitro*, il est faut mentionner que les HUVECs ne sont pas exposées à l'hypoxie et que le phénotype ne peut donc être identique aux ECs retrouvées dans le muscle ischémique. De plus, les HUVECs ne sont pas dans un micro-environnement

identique aux ECs du muscle ischémique, n'étant pas en interaction avec les divers types cellulaires contribuant à l'angiogenèse. Comme les HUVECs sont une lignée primaire, la durée d'utilisation est également limitée. Elles sont aussi généralement plus sensibles aux agents toxiques tels que les oxLDL par rapport aux lignées immortalisées et possèdent une durée de vie assez courte avant de changer de phénotype (Hunt, Currie et al. 2010, Morin and Tranquillo 2013). En effet, les HUVECs utilisés dans nos projets proviennent des passages 3 à 6. Toutefois, pour les besoins de nos études, nous considérons que notre modèle *in vitro* d'HUVECs est approprié, car c'est un modèle bien documenté qui permet une validation plus facile de l'action des divers traitements étudiés.

En perspective de nos travaux, il pourrait être intéressant d'optimiser les conditions expérimentales *in vitro* en traitant les cellules dans un incubateur à hypoxie ce qui simulerait de plus près la condition d'ischémie. *In vitro*, il pourrait aussi être pertinent d'évaluer l'impact des oxLDL sur le niveau d'expression du miR-150 et du miR-146b dans diverses autres lignées cellulaires impliquées dans la néovascularisation (ex. macrophages, neutrophiles, MSC etc.). Également, le niveau d'expression pourrait être mesuré dans le sang et/ou dans divers tissus ischémiques humains de patients présentant divers facteurs de risques cardiovasculaires. Finalement, l'efficacité thérapeutique de ces deux miRs pourrait être testée dans d'autres modèles murins présentant une néovascularisation défailante et pourrait aussi être testée pour stimuler la formation de vaisseaux dans d'autres pathologies.

V-Conclusion

Les maladies cardiovasculaires ischémiques causées par l'athérosclérose représentent encore aujourd'hui la première cause de mortalité mondiale. L'occlusion d'une artère par la plaque athérosclérotiques diminue la perfusion sanguine aux tissus et crée une condition d'ischémie. Afin de diminuer les dommages ischémiques aux tissus, l'organisme va s'adapter en créant un nouveau réseau vasculaire permettant de maintenir la perfusion tissulaire. Après la naissance, cette néovascularisation survient par l'angiogenèse, la vasculogenèse et l'artériogenèse. De façon intéressante, les mêmes facteurs de risques associés au développement de l'athérosclérose diminuent la capacité de néovascularisation suite à une ischémie. Ce phénotype athérosclérotique est caractérisé par une élévation du stress oxydant et de l'inflammation systémique, ce qui induit une défaillance des fonctions angiogéniques des ECs et les PACs. Toutefois, les mécanismes moléculaires impliqués dans la modulation de la néovascularisation post-ischémique en condition athérosclérotique restent encore mal compris. En particulier, le rôle de la rénine et des miRs dans cette physiopathologie doivent être caractérisés. Ainsi, l'ensemble de mes travaux de doctorat portait sur l'efficacité thérapeutique d'une approche basée sur l'inhibition de la rénine et d'une supplémentation de miR-150 et miR-146b pour stimuler la néovascularisation post-ischémique.

- **L'objectif de ma première étude visait à évaluer l'effet thérapeutique de l'aliskiren, un inhibiteur direct de la rénine, sur la néovascularisation post-ischémique. Nos résultats démontrent que l'aliskiren :**
- Améliore la néovascularisation post-ischémique chez la souris, ce qui est démontré par une augmentation de la récupération du flot sanguin, de la densité capillaire et artériolaire et de l'expression du VEGF dans le muscle ischémique.
 - Augmente le nombre et l'activité fonctionnelle des PACs *in vivo*.
 - Améliore l'activité angiogénique des ECs *in vitro*.
 - Diminue la production de ROS dans le muscle ischémique et dans les ECs et augmente les niveaux de NO.

➤ **L'objectif de ma deuxième et troisième étude visait étudier le rôle du miR-150 et miR-146b dans la défaillance de néovascularisation causée par des conditions athérosclérotiques. Nos résultats démontrent que :**

- Le miR-150 (un miR pro-angiogénique) et le miR-146b (un miR anti-inflammatoire) sont significativement diminués dans le muscle ischémique des souris hypercholestérolémiques et dans les ECs matures exposés aux oxLDL.
- L'inhibition du miR-150 cause une défaillance angiogénique des ECs et des PACs en augmentant les niveaux de SRCIN1. L'augmentation de SRCIN1 mène à son tour à une diminution de l'activité de la voie pro-angiogénique Src/Akt/eNos *in vivo* et *in vitro*.
- L'inhibition du miR-146b par les oxLDL induit la dysfonction endothéliale par un mécanisme impliquant l'induction du gène pro-inflammatoire TRAF6.
- *In vitro*, l'expression forcée du miR-150 ou du miR-146b permet de restaurer les fonctions angiogéniques basales des ECs qui étaient inhibés par les oxLDL.
- *In vivo*, une supplémentation de miR-150 ou de miR-146b par injection intramusculaire au moment de la chirurgie augmente significativement la néovascularisation globale des souris hypercholestérolémiques, ce qui inclut une amélioration du nombre et l'activité fonctionnelle des PACs.

Au cours de cette thèse, nous avons élucidé de nouveaux mécanismes impliqués dans la modulation de la néovascularisation post-ischémique dans modèle murins, mimant une ischémique critique du membre inférieur chez l'humain. Premièrement, nous avons démontré pour la première fois que l'inhibition directe de la rénine par l'aliskiren, améliore la néovascularisation post-ischémique *in vivo*. Nous avons aussi identifié et caractérisé deux miRs impliqués dans la défaillance de néovascularisation causée par l'hypercholestérolémie. Nous avons également démontré pour la première fois qu'une supplémentation de miR-150 ou de miR-146b permet d'augmenter la néovascularisation déficiente chez les souris hypercholestérolémiques en récupérant les fonctions angiogéniques basales des ECs et des PACs. Globalement, nos études améliorent l'état des connaissances sur le rôle de la rénine et des miRs dans la néovascularisation post-ischémique. Finalement, nos résultats pourraient contribuer à l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement des pathologies cardiovasculaires ischémiques.

VI-Bibliographie

- Ablin, J. N., V. Boguslavski, V. Aloush, O. Elkayam, D. Paran, D. Caspi, and J. George. 2006. 'Effect of anti-TNF- α treatment on circulating endothelial progenitor cells (EPCs) in rheumatoid arthritis', *Life Sci*, 79: 2364-9.
- Abu-Hayyeh, S., M. Sian, K. G. Jones, A. Manuel, and J. T. Powell. 2001. 'Cadmium accumulation in aortas of smokers', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21: 863-7.
- Adair, T. H., and J. P. Montani. 2010. *Angiogenesis* (2010 by Morgan & Claypool Life Sciences.: San Rafael CA).
- Ai, J., R. Zhang, Y. Li, J. Pu, Y. Lu, J. Jiao, K. Li, B. Yu, Z. Li, R. Wang, L. Wang, Q. Li, N. Wang, H. Shan, Z. Li, and B. Yang. 2010. 'Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction', *Biochem Biophys Res Commun*, 391: 73-7.
- Aicher, A., W. Brenner, M. Zuhayra, C. Badorff, S. Massoudi, B. Assmus, T. Eckey, E. Henze, A. M. Zeiher, and S. Dimmeler. 2003. 'Assessment of the tissue distribution of transplanted human endothelial progenitor cells by radioactive labeling', *Circulation*, 107: 2134-9.
- Aicher, A., C. Heeschen, C. Mildner-Rihm, C. Urbich, C. Ihling, K. Technau-Ihling, A. M. Zeiher, and S. Dimmeler. 2003. 'Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells', *Nat Med*, 9: 1370-6.
- Aird, W. C. 2011. 'Discovery of the cardiovascular system: from Galen to William Harvey', *J Thromb Haemost*, 9 Suppl 1: 118-29.
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, P. Walter, M. Raff, and K. Roberts. 2002. *Molecular Biology of the Cell 4th Edition: International Student Edition* (Routledge).
- Alexander, R. Wayne. 1995. 'Hypertension and the Pathogenesis of Atherosclerosis', *Oxidative Stress and the Mediation of Arterial Inflammatory Response: A New Perspective*, 25: 155-61.
- Allen, R. M., T. J. Marquart, C. J. Albert, F. J. Suchy, D. Q. Wang, M. Ananthanarayanan, D. A. Ford, and A. Baldan. 2012. 'miR-33 controls the expression of biliary transporters, and mediates statin- and diet-induced hepatotoxicity', *EMBO Mol Med*, 4: 882-95.
- Allred, E. N., E. R. Bleecker, B. R. Chaitman, T. E. Dahms, S. O. Gottlieb, J. D. Hackney, M. Pagano, R. H. Selvester, S. M. Walden, and J. Warren. 1989. 'Short-term effects of carbon monoxide exposure on the exercise performance of subjects with coronary artery disease', *N Engl J Med*, 321: 1426-32.
- Almeida, Maria I., Rui M. Reis, and George A. Calin. 2011. 'MicroRNA history: Discovery, recent applications, and next frontiers', *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 717: 1-8.
- Amanchy, R., J. Zhong, R. Hong, J. H. Kim, M. Gucek, R. N. Cole, H. Molina, and A. Pandey. 2009. 'Identification of c-Src Tyrosine Kinase Substrates in Platelet-Derived Growth Factor Receptor Signaling', *Mol Oncol*, 3: 439-50.

- Amano, K., H. Matsubara, O. Iba, M. Okigaki, S. Fujiyama, T. Imada, H. Kojima, Y. Nozawa, S. Kawashima, M. Yokoyama, and T. Iwasaka. 2003. 'Enhancement of ischemia-induced angiogenesis by eNOS overexpression', *Hypertension*, 41: 156-62.
- Ambrose, John A., and Rajat S. Barua. 2004. 'The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease', *Journal of the American College of Cardiology*, 43: 1731-37.
- Andreou, I., D. Tousoulis, C. Tentolouris, C. Antoniades, and C. Stefanadis. 2006. 'Potential role of endothelial progenitor cells in the pathophysiology of heart failure: clinical implications and perspectives', *Atherosclerosis*, 189: 247-54.
- Annex, B. H. 2013. 'Therapeutic angiogenesis for critical limb ischaemia', *Nat Rev Cardiol*, 10: 387-96.
- Antonopoulos, A. S., M. Margaritis, R. Lee, K. Channon, and C. Antoniades. 2012. 'Statins as anti-inflammatory agents in atherogenesis: molecular mechanisms and lessons from the recent clinical trials', *Curr Pharm Des*, 18: 1519-30.
- Aragona, Caterina Oriana, Egidio Imbalzano, Federica Mamone, Valentina Cairo, Alberto Lo Gullo, #x, Angela Ascola, Maria Adriana Sardo, Michele Scuruchi, Giorgio Basile, Antonino Saitta, and Giuseppe Mandraffino. 2016. 'Endothelial Progenitor Cells for Diagnosis and Prognosis in Cardiovascular Disease', *Stem Cells International*, 2016: 12.
- Araujo, A. S., G. P. Diniz, F. E. Seibel, G. Branchini, M. F. Ribeiro, I. S. Brum, N. Khaper, M. L. Barreto-Chaves, and A. Bello-Klein. 2011. 'Reactive oxygen and nitrogen species balance in the determination of thyroid hormones-induced cardiac hypertrophy mediated by renin-angiotensin system', *Mol Cell Endocrinol*, 333: 78-84.
- Arboix, A. 2015. 'Cardiovascular risk factors for acute stroke: Risk profiles in the different subtypes of ischemic stroke', *World J Clin Cases*, 3: 418-29.
- Ardekani, A. M., and M. M. Naeini. 2010. 'The Role of MicroRNAs in Human Diseases', *Avicenna J Med Biotechnol*, 2: 161-79.
- Aronson, D., and E. J. Rayfield. 2002. 'How hyperglycemia promotes atherosclerosis: molecular mechanisms', *Cardiovasc Diabetol*, 1: 1.
- Arras, M., W. D. Ito, D. Scholz, B. Winkler, J. Schaper, and W. Schaper. 1998. 'Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb', *J Clin Invest*, 101: 40-50.
- Arras, M., R. Strasser, M. Mohri, R. Doll, P. Eckert, W. Schaper, and J. Schaper. 1998. 'Tumor necrosis factor-alpha is expressed by monocytes/macrophages following cardiac microembolization and is antagonized by cyclosporine', *Basic Res Cardiol*, 93: 97-107.
- Asahara, T., and A. Kawamoto. 2004. 'Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis', *Am J Physiol Cell Physiol*, 287: C572-9.
- Asahara, T., A. Kawamoto, and H. Masuda. 2011. 'Concise review: Circulating endothelial progenitor cells for vascular medicine', *Stem Cells*, 29: 1650-5.
- Asahara, T., H. Masuda, T. Takahashi, C. Kalka, C. Pastore, M. Silver, M. Kearne, M. Magner, and J. M. Isner. 1999a. 'Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization', *Circ Res*, 85: 221-8.
- Asahara, T., T. Murohara, A. Sullivan, M. Silver, R. van der Zee, T. Li, B. Witzenbichler, G. Schatteman, and J. M. Isner. 1997. 'Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis', *Science*, 275: 964-7.

- Allikmets K. Aliskiren--an orally active renin inhibitor Review of pharmacology, pharmacodynamics, kinetics, and clinical potential in the treatment of hypertension. *Vasc Health Risk Manag.* 2007;3(6):809-15.
- Asahara, T., T. Takahashi, H. Masuda, C. Kalka, D. Chen, H. Iwaguro, Y. Inai, M. Silver, and J. M. Isner. 1999. 'VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells', *EMBO J*, 18: 3964-72.
- Ascer, E., M. C. Bertolami, M. L. Venturinelli, V. Buccheri, J. Souza, J. C. Nicolau, J. A. Ramires, and C. V. Serrano, Jr. 2004. 'Atorvastatin reduces proinflammatory markers in hypercholesterolemic patients', *Atherosclerosis*, 177: 161-6.
- Askari, A. T., S. Unzek, Z. B. Popovic, C. K. Goldman, F. Forudi, M. Kiedrowski, A. Rovner, S. G. Ellis, J. D. Thomas, P. E. DiCorleto, E. J. Topol, and M. S. Penn. 2003. 'Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy', *Lancet*, 362: 697-703.
- Assmus, B., U. Fischer-Rasokat, J. Honold, F. H. Seeger, S. Fichtlscherer, T. Tonn, E. Seifried, V. Schachinger, S. Dimmeler, and A. M. Zeiher. 2007. 'Transcoronary transplantation of functionally competent BMCs is associated with a decrease in natriuretic peptide serum levels and improved survival of patients with chronic postinfarction heart failure: results of the TOPCARE-CHD Registry', *Circ Res*, 100: 1234-41.
- Autieri, Michael V. 2012. 'Pro- and Anti-Inflammatory Cytokine Networks in Atherosclerosis', *ISRN Vascular Medicine*, 2012: 17.
- Avraamides, C. J., B. Garmy-Susini, and J. A. Varner. 2008. 'Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis', *Nat Rev Cancer*, 8: 604-17.
- Babaei, S., and D. J. Stewart. 2002. 'Overexpression of endothelial NO synthase induces angiogenesis in a co-culture model', *Cardiovasc Res*, 55: 190-200.
- Bader M, Alenina N, Andrade-Navarro MA, Santos RA. MAS and its related G protein-coupled receptors, Mrgprs. *Pharmacol Rev.* 2014 Oct;66(4):1080-105.
- Baetta, R., and A. Corsini. 2010. 'Role of polymorphonuclear neutrophils in atherosclerosis: current state and future perspectives', *Atherosclerosis*, 210: 1-13.
- Bajan, S., and G. Hutvagner. 2014. 'Regulation of miRNA Processing and miRNA Mediated Gene Repression in Cancer', *Microrna*, 3: 10-7.
- Balaji, S., A. King, T. M. Crombleholme, and S. G. Keswani. 2013. 'The Role of Endothelial Progenitor Cells in Postnatal Vasculogenesis: Implications for Therapeutic Neovascularization and Wound Healing', *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2: 283-95.
- Bali, Jatinder, and Renu Bali. 2013. 'Pathological ocular angiogenesis in diabetes: A perspective of emerging paradigms and current evidence', *Journal of Clinical Ophthalmology and Research*, 1: 3-10.
- Balligand, J. L., O. Feron, and C. Dessy. 2009. 'eNOS activation by physical forces: from short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues', *Physiol Rev*, 89: 481-534.
- Banerjee, S., N. Xie, H. Cui, Z. Tan, S. Yang, M. Icyuz, E. Abraham, and G. Liu. 2013. 'MicroRNA let-7c regulates macrophage polarization', *J Immunol*, 190: 6542-9.
- Bartel, D. P. 2004. 'MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function', *Cell*, 116: 281-97.
- Barter, Philip J., Stephen Nicholls, Kerry-Anne Rye, G.M. Anantharamaiah, Mohamad Navab, and Alan M. Fogelman. 2004. 'Antiinflammatory Properties of HDL', *Circulation Research*, 95: 764-72.

- Barua, R. S., J. A. Ambrose, L. J. Eales-Reynolds, M. C. DeVoe, J. G. Zervas, and D. C. Saha. 2001. 'Dysfunctional endothelial nitric oxide biosynthesis in healthy smokers with impaired endothelium-dependent vasodilatation', *Circulation*, 104: 1905-10.
- Basile, D. P., and M. C. Yoder. 2014. 'Circulating and tissue resident endothelial progenitor cells', *J Cell Physiol*, 229: 10-6.
- Bauer, Viktor, and Ružena Sotníková. 2010. *Nitric oxide - The endothelium-derived relaxing factor and its role in endothelial functions*.
- Bautz, F., S. Rafii, L. Kanz, and R. Mohle. 2000. 'Expression and secretion of vascular endothelial growth factor-A by cytokine-stimulated hematopoietic progenitor cells. Possible role in the hematopoietic microenvironment', *Exp Hematol*, 28: 700-6.
- Beenken, A., and M. Mohammadi. 2009. 'The FGF family: biology, pathophysiology and therapy', *Nat Rev Drug Discov*, 8: 235-53.
- Ben-Horin, S., E. Bardan, I. Barshack, N. Zaks, and A. Livneh. 2003. 'Cholesterol crystal embolization to the digestive system: characterization of a common, yet overlooked presentation of atheroembolism', *Am J Gastroenterol*, 98: 1471-9.
- Benowitz, N. L. 2003. 'Cigarette smoking and cardiovascular disease: pathophysiology and implications for treatment', *Prog Cardiovasc Dis*, 46: 91-111.
- Bentzon, J. F., F. Otsuka, R. Virmani, and E. Falk. 2014. 'Mechanisms of plaque formation and rupture', *Circ Res*, 114: 1852-66.
- Bergers, Gabriele, and Laura E. Benjamin. 2003. 'Tumorigenesis and the angiogenic switch', *Nat Rev Cancer*, 3: 401-10.
- Bernhard, D., A. Csordas, B. Henderson, A. Rossmann, M. Kind, and G. Wick. 2005. 'Cigarette smoke metal-catalyzed protein oxidation leads to vascular endothelial cell contraction by depolymerization of microtubules', *FASEB J*, 19: 1096-107.
- Bernstein, E., S. Y. Kim, M. A. Carmell, E. P. Murchison, H. Alcorn, M. Z. Li, A. A. Mills, S. J. Elledge, K. V. Anderson, and G. J. Hannon. 2003. 'Dicer is essential for mouse development', *Nat Genet*, 35: 215-7.
- Betz, C., A. Lenard, H. G. Belting, and M. Affolter. 2016. 'Cell behaviors and dynamics during angiogenesis', *Development*, 143: 2249-60.
- Bevilacqua, M. P., J. S. Pober, M. E. Wheeler, R. S. Cotran, and M. A. Gimbrone. 1985. 'Interleukin 1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and related leukocyte cell lines', *J Clin Invest*, 76: 2003-11.
- Bezman, N. A., T. Chakraborty, T. Bender, and L. L. Lanier. 2011. 'miR-150 regulates the development of NK and iNKT cells', *J Exp Med*, 208: 2717-31.
- Bir, S. C., Y. Xiong, C. G. Kevil, and J. Luo. 2012. 'Emerging role of PKA/eNOS pathway in therapeutic angiogenesis for ischaemic tissue diseases', *Cardiovasc Res*, 95: 7-18.
- Biros, E., M. Karan, and J. Golledge. 2008. 'Genetic Variation and Atherosclerosis', *Curr Genomics*, 9: 29-42.
- Blair, M. 2016. 'Diabetes Mellitus Review', *Urol Nurs*, 36: 27-36.

- Blanke, H., M. Cohen, K. R. Karsch, R. Fagerstrom, and K. P. Rentrop. 1985. 'Prevalence and significance of residual flow to the infarct zone during the acute phase of myocardial infarction', *J Am Coll Cardiol*, 5: 827-31.
- Bonauer, A., G. Carmona, M. Iwasaki, M. Mione, M. Koyanagi, A. Fischer, J. Burchfield, H. Fox, C. Doebele, K. Ohtani, E. Chavakis, M. Potente, M. Tjwa, C. Urbich, A. M. Zeiher, and S. Dimmeler. 2009. 'MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice', *Science*, 324: 1710-3.
- Bonetti, P. O., L. O. Lerman, and A. Lerman. 2003. 'Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23: 168-75.
- Boodhwani, M., Y. Nakai, S. Mieno, P. Voisine, C. Bianchi, E. G. Araujo, J. Feng, K. Michael, J. Li, and F. W. Sellke. 2006. 'Hypercholesterolemia impairs the myocardial angiogenic response in a swine model of chronic ischemia: role of endostatin and oxidative stress', *Ann Thorac Surg*, 81: 634-41.
- Botstein, D. 2012. 'Why we need more basic biology research, not less', *Mol Biol Cell*, 23: 4160-1.
- Boutin, V., L. Geray, Y. Krauss, and C. Vilbert. 2015. *Atlas de Biologie BCPST 1re et 2e années: Conforme au nouveau programme* (Dunod).
- Bowie, A., D. Owens, P. Collins, A. Johnson, and G. H. Tomkin. 1993. 'Glycosylated low density lipoprotein is more sensitive to oxidation: implications for the diabetic patient?', *Atherosclerosis*, 102: 63-7.
- Branen, L., L. Hovgaard, M. Nitulescu, E. Bengtsson, J. Nilsson, and S. Jovinge. 2004. 'Inhibition of tumor necrosis factor-alpha reduces atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24: 2137-42.
- Brannan, C. I., E. C. Dees, R. S. Ingram, and S. M. Tilghman. 1990. 'The product of the H19 gene may function as an RNA', *Mol Cell Biol*, 10: 28-36.
- Brenes, R. A., C. C. Jadowiec, M. Bear, P. Hashim, C. D. Protack, X. Li, W. Lv, M. J. Collins, and A. Dardik. 2012. 'Toward A Mouse Model of Hind Limb Ischemia to Test Therapeutic Angiogenesis', *J Vasc Surg*, 56: 1669-79.
- Broeckel, U., C. Hengstenberg, B. Mayer, S. Holmer, L. J. Martin, A. G. Comuzzie, J. Blangero, P. Nurnberg, A. Reis, G. A. Riegger, H. J. Jacob, and H. Schunkert. 2002. 'A comprehensive linkage analysis for myocardial infarction and its related risk factors', *Nat Genet*, 30: 210-4.
- Brown, M. S., J. L. Goldstein, M. Krieger, Y. K. Ho, and R. G. Anderson. 1979. 'Reversible accumulation of cholesteryl esters in macrophages incubated with acetylated lipoproteins', *J Cell Biol*, 82: 597-613.
- Bruneau, S., D. Datta, J. A. Flaxenburg, S. Pal, and D. M. Briscoe. 2012. 'TRAF6 inhibits proangiogenic signals in endothelial cells and regulates the expression of vascular endothelial growth factor', *Biochem Biophys Res Commun*, 419: 66-71.
- Bucala, R., Z. Makita, T. Koschinsky, A. Cerami, and H. Vlassara. 1993. 'Lipid advanced glycosylation: pathway for lipid oxidation *in vivo*', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90: 6434-8.
- Budoff, M. J., K. Nasir, S. Mao, P. H. Tseng, A. Chau, S. T. Liu, F. Flores, and R. S. Blumenthal. 2006. 'Ethnic differences of the presence and severity of coronary atherosclerosis', *Atherosclerosis*, 187: 343-50.
- Bueno-Betí, C., S. Novella, M. Lázaro-Franco, D. Pérez-Cremades, M. Heras, J. Sanchís, and C. Hermenegildo. 2013. 'An affordable method to obtain cultured endothelial cells from peripheral blood', *J Cell Mol Med*, 17: 1475-83.
- Buja, L. M. 2005. 'Myocardial ischemia and reperfusion injury', *Cardiovasc Pathol*, 14: 170-5.

- Burke, A., and G. A. Fitzgerald. 2003. 'Oxidative stress and smoking-induced vascular injury', *Prog Cardiovasc Dis*, 46: 79-90.
- Burke, Gregory L., Alain G. Bertoni, Steven Shea, Russell Tracy, Karol E. Watson, Roger S. Blumenthal, Hyoju Chung, and Mercedes R. Carnethon. 2008. 'The Impact of Obesity on Cardiovascular Disease Risk Factors and Subclinical Vascular Disease: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis', *Archives of internal medicine*, 168: 928-35.
- Burnham, M. R., P. J. Bruce-Staskal, M. T. Harte, C. L. Weidow, A. Ma, S. A. Weed, and A. H. Bouton. 2000. 'Regulation of c-SRC Activity and Function by the Adapter Protein CAS', *Mol Cell Biol*, 20: 5865-78.
- Buschmann, I. R., I. E. Hofer, N. van Royen, E. Katzer, R. Braun-Dulleaus, M. Heil, S. Kostin, C. Bode, and W. Schaper. 2001. 'GM-CSF: a strong arteriogenic factor acting by amplification of monocyte function', *Atherosclerosis*, 159: 343-56.
- Buschmann, I., and W. Schaper. 1999. 'Arteriogenesis Versus Angiogenesis: Two Mechanisms of Vessel Growth', *Physiology*, 14: 121-25.
- Cai, Hua, and David G. Harrison. 2000b. 'Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The Role of Oxidant Stress', *Circulation Research*, 87: 840-44.
- Caiado, F., and S. Dias. 2012. 'Endothelial progenitor cells and integrins: adhesive needs', *Fibrogenesis Tissue Repair*, 5: 4.
- Campbell, D. J., Y. Zhang, D. J. Kelly, R. E. Gilbert, D. J. McCarthy, W. Shi, and G. K. Smyth. 2011. 'Aliskiren increases bradykinin and tissue kallikrein mRNA levels in the heart', *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 38: 623-31.
- Cannon, R. O., 3rd. 1998. 'Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium', *Clin Chem*, 44: 1809-19.
- Cao, M., D. Hou, H. Liang, F. Gong, Y. Wang, X. Yan, X. Jiang, C. Wang, J. Zhang, K. Zen, C. Y. Zhang, and X. Chen. 2014. 'miR-150 promotes the proliferation and migration of lung cancer cells by targeting SRC kinase signalling inhibitor 1', *Eur J Cancer*, 50: 1013-24.
- Cao, Y., A. Hong, H. Schulten, and M. J. Post. 2005. 'Update on therapeutic neovascularization', *Cardiovasc Res*, 65: 639-48.
- Cardilo-Reis, L., S. Gruber, S. M. Schreier, M. Drechsler, N. Papac-Milicevic, C. Weber, O. Wagner, H. Stangl, O. Soehnlein, and C. J. Binder. 2012. 'Interleukin-13 protects from atherosclerosis and modulates plaque composition by skewing the macrophage phenotype', *EMBO Mol Med*, 4: 1072-86.
- Carey RM. Antihypertensive and renoprotective mechanisms of Renin inhibition in diabetic rats. *Hypertension*. 2008 Jul;52(1):63-4.
- Carleton, R. A., J. Dwyer, L. Finberg, J. Flora, D. S. Goodman, S. M. Grundy, S. Havas, G. T. Hunter, D. Kritchevsky, R. M. Lauer, and et al. 1991. 'Report of the Expert Panel on Population Strategies for Blood Cholesterol Reduction. A statement from the National Cholesterol Education Program, National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health', *Circulation*, 83: 2154-232.
- Carmeliet, P. 2000. 'Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis', *Nat Med*, 6: 389-95.
- Carmeliet, P., and R. K. Jain. 2011. 'Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis', *Nature*, 473: 298-307.

- Case, J., D. A. Ingram, and L. S. Haneline. 2008. 'Oxidative Stress Impairs Endothelial Progenitor Cell Function', *Antioxid Redox Signal*, 10: 1895-907.
- Cassis, L. A., K. R. Lynch, and M. J. Peach. 1988. 'Localization of angiotensinogen messenger RNA in rat aorta', *Circ Res*, 62: 1259-62.
- Castellon, X., and V. Bogdanova. 2016. 'Chronic Inflammatory Diseases and Endothelial Dysfunction', *Aging Dis*, 7: 81-9.
- Cave, A. 2009. 'Selective targeting of NADPH oxidase for cardiovascular protection', *Curr Opin Pharmacol*, 9: 208-13.
- Cébe-Suarez, S., A. Zehnder-Fjällman, and K. Ballmer-Hofer. 2006. 'The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships', *Cell Mol Life Sci*, 63: 601-15.
- Ceradini, D. J., A. R. Kulkarni, M. J. Callaghan, O. M. Tepper, N. Bastidas, M. E. Kleinman, J. M. Capla, R. D. Galiano, J. P. Levine, and G. C. Gurtner. 2004. 'Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1', *Nat Med*, 10: 858-64.
- Chakrabarti, S., O. Lekontseva, and S. T. Davidge. 2008. 'Estrogen is a modulator of vascular inflammation', *IUBMB Life*, 60: 376-82.
- Chamorro-Jorganes, Aránzazu, Elisa Araldi, Luiz O.F. Penalva, Devraj Sandhu, Carlos Fernández-Hernando, and Yajaira Suárez. 2011. 'MicroRNA-16 and MicroRNA-424 Regulate Cell-Autonomous Angiogenic Functions in Endothelial Cells via Targeting Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 and Fibroblast Growth Factor Receptor-1', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31: 2595-606.
- Chamorro-Jorganes, Aránzazu, Elisa Araldi, and Yajaira Suárez. 2013. 'MicroRNAs as pharmacological targets in endothelial cell function and dysfunction', *Pharmacological Research*, 75: 15-27.
- Chang, T. T., T. C. Wu, P. H. Huang, J. S. Chen, L. Y. Lin, S. J. Lin, and J. W. Chen. 2016. 'Aliskiren directly improves endothelial progenitor cell function from Type II diabetic patients', *Eur J Clin Invest*, 46: 544-54.
- Chang, T. T., T. C. Wu, P. H. Huang, C. P. Lin, J. S. Chen, L. Y. Lin, S. J. Lin, and J. W. Chen. 2015. 'Direct Renin Inhibition with Aliskiren Improves Ischemia-Induced Neovascuogenesis in Diabetic Animals via the SDF-1 Related Mechanism', *PLoS One*, 10: e0136627.
- Chang, Ting-Yu, Wei-Chi Tsai, Tse-Shun Huang, Shu-Han Su, Chih-Young Chang, Hsiu-Yen Ma, Chun-Hsien Wu, Chih-Yung Yang, Chi-Hung Lin, Po-Hsun Huang, Cheng-Chung Cheng, Shu-Meng Cheng, and Hsei-Wei Wang. 2017b. 'Dysregulation of endothelial colony-forming cell function by a negative feedback loop of circulating miR-146a and -146b in cardiovascular disease patients', *PLoS One*, 12: e0181562.
- Chen, C. H., J. Cartwright, Jr., Z. Li, S. Lou, H. H. Nguyen, A. M. Gotto, Jr., and P. D. Henry. 1997. 'Inhibitory effects of hypercholesterolemia and ox-LDL on angiogenesis-like endothelial growth in rabbit aortic explants. Essential role of basic fibroblast growth factor', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17: 1303-12.
- Chen, C., and D. B. Khisimatullin. 2015. 'Oxidized low-density lipoprotein contributes to atherogenesis via co-activation of macrophages and mast cells', *PLoS One*, 10: e0123088.
- Chen, J. Z., F. R. Zhang, Q. M. Tao, X. X. Wang, J. H. Zhu, and J. H. Zhu. 2004. 'Number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood in patients with hypercholesterolaemia', *Clin Sci (Lond)*, 107: 273-80.
- Chen, L., A. Frister, S. Wang, A. Ludwig, H. Behr, S. Pippig, B. Li, A. Simm, B. Hofmann, C. Pilowski, S. Koch, M. Buerke, S. Rose-John, K. Werdan, and H. Loppnow. 2009. 'Interaction of vascular smooth muscle cells

- and monocytes by soluble factors synergistically enhances IL-6 and MCP-1 production', *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 296: H987-96.
- Chen, T. G., Z. Y. Zhong, G. F. Sun, Y. X. Zhou, and Y. Zhao. 2011. 'Effects of tumour necrosis factor-alpha on activity and nitric oxide synthase of endothelial progenitor cells from peripheral blood', *Cell Prolif*, 44: 352-9.
- Chen, T., Z. Huang, L. Wang, Y. Wang, F. Wu, S. Meng, and C. Wang. 2009. 'MicroRNA-125a-5p partly regulates the inflammatory response, lipid uptake, and ORP9 expression in oxLDL-stimulated monocyte/macrophages', *Cardiovasc Res*, 83: 131-9.
- Chen, X., B. T. Andresen, M. Hill, J. Zhang, F. Booth, and C. Zhang. 2008. 'Role of Reactive Oxygen Species in Tumor Necrosis Factor-alpha Induced Endothelial Dysfunction', *Curr Hypertens Rev*, 4: 245-55.
- Chen, Z., F. R. Bakhshi, A. N. Shajahan, T. Sharma, M. Mao, A. Trane, P. Bernatchez, G. P. van Nieuw Amerongen, M. G. Bonini, R. A. Skidgel, A. B. Malik, and R. D. Minshall. 2012. 'Nitric oxide-dependent Src activation and resultant caveolin-1 phosphorylation promote eNOS/caveolin-1 binding and eNOS inhibition', *Mol Biol Cell*, 23: 1388-98.
- Cheng, H. S., N. Sivachandran, A. Lau, E. Boudreau, J. L. Zhao, D. Baltimore, P. Delgado-Olguin, M. I. Cybulsky, and J. E. Fish. 2013a. 'MicroRNA-146 represses endothelial activation by inhibiting pro-inflammatory pathways', *EMBO Mol Med*, 5: 1017-34.
- Cheng, M., K. Huang, J. Zhou, D. Yan, Y. L. Tang, T. C. Zhao, R. J. Miller, R. Kishore, D. W. Losordo, and G. Qin. 2015a. 'A critical role of Src family kinase in SDF-1/CXCR4-mediated bone-marrow progenitor cell recruitment to the ischemic heart', *J Mol Cell Cardiol*, 81: 49-53.
- Cheng, M., and G. Qin. 2012. 'Progenitor Cell Mobilization and Recruitment: SDF-1, CXCR4, α 4-integrin, and c-kit', *Prog Mol Biol Transl Sci*, 111: 243-64.
- Cheng, Min, Kai Huang, Junlan Zhou, Dewen Yan, Yao-Liang Tang, Ting C. Zhao, Richard J. Miller, Raj Kishore, Douglas W. Losordo, and Gangjian Qin. 2015b. 'A critical role of Src family kinase in SDF-1/CXCR4-mediated bone-marrow progenitor cell recruitment to the ischemic heart', *Journal of molecular and cellular cardiology*, 81: 49-53.
- Cheng, Y., S. Jiang, R. Hu, and L. Lv. 2013. 'Potential mechanism for endothelial progenitor cell therapy in acute myocardial infarction: Activation of VEGF- PI3K/Akte-NOS pathway', *Ann Clin Lab Sci*, 43: 395-401.
- Cheng, Y., N. Tan, J. Yang, X. Liu, X. Cao, P. He, X. Dong, S. Qin, and C. Zhang. 2010. 'A translational study of circulating cell-free microRNA-1 in acute myocardial infarction', *Clin Sci (Lond)*, 119: 87-95.
- Chinetti-Gbaguidi, G., M. Baron, M. A. Bouhlef, J. Vanhoutte, C. Copin, Y. Sebti, B. Derudas, T. Mayi, G. Bories, A. Tailleux, S. Haulon, C. Zawadzki, B. Jude, and B. Staels. 2011. 'Human atherosclerotic plaque alternative macrophages display low cholesterol handling but high phagocytosis because of distinct activities of the PPARgamma and LXRalpha pathways', *Circ Res*, 108: 985-95.
- Chobanian, A. V. 1990. 'The effects of ACE inhibitors and other antihypertensive drugs on cardiovascular risk factors and atherogenesis', *Clin Cardiol*, 13: VII43-8.
- Choi, D. E., J. Y. Jeong, B. J. Lim, Y. K. Chang, K. R. Na, Y. T. Shin, and K. W. Lee. 2011. 'Aliskiren ameliorates renal inflammation and fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction in mice', *J Urol*, 186: 694-701.
- Choi, Y. E., Y. R. Cha, K. Lee, H. J. Kim, and C. H. Yoon. 2015. 'Proangiogenic cells enhanced persistent and physiologic neovascularization compared with macrophages', *Exp Mol Med*, 47: e186-.

- Cholesterol Treatment Trialists, Collaborators. 2012. 'The effects of lowering LDL cholesterol with statin therapy in people at low risk of vascular disease: meta-analysis of individual data from 27 randomised trials', *Lancet*, 380: 581-90.
- Chung, H. Y., B. Sung, K. J. Jung, Y. Zou, and B. P. Yu. 2006. 'The molecular inflammatory process in aging', *Antioxid Redox Signal*, 8: 572-81.
- Church, D. F., and W. A. Pryor. 1985. 'Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications', *Environ Health Perspect*, 64: 111-26.
- Clement, T., V. Salone, and M. Rederstorff. 2015. 'Dual luciferase gene reporter assays to study miRNA function', *Methods Mol Biol*, 1296: 187-98.
- Collectif, Q.A.I. 2002. *Les Guides de la connaissance - Le Corps Humain - Comprendre notre organisme et son fonctionnement* (Québec Amérique).
- Collins, T., M. A. Read, A. S. Neish, M. Z. Whitley, D. Thanos, and T. Maniatis. 1995. 'Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers', *FASEB J*, 9: 899-909.
- Comer, B. S., B. Camoretti-Mercado, P. C. Kogut, A. J. Halayko, J. Solway, and W. T. Gerthoffer. 2014. 'MicroRNA-146a and microRNA-146b expression and anti-inflammatory function in human airway smooth muscle', *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 307: L727-34.
- Conklin, D. J., A. Bhatnagar, H. R. Cowley, G. H. Johnson, R. J. Wiechmann, L. M. Sayre, M. B. Trent, and P. J. Boor. 2006. 'Acrolein generation stimulates hypercontraction in isolated human blood vessels', *Toxicol Appl Pharmacol*, 217: 277-88.
- Cooke, John P., and Douglas W. Losordo. 2002b. 'Nitric Oxide and Angiogenesis', *Circulation*, 105: 2133-35.
- Corde, S., C. Laplace, E. Vicaut, and J. Duranteau. 2001. 'Rapid reactive oxygen species production by mitochondria in endothelial cells exposed to tumor necrosis factor-alpha is mediated by ceramide', *Am J Respir Cell Mol Biol*, 24: 762-8.
- Cordes, K. R., N. T. Sheehy, M. P. White, E. C. Berry, S. U. Morton, A. N. Muth, T. H. Lee, J. M. Miano, K. N. Ivey, and D. Srivastava. 2009. 'miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity', *Nature*, 460: 705-10.
- Corti, Roberto, Valentin Fuster, and Juan Jose Badimon. 2003. 'Pathogenetic concepts of acute coronary syndromes', *Journal of the American College of Cardiology*, 41: S7-S14.
- Couffinhal, T., P. Dufourcq, L. Barandon, L. Leroux, and C. Duplaa. 2009. 'Mouse models to study angiogenesis in the context of cardiovascular diseases', *Front Biosci (Landmark Ed)*, 14: 3310-25.
- Couffinhal, T., M. Silver, M. Kearney, A. Sullivan, B. Witzendichler, M. Magner, B. Annex, K. Peters, and J. M. Isner. 1999. 'Impaired collateral vessel development associated with reduced expression of vascular endothelial growth factor in ApoE^{-/-} mice', *Circulation*, 99: 3188-98.
- Couffinhal, T., M. Silver, L. P. Zheng, M. Kearney, B. Witzendichler, and J. M. Isner. 1998a. 'Mouse model of angiogenesis', *The American Journal of Pathology*, 152: 1667-79.
- Coujard, Roger, and J. Poirier. 1980. *Précis d'histologie humaine* (Masson).
- Craig, W. Y., G. E. Palomaki, and J. E. Haddow. 1989. 'Cigarette smoking and serum lipid and lipoprotein concentrations: an analysis of published data', *BMJ*, 298: 784-8.

- Cromwell, W. C., J. D. Otvos, M. J. Keyes, M. J. Pencina, L. Sullivan, R. S. Vasan, P. W. F. Wilson, and R. B. D'Agostino. 2007. 'LDL Particle Number and Risk of Future Cardiovascular Disease in the Framingham Offspring Study – Implications for LDL Management', *J Clin Lipidol*, 1: 583-92.
- Cunningham, K. S., and A. I. Gotlieb. 2005. 'The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis', *Lab Invest*, 85: 9-23.
- Curtale, G., M. Mirolo, T. A. Renzi, M. Rossato, F. Bazzoni, and M. Locati. 2013. 'Negative regulation of Toll-like receptor 4 signaling by IL-10-dependent microRNA-146b', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: 11499-504.
- Curtale, G., T. A. Renzi, and M. Locati. 2012. 'P142 miR-146b: IL-10-dependent negative regulator of inflammation', *Cytokine*, 59: 565.
- D'Amore, P. A., and R. W. Thompson. 1987. 'Mechanisms of angiogenesis', *Annu Rev Physiol*, 49: 453-64.
- d'Uscio, L. V., T. A. Baker, C. B. Mantilla, L. Smith, D. Weiler, G. C. Sieck, and Z. S. Katusic. 2001. 'Mechanism of endothelial dysfunction in apolipoprotein E-deficient mice', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21: 1017-22.
- Das, A., M. Sinha, S. Datta, M. Abas, S. Chaffee, C. K. Sen, and S. Roy. 2015. 'Monocyte and macrophage plasticity in tissue repair and regeneration', *Am J Pathol*, 185: 2596-606.
- Daugherty, A., H. Lu, D. L. Rateri, and L. A. Cassis. 2008. 'Augmentation of the renin–angiotensin system by hypercholesterolemia promotes vascular diseases', *Future Lipidol*, 3: 625-36.
- Daugherty, A., D. L. Rateri, H. Lu, T. Inagami, and L. A. Cassis. 2004. 'Hypercholesterolemia stimulates angiotensin peptide synthesis and contributes to atherosclerosis through the AT1A receptor', *Circulation*, 110: 3849-57.
- Davies, L. C., S. J. Jenkins, J. E. Allen, and P. R. Taylor. 2013. 'Tissue-resident macrophages', *Nat Immunol*, 14: 986-95.
- Davignon, J., and P. Ganz. 2004. 'Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis', *Circulation*, 109: III27-32.
- Davignon, Jean. 2005. 'Apolipoprotein E and Atherosclerosis', *Beyond Lipid Effect*, 25: 267-69.
- Davis, B. N., and A. Hata. 2009. 'Regulation of MicroRNA Biogenesis: A miRiad of mechanisms', *Cell Commun Signal*, 7: 18.
- Davis, M. E., H. Cai, G. R. Drummond, and D. G. Harrison. 2001. 'Shear stress regulates endothelial nitric oxide synthase expression through c-Src by divergent signaling pathways', *Circ Res*, 89: 1073-80.
- de Boer, O. J., J. J. van der Meer, P. Teeling, C. M. van der Loos, and A. C. van der Wal. 2007. 'Low numbers of FOXP3 positive regulatory T cells are present in all developmental stages of human atherosclerotic lesions', *PLoS One*, 2: e779.
- De Falco, E., D. Porcelli, A. R. Torella, S. Straino, M. G. Iachininoto, A. Orlandi, S. Truffa, P. Biglioli, M. Napolitano, M. C. Capogrossi, and M. Pesce. 2004. 'SDF-1 involvement in endothelial phenotype and ischemia-induced recruitment of bone marrow progenitor cells', *Blood*, 104: 3472-82.
- de Groot, D., G. Pasterkamp, and I. E. Hoefer. 2009. 'Cardiovascular risk factors and collateral artery formation', *Eur J Clin Invest*, 39: 1036-47.
- De Mello, W. C., and A. H. Danser. 2000. 'Angiotensin II and the heart : on the intracrine renin-angiotensin system', *Hypertension*, 35: 1183-8.

- De Toni, L., A. Di Nisio, S. Magagna, A. Michielan, M. Martinato, G. C. Sturniolo, R. D'Incà, C. Foresta, and A. Garolla. 2015. 'Altered Chemokine Signalling in Endothelial Progenitor Cells from Acute Ulcerative Colitis Patients', *Gastroenterol Res Pract*, 2015.
- de Villiers, W. J., J. D. Smith, M. Miyata, H. M. Dansky, E. Darley, and S. Gordon. 1998. 'Macrophage phenotype in mice deficient in both macrophage-colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18: 631-40.
- de Winther, M. P., K. W. van Dijk, L. M. Havekes, and M. H. Hofker. 2000. 'Macrophage scavenger receptor class A: A multifunctional receptor in atherosclerosis', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20: 290-7.
- DeCicco-Skinner, K. L., G. H. Henry, C. Cataisson, T. Tabib, J. C. Gwilliam, N. J. Watson, E. M. Bullwinkle, L. Falkenburg, R. C. O'Neill, A. Morin, and J. S. Wiest. 2014. 'Endothelial Cell Tube Formation Assay for the *In Vitro* Study of Angiogenesis', *J Vis Exp*: e51312.
- Deiuliis J, Mihai G, Zhang J, Taslim C, Varghese JJ, et al. Renin-sensitive microRNAs correlate with atherosclerosis plaque progression. *J Hum Hypertens*. 2014 Apr;28(4):251-8.
- Del Fiorentino, A., S. Cianchetti, A. Celi, and R. Pedrinelli. 2010. 'Aliskiren, a renin inhibitor, downregulates TNF-alpha-induced tissue factor expression in HUVECS', *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 11: 243-7.
- Delgado, G. E., R. Siekmeier, B. K. Kramer, M. Grubler, A. Tomaschitz, W. Marz, and M. E. Kleber. 2016. 'The Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Smokers and Non-Smokers of the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health (LURIC) Study', *Adv Exp Med Biol*, 935: 75-82.
- Deshmane, S. L., S. Kremlev, S. Amini, and B. E. Sawaya. 2009. 'Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview', *J Interferon Cytokine Res*, 29: 313-26.
- Desjarlais, M., S. Dussault, W. Dhahri, R. Mathieu, and A. Rivard. 2015. 'Direct renin inhibition with aliskiren improves ischemia-induced neovascularization: blood pressure-independent effect', *Atherosclerosis*, 242: 450-60.
- Desjarlais, Michel, Sylvie Dussault, Wahiba Dhahri, Raphael Mathieu, and Alain Rivard. 2017b. 'MicroRNA-150 Modulates Ischemia-Induced Neovascularization in Atherosclerotic Conditions', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*.
- Deveza, L., J. Choi, and F. Yang. 2012. 'Therapeutic Angiogenesis for Treating Cardiovascular Diseases', *Theranostics*, 2: 801-14.
- Dews, M., A. Homayouni, D. Yu, D. Murphy, C. Seignani, E. Wentzel, E. E. Furth, W. M. Lee, G. H. Enders, J. T. Mendell, and A. Thomas-Tikhonenko. 2006. 'Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster', *Nat Genet*, 38: 1060-5.
- Dhahri, W., S. Dussault, P. Haddad, J. Turgeon, S. Tremblay, K. Rolland, M. Desjarlais, K. Y. Caceres-Gorriti, R. Mathieu, and A. Rivard. 2017a. 'Reduced expression of let-7f activates TGF-beta/ALK5 pathway and leads to impaired ischaemia-induced neovascularization after cigarette smoke exposure', *J Cell Mol Med*.
- Di Stefano, P., L. Damiano, S. Cabodi, S. Aramu, L. Tordella, A. Praduroux, R. Piva, F. Cavallo, G. Forni, L. Silengo, G. Tarone, E. Turco, and P. Defilippi. 2007. 'p140Cap protein suppresses tumour cell properties, regulating Csk and Src kinase activity', *EMBO J*, 26: 2843-55.

- Dj, Y. F., D. C. Li, Y. Q. Shen, C. L. Wang, D. Y. Zhang, A. Q. Shang, and T. Hu. 2017. 'MiR-146b protects cardiomyocytes injury in myocardial ischemia/reperfusion by targeting Smad4', *Am J Transl Res*, 9: 656-63.
- Dickson, K. M., A. L. Bhakar, and P. A. Barker. 2004. 'TRAF6-dependent NF- κ B transcriptional activity during mouse development', *Dev Dyn*, 231: 122-7.
- Dikalov, S. I., R. R. Nazarewicz, A. Bikineyeva, L. Hilenski, B. Lassegue, K. K. Griendling, D. G. Harrison, and A. E. Dikalova. 2014. 'Nox2-induced production of mitochondrial superoxide in angiotensin II-mediated endothelial oxidative stress and hypertension', *Antioxid Redox Signal*, 20: 281-94.
- Dimmeler, S., I. Fleming, B. Fisslthaler, C. Hermann, R. Busse, and A. M. Zeiher. 1999. 'Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation', *Nature*, 399: 601-5.
- Dimmeler, S., and A. M. Zeiher. 1999. 'Nitric oxide-an endothelial cell survival factor', *Cell Death Differ*, 6: 964-8.
- Dinh, Quynh N., Sophocles Chrissobolis, Henry Diep, Christopher T. Chan, Dorota Ferens, Grant R. Drummond, and Christopher G. Sobey. 2017. 'Advanced atherosclerosis is associated with inflammation, vascular dysfunction and oxidative stress, but not hypertension', *Pharmacological Research*, 116: 70-76.
- Dinh, Quynh N., Grant R. Drummond, Christopher G. Sobey, and Sophocles Chrissobolis. 2014. 'Roles of Inflammation, Oxidative Stress, and Vascular Dysfunction in Hypertension', *BioMed Research International*, 2014: 11.
- Donato, A. J., R. G. Morgan, A. E. Walker, and L. A. Lesniewski. 2015. 'Cellular and molecular biology of aging endothelial cells', *J Mol Cell Cardiol*, 89: 122-35.
- Dong, S., Y. Cheng, J. Yang, J. Li, X. Liu, X. Wang, D. Wang, T. J. Krall, E. S. Delphin, and C. Zhang. 2009. 'MicroRNA Expression Signature and the Role of MicroRNA-21 in the Early Phase of Acute Myocardial Infarction', *J Biol Chem*, 284: 29514-25.
- Donnelly, R., and G. Manning. 2007. 'Angiotensin-converting enzyme inhibitors and coronary heart disease prevention', *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 8: 13-22.
- Dopheide, J. F., P. Geissler, J. Rubrech, A. Trumpp, G. C. Zeller, K. Bock, B. Dorweiler, F. Dunschede, T. Munzel, M. P. Radsak, and C. Espinola-Klein. 2016. 'Inflammation is associated with a reduced number of pro-angiogenic Tie-2 monocytes and endothelial progenitor cells in patients with critical limb ischemia', *Angiogenesis*, 19: 67-78.
- Doran, A. C., N. Meller, and C. A. McNamara. 2008. 'Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28: 812-9.
- Dostal, D. E., and K. M. Baker. 1999. 'The cardiac renin-angiotensin system: conceptual, or a regulator of cardiac function?', *Circ Res*, 85: 643-50.
- Douglas, G., J. K. Bendall, M. J. Crabtree, A. L. Tatham, E. E. Carter, A. B. Hale, and K. M. Channon. 2012. 'Endothelial-specific Nox2 overexpression increases vascular superoxide and macrophage recruitment in ApoE(-)/(-) mice', *Cardiovasc Res*, 94: 20-9.
- Drake, C. J. 2003. 'Embryonic and adult vasculogenesis', *Birth Defects Res C Embryo Today*, 69: 73-82.
- Drummond, G. R., and C. G. Sobey. 2014. 'Endothelial NADPH oxidases: which NOX to target in vascular disease?', *Trends Endocrinol Metab*, 25: 452-63.

- Du, F., J. Zhou, R. Gong, X. Huang, M. Pansuria, A. Virtue, X. Li, H. Wang, and X. F. Yang. 2012. 'Endothelial progenitor cells in atherosclerosis', *Front Biosci (Landmark Ed)*, 17: 2327-49.
- Duda, Dan G., Dai Fukumura, and Rakesh K. Jain. 2004. 'Role of eNOS in neovascularization: NO for endothelial progenitor cells', *Trends in Molecular Medicine*, 10: 143-45.
- Dulak, J., A. Jozkowicz, A. Dembinska-Kiec, I. Guevara, A. Zdzienicka, D. Zmudzinska-Grochot, I. Florek, A. Wojtowicz, A. Szuba, and J. P. Cooke. 2000. 'Nitric oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20: 659-66.
- Durante, A., G. Peretto, A. Laricchia, F. Ancona, M. Spartera, A. Mangieri, and D. Cianflone. 2012. 'Role of the renin-angiotensin-aldosterone system in the pathogenesis of atherosclerosis', *Curr Pharm Des*, 18: 981-1004.
- Dussault, S., W. Dhahri, M. Desjarlais, R. Mathieu, and A. Rivard. 2014. 'Elsibucol inhibits atherosclerosis following arterial injury: multifunctional effects on cholesterol levels, oxidative stress and inflammation', *Atherosclerosis*, 237: 194-9.
- Dussault, S., F. Maingrette, C. Menard, S. E. Michaud, P. Haddad, J. Groleau, J. Turgeon, G. Perez, and A. Rivard. 2009. 'Sildenafil increases endothelial progenitor cell function and improves ischemia-induced neovascularization in hypercholesterolemic apolipoprotein E-deficient mice', *Hypertension*, 54: 1043-9.
- Ebrahimian, T. G., C. Heymes, D. You, O. Blanc-Brude, B. Mees, L. Waeckel, M. Duriez, J. Vilar, R. P. Brandes, B. I. Levy, A. M. Shah, and J. S. Silvestre. 2006. 'NADPH oxidase-derived overproduction of reactive oxygen species impairs postischemic neovascularization in mice with type 1 diabetes', *Am J Pathol*, 169: 719-28.
- Echavarria, R., D. Mayaki, J. C. Neel, S. Harel, V. Sanchez, and S. N. Hussain. 2015. 'Angiopoietin-1 inhibits toll-like receptor 4 signalling in cultured endothelial cells: role of miR-146b-5p', *Cardiovasc Res*, 106: 465-77.
- Edirisinghe I, Arunachalam G, Wong C, Yao H, Rahman A, et al. Cigarette-smoke-induced oxidative/nitrosative stress impairs VEGF- and fluid-shear-stress-mediated signaling in endothelial cells. *Antioxid Redox Signal*. 2010 Jun 15;12(12):1355-69.
- Eggebrecht, H., O. Oldenburg, O. Dirsch, M. Haude, D. Baumgart, D. Welge, J. Herrmann, G. Arnold, K. W. Schmid, and R. Erbel. 2000. 'Potential embolization by atherosclerotic debris dislodged from aortic wall during cardiac catheterization:: histological and clinical findings in 7,621 patients', *Catheter Cardiovasc Interv*, 49: 389-94.
- Eliceiri, B. P., R. Paul, P. L. Schwartzberg, J. D. Hood, J. Leng, and D. A. Cheresh. 1999. 'Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability', *Mol Cell*, 4: 915-24.
- Elmen, J., M. Lindow, S. Schutz, M. Lawrence, A. Petri, S. Obad, M. Lindholm, M. Hedtjarn, H. F. Hansen, U. Berger, S. Gullans, P. Kearney, P. Sarnow, E. M. Straarup, and S. Kauppinen. 2008. 'LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates', *Nature*, 452: 896-9.
- Elmen, J., M. Lindow, A. Silaharoglu, M. Bak, M. Christensen, A. Lind-Thomsen, M. Hedtjarn, J. B. Hansen, H. F. Hansen, E. M. Straarup, K. McCullagh, P. Kearney, and S. Kauppinen. 2008. 'Antagonism of microRNA-122 in mice by systemically administered LNA-antimiR leads to up-regulation of a large set of predicted target mRNAs in the liver', *Nucleic Acids Res*, 36: 1153-62.

- Emanuelli, C., A. Monopoli, N. Kraenkel, M. Meloni, S. Gadau, I. Campesi, E. Ongini, and P. Madeddu. 2007. 'Nitropravastatin stimulates reparative neovascularisation and improves recovery from limb Ischaemia in type-1 diabetic mice', *Br J Pharmacol*, 150: 873-82.
- Emini Veseli, Besa, Paola Perrotta, Gregory R. A. De Meyer, Lynn Roth, Carole Van der Donckt, Wim Martinet, and Guido R. Y. De Meyer. 'Animal models of atherosclerosis', *European Journal of Pharmacology*.
- Ende, G., D. M. Poitz, E. Wiedemann, A. Augstein, J. Friedrichs, S. Giebe, S. Weinert, C. Werner, R. H. Strasser, and S. Jellinghaus. 2014. 'TNF-alpha-mediated adhesion of monocytes to endothelial cells-The role of ephrinA1', *J Mol Cell Cardiol*, 77: 125-35.
- Endemann, D. H., and E. L. Schiffrin. 2004. 'Endothelial dysfunction', *J Am Soc Nephrol*, 15: 1983-92.
- Erbs, S., A. Linke, V. Adams, K. Lenk, H. Thiele, K. W. Diederich, F. Emmrich, R. Kluge, K. Kendziorra, O. Sabri, G. Schuler, and R. Hambrecht. 2005. 'Transplantation of blood-derived progenitor cells after recanalization of chronic coronary artery occlusion: first randomized and placebo-controlled study', *Circ Res*, 97: 756-62.
- Esau, C., S. Davis, S. F. Murray, X. X. Yu, S. K. Pandey, M. Pear, L. Watts, S. L. Booten, M. Graham, R. McKay, A. Subramaniam, S. Propp, B. A. Lollo, S. Freier, C. F. Bennett, S. Bhanot, and B. P. Monia. 2006. 'miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by *in vivo* antisense targeting', *Cell Metab*, 3: 87-98.
- Esper, R. J., R. A. Nordaby, J. O. Vilarino, A. Paragano, J. L. Cacharron, and R. A. Machado. 2006. 'Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal', *Cardiovasc Diabetol*, 5: 4.
- Fabre, J. E., A. Rivard, M. Magner, M. Silver, and J. M. Isner. 1999. 'Tissue inhibition of angiotensin-converting enzyme activity stimulates angiogenesis *in vivo*', *Circulation*, 99: 3043-9.
- Fan, Y., J. Ye, F. Shen, Y. Zhu, Y. Yeghiazarians, W. Zhu, Y. Chen, M. T. Lawton, W. L. Young, and G. Y. Yang. 2008. 'Interleukin-6 stimulates circulating blood-derived endothelial progenitor cell angiogenesis *in vitro*', *J Cereb Blood Flow Metab*, 28: 90-8.
- Fandos, M., D. Corella, M. Guillen, O. Portoles, P. Carrasco, A. Iradi, M. A. Martinez-Gonzalez, R. Estruch, M. I. Covas, R. M. Lamuela-Raventos, M. T. Michavilla, C. Cerda, R. Torregrosa, J. Redon, F. F. Chaves, M. C. Tormos, D. Ocete, and G. T. Saez. 2009. 'Impact of cardiovascular risk factors on oxidative stress and DNA damage in a high risk Mediterranean population', *Free Radic Res*, 43: 1179-86.
- Fang, Y., C. Shi, E. Manduchi, M. Civelek, and P. F. Davies. 2010. 'MicroRNA-10a regulation of proinflammatory phenotype in athero-susceptible endothelium *in vivo* and *in vitro*', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 13450-5.
- Favero, G., C. Paganelli, B. Buffoli, L. F. Rodella, and R. Rezzani. 2014. 'Endothelium and its alterations in cardiovascular diseases: life style intervention', *Biomed Res Int*, 2014: 801896.
- Feig, J. E., S. Parathath, J. X. Rong, S. L. Mick, Y. Vengrenyuk, L. Grauer, S. G. Young, and E. A. Fisher. 2011. 'Reversal of hyperlipidemia with a genetic switch favorably affects the content and inflammatory state of macrophages in atherosclerotic plaques', *Circulation*, 123: 989-98.
- Feig, J. E., J. X. Rong, R. Shamir, M. Sanson, Y. Vengrenyuk, J. Liu, K. Rayner, K. Moore, M. Garabedian, and E. A. Fisher. 2011. 'HDL promotes rapid atherosclerosis regression in mice and alters inflammatory properties of plaque monocyte-derived cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 7166-71.
- Feinberg, M. W., and K. J. Moore. 2016. 'MicroRNA regulation of atherosclerosis', *Circ Res*, 118: 703-20.
- Félétou, M. 2011. *The Endothelium* (Morgan & Claypool Life Sciences).

- Félix-Redondo, F. J., M. Grau, and D. Fernández-Bergés. 2013. 'Cholesterol and Cardiovascular Disease in the Elderly. Facts and Gaps', *Aging Dis*, 4: 154-69.
- Ferrara, N. 2011. 'From the discovery of vascular endothelial growth factor to the introduction of avastin in clinical trials - an interview with Napoleone Ferrara by Domenico Ribatti', *Int J Dev Biol*, 55: 383-8.
- Ferrara, Napoleone. 2009. 'Vascular Endothelial Growth Factor', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 29: 789-91.
- Ferrario, C. M. 2006. 'Role of angiotensin II in cardiovascular disease therapeutic implications of more than a century of research', *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 7: 3-14.
- Fichtlscherer, S., S. De Rosa, H. Fox, T. Schwietz, A. Fischer, C. Liebetrau, M. Weber, C. W. Hamm, T. Roxel, M. Müller-Ardogan, A. Bonauer, A. M. Zeiher, and S. Dimmeler. 2010. 'Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease', *Circ Res*, 107: 677-84.
- Finegold, J. A., P. Asaria, and D. P. Francis. 2013. 'Mortality from ischaemic heart disease by country, region, and age: Statistics from World Health Organisation and United Nations()', *Int J Cardiol*, 168: 934-45.
- Fish, J. E., M. M. Santoro, S. U. Morton, S. Yu, R. F. Yeh, J. D. Wythe, K. N. Ivey, B. G. Bruneau, D. Y. Stainier, and D. Srivastava. 2008. 'miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity', *Dev Cell*, 15: 272-84.
- Fleissner, F., V. Jazbutyte, J. Fiedler, S. K. Gupta, X. Yin, Q. Xu, P. Galuppo, S. Kneitz, M. Mayr, G. Ertl, J. Bauersachs, and T. Thum. 2010. 'Short communication: asymmetric dimethylarginine impairs angiogenic progenitor cell function in patients with coronary artery disease through a microRNA-21-dependent mechanism', *Circ Res*, 107: 138-43.
- Forstermann, U., and T. Munzel. 2006. 'Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace', *Circulation*, 113: 1708-14.
- Forstermann, U., and W. C. Sessa. 2012. 'Nitric oxide synthases: regulation and function', *Eur Heart J*, 33: 829-37, 37a-37d.
- Frame, M. C. 2002. 'Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour', *Biochim Biophys Acta*, 1602: 114-30.
- Fridlender, Z. G., J. Sun, S. Kim, V. Kapoor, G. Cheng, L. Ling, G. S. Worthen, and S. M. Albelda. 2009. 'Polarization of Tumor-Associated Neutrophil (TAN) Phenotype by TGF- β : "N1" versus "N2" TAN', *Cancer Cell*, 16: 183-94.
- Friedländer, M. R., E. Lizano, A. J. S. Houben, D. Bezdan, M. Báñez-Coronel, G. Kudla, E. Mateu-Huertas, B. Kagerbauer, J. González, K. C. Chen, E. M. LeProust, E. Martí, and X. Estivill. 2014. 'Evidence for the biogenesis of more than 1,000 novel human microRNAs', *Genome Biol*, 15: R57.
- Frostegard, J., A. K. Ulfgren, P. Nyberg, U. Hedin, J. Swedenborg, U. Andersson, and G. K. Hansson. 1999. 'Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines', *Atherosclerosis*, 145: 33-43.
- Fukumura, D., T. Gohongi, A. Kadambi, Y. Izumi, J. Ang, C. O. Yun, D. G. Buerk, P. L. Huang, and R. K. Jain. 2001. 'Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 2604-9.
- Fukumura, D., and R. K. Jain. 1998. 'Role of nitric oxide in angiogenesis and microcirculation in tumors', *Cancer Metastasis Rev*, 17: 77-89.

- Fulton, D., J. E. Church, L. Ruan, C. Li, S. G. Sood, B. E. Kemp, I. G. Jennings, and R. C. Venema. 2005. 'Src kinase activates endothelial nitric-oxide synthase by phosphorylating Tyr-83', *J Biol Chem*, 280: 35943-52.
- Fulzele, Sadanand, Ahmed El-Sherbini, Saif Ahmad, Rajnikumar Sangani, Suraporn Matragoon, Azza El-Remessy, Reshmitha Radhakrishnan, and Gregory I. Liou. 2015. 'MicroRNA-146b-3p Regulates Retinal Inflammation by Suppressing Adenosine Deaminase-2 in Diabetes', *BioMed Research International*, 2015: 8.
- Furuya, M., M. Nishiyama, Y. Kasuya, S. Kimura, and H. Ishikura. 2005. 'Pathophysiology of Tumor Neovascularization', *Vasc Health Risk Manag*, 1: 277-90.
- Galle, Jan, Thomas Quaschnig, Stefan Seibold, and Christoph Wanner. 2003. 'Endothelial dysfunction and inflammation: What is the link?', *Kidney International*, 63: S45-S49.
- Gardiner, T. A., D. S. Gibson, T. E. de Gooyer, V. F. de la Cruz, D. M. McDonald, and A. W. Stitt. 2005. 'Inhibition of Tumor Necrosis Factor- α Improves Physiological Angiogenesis and Reduces Pathological Neovascularization in Ischemic Retinopathy', *Am J Pathol*, 166: 637-44.
- Gauthier KM, Cepura CJ, Campbell WB. ACE inhibition enhances bradykinin relaxations through nitric oxide and B1 receptor activation in bovine coronary arteries. *Biol Chem*. 2013 Sep;394(9):1205-12.
- Gawaz, M., H. Langer, and A. E. May. 2005. 'Platelets in inflammation and atherogenesis', *J Clin Invest*, 115: 3378-84.
- Genest, J. 2003. 'Lipoprotein disorders and cardiovascular risk', *J Inherit Metab Dis*, 26: 267-87.
- Gengrinovitch, S., S. M. Greenberg, T. Cohen, H. Gitay-Goren, P. Rockwell, T. E. Maione, B. Z. Levi, and G. Neufeld. 1995. 'Platelet factor-4 inhibits the mitogenic activity of VEGF121 and VEGF165 using several concurrent mechanisms', *J Biol Chem*, 270: 15059-65.
- Gerhard, M., M. A. Roddy, S. J. Creager, and M. A. Creager. 1996. 'Aging progressively impairs endothelium-dependent vasodilation in forearm resistance vessels of humans', *Hypertension*, 27: 849-53.
- Getz, Godfrey S., and Catherine A. Reardon. 2012. 'Animal Models of Atherosclerosis', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32: 1104-15.
- Geudens, Ilse, and Holger Gerhardt. 2011. 'Coordinating cell behaviour during blood vessel formation', *Development*, 138: 4569-83.
- Ghose, J., and N. P. Bhattacharyya. 2015. 'Transcriptional regulation of microRNA-100, -146a, and -150 genes by p53 and NFkappaB p65/RelA in mouse striatal STHdh(Q7)/ Hdh(Q7) cells and human cervical carcinoma HeLa cells', *RNA Biol*, 12: 457-77.
- Gianni-Barrera, Roberto, Marianna Trani, Silvia Reginato, and Andrea Banfi. 2011. 'To sprout or to split? VEGF, Notch and vascular morphogenesis', *Biochemical Society Transactions*, 39: 1644-48.
- Gianturco, S. H., M. P. Ramprasad, R. Song, R. Li, M. L. Brown, and W. A. Bradley. 1998. 'Apolipoprotein B-48 or its apolipoprotein B-100 equivalent mediates the binding of triglyceride-rich lipoproteins to their unique human monocyte-macrophage receptor', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18: 968-76.
- Gidlof, O., J. G. Smith, K. Miyazu, P. Gilje, A. Spencer, S. Blomquist, and D. Erlinge. 2013. 'Circulating cardio-enriched microRNAs are associated with long-term prognosis following myocardial infarction', *BMC Cardiovasc Disord*, 13: 12.
- Gimbrone, M. A., Jr., and G. Garcia-Cardena. 2013. 'Vascular endothelium, hemodynamics, and the pathobiology of atherosclerosis', *Cardiovasc Pathol*, 22: 9-15.

- Gimbrone, M. A., Jr., T. Nagel, and J. N. Topper. 1997. 'Biomechanical activation: an emerging paradigm in endothelial adhesion biology', *J Clin Invest*, 99: 1809-13.
- Gingras, Denis, and Richard Béliveau. 2010. 'Emerging concepts in the regulation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase activity', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1803: 142-50.
- Giza, D. E., C. Vasilescu, and G. A. Calin. 2014. 'Key principles of miRNA involvement in human diseases', *Discoveries (Craiova)*, 2: e34-.
- Goedeke, L., N. Rotllan, A. Canfran-Duque, J. F. Aranda, C. M. Ramirez, E. Araldi, C. S. Lin, N. N. Anderson, A. Wagschal, R. de Cabo, J. D. Horton, M. A. Lasuncion, A. M. Naar, Y. Suarez, and C. Fernandez-Hernando. 2015. 'MicroRNA-148a regulates LDL receptor and ABCA1 expression to control circulating lipoprotein levels', *Nat Med*, 21: 1280-9.
- Goldstein, J. L., and M. S. Brown. 1977. 'The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis', *Annu Rev Biochem*, 46: 897-930.
- Goldstein, J. L., Y. K. Ho, S. K. Basu, and M. S. Brown. 1979. 'Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76: 333-7.
- Goodwill, A. G., P. A. Stapleton, M. E. James, A. C. D'Audiffret, and J. C. Frisbee. 2008. 'Increased arachidonic acid-induced thromboxane generation impairs skeletal muscle arteriolar dilation with genetic dyslipidemia', *Microcirculation*, 15: 621-31.
- Gordon, D. J., and B. M. Rifkind. 1989. 'High-density lipoprotein--the clinical implications of recent studies', *N Engl J Med*, 321: 1311-6.
- Gordon, S., and F. O. Martinez. 2010. 'Alternative activation of macrophages: mechanism and functions', *Immunity*, 32: 593-604.
- Gradinaru, Daniela, Claudia Borsa, Cristina Ionescu, and Gabriel Ioan Prada. 2015. 'Oxidized LDL and NO synthesis—Biomarkers of endothelial dysfunction and ageing', *Mechanisms of Ageing and Development*, 151: 101-13.
- Grainger, D. J. 2004. 'Transforming growth factor beta and atherosclerosis: so far, so good for the protective cytokine hypothesis', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24: 399-404.
- Grainger, David J. 2007. 'TGF- β and atherosclerosis in man', *Cardiovascular Research*, 74: 213-22.
- Grainger, David J., Paul R. Kemp, James C. Metcalfe, Alexander C. Liu, Richard M. Lawn, Norman R. Williams, Andrew A. Grace, Peter M. Schofield, and Anoop Chauhan. 1995. 'The serum concentration of active transforming growth factor-[beta] is severely depressed in advanced atherosclerosis', *Nat Med*, 1: 74-79.
- Greenaway, J., J. Lawler, R. Moorehead, P. Bornstein, J. Lamarre, and J. Petrik. 2007. 'Thrombospondin-1 inhibits VEGF levels in the ovary directly by binding and internalization via the low density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1)', *J Cell Physiol*, 210: 807-18.
- Griendling, K. K., C. A. Minieri, J. D. Ollerenshaw, and R. W. Alexander. 1994. 'Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells', *Circ Res*, 74: 1141-8.

- Groleau, J., S. Dussault, P. Haddad, J. Turgeon, C. Menard, J. S. Chan, and A. Rivard. 2010. 'Essential role of copper-zinc superoxide dismutase for ischemia-induced neovascularization via modulation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30: 2173-81.
- Groleau, J., S. Dussault, J. Turgeon, P. Haddad, and A. Rivard. 2011. 'Accelerated Vascular Aging in CuZnSOD-Deficient Mice: Impact on EPC Function and Reparative Neovascularization', *PLoS One*, 6: e23308.
- Grover-Paez, F., and A. B. Zavalza-Gomez. 2009. 'Endothelial dysfunction and cardiovascular risk factors', *Diabetes Res Clin Pract*, 84: 1-10.
- Gu, Y., X. Tang, L. Xie, G. Meng, and Y. Ji. 2016. 'Aliskiren improves endothelium-dependent relaxation of thoracic aorta by activating PI3K/Akt/eNOS signal pathway in SHR', *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 43: 450-8.
- Gugliucci, A. 2008. 'Antithrombin activity is inhibited by acrolein and homocysteine thiolactone: Protection by cysteine', *Life Sci*, 82: 413-8.
- Gunaratne, P. H., C. Coarfa, B. Soibam, and A. Tandon. 2012. 'miRNA data analysis: next-gen sequencing', *Methods Mol Biol*, 822: 273-88.
- Gunaratne, P. H., C. J. Creighton, M. Watson, and J. B. Tennakoon. 2010. 'Large-scale integration of MicroRNA and gene expression data for identification of enriched microRNA-mRNA associations in biological systems', *Methods Mol Biol*, 667: 297-315.
- Gupta, S. K., P. G. Lysko, K. Pillarisetti, E. Ohlstein, and J. M. Stadel. 1998. 'Chemokine receptors in human endothelial cells. Functional expression of CXCR4 and its transcriptional regulation by inflammatory cytokines', *J Biol Chem*, 273: 4282-7.
- Habib, G. B., J. Heibig, S. A. Forman, B. G. Brown, R. Roberts, M. L. Terrin, and R. Bolli. 1991. 'Influence of coronary collateral vessels on myocardial infarct size in humans. Results of phase I thrombolysis in myocardial infarction (TIMI) trial. The TIMI Investigators', *Circulation*, 83: 739-46.
- Habibi, F., F. Ghadiri Soufi, R. Ghiasi, A. M. Khamaneh, and M. R. Alipour. 2016. 'Alteration in Inflammation-related miR-146a Expression in NF-KB Signaling Pathway in Diabetic Rat Hippocampus', *Adv Pharm Bull*, 6: 99-103.
- Haddad, P., S. Dussault, J. Groleau, J. Turgeon, F. Maingrette, and A. Rivard. 2011. 'Nox2-derived reactive oxygen species contribute to hypercholesterolemia-induced inhibition of neovascularization: effects on endothelial progenitor cells and mature endothelial cells', *Atherosclerosis*, 217: 340-9.
- Haddad, P., S. Dussault, J. Groleau, J. Turgeon, S. E. Michaud, C. Menard, G. Perez, F. Maingrette, and A. Rivard. 2009. 'Nox2-Containing NADPH Oxidase Deficiency Confers Protection From Hindlimb Ischemia in Conditions of Increased Oxidative Stress', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 29: 1522-28.
- Hadi, H. A., C. S. Carr, and J. Al Suwaidi. 2005. 'Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome', *Vasc Health Risk Manag*, 1: 183-98.
- Hanahan, D., and J. Folkman. 1996. 'Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis', *Cell*, 86: 353-64.
- Hanna, R. N., I. Shaked, H. G. Hubbeling, J. A. Punt, R. Wu, E. Herrley, C. Zaugg, H. Pei, F. Geissmann, K. Ley, and C. C. Hedrick. 2012. 'NR4A1 (Nur77) deletion polarizes macrophages toward an inflammatory phenotype and increases atherosclerosis', *Circ Res*, 110: 416-27.
- Hansson, G. K. 2001. 'Immune mechanisms in atherosclerosis', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21: 1876-90.

- Hansson, G. K., and P. Libby. 2006. 'The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword', *Nat Rev Immunol*, 6: 508-19.
- Hariri, R. J., D. P. Hajjar, D. Coletti, D. R. Alonso, M. E. Weksler, and E. Rabellino. 1988. 'Aging and arteriosclerosis. Cell cycle kinetics of young and old arterial smooth muscle cells', *Am J Pathol*, 131: 132-6.
- He, M., Y. Liu, X. Wang, M. Q. Zhang, G. Hannon, and Z. J. Huang. 2012. 'Cell-type based analysis of microRNA profiles in the mouse brain', *Neuron*, 73: 35-48.
- He, Q. W., Q. Li, H. J. Jin, F. Zhi, B. Suraj, Y. Y. Zhu, Y. P. Xia, L. Mao, X. L. Chen, and B. Hu. 2016. 'MiR-150 Regulates Poststroke Cerebral Angiogenesis via Vascular Endothelial Growth Factor in Rats', *CNS Neurosci Ther*, 22: 507-17.
- He, Y., X. Jiang, and J. Chen. 2014. 'The role of miR-150 in normal and malignant hematopoiesis', *Oncogene*, 33: 3887-93.
- Heinrich, E. M., and S. Dimmeler. 2012. 'MicroRNAs and stem cells: control of pluripotency, reprogramming, and lineage commitment', *Circ Res*, 110: 1014-22.
- Heissig, B., K. Hattori, S. Dias, M. Friedrich, B. Ferris, N. R. Hackett, R. G. Crystal, P. Besmer, D. Lyden, M. A. Moore, Z. Werb, and S. Rafii. 2002. 'Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand', *Cell*, 109: 625-37.
- Hellström, M., L. K. Phng, and H. Gerhardt. 2007. 'VEGF and Notch Signaling: The Yin and Yang of Angiogenic Sprouting', *Cell Adh Migr*, 1: 133-6.
- Henry, P. D., O. A. Cabello, and C. H. Chen. 1995. 'Hypercholesterolemia and endothelial dysfunction', *Curr Opin Lipidol*, 6: 190-5.
- Herrmann, M., S. Verrier, and M. Alini. 2015. 'Strategies to Stimulate Mobilization and Homing of Endogenous Stem and Progenitor Cells for Bone Tissue Repair', *Front Bioeng Biotechnol*, 3.
- Hersberger, Martin, and Arnold von Eckardstein. 2003. 'Low High-Density Lipoprotein Cholesterol', *Drugs*, 63: 1907-45.
- Higashi, Y., K. Noma, M. Yoshizumi, and Y. Kihara. 2009. 'Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases', *Circ J*, 73: 411-8.
- Higgins RD, Yan Y, Geng Y, Sharma J, Barr SM. Captopril and vascular endothelial growth factor in a mouse model of retinopathy. *Curr Eye Res*. 2003 Aug;27(2):123-9.
- Hirschi, Karen K., David A. Ingram, and Mervin C. Yoder. 2008. 'Assessing Identity, Phenotype, and Fate of Endothelial Progenitor Cells', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 28: 1584-95.
- Ho, E., K. Karimi Galoughi, C. C. Liu, R. Bhindi, and G. A. Figtree. 2013. 'Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice', *Redox Biol*, 1: 483-91.
- Hobson, B., and J. Denekamp. 1984. 'Endothelial proliferation in tumours and normal tissues: continuous labelling studies', *Br J Cancer*, 49: 405-13.
- Hoeben, Ann, Bart Landuyt, Martin S. Highley, Hans Wildiers, Allan T. Van Oosterom, and Ernst A. De Bruijn. 2004b. 'Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis', *Pharmacological Reviews*, 56: 549-80.
- Hoesel, B., and J. A. Schmid. 2013. 'The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer', *Mol Cancer*, 12: 86.

- Hollander, W. 1976. 'Role of hypertension in atherosclerosis and cardiovascular disease', *Am J Cardiol*, 38: 786-800.
- Holtz, J., and R. M. Goetz. 1994. 'Vascular renin-angiotensin-system, endothelial function and atherosclerosis?', *Basic Res Cardiol*, 89 Suppl 1: 71-86.
- Hong, I. S. 2016. 'Stimulatory versus suppressive effects of GM-CSF on tumor progression in multiple cancer types', *Exp Mol Med*, 48: e242-.
- Hong, Y., D. Eleftheriou, N. J. Klein, and P. A. Brogan. 2015. 'Impaired function of endothelial progenitor cells in children with primary systemic vasculitis', *Arthritis Res Ther*, 17.
- Huang, F., M. L. Li, Z. F. Fang, X. Q. Hu, Q. M. Liu, Z. J. Liu, L. Tang, Y. S. Zhao, and S. H. Zhou. 2013. 'Overexpression of MicroRNA-1 improves the efficacy of mesenchymal stem cell transplantation after myocardial infarction', *Cardiology*, 125: 18-30.
- Huang, P. H., J. W. Chen, and S. J. Lin. 2014a. 'Effects of Cardiovascular Risk Factors on Endothelial Progenitor Cell', *Acta Cardiol Sin*, 30: 375-81.
- Huang, W. Y., L. Fu, C. Y. Li, L. P. Xu, L. X. Zhang, and W. M. Zhang. 2017. 'Quercetin, Hyperin, and Chlorogenic Acid Improve Endothelial Function by Antioxidant, Antiinflammatory, and ACE Inhibitory Effects', *J Food Sci*, 82: 1239-46.
- Huang, Y., X. J. Shen, Q. Zou, S. P. Wang, S. M. Tang, and G. Z. Zhang. 2011. 'Biological functions of microRNAs: a review', *J Physiol Biochem*, 67: 129-39.
- Hulsmans, M., E. Van Dooren, C. Mathieu, and P. Holvoet. 2012a. 'Decrease of miR-146b-5p in monocytes during obesity is associated with loss of the anti-inflammatory but not insulin signaling action of adiponectin', *PLoS One*, 7: e32794.
- Hung, M. J., Y. C. Kao, C. T. Mao, T. H. Chen, and W. S. Chen. 2016. 'Aliskiren attenuates the effects of interleukin-6 on endothelial nitric oxide synthase and caveolin-1 in human aortic endothelial cells', *Nitric Oxide*, 61: 45-54.
- Hunt, Michelle A., Margaret J. Currie, Bridget A. Robinson, and Gabi U. Dachs. 2010. 'Optimizing Transfection of Primary Human Umbilical Vein Endothelial Cells Using Commercially Available Chemical Transfection Reagents', *Journal of Biomolecular Techniques : JBT*, 21: 66-72.
- Husain, K., W. Hernandez, R. A. Ansari, and L. Ferder. 2015. 'Inflammation, oxidative stress and renin angiotensin system in atherosclerosis', *World J Biol Chem*, 6: 209-17.
- Hynes, R. O. 2009. 'The extracellular matrix: not just pretty fibrils', *Science*, 326: 1216-9.
- Ichim, T. E., M. Li, H. Qian, I. A. Popov, K. Rycerz, X. Zheng, D. White, R. Zhong, and W. P. Min. 2004. 'RNA interference: a potent tool for gene-specific therapeutics', *Am J Transplant*, 4: 1227-36.
- Imanishi, T., T. Hano, Y. Matsuo, and I. Nishio. 2003. 'Oxidized low-density lipoprotein inhibits vascular endothelial growth factor-induced endothelial progenitor cell differentiation', *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 30: 665-70.
- Imanishi, T., T. Hano, and I. Nishio. 2005. 'Angiotensin II accelerates endothelial progenitor cell senescence through induction of oxidative stress', *J Hypertens*, 23: 97-104.
- Imanishi, T., T. Hano, T. Sawamura, and I. Nishio. 2004. 'Oxidized low-density lipoprotein induces endothelial progenitor cell senescence, leading to cellular dysfunction', *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 31: 407-13.

- Imanishi, T., H. Tsujioka, H. Ikejima, A. Kuroi, S. Takarada, H. Kitabata, T. Tanimoto, Y. Muragaki, S. Mochizuki, M. Goto, K. Yoshida, and T. Akasaka. 2008. 'Renin inhibitor aliskiren improves impaired nitric oxide bioavailability and protects against atherosclerotic changes', *Hypertension*, 52: 563-72.
- Ingram, D. A., T. R. Krier, L. E. Mead, C. McGuire, D. N. Prater, J. Bhavsar, M. R. Saadatizadeh, K. Bijangi-Vishehsaraei, F. Li, M. C. Yoder, and L. S. Haneline. 2007. 'Clonogenic endothelial progenitor cells are sensitive to oxidative stress', *Stem Cells*, 25: 297-304.
- Irby, R. B., and T. J. Yeatman. 2000. 'Role of Src expression and activation in human cancer', *Oncogene*, 19: 5636-42.
- Ischenko, I., M. Guba, M. Yezhelyev, A. Papyan, G. Schmid, T. Green, M. Fennell, K. W. Jauch, and C. J. Bruns. 2007. 'Effect of Src kinase inhibition on metastasis and tumor angiogenesis in human pancreatic cancer', *Angiogenesis*, 10: 167-82.
- Ishihara K, Kamata M, Hayashi I, Yamashina S, Majima M. Roles of bradykinin in vascular permeability and angiogenesis in solid tumor. *Int Immunopharmacol*. 2002 Mar;2(4):499-509.
- Issan, Y., E. Hochhauser, A. Guo, K. H. Gotlinger, R. Kornowski, D. Leshem-Lev, E. Lev, E. Porat, E. Snir, C. I. Thompson, N. G. Abraham, and M. Laniado-Schwartzman. 2013. 'Elevated level of pro-inflammatory eicosanoids and EPC dysfunction in diabetic patients with cardiac ischemia', *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 0: 15-21.
- Ito, W. D., M. Arras, D. Scholz, B. Winkler, P. Htun, and W. Schaper. 1997. 'Angiogenesis but not collateral growth is associated with ischemia after femoral artery occlusion', *Am J Physiol*, 273: H1255-65.
- Ivanova, V. M., S. I. Kostin, I. M. Popovich, N. V. Chebanu, V. A. Kobets, and M. I. Popovich. 2010. '[Qualitative and quantitative changes of circulating in blood endotheliocyte precursor cells in patients with hypercholesterolemia]', *Kardiologija*, 50: 27-31.
- Jain, M., V. Bhosale, D. Tripathi, H. Singh, N. Pal, K. Hanif, and K. Jagavelu. 2017. 'Antihypertensive Drugs Aliskiren, Nebivolol, and Olmesartan Reduce Hypertension by Reducing Endothelial Microparticles and Regulating Angiogenesis', *J Cardiovasc Pharmacol*, 70: 176-83.
- Jakob, Philipp, and Ulf Landmesser. 2012. 'Role of microRNAs in stem/progenitor cells and cardiovascular repair', *Cardiovascular Research*, 93: 614-22.
- Jang, James J., Hoai-Ky V. Ho, Helen H. Kwan, Luis F. Fajardo, and John P. Cooke. 2000. 'Angiogenesis Is Impaired by Hypercholesterolemia', *Role of Asymmetric Dimethylarginine*, 102: 1414-19.
- Jawien, J. 2012. 'The role of an experimental model of atherosclerosis: apoE-knockout mice in developing new drugs against atherogenesis', *Curr Pharm Biotechnol*, 13: 2435-9.
- Ji, X., R. Takahashi, Y. Hiura, G. Hirokawa, Y. Fukushima, and N. Iwai. 2009. 'Plasma miR-208 as a biomarker of myocardial injury', *Clin Chem*, 55: 1944-9.
- Jiang, B. H., J. Z. Zheng, M. Aoki, and P. K. Vogt. 2000. 'Phosphatidylinositol 3-kinase signaling mediates angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor in endothelial cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 1749-53.
- Jiang, W., J. Liu, Y. Dai, N. Zhou, C. Ji, and X. Li. 2015. 'MiR-146b attenuates high-fat diet-induced non-alcoholic steatohepatitis in mice', *J Gastroenterol Hepatol*, 30: 933-43.

- Jimenez-Rosales, A., A. Amaya-Chavez, M. V. Dominguez Garcia, E. Camarillo-Romero, G. G. Huitron Bravo, and A. M. Cruz. 2013. 'Association of inflammatory and oxidative stress biomarkers in subjects with cardiovascular risk', *Am J Ther*, 20: 422-31.
- Jin, H., A. Aiyer, J. Su, P. Borgstrom, D. Stupack, M. Friedlander, and J. Varner. 2006. 'A homing mechanism for bone', *J Clin Invest*, 116: 652-62.
- Johnson, K. E., and T. A. Wilgus. 2014. 'Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in the Regulation of Cutaneous Wound Repair', *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 3: 647-61.
- Josko, J., and M. Mazurek. 2004. 'Transcription factors having impact on vascular endothelial growth factor (VEGF) gene expression in angiogenesis', *Med Sci Monit*, 10: RA89-98.
- Judkins, C. P., H. Diep, B. R. Broughton, A. E. Mast, E. U. Hooker, A. A. Miller, S. Selemidis, G. J. Dusting, C. G. Sobey, and G. R. Drummond. 2010. 'Direct evidence of a role for Nox2 in superoxide production, reduced nitric oxide bioavailability, and early atherosclerotic plaque formation in ApoE^{-/-} mice', *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 298: H24-32.
- Jujo, K., M. Ii, and D. W. Losordo. 2008. 'Endothelial progenitor cells in neovascularization of infarcted myocardium', *J Mol Cell Cardiol*, 45: 530-44.
- Kalka, C., H. Masuda, T. Takahashi, W. M. Kalka-Moll, M. Silver, M. Kearney, T. Li, J. M. Isner, and T. Asahara. 2000. 'Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 3422-7.
- Kamiya, A., and T. Togawa. 1980. 'Adaptive regulation of wall shear stress to flow change in the canine carotid artery', *Am J Physiol*, 239: H14-21.
- Kanazawa H, Yoshikawa J. Elevated oxidative stress and reciprocal reduction of vascular endothelial growth factor levels with severity of COPD. *Chest*. 2005 Nov;128(5):3191-7.
- Kang YS, Park YG, Kim BK, Han SY, Jee YH, et al. Angiotensin II stimulates the synthesis of vascular endothelial growth factor through the p38 mitogen activated protein kinase pathway in cultured mouse podocytes. *J Mol Endocrinol*. 2006 Apr;36(2):377-88.
- Kannel, W. B. 1995. 'Framingham study insights into hypertensive risk of cardiovascular disease', *Hypertens Res*, 18: 181-96.
- Kannel, W. B., and R. S. Vasan. 2009. 'Is Age Really a Non-modifiable Cardiovascular Risk Factor?', *Am J Cardiol*, 104: 1307-10.
- Kapinas, Kristina, and Anne Delany. 2011. *MicroRNA biogenesis and regulation of bone remodeling*.
- Kapourchali, F. R., G. Surendiran, L. Chen, E. Uitz, B. Bahadori, and M. H. Moghadasian. 2014. 'Animal models of atherosclerosis', *World J Clin Cases*, 2: 126-32.
- Kapur, N. K., and K. Musunuru. 2008. 'Clinical efficacy and safety of statins in managing cardiovascular risk', *Vasc Health Risk Manag*, 4: 341-53.
- Karolina, D. S., S. Tavintharan, A. Armugam, S. Sepramaniam, S. L. Pek, M. T. Wong, S. C. Lim, C. F. Sum, and K. Jeyaseelan. 2012. 'Circulating miRNA profiles in patients with metabolic syndrome', *J Clin Endocrinol Metab*, 97: E2271-6.
- Katrtsis, D. G., P. A. Sotiropoulou, E. Karvouni, I. Karabinos, S. Korovesis, S. A. Perez, E. M. Vouridis, and M. Papamichail. 2005. 'Transcoronary transplantation of autologous mesenchymal stem cells and endothelial progenitors into infarcted human myocardium', *Catheter Cardiovasc Interv*, 65: 321-9.

- Kasuno K, Takabuchi S, Fukuda K, Kizaka-Kondoh S, Yodoi J, et al. Nitric oxide induces hypoxia-inducible factor 1 activation that is dependent on MAPK and phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *J Biol Chem*. 2004 Jan 23;279(4):2550-8.
- Kemp JR, Unal H, Desnoyer R, Yue H, Bhatnagar A, et al. Angiotensin II-regulated microRNA 483-3p directly targets multiple components of the renin-angiotensin system. *J Mol Cell Cardiol*. 2014 Oct;75:25-39.
- Kierszenbaum, A.L., P. Validire-Charpy, and P. Validire. 2006. *Histologie et biologie cellulaire: Une introduction à l'anatomie pathologique* (De Boeck Supérieur).
- Kim, J., I. S. Cheon, Y. J. Won, H. J. Na, Y. M. Kim, and J. Choe. 2003. 'IL-4 inhibits cell cycle progression of human umbilical vein endothelial cells by affecting p53, p21(Waf1), cyclin D1, and cyclin E expression', *Mol Cells*, 16: 92-6.
- Kim, J., H. Yoon, C. M. Ramirez, S. M. Lee, H. S. Hoe, C. Fernandez-Hernando, and J. Kim. 2012. 'MiR-106b impairs cholesterol efflux and increases Abeta levels by repressing ABCA1 expression', *Exp Neurol*, 235: 476-83.
- Kim, Y. W., and T. V. Byzova. 2014. 'Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease', *Blood*, 123: 625-31.
- Kimura H, Esumi H. Reciprocal regulation between nitric oxide and vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Biochim Pol*. 2003;50(1):49-59.
- Kinnaird, T., E. Stabile, M.S. Burnett, C.W. Lee, S. Barr, S. Fuchs, and S.E. Epstein. 2004. 'Marrow-Derived Stromal Cells Express Genes Encoding a Broad Spectrum of Arteriogenic Cytokines and Promote *In Vitro* and *In vivo* Arteriogenesis Through Paracrine Mechanisms', *Circulation Research*, 94: 678-85.
- Kinnaird, Tim, Eugenio Stabile, Mary Susan Burnett, and Stephen E. Epstein. 2004. 'Bone Marrow-Derived Cells for Enhancing Collateral Development', *Mechanisms, Animal Data, and Initial Clinical Experiences*, 95: 354-63.
- Koch, S., and L. Claesson-Welsh. 2012. 'Signal Transduction by Vascular Endothelial Growth Factor Receptors', *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2.
- Koenig, W., M. Karakas, A. Zierer, C. Herder, J. Baumert, C. Meisinger, and B. Thorand. 2011. 'Oxidized LDL and the risk of coronary heart disease: results from the MONICA/KORA Augsburg Study', *Clin Chem*, 57: 1196-200.
- Koid, S. S., J. Ziogas, and D. J. Campbell. 2014. 'Aliskiren reduces myocardial ischemia-reperfusion injury by a bradykinin B2 receptor- and angiotensin AT2 receptor-mediated mechanism', *Hypertension*, 63: 768-73.
- Kovacic, Sanja, and Mirjana Bakran. 2012. 'Genetic Susceptibility to Atherosclerosis', *Stroke Research and Treatment*, 2012: 5.
- Kovanen, P. T. 2009. 'Mast cells in atherogenesis: actions and reactions', *Curr Atheroscler Rep*, 11: 214-9.
- Krankel, N., R. G. Katare, M. Siragusa, L. S. Barcelos, P. Campagnolo, G. Mangialardi, O. Fortunato, G. Spinetti, N. Tran, K. Zacharowski, W. Wojakowski, I. Mroz, A. Herman, J. E. Manning Fox, P. E. MacDonald, J. P. Schanstra, J. L. Bascands, R. Ascione, G. Angelini, C. Emanuelli, and P. Madeddu. 2008. 'Role of kinin B2 receptor signaling in the recruitment of circulating progenitor cells with neovascularization potential', *Circ Res*, 103: 1335-43.
- Krock, B. L., N. Skuli, and M. C. Simon. 2011. 'Hypoxia-Induced Angiogenesis: Good and Evil', *Genes Cancer*, 2: 1117-33.

- Kucia, M., R. Reza, K. Miekus, J. Wanzeck, W. Wojakowski, A. Janowska-Wieczorek, J. Ratajczak, and M. Z. Ratajczak. 2005. 'Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis', *Stem Cells*, 23: 879-94.
- Kuehbachner, A., C. Urbich, A. M. Zeiher, and S. Dimmeler. 2007. 'Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis', *Circ Res*, 101: 59-68.
- Kuhnert, F., M. R. Mancuso, J. Hampton, K. Stankunas, T. Asano, C. Z. Chen, and C. J. Kuo. 2008. 'Attribution of vascular phenotypes of the murine *Egfl7* locus to the microRNA miR-126', *Development*, 135: 3989-93.
- Kunjathoor, V. V., M. Febbraio, E. A. Podrez, K. J. Moore, L. Andersson, S. Koehn, J. S. Rhee, R. Silverstein, H. F. Hoff, and M. W. Freeman. 2002. 'Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages', *J Biol Chem*, 277: 49982-8.
- Kyrychenko, S., V. Kyrychenko, M. A. Badr, Y. Ikeda, J. Sadoshima, and N. Shirokova. 2015. 'Pivotal role of miR-448 in the development of ROS-induced cardiomyopathy', *Cardiovasc Res*, 108: 324-34.
- Lam, Y. T. 2016. 'Critical Roles of Reactive Oxygen Species in Age-Related Impairment in Ischemia-Induced Neovascularization by Regulating Stem and Progenitor Cell Function', *Oxid Med Cell Longev*, 2016.
- Landmesser, U., S. Spiekermann, S. Dikalov, H. Tatge, R. Wilke, C. Kohler, D. G. Harrison, B. Hornig, and H. Drexler. 2002. 'Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: role of xanthine-oxidase and extracellular superoxide dismutase', *Circulation*, 106: 3073-8.
- Landskroner-Eiger, S., I. Moneke, and W. C. Sessa. 2013. 'miRNAs as Modulators of Angiogenesis', *Cold Spring Harb Perspect Med*, 3.
- Landskroner-Eiger, S., C. Qiu, P. Perrotta, M. Siragusa, M. Y. Lee, V. Ulrich, A. K. Luciano, Z. W. Zhuang, F. Corti, M. Simons, R. L. Montgomery, D. Wu, J. Yu, and W. C. Sessa. 2015. 'Endothelial miR-17-92 cluster negatively regulates arteriogenesis via miRNA-19 repression of WNT signaling', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112: 12812-7.
- Lapidot, T. 2001. 'Mechanism of human stem cell migration and repopulation of NOD/SCID and B2mnull NOD/SCID mice. The role of SDF-1/CXCR4 interactions', *Ann N Y Acad Sci*, 938: 83-95.
- Lapidot, T., A. Dar, and O. Kollet. 2005. 'How do stem cells find their way home?', *Blood*, 106: 1901-10.
- Lapidot, T., and I. Petit. 2002. 'Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells', *Exp Hematol*, 30: 973-81.
- Lara-Hernandez, R., P. Lozano-Vilardell, P. Blanes, N. Torreguitart-Mirada, A. Galmes, and J. Besalduch. 2010. 'Safety and efficacy of therapeutic angiogenesis as a novel treatment in patients with critical limb ischemia', *Ann Vasc Surg*, 24: 287-94.
- Laskin, D. L. 2009. 'Macrophages and inflammatory mediators in chemical toxicity: a battle of forces', *Chem Res Toxicol*, 22: 1376-85.
- Lauer, T., P. Kleinbongard, and M. Kelm. 2002. 'Indexes of NO bioavailability in human blood', *News Physiol Sci*, 17: 251-5.
- Lavie, C. J., R. V. Milani, and H. O. Ventura. 2009. 'Obesity and cardiovascular disease: risk factor, paradox, and impact of weight loss', *J Am Coll Cardiol*, 53: 1925-32.
- Lawler, J. 2002. 'Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth', *J Cell Mol Med*, 6: 1-12.

- le Sage, C., R. Nagel, D. A. Egan, M. Schrier, E. Mesman, A. Mangiola, C. Anile, G. Maira, N. Mercatelli, S. A. Ciafre, M. G. Farace, and R. Agami. 2007. 'Regulation of the p27(Kip1) tumor suppressor by miR-221 and miR-222 promotes cancer cell proliferation', *EMBO J*, 26: 3699-708.
- Lee, H. M., T. S. Kim, and E. K. Jo. 2016. 'MiR-146 and miR-125 in the regulation of innate immunity and', *BMB Rep*, 49: 311-8.
- Lee, P. C., A. N. Salyapongse, G. A. Bragdon, L. L. Shears, 2nd, S. C. Watkins, H. D. Edington, and T. R. Billiar. 1999. 'Impaired wound healing and angiogenesis in eNOS-deficient mice', *Am J Physiol*, 277: H1600-8.
- Lee, P. S. S., and K. K. Poh. 2014. 'Endothelial progenitor cells in cardiovascular diseases', *World J Stem Cells*, 6: 355-66.
- Lefevre, J., S. E. Michaud, P. Haddad, S. Dussault, C. Menard, J. Groleau, J. Turgeon, and A. Rivard. 2007. 'Moderate consumption of red wine (cabernet sauvignon) improves ischemia-induced neovascularization in ApoE-deficient mice: effect on endothelial progenitor cells and nitric oxide', *FASEB J*, 21: 3845-52.
- Leitinger, N., and I. G. Schulman. 2013. 'Phenotypic polarization of macrophages in atherosclerosis', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 33: 1120-6.
- Li, D. W., Z. Q. Liu, J. Wei, Y. Liu, and L. S. Hu. 2012. 'Contribution of endothelial progenitor cells to neovascularization (Review)', *Int J Mol Med*, 30: 1000-6.
- Li, H., M. I. Cybulsky, M. A. Gimbrone, Jr., and P. Libby. 1993. 'An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium', *Arterioscler Thromb*, 13: 197-204.
- Li, J., Y. Zhang, Y. Liu, X. Dai, W. Li, X. Cai, Y. Yin, Q. Wang, Y. Xue, C. Wang, D. Li, D. Hou, X. Jiang, J. Zhang, K. Zen, X. Chen, and C. Y. Zhang. 2013. 'Microvesicle-mediated transfer of microRNA-150 from monocytes to endothelial cells promotes angiogenesis', *J Biol Chem*, 288: 23586-96.
- Li, X., and H. Cong. 2009. 'Platelet-derived microparticles and the potential of glycoprotein IIb/IIIa antagonists in treating acute coronary syndrome', *Tex Heart Inst J*, 36: 134-9.
- Li P, Kondo T, Numaguchi Y, Kobayashi K, Aoki M, et al. Role of bradykinin, nitric oxide, and angiotensin II type 2 receptor in imidapril-induced angiogenesis. *Hypertension*. 2008 Feb;51(2):252-8.
- Libby, P. 2002. 'Inflammation in atherosclerosis', *Nature*, 420: 868-74.
- Libby. 2003. 'Vascular biology of atherosclerosis: overview and state of the art', *Am J Cardiol*, 91: 3A-6A.
- Libby. 2012. 'History of Discovery: Inflammation in Atherosclerosis', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32: 2045-51.
- Libby, P., P. M. Ridker, and G. K. Hansson. 2011. 'Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis', *Nature*, 473: 317-25.
- Lin, Chih-Pei, Feng-Yen Lin, Po-Hsun Huang, Yuh-Lien Chen, Wen-Chi Chen, Huey-Yi Chen, Yu-Chuen Huang, Wen-Ling Liao, Huey-Chun Huang, Po-Len Liu, and Yung-Hsiang Chen. 2013c. 'Endothelial Progenitor Cell Dysfunction in Cardiovascular Diseases: Role of Reactive Oxygen Species and Inflammation', *BioMed Research International*, 2013: 845037.
- Lin, Y. C., M. W. Kuo, J. Yu, H. H. Kuo, R. J. Lin, W. L. Lo, and A. L. Yu. 2008. 'c-Myb is an evolutionary conserved miR-150 target and miR-150/c-Myb interaction is important for embryonic development', *Mol Biol Evol*, 25: 2189-98.

- Ling, H., M. Fabbri, and G. A. Calin. 2013. 'MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development', *Nat Rev Drug Discov*, 12: 847-65.
- Liu, C. H., Y. Sun, J. Li, Y. Gong, K. T. Tian, L. P. Evans, P. C. Morss, T. W. Fredrick, N. J. Saba, and J. Chen. 2015. 'Endothelial microRNA-150 is an intrinsic suppressor of pathologic ocular neovascularization', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112: 12163-8.
- Liu, H., X. Qi, L. Ma, D. K. Yao, and L. Wang. 2013. 'Atorvastatin improves endothelial progenitor cell function and reduces pulmonary hypertension in patients with chronic pulmonary heart disease', *Exp Clin Cardiol*, 18: e40-3.
- Liu, Jie, Steven F. Jennings, Weida Tong, and Huixiao Hong. 2011b. 'Next generation sequencing for profiling expression of miRNAs: technical progress and applications in drug development', *Journal of biomedical science and engineering*, 4: 666-76.
- Liu, V. W., and P. L. Huang. 2008. 'Cardiovascular roles of nitric oxide: a review of insights from nitric oxide synthase gene disrupted mice', *Cardiovasc Res*, 77: 19-29.
- Liu, Y., L. Zhao, D. Li, Y. Yin, C. Y. Zhang, J. Li, and Y. Zhang. 2013. 'Microvesicle-delivery miR-150 promotes tumorigenesis by up-regulating VEGF, and the neutralization of miR-150 attenuate tumor development', *Protein Cell*, 4: 932-41.
- Llodra, J., V. Angeli, J. Liu, E. Trogan, E. A. Fisher, and G. J. Randolph. 2004. 'Emigration of monocyte-derived cells from atherosclerotic lesions characterizes regressive, but not progressive, plaques', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 11779-84.
- Lloyd-Jones, D., R. Adams, M. Carnethon, G. De Simone, T. B. Ferguson, K. Flegal, E. Ford, K. Furie, A. Go, K. Greenlund, N. Haase, S. Hailpern, M. Ho, V. Howard, B. Kissela, S. Kittner, D. Lackland, L. Lisabeth, A. Marelli, M. McDermott, J. Meigs, D. Mozaffarian, G. Nichol, C. O'Donnell, V. Roger, W. Rosamond, R. Sacco, P. Sorlie, R. Stafford, J. Steinberger, T. Thom, S. Wasserthiel-Smoller, N. Wong, J. Wylie-Rosett, and Y. Hong. 2009. 'Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee', *Circulation*, 119: e21-181.
- Lo Sasso, Giuseppe, Walter K. Schlage, Stéphanie Boué, Emilija Veljkovic, Manuel C. Peitsch, and Julia Hoeng. 2016. 'The Apoe(-/-) mouse model: a suitable model to study cardiovascular and respiratory diseases in the context of cigarette smoke exposure and harm reduction', *Journal of Translational Medicine*, 14: 146.
- Loffredo, L., F. Martino, R. Carnevale, P. Pignatelli, E. Catasca, L. Perri, C. M. Calabrese, M. M. Palumbo, F. Baratta, M. Del Ben, F. Angelico, and F. Violi. 2012. 'Obesity and hypercholesterolemia are associated with NOX2 generated oxidative stress and arterial dysfunction', *J Pediatr*, 161: 1004-9.
- López, J. A., and A. J. Granados-López. 2017. 'Future directions of extracellular vesicle-associated miRNAs in metastasis', *Ann Transl Med*, 5.
- Losordo, D. W., and S. Dimmeler. 2004a. 'Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease: part 1: angiogenic cytokines', *Circulation*, 109: 2487-91.
- Losordo, D. W., T. D. Henry, C. Davidson, J. Sup Lee, M. A. Costa, T. Bass, F. Mendelsohn, F. D. Fortuin, C. J. Pepine, J. H. Traverse, D. Amrani, B. M. Ewenstein, N. Riedel, K. Story, K. Barker, T. J. Povsic, R. A. Harrington, and R. A. Schatz. 2011. 'Intramyocardial, autologous CD34+ cell therapy for refractory angina', *Circ Res*, 109: 428-36.

- Lovren, F., Y. Pan, A. Quan, K. K. Singh, P. C. Shukla, N. Gupta, B. M. Steer, A. J. Ingram, M. Gupta, M. Al-Omran, H. Teoh, P. A. Marsden, and S. Verma. 2012. 'MicroRNA-145 targeted therapy reduces atherosclerosis', *Circulation*, 126: S81-90.
- Loyer, X., S. Potteaux, A. C. Vion, C. L. Guerin, S. Boulkroun, P. E. Rautou, B. Ramkhelawon, B. Esposito, M. Dalloz, J. L. Paul, P. Julia, J. Maccario, C. M. Boulanger, Z. Mallat, and A. Tedgui. 2014. 'Inhibition of microRNA-92a prevents endothelial dysfunction and atherosclerosis in mice', *Circ Res*, 114: 434-43.
- Lu, H., D. L. Rateri, D. L. Feldman, R. J. Charnigo, Jr., A. Fukamizu, J. Ishida, E. G. Oesterling, L. A. Cassis, and A. Daugherty. 2008. 'Renin inhibition reduces hypercholesterolemia-induced atherosclerosis in mice', *J Clin Invest*, 118: 984-93.
- Lu, M., Q. Lu, Y. Zhang, and G. Tian. 2011. 'ApoB/apoA1 is an effective predictor of coronary heart disease risk in overweight and obesity()', *J Biomed Res*, 25: 266-73.
- Lumbers, E. R. 1995. 'Functions of the renin-angiotensin system during development', *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 22: 499-505.
- Lundberg, J. O., M. T. Gladwin, and E. Weitzberg. 2015. 'Strategies to increase nitric oxide signalling in cardiovascular disease', *Nat Rev Drug Discov*, 14: 623-41.
- Luo, Z., G. Wen, G. Wang, X. Pu, S. Ye, Q. Xu, W. Wang, and Q. Xiao. 2013. 'MicroRNA-200C and -150 play an important role in endothelial cell differentiation and vasculogenesis by targeting transcription repressor ZEB1', *Stem Cells*, 31: 1749-62.
- Lupi, R., S. Del Guerra, M. Bugliani, U. Boggi, F. Mosca, S. Torri, S. Del Prato, and P. Marchetti. 2006. 'The direct effects of the angiotensin-converting enzyme inhibitors, zofenoprilat and enalaprilat, on isolated human pancreatic islets', *Eur J Endocrinol*, 154: 355-61.
- Lusis, A. J. 2000. 'Atherosclerosis', *Nature*, 407: 233-41.
- Lusis, Aldons J., Alan M. Fogelman, and Gregg C. Fonarow. 2004. 'Genetic Basis of Atherosclerosis: Part II', *Clinical Implications*, 110: 2066-71.
- Lutgens, E., D. Lievens, L. Beckers, E. Wijnands, O. Soehnlein, A. Zerneck, T. Seijkens, D. Engel, J. Cleutjens, A. M. Keller, S. H. Naik, L. Boon, H. A. Oufella, Z. Mallat, C. L. Ahonen, R. J. Noelle, M. P. de Winther, M. J. Daemen, E. A. Biessen, and C. Weber. 2010. 'Deficient CD40-TRAF6 signaling in leukocytes prevents atherosclerosis by skewing the immune response toward an antiinflammatory profile', *J Exp Med*, 207: 391-404.
- Lykkesfeldt, J., S. Christen, L. M. Wallock, H. H. Chang, R. A. Jacob, and B. N. Ames. 2000. 'Ascorbate is depleted by smoking and repleted by moderate supplementation: a study in male smokers and nonsmokers with matched dietary antioxidant intakes', *Am J Clin Nutr*, 71: 530-6.
- Lynch, C. M., D. A. Kinzenbaw, X. Chen, S. Zhan, E. Mezzetti, J. Filosa, A. Ergul, J. L. Faulkner, F. M. Faraci, and S. P. Didion. 2013. 'Nox2-derived superoxide contributes to cerebral vascular dysfunction in diet-induced obesity', *Stroke*, 44: 3195-201.
- Ma, F. X., F. Chen, Q. Ren, and Z. C. Han. 2009. 'Lovastatin restores the function of endothelial progenitor cells damaged by oxLDL', *Acta Pharmacol Sin*, 30: 545-52.
- Ma, F. X., and Z. C. Han. 2005. 'Statins, nitric oxide and neovascularization', *Cardiovasc Drug Rev*, 23: 281-92.

- Ma, F. X., B. Zhou, Z. Chen, Q. Ren, S. H. Lu, T. Sawamura, and Z. C. Han. 2006. 'Oxidized low density lipoprotein impairs endothelial progenitor cells by regulation of endothelial nitric oxide synthase', *J Lipid Res*, 47: 1227-37.
- Ma, T. K. W., K. K. H. Kam, B. P. Yan, and Y. Y. Lam. 2010b. 'Renin–angiotensin–aldosterone system blockade for cardiovascular diseases: current status', *Br J Pharmacol*, 160: 1273-92.
- Maas, A., and Y. Appelman. 2010. 'Gender differences in coronary heart disease', *Neth Heart J*, 18: 598-602.
- Maegdefessel, Lars. 2014. *The emerging role of microRNAs in cardiovascular disease*.
- Mahley, R. W., T. L. Innerarity, S. C. Rall, Jr., and K. H. Weisgraber. 1984. 'Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function', *J Lipid Res*, 25: 1277-94.
- Maingrette, F., S. Dussault, W. Dhahri, M. Desjarlais, R. Mathieu, J. Turgeon, P. Haddad, J. Groleau, G. Perez, and A. Rivard. 2015. 'Psychological stress impairs ischemia-induced neovascularization: Protective effect of fluoxetine', *Atherosclerosis*, 241: 569-78.
- Maiolino, Giuseppe, Giacomo Rossitto, Paola Caielli, Valeria Bisogni, Gian Paolo Rossi, Cal, #xf2, and Lorenzo A. . 2013. 'The Role of Oxidized Low-Density Lipoproteins in Atherosclerosis: The Myths and the Facts', *Mediators of Inflammation*, 2013: 13.
- Maitra, U., J. S. Parks, and L. Li. 2009. 'An innate immunity signaling process suppresses macrophage ABCA1 expression through IRAK-1-mediated downregulation of retinoic acid receptor alpha and NFATc2', *Mol Cell Biol*, 29: 5989-97.
- Malek, A. M., S. L. Alper, and S. Izumo. 1999. 'Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis', *JAMA*, 282: 2035-42.
- Mallat, Z., C. Heymes, J. Ohan, E. Faggin, G. Leseche, and A. Tedgui. 1999. 'Expression of interleukin-10 in advanced human atherosclerotic plaques: relation to inducible nitric oxide synthase expression and cell death', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19: 611-6.
- Manea, S. A., A. Constantin, G. Manda, S. Sasson, and A. Manea. 2015. 'Regulation of Nox enzymes expression in vascular pathophysiology: Focusing on transcription factors and epigenetic mechanisms', *Redox Biol*, 5: 358-66.
- Mansego, M. L., J. Redon, S. Martinez-Hervas, J. T. Real, F. Martinez, S. Blesa, V. Gonzalez-Albert, G. T. Saez, R. Carmena, and F. J. Chaves. 2011. 'Different impacts of cardiovascular risk factors on oxidative stress', *Int J Mol Sci*, 12: 6146-63.
- Mantha, S. V., M. Prasad, J. Kalra, and K. Prasad. 1993. 'Antioxidant enzymes in hypercholesterolemia and effects of vitamin E in rabbits', *Atherosclerosis*, 101: 135-44.
- Mantovani, A., C. Garlanda, and M. Locati. 2009. 'Macrophage diversity and polarization in atherosclerosis: a question of balance', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 29: 1419-23.
- Marieb, E., K. Hoehn, R. Lachaine, and L. Moussakova. 2014. *Anatomie et physiologie humaines: Livre + eText + plateforme numérique MonLab - Licence étudiant 60 mois (ERPI)*.
- Mariotti, Massimo, and Jeanette A. M. Maier. 2006. 'Angiogenesis: An Overview.' in Reza Forough (ed.), *New Frontiers in Angiogenesis* (Springer Netherlands: Dordrecht).
- Marquart, T. J., R. M. Allen, D. S. Ory, and A. Baldan. 2010. 'miR-33 links SREBP-2 induction to repression of sterol transporters', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 12228-32.

- Marti, H. H., and W. Risau. 1999. 'Angiogenesis in ischemic disease', *Thromb Haemost*, 82 Suppl 1: 44-52.
- Martini, Giorgia, Francesca Biscaro, Elisa Boscaro, Fiorella Calabrese, Francesca Lunardi, Monica Facco, Carlo Agostini, Francesco Zulian, and Gian Paolo Fadini. 2015. 'Reduced levels of circulating progenitor cells in juvenile idiopathic arthritis are counteracted by anti TNF- α therapy', *BMC Musculoskeletal Disorders*, 16: 103.
- Massberg, S., P. Schaerli, I. Knezevic-Maramica, M. Kollnberger, N. Tubo, E. A. Moseman, I. V. Huff, T. Junt, A. J. Wagers, I. B. Mazo, and U. H. von Andrian. 2007. 'Immunosurveillance by hematopoietic progenitor cells trafficking through blood, lymph, and peripheral tissues', *Cell*, 131: 994-1008.
- Matsui, J., T. Wakabayashi, M. Asada, K. Yoshimatsu, and M. Okada. 2004. 'Stem cell factor/c-kit signaling promotes the survival, migration, and capillary tube formation of human umbilical vein endothelial cells', *J Biol Chem*, 279: 18600-7.
- Matsumoto, S., M. Shimabukuro, D. Fukuda, T. Soeki, K. Yamakawa, H. Masuzaki, and M. Sata. 2014. 'Azilsartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker, restores endothelial function by reducing vascular inflammation and by increasing the phosphorylation ratio Ser(1177)/Thr(497) of endothelial nitric oxide synthase in diabetic mice', *Cardiovasc Diabetol*, 13: 30.
- Matthys, K. E., and H. Bult. 1997. 'Nitric oxide function in atherosclerosis', *Mediators Inflamm*, 6: 3-21.
- Mause, S. F., and C. Weber. 2010. 'Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange', *Circ Res*, 107: 1047-57.
- McLaren, J. E., D. R. Michael, R. C. Salter, T. G. Ashlin, C. J. Calder, A. M. Miller, F. Y. Liew, and D. P. Ramji. 2010. 'IL-33 reduces macrophage foam cell formation', *J Immunol*, 185: 1222-9.
- McManus, M. T. 2003. 'MicroRNAs and cancer', *Semin Cancer Biol*, 13: 253-8.
- McNeill, E., M. J. Crabtree, N. Sahgal, J. Patel, S. Chuaiphichai, A. J. Iqbal, A. B. Hale, D. R. Greaves, and K. M. Channon. 2015. 'Regulation of iNOS function and cellular redox state by macrophage Gch1 reveals specific requirements for tetrahydrobiopterin in NRF2 activation', *Free Radic Biol Med*, 79: 206-16.
- Mehta, J. L., and D. Y. Li. 1998. 'Identification and autoregulation of receptor for OX-LDL in cultured human coronary artery endothelial cells', *Biochem Biophys Res Commun*, 248: 511-4.
- Meir, Karen S., and Eran Leitersdorf. 2004. 'Atherosclerosis in the Apolipoprotein E-Deficient Mouse', *A Decade of Progress*, 24: 1006-14.
- Meisner, Joshua, and Richard Price. 2010. *Spatial and Temporal Coordination of Bone Marrow-Derived Cell Activity During Arteriogenesis: Regulation of the Endogenous Response and Therapeutic Implications*.
- Melo, Sonia A., and Raghu Kalluri. 2012. 'Angiogenesis is controlled by miR-27b associated with endothelial tip cells', *Blood*, 119: 2439-40.
- Memon, R. A., I. Staprans, M. Noor, W. M. Holleran, Y. Uchida, A. H. Moser, K. R. Feingold, and C. Grunfeld. 2000. 'Infection and inflammation induce LDL oxidation *in vivo*', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20: 1536-42.
- Menghini, Rossella, Viviana Casagrande, Marina Cardellini, Eugenio Martelli, Alessandro Terrinoni, Francesca Amati, Mariuca Vasa-Nicotera, Arnaldo Ippoliti, Giuseppe Novelli, Gerry Melino, Renato Lauro, and Massimo Federici. 2009. 'MicroRNA 217 Modulates Endothelial Cell Senescence via Silent Information Regulator 1', *Circulation*, 120: 1524-32.
- Metzler, B., and Q. Xu. 1997. 'The role of mast cells in atherosclerosis', *Int Arch Allergy Immunol*, 114: 10-4.

- Meyrelles, Silvana S., Veronica A. Peotta, Thiago M. C. Pereira, and Elisardo C. Vasquez. 2011. 'Endothelial Dysfunction in the Apolipoprotein E-deficient Mouse: insights into the influence of diet, gender and aging', *Lipids in Health and Disease*, 10: 211-11.
- Mezentsev, Alexandre, Roeland M. H. Merks, Edmond O'Riordan, Jun Chen, Natalia Mendeleev, Michael S. Goligorsky, and Sergey V. Brodsky. 2005. 'Endothelial microparticles affect angiogenesis *in vitro*: role of oxidative stress', *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 289: H1106-H14.
- Michaud, S. E., S. Dussault, J. Groleau, P. Haddad, and A. Rivard. 2006. 'Cigarette smoke exposure impairs VEGF-induced endothelial cell migration: role of NO and reactive oxygen species', *J Mol Cell Cardiol*, 41: 275-84.
- Michaud, S. E., C. Menard, L. G. Guy, G. Gennaro, and A. Rivard. 2003. 'Inhibition of hypoxia-induced angiogenesis by cigarette smoke exposure: impairment of the HIF-1alpha/VEGF pathway', *Faseb J*, 17: 1150-2.
- Mihai, G., J. Varghese, T. Kampfrath, L. Gushchina, L. Hafer, J. Deiuliis, A. Maiseyeu, O. P. Simonetti, B. Lu, and S. Rajagopalan. 2013. 'Aliskiren effect on plaque progression in established atherosclerosis using high resolution 3D MRI (ALPINE): a double-blind placebo-controlled trial', *J Am Heart Assoc*, 2: e004879.
- Miller, A. M., D. Xu, D. L. Asquith, L. Denby, Y. Li, N. Sattar, A. H. Baker, I. B. McInnes, and F. Y. Liew. 2008. 'IL-33 reduces the development of atherosclerosis', *J Exp Med*, 205: 339-46.
- Mills, G. L., and C. E. Taylaur. 1971. 'The distribution and composition of serum lipoproteins in eighteen animals', *Comp Biochem Physiol B*, 40: 489-501.
- Minami, Y., M. Satoh, C. Maesawa, Y. Takahashi, T. Tabuchi, T. Itoh, and M. Nakamura. 2009. 'Effect of atorvastatin on microRNA 221 / 222 expression in endothelial progenitor cells obtained from patients with coronary artery disease', *Eur J Clin Invest*, 39: 359-67.
- Moore, K., F. Sheedy, and E. Fisher. 2013b. 'Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance', *Nat Rev Immunol*, 13: 709-21.
- Morin, Kristen T., and Robert T. Tranquillo. 2013. 'In Vitro Models of Angiogenesis and Vasculogenesis in Fibrin Gel', *Experimental cell research*, 319: 2409-17.
- Morini, M., A. Albini, G. Lorusso, K. Moelling, B. Lu, M. Cilli, S. Ferrini, and D. M. Noonan. 2004. 'Prevention of angiogenesis by naked DNA IL-12 gene transfer: angioprevention by immunogene therapy', *Gene Ther*, 11: 284-91.
- Moriya, H., S. Kobayashi, T. Ohtake, D. Tutumi, Y. Mochida, K. Ishioka, M. Oka, K. Maesato, S. Hidaka, and S. Nomura. 2013. 'Aliskiren, a direct renin inhibitor, improves vascular endothelial function in patients on hemodialysis independent of antihypertensive effect approximately a pilot study approximately', *Kidney Blood Press Res*, 37: 190-8.
- Moulton, K. S. 2001. 'Plaque angiogenesis and atherosclerosis', *Curr Atheroscler Rep*, 3: 225-33.
- Mukundan, L., G. A. Bishop, K. Z. Head, L. Zhang, L. M. Wahl, and J. Suttles. 2005. 'TNF receptor-associated factor 6 is an essential mediator of CD40-activated proinflammatory pathways in monocytes and macrophages', *J Immunol*, 174: 1081-90.
- Muller, William A. 2015. 'The regulation of transendothelial migration: new knowledge and new questions', *Cardiovascular Research*, 107: 310-20.

- Muller-Ehmsen, J., B. Krausgrill, V. Burst, K. Schenk, U. C. Neisen, J. W. Fries, B. K. Fleischmann, J. Hescheler, and R. H. Schwinger. 2006. 'Effective engraftment but poor mid-term persistence of mononuclear and mesenchymal bone marrow cells in acute and chronic rat myocardial infarction', *J Mol Cell Cardiol*, 41: 876-84.
- Munoz-Chapuli, R., A. R. Quesada, and M. Angel Medina. 2004. 'Angiogenesis and signal transduction in endothelial cells', *Cell Mol Life Sci*, 61: 2224-43.
- Munzel, T., I. B. Afanas'ev, A. L. Kleschyov, and D. G. Harrison. 2002. 'Detection of superoxide in vascular tissue', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22: 1761-8.
- Murohara, T. 2003. 'Angiogenesis and vasculogenesis for therapeutic neovascularization', *Nagoya J Med Sci*, 66: 1-7.
- Murohara, T., T. Asahara, M. Silver, C. Bauters, H. Masuda, C. Kalka, M. Kearney, D. Chen, J. F. Symes, M. C. Fishman, P. L. Huang, and J. M. Isner. 1998. 'Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia', *J Clin Invest*, 101: 2567-78.
- Murohara, T., B. Witzendichler, I. Spyridopoulos, T. Asahara, B. Ding, A. Sullivan, D. W. Losordo, and J. M. Isner. 1999. 'Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell migration', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19: 1156-61.
- Naldini, A., and F. Carraro. 2005. 'Role of inflammatory mediators in angiogenesis', *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 4: 3-8.
- Napoli, C., T. Hayashi, F. Cacciatore, A. Casamassimi, C. Casini, M. Al-Omran, and L. J. Ignarro. 2011. 'Endothelial progenitor cells as therapeutic agents in the microcirculation: an update', *Atherosclerosis*, 215: 9-22.
- Nathan, L., and G. Chaudhuri. 1997. 'Estrogens and atherosclerosis', *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 37: 477-515.
- Nauseef, W. M. 2008. 'Biological roles for the NOX family NADPH oxidases', *J Biol Chem*, 283: 16961-5.
- Nemecz, M., N. Alexandru, G. Tanko, and A. Georgescu. 2016. 'Role of MicroRNA in Endothelial Dysfunction and Hypertension', *Curr Hypertens Rep*, 18: 87.
- Neufeld, G., T. Cohen, S. Gengrinovitch, and Z. Poltorak. 1999. 'Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors', *Faseb J*, 13: 9-22.
- Ng, Y. S., and P. A. D'Amore. 2001a. 'Therapeutic angiogenesis for cardiovascular disease', *Curr Control Trials Cardiovasc Med*, 2: 278-85.
- Nguyen G, Muller DN. The biology of the (pro)renin receptor. *J Am Soc Nephrol*. 2010 Jan;21(1):18-23.
- Nicholls, S. J., G. L. Bakris, J. J. Kastelein, V. Menon, B. Williams, J. Armbrecht, P. Brunel, M. Nicolaidis, A. Hsu, B. Hu, H. Fang, R. Puri, K. Uno, Y. Kataoka, D. Bash, and S. E. Nissen. 2013. 'Effect of aliskiren on progression of coronary disease in patients with prehypertension: the AQUARIUS randomized clinical trial', *JAMA*, 310: 1135-44.
- Niessner, A., and C. M. Weyand. 2010. 'Dendritic cells in atherosclerotic disease', *Clin Immunol*, 134: 25-32.
- Nivelstein, P. F., A. M. Fogelman, G. Mottino, and J. S. Frank. 1991. 'Lipid accumulation in rabbit aortic intima 2 hours after bolus infusion of low density lipoprotein. A deep-etch and immunolocalization study of ultrarapidly frozen tissue', *Arterioscler Thromb*, 11: 1795-805.
- Niiyama, Hiroshi, Ngan F. Huang, Mark D. Rollins, and John P. Cooke. 2009. 'Murine Model of Hindlimb Ischemia', *Journal of Visualized Experiments : JoVE*: 1035.

- Nishida, N., H. Yano, T. Nishida, T. Kamura, and M. Kojiro. 2006. 'Angiogenesis in Cancer', *Vasc Health Risk Manag*, 2: 213-9.
- Nishiguchi, Tsuyoshi, Toshio Imanishi, and Takashi Akasaka. 2015. 'MicroRNAs and Cardiovascular Diseases', *BioMed Research International*, 2015: 14.
- Nishiwaki, Yasunobu, Masayuki Yoshida, Hideki Iwaguro, Haruchika Masuda, Noriko Nitta, Takayuki Asahara, and Mitsuaki Isobe. 2007. 'Endothelial E-Selectin Potentiates Neovascularization via Endothelial Progenitor Cell-Dependent and -Independent Mechanisms', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27: 512-18.
- Nissen, S. E., T. Tsunoda, E. M. Tuzcu, P. Schoenhagen, C. J. Cooper, M. Yasin, G. M. Eaton, M. A. Lauer, W. S. Sheldon, C. L. Grines, S. Halpern, T. Crowe, J. C. Blankenship, and R. Kerensky. 2003. 'Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial', *JAMA*, 290: 2292-300.
- Nohara, R., H. Kambara, T. Murakami, K. Kadota, S. Tamaki, and C. Kawai. 1983. 'Collateral function in early acute myocardial infarction', *Am J Cardiol*, 52: 955-9.
- Nussberger, J., J. F. Aubert, K. Bouzourene, M. Pellegrin, D. Hayoz, and L. Mazzolai. 2008. 'Renin inhibition by aliskiren prevents atherosclerosis progression: comparison with irbesartan, atenolol, and amlodipine', *Hypertension*, 51: 1306-11.
- Nussberger, J., G. Wuerzner, C. Jensen, and H. R. Brunner. 2002. 'Angiotensin II suppression in humans by the orally active renin inhibitor Aliskiren (SPP100): comparison with enalapril', *Hypertension*, 39: E1-8.
- Nyberg, P., L. Xie, and R. Kalluri. 2005a. 'Endogenous inhibitors of angiogenesis', *Cancer Res*, 65: 3967-79.
- O'Reilly, M. S., T. Boehm, Y. Shing, N. Fukai, G. Vasios, W. S. Lane, E. Flynn, J. R. Birkhead, B. R. Olsen, and J. Folkman. 1997. 'Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth', *Cell*, 88: 277-85.
- Oak, J. H., and H. Cai. 2007. 'Attenuation of angiotensin II signaling recouples eNOS and inhibits nonendothelial NOX activity in diabetic mice', *Diabetes*, 56: 118-26.
- Oberoi, Raghav, Jutta Schuett, Harald Schuett, Ann-Kathrin Koch, Maren Luchtefeld, Karsten Grote, and Bernhard Schieffer. 2016. 'Targeting Tumor Necrosis Factor- α with Adalimumab: Effects on Endothelial Activation and Monocyte Adhesion', *PLoS One*, 11: e0160145.
- Oh, Il-Young, Chang-Hwan Yoon, Jin Hur, Ji-Hyun Kim, Tae-Youn Kim, Choon-Soo Lee, Kyung-Woo Park, In-Ho Chae, Byung-Hee Oh, Young-Bae Park, and Hyo-Soo Kim. 2007. 'Involvement of E-selectin in recruitment of endothelial progenitor cells and angiogenesis in ischemic muscle', *Blood*, 110: 3891-99.
- Ohta, H., H. Wada, T. Niwa, H. Kirii, N. Iwamoto, H. Fujii, K. Saito, K. Sekikawa, and M. Seishima. 2005. 'Disruption of tumor necrosis factor-alpha gene diminishes the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice', *Atherosclerosis*, 180: 11-7.
- Olivieri, F., R. Antonicelli, M. Lorenzi, Y. D'Alessandra, R. Lazzarini, G. Santini, L. Spazzafumo, R. Lisa, L. La Sala, R. Galeazzi, R. Recchioni, R. Testa, G. Pompilio, M. C. Capogrossi, and A. D. Procopio. 2013. 'Diagnostic potential of circulating miR-499-5p in elderly patients with acute non ST-elevation myocardial infarction', *Int J Cardiol*, 167: 531-6.
- Olofsson, S. O., and J. Boren. 2005. 'Apolipoprotein B: a clinically important apolipoprotein which assembles atherogenic lipoproteins and promotes the development of atherosclerosis', *J Intern Med*, 258: 395-410.

- Ossewaarde, M. E., M. L. Bots, A. L. Verbeek, P. H. Peeters, Y. van der Graaf, D. E. Grobbee, and Y. T. van der Schouw. 2005. 'Age at menopause, cause-specific mortality and total life expectancy', *Epidemiology*, 16: 556-62.
- Otrock, Z. K., R. A. Mahfouz, J. A. Makarem, and A. I. Shamseddine. 2007. 'Understanding the biology of angiogenesis: review of the most important molecular mechanisms', *Blood Cells Mol Dis*, 39: 212-20.
- Ott, C., K. Jacobs, E. Haucke, A. Navarrete Santos, T. Grune, and A. Simm. 2014. 'Role of advanced glycation end products in cellular signaling()', *Redox Biol*, 2: 411-29.
- Ou, Zhi-Jun, Feng-Jun Chang, Dan Luo, Xiao-Long Liao, Zhi-Ping Wang, Xi Zhang, Ying-Qi Xu, and Jing-Song Ou. 2011. 'Endothelium-derived microparticles inhibit angiogenesis in the heart and enhance the inhibitory effects of hypercholesterolemia on angiogenesis', *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism*, 300: E661-E68.
- Ouimet, M., H. N. Ediriweera, U. M. Gundra, F. J. Sheedy, B. Ramkhelawon, S. B. Hutchison, K. Rinehold, C. van Solingen, M. D. Fullerton, K. Cecchini, K. J. Rayner, G. R. Steinberg, P. D. Zamore, E. A. Fisher, P. Loke, and K. J. Moore. 2015. 'MicroRNA-33-dependent regulation of macrophage metabolism directs immune cell polarization in atherosclerosis', *J Clin Invest*, 125: 4334-48.
- Ozdemir, B. H., Z. Akcali, and M. Haberal. 2004. 'Hypercholesterolemia impairs angiogenesis in patients with breast carcinoma and, therefore, lowers the risk of metastases', *Am J Clin Pathol*, 122: 696-703.
- Ozuyaman, B., P. Ebner, U. Niesler, J. Ziemann, P. Kleinbongard, T. Jax, A. Godecke, M. Kelm, and C. Kalka. 2005. 'Nitric oxide differentially regulates proliferation and mobilization of endothelial progenitor cells but not of hematopoietic stem cells', *Thromb Haemost*, 94: 770-2.
- Pacurari, Maricica, Ramzi Kafoury, Paul B. Tchounwou, and Kenneth Ndebele. 2014. 'The Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Vascular Inflammation and Remodeling', *International Journal of Inflammation*, 2014: 13.
- Papapetropoulos, A., G. Garcia-Cardena, J. A. Madri, and W. C. Sessa. 1997. 'Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells', *J Clin Invest*, 100: 3131-9.
- Papetti, Michael, and Ira M. Herman. 2002. 'Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis', *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 282: C947-C70.
- Paquin-Veillette J, Lizotte F, Robillard S, Béland R, Breton MA, et al. Deletion of AT2 Receptor Prevents SHP-1-Induced VEGF Inhibition and Improves Blood Flow Reperfusion in Diabetic Ischemic Hindlimb. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*.
- Paramsothy, P., R. Knopp, A. G. Bertoni, M. Y. Tsai, T. Rue, and S. R. Heckbert. 2009. 'Combined Hyperlipidemia in relation to Race/Ethnicity, Obesity, and Insulin Resistance in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA)', *Metabolism*, 58: 212-9.
- Parathath, S., L. Grauer, L. S. Huang, M. Sanson, E. Distel, I. J. Goldberg, and E. A. Fisher. 2011. 'Diabetes adversely affects macrophages during atherosclerotic plaque regression in mice', *Diabetes*, 60: 1759-69.
- Pareek, C. S., R. Smoczynski, and A. Tretyn. 2011. 'Sequencing technologies and genome sequencing', *J Appl Genet*, 52: 413-35.

- Park, H., X. Huang, C. Lu, M. S. Cairo, and X. Zhou. 2015. 'MicroRNA-146a and microRNA-146b regulate human dendritic cell apoptosis and cytokine production by targeting TRAF6 and IRAK1 proteins', *J Biol Chem*, 290: 2831-41.
- Park, Y. S., J. Kim, Y. Misonou, R. Takamiya, M. Takahashi, M. R. Freeman, and N. Taniguchi. 2007. 'Acrolein induces cyclooxygenase-2 and prostaglandin production in human umbilical vein endothelial cells: roles of p38 MAP kinase', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27: 1319-25.
- Paterson, Mark, Sandra Chuppa, and Alison J. Kriegel. 2017. 'Loss of miR-146b-5p Exacerbates Pathological Left-Ventricular Remodeling in a Rat Model of CKD', *The FASEB Journal*, 31: 722.5-22.5.
- Patschan, D., K. Krupinca, S. Patschan, Z. Zhang, C. Hamby, and M. S. Goligorsky. 2006. 'Dynamics of mobilization and homing of endothelial progenitor cells after acute renal ischemia: modulation by ischemic preconditioning', *Am J Physiol Renal Physiol*, 291: F176-85.
- Pauku, K., and O. Silvennoinen. 2004. 'STATs as critical mediators of signal transduction and transcription: lessons learned from STAT5', *Cytokine Growth Factor Rev*, 15: 435-55.
- Peled, Michael, and Edward A. Fisher. 2014. 'Dynamic Aspects of Macrophage Polarization during Atherosclerosis Progression and Regression', *Frontiers in Immunology*, 5.
- Penn, A., and C. Snyder. 1988. 'Arteriosclerotic plaque development is 'promoted' by polynuclear aromatic hydrocarbons', *Carcinogenesis*, 9: 2185-9.
- Penn, A., and C. A. Snyder. 1996. '1,3 Butadiene, a vapor phase component of environmental tobacco smoke, accelerates arteriosclerotic plaque development', *Circulation*, 93: 552-7.
- Peplow, P. V. 2014. 'Growth factor- and cytokine-stimulated endothelial progenitor cells in post-ischemic cerebral neovascularization', *Neural Regen Res*, 9: 1425-9.
- Perdomo, G., and H. H. Dong. 2009. 'Apolipoprotein D in Lipid Metabolism and Its Functional', *Aging (Albany NY)*, 1: 17-27.
- Perry, M. M., S. A. Moschos, A. E. Williams, N. J. Shepherd, H. M. Larner-Svensson, and M. A. Lindsay. 2008. 'Rapid changes in microRNA-146a expression negatively regulate the IL-1 β -induced inflammatory response in human lung alveolar epithelial cells', *J Immunol*, 180: 5689-98.
- Pesaro, A. E. P., C. V. Serrano, M. Katz, A. H. Campos, R. D. Lopes, L. C. Marti, H. S. Martins, R. S. Sunahara, R. C. Maranhao, and J. C. Nicolau. 2012. 'Inflammation and circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease and residual platelet reactivity', *Clinics (Sao Paulo)*, 67: 1117-21.
- Peterson, Sarah, Jeffrey Thompson, Melanie Ufkin, Pradeep Sathyanarayana, Lucy Liaw, and Clare Bates Congdon. 2014. 'Common features of microRNA target prediction tools', *Frontiers in Genetics*, 5.
- Peti-Peterdi, J., J. J. Kang, and I. Toma. 2008. 'Activation of the renal renin-angiotensin system in diabetes—new concepts', *Nephrol Dial Transplant*, 23: 3047-9.
- Picchi, A., X. Gao, S. Belmadani, B. J. Potter, M. Focardi, W. M. Chilian, and C. Zhang. 2006. 'Tumor necrosis factor-alpha induces endothelial dysfunction in the prediabetic metabolic syndrome', *Circ Res*, 99: 69-77.
- Pirillo, A., G. D. Norata, and A. L. Catapano. 2013a. 'LOX-1, OxLDL, and Atherosclerosis', *Mediators Inflamm*, 2013.

- Pirillo, A., P. Uboldi, N. Ferri, A. Corsini, H. Kuhn, and A. L. Catapano. 2012. 'Upregulation of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor 1 (LOX-1) expression in human endothelial cells by modified high density lipoproteins', *Biochem Biophys Res Commun*, 428: 230-3.
- Pirro, Matteo, Giuseppe Schillaci, Paolo F. Romagno, Massimo R. Mannarino, Francesco Bagaglia, Rolando Razzi, Leonella Pasqualini, Gaetano Vaudo, and Elmo Mannarino. 2009. 'Influence of Short-term Rosuvastatin Therapy on Endothelial Progenitor Cells and Endothelial Function', *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 14: 14-21.
- Plump, A. S., J. D. Smith, T. Hayek, K. Aalto-Setälä, A. Walsh, J. G. Verstuyft, E. M. Rubin, and J. L. Breslow. 1992. 'Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells', *Cell*, 71: 343-53.
- Pober, J. S., and W. C. Sessa. 2007. 'Evolving functions of endothelial cells in inflammation', *Nat Rev Immunol*, 7: 803-15.
- Poliseno, L., A. Tuccoli, L. Mariani, M. Evangelista, L. Citti, K. Woods, A. Mercatanti, S. Hammond, and G. Rainaldi. 2006. 'MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs', *Blood*, 108: 3068-71.
- Polykratis, Apostolos, Geert van Loo, Sofia Xanthoulea, Martin Hellmich, and Manolis Pasparakis. 2012a. 'Conditional Targeting of TRAF6 Reveals Opposing Functions of TLR Signaling in Endothelial and Myeloid Cells in a Mouse Model of Atherosclerosis', *Circulation*.
- Poss, J., C. Werner, D. Lorenz, C. Gensch, M. Böhm, and U. Laufs. 2010. 'The renin inhibitor aliskiren upregulates pro-angiogenic cells and reduces atherogenesis in mice', *Basic Res Cardiol*, 105: 725-35.
- Potente, Michael, Holger Gerhardt, and Peter Carmeliet. 'Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis', *Cell*, 146: 873-87.
- Powell, T. M., J. D. Paul, J. M. Hill, M. Thompson, M. Benjamin, M. Rodrigo, J. P. McCoy, E. J. Read, H. M. Khuu, S. F. Leitman, T. Finkel, and R. O. Cannon, 3rd. 2005. 'Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes functional endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25: 296-301.
- Prasad, A., K. K. Koh, W. H. Schenke, R. Mincemoyer, G. Csako, T. A. Fleischer, M. Brown, T. A. Selvaggi, and A. A. Quyyumi. 2001. 'Role of angiotensin II type 1 receptor in the regulation of cellular adhesion molecules in atherosclerosis', *Am Heart J*, 142: 248-53.
- Prior, B. M., H. T. Yang, and R. L. Terjung. 2004. 'What makes vessels grow with exercise training?', *J Appl Physiol (1985)*, 97: 1119-28.
- Pryor, W. A., and K. Stone. 1993. 'Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxy-nitrate, and peroxy-nitrite', *Ann N Y Acad Sci*, 686: 12-27; discussion 27-8.
- Qin, B., B. Xiao, D. Liang, J. Xia, Y. Li, and H. Yang. 2011. 'MicroRNAs expression in ox-LDL treated HUVECs: MiR-365 modulates apoptosis and Bcl-2 expression', *Biochem Biophys Res Commun*, 410: 127-33.
- Qu, Kai, Zuo Wang, Xiao-long Lin, Kai Zhang, Xing-lan He, and Hai Zhang. 2015. 'MicroRNAs: Key regulators of endothelial progenitor cell functions', *Clinica Chimica Acta*, 448: 65-73.
- Radenković, M., M. Stojanović, I. M. Nešić, and M. Prostran. 2016. 'Angiotensin receptor blockers & endothelial dysfunction: Possible correlation & therapeutic implications', *Indian J Med Res*, 144: 154-68.

- Rafikov, R., F. V. Fonseca, S. Kumar, D. Pardo, C. Darragh, S. Elms, D. Fulton, and S. M. Black. 2011. 'eNOS activation and NO function: structural motifs responsible for the posttranslational control of endothelial nitric oxide synthase activity', *J Endocrinol*, 210: 271-84.
- Raitoharju, E., L. P. Lyytikäinen, M. Levula, N. Oksala, A. Mennander, M. Tarkka, N. Klopp, T. Illig, M. Kahonen, P. J. Karhunen, R. Laaksonen, and T. Lehtimäki. 2011. 'miR-21, miR-210, miR-34a, and miR-146a/b are up-regulated in human atherosclerotic plaques in the Tampere Vascular Study', *Atherosclerosis*, 219: 211-7.
- Rajagopalan, S., S. Kurz, T. Munzel, M. Tarpey, B. A. Freeman, K. K. Griendling, and D. G. Harrison. 1996. 'Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone', *J Clin Invest*, 97: 1916-23.
- Rajagopalan, Sanjay, George L. Bakris, William T. Abraham, Bertram Pitt, and Robert D. Brook. 2013. 'Complete Renin–Angiotensin–Aldosterone System (RAAS) Blockade in High-Risk Patients', *Recent Insights From Renin Blockade Studies*, 62: 444-49.
- Rajasingh, J., E. Bord, C. Luedemann, J. Asai, H. Hamada, T. Thorne, G. Qin, D. Goukassian, Y. Zhu, D. W. Losordo, and R. Kishore. 2006. 'IL-10-induced TNF- α mRNA destabilization is mediated via IL-10 suppression of p38 MAP kinase activation and inhibition of HuR expression', *FASEB J*, 20: 2112-4.
- Ramalingam, P., J. K. Palanichamy, A. Singh, P. Das, M. Bhagat, M. A. Kassab, S. Sinha, and P. Chattopadhyay. 2014. 'Biogenesis of intronic miRNAs located in clusters by independent transcription and alternative splicing', *RNA*, 20: 76-87.
- Ramji, D. P., and T. S. Davies. 2015. 'Cytokines in atherosclerosis: Key players in all stages of disease and promising therapeutic targets', *Cytokine Growth Factor Rev*, 26: 673-85.
- Ramos-Arellano, L. E., J. F. Muñoz-Valle, U. De la Cruz-Mosso, A. B. Salgado-Bernabe, N. Castro-Alarcon, and I. Parra-Rojas. 2014. 'Circulating CD36 and oxLDL levels are associated with cardiovascular risk factors in young subjects', *BMC Cardiovasc Disord*, 14: 54.
- Raptis, A. E., K. P. Markakis, M. C. Mazioti, I. Ikonomidis, E. P. Maratou, D. V. Vlahakos, E. E. Kotsifaki, A. N. Voumvourakis, A. G. Tsirogianni, V. A. Lambadiari, J. P. Lekakis, S. A. Raptis, and G. D. Dimitriadis. 2015. 'Effect of aliskiren on circulating endothelial progenitor cells and vascular function in patients with type 2 diabetes and essential hypertension', *Am J Hypertens*, 28: 22-9.
- Rayner, K. J., and E. J. Hennessy. 2013. 'Extracellular communication via microRNA: lipid particles have a new message', *J Lipid Res*, 54: 1174-81.
- Rayner, K. J., F. J. Sheedy, C. C. Esau, F. N. Hussain, R. E. Temel, S. Parathath, J. M. van Gils, A. J. Rayner, A. N. Chang, Y. Suarez, C. Fernandez-Hernando, E. A. Fisher, and K. J. Moore. 2011. 'Antagonism of miR-33 in mice promotes reverse cholesterol transport and regression of atherosclerosis', *J Clin Invest*, 121: 2921-31.
- Rehman, Jalees, Jingling Li, Christie M. Orschell, and Keith L. March. 2003. 'Peripheral Blood "Endothelial Progenitor Cells" Are Derived From Monocyte/Macrophages and Secrete Angiogenic Growth Factors', *Circulation*, 107: 1164-69.
- Ren, X. P., J. Wu, X. Wang, M. A. Sartor, K. Jones, J. Qian, P. Nicolaou, T. J. Pritchard, and G. C. Fan. 2009. 'MicroRNA-320 is involved in the regulation of cardiac ischemia/reperfusion injury by targeting heat-shock protein 20', *Circulation*, 119: 2357-66.

- Rennert, R. C., M. Sorkin, R. K. Garg, and G. C. Gurtner. 2012. 'Stem cell recruitment after injury: lessons for regenerative medicine', *Regen Med*, 7: 833-50.
- Resnick, N., and M. A. Gimbrone, Jr. 1995. 'Hemodynamic forces are complex regulators of endothelial gene expression', *FASEB J*, 9: 874-82.
- Reverri, E. J., B. M. Morrissey, C. E. Cross, and F. M. Steinberg. 2014. 'Inflammation, oxidative stress, and cardiovascular disease risk factors in adults with cystic fibrosis', *Free Radic Biol Med*, 76: 261-77.
- Ribatti, D., A. Vacca, L. Roncali, and F. Dammacco. 1991. 'Angiogenesis under normal and pathological conditions', *Haematologica*, 76: 311-20.
- Ribatti, Domenico, and Enrico Crivellato. 2012. "'Sprouting angiogenesis", a reappraisal', *Developmental Biology*, 372: 157-65.
- Ribera-Casado, J. M. 1999. 'Ageing and the cardiovascular system', *Z Gerontol Geriatr*, 32: 412-9.
- Rivard, A., M. Silver, D. Chen, M. Kearney, M. Magner, B. Annex, K. Peters, and J. M. Isner. 1999. 'Rescue of Diabetes-Related Impairment of Angiogenesis by Intramuscular Gene Therapy with Adeno-VEGF', *Am J Pathol*, 154: 355-63.
- Roifman, I., P. L. Beck, T. J. Anderson, M. J. Eisenberg, and J. Genest. 2011. 'Chronic inflammatory diseases and cardiovascular risk: a systematic review', *Can J Cardiol*, 27: 174-82.
- Roignot, J., X. Peng, and K. Mostov. 2013. 'Polarity in mammalian epithelial morphogenesis', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5.
- Roos, J., E. Enlund, J. B. Funcke, D. Tews, K. Holzmann, K. M. Debatin, M. Wabitsch, and P. Fischer-Posovszky. 2016. 'miR-146a-mediated suppression of the inflammatory response in human adipocytes', *Sci Rep*, 6.
- Rose, J. A., S. Erzurum, and K. Asosingh. 2015. 'Biology and Flow Cytometry of Proangiogenic Hematopoietic Progenitors Cells', *Cytometry A*, 87: 5-19.
- Rosenson, R. S. 2004. 'Statins in atherosclerosis: lipid-lowering agents with antioxidant capabilities', *Atherosclerosis*, 173: 1-12.
- Rosenthal-Allieri, M. A., M. Ticchioni, J. P. Breittmayer, Y. Shimizu, and A. Bernard. 2005. 'Influence of beta 1 integrin intracytoplasmic domains in the regulation of VLA-4-mediated adhesion of human T cells to VCAM-1 under flow conditions', *J Immunol*, 175: 1214-23.
- Ross, R. 1999. 'Atherosclerosis--an inflammatory disease', *N Engl J Med*, 340: 115-26.
- Ross, R., J. Glomset, and L. Harker. 1977. 'Response to injury and atherogenesis', *Am J Pathol*, 86: 675-84.
- Rossi, F., C. Bertone, F. Montanile, F. Miglietta, C. Lubrano, L. Gandini, and V. Santiemma. 2010. 'HDL cholesterol is a strong determinant of endothelial progenitor cells in hypercholesterolemic subjects', *Microvasc Res*, 80: 274-9.
- Ruilope, L. M., J. Redón, and R. Schmieder. 2007. 'Cardiovascular risk reduction by reversing endothelial dysfunction: ARBs, ACE inhibitors, or both? Expectations from The ONTARGET Trial Programme', *Vasc Health Risk Manag*, 3: 1-9.
- Ruiz-Ortega, M., O. Lorenzo, M. Ruperez, V. Esteban, Y. Suzuki, S. Mezzano, J. J. Plaza, and J. Egido. 2001. 'Role of the renin-angiotensin system in vascular diseases: expanding the field', *Hypertension*, 38: 1382-7.
- Rupaimoole, Rajesha, and Frank J. Slack. 2017. 'MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases', *Nat Rev Drug Discov*, 16: 203-22.

- Ryoo, S., A. Bhunia, F. Chang, A. Shoukas, D. E. Berkowitz, and L. H. Romer. 2011. 'OxLDL-dependent activation of arginase II is dependent on the LOX-1 receptor and downstream RhoA signaling', *Atherosclerosis*, 214: 279-87.
- Sandhu, K., M. Mamas, and R. Butler. 2017. 'Endothelial progenitor cells: Exploring the pleiotropic effects of statins', *World J Cardiol*, 9: 1-13.
- Sandoo, A., J. J. van Zanten, G. S. Metsios, D. Carroll, and G. D. Kitas. 2010. 'The endothelium and its role in regulating vascular tone', *Open Cardiovasc Med J*, 4: 302-12.
- Sanoski, C. A. 2009. 'Aliskiren: an oral direct renin inhibitor for the treatment of hypertension', *Pharmacotherapy*, 29: 193-212.
- Sasaki, Ken-ichiro, Junli Duan, Toyooki Murohara, Hisao Ikeda, Satoshi Shintani, Toshifumi Shimada, Takako Akita, Kimiyasu Egami, and Tsutomu Imaizumi. 2003. 'Rescue of hypercholesterolemia-related impairment of angiogenesis by oral folate supplementation', *Journal of the American College of Cardiology*, 42: 364-72.
- Satofuka S, Ichihara A, Nagai N, Yamashiro K, Koto T, et al. Suppression of ocular inflammation in endotoxin-induced uveitis by inhibiting nonproteolytic activation of prorenin. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006 Jun;47(6):2686-92.
- Sauter M, Cohen CD, Wörnle M, Mussack T, Ladurner R, et al. ACE inhibitor and AT1-receptor blocker attenuate the production of VEGF in mesothelial cells. *Perit Dial Int*. 2007 Mar-Apr;27(2):167-72.
- Schachinger, V., B. Assmus, M. B. Britten, J. Honold, R. Lehmann, C. Teupe, N. D. Abolmaali, T. J. Vogl, W. K. Hofmann, H. Martin, S. Dimmeler, and A. M. Zeiher. 2004. 'Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial', *J Am Coll Cardiol*, 44: 1690-9.
- Schaper, W., and I. Buschmann. 1999. 'Arteriogenesis, the good and bad of it', *Cardiovasc Res*, 43: 835-7.
- Schaper, W., M. De Brabander, and P. Lewi. 1971. 'DNA synthesis and mitoses in coronary collateral vessels of the dog', *Circ Res*, 28: 671-9.
- Schaper, W., and S. Pasyk. 1976. 'Influence of collateral flow on the ischemic tolerance of the heart following acute and subacute coronary occlusion', *Circulation*, 53: 157-62.
- Schieber, M., and N. S. Chandel. 2014. 'ROS function in redox signaling and oxidative stress', *Curr Biol*, 24: R453-62.
- Schieffer, B., T. Selle, A. Hilfiker, D. Hilfiker-Kleiner, K. Grote, U. J. Tietge, C. Trautwein, M. Luchtefeld, C. Schmittkamp, S. Heeneman, M. J. Daemen, and H. Drexler. 2004. 'Impact of interleukin-6 on plaque development and morphology in experimental atherosclerosis', *Circulation*, 110: 3493-500.
- Schirmer, Stephan H., Ivo R. Buschmann, Marco M. Jost, Imo E. Hofer, Sebastian Grundmann, Jan-Philip Andert, Susann Ulusans, Christoph Bode, Jan J. Piek, and Niels van Royen. 2004. 'Differential effects of MCP-1 and leptin on collateral flow and arteriogenesis', *Cardiovascular Research*, 64: 356-64.
- Schmidt, A. M., O. Hori, J. X. Chen, J. F. Li, J. Crandall, J. Zhang, R. Cao, S. D. Yan, J. Brett, and D. Stern. 1995. 'Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice. A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes', *J Clin Invest*, 96: 1395-403.

- Schmidt, Tim S., and Nicholas J. Alp. 2007. 'Mechanisms for the role of tetrahydrobiopterin in endothelial function and vascular disease', *Clinical Science*, 113: 47-63.
- Schnoor, M., P. Cullen, J. Lorkowski, K. Stolle, H. Robenek, D. Troyer, J. Rauterberg, and S. Lorkowski. 2008. 'Production of type VI collagen by human macrophages: a new dimension in macrophage functional heterogeneity', *J Immunol*, 180: 5707-19.
- Scholz, D., W. Ito, I. Fleming, E. Deindl, A. Sauer, M. Wiesnet, R. Busse, J. Schaper, and W. Schaper. 2000. 'Ultrastructure and molecular histology of rabbit hind-limb collateral artery growth (arteriogenesis)', *Virchows Arch*, 436: 257-70.
- Scholz, D., T. Ziegelhoeffer, A. Helisch, S. Wagner, C. Friedrich, T. Podzuweit, and W. Schaper. 2002. 'Contribution of arteriogenesis and angiogenesis to postocclusive hindlimb perfusion in mice', *J Mol Cell Cardiol*, 34: 775-87.
- Schulte, C., and T. Zeller. 2015. 'microRNA-based diagnostics and therapy in cardiovascular disease—Summing up the facts', *Cardiovasc Diagn Ther*, 5: 17-36.
- Schutze, S., K. Wiegmann, T. Machleidt, and M. Kronke. 1995. 'TNF-induced activation of NF-kappa B', *Immunobiology*, 193: 193-203.
- Schwartz, C. J., A. J. Valente, E. A. Sprague, J. L. Kelley, C. A. Suenram, and M. M. Rozek. 1985. 'Atherosclerosis as an inflammatory process. The roles of the monocyte-macrophage', *Ann N Y Acad Sci*, 454: 115-20.
- Schwenke, D. C., and T. E. Carew. 1989. 'Initiation of atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits. II. Selective retention of LDL vs. selective increases in LDL permeability in susceptible sites of arteries', *Arteriosclerosis*, 9: 908-18.
- Seeger, F. H., J. Haendeler, D. H. Walter, U. Rochwalsky, J. Reinhold, C. Urbich, L. Rossig, A. Corbaz, Y. Chvatchko, A. M. Zeiher, and S. Dimmeler. 2005. 'p38 mitogen-activated protein kinase downregulates endothelial progenitor cells', *Circulation*, 111: 1184-91.
- Sessa, Roberto, Giorgio Seano, Laura di Blasio, Paolo Armando Gagliardi, Claudio Isella, Enzo Medico, Franco Cotelli, Federico Bussolino, and Luca Primo. 2012. 'The miR-126 regulates Angiopoietin-1 signaling and vessel maturation by targeting p85 β ', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1823: 1925-35.
- Shafiq, M. M., D. V. Menon, and R. G. Victor. 2008. 'Oral direct renin inhibition: premise, promise, and potential limitations of a new antihypertensive drug', *Am J Med*, 121: 265-71.
- Shanks, Niall, Ray Greek, and Jean Greek. 2009. 'Are animal models predictive for humans?', *Philosophy, Ethics, and Humanities in Medicine : PEHM*, 4: 2-2.
- Shen, J. K., X. Yang, B. Xie, Y. Chen, M. Swaim, S. F. Hackett, and P. A. Campochiaro. 2008. 'MicroRNAs Regulate Ocular Neovascularization', *Mol Ther*, 16: 1208-16.
- Shibuya, M. 2011. 'Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies', *Genes Cancer*, 2: 1097-105.
- Shinkai, Hisashi. 2012. *Cholesteryl ester transfer-protein modulator and inhibitors and their potential for the treatment of cardiovascular diseases*.
- Silvestre, J. S. 2012. 'Pro-angiogenic cell-based therapy for the treatment of ischemic cardiovascular diseases', *Thromb Res*, 130 Suppl 1: S90-4.

- Silvestre, J. S., D. M. Smadja, and B. I. Levy. 2013. 'Postischemic revascularization: from cellular and molecular mechanisms to clinical applications', *Physiol Rev*, 93: 1743-802.
- Silvestre, Jean-Sebastien, Ziad Mallat, Alain Tedgui, and Bernard I. Lévy. 2008. 'Post-ischaemic neovascularization and inflammation', *Cardiovascular Research*, 78: 242-49.
- Simionescu, M. 2007. 'Implications of early structural-functional changes in the endothelium for vascular disease', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27: 266-74.
- Smith, Carr J., and Thomas H. Fischer. 2001. 'Particulate and vapor phase constituents of cigarette mainstream smoke and risk of myocardial infarction', *Atherosclerosis*, 158: 257-67.
- Smith, J. D., E. Trogan, M. Ginsberg, C. Grigaux, J. Tian, and M. Miyata. 1995. 'Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 8264-8.
- Sniderman, A. D., S. Islam, M. McQueen, M. Pencina, C. D. Furberg, G. Thanassoulis, and S. Yusuf. 2016. 'Age and Cardiovascular Risk Attributable to Apolipoprotein B, Low-Density Lipoprotein Cholesterol or Non-High-Density Lipoprotein Cholesterol', *J Am Heart Assoc*, 5.
- Soccio, M., E. Toniato, V. Evangelista, M. Carluccio, and R. De Caterina. 2005. 'Oxidative stress and cardiovascular risk: the role of vascular NAD(P)H oxidase and its genetic variants', *Eur J Clin Invest*, 35: 305-14.
- Soehnlein, O., A. Zernecke, and C. Weber. 2009. 'Neutrophils launch monocyte extravasation by release of granule proteins', *Thromb Haemost*, 102: 198-205.
- Solomon, S. D., E. Appelbaum, W. J. Manning, A. Verma, T. Berglund, V. Lukashevich, C. Cherif Papst, B. A. Smith, B. Dahlof, and Investigators Aliskiren in Left Ventricular Hypertrophy Trial. 2009. 'Effect of the direct Renin inhibitor aliskiren, the Angiotensin receptor blocker losartan, or both on left ventricular mass in patients with hypertension and left ventricular hypertrophy', *Circulation*, 119: 530-7.
- Sonkoly, E., and A. Pivarcsi. 2009. 'Advances in microRNAs: implications for immunity and inflammatory diseases', *J Cell Mol Med*, 13: 24-38.
- Sood, P., A. Krek, M. Zavolan, G. Macino, and N. Rajewsky. 2006. 'Cell-type-specific signatures of microRNAs on target mRNA expression', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 2746-51.
- Spigoni, V., A. Picconi, M. Cito, V. Ridolfi, S. Bonomini, C. Casali, I. Zavaroni, L. Gnudi, M. Metra, and A. Dei Cas. 2012. 'Pioglitazone Improves *In Vitro* Viability and Function of Endothelial Progenitor Cells from Individuals with Impaired Glucose Tolerance', *PLoS One*, 7.
- Spinetti, G., O. Fortunato, D. Cordella, P. Portararo, N. Krankel, R. Katare, G. B. Sala-Newby, C. Richer, M. P. Vincent, F. Alhenc-Gelas, G. Tonolo, S. Cherchi, C. Emanuelli, and P. Madeddu. 2011. 'Tissue kallikrein is essential for invasive capacity of circulating proangiogenic cells', *Circ Res*, 108: 284-93.
- Sprague, A. H., and R. A. Khalil. 2009. 'Inflammatory Cytokines in Vascular Dysfunction and Vascular Disease', *Biochem Pharmacol*, 78: 539-52.
- Stapleton, P. A., A. G. Goodwill, M. E. James, R. W. Brock, and J. C. Frisbee. 2010. 'Hypercholesterolemia and microvascular dysfunction: interventional strategies', *J Inflamm (Lond)*, 7: 54.
- Stary, H. C., A. B. Chandler, R. E. Dinsmore, V. Fuster, S. Glagov, W. Insull, Jr., M. E. Rosenfeld, C. J. Schwartz, W. D. Wagner, and R. W. Wissler. 1995. 'A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a

- histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association', *Circulation*, 92: 1355-74.
- Sary, H. C., A. B. Chandler, S. Glagov, J. R. Guyton, W. Insull, Jr., M. E. Rosenfeld, S. A. Schaffer, C. J. Schwartz, W. D. Wagner, and R. W. Wissler. 1994. 'A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association', *Circulation*, 89: 2462-78.
- Staton, Carolyn A., Malcolm W. R. Reed, and Nicola J. Brown. 2009. 'A critical analysis of current *in vitro* and *in vivo* angiogenesis assays', *International Journal of Experimental Pathology*, 90: 195-221.
- Steinberg, D. 2005. 'Thematic review series: the pathogenesis of atherosclerosis: an interpretive history of the cholesterol controversy, part III: mechanistically defining the role of hyperlipidemia', *J Lipid Res*, 46: 2037-51.
- Steinberg, D., S. Parthasarathy, T. E. Carew, J. C. Khoo, and J. L. Witztum. 1989. 'Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity', *N Engl J Med*, 320: 915-24.
- Stephenson, J. A., J. C. Goddard, O. Al-Taan, A. R. Dennison, and B. Morgan. 2013. 'Tumour Angiogenesis: A Growth Area—From John Hunter to Judah Folkman and Beyond', *Journal of Cancer Research*, 2013: 6.
- Sterzynska, Karolina, Patrycja Sujka-Kordowska, and Wojciech Witkiewicz. 2011. "The Most Important Angiogenic Growth Factors Influencing the Development and Function of Blood Vessels - in the Context of Coronary Artery Bypass Grafting (CABG)." In *Advances in Cell Biology*, 55.
- Steyers, C. M., 3rd, and F. J. Miller, Jr. 2014. 'Endothelial dysfunction in chronic inflammatory diseases', *Int J Mol Sci*, 15: 11324-49.
- Stocker, R., and J. F. Keaney, Jr. 2004. 'Role of oxidative modifications in atherosclerosis', *Physiol Rev*, 84: 1381-478.
- Stoger, J. L., M. J. Gijbels, S. van der Velden, M. Manca, C. M. van der Loos, E. A. Biessen, M. J. Daemen, E. Lutgens, and M. P. de Winther. 2012. 'Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis', *Atherosclerosis*, 225: 461-8.
- Su, Zeng-Feng, Zhong-Wu Sun, Ying Zhang, Shu Wang, Qi-Gui Yu, and Ze-Bing Wu. 2017b. 'Regulatory effects of miR-146a/b on the function of endothelial progenitor cells in acute ischemic stroke in mice', *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 33: 369-78.
- Su JB, Barbe F, Crozatier B, Campbell DJ, Hittinger L. Increased bradykinin levels accompany the hemodynamic response to acute inhibition of angiotensin-converting enzyme in dogs with heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1999 Nov;34(5):700-10.
- Suarez, Y., C. Fernandez-Hernando, J. S. Pober, and W. C. Sessa. 2007. 'Dicer dependent microRNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells', *Circ Res*, 100: 1164-73.
- Suárez, Y., C. Fernández-Hernando, J. Yu, S. A. Gerber, K. D. Harrison, J. S. Pober, M. L. Iruela-Arispe, M. Merckenschlager, and W. C. Sessa. 2008. 'Dicer-dependent endothelial microRNAs are necessary for postnatal angiogenesis', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 14082-7.
- Suarez, Y., and W. C. Sessa. 2009. 'MicroRNAs as novel regulators of angiogenesis', *Circ Res*, 104: 442-54.

- Suarez, Y., C. Wang, T. D. Manes, and J. S. Pober. 2010. 'Cutting edge: TNF-induced microRNAs regulate TNF-induced expression of E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 on human endothelial cells: feedback control of inflammation', *J Immunol*, 184: 21-5.
- Sukriti, S., M. Tauseef, P. Yazbeck, and D. Mehta. 2014. 'Mechanisms regulating endothelial permeability', *Pulm Circ*, 4: 535-51.
- Sun, H., X. B. Li, Y. Meng, L. Fan, M. Li, and J. Fang. 2013. 'TRAF6 upregulates expression of HIF-1alpha and promotes tumor angiogenesis', *Cancer Res*, 73: 4950-9.
- Sun, H. X., D. Y. Zeng, R. T. Li, R. P. Pang, H. Yang, Y. L. Hu, Q. Zhang, Y. Jiang, L. Y. Huang, Y. B. Tang, G. J. Yan, and J. G. Zhou. 2012. 'Essential role of microRNA-155 in regulating endothelium-dependent vasorelaxation by targeting endothelial nitric oxide synthase', *Hypertension*, 60: 1407-14.
- Sun, J., J. Xie, L. Kang, A. Ferro, L. Dong, and B. Xu. 2016. 'Amlodipine Ameliorates Ischemia-Induced Neovascularization in Diabetic Rats through Endothelial Progenitor Cell Mobilization', *Biomed Res Int*, 2016.
- Sun, J. Y., L. Zhai, Q. L. Li, J. X. Ye, L. N. Kang, J. Xie, and B. Xu. 2013. 'Effects of ACE inhibition on endothelial progenitor cell mobilization and prognosis after acute myocardial infarction in type 2 diabetic patients', *Clinics (Sao Paulo)*, 68: 665-73.
- Sun, X., S. He, A. K. M. Wara, B. Icli, E. Shvartz, Y. Tesmenitsky, N. Belkin, D. Li, T. S. Blackwell, G. K. Sukhova, K. Croce, and M. W. Feinberg. 2014. 'Systemic delivery of microRNA-181b inhibits nuclear factor-kappaB activation, vascular inflammation, and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice', *Circ Res*, 114: 32-40.
- Sun, X., B. Icli, A. K. Wara, N. Belkin, S. He, L. Kobzik, G. M. Hunninghake, M. P. Vera, T. S. Blackwell, R. M. Baron, and M. W. Feinberg. 2012. 'MicroRNA-181b regulates NF-kappaB-mediated vascular inflammation', *J Clin Invest*, 122: 1973-90.
- Sun, Z., X. Li, S. Massena, S. Kutschera, N. Padhan, L. Gualandi, V. Sundvold-Gjerstad, K. Gustafsson, W. W. Choy, G. Zang, M. Quach, L. Jansson, M. Phillipson, M. R. Abid, A. Spurkland, and L. Claesson-Welsh. 2012. 'VEGFR2 induces c-Src signaling and vascular permeability *in vivo* via the adaptor protein TSAd', *J Exp Med*, 209: 1363-77.
- Sun Y, Danser AHJ, Lu X. (Pro)renin receptor as a therapeutic target for the treatment of cardiovascular diseases?. *Pharmacol Res*. 2017 Nov;125(Pt A):48-56.
- Superko, H. R. 2000. 'Hypercholesterolemia and Dyslipidemia', *Curr Treat Options Cardiovasc Med*, 2: 173-87.
- Suzuki, S., A. Naito, T. Asano, T. T. Evans, S. A. G. Reddy, and M. Higuchi. 2008. 'Constitutive Activation of AKT Pathway Inhibits TNF-induced Apoptosis in Mitochondrial DNA-Deficient human myelogenous leukemia ML-1a', *Cancer Lett*, 268: 31-7.
- Szadkowski, A., and C. R. Myers. 2008. 'Acrolein oxidizes the cytosolic and mitochondrial thioredoxins in human endothelial cells', *Toxicology*, 243: 164-76.
- Taganov, K. D., M. P. Boldin, K. J. Chang, and D. Baltimore. 2006. 'NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 12481-6.
- Tak, P. P., and G. S. Firestein. 2001. 'NF-kB: a key role in inflammatory diseases', *J Clin Invest*, 107: 7-11.

- Takahashi, Hiroyuki, and Masabumi Shibuya. 2005. 'The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions', *Clinical Science*, 109: 227-41.
- Talayero, B. G., and F. M. Sacks. 2011. 'The Role of Triglycerides in Atherosclerosis', *Curr Cardiol Rep*, 13: 544-52.
- Tamarat, R., J. S. Silvestre, S. Le Ricousse-Roussanne, V. Barateau, L. Lecomte-Raclet, M. Clergue, M. Duriez, G. Tobelem, and B. I. Levy. 2004. 'Impairment in ischemia-induced neovascularization in diabetes: bone marrow mononuclear cell dysfunction and therapeutic potential of placenta growth factor treatment', *Am J Pathol*, 164: 457-66.
- Tamma, R., and D. Ribatti. 2017. 'Bone Niches, Hematopoietic Stem Cells, and Vessel Formation', *Int J Mol Sci*, 18.
- Tano, N., H. W. Kim, and M. Ashraf. 2011. 'microRNA-150 Regulates Mobilization and Migration of Bone Marrow-Derived Mononuclear Cells by Targeting Cxcr4', *PLoS One*, 6.
- Tardif, J. C., J. Gregoire, P. L. L'Allier, R. Ibrahim, J. Lesperance, T. M. Heinonen, S. Kouz, C. Berry, R. Basser, M. A. Lavoie, M. C. Guertin, and J. Rodes-Cabau. 2007. 'Effects of reconstituted high-density lipoprotein infusions on coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial', *JAMA*, 297: 1675-82.
- Tedgui, Alain, and Ziad Mallat. 2006b. 'Cytokines in Atherosclerosis: Pathogenic and Regulatory Pathways', *Physiological Reviews*, 86: 515-81.
- Thorin-Trescases, N., G. Voghel, N. Farhat, A. Drouin, M. E. Gendron, and E. Thorin. 2010. '[Age-dependent oxidative stress: toward an irreversible failure in endothelial maintenance]', *Med Sci (Paris)*, 26: 875-80.
- Tian, F. J., L. N. An, G. K. Wang, J. Q. Zhu, Q. Li, Y. Y. Zhang, A. Zeng, J. Zou, R. F. Zhu, X. S. Han, N. Shen, H. T. Yang, X. X. Zhao, S. Huang, Y. W. Qin, and Q. Jing. 2014. 'Elevated microRNA-155 promotes foam cell formation by targeting HBP1 in atherogenesis', *Cardiovasc Res*, 103: 100-10.
- Tiemessen, M. M., A. L. Jagger, H. G. Evans, M. J. van Herwijnen, S. John, and L. S. Taams. 2007. 'CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 19446-51.
- Tilling, L., P. Chowienczyk, and B. Clapp. 2009. 'Progenitors in motion: mechanisms of mobilization of endothelial progenitor cells', *Br J Clin Pharmacol*, 68: 484-92.
- Timar, J., B. Dome, K. Fazekas, A. Janovics, and S. Paku. 2001. 'Angiogenesis-dependent diseases and angiogenesis therapy', *Pathol Oncol Res*, 7: 85-94.
- Tirziu, D., K. L. Moodie, Z. W. Zhuang, K. Singer, A. Helisch, J. F. Dunn, W. Li, J. Singh, and M. Simons. 2005. 'Delayed arteriogenesis in hypercholesterolemic mice', *Circulation*, 112: 2501-9.
- Tojo, A., N. Kobayashi, K. Kimura, Y. Hirata, H. Matsuoka, S. Yagi, and M. Omata. 1996. 'Effects of antihypertensive drugs on nitric oxide synthase activity in rat kidney', *Kidney Int Suppl*, 55: S138-40.
- Tojo, Naoko, Eiji Asakura, Mamoru Koyama, Toshizumi Tanabe, and Norifumi Nakamura. 1999. 'Effects of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on protease production from monocyte, macrophage and foam cell *in vitro*: a possible mechanism for anti-atherosclerotic effect of M-CSF', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1452: 275-84.

- Tomasian, D., J. F. Keane, and J. A. Vita. 2000. 'Antioxidants and the bioactivity of endothelium-derived nitric oxide', *Cardiovasc Res*, 47: 426-35.
- Tongers, J., J. G. Roncalli, and D. W. Losordo. 2010. 'Role of endothelial progenitor cells during ischemia-induced vasculogenesis and collateral formation', *Microvasc Res*, 79: 200-6.
- Tonini, T., F. Rossi, and P. P. Claudio. 2003. 'Molecular basis of angiogenesis and cancer', *Oncogene*, 22: 6549-56.
- Tousoulis, D., A. M. Kampoli, C. Tentolouris, N. Papageorgiou, and C. Stefanadis. 2012. 'The role of nitric oxide on endothelial function', *Curr Vasc Pharmacol*, 10: 4-18.
- Treps, L., and J. Gavard. 2015. '[Tumor angiogenesis: when the Tree of Life turns bad]', *Med Sci (Paris)*, 31: 989-95.
- Trpkovic, A., I. Resanovic, J. Stanimirovic, D. Radak, S. A. Mousa, D. Cenic-Milosevic, D. Jevremovic, and E. R. Isenovic. 2015. 'Oxidized low-density lipoprotein as a biomarker of cardiovascular diseases', *Crit Rev Clin Lab Sci*, 52: 70-85.
- Tufekci, K. U., M. G. Oner, R. L. Meuwissen, and S. Genc. 2014. 'The role of microRNAs in human diseases', *Methods Mol Biol*, 1107: 33-50.
- Turgeon, J., S. Dussault, P. Haddad, J. Groleau, C. Menard, S. E. Michaud, F. Maingrette, and A. Rivard. 2010. 'Probucol and antioxidant vitamins rescue ischemia-induced neovascularization in mice exposed to cigarette smoke: potential role of endothelial progenitor cells', *Atherosclerosis*, 208: 342-9.
- Turgeon, J., S. Dussault, F. Maingrette, J. Groleau, P. Haddad, G. Perez, and A. Rivard. 2013. 'Fish oil-enriched diet protects against ischemia by improving angiogenesis, endothelial progenitor cell function and postnatal neovascularization', *Atherosclerosis*, 229: 295-303.
- Turgeon, J., P. Haddad, S. Dussault, J. Groleau, F. Maingrette, G. Perez, and A. Rivard. 2012. 'Protection against vascular aging in Nox2-deficient mice: Impact on endothelial progenitor cells and reparative neovascularization', *Atherosclerosis*, 223: 122-9.
- Ucuzian, A. A., A. A. Gassman, A. T. East, and H. P. Greisler. 2010. 'Molecular Mediators of Angiogenesis', *J Burn Care Res*, 31: 158.
- Ulitsky, I., and D. P. Bartel. 2013. 'lincRNAs: genomics, evolution, and mechanisms', *Cell*, 154: 26-46.
- Umemura, T., J. Soga, T. Hidaka, H. Takemoto, S. Nakamura, D. Jitsuiki, K. Nishioka, C. Goto, H. Teragawa, M. Yoshizumi, K. Chayama, and Y. Higashi. 2008. 'Aging and hypertension are independent risk factors for reduced number of circulating endothelial progenitor cells', *Am J Hypertens*, 21: 1203-9.
- Urbich, C., A. Aicher, C. Heeschen, E. Dernbach, W. K. Hofmann, A. M. Zeiher, and S. Dimmeler. 2005. 'Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells', *J Mol Cell Cardiol*, 39: 733-42.
- Urbich, C., E. Dernbach, A. Aicher, A. M. Zeiher, and S. Dimmeler. 2002a. 'CD40 ligand inhibits endothelial cell migration by increasing production of endothelial reactive oxygen species', *Circulation*, 106: 981-6.
- Urbich, C., and S. Dimmeler. 2004. 'Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology', *Circ Res*, 95: 343-53.
- Urbich, C., A. Kuehbach, and S. Dimmeler. 2008. 'Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis', *Cardiovasc Res*, 79: 581-8.

- Van Belle, E., A. Rivard, D. Chen, M. Silver, S. Bunting, N. Ferrara, J. F. Symes, C. Bauters, and J. M. Isner. 1997. 'Hypercholesterolemia attenuates angiogenesis but does not preclude augmentation by angiogenic cytokines', *Circulation*, 96: 2667-74.
- van der Vorst, E. P. C., Y. Döring, and C. Weber. 2015. 'Chemokines and their receptors in Atherosclerosis', *J Mol Med (Berl)*, 93: 963-71.
- van der Zee, P. M., E. Biro, Y. Ko, R. J. de Winter, C. E. Hack, A. Sturk, and R. Nieuwland. 2006. 'P-selectin- and CD63-exposing platelet microparticles reflect platelet activation in peripheral arterial disease and myocardial infarction', *Clin Chem*, 52: 657-64.
- van Royen, Niels, Jan J. Piek, Ivo Buschmann, Imo Hofer, Michiel Voskuil, and Wolfgang Schaper. 2001. 'Stimulation of arteriogenesis; a new concept for the treatment of arterial occlusive disease', *Cardiovascular Research*, 49: 543-53.
- van Solingen, C., L. Seghers, R. Bijkerk, J. M. Duijs, M. K. Roeten, A. M. van Oeveren-Rietdijk, H. J. Baelde, M. Monge, J. B. Vos, H. C. de Boer, P. H. Quax, T. J. Rabelink, and A. J. van Zonneveld. 2009. 'Antagomir-mediated silencing of endothelial cell specific microRNA-126 impairs ischemia-induced angiogenesis', *J Cell Mol Med*, 13: 1577-85.
- van Solingen, Coen, Hetty C. de Boer, Roel Bijkerk, Matthieu Monge, Annemarie M. van Oeveren-Rietdijk, Leonard Seghers, Margreet R. de Vries, Eric P. van der Veer, Paul H. A. Quax, Ton J. Rabelink, and Anton Jan van Zonneveld. 2011. 'MicroRNA-126 modulates endothelial SDF-1 expression and mobilization of Sca-1+/Lin- progenitor cells in ischaemia', *Cardiovascular Research*, 92: 449-55.
- van Weel, V., M. de Vries, P. J. Voshol, R. E. Verloop, P. H. Eilers, V. W. van Hinsbergh, J. H. van Bockel, and P. H. Quax. 2006. 'Hypercholesterolemia reduces collateral artery growth more dominantly than hyperglycemia or insulin resistance in mice', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26: 1383-90.
- VanderLaan, P. A., C. A. Reardon, and G. S. Getz. 2004. 'Site specificity of atherosclerosis: site-selective responses to atherosclerotic modulators', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24: 12-22.
- Vasa, M., S. Fichtlscherer, A. Aicher, K. Adler, C. Urbich, H. Martin, A. M. Zeiher, and S. Dimmeler. 2001. 'Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease', *Circ Res*, 89: E1-7.
- Vasa-Nicotera, M., H. Chen, P. Tucci, A. L. Yang, G. Saintigny, R. Menghini, C. Mahe, M. Agostini, R. A. Knight, G. Melino, and M. Federici. 2011. 'miR-146a is modulated in human endothelial cell with aging', *Atherosclerosis*, 217: 326-30.
- Veliceasa, D., D. Biyashev, G. Qin, S. Misener, A. R. Mackie, R. Kishore, and O. V. Volpert. 2015. 'Therapeutic manipulation of angiogenesis with miR-27b', *Vasc Cell*, 7: 6.
- Verdecchia P, Angeli F, Mazzotta G, Gentile G, Reboldi G. The renin angiotensin system in the development of cardiovascular disease: role of aliskiren in risk reduction. *Vasc Health Risk Manag*. 2008;4(5):971-81.
- Vergadi, E., K. Vaporidi, E. E. Theodorakis, C. Doxaki, E. Lagoudaki, E. Ieronymaki, V. I. Alexaki, M. Helms, E. Kondili, B. Soennichsen, E. N. Stathopoulos, A. N. Margioris, D. Georgopoulos, and C. Tsatsanis. 2014. 'Akt2 deficiency protects from acute lung injury via alternative macrophage activation and miR-146a induction in mice', *J Immunol*, 192: 394-406.
- Vergeer, M., A. G. Holleboom, J. J. P. Kastelein, and J. A. Kuivenhoven. 2010. 'The HDL hypothesis: does high-density lipoprotein protect from atherosclerosis?', *J Lipid Res*, 51: 2058-73.
- Vestweber, Dietmar. 2015. 'How leukocytes cross the vascular endothelium', *Nat Rev Immunol*, 15: 692-704.

- Vickers, K. C., S. R. Landstreet, M. G. Levin, B. M. Shoucri, C. L. Toth, R. C. Taylor, B. T. Palmisano, F. Tabet, H. L. Cui, K. A. Rye, P. Sethupathy, and A. T. Remaley. 2014. 'MicroRNA-223 coordinates cholesterol homeostasis', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111: 14518-23.
- Vladimirova-Kitova, L., T. Deneva, E. Angelova, F. Nikolov, B. Marinov, and N. Mateva. 2008. 'Relationship of asymmetric dimethylarginine with flow-mediated dilatation in subjects with newly detected severe hypercholesterolemia', *Clin Physiol Funct Imaging*, 28: 417-25.
- Vlassara, H., M. Brownlee, K. R. Manogue, C. A. Dinarello, and A. Pasagian. 1988. 'Cachectin/TNF and IL-1 induced by glucose-modified proteins: role in normal tissue remodeling', *Science*, 240: 1546-8.
- Volpe, M., C. Savoia, P. De Paolis, B. Ostrowska, D. Tarasi, and S. Rubattu. 2002. 'The renin-angiotensin system as a risk factor and therapeutic target for cardiovascular and renal disease', *J Am Soc Nephrol*, 13 Suppl 3: S173-8.
- von der Thusen, J. H., J. Kuiper, T. J. van Berkel, and E. A. Biessen. 2003. 'Interleukins in atherosclerosis: molecular pathways and therapeutic potential', *Pharmacol Rev*, 55: 133-66.
- von Eckardstein, A. 2005. 'Risk factors for atherosclerotic vascular disease', *Handb Exp Pharmacol*: 71-105.
- Wadhwa, R. K., D. L. Steen, I. Khan, R. P. Giugliano, and J. M. Foody. 2016. 'A review of low-density lipoprotein cholesterol, treatment strategies, and its impact on cardiovascular disease morbidity and mortality', *J Clin Lipidol*, 10: 472-89.
- Wagschal, A., S. H. Najafi-Shoushtari, L. Wang, L. Goedeke, S. Sinha, A. S. deLemos, J. C. Black, C. M. Ramirez, Y. Li, R. Tewhey, I. Hatoum, N. Shah, Y. Lu, F. Kristo, N. Psychogios, V. Vrbanac, Y. C. Lu, T. Hla, R. de Cabo, J. S. Tsang, E. Schadt, P. C. Sabeti, S. Kathiresan, D. E. Cohen, J. Whetstine, R. T. Chung, C. Fernandez-Hernando, L. M. Kaplan, A. Bernards, R. E. Gerszten, and A. M. Naar. 2015. 'Genome-wide identification of microRNAs regulating cholesterol and triglyceride homeostasis', *Nat Med*, 21: 1290-7.
- Walldius, G., and I. Jungner. 2007. 'Apolipoprotein A-I versus HDL cholesterol in the prediction of risk for myocardial infarction and stroke', *Curr Opin Cardiol*, 22: 359-67.
- Walldius, G., I. Jungner, A. H. Aastveit, I. Holme, C. D. Furberg, and A. D. Sniderman. 2004. 'The apoB/apoA-I ratio is better than the cholesterol ratios to estimate the balance between plasma proatherogenic and antiatherogenic lipoproteins and to predict coronary risk', *Clin Chem Lab Med*, 42: 1355-63.
- Walpola, P. L., A. I. Gotlieb, M. I. Cybulsky, and B. L. Langille. 1995. 'Expression of ICAM-1 and VCAM-1 and monocyte adherence in arteries exposed to altered shear stress', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 15: 2-10.
- Wang, F., X. Ren, and X. Zhang. 2015. 'Role of microRNA-150 in solid tumors', *Oncol Lett*, 10: 11-16.
- Wang, G. K., J. Q. Zhu, J. T. Zhang, Q. Li, Y. Li, J. He, Y. W. Qin, and Q. Jing. 2010. 'Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans', *Eur Heart J*, 31: 659-66.
- Wang, H. D., S. Xu, D. G. Johns, Y. Du, M. T. Quinn, A. J. Cayatte, and R. A. Cohen. 2001. 'Role of NADPH oxidase in the vascular hypertrophic and oxidative stress response to angiotensin II in mice', *Circ Res*, 88: 947-53.
- Wang, Julie C., and Martin Bennett. 2012. 'Aging and Atherosclerosis', *Mechanisms, Functional Consequences, and Potential Therapeutics for Cellular Senescence*, 111: 245-59.

- Wang, S., A. B. Aurora, B. A. Johnson, X. Qi, J. McAnally, J. A. Hill, J. A. Richardson, R. Bassel-Duby, and E. N. Olson. 2008a. 'An Endothelial-specific microRNA Governs Vascular Integrity and Angiogenesis', *Dev Cell*, 15: 261-71.
- Wang, S., and E. N. Olson. 2009. 'AngiomiRs—Key Regulators of Angiogenesis', *Curr Opin Genet Dev*, 19: 205-11.
- Wang, Z., S. Brandt, A. Medeiros, S. Wang, H. Wu, A. Dent, and C. H. Serezani. 2015. 'MicroRNA 21 is a homeostatic regulator of macrophage polarization and prevents prostaglandin E2-mediated M2 generation', *PLoS One*, 10: e0115855.
- Wang, Z., M. Gerstein, and M. Snyder. 2009. 'RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics', *Nat Rev Genet*, 10: 57-63.
- Wang, Zhe, Hongqiu Li, Ran Guo, Qiushi Wang, and Dianbao Zhang. 2016. 'Antioxidants inhibit advanced glycosylation end-product-induced apoptosis by downregulation of miR-223 in human adipose tissue-derived stem cells', 6: 23021.
- Wautier, J. L., C. Zoukourian, O. Chappey, M. P. Wautier, P. J. Guillausseau, R. Cao, O. Hori, D. Stern, and A. M. Schmidt. 1996. 'Receptor-mediated endothelial cell dysfunction in diabetic vasculopathy. Soluble receptor for advanced glycation end products blocks hyperpermeability in diabetic rats', *J Clin Invest*, 97: 238-43.
- Wautier, M. P., F. J. Tessier, and J. L. Wautier. 2014. 'Les produits de glycation avancée : un risque pour la santé humaine', *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 72: 400-08.
- Weber, M., M. B. Baker, R. S. Patel, A. A. Quyyumi, G. Bao, and C. D. Searles. 2011a. 'MicroRNA Expression Profile in CAD Patients and the Impact of ACEI/ARB', *Cardiol Res Pract*, 2011: 532915.
- Weimar, I. S., N. Miranda, E. J. Muller, A. Hekman, J. M. Kerst, G. C. de Gast, and W. R. Gerritsen. 1998. 'Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) is produced by human bone marrow stromal cells and promotes proliferation, adhesion and survival of human hematopoietic progenitor cells (CD34+)', *Exp Hematol*, 26: 885-94.
- Weis, S., J. Cui, L. Barnes, and D. Cheresch. 2004. 'Endothelial barrier disruption by VEGF-mediated Src activity potentiates tumor cell extravasation and metastasis', *J Cell Biol*, 167: 223-9.
- Werner, Nikos, and Georg Nickenig. 2006. 'Influence of Cardiovascular Risk Factors on Endothelial Progenitor Cells', *Limitations for Therapy?*, 26: 257-66.
- Wheeler, D. L., M. Iida, and E. F. Dunn. 2009. 'The Role of Src in Solid Tumors', *Oncologist*, 14: 667-78.
- Whitman, S. C., P. Ravisankar, H. Elam, and A. Daugherty. 2000. 'Exogenous interferon-gamma enhances atherosclerosis in apolipoprotein E^{-/-} mice', *Am J Pathol*, 157: 1819-24.
- Widlansky, M. E., N. Gokce, J. F. Keaney, Jr., and J. A. Vita. 2003. 'The clinical implications of endothelial dysfunction', *J Am Coll Cardiol*, 42: 1149-60.
- Wietecha, Mateusz S., Wendy L. Cerny, and Luisa A. DiPietro. 2013. 'Mechanisms of Vessel Regression: Toward an Understanding of the Resolution of Angiogenesis.' in Ellen Heber-Katz and David L. Stocum (eds.), *New Perspectives in Regeneration* (Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg).
- Willerson, J. T., and P. M. Ridker. 2004a. 'Inflammation as a cardiovascular risk factor', *Circulation*, 109: I12-10.
- Williams, K. J., and I. Tabas. 1995. 'The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 15: 551-61.

- Williamson, K., Sally Stringer, and Yvonne Alexander. 2012. *Endothelial Progenitor Cells Enter the Aging Arena*.
- Willis, Lauren M., Azza B. El-Remessy, Payaningal R. Somanath, David L. Deremer, and Susan C. Fagan. 2011b. 'Angiotensin receptor blockers and angiogenesis: clinical and experimental evidence', *Clinical Science*, 120: 307-19.
- Wilson, P. W. 1994. 'Established risk factors and coronary artery disease: the Framingham Study', *Am J Hypertens*, 7: 7S-12S.
- Winter, J., S. Jung, S. Keller, R. I. Gregory, and S. Diederichs. 2009. 'Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation', *Nat Cell Biol*, 11: 228-34.
- Wu, J., S. Xia, B. Kalionis, W. Wan, and T. Sun. 2014. 'The Role of Oxidative Stress and Inflammation in Cardiovascular Aging', *Biomed Res Int*, 2014.
- Wu, K. K., and P. Thiagarajan. 1996. 'Role of endothelium in thrombosis and hemostasis', *Annu Rev Med*, 47: 315-31.
- Xie, Y., R. Shu, S. Jiang, Z. Song, Q. Guo, J. Dong, and Z. Lin. 2014. 'miRNA-146 negatively regulates the production of pro-inflammatory cytokines via NF- κ B signalling in human gingival fibroblasts', *J Inflamm (Lond)*, 11.
- Xu, C., C. K. Zarins, and S. Glagov. 2001. 'Aneurysmal and occlusive atherosclerosis of the human abdominal aorta', *J Vasc Surg*, 33: 91-6.
- Xu, S., S. Ogura, J. Chen, P. J. Little, J. Moss, and P. Liu. 2013. 'LOX-1 in atherosclerosis: biological functions and pharmacological modifiers', *Cell Mol Life Sci*, 70: 2859-72.
- Yan, B., and Z. Wang. 2012. 'Long noncoding RNA: its physiological and pathological roles', *DNA Cell Biol*, 31 Suppl 1: S34-41.
- Yan, S. D., A. M. Schmidt, G. M. Anderson, J. Zhang, J. Brett, Y. S. Zou, D. Pinsky, and D. Stern. 1994. 'Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins', *J Biol Chem*, 269: 9889-97.
- Yang, D., S. G. Elner, Z. M. Bian, G. O. Till, H. R. Petty, and V. M. Elner. 2007. 'Pro-inflammatory Cytokines Increase Reactive Oxygen Species through Mitochondria and NADPH Oxidase in Cultured RPE Cells', *Exp Eye Res*, 85: 462-72.
- Yang, K., Y. S. He, X. Q. Wang, L. Lu, Q. J. Chen, J. Liu, Z. Sun, and W. F. Shen. 2011. 'MiR-146a inhibits oxidized low-density lipoprotein-induced lipid accumulation and inflammatory response via targeting toll-like receptor 4', *FEBS Lett*, 585: 854-60.
- Yang, W. J., D. D. Yang, S. Na, G. E. Sandusky, Q. Zhang, and G. Zhao. 2005. 'Dicer is required for embryonic angiogenesis during mouse development', *J Biol Chem*, 280: 9330-5.
- Yang, Y. M., A. Huang, G. Kaley, and D. Sun. 2009. 'eNOS uncoupling and endothelial dysfunction in aged vessels', *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 297: H1829-36.
- Ye, Y., Z. Hu, Y. Lin, C. Zhang, and J. R. Perez-Polo. 2010. 'Downregulation of microRNA-29 by antisense inhibitors and a PPAR-gamma agonist protects against myocardial ischaemia-reperfusion injury', *Cardiovasc Res*, 87: 535-44.
- Yilmaz, M. I., Y. Baykal, M. Kilic, A. Sonmez, F. Bulucu, A. Aydin, A. Sayal, and I. H. Kocar. 2004. 'Effects of statins on oxidative stress', *Biol Trace Elem Res*, 98: 119-27.

- Ylä-Herttua, Seppo, Charles Bridges, Michael G. Katz, and Petra Korpisalo. 2017. 'Angiogenic gene therapy in cardiovascular diseases: dream or vision?', *European Heart Journal*, 38: 1365-71.
- Yu, Xiao-Hua, Yu-Chang Fu, Da-Wei Zhang, Kai Yin, and Chao-Ke Tang. 2013. 'Foam cells in atherosclerosis', *Clinica Chimica Acta*, 424: 245-52.
- Yuan, S.Y., and R.R. Rigor. 2011. *Regulation of Endothelial Barrier Function* (Morgan & Claypool Life Sciences).
- Zachary, I., and R. D. Morgan. 2011. 'Therapeutic angiogenesis for cardiovascular disease: biological context, challenges, prospects', *Heart*, 97: 181-9.
- Zajac, E., B. Schweighofer, T. A. Kupriyanova, A. Juncker-Jensen, P. Minder, J. P. Quigley, and E. I. Deryugina. 2013. 'Angiogenic capacity of M1- and M2-polarized macrophages is determined by the levels of TIMP-1 complexed with their secreted proMMP-9', *Blood*, 122: 4054-67.
- Zaragoza, Carlos, Carmen Gomez-Guerrero, Jose Luis Martin-Ventura, Luis Blanco-Colio, Bego Lavin, #xf1, Be Mallavia, #xf1, at, Carlos Tarin, Sebastian Mas, Alberto Ortiz, and Jesus Egido. 2011. 'Animal Models of Cardiovascular Diseases', *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011: 13.
- Zarins, C. K., M. A. Zatina, D. P. Giddens, D. N. Ku, and S. Glagov. 1987. 'Shear stress regulation of artery lumen diameter in experimental atherogenesis', *J Vasc Surg*, 5: 413-20.
- Zernecke, Alma, and Christian Weber. 2014. 'Chemokines in Atherosclerosis', *Proceedings Resumed*, 34: 742-50.
- Zhang, C. 2008. 'The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction', *Basic Res Cardiol*, 103: 398-406.
- Zhang, C., X. Xu, B. J. Potter, W. Wang, L. Kuo, L. Michael, G. J. Bagby, and W. M. Chilian. 2006. 'TNF-alpha contributes to endothelial dysfunction in ischemia/reperfusion injury', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26: 475-80.
- Zhang, H., Y. Park, J. Wu, Xp Chen, S. Lee, J. Yang, K. C. Dellsperger, and C. Zhang. 2009. 'Role of TNF-alpha in vascular dysfunction', *Clin Sci (Lond)*, 116: 219-30.
- Zhang, M., and L. Jiang. 2016. 'Oxidized low-density lipoprotein decreases VEGFR2 expression in HUVECs and impairs angiogenesis', *Exp Ther Med*, 12: 3742-8.
- Zhang, M., and A. M. Shah. 2014. 'ROS signalling between endothelial cells and cardiac cells', *Cardiovasc Res*, 102: 249-57.
- Zhang, W., Y. Han, G. Meng, W. Bai, L. Xie, H. Lu, Y. Shao, L. Wei, S. Pan, S. Zhou, Q. Chen, A. Ferro, and Y. Ji. 2014. 'Direct renin inhibition with aliskiren protects against myocardial ischemia/reperfusion injury by activating nitric oxide synthase signaling in spontaneously hypertensive rats', *J Am Heart Assoc*, 3: e000606.
- Zhang, W., L. Yan, Y. Li, W. Chen, N. Hu, H. Wang, and H. Ou. 2015. 'Roles of miRNA-24 in regulating endothelial nitric oxide synthase expression and vascular endothelial cell proliferation', *Mol Cell Biochem*, 405: 281-9.
- Zhang, X., W. L. Ng, P. Wang, L. L. Tian, E. Werner, H. Wang, P. Doetsch, and Y. Wang. 2012. 'MicroRNA-21 Modulates the Levels of Reactive Oxygen Species Levels by Targeting SOD3 and TNF α ', *Cancer Res*, 72: 4707-13.

- Zhang, Y., D. Liu, X. Chen, J. Li, L. Li, Z. Bian, F. Sun, J. Lu, Y. Yin, X. Cai, Q. Sun, K. Wang, Y. Ba, Q. Wang, D. Wang, J. Yang, P. Liu, T. Xu, Q. Yan, J. Zhang, K. Zen, and C. Y. Zhang. 2010. 'Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration', *Mol Cell*, 39: 133-44.
- Zhang, Y., W. Qin, L. Zhang, X. Wu, N. Du, Y. Hu, X. Li, N. Shen, D. Xiao, H. Zhang, Z. Li, Y. Zhang, H. Yang, F. Gao, Z. Du, C. Xu, and B. Yang. 2015. 'MicroRNA-26a prevents endothelial cell apoptosis by directly targeting TRPC6 in the setting of atherosclerosis', *Sci Rep*, 5.
- Zhang, Y., Z. Wang, and R. A. Gemeinhart. 2013. 'Progress in MicroRNA Delivery', *J Control Release*, 172: 962-74.
- Zhao, T., J. Li, and A. F. Chen. 2010. 'MicroRNA-34a induces endothelial progenitor cell senescence and impedes its angiogenesis via suppressing silent information regulator 1', *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 299: E110-6.
- Zhao, X., and J. L. Guan. 2011. 'Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis', *Adv Drug Deliv Rev*, 63: 610-5.
- Zhao, X., D. Qian, N. Wu, Y. Yin, J. Chen, B. Cui, and L. Huang. 2010. 'The spleen recruits endothelial progenitor cell via SDF-1/CXCR4 axis in mice', *J Recept Signal Transduct Res*, 30: 246-54.
- Zhao, Y., D. McLaughlin, E. Robinson, A. P. Harvey, M. B. Hookham, A. M. Shah, B. J. McDermott, and D. J. Grieve. 2010. 'Nox2 NADPH oxidase promotes pathologic cardiac remodeling associated with Doxorubicin chemotherapy', *Cancer Res*, 70: 9287-97.
- Zheng, H., G. Fu, T. Dai, and H. Huang. 2007. 'Migration of endothelial progenitor cells mediated by stromal cell-derived factor-1alpha/CXCR4 via PI3K/Akt/eNOS signal transduction pathway', *J Cardiovasc Pharmacol*, 50: 274-80.
- Zheng, Y., and Z. Xu. 2014. 'MicroRNA-22 induces endothelial progenitor cell senescence by targeting AKT3', *Cell Physiol Biochem*, 34: 1547-55.
- Zimna, A., and M. Kurpisz. 2015. 'Hypoxia-Inducible Factor-1 in Physiological and Pathophysiological Angiogenesis: Applications and Therapies', *Biomed Res Int*, 2015.
- Zizzo, G., B. A. Hilliard, M. Monestier, and P. L. Cohen. 2012. 'Efficient clearance of early apoptotic cells by human macrophages requires M2c polarization and MerTK induction', *J Immunol*, 189: 3508-20.
- Zoungas, S., A. J. Curtis, J. J. McNeil, and A. M. Tonkin. 2014. 'Treatment of dyslipidemia and cardiovascular outcomes: the journey so far--is this the end for statins?', *Clin Pharmacol Ther*, 96: 192-205.
- Zuo, K., M. Li, X. Zhang, C. Lu, S. Wang, K. Zhi, and B. He. 2015. 'MiR-21 suppresses endothelial progenitor cell proliferation by activating the TGFβ signaling pathway via downregulation of WWP1', *Int J Clin Exp Pathol*, 8: 414-22.