

Université de Montréal

**Limiter la production d'angiopoïétine-like 2 vasculaire prévient
le développement de l'athérosclérose associé à la sénescence
endothéliale**

Par

Laurie Caland

Département de pharmacologie et physiologie, Faculté de médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maitrise
en pharmacologie

Juin 2020

© Laurie Caland, 2020

Université de Montréal

Département de pharmacologie et physiologie, Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé

**Limiter la production d'angiopoïétine-like 2 vasculaire prévient le développement de
l'athérosclérose associé à la sénescence endothéliale**

Présenté par

Laurie Caland

A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes

Angelo Calderone

Président-rapporteur

Éric Thorin

Directeur de recherche

Gerardo Ferbeyre

Codirecteur

Sylvie Marleau

Membre du jury

Résumé

Le vieillissement est la conséquence de la dégradation progressive des fonctions de l'organisme menant à la mort. Les altérations accumulées au cours du vieillissement favorisent l'apparition de maladies liées à l'âge dont les maladies cardiovasculaires. La sénescence est le processus cellulaire sous-jacent au vieillissement et à l'origine du déclin de l'organisme. Les cellules sénescents perdent leur capacité à proliférer mais elles restent métaboliquement actives en sécrétant un cocktail de molécules impliquées dans l'inflammation chronique et la progression des maladies liées à l'âge dont l'athérosclérose. L'angiopoïétine-like 2 (Angptl2) est une protéine pro-inflammatoire et anti-apoptotique directement impliquée dans le développement de l'athérosclérose et sécrétée par les cellules sénescents. Dans cette optique, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle une inhibition de l'Angptl2 vasculaire serait propice à une atténuation de l'athérogenèse associée à la sénescence endothéliale. L'objectif a donc été d'étudier les effets bénéfiques d'une réduction de l'Angptl2 *in vivo* dans le développement de l'athérosclérose et la sénescence endothéliale chez des souris sévèrement dyslipidémiques (LDLr^{-/-}; hApoB100^{+/+}). À l'aide d'un virus adeno-associé de sérotype 1 vecteur d'un petit ARN en épingle à cheveux dirigé contre l'Angptl2 (AAV1-shAngptl2), nous avons montré qu'un blocage de l'expression de l'Angptl2 vasculaire a diminué la taille des plaques d'athérome de 58% dans l'aorte thoracique des souris. Ces résultats s'expliquent par une diminution de la sénescence, du recrutement des monocytes et de l'inflammation dans l'endothélium ainsi qu'une diminution de l'inflammation et de l'infiltration des macrophages dans la média de la paroi artérielle. De plus, nous avons montré que dans les jours qui suivent l'administration du AAV1-shAngptl2, les cellules endothéliales sénescents sont éliminées par apoptose ce qui favorise le recrutement de cellules endothéliales progénitrices destinées à renouveler l'endothélium, contribuant ainsi à une réduction de l'athérogenèse. Ces résultats démontrant le lien entre l'Angptl2 et la sénescence dans l'athérosclérose ont été validés par des données cliniques qui montrent que les niveaux d'expression vasculaire de l'Angptl2 corrèlent avec ceux du marqueur de sénescence p21 dans les artères mammaires de patients coronariens. Notre étude suggère donc que l'inhibition de l'Angptl2 vasculaire pourrait être une nouvelle approche sénolytique dans le but de réduire l'athérosclérose.

Mots-clés : Angiopoïétine-like 2, sénescence, athérosclérose, vieillissement, AAV1-shAngptl2, endothélium, inflammation, apoptose, sénolytique

Abstract

Aging is associated with progressive deterioration of the organism functions leading to death. Accumulated alterations in aging favor the appearance of age-related diseases including cardiovascular diseases. Senescence is the cellular process underlying aging and the cause of organism decline. Senescent cells lose their ability to proliferate but remain metabolically active by secreting a cocktail of molecules involved in chronic inflammation and progression of age-related diseases such as atherosclerosis. Angiopoietin-like 2 (Angptl2) is a pro-inflammatory and an anti-apoptotic protein involved in the development of atherosclerosis and secreted by senescent cells. In this light, we hypothesized that an inhibition of vascular Angptl2 would be conducive to an attenuation of atherogenesis associated to endothelial senescence. The aim of my project was to study the beneficial effects of an *in vivo* reduction of Angptl2 in the development of atherosclerosis and endothelial senescence in severely dyslipidemic mice (LDLr^{-/-}; hApoB100^{+/+}). Using a serotype 1 adeno-associated virus containing a short hairpin ARN against Angptl2 (AAV1-shAngptl2), we showed that blocking the expression of vascular Angptl2 decreased plaque size by 58% in the thoracic aorta of mice. These results are explained by a decrease in senescence, recruitment of monocytes and lower inflammation in the endothelium as well as a decrease in inflammation and infiltration of macrophages in the media of arterial wall. In addition, few days after the administration of AAV1-shAngptl2, we showed that senescent endothelial cells are eliminated by apoptosis, which in turn promotes the recruitment of endothelial progenitor cells in order to renew the endothelium, collectively contributing to a reduction of atherogenesis. These results demonstrate a link between Angptl2 and senescence in atherosclerosis, and they were validated by clinical data showing that vascular expression levels of Angptl2 correlates with the expression of the senescence marker p21 in the mammary arteries of patients with coronary artery disease. In conclusion, our study suggests that inhibition of vascular Angptl2 could be a new senolytic pathway to reduce atherosclerosis.

Keywords: Angiopoietin-like 2, senescence, atherosclerosis, aging, AAV1-shAngptl2, endothelium, inflammation, apoptosis, senolytic

Table des matières

Résumé	1
Abstract	3
Table des matières	5
Liste des figures	7
Liste des sigles et abréviations	9
Remerciements	13
Chapitre 1 – Le vieillissement.....	15
1.1. L’espérance de vie et les facteurs pouvant la moduler.....	15
1.1.1. L’espérance de vie et l’espérance de vie en santé au Canada	16
1.1.2. Amélioration de l’espérance de vie par des facteurs extrinsèques	16
1.1.2.1. <i>La restriction calorique</i>	16
1.1.2.2. <i>La diète</i>	17
1.1.2.3. <i>L’activité physique</i>	17
1.2. Le vieillissement physiologique et ses conséquences	18
1.2.1. Immunosénescence.....	18
1.2.2. Inflammation liée à l’âge ou <i>inflammaging</i>	19
1.3. Le vieillissement vasculaire et ses conséquences	19
1.3.1. Développement de l’athérosclérose	20
1.3.2. L’athérosclérose et ses complications	21
1.3.3. L’athérosclérose et ses traitements pharmacologiques	22
Chapitre 2 – La sénescence	23
2.1. Caractéristiques des cellules sénescents.....	23
2.1.1. Arrêt de croissance permanent	23

2.1.2. Phénotype sécrétoire associé à la sénescence	25
2.1.3. Résistance à l'apoptose	26
2.2. Rôle pathologique dans le vieillissement et les maladies liées à l'âge	26
2.2.1. Preuve de concept sur des modèles de souris transgéniques.....	26
2.2.2. Sénescence vasculaire et athérosclérose	27
2.3. Les sénotherapies	28
2.3.1. Les sénolytiques	28
2.3.2. Les sénomorphiques.....	29
2.3.3. L'immunothérapie.....	30
Chapitre 3 – L'Angiopoïétine-like 2	33
3.1. Rôle pathologique dans le vieillissement et les maladies liées à l'âge	33
3.1.1. Incidence dans les maladies cardiovasculaires.....	34
3.1.1.1. <i>Angiopoïétine-like 2 et athérogenèse</i>	35
3.2. Contribution dans la sénescence	36
Chapitre 4 – Hypothèse et objectifs	39
Chapitre 5 – Article publié.....	41
Chapitre 6 – Discussion.....	61
Chapitre 7 – Conclusion et perspectives	67
Références bibliographiques	69

Liste des figures

Figure 1: Activation des voies de la sénescence par des dommages à l'ADN causés par divers signaux. p 24

Figure 2 : Mécanisme d'action des sénolytiques et des sénomorphiques dans une cellule sénescence. p 30

Figure 3 : Approche sénolytique par le blocage de l'expression de l'Angptl2 dans une cellule endothéliale sénescence. p 62

Liste des sigles et abréviations

AAV : *Adeno-associated virus*

ADN : Acide désoxyribonucléique

Angptl2 : Angiopoïétine-like 2

ARN : Acide ribonucléique

ATL : Athérosclérose

ATM : *Ataxia Telangiectasia Mutated*

ATR: *Ataxia Telangiectasia and Rad3-related*

CCL2 : *Chemokine ligand 2*

CDK : *Cyclin-dependent kinase*

CE : Cellules endothéliales

eNOS: *Endothelial nitric oxide synthase*

ERK1/2: *Extracellular signal-regulated kinases 1/2*

EV : Espérance de vie

EVS : Espérance de vie en santé

FKBP: *FK506 binding protein*

FOXC2: *Forkhead box protein C2*

FOXO4: *Forkhead box protein O4*

FOXO4-DRI: *Forkhead box protein O4 D-retro inverso*

HDL: *High density lipoprotein*

HSP90: *Heat shock protein 90*

ICAM1 : *Intracellular adhesion molecule 1*

IL: Interleukine

INK-ATTAC: *INK-linked apoptosis through targeted activation of caspase*

LDL: *Low density lipoprotein*

LILRB2: *Leukocyte immunoglobulin receptor B2*

MCV : Maladies cardiovasculaires

MDM2 : *Murine double minute 2*

MLA : Maladies liées à l'âge

mTOR: *Mechanistic target of Rapamycin*

NF- κ B: *Nuclear factor kappa B*

NO: *nitric oxide*

PAI-1: *Plasminogen activator inhibitor-1*

PI3K: Phosphoinositide-3-kinase

PIRB: *Paired Ig-like receptor B*

PPAR: *Peroxisome proliferator-activated receptor*

PSAS : Phénotype sécrétoire associé à la sénescence

shRNA: *Short hairpin ribonucleic acid*

SIRP α : *Signal regulatory protein α*

TG: Triglycérides

VCAM1: *Vascular cell adhesion molecule 1*

À ma fille Lina, ma source de motivation qui anime et embellit mon quotidien,

À mon mari Brahim, pour son amour et son appui,

À mes parents, Patricia et Fabrice, aucune dédicace ne pourrait exprimer la gratitude et l'amour que je leur porte pour la dynamique familiale au sein de laquelle je me suis épanouie et pour leur constant soutien tout au long de mon cursus scolaire et universitaire. Je les félicite pour leur réussite dans le métier le plus incertain, celui d'être parent.

Remerciements

Je souhaiterais remercier le Dr Éric Thorin pour m'avoir engagé dans son laboratoire et m'avoir permis de développer ce projet qui m'a beaucoup plu et dans lequel je me suis beaucoup investie. Le Dr Éric Thorin est un directeur de recherche qui laisse une marge de manœuvre à ses étudiants en toute confiance, ce qui m'a permis de travailler dans un climat non oppressant.

Je remercie Nathalie pour sa gentillesse, son efficacité et sa patience envers les nombreuses relectures de mes travaux.

Une pensée également pour Maya Mamarbachi, une personne d'une grande sagesse et très compétente. Ses bons conseils m'ont permis d'avancer efficacement dans mes expériences.

Merci au Dr Gerardo Ferbeyre, mon co-directeur, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire à l'Université de Montréal durant la dernière année de mon cursus.

Je tiens également à remercier Véronique Bourdeau, associée de recherche dans le laboratoire du Dr Gerardo Ferbeyre, pour le temps qu'elle a accordé à ma formation et au suivi de mes expériences. Véronique est une personne douce, agréable et serviable. J'ai tout autant apprécié le reste de l'équipe, une grande famille soudée dans laquelle j'ai été rapidement intégrée.

Merci à Pauline Labbé pour sa complicité et son amitié ainsi qu'à tous les autres membres que j'ai pu rencontrer dans le laboratoire du Dr Éric Thorin, Olivia, Adeline, Pauline Mury, Anthony, Albert, Alexandre et les stagiaires qui nous ont fait beaucoup rire.

Et je n'oublie pas les filles de l'animalerie, Natacha et Marie-Ève, sans qui mon projet n'aurait pas abouti puisqu'elles étaient les expertes de l'injection caudale chez la souris.

Enfin, je remercie le Dr Angelo Calderone et son assistante de laboratoire, Vanessa, pour m'avoir sollicité afin de leur partager mon savoir-faire dans la production des virus et pour m'avoir gratifié en m'intégrant dans leur étude.

Chapitre 1 – Le vieillissement

D'un point de vue biologique, le vieillissement est la conséquence d'une accumulation de dommages cellulaires et moléculaires entraînant une dégradation progressive des capacités physiques et mentales, une accumulation de dommages au niveau des organes, une vulnérabilité accrue au risque de maladies et enfin, le décès (1). Le vieillissement chronologique est associé à un état de fragilité (vulnérabilité au stress, sarcopénie et cachexie) prédisposant ainsi les personnes âgées aux maladies chroniques liées à l'âge (MLA) et à la perte d'autonomie ayant un impact négatif sur leur qualité de vie et sur le coût associé au niveau des systèmes de santé (2,3). Dans ce chapitre, j'introduirai le vieillissement de manière générale par des données de santé publique concernant l'écart entre l'espérance de vie (EV) et l'espérance de vie en santé (EVS) au Canada, et par les facteurs extrinsèques qui peuvent améliorer l'EV. Dans une seconde partie, j'aborderai les conséquences du vieillissement physiologique en insistant sur la détérioration du système immunitaire et l'inflammation chronique liée à l'âge. Et enfin, dans une dernière partie je présenterai l'impact du vieillissement au niveau vasculaire, illustré par l'exemple de l'athérosclérose.

1.1. L'espérance de vie et les facteurs pouvant la moduler

Aujourd'hui les personnes vivent plus longtemps, avec une EV supérieure à 60 ans pour la plupart (4). D'après l'Organisation Mondiale de la Santé, en 2015, 900 millions de personnes étaient âgées d'au moins 60 ans et 125 millions étaient âgées d'au moins 80 ans. Par ailleurs, la proportion de personnes âgées de 60 ans et plus pourrait doubler jusqu'en 2050 (4). Cette augmentation de l'EV est due à l'amélioration des règles d'hygiène et de salubrité et aux progrès de la médecine, en particulier la découverte des antibiotiques par Fleming et des vaccins par Louis Pasteur. L'EV a depuis connu une augmentation constante, passant de 30 ans en 1750 à près de 80 ans dans les sociétés occidentales (5,6). Toutefois, vieillir plus longtemps ne veut pas nécessairement dire vieillir en santé : l'augmentation de l'EV est généralement associée à des pathologies chroniques qui sont délétères pour le patient et ses proches et entraînent une surcroissance des dépenses de santé publique.

1.1.1. L'espérance de vie et l'espérance de vie en santé au Canada

Au Canada, l'EV à la naissance a augmenté de 11 années entre 1960 et 2017 pour se situer à 82.47 ans (7). Malgré cette amélioration au fil des années, l'augmentation du nombre d'années de vie ne nous renseigne pas sur la qualité de vie. Or, la manière dont elle suit l'expansion de l'EV est un important indicateur de la santé (8). L'EVS représente le nombre moyen d'années qu'une personne peut s'attendre à vivre en bonne santé en fonction des conditions actuelles de morbidité et de mortalité. La morbidité, indicateur de la qualité de vie (9), est estimée au moyen de l'indice de l'état de santé (Health Utilities Index Mark 3 [HUI3]) incluant huit caractères sur l'état de santé, à savoir la vision, l'ouïe, la parole, la mobilité, la dextérité, l'émotion, la cognition et la douleur (10). Au Canada, une étude récente réalisée chez des personnes vivant à domicile et dans des établissements de santé, a montré que l'écart entre les hommes et les femmes sur les années d'EV et d'EVS a diminué au fil des années (11). Par ailleurs, une augmentation du ratio de l'EVS et de l'EV (pourcentage d'années vécues en bonne santé fonctionnelle) entre 1994-1995 et 2015 montre que pour toutes les tranches d'âge et toutes les périodes, les hommes ont tendance à vivre en meilleure santé que les femmes. Malgré des écarts de l'EV et de l'EVS entre les hommes et les femmes, ceux-ci ont diminué au fil des années (11). Ceci s'expliquerait par une baisse de morts violentes chez les adolescents et jeunes adultes masculins, un meilleur traitement des maladies cardiovasculaires (MCV) et une plus grande similarité entre le comportement des hommes et des femmes (tabagisme, consommation d'alcool, stress lié au travail) (12). Le but des recherches actuelles est donc d'élucider le lien entre le vieillissement et les maladies associées afin d'améliorer l'EVS, de retarder la prise en charge médicale et par conséquent, de réduire les dépenses qui en découlent.

1.1.2. Amélioration de l'espérance de vie par des facteurs extrinsèques

1.1.2.1. La restriction calorique

Bien que non établi chez l'homme, la restriction calorique prolonge l'EV et retarde l'incidence des MLA dans les modèles animaux (13). Le mécanisme à l'origine de ces faits serait dû à une diminution du métabolisme conduisant à la désactivation de *mechanistic target of rapamycin* (mTOR) (14) et par conséquent, à une diminution de la synthèse protéique. mTOR

contribue également à la longévité cellulaire (15) en régulant l'autophagie via l'activation de Sirtuine 1, un gène de longévité (16,17). Par exemple, le composé polyphénolique Resveratrol est un puissant activateur de Sirtuine 1 qui imite les effets de la restriction calorique en augmentant l'EV (18,19).

1.1.2.2. La diète

Les diètes riches en fruits, légumes, graisses monoinsaturées, poisson et pauvres en graisses saturées comme les diètes méditerranéenne et japonaise, sont connues pour avoir un effet positif sur la santé et diminuer le risque de mortalité (20,21) principalement en atténuant le taux d'événements cardiovasculaires (20). Par conséquent, elles favorisent une EV plus longue non seulement chez des personnes vivants aux alentours de la mer Méditerranée (20) mais également chez des personnes qui ne vivent pas dans des pays méditerranéens (22). Ces résultats s'expliqueraient par les effets anti-inflammatoires de certains aliments comme les fruits, les légumes (23), le poisson (24) et les graisses mono-insaturées que l'on retrouve dans l'huile d'olive (25). Par conséquent, le fait d'adopter une alimentation méditerranéenne diminuerait l'inflammation liée à l'âge (26,27). De plus, une étude a montré que les produits antioxydants que contient la diète méditerranéenne auraient un effet anti-inflammatoire qui ralentirait le raccourcissement des télomères (28), marqueur biologique du vieillissement cellulaire, ce qui expliquerait le taux de survie plus élevé dans la population méditerranéenne.

1.1.2.3. L'activité physique

L'activité physique régulière diminue le risque de développer des MCV (29,30) et par conséquent, est associée à une EV plus longue (31,32). Le risque de mortalité est diminué de 20% à 35% chez les personnes physiquement actives comparé à des personnes inactives (32). Une étude a estimé que le fait de pratiquer une activité physique permettait de gagner environ 4 ans sur l'EV (33) sans état d'invalidité (34). En association avec une vie saine, c'est-à-dire ne pas fumer et ne pas être en surpoids, l'activité physique améliore l'EV d'environ 12 ans chez des hommes physiquement aptes comparé à des hommes fumeurs, en surpoids et physiquement inaptés (35). Ces résultats seraient dus à une diminution de la concentration en triglycérides (TG) et en apolipoprotéine B parallèlement à une augmentation de *high density lipoprotein* (HDL), de l'activité de l'activateur tissulaire du plasminogène et enfin, à une diminution de calcium dans les

artères coronaires (36). Ces événements diminueraient ainsi le risque de développer des MCV associées à un risque de mortalité élevé (36).

1.2. Le vieillissement physiologique et ses conséquences

Le vieillissement regroupe un nombre de facteurs qui conduisent à un épuisement des réserves entraînant ainsi une incapacité d'adaptation fonctionnelle et une accumulation de dommages dans de nombreux organes (1) à l'origine des MLA (37). Parmi ceux-ci, les plus importants sont l'affaiblissement du système immunitaire et l'inflammation liée à l'âge ou *inflammaging* que je développerai dans cette partie.

1.2.1. Immunosénescence

À l'état physiologique, le système immunitaire agit comme défense contre les agents toxiques vis-à-vis de l'organisme. Deux types d'immunité coopèrent, à savoir l'immunité innée (macrophages, cellules dendritiques, les neutrophiles et cellules tueuses naturelles) dont la protection est rapide, non spécifique et incomplète, et l'immunité acquise (lymphocytes B et lymphocytes T) qui est plus lente mais hautement spécifique et permanente. L'immunité joue un rôle important dans la régulation des mécanismes du vieillissement et dans l'apparition des MLA. Les personnes âgées sont plus vulnérables aux maladies infectieuses car leur système immunitaire vieillit et devient moins efficace. La quantité de tissus dans le thymus et la capacité de renouvellement des cellules souches hématopoïétiques diminue avec l'âge et ceci corrèle avec le raccourcissement des télomères (38). Par conséquent, la production de cellules immunitaires dans la moelle osseuse diminue ce qui affecte la génération d'anticorps et l'habileté des personnes âgées à répondre efficacement à une infection (39,40) ou à une vaccination (41). En plus de leur nombre, la qualité des cellules du système immunitaire est également touchée. Les changements observés dans les cellules du système immunitaire inné âgé sont principalement, une altération de la présentation de l'antigène et une baisse de leur propriétés attractante et phagocytaire (42,43). Quant au système immunitaire acquis, le nombre de lymphocytes diminue avec l'âge (44,45) et leurs fonction sont également endommagées (46,47). Par conséquent, le vieillissement est associé à une réponse immunitaire défaillante face à une infection, augmentant ainsi le risque de morbidité et de mortalité (48). De plus, les changements subis au cours du vieillissement par les deux types d'immunité, innée et acquise, favorisent le développement d'une inflammation chronique de faible

intensité (49) induite par une accumulation de cellules mortes ou sénescents non éliminées par le système immunitaire affaibli (50).

1.2.2. Inflammation liée à l'âge ou *inflammaging*

Dans un contexte physiologique normal, une réaction inflammatoire aiguë permet la destruction des agents pathogènes en cas d'infection et participe à la réparation tissulaire suite à un traumatisme. À l'inverse, le processus inflammatoire lié au vieillissement est de faible intensité, chronique et se produit en l'absence d'infection (51). Cet état inflammatoire est principalement dû à un déséquilibre entre les facteurs pro-inflammatoires et anti-inflammatoires (52) ayant des répercussions sur le système immunitaire (53) et se traduisant par une augmentation de marqueurs inflammatoires dans le sang (54). Malgré une neutralisation partielle ou une compensation de l'inflammation chronique par les processus anti-inflammatoires (55), les affections liées au vieillissement subsistent. Plusieurs éléments contribuent à l'inflammation liée à l'âge dont un déséquilibre de l'homéostasie entre les systèmes oxydant et antioxydant (56,57), une production accrue de radicaux libres liée à une dysfonction mitochondriale (51), l'augmentation de la taille et du nombre des cellules du tissu adipeux associée à une infiltration importante de macrophages libérant des cytokines pro-inflammatoires (58,59), des infections chroniques comme l'hépatite C (60) et le cytomégalovirus (61), et le système rénine-angiotensine qui induit l'expression de cytokines pro-inflammatoires et de molécules d'adhésion (62). En effet, une étude a montré que son inhibition améliore les processus inflammatoires, augmente l'EV et diminue la sévérité des processus auto-immunitaires (63). Enfin, l'accumulation des cellules sénescents qui sécrètent des molécules pro-inflammatoires joue un rôle primordial dans le processus de *inflammaging* (51) puisque la fragilité associée au vieillissement corrèle avec l'augmentation de facteurs pro-inflammatoires (64). De plus, le processus inflammatoire joue un rôle important dans la pathogenèse de l'athérosclérose (ATL) (65) et dans les complications vasculaires associées, à savoir l'infarctus du myocarde et les accidents vasculaires cérébraux (66).

1.3. Le vieillissement vasculaire et ses conséquences

Le vieillissement normal entraîne de multiples altérations du système cardiovasculaire ce qui prédispose les personnes âgées aux MCV. Le vieillissement vasculaire se traduit par la présence

d'une rigidité artérielle qui apparaît suite à des changements mécaniques et structuraux au niveau de la paroi vasculaire, à savoir une perte d'élasticité et une diminution de la compliance (67) contribuant possiblement à une hypertension artérielle chez certains sujets susceptibles (68), un facteur de risque majeur dans les MCV. Ces changements structuraux s'expliquent par une augmentation du ratio collagène/élastine dans la paroi vasculaire due à la perte d'élastine, conséquence du stress mécanique chronique (69). Par ailleurs, l'altération de la paroi vasculaire durant le vieillissement normal peut favoriser le développement de l'ATL et réciproquement, l'ATL peut aggraver les changements pathologiques associés au vieillissement vasculaire normal, ainsi les effets du vieillissement se superposent à ceux de l'ATL (70,71). Le vieillissement est un facteur de risque majeur de l'ATL (72,73) et indépendant des autres facteurs de risque cardiovasculaires comme l'hypercholestérolémie, l'hypertension artérielle, le diabète, l'obésité et le tabagisme.

1.3.1. Développement de l'athérosclérose

Bien que l'ATL soit présente dès le jeune âge (74), elle est considérée comme une MLA puisqu'elle progresse et se manifeste cliniquement entre 65 ans et 72 ans chez les hommes et les femmes (75). L'ATL est une pathologie secondaire à une dyslipidémie qui se caractérise par la progression de plaques d'athérome sous l'endothélium de la paroi vasculaire au niveau des embranchements ou des bifurcations dans les artères, là où la contrainte de cisaillement est importante. À un stade précoce, la pathogenèse de l'ATL se distingue par une dysfonction endothéliale due à une baisse de la biodisponibilité en monoxyde d'azote (NO) (76) sous l'influence de stimuli hémodynamiques, d'une défaillance dans les systèmes oxydant et antioxydant (77) et d'une production accrue d'angiotensine II (78). Le NO produit par l'enzyme *endothelial nitric oxide synthase* (eNOS), une enzyme de type oxyde nitrique synthase exprimée au niveau de l'endothélium vasculaire, joue un rôle important dans la régulation négative des voies inflammatoires et thrombogènes dans l'endothélium, par conséquent sa diminution prédispose à la dysfonction endothéliale. L'endothélium endommagé devient alors plus perméable et facilite le passage de lipides oxydés par les radicaux libres produits par le stress oxydant. L'accumulation de lipides oxydés dans l'intima induit une inflammation locale en maintenant l'activation de l'endothélium (79) et l'expression de chimiokines dont *chemokine ligand 2* (CCL2) qui attirent les

leucocytes, principalement les monocytes et les lymphocytes T (80,81), et l'expression de molécules d'adhésion dont *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM1) et *Intercellular Adhesion Molecule 1* (ICAM1) qui permettent leur liaison et leur passage à travers la paroi vasculaire (82). Après la diapédèse, les monocytes se transforment en macrophages qui expriment des récepteurs de phagocytose (CD36, LOX-1, SR-A et CD68) et deviennent des cellules spumeuses en ingérant les lipides oxydés (83). Ainsi, l'accumulation de lipides oxydés dans l'intima attirent les monocytes et les lymphocytes T qui libèrent des cytokines pro-inflammatoires et attirent davantage de cellules inflammatoires. Ce cercle vicieux contribue à l'amplification de l'inflammation et par conséquent, à l'augmentation de la taille des plaques. À ce stade, les plaques sont formées d'un noyau nécrotique composé de lipides oxydés, de cristaux de cholestérol, de cellules inflammatoires et de débris cellulaires, recouvert d'une chape fibreuse. La chape fibreuse est principalement composée de macrophages et cellules musculaires lisses qui, sous l'effet de l'environnement inflammatoire, migrent de la média vers l'intima et adoptent un profil prolifératif afin de réparer les lésions de la paroi vasculaire (84). Par conséquent, la chape fibreuse joue un rôle important dans le maintien de la stabilité des plaques afin d'empêcher leur rupture (85).

1.3.2. L'athérosclérose et ses complications

Le noyau lipidique qui forme les plaques d'athérome est hautement thrombogène d'où le rôle important de la chape fibreuse dans la stabilisation de la plaque. Il existe deux mécanismes qui provoquent les symptômes de l'ATL. Le premier correspond à une sténose provoquée par une plaque suffisamment importante allant jusqu'à causer une ischémie dans l'artère amenant à une angine de poitrine à l'effort. Le deuxième mécanisme, plus dangereux, correspond à l'érosion ou à la rupture d'une plaque. L'érosion ou la rupture de la chape fibreuse entraîne l'accumulation de plaquettes sur la brèche formant un thrombus susceptible d'obstruer l'artère ou de se détacher de la plaque jusqu'à atteindre une artère de plus petit calibre, bloquer le flux sanguin et provoquer une ischémie à l'origine d'un syndrome coronarien aigu ou d'un infarctus du myocarde. Les plaques les plus à risque sont celles formées d'un noyau lipidique conséquent et d'une chape fibreuse de faible épaisseur, limitant ainsi leur résistance au stress mécanique (86,87). Par conséquent, la faible teneur en cellules musculaires lisses dans la chape fibreuse constitue un risque élevé de rupture de plaque (88). Il existe plusieurs mécanismes responsables de la diminution du nombre de cellules

musculaires lisses dans la chape fibreuse dont la dégradation de la matrice extracellulaire par les métalloprotéines issues des macrophages, l'inhibition de la prolifération des cellules musculaires lisses par les cytokines pro-inflammatoires issues des cellules inflammatoires et l'apoptose des cellules musculaires lisses par leur contact direct avec les macrophages (89).

1.3.3. L'athérosclérose et ses traitements pharmacologiques

Les traitements actuels sont indiqués dans les cas d'hypercholestérolémie en prévention primaire si certains changements concernant l'hygiène de vie comme la diète, l'activité physique et l'arrêt du tabagisme ne sont pas suffisants pour abaisser les niveaux de cholestérol. Les statines, inhibiteurs de l'enzyme hydroxy-méthyl-glutaryl-coenzyme A réductase impliquée dans la synthèse du cholestérol, figurent comme le traitement principal depuis les années 1990 puisqu'elles diminuent à la fois la concentration plasmatique des *low density lipoprotein* (LDL) et des TG (90) mais aussi la survenue d'évènements cardiovasculaires (91). D'autres traitements sont prescrits pour diminuer la concentration des LDL dans le sang comme l'ézetemibe, un inhibiteur de l'absorption intestinale du cholestérol, utilisé en association avec les statines lorsque leur dose maximale ne suffit pas à atteindre l'effet attendu (90); les chélateurs d'acides biliaires dont le colesevelam qui peut être combiné aux statines et qui a l'avantage d'avoir moins d'interactions médicamenteuses que les autres chélateurs disponibles (90); et les anticorps monoclonaux, inhibiteurs de la proprotéin convertase subtilisin/kexin type 9 à l'origine de la dégradation des récepteurs aux LDL, qui sont plus efficaces que les statines en association avec l'ézetemibe (92,93). Les fibrates (94) et les acides gras oméga-3 (95) sont plutôt utilisés pour diminuer les taux de TG dans le sang en interagissant avec certains récepteurs *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR) impliqués dans la régulation du métabolisme des lipides. À l'opposé, des traitements novateurs comme les inhibiteurs de la protéine de transfert des esters du cholestérol (PTEC), visent à augmenter les taux de HDL (96,97). Par exemple, l'anacetrapib augmente efficacement la concentration des HDL et de façon intéressante, il diminue aussi celle des LDL (98) en favorisant l'élimination de l'apolipoprotéine B (99).

Chapitre 2 – La sénescence

Le terme « sénescence » a été introduit pour la première fois par Hayflick et Moorhead pour décrire l'arrêt de croissance irréversible de cellules humaines diploïdes après plusieurs passages en culture (100). L'arrêt de la division cellulaire est dû au raccourcissement des télomères défini comme la sénescence répllicative (100). Les télomères sont des séquences répétitives de nucléotides essentiels à la stabilité des chromosomes en les préservant d'un déclenchement de la réponse aux dommages à l'ADN pouvant causer des recombinaisons ou une fusion des chromosomes (101). Par ailleurs, lorsque les cellules entrent en sénescence, non seulement leur capacité de prolifération diminue mais elles subissent également des changements phénotypiques marqués par un aplatissement et une hypertrophie cellulaire, une accumulation de lysosomes détectable par l'augmentation de l'activité de l'enzyme β -Galactosidase à pH 6, une augmentation des mitochondries, une altération de la membrane plasmique et de la paroi nucléaire, et la présence de foyers d'hétérochromatine (102). La sénescence intervient de façon bénéfique dans le développement embryonnaire (103), la réparation tissulaire (104), la cicatrisation de plaies (105), l'homéostasie glucidique (106) et contre la progression de tumeurs (107) mais l'accumulation excessive de cellules sénescents dans les tissus peut favoriser l'apparition et la progression des MLA (108–110). Dans ce chapitre, j'exposerai les caractéristiques principales des cellules sénescents dont les voies menant à l'arrêt de croissance cellulaire permanent, leur phénotype sécrétoire et leur faculté à résister à l'apoptose. Dans la deuxième partie, je développerai le rôle de la sénescence dans les MLA de manière générale puis plus particulièrement dans l'ATL. Dans une dernière partie, je détaillerai les sénotherapies expérimentales décrites dans la littérature, connues pour diminuer la sénescence.

2.1. Caractéristiques des cellules sénescents

2.1.1. Arrêt de croissance permanent

L'arrêt de prolifération irréversible des cellules sénescents est maintenu par deux voies de signalisation distinctes, à savoir celle de p53/p21 et de la protéine du rétinoblastome, et celle de

l'inhibiteur de kinases dépendantes de la cycline p16^{Ink4a} et de la protéine du rétinoblastome dépendamment du type et de l'intensité du stress perçu par la cellule. Dans les deux cas, les voies s'activent en réponse à des dommages à l'ADN (111) par différents stimuli dont le raccourcissement des télomères, certains oncogènes (Ras, BRAF), la chimiothérapie ou la radiothérapie, le stress oxydant, la dysfonction mitochondriale, le stress épigénétique et le phénotype sécrétoire associé à la sénescence (PSAS) (112). En premier lieu, les dommages à l'ADN sont reconnus par les kinases *Ataxia Telangiectasia Mutated* (ATM) et *Ataxia Telangiectasia and Rad3-related* (ATR) qui, une fois phosphorylées, stabilisent la protéine p53 qui active à son tour p21, un inhibiteur des kinases dépendantes de la cycline (CDK2, CDK4 et CDK6) bloquant ainsi la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome et par conséquent, le passage vers la phase S du cycle cellulaire (111). Alors que dans le cas d'un arrêt prolongé du cycle cellulaire (113) et sous l'influence de certains stimuli (114), la sénescence est causée par une régulation positive de la protéine p16^{Ink4a} qui inhibe également les CDK4 et CDK6 et provoque l'arrêt du cycle à la phase G1 (115) (**Figure 1**).

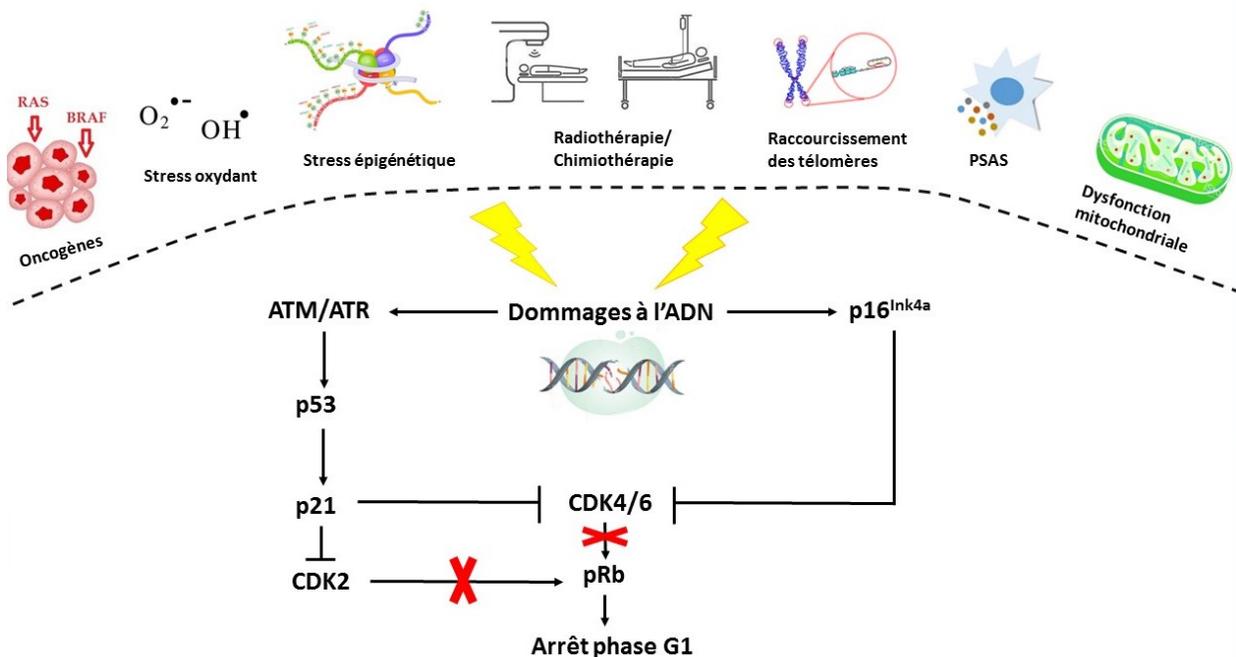


Figure 1 : Activation des voies de la sénescence par des dommages à l'ADN causés par divers signaux

2.1.2. Phénotype sécrétoire associé à la sénescence

Les cellules sénescents perdent leur capacité à se diviser mais elles restent métaboliquement actives (116) et acquièrent un phénotype sécrétoire délétère qui peut avoir un impact sur le microenvironnement tissulaire et les cellules qui les entourent en induisant une inflammation à distance, en attirant les cellules immunitaires, en propageant la sénescence aux autres cellules, en modifiant la fonction des cellules souches et en affectant la fonction endocrinienne et métabolique (117). La présence de 20% de cellules sénescents dans un tissu est suffisante pour induire des effets systémiques par le biais du phénotype sécrétoire associé à la sénescence (PSAS) (118). Par ailleurs, le PSAS augmente dans plusieurs tissus en fonction de l'âge chronologique (119) et favorise l'émergence de MLA (109,120). Les cellules sénescents possèdent toutes la capacité à attirer les cellules immunitaires et à participer à l'inflammation par le biais du PSAS mais celui-ci varie en fonction du type et du contexte cellulaire (121). Le PSAS est très hétérogène puisqu'il comprend différentes classes moléculaires dont plusieurs cytokines pro-inflammatoires, des chimiokines, des protéases et leurs inhibiteurs, des facteurs de croissance (122) et l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 (PAI-1) (123). Les composants du PSAS comprennent également des microvésicules, des microARN, des fragments d'ADN mitochondrial, des espèces réactives de l'oxygène, des agrégats de protéines et d'autres facteurs qui pourraient également propager la sénescence et exacerber l'inflammation (124–126). Par ailleurs, les cytokines IL6 et IL8 sont connues pour favoriser la sénescence en maintenant l'arrêt du cycle cellulaire et pour induire la libération d'autres facteurs du PSAS via la voie de signalisation de *Nuclear factor kappa B* (NF- κ B) (127,128). Cette voie est également sollicitée par une activation de la protéine mTOR qui favorise la traduction de IL1 α , activateur de NF- κ B (127). Les voies de signalisation p38/MAPK (129), GATA4 (130), NOTCH (131) et PI3K (123) sont aussi connues pour être impliquées dans la régulation du PSAS. Bien que le rôle du PSAS soit délétère dans la sénescence associée au vieillissement, dans un contexte physiologique sain, certains facteurs du PSAS comme les cytokines et les chimiokines, permettent de recruter et d'activer les cellules immunitaires afin d'éliminer les cellules endommagées (104). Le PSAS agit également de manière bénéfique dans la réparation tissulaire (104), l'angiogenèse (102), le développement embryonnaire (103) et la cicatrisation (132).

2.1.3. Résistance à l'apoptose

L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée régulée par une voie de signalisation qui repose sur la perte d'intégrité membranaire des mitochondries. En effet, la perméabilité mitochondriale est contrôlée par les membres de la famille Bcl2 dont l'activité dépend de plusieurs stimuli (dommages à l'ADN, stress métabolique...) (133). Après l'intégration des signaux par les protéines Bcl2, l'apoptose est amorcée par l'activation d'une cascade d'enzymes protéolytiques, les caspases, impliquées dans le clivage de protéines essentielles à la survie cellulaire (134). Par ailleurs, ces signaux apoptotiques sont altérés durant la sénescence (135,136). Les facteurs pro-apoptotiques Bcl-XL et Bcl-W appartenant à la famille Bcl2, favorisent la survie des cellules sénescents en séquestrant la protéine BH3 permettant ainsi de maintenir l'intégrité de la membrane mitochondriale externe et d'empêcher l'entrée en apoptose des cellules sénescents (137). De plus, les cellules sénescents ont une expression élevée de la protéine FOXO4 qui favorise la survie des cellules en séquestrant p53 dans le noyau (110). La protéine p21 joue aussi un rôle dans la résistance à l'apoptose des cellules sénescents (138) en inhibant la caspase 3 (139). D'autres facteurs comme PI3K, PAI-2 (140) et HSP90 (141) sont également impliqués dans la survie des cellules sénescents.

2.2. Rôle pathologique dans le vieillissement et les maladies liées à l'âge

2.2.1. Preuve de concept sur des modèles de souris transgéniques

Plusieurs études *in vivo* ont montré que l'accumulation de cellules sénescents dans les tissus âgés peut accélérer le phénotype de vieillissement et favoriser la progression de MLA. Effectivement, le fait d'inactiver le gène p16^{INK4a} dans le modèle murin progéroïde BubR1^{H/H} atténue le phénotype de vieillissement associé dont la sarcopénie, l'atrophie adipeuse et la cataracte, et augmente leur EV (142). Ces mêmes résultats ont été observés dans un modèle murin plus sélectif, le modèle INK-ATTAC dérivé de la lignée BubR1 dans lequel l'expression du complexe protéique caspase 8/FKBP est sous le contrôle du promoteur p16^{INK4a} dont le gène est actif dans les cellules sénescents. Ainsi, l'administration du ligand de FKBP (AP20187) active la caspase 8 et induit l'apoptose des cellules sénescents p16^{INK4a} positives (120). Dans une étude similaire mais comportant deux cohortes de souris ATTAC d'origine génétique différente (wild

type versus BubR1), l'administration de AP20187 a augmenté leur EV moyenne et diminué la détérioration fonctionnelle et structurelle due au vieillissement dans plusieurs organes comparé aux contrôles (108). Dans le cas de l'ATL, une étude a utilisé des souris athérosclérotiques LDLr^{-/-} croisées avec des souris p16-3MR dans lesquelles le promoteur p16^{INK4a} conduit l'expression de la protéine 3MR composée, entre autres, de la thymidine kinase du virus de l'herpès qui converti le Genciclovir en inducteur d'apoptose après son administration. Les résultats de cette étude ont montré que l'élimination sélective des cellules sénescents p16^{INK4a} positives atténue la formation de la plaque d'athérome et augmente sa stabilité (143) diminuant ainsi le risque de rupture. Finalement, toutes ces études *in vivo* suggèrent que l'élimination des cellules sénescents améliore l'EVS.

2.2.2. Sénescence vasculaire et athérosclérose

Le taux de mortalité associé à une MCV est plus élevé chez les personnes âgées présentant des télomères courts dans l'ADN des leucocytes (144). Le système vasculaire âgé plus sensible aux facteurs de stress et la persistance à long terme des cellules sénescents et du PSAS conduisent au développement des MLA dont l'ATL (143). La présence de marqueurs de sénescence dans les cellules endothéliales (CE) et cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire indique que les cellules sénescents contribuent à leur détérioration (145,146). Les CE sénescents apparaissent avec l'âge (147) et sont présentes dans les plaques d'athérome (145). Le stress mécanique chronique présent chez les sujets âgés favorise l'entrée en sénescence des CE (148) ce qui limite leur bon fonctionnement. En effet, les CE sénescents montrent une diminution de eNOS associée à une perte de l'activité du NO (149) ainsi qu'une expression élevée des molécules d'adhésion VCAM1 et ICAM1 (150). De plus, le phénomène de sénescence des CE altère leurs jonctions serrées qui les relient les unes aux autres favorisant ainsi le passage des lipides oxydés dans la paroi vasculaire (151). Par ailleurs, les cellules musculaires lisses sénescents qui sont également présentes dans les plaques d'athérome (152), alimentent l'environnement athérogène en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires et des protéases (153–155). Enfin, les macrophages sénescents jouent un rôle clé dans le développement de l'ATL puisque ce sont les principales cellules sénescents retrouvées dans les plaques d'athérome (143). De plus, la voie de sénescence médiée par p16, la protéine inhibitrice de CDK, est impliquée dans le changement de phénotype des

macrophages qui exposent alors un phénotype pro-inflammatoire (156). Par conséquent, la sénescence des CE, des cellules musculaires lisses et des macrophages contribue à la progression de l'ATL en maintenant un environnement inflammatoire chronique. En effet, une étude a montré que l'élimination des cellules sénescents dans un modèle de souris dyslipidémiques a considérablement diminué la taille des plaques d'athérome et amélioré leur stabilité grâce à la diminution de cytokines pro-inflammatoires et de protéases impliquées dans l'ATL (143). Enfin, une étude clinique a montré que le fait de pratiquer une activité physique peut diminuer la sénescence endothéliale chez des personnes âgées actives comparé à des personnes âgées sédentaires (147). L'activité physique pourrait donc prévenir l'apparition de l'ATL en limitant l'entrée en sénescence des CE.

2.3. Les sénotherapies

2.3.1. Les sénolytiques

Les sénolytiques sont des composés qui éliminent sélectivement les cellules sénescents. À l'heure actuelle, il en existe une dizaine qui visent à renverser la capacité des cellules sénescents à résister à l'apoptose (157) (**Figure 2**). Le dasatinib, un inhibiteur de tyrosine kinase, a montré son efficacité pour éliminer des cellules sénescents dans les tissus adipeux alors que la quercétine, un flavonoïde végétal qui inhibe les serpinés, a permis de supprimer des cellules sénescents dans l'endothélium et la moelle osseuse (140). L'association des deux améliore les fonctions physiologiques de souris âgées et augmente leur EV (140). Un autre composé connu est le ABT263 ou navitoclax qui se lie au domaine inhibiteur des protéines anti-apoptotiques (Bcl2, Bcl-XL, Bcl-W). Le navitoclax a éliminé avec succès des cellules souches sénescents dans la moelle osseuse et dans les muscles de souris ayant vieilli naturellement ou précocement par irradiation (158). Ces résultats ont conduit à un rajeunissement dans les deux modèles murins ainsi qu'à la restauration des fonctions hématopoïétiques (158). De plus, le navitoclax a permis de freiner la progression de l'ATL dans un modèle de souris athérosclérotiques en éliminant les macrophages sénescents dans les plaques d'athérome (143). Des dérivés du navitoclax comme le composé ABT737, A1331852 et A1155463 ont également permis d'éliminer des cellules sénescents dans différents modèles tissulaires et cellulaires (137,159). Un autre composé révolutionnaire, le FOXO4-DRI, interagit au niveau du complexe FOXO4/p53 en bloquant leur interaction permettant ainsi l'exclusion de p53

du noyau qui interagit alors avec le cytochrome c et déclenche la cascade de caspases qui, à leur tour, induisent l'apoptose des cellules sénescents (110). Cette étude a montré que le FOXO4-DRI améliore la densité des poils, la forme physique et la fonction rénale chez des souris progéroides qui ont vieilli naturellement (110). Le composé UBX0101 agit de manière similaire au FOXO-DRI mais en bloquant l'interaction de MDM2 et p53 déclenchant ainsi l'apoptose des cellules sénescents (160). Ce composé a été testé chez la souris et chez l'humain dans le cas de l'arthrite par injection intra-articulaire (160). Il atténue efficacement le développement de l'arthrite et la douleur associée en améliorant la capacité des chondrocytes à former le cartilage (160). Le composé 17AAG et la geldanamycine sont des inhibiteurs de la protéine chaperonne *heat shock protein 90* (HSP90) qui retardent les symptômes du vieillissement et rallongent l'EVS de souris progéroides en éliminant les cellules sénescents par apoptose (141). Plusieurs études ont étudié d'autres candidats dont la piperlongumine (161), la fisétine (159) et l'hyperoside dérivé de la quercétine (162) dans différentes lignées cellulaires et d'après leurs résultats, ceux-ci présentent des propriétés sénolytiques. Malheureusement, le manque de sélectivité de certains composés comme navitoclax, FOXO4-DRI et dasatinib + quercétin induit une toxicité intrinsèque qui limite leur utilisation chez l'humain.

2.3.2. Les sénomorphiques

Les sénomorphiques sont caractérisés par leur capacité à moduler les cellules sénescents en inhibant leur PSAS (**Figure 2**). Le facteur de transcription NF- κ B joue un rôle clé dans l'*inflammaging* et son activation dépend de facteurs impliqués dans le processus de vieillissement. Effectivement, plusieurs composés engagés dans la régulation de NF- κ B, à savoir les glucocorticoïdes (163), la metformine (164), les antagonistes du récepteur de l'interleukine 1 (IL1) (165), le Resvératrol (166), les flavonoïdes (167) et la rapamycine (168) diminuent la sénescence en inhibant des facteurs du PSAS dépendants ou indépendants de la voie de signalisation de NF- κ B. De plus, l'inhibition de la kinase I κ B (IKK) qui permet l'activation de NF- κ B, permet aussi de diminuer la sénescence *in vivo* en retardant les symptômes liés au vieillissement et les MLA dans un modèle de souris progéroides (169). Par ailleurs, le PSAS est aussi régulé par la voie JAK/STAT dont l'inhibition supprime l'*inflammaging*, allège la dysfonction tissulaire associée au vieillissement et améliore la forme physique de souris âgées (170). De plus, l'inhibition de la

protéine ATM par le composé KU-60019 bloque les cascades de signalisation pro-PSAS et perturbe la sécrétion du PSAS (171). Finalement, plusieurs composés naturels dérivés de plantes (172–175) ont la propriété de diminuer la sénescence en interférant avec le PSAS. Étant donné que les sénomorphiques doivent être utilisés en continu et qu'ils ne sont pas spécifiques aux cellules sénescents, leurs effets peuvent devenir toxiques à long terme (112).

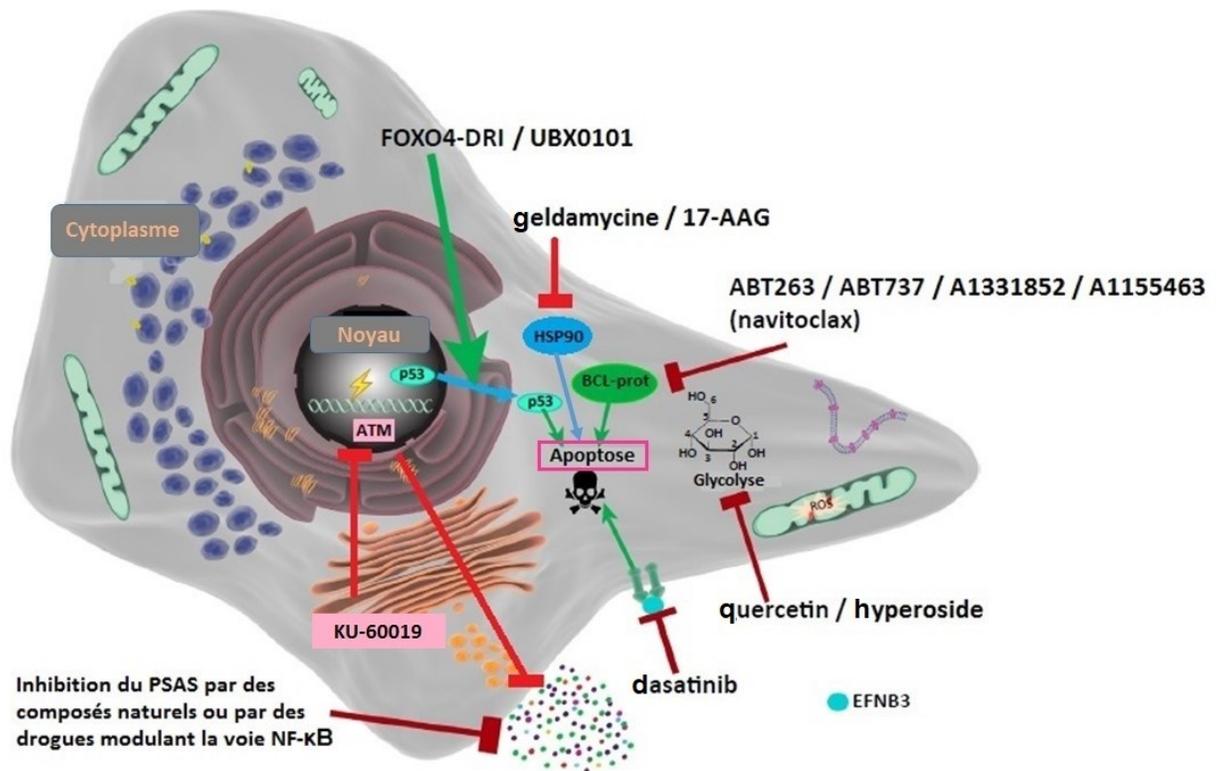


Figure 2 : Mécanisme d'action des sénolytiques et des sénomorphiques dans une cellule sénescents.
 EFNB3 : Éphrine B3; ATM : *Ataxia Telangiectasia Mutated*; HSP90 : *Heat Shock Protein 90*
 (inspirée d'une figure de la revue (112))

2.3.3. L'immunothérapie

Actuellement, l'immunothérapie est un domaine de recherche émergent considéré comme une alternative aux sénolytiques pour éliminer les cellules sénescents dans les MLA de manière plus sélective. La surveillance immunitaire des cellules sénescents qui permet le recrutement des cellules immunitaires et l'élimination des cellules sénescents est exécutée par les macrophages, les cellules tueuses naturelles, et les lymphocytes T cytotoxiques dans des pathologies comme le cancer (176) et la cirrhose hépatique (104). Néanmoins, la surveillance immunitaire effectuée par

les macrophages joue aussi un rôle important dans la sénescence associée à l'ATL. Les cellules sénescents expriment le cluster CD47 sur leur surface afin de signaler aux macrophages de ne pas les éliminer, ceci entraîne la liaison de CD47 à la *signal regulatory protein α* (SIRPα) sur les macrophages, compromettant ainsi le bon fonctionnement de la phagocytose (177). Dans cette continuité, une étude a montré qu'un anticorps bloquant CD47 active à nouveau la phagocytose dans le tissu vasculaire endommagé sans empêcher l'apoptose des cellules sénescents prévenant ainsi le développement de l'ATL dans l'aorte de plusieurs modèles murins (177). De plus, les CE sénescents expriment l'antigène E du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (AE-CMH) qui inhibe la cytotoxicité immunitaire destinée à détruire les cellules sénescents en interagissant avec le récepteur inhibiteur NKG2A appartenant à la famille des récepteurs de la lectine de type C exprimé sur la surface des cellules tueuses naturelles (178). Dans cette optique, deux études ont expérimenté des agents bloquant l'interaction AE-CMH/NKG2A, à savoir l'anticorps monoclonal humanisé anti-NKG2A (179) et les bloqueurs d'expression de protéines NKG2A (180) en vue de lever l'inhibition de l'activité des cellules tueuses naturelles pour éliminer les cellules sénescents. Finalement, l'immunothérapie s'avère prometteuse pour rétablir la surveillance immunitaire des cellules sénescents et jouer indirectement le rôle de sénolytique en exploitant le système immunitaire.

Chapitre 3 – L'Angiopoïétine-like 2

L'angiopoïétine-like 2 (Angptl2) est une cytokine pro-inflammatoire sécrétée dans la circulation sanguine qui a été clonée, exprimée et caractérisée pour la première fois en 1999 (181). C'est une protéine glycosylée de 57 kDa appartenant à la famille des angiopoïétines-like qui sont au nombre de huit (181). La structure de l'Angptl2 comporte un domaine N-terminal en forme de superhélice impliqué dans l'oligomérisation et un site de fixation globulaire en C-terminal composé du fibrinogène (181). Malgré une structure similaire à celle des Angiopoïétines, l'Angptl2 ne se lie pas aux mêmes récepteurs, Tie1 et Tie2 (181–183). Cependant, plusieurs études ont démontré son affinité non spécifique pour certains récepteurs. En effet, l'Angptl2 peut se lier aux intégrines $\alpha\beta 1$ dans les adipocytes (184) et les CE (185), au récepteur des leucocytes LILRB2 (PIRB chez la souris) dans les cellules souches hématopoïétiques (183), dans les plaquettes (186) et les cellules cancéreuses du pancréas (187). Aussi, l'Angptl2 se lie au récepteur AT1 de l'angiotensine II favorisant le recyclage du récepteur (188–190) et les effets pro-inflammatoires et oxydants associés à l'activation des récepteurs AT1 (191). En plus d'être pro-inflammatoire, l'Angptl2 est pro-angiogénique (181,192,193), anti-apoptotique (182), anti-thrombotique (186) et elle intervient comme facteur de croissance nécessaire à la survie des cellules souches hématopoïétiques (183,193,194). Elle joue aussi un rôle physiologique dans la vasculogénèse (195) et le cycle circadien (196,197). Néanmoins, l'Angptl2 est plus connue pour son rôle délétère dans plusieurs maladies chroniques dont le cancer (183,198–200), le diabète (184,201), l'ATL (185,202), les troubles métaboliques (184), l'insuffisance rénale (203), l'arthrite (204) et d'autres maladies inflammatoires (205,206). Dans ce chapitre, je présenterai le rôle délétère que joue l'Angptl2 dans le vieillissement et les MLA en insistant sur les MCV et l'ATL. Dans une dernière partie, je partagerai les données qui exposent l'Angptl2 comme un composant du PSAS.

3.1. Rôle pathologique dans le vieillissement et les maladies liées à l'âge

En plus d'intervenir dans plusieurs MLA (185,202,204), une étude récente a relié l'Angptl2 à un phénotype de vieillissement. Effectivement, l'Angptl2 joue un rôle délétère dans la sarcopénie (207), un des facteurs contribuant à la fragilité observée chez les personnes âgées. La sarcopénie

se caractérise par une perte de la masse et de la force du muscle squelettique due à un environnement inflammatoire et oxydatif. Une étude a montré que l'expression de l'Angptl2 augmente en fonction de l'âge dans les myocytes squelettiques de souris, favorisant une perte de masse musculaire, une augmentation de l'inflammation et du stress oxydant, et la suppression de l'activité des cellules musculaires satellites, précurseurs des myocytes (207). De plus, la suppression de l'Angptl2 due à l'exercice physique, réduit l'inflammation et le stress oxydant, facilitant ainsi l'activation des cellules satellites nécessaire au maintien de la masse musculaire (207). Ces données suggèrent que l'Angptl2 accélère la fragilité due au vieillissement en alimentant l'environnement pro-inflammatoire et oxydant qui détériore la masse musculaire.

3.1.1. Incidence dans les maladies cardiovasculaires

L'Angptl2 est une protéine dont les propriétés pro-inflammatoires contribuent à la détérioration du système cardiovasculaire. En effet, son expression est significativement plus élevée dans des CE de fumeurs actifs ayant une maladie coronarienne sévère comparé à des patients non-fumeurs (208). Son taux circulant s'avère plus élevée dans une cohorte de patients asiatiques (184,185,209) et caucasiens (202) ayant une maladie coronarienne comparé à des sujets sains, et corrèle avec la sévérité de la maladie (210). De plus, l'Angptl2 semble être un marqueur de prédiction dans le développement de MCV puisque son taux plasmatique corrèle avec la sténose présente dans les artères coronaires de patients coronariens (185,211) et que ce taux augmente également avec les scores de Framingham prédisant le risque de développer une MCV (212). De plus, les niveaux d'Angptl2 circulants corrèlent positivement avec l'inflammation vasculaire et l'épaisseur intima-média dans les carotides de patients sans MCV (185), ce qui suggère que l'Angptl2 peut influencer la survenue de futurs événements cardiovasculaires. Par ailleurs, des études ont démontré que l'exercice physique (213,214) et qu'un traitement aigu à l'atorvastatine (215) auraient un effet cardioprotecteur en diminuant les niveaux d'Angptl2 circulants. Récemment, il a été démontré qu'une modification de la diète de patients en surpoids ou obèses pendant douze semaines permet la diminution des niveaux d'Angptl2 circulants associée à une atténuation de la rigidité artérielle (216), un facteur de risque important dans le développement de MCV. Par conséquent, l'Angptl2 a été proposée comme une cible pour le traitement des maladies

inflammatoires chroniques dont les MCV (209,217,218), bien que les mécanismes moléculaires impliqués restent encore inconnus.

3.1.1.1. Angiopoïétine-like 2 et athérogenèse

L'Angptl2 joue un rôle important dans la dysfonction endothéliale dès les premiers stades de l'ATL. En effet, la voie de signalisation eNOS/NO est régulée positivement chez des souris dans lesquelles le gène de l'Angptl2 a été atténué (219) alors qu'à l'inverse, l'Angptl2 induit la dysfonction endothéliale (220). Aussi, l'expression de l'Angptl2 augmente dans des CE de patients fumeurs (208) dans lesquelles l'environnement est pro-oxydant alors qu'elle diminue dans les CE de patients coronariens après un traitement anti-oxydant (221), ce qui suggère que l'Angptl2 est sensible au stress oxydant dans les CE, un facteur contribuant à la dysfonction endothéliale. De plus, la surexpression d'Angptl2 produit des effets pro-inflammatoires sur les CE et les leucocytes via les voies de signalisation de NF- κ B, conduisant à une expression élevée de cytokines inflammatoires et de molécules d'adhésion (184,202) pouvant induire un dysfonctionnement de l'endothélium et par conséquent, la migration des leucocytes à travers la paroi vasculaire. L'Angptl2 pourrait affecter la fonction leucocytaire selon deux modes, l'un indirect et l'autre direct. D'après une étude du laboratoire (202), une surexpression d'angptl2 favorise l'adhésion des leucocytes sur l'endothélium natif *ex vivo* sous l'influence d'un environnement pro-inflammatoire. Dans cette étude, il a été montré que l'Angptl2 augmente l'expression de P-sélectine et de ICAM-1 endothéliale favorisant l'adhésion des monocytes. En conséquence, l'adhésion des leucocytes induite par l'Angptl2 a été empêchée par la neutralisation de P-sélectine et de ICAM1 au niveau de l'endothélium (202). Une autre étude a montré que dans des modèles de souris transgéniques avec une surexpression d'Angptl2 (K14-Angptl2 et aP2-Angptl2), l'adhésion des leucocytes sur les vaisseaux inflammés est significativement plus élevée que dans des vaisseaux non inflammés de souris wild-type (184). L'inactivation de la P-sélectine dans les carotides de souris ApoE^{-/-} limite l'accumulation de macrophages dans les plaques après une lésion endothéliale (222). L'effet peut également être direct car la surexpression de l'Angptl2 a aussi augmenté l'expression des molécules d'adhésion à la surface des leucocytes isolés à partir de la rate dans notre modèle de souris dyslipidémiques (202). Par conséquent, une surexpression de l'Angptl2 peut contribuer à l'initiation de l'athérogenèse par l'adhésion leucocytaire dépendamment de l'expression des molécules d'adhésion P-sélectine et ICAM1 à leur surface et sur l'endothélium. Aussi, l'Angptl2 sécrétée par les tissus adipeux péri-vasculaires induit une inflammation (223) qui endommage

l'endothélium possiblement en l'activant, comme nous l'avons démontré dans un travail précédent du laboratoire (202). Effectivement, l'Angptl2 augmente la production de cytokines inflammatoires par l'endothélium (TNF- α et IL-6) ainsi que les molécules d'adhésions (202) ce qui favoriserait l'inflammation et le dommage endothéliale. Une étude a également montré que la surexpression d'Angptl2 dans l'endothélium chez la souris, entraîne une dysfonction endothéliale et une inflammation vasculaire (185) étroitement liées à l'athérogenèse (184,185,202). Des études portant sur le rôle physiopathologique de l'Angptl2 ont révélé des niveaux d'Angptl2 circulant et tissulaire significativement élevés chez les souris dyslipidémiques proathérosclérotiques (LDLr^{-/-};hApoB^{+/+}) et ont démontré que les niveaux augmentent progressivement en fonction du développement des plaques d'athérome (202). En effet, une étude a montré qu'une déficience en Angptl2 systémique/circulante diminue la progression de l'ATL ainsi que l'instabilité des plaques dans le modèle murin ApoE^{-/-}/Tie2-Angptl2 Tg (185). L'Angptl2 recombinante peut accélérer la formation de plaques d'athérome (202) tandis qu'une extinction du gène de l'Angptl2 dans des souris athérosclérotiques déficientes en apolipoprotéine E, ralenti le développement de l'ATL en réduisant l'inflammation et par conséquent, l'infiltration de macrophages à travers la paroi vasculaire (185). Néanmoins, une étude *in vitro* a relaté que l'interaction entre l'Angptl2 et le facteur de transcription *Forkhead box protein C2* (FOXC2) diminue l'inflammation et l'apoptose des macrophages, et atténue l'accumulation des lipides induite par les lipides oxydés, suggérant un rôle bénéfique de l'Angptl2 dans l'inflammation liée à l'ATL selon la voie moléculaire impliquée (224). Dans l'ensemble, ces données suggèrent que l'Angptl2 contribue à la pathogenèse de l'ATL en favorisant la dysfonction endothéliale et l'inflammation vasculaire.

3.2. Contribution dans la sénescence

Malgré un nombre limité d'études exposant un lien entre l'Angptl2 et la sénescence, les données disponibles semblent définir l'Angptl2 comme un composant du PSAS. D'après la littérature, elle possède les mêmes propriétés que celles du PSAS, à savoir l'angiogenèse (192), la prolifération cellulaire (225), le renouvellement et la différenciation des cellules souches (194), l'inflammation (184) et la réparation tissulaire (199). De plus, l'Angptl2 a été détectée dans plusieurs types cellulaires sénescents dont les CE (208), les fibroblastes (226), les hépatocytes (227,228), les plaquettes (229) et dans des cellules souches pluripotentes reprogrammées issus de

patients ayant le syndrome de Werner, une maladie qui entraîne un vieillissement accéléré et une mort prématurée (230). Également, une étude récente a montré que les niveaux d'Angptl2 plasmatique chez des patients athérosclérotiques ayant subi une chirurgie cardiaque corrèlent avec la sénescence artérielle (231), présentant l'Angptl2 comme un marqueur du vieillissement.

Chapitre 4 – Hypothèse et objectifs

D'après la littérature, les cellules sénescents sont présentes *in vivo* dans l'endothélium et la paroi vasculaire de modèles animaux dyslipidémiques et dans les artères de patients athérosclérotiques. Par conséquent, la sénescence contribue à la pathogenèse de l'ATL. De plus, l'Angptl2 fait partie du PSAS et induit l'ATL. Dans cette optique, notre hypothèse est qu'une répression de l'Angptl2 exprimée par l'endothélium peut diminuer la progression de l'ATL par la levée d'inhibition de l'apoptose des cellules sénescents vasculaires impliquées dans l'ATL permettant ainsi leur élimination.

L'objectif de ce mémoire était d'étudier les effets bénéfiques d'une inhibition de l'expression de l'Angptl2 au niveau de la sénescence endothéliale et de la progression de l'ATL dans un modèle de souris dyslipidémiques (LDLr^{-/-} ; hApoB100^{+/+}). Ces souris ont une expression endogène élevée d'Angptl2 et elles développent des plaques d'athérome spontanément à l'âge de six mois sans diète riche en gras (232). Actuellement il n'existe aucun traitement pharmacologique capable de diminuer l'expression de l'Angptl2 puisqu'elle ne lie aucun récepteur spécifiquement ou lie différents récepteurs tels que LILRB2 et les intégrines $\alpha 5\beta 1$ selon le type cellulaire (183–187). Par conséquent, nous avons choisi de bloquer l'expression de l'Angptl2 à l'aide d'un *shRNA* délivré par un adenovirus associé de sérotype 1 (AAV1) ayant un tropisme pour la paroi vasculaire (233). Pour cela, des souris LDLr^{-/-} ; hApoB100^{+/+} de trois mois et dépourvues de plaque ont reçu une injection de *shRNA-Angptl2*, et ont été sacrifiées à six mois, à un âge où les plaques d'athérome sont présentes (232). Le but de l'étude a donc été d'apprécier les effets d'un traitement préventif sur le ralentissement de l'athérogenèse associé à une diminution de la sénescence endothéliale.

Chapitre 5 – Article publié

Knockdown of angiotensin-like 2 induces clearance of vascular endothelial senescent cells by apoptosis, promotes endothelial repair and slows atherosclerosis in mice

Laurie Caland^{1,2}, Pauline Labbé^{1,2}, Maya Mamarbachi², Louis Villeneuve², Gerardo Ferbeyre³, Pierre-Emmanuel Noly^{2,4}, Michel Carrier^{2,4}, Nathalie Thorin-Trescases², Éric Thorin^{2,4}

¹Faculty of Medicine, Department of Pharmacology and Physiology, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

²Montreal Heart Institute, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

³Faculty of Medicine, Department of Biochemistry, Université de Montréal and CRCHUM, Montreal, Quebec, Canada

⁴Faculty of Medicine, Department of Surgery, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

Correspondence to: Éric Thorin; email: eric.thorin@umontreal.ca

Keywords: p21, Bax/Bcl2, CD34, PAI-1, human internal mammary artery

Received: February 21, 2019

Accepted: June 4, 2019

Published: June 11, 2019

Copyright: Caland et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

Elimination of senescent cells (SnC) is anti-atherogenic, but the specific contribution of senescent vascular endothelial cells (EC) is unknown. We inactivated angiotensin like-2 (*angptl2*), a marker of SnEC and a pro-atherogenic cytokine in *LDLr^{-/-}*, *hApoB₁₀₀^{+/+}* atherosclerotic (ATX) mice. Three months after a single vascular delivery of a small hairpin (*sh*)*Angptl2* in 3-month old ATX mice using an adeno-associated virus serotype 1 (AAV1), aortic atheroma plaque progression was slowed by 58% ($p < 0.0001$). In the native aortic endothelium, *angptl2* expression was decreased by 80%, in association with a reduced expression of *p21*, a cyclin-dependent kinase inhibitor overexpressed in growth-arrested SnC. Endothelial activation was reduced (lower *Icam-1*, *Il-1 β* and *Mcp-1* expression), decreasing monocyte *Cd68* expression in the endothelium. One week post-injection, the ratio *Bax/Bcl2* increased in the endothelium only, suggesting that *angptl2⁺/p21⁺* SnEC were eliminated by apoptosis. Four weeks post-injection, the endothelial progenitor marker *Cd34* increased, suggesting endothelial repair. In arteries of atherosclerotic patients, we observed a strong correlation between *p21* and *ANGPTL2* ($r = 0.727$, $p = 0.0002$) confirming the clinical significance of *angptl2*-associated senescence. Our data suggest that therapeutic down-regulation of vascular *angptl2* leads to the clearance of SnEC by apoptosis, stimulates endothelial repair and reduces atherosclerosis.

INTRODUCTION

Senescent cells lose their proliferative potential in response to various stresses. They secrete a variety of pro-inflammatory mediators and proteases, gathered in the senescence-associated secretory phenotype (SASP) [1] that engages the immune system to eliminate senescent cells [2, 3]. Senescent cells accumulate in aging organisms, chronic age-related diseases and benign

tumors [4-7]; conversely, elimination of senescent cells contributes to improve health [8-11]. They also accumulate in tissues affected by atherosclerosis [12-14] and their elimination strikingly reduces atherogenicity in animal models [12, 14]. Senescence is thus a link between molecular damage and the altered physiology of aging, and targeting SnC using senolytic drugs appears a promising strategy to reduce the burden of age-related chronic inflammatory diseases [15],

including atherosclerosis [16, 17]. Selective and safe senolytics, however, have yet to be discovered as most have emerged from the oncology therapeutic armamentarium [18]. Combination of the natural product quercetin with the tyrosine kinase inhibitor dasatinib preferentially killed senescent cells in culture and in mice, improving health span in naturally aged mice [19, 20]. ABT263, a Bcl2 family inhibitor, was able to eliminate senescent cells after irradiation in mice and to rejuvenate bone marrow stem cells from both irradiated mice and naturally aged mice [21], to reverse pulmonary fibrosis in a mouse model [22], and to reduce senescence-associated Tau-dependent neuronal damage and cognitive decline [23].

Angiopoietin like-2 (*angptl2*) is a member of the SASP [24-28] and is detectable in most organs of adult mice [29]. *Angptl2* is expressed by senescent vascular human endothelial cells (EC) [30], but not quiescent or proliferative EC [31] and is atherogenic when infused in young *LDLr^{-/-};hApoB₁₀₀^{+/+}* atherosclerotic (ATX) mice [31] or in *angptl2*-endothelial transgenic *ApoE^{-/-}* mice [32]. We reported that plasma levels of *angptl2* are elevated in patients with cardiovascular diseases (CVD) [31], were associated with endothelial dysfunction [33] and were predictive of major cardiac adverse events (MACE) and death [34]. Recently, we reported a strong relationship between arterial expression of *p21*, a cell cycle inhibitor overexpressed in senescent cells and maintaining growth arrest [35], and circulating levels of *angptl2* in atherosclerotic patients [36]. Senescent EC are activated and promote aggregation of leukocytes [37], the initiating step of atherogenesis [38]. We therefore hypothesized that down-regulation of vascular *angptl2*, preferentially in the endothelium of severely dyslipidemic ATX mice would promote endothelial repair and slow atherogenesis. Here, we report that knockdown of vascular *angptl2* by a shRNA (shAngptl2), delivered to the vascular cells via a single injection of an AAV1 [39], slowed atheroma progression in ATX mice. Knockdown of *angptl2* was associated with a rapid reduction in the expression of EC senescence-associated *p21* accompanied by the increase in *Bax/Bcl2* ratio as a marker of apoptosis; subsequently, this was associated with endothelial repair as evidenced by the incorporation of endothelial progenitor CD34⁺ cells. In addition to our pre-clinical results, we show that vascular *ANGPTL2* gene expression is correlated with *p21* expression and inflammatory cytokines in the internal mammary artery isolated from severely atherosclerotic patients undergoing a coronary artery bypass surgery. Altogether, our data suggest that targeting vascular *angptl2* could be senolytic, delaying the progression of atherosclerosis.

RESULTS

Endothelial expression of *angptl2* and senescence gene markers parallels atherosclerosis

Firstly, and as expected, endothelial expression of *angptl2*, *Pai-1* and *p21* parallels the growing atheroma plaque in untreated *LDLr^{-/-};hApoB₁₀₀^{+/+}* atherosclerotic (ATX) mice up to 12-month old (-mo) (Figure 1); *p21* is a cyclin-dependent kinase inhibitor overexpressed in growth-arrested senescent cells, and *Pai-1* is a recognized SASP member and inducer of senescence [15]. When compared to age-matched wild-type mice, *angptl2*, *Pai-1* and *p21* are over-expressed in the native endothelium of 6-mo ATX mice (Figure 2).

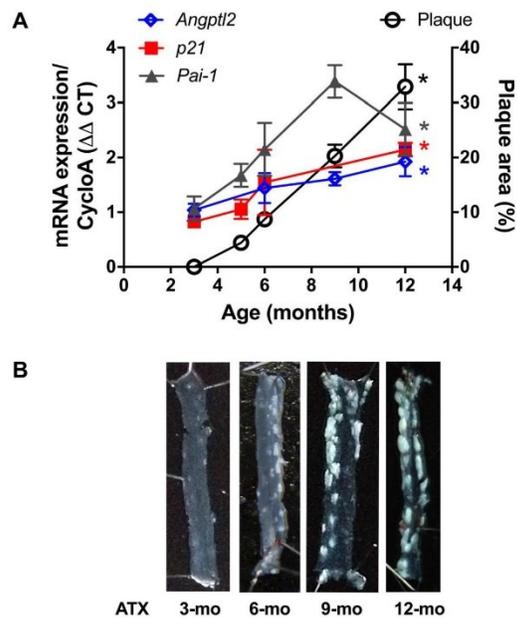


Figure 1. Age-dependent increase of senescence-associated *p21*, *Pai-1* and *angptl2* expressions in the native endothelium parallels plaque growth in the aorta. (A) mRNA expression of indicated genes was quantified in the native aortic endothelium of 3-mo (n=4), 5-mo (n=4), 6-mo (n=4) and 12-mo (n=4) control ATX mice. The average level of gene expression in 3-mo ATX mice was arbitrarily set at 1. Plaque area was quantified from longitudinally open thoracic aortas of 3-mo (n=7), 5-mo (n=5), 6-mo (n=7), 9-mo (n=12) and 12-mo (n=4) ATX mice. Data are expressed as mean±SEM. *: p<0.0001 vs. 3-mo ATX mice. (B) Representative pictures of age-related increase in atherosclerotic plaque in 3-, 6-, 9- and 12-mo ATX mice.

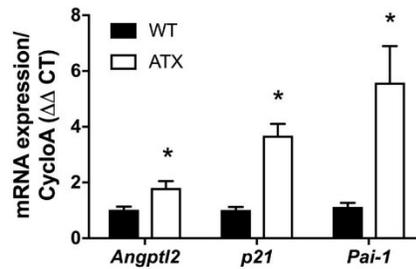


Figure 2. Increased expression of senescence-associated *p21*, *Pai-1* and *angptl2* in the native aortic endothelium of 6-month old ATX compared to WT mice. mRNA expression of indicated genes was quantified in the native aortic endothelium of 6-mo WT and ATX mice (n=3). The average level of gene expression in 6-mo WT mice was arbitrarily set at 1. Data are expressed as mean±SEM. *: p<0.05 vs. WT mice.

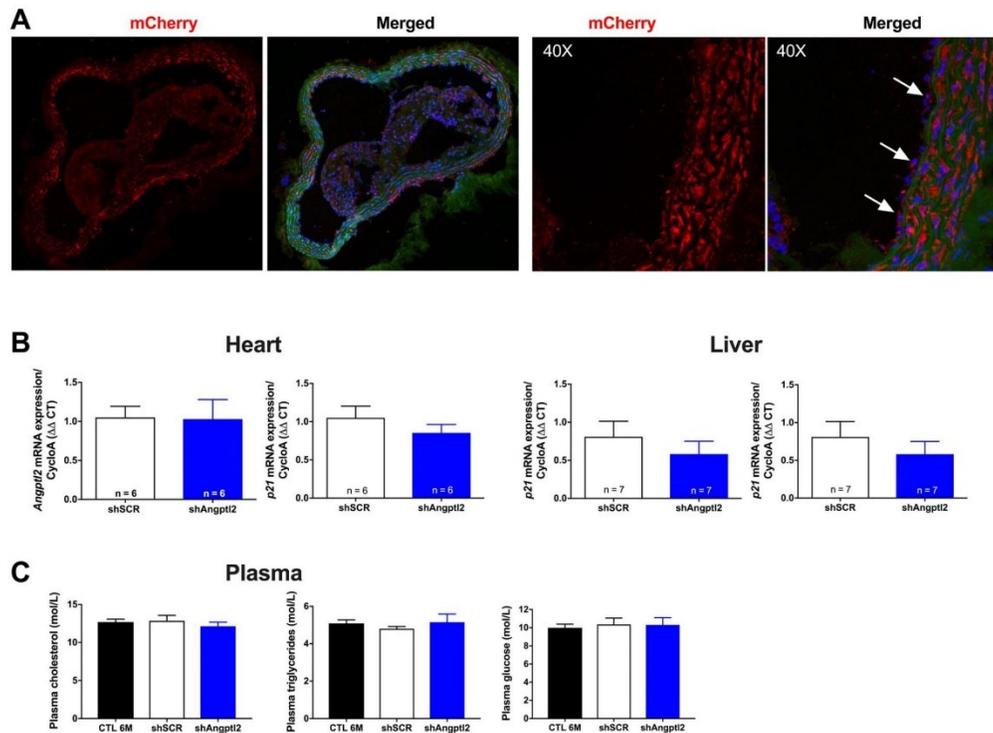


Figure 3. Distribution of the AAV1-mCherry in the aortic wall and specificity of the AAV1-shAngptl2. (A) Immunofluorescence of AAV1-mCherry in frozen aortic sections of ATX mice at 6 months of age, 3 months post-infection: mCherry signal distributed throughout the vascular wall is shown in red and basal lamina in green; nuclei are shown in blue. At a higher magnification (40X), arrows show mCherry signal in the endothelium. A negative control (absence of primary antibody against mCherry) was performed (data not shown). (B) Neither cardiac nor liver *Angptl2* and *p21* mRNA expressions were affected by the AAV1-shAngptl2 in ATX mice, 3 months post-infection. Average gene expression level in shSCR mice was arbitrarily set at 1. Data are mean±SEM of n ATX mice. (C) Cholesterol, triglycerides and glucose levels of ATX mice were not altered by the AAV1-shAngptl2, 3 months post-infection. Data are mean±SEM of n=7 ATX mice.

Vascular *angptl2* knockdown decreases atherosclerotic plaque size

To investigate the anti-atherogenic effects of *angptl2* knockdown, we delivered once a shAngptl2 (Table S1) using an adeno-associated virus serotype 1 (AAV1) as a vector (i.v. bolus injection) with preferred vascular tropism [39] in 3-mo ATX mice. Each mouse was sacrificed at 6-mo. The vascular delivery of the shRNA was confirmed by mCherry staining of the aortic wall, showing red fluorescence in the endothelial cells and throughout the vascular wall, but with no diffusion to the adventitia or in the plaque (Figure 3A). In addition, the AAV1-shAngptl2 infection neither reduced *angptl2* expression in the mouse heart and liver (Figure 3B), nor affected lipid and glucose blood levels (Figure 3C).

Plaque was not present at 3-mo (Figures 1B and 4A), but the atherosclerotic lesion covered $8\pm 1\%$ of the thoracic aorta of 6-mo untreated ATX mice, and $8\pm 1\%$ of the thoracic aorta of mice injected with an AAV1 containing a scrambled (SCR; Table S1) mRNA sequence (Figure 4). At 6-mo, 3 months AAV1-shAngptl2 post-injection, the atherosclerotic burden in the thoracic aorta was reduced by 58% (Figure 4; $p < 0.0001$; $n = 12$) compared to un-injected ATX mice and mice injected with an AAV1-shSCR. Therefore, targeting *angptl2*⁺ vascular cells is anti-atherogenic.

Vascular *Angptl2* down-regulation decreases markers of senescence, monocytes recruitment and inflammation in the endothelium

Some ATX mice were sacrificed 1, 2 and 4 weeks after AAV1-shAngptl2 infection. After only one week, endo-

thelial expression of *angptl2* and *p21* were significantly lowered and continued to decline over the 4-week period post-AAV1-shAngptl2 injection (Figure 5), demonstrating a fast reduction in senescence. At the end of the treatment, 3 months post-AAV1-shAngptl2 injection, *angptl2*, *p21* (Figure 5 and 6A) and *Pai-1* expressions were still significantly decreased in the endothelium (Figure 6A), suggesting that knockdown of *angptl2* lowers senescence in the long-term. Therefore, targeting *angptl2*⁺ EC reduces senescent EC load *in vivo*; conversely, this suggests that *angptl2*⁺ EC are senescent.

Senescent EC are known to favour adhesion of monocytes and their migration into the intima [37]. Accordingly, in the endothelium of 6-mo treated AAV1-shAngptl2 mice the expressions of the adhesion molecule *Icam-1* and of monocyte chemo-attractant protein *Mcp1* were reduced (Figure 6A) and this was associated with a lower expression of *Cd68*⁺ in endothelial cells (Figure 6A); the expression of the inflammatory marker *IL-1 β* also tended ($p = 0.057$) to decrease in AAV1-shAngptl2 mice (Figure 6A). Altogether, these data suggest that targeting *angptl2*⁺ senescent EC reduces inflammation and adhesion of *Cd68*⁺ mono-cytes onto the endothelium.

Vascular *Angptl2* down-regulation decreases inflammation, monocytes recruitment and macrophages infiltration into the media of the aorta

In the present study, *p21* expression was not altered in the media (including the atheroma plaque) of the aorta 3 months post-AAV1-shAngptl2 infection (Figure 6B), suggesting that in this mouse model and at this young

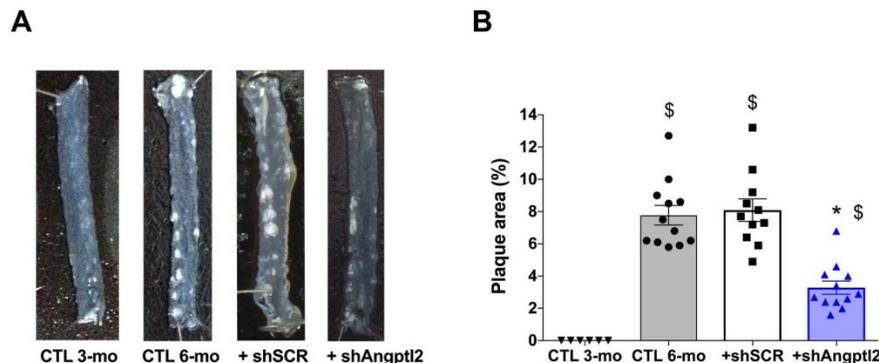


Figure 4. Down-regulation of vascular *angptl2* is anti-atherogenic. (A) Representative images of longitudinally open thoracic aortas showing atherosclerotic plaque, and (B) Quantification of thoracic aorta atheroma plaque area in 3 mo control (CTL 3-mo, $n = 6$), 6-mo control (CTL 6-mo, $n = 12$), 6-mo AAV1-shScramble (+ shSCR, $n = 11$) and 6-mo AAV1-shAngptl2 (+ shAngptl2, $n = 12$) ATX mice revealing white atheroma plaques at 6-mo. Data are mean \pm SEM. *; $p < 0.0001$ vs. CTL 6-mo and shSCR; §; $p < 0.0001$ vs. CTL 3-mo.

age, arterial smooth muscle cells, fibroblasts and foam cells are not senescent. *Angptl2* and *Cd68* expression, however, decreased (Figure 6B), as did *Pai-1*, *Il-1 β* and *Mcp1*, suggestive of less macrophage infiltration into the media and a lower inflammation. Indirectly, it also suggests that *Cd68*⁺ macrophages express *angptl2* and contribute to the local inflammation, as previously reported [29, 32, 40]. Therefore, targeting *angptl2*⁺ vascular cells reduces inflammation associated with macrophages infiltration into the media.

Vascular *Angptl2* down-regulation induces early apoptosis of senescent ECs and promotes endothelium repair

To determine the mechanism of senescent EC clearance and endothelial repair associated with the anti-atherogenic effect of the sh*Angptl2*, we euthanized ATX mice 1, 2 and 4 weeks after AAV1-sh*Angptl2* infection. Concomitantly with the fast reduction in senescence (Figure 5), after only one week post-

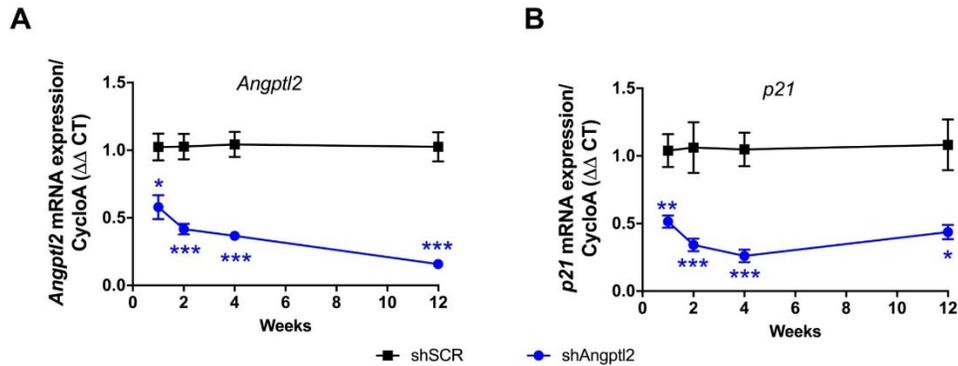


Figure 5. Time-dependent decrease of senescent-associated *Angptl2* and *p21* mRNA expressions in the native endothelium of the aorta post-AAV1-sh*Angptl2* injection. Decrease of *Angptl2* (A) and *p21* (B) mRNA expression post-injections (1-week, n=5-6; 2-week, n=5-7; 4-week, n=4-7; 3-month, n=6-4) in the native endothelium freshly harvested from thoracic aortas of ATX mice treated with AAV1-shSCR or AAV1-sh*Angptl2*. Average gene expression level in shSCR group was arbitrarily set at 1. Data are mean±SEM. *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001 vs. shSCR group, at each time point.

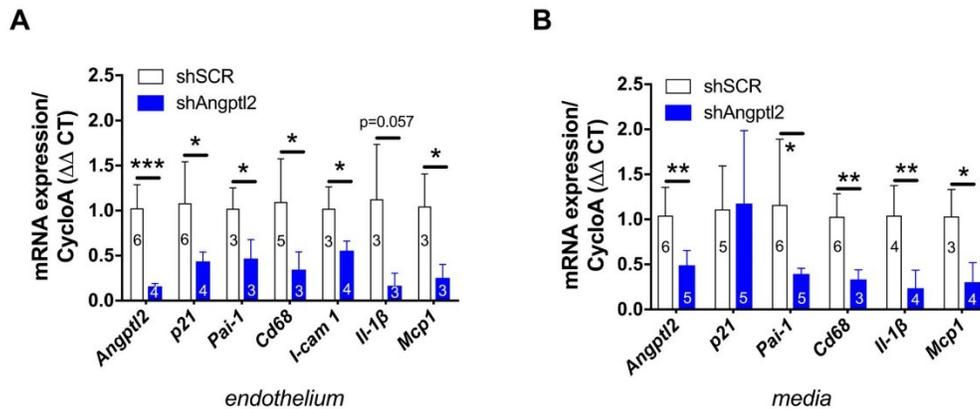


Figure 6. Down-regulation of vascular *angptl2* is senolytic and anti-atherogenic. (A) Decrease of mRNA expression of the indicated genes in the native aortic endothelium isolated from AAV1-sh*Angptl2*-treated ATX mice, 3 months post-infection. Data are mean±SEM of n mice. *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001 vs. shSCR group. (B) Decrease of mRNA expression (except for *p21*) in the de-endothelialized aortic wall (media) isolated from AAV1-sh*Angptl2*-treated ATX mice, 3 months post-infection. Data are mean±SEM. *: p<0.05 and ** p<0.01 vs. shSCR group.

infection, endothelial pro-apoptotic *Bax* expression was significantly increased ($p=0.005$), while that of the anti-apoptotic *Bcl2* was significantly decreased ($p=0.003$), increasing the *Bax/Bcl2* ratio (Figure 7A), suggesting that *angptl2*⁺ senescent EC were eliminated, at least partly, following activation of this apoptotic pathway. In contrast, in the media neither *Bax* nor *Bcl2* expression changed one week post-infection (Figure 7B), and this absence of apoptosis paralleled the lack of reduction in the senescence marker *p21* in the media (Figure 6). Thus, AAV1-shAngptl2 infection promotes cell death of senescent *angptl2*⁺ endothelial cells by apoptosis; in contrast, in other cells from the aortic wall, shAngptl2 does not affect senescence and does not induce apoptosis.

Since the shAngptl2 therapy is anti-atherogenic, it would be expected that endothelial repair occurred as a mean to restore and/or maintain endothelial functions. After 2 weeks of shAngptl2 treatment, *Cd34* expression tended to increase in the endothelium (from 1.1 ± 0.3 to 1.9 ± 0.3 , $p=0.082$, $n=5$ and 7 , respectively; data not shown), and after 4 weeks *Cd34* expression increased significantly ($p=0.034$) (Figure 8A). This increase in the marker of progenitor cells, suggesting $Cd34$ ⁺ progenitor

cell recruitment, was maintained up to the end of the study period, *i.e.* 3 months post-injection (Figure 8B-C). In contrast, endothelial apoptosis was no longer observed 3 months post-injection (data not shown). This strongly suggests that rapid apoptosis of *angptl2*⁺ senescent EC stimulates long-term endothelial repair, at least in part by incorporating circulating endothelial progenitor cells ($CD34$ ⁺ EpC).

Vascular *ANGPTL2* expression correlates with vascular senescence in internal mammary artery of patients with severe coronary artery disease

To validate the clinical relevance of *ANGPTL2* as a marker of vascular senescence, and to assess whether accumulation of senescent cells precedes plaque growth in human arteries, we measured the expression of *ANGPTL2* and markers of senescence in human arterial segments. We recruited 26 patients undergoing coronary artery bypass (CABG) surgery with or without valve replacement (characteristics of the patients are in Table S2). In internal mammary artery segments free of plaque, the expression of *p21* and that of *ANGPTL2* were tightly associated (Figure 9A) and did not correlate with the age of the donor (data not shown).

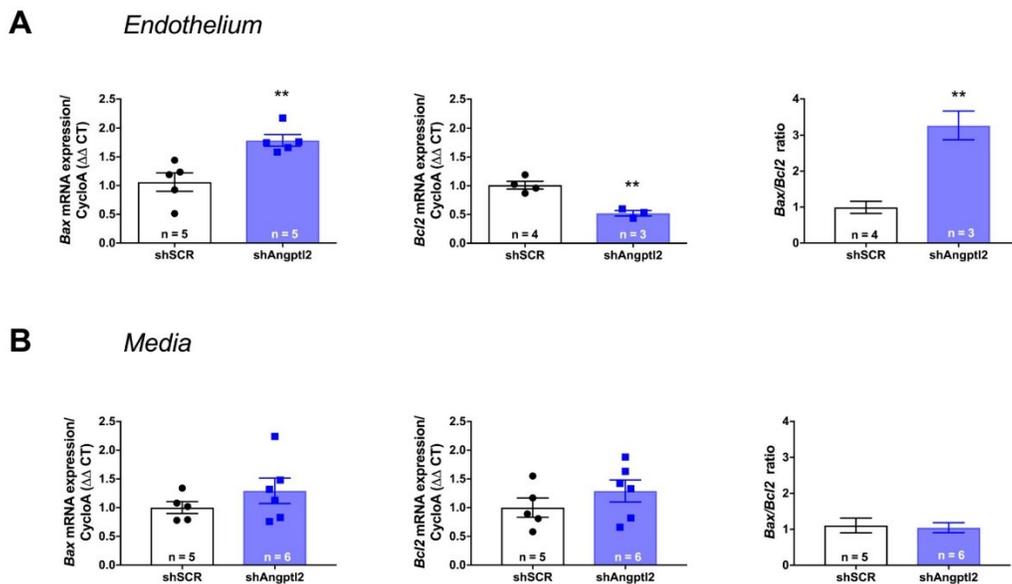


Figure 7. Down-regulation of vascular *angptl2* is senolytic by promoting apoptosis. (A) Induction of *Angptl2*⁺ senescent endothelial cells apoptosis 1-week post-injection of AAV1-shAngptl2 in aortas of ATX mice: *Bax* mRNA expression increased (left, $p=0.005$) while *Bcl2* mRNA expression decreased (middle, $p=0.003$), increasing *Bax/Bcl2* ratio (right). (B) Absence of apoptosis in cells from the media 1-week post-injection of AAV1-shAngptl2 in aortas of ATX mice. Data are mean \pm SEM of n ATX mice.

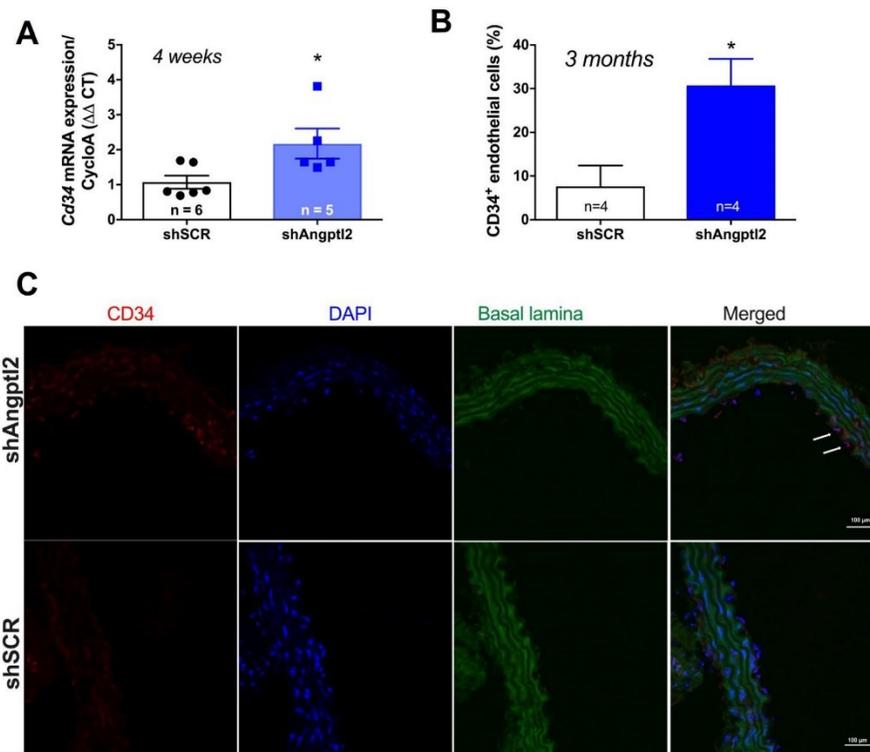


Figure 8. Down-regulation of vascular *angptl2* is anti-atherogenic and promotes endothelial repair. (A) Increased expression of the progenitor marker *Cd34* mRNA in the native aortic endothelium 4-week post-injection of shAngptl2 ATX mice. Data are mean±SEM. * : $p < 0.05$ vs. shSCR group. The average gene expression levels in the shSCR group were arbitrarily set at 1. (B) Higher CD34 staining in the endothelium of 6-month old ATX mice 3 months post-injection of the AAV1-shAngptl2 compared to ATX mice injected with the scramble shRNA (shSCR). Data are mean±SEM. * : $p < 0.05$ vs. shSCR. C) Representative images of CD34 immunostaining are shown.

Furthermore, *ANGPTL2* and *p21* levels correlated with pro-inflammatory cytokines of the SASP, i.e., *TNFA*, *IL-8* and *IL-6* levels (Figure 9B-C). These clinical data validate the strong link between vascular *ANGPTL2* and the marker of senescence *p21*, in yet non-atherosclerotic arteries, independently of age. These data also suggest that accumulation of senescent vascular *ANGPTL2*⁺; *p21*⁺ cells might precede plaque growth in human arteries.

DISCUSSION

The novel findings of this study are that down-regulation of vascular *Angptl2* may limit the progression of atherosclerotic lesions in pre-atherosclerotic dyslipidemic mice by 1) inducing clearance of senescent ECs through apoptosis and 2) by promoting

endothelium repair and thus, attenuating the pro-inflammatory environment in the wall of the aorta. We have also shown that vascular *ANGPTL2* expression is correlated with senescence and inflammatory cytokines of the SASP in pre-atherosclerotic internal mammary artery from patients with coronary artery disease, suggesting that *angptl2* is a clinical marker of arterial senescence and that arterial senescence may precede plaque growth in human arteries. Altogether, these observations demonstrate that targeting vascular *angptl2* is an innovative strategy to delay atherosclerosis by reducing endothelial senescence (Figure 10).

Age-related atherosclerosis is partly driven by the accumulation of senescent cells in mice [12, 14], creating a pro-inflammatory environment through their

SASP [1]. Targeting senescent cells using senolytic drugs appears therefore a promising strategy to reduce the burden of age-related chronic inflammatory diseases [15], including atherosclerosis [16, 17]. Selective and safe senolytics have yet to be discovered as most come from the oncology therapeutic field [18]. The protein *angptl2*, on the other hand, is highly expressed by senescent vascular human EC [30], but not by quiescent or proliferative EC [31], and is highly atherogenic when infused in young *LDLr^{-/-};hApoB100^{-/-}* atherosclerotic mice [31]. Abundant *ANGPTL2* expression was also observed in atheroma plaques of patients, particularly in EC and infiltrated macrophages [32]. The presence of senescent cells was also reported in human atherosclerotic arteries [17, 41]. Although co-expression of vascular *angptl2* and senescence markers has never been reported, our data show that by targeting *angptl2⁺* vascular cells, senescent cells are eliminated, and thus strongly suggest that *angptl2* is a marker of arterial

senescence. Indeed, our recent study demonstrated that the per-operative variations in circulating plasma levels of *angptl2* following cardiac surgery were determined by fat and arterial tissue inflammatory and senescence load of the patients [36]. Therefore, *angptl2* is a clear marker of aging, which levels of expression are magnified by the presence of risk factors for vascular diseases [42] and are linked to arterial senescence [36]. The demonstration that down-regulation of *angptl2* is anti-atherogenic therefore validates the concept of the contribution of senescent EC in the pathogenesis of atherosclerosis.

Several data collected in this work converge to support the contribution of *angptl2⁺* senescent EC in endothelial dysfunction and in atherogenesis. Pro-inflammatory senescent EC are activated and promote aggregation of leukocytes [37], the initiating step of atherogenesis [38]. Our results reveal that following sh*Angptl2* treatment,

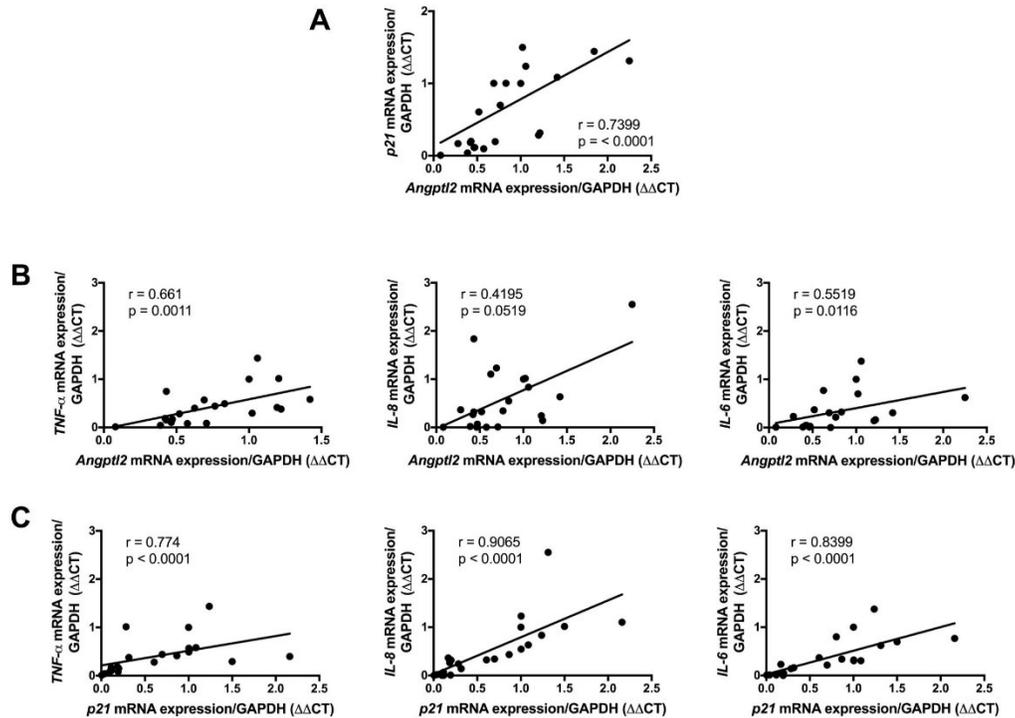


Figure 9. Association of vascular *ANGPTL2*, senescence and inflammation in IMA from atherosclerotic patients undergoing coronary artery by-pass surgery. Linear correlations between (A) *ANGPTL2* and *p21* mRNA expression, (B) *ANGPTL2* and *TNF- α* , *IL-8* and *IL-6* mRNA expression and (C) *p21* and *TNF- α* , *IL-8* and *IL-6* mRNA expression in IMA segments (n=26). Non-parametric Spearman correlation test was applied. Patient's characteristics are described in Table S2.

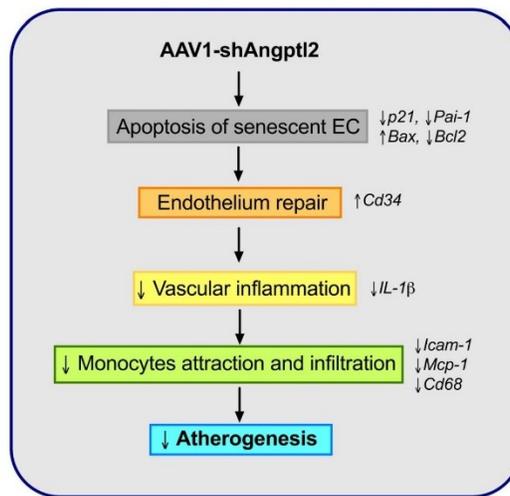


Figure 10. Schematic representation of the putative anti-atherogenic action of AAV1-shAngptl2. Elimination of *angptl2*⁺*p21*⁺ senescent endothelial cells by apoptosis promotes endothelial repair. This leads to a reduced inflammatory profile, a lower immune cell adhesiveness and infiltration and therefore, a reduced atherogenicity.

the endothelial expression of the adhesion molecule *Icam-1* and the endothelial expression of monocyte chemo-attractant protein *Mcp1* were reduced, likely contributing to lower adhesion of *Cd68*⁺ monocytes onto the endothelium. Monocytes adhesion is crucial for macrophage infiltration and atheroma growth [38]. Endothelial cells and macrophages are the primary cells that secrete *angptl2* in the atherosclerotic lesion [32], and *angptl2* activates macrophage recruitment [29]. Accordingly, reducing *angptl2*⁺ senescent EC burden translates into lower EC activation, *i.e.* preserved endothelial anti-adhesive functions. Similarly, in hypercholesterolemic mice treated with the senolytic cocktail dasatinib/quercetin, endothelial dilatory function was improved *via* a greater nitric oxide (NO) bioavailability [12]. Interestingly, we reported that the dilatory eNOS-NO pathway was up-regulated in *angptl2* knockdown mice [43], and that in contrast, *angptl2* induced endothelial dysfunction [44]. Senescence was not quantified in the latter studies [43, 44], but altogether our data suggest that lowering *angptl2*, and thus senescence, protects the endothelial functions. In the present study, *p21* expression was not altered in the media of the aorta 3 months post-infection, suggesting that in this mouse model and at this young age, arterial smooth muscle cells, fibroblasts and foam cells are not senescent. In contrast, *Angptl2* and *Cd68* expression in the media decreased 3 months post-infection, as did *Pai-1*, *Il-1β* and *Mcp1*. On one hand, this result suggests

that *Cd68*⁺ macrophages express *angptl2* and contribute to the local inflammation, as previously reported [29, 32, 40] and, on the other hand, that elimination of senescent *angptl2*⁺ EC reduced monocyte adhesion and macrophage infiltration. Macrophages appear unique as they may express *p16* as part of a physiological response to immune stimuli rather than through senescence [19, 45, 46]. Hence, reduced adhesion and infiltration of macrophages suggest improved endothelial functions 3 months post-AAV1-shAngptl2 therapy. Beyond the known benefits of eliminating senescent cells [18], the concomitant reduction both in the endothelium and the media of *Pai-1*, a well recognized SASP member and inducer of senescence [47], is clinically relevant: genetically driven high circulating levels of PAI-1 correlate with the severity of atherosclerosis [48], while conversely, a null mutation in its gene reduces markers of biological aging and increases longevity in humans [49].

A high level of senescent cells limits tissue remodelling and repair [50]. In contrast, parallel to the reduced endothelial expression of *angptl2* and *p21*, endothelial (but not in the media) pro-apoptotic *Bax* expression was significantly increased after one week of treatment, while that of the anti-apoptotic *Bcl2* was significantly decreased. These data suggest that *angptl2*⁺*p21*⁺ senescent EC were eliminated following activation of this apoptotic pathway, which has been shown to be an

effective mean of remodelling [51]. Selective induction of death by activation of apoptosis of senescent cells is the common mechanism of action of senolytics [12, 14, 19, 52]. Thus, elimination of senescent *angptl2*⁺ EC cells by apoptosis is a senolytic approach.

Since the shAngptl2 therapy is anti-atherogenic, preserves endothelial anti-adhesive functions and reduces arterial wall inflammation, endothelial repair should occur. One major mechanism of repair is the recruitment of CD34⁺ progenitor cells from the circulation, and more specifically endothelial progenitor cells for re-endothelialization in mice [53]. Conversely, a reduced number of circulating EpC has been associated with an increase in major advanced cardiac events in patients with CVD [54]. Two weeks after shAngptl2 treatment, *Cd34* expression tended to increase in the endothelium (data not shown), it increased significantly after 4 weeks and was sustained up to 3 months, suggesting that the shAngptl2 therapy stimulated repair of the endothelium. Thus, apoptosis of *angptl2*⁺; *p21*⁺ senescent EC likely stimulated endothelial repair, at least partly by incorporating circulating EpC. To our knowledge, this result is the first study to imply that integration of EpC into the native endothelium contributes to a functional endothelial repair post-senolytic therapy. Down-regulating vascular *angptl2* should be safe; *angptl2*-KO [29] and our Angptl2-KD mice are healthy and resist better to an inflammatory stress [44].

Senescent EC overlay the atheroma plaque in patients [17]. To validate the clinical relevance of *ANGPTL2* as a marker of vascular senescence, and to assess whether vascular senescence precedes plaque growth in patients, we measured the expression of *ANGPTL2* and markers of senescence in functional, not atherosclerotic internal mammary artery segments from patients with CVD. In these arterial segments, the expression of *p21* and that of *ANGPTL2* were tightly associated, independently of the age of the donor, demonstrating that accumulation of senescent vascular cells is driven by stress (risk factors for CVD) more than age *per se*, as we previously reported in cultured EC isolated from mammary arteries [55]. The strong levels of association of *ANGPTL2* and *p21* levels with the pro-inflammatory cytokines of the SASP, *i.e.*, *TNF α* , *IL-8* and *IL-6* levels strengthen the concept that senescence-driven chronic low-grade inflammation ultimately triggers the appearance of the atheroma with time.

Limitations of the study: first, almost all data were provided on mRNA level. Unfortunately, there was not enough material in the native endothelium layer scraped from the mouse aorta to look at the protein level. Second, *n* number is relatively small and variable due to

the limited and variable availability of endothelial mRNA extractions. Third, expression of *p21* mRNA was unaffected by the shAngptl2 in the media, suggesting either that cells in the media were not senescent, as we propose in these young ATX mice, or, alternatively, that *angptl2* is not central to the maintenance of senescence in cells other than endothelial cells. Finally, the underlying mechanism of elevated CD34⁺ progenitor cell recruitment after shAngptl2 treatment was not elucidated. Because on one hand, *angptl2* is anti-apoptotic [56], and because on the other hand, the shAngptl2 induced apoptosis of endothelial cells, it is possible that the generation of apoptotic bodies act as chemoattractant for EpC [57, 58]. This attractive hypothesis would need to be validated in specific experiments.

In conclusion, therapeutic down-regulation of vascular *angptl2* leads to the clearance of senescent EC by apoptosis, stimulates endothelial repair, preserves endothelial functions and reduces atherosclerosis. *ANGPTL2* and *p21* expression are tightly associated in non-atherosclerotic human arteries, which further suggests that accumulation of arterial senescence precedes age-related atherosclerosis. Altogether, these data suggest that targeting vascular *angptl2* could be a selective and safe senolytic strategy to delay or reduce atherogenesis.

MATERIALS AND METHODS

Animal study

All animal experiments were performed in accordance with the “Guide for the Care and Use of Experimental Animals of the Canadian Council on Animal Care” and the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” of the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996) and was approved by the Montreal Heart Institute Ethics Committee. Knockout/transgenic severely dyslipidemic LDLr^{-/-};hApoB^{+/+} (ATX) male mice were fed a normal diet. Mice were anaesthetized with 44 mg/kg ketamine and 2.2 mg/kg xylazine and ventilated. Thoracic aortas of ATX and WT mice were used to quantify atherosclerotic lesions and to assess mRNA expression of senescent markers, inflammatory markers, progenitor marker and apoptosis markers both in the freshly isolated native endothelium and in the aorta wall [31]. Hearts, livers and blood of ATX mice were used to validate the vascular tropism of the AAV1.

AAV1 production

The protocol was adapted from a previous study [39]. HEKT293T competent cells were plated until a con-

fluence of 70%, and were then transfected overnight with 12 µg/mL of the pXYZ C1 plasmid vector (serotype 1), 4 µg/mL of the plasmid containing shAngptl2, shSCR (see shRNA sequences Table S1) or mCherry red fluorescent protein sequence, and 48 µg/mL of polyethylenimine (Sigma) in a starvation medium. The next day, the medium was changed and cells were incubated for 48h with normal growth medium. Then, cells were collected and lysed with Tris 1M/ NaCl 5M pH 8.5. Lysis was accelerated by several freeze/thaw steps and 1 µL of MgCl₂ (1M) in addition to benzonase (250U/µL, Sigma) were added *per* mL of lysate. After centrifugation, AAV1 were isolated from the supernatant by iodixanol gradients during ultracentrifugation, then extracted with a syringe and concentrated in a PBST buffer volume between 0.25 ml and 0.5 ml with Ultracel-100 regenerated cellulose membrane (100 kDa, EMD Millipore).

AAV1 titration and administration in ATX mice

Titration was performed by qPCR reactions using a StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific). AAV1 were quantified using a standard range made by serial dilutions (10 ng to 10⁻⁶ ng) of shAngptl2 and shSCR plasmids containing a target sequence (BGH) or the plasmid containing mCherry sequence. The primers for BGH target sequence and mCherry were designed using Clone Manager software (Table S3). Each mouse received a systemic (i.v.) bolus injection of 10¹¹ AAV1 particles at 3-month old (-mo) and were studied at 6-mo; some mice received an injection at 5-mo and were studied after 1 week, 2 weeks or 4 weeks. A pilot study showed that injection of 5x10¹⁰ AAV1 particles was sub-optimal, leading to an inconsistent reduction in angptl2 by ~50% (data not shown).

Quantification of atherosclerotic lesions

Freshly isolated thoracic aortas of ATX mice were longitudinally opened and pictures taken with a digital camera. Atherosclerosis lesions were quantified by measuring the white spots in the aorta using ImageJ software as previously [31]. Plaque areas were expressed as percentage of total aortic area.

Total RNA extraction

Total RNA was extracted from freshly isolated aorta, separately in both the endothelial layer and the arterial wall. Native ECs were gently scraped with the tip of a scalpel blade from longitudinally opened segments of the thoracic aorta and endothelial mRNA was extracted as previously [31]; the denuded aorta wall (including the atheroma plaque), the liver and the heart were pulverized in liquid nitrogen with a Cell crusher kit

(Cellcrusher Limited). RNAs were extracted using an RNeasy Mini Kit (Qiagen). Contamination with genomic DNA was prevented by a digestion with a DNase I mix (Qiagen), according to the manufacturer's guidelines. Total RNA was quantified using a NanoDrop ND-100 spectrophotometer.

Real-Time quantitative PCR

Total RNA was reverse transcribed into first-strand complementary DNA with M-MLV reverse transcriptase (Thermo Fisher), using random hexamer primers. The qPCR reactions were carried out on diluted RT products by using the DNA-binding dye SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) to detect PCR products with StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific). The primers of target genes (*Angptl2*, *p21*, *Il-1β*, *Icam-1*, *Cd68*, *Cd34*, *Mcp1*, *Bax*, *Bcl2*) were designed using Clone Manager software (Table S3 (mouse) and S4 (human)). All samples were run in duplicate and the fold changes in gene expression were calculated by a $\Delta\Delta C_T$ method using *cycloA* (cyclophilin A) as the housekeeping gene. N numbers are not homogeneous due to the limited and variable availability of endothelial mRNA extraction.

Immunofluorescence

Fixed tissues (transversely aortic frozen sections) were incubated with 1:100 diluted rabbit anti-mCherry (#ab167453; Abcam) or with 1:200 diluted rabbit anti-CD34 (#ab185732; Abcam) and 1:800 diluted secondary antibody Alexa fluor-647 anti-rabbit (#A31573, Thermo Fisher Scientific). DNA counterstaining was performed by incubating fixed tissues with DAPI (D1306, Thermo Fisher Scientific). Fluorescence was visualized by confocal microscopy (Zeiss LSM 510) with 40X magnification for mCherry staining and 20X magnification for CD34 staining. CD34 staining was normalized to the total number of nuclei present in the endothelial layer (DAPI staining).

Biochemical analysis

Blood was rapidly collected after sacrifices and then centrifuged within minutes to collect the plasma. Samples were stored frozen in aliquots at -80°C until further analysis. Plasma metabolic profile (total cholesterol, glucose and triglycerides) was measured at the biochemical laboratory of the Montreal Heart Institute.

Human study

Twenty-six coronary artery disease (CAD) patients undergoing coronary arterial bypass (CABG, n=16), or

both CABG and aortic or mitral valve replacement (VR) (n=10) between February 2014 and January 2016, were prospectively included in the study at the Montreal Heart Institute (Quebec, Canada). Inclusion criteria were patients undergoing elective CABG and VR with normal left ventricular function at pre-operative evaluation. Patients who underwent other type of procedure were excluded. All patients signed an informed consent and the study (#ICM 13-1492) was approved by the ethical committee on human research of the Montreal Heart Institute. On the overall population, the mean age was 67±8 years and 92% were male. All patients had at least one risk factor for CVD and received preventive treatment such aspirin or statin before surgery. Left ventricular function was normal in all patients. The basal pre-operative characteristics of the patients are detailed in the Table S2. All patients underwent cardiac surgery with cardiopulmonary bypass (CPB). During surgery, a distal segment of left internal mammary artery (IMA) measuring at least 1 cm in length was harvested and stored at -80°C for all patients. Then gene expression of *ANGPTL2* and other markers of inflammation (*TNF α* , *IL-8*, *IL-6*) and senescence (*p21*) were measured in this tissue. Frozen IMA fragments were pulverized in liquid nitrogen and dry ice with a Cell crusher kit (Cellcrusher Limited). Samples of organ powder were then processed for RNA extraction according to the manufacturer's instructions (RNeasy mini kit, Qiagen). Contamination with DNA was prevented by a digestion with a DNase I mix (Qiagen) according to the manufacturer's guidelines. Total RNA was quantified using a NanoDrop ND-100 spectrophotometer. Total RNA was reverse-transcribed into first-strand complementary DNA with M-MLV reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific) using random hexamer primers. The primers of target genes were designed using Clone Manager software (Table S4). Quantitative polymerase chain reaction was performed using the SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific). All samples were run in duplicate and the fold changes in gene expression were calculated by a $\Delta\Delta$ CT method using *GAPDH* as the housekeeping gene.

Statistical analysis

Data are presented as mean±SEM, with “n” indicating the number of animals or patients. Animal data were analyzed using parametric and non-parametric tests: a two-tailed unpaired *t* test was used to compare plaque growth and endothelial gene (*Angptl2*, *p21* and *Pai-1*) expression in ATX mice at 3- vs. 12-mo (Figure 1). A two-way ANOVA with Sidak's multiple comparisons test was performed to compare mRNA expressions in WT and ATX mice (Figure 2). One-way ANOVA with Tukey's posthoc-test was used to compare plaque area

in untreated 3-mo, AAV1-treated or -untreated 6-mo ATX mice (Figure 4). Unpaired *t* test or Mann Whitney test was used to compare mRNA expression in shSCR group (control) versus shAngptl2 group (Figures 5, 6, 7 and 8). Human data are presented as dot plots. Non-parametric Spearman correlation analyses were performed to correlate the mRNA levels of *ANGPTL2* and *p21* with *TNF α* , *IL-8* and *IL-6* in IMA segments from patients (Figure 9). All statistics were performed using Graph Pad Prism 7.0.

Abbreviations

AAV1: adeno-associated virus serotype 1; ACEi: angiotensin converting enzyme inhibitors; Angptl2: angiotensin-like 2; ARA, angiotensin II receptor antagonists; ATX: dyslipidemic LDLr^{-/-}; ApoB100^{+/+}: spontaneously atherosclerotic mice; Bax: Bcl-2-associated X protein; Bcl2: B-cell lymphoma 2; BMI: body mass index; CAD: coronary artery disease; CD34: Cluster of Differentiation 34; CD68: Cluster of Differentiation 68; COPD: chronic obstructive pulmonary disease; CVD: cardiovascular diseases; EC: endothelial cells; HbA1C: glycated hemoglobin A1C; ICAM-1: intracellular adhesion molecule-1; IL-1 β : interleukin-1 β ; IL-6: interleukin-6; IL-8: interleukin-8; MCP-1: monocyte chemoattractant protein 1; p21: cyclin-dependent kinase inhibitor 1; PAI-1: plasminogen activator inhibitor 1; SASP: senescence-associated secretory phenotype; shRNA: small hairpin ribonucleic acid; SnC: senescent cells; SCR: scramble sequence; TNF- α : tumor necrosis factor alpha.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

LC and ET were responsible for the experimental design. LC carried out experiments and data analysis in mice. PL carried out quantitative PCR analysis in the human samples. PL and NTT analyzed the data of the human samples. MM designed the plasmids and all the primers. LV carried out confocal microscopy. PEN and MC performed the cardiac surgeries and supervised analysis of the human samples. LC, PL, NTT and ET wrote the manuscript. GF edited the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Natacha Duquette and Marie-Ève Higgins for expert assistance in injecting the AAV1-shRNA in mice.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest in relation to this work.

FUNDING

This research was funded by the Canadian Institute for Health Research (MOP133649, E.T.) and the Foundation of the Montreal Heart Institute (E.T.).

REFERENCES

1. Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol.* 2010; 5:99–118. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-121808-102144> PMID:20078217
2. Kang TW, Yevsa T, Woller N, Hoenicke L, Wuestefeld T, Dauch D, Hohmeyer A, Gereke M, Rudalska R, Potapova A, Iken M, Vucur M, Weiss S, et al. Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature.* 2011; 479:547–51. <https://doi.org/10.1038/nature10599> PMID:22080947
3. Xue W, Zender L, Miething C, Dickins RA, Hernando E, Krizhanovsky V, Cordon-Cardo C, Lowe SW. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature.* 2007; 445:656–60. <https://doi.org/10.1038/nature05529> PMID:17251933
4. Deschênes-Simard X, Gaumont-Leclerc MF, Bourdeau V, Lessard F, Moiseeva O, Forest V, Igelmann S, Mallette FA, Saba-El-Leil MK, Meloche S, Saad F, Mes-Masson AM, Ferbeyre G. Tumor suppressor activity of the ERK/MAPK pathway by promoting selective protein degradation. *Genes Dev.* 2013; 27:900–15. <https://doi.org/10.1101/gad.203984.112> PMID:23599344
5. Michaloglou C, Vredeveld LC, Mooi WJ, Peeper DS. BRAF(E600) in benign and malignant human tumours. *Oncogene.* 2008; 27:877–95. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210704> PMID:17724477
6. Castro P, Xia C, Gomez L, Lamb DJ, Ittmann M. Interleukin-8 expression is increased in senescent prostatic epithelial cells and promotes the development of benign prostatic hyperplasia. *Prostate.* 2004; 60:153–59. <https://doi.org/10.1002/pros.20051> PMID:15162381
7. Biran A, Zada L, Abou Karam P, Vadai E, Roitman L, Ovadya Y, Porat Z, Krizhanovsky V. Quantitative identification of senescent cells in aging and disease. *Aging Cell.* 2017; 16:661–71. <https://doi.org/10.1111/acer.12592> PMID:28455874
8. Baker DJ, Childs BG, Durik M, Wijers ME, Sieben CJ, Zhong J, Saltness RA, Jeganathan KB, Verzosa GC, Pezeshki A, Khazaie K, Miller JD, van Deursen JM. Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature.* 2016; 530:184–89. <https://doi.org/10.1038/nature16932> PMID:26840489
9. Baker DJ, Wijshake T, Tchkonina T, LeBrasseur NK, Childs BG, van de Sluis B, Kirkland JL, van Deursen JM. Clearance of p16(Ink4a)-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature.* 2011; 479:232–36. <https://doi.org/10.1038/nature10600> PMID:22048312
10. Baar MP, Brandt RM, Putavet DA, Klein JD, Derks KW, Bourgeois BR, Stryeck S, Rijksen Y, van Willigenburg H, Feijtel DA, van der Pluijm I, Essers J, van Cappellen WA, et al. Targeted Apoptosis of Senescent Cells Restores Tissue Homeostasis in Response to Chemotoxicity and Aging. *Cell.* 2017; 169:132–147.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.031> PMID:28340339
11. Yosef R, Pilpel N, Tokarsky-Amiel R, Biran A, Ovadya Y, Cohen S, Vadai E, Dassa L, Shahar E, Condiotti R, Ben-Porath I, Krizhanovsky V. Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nat Commun.* 2016; 7:11190. <https://doi.org/10.1038/ncomms11190> PMID:27048913
12. Roos CM, Zhang B, Palmer AK, Ogrodnik MB, Pirtskhalava T, Thalji NM, Hagler M, Jurk D, Smith LA, Casacang-Verzosa G, Zhu Y, Schafer MJ, Tchkonina T, et al. Chronic senolytic treatment alleviates established vasomotor dysfunction in aged or atherosclerotic mice. *Aging Cell.* 2016; 15:973–77. <https://doi.org/10.1111/acer.12458> PMID:26864908
13. Minamino T, Yoshida T, Tateno K, Miyauchi H, Zou Y, Toko H, Komuro I. Ras induces vascular smooth muscle cell senescence and inflammation in human atherosclerosis. *Circulation.* 2003; 108:2264–69. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000093274.82929.22> PMID:14557365
14. Childs BG, Baker DJ, Wijshake T, Conover CA, Campisi J, van Deursen JM. Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis. *Science.* 2016; 354:472–77. <https://doi.org/10.1126/science.aaf6659> PMID:27789842
15. McHugh D, Gil J. Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *J Cell Biol.* 2018; 217:65–77. <https://doi.org/10.1083/jcb.201708092> PMID:29114066
16. Katsuomi G, Shimizu I, Yoshida Y, Minamino T. Vascul-

- lar Senescence in Cardiovascular and Metabolic Diseases. *Front Cardiovasc Med.* 2018; 5:18. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2018.00018> PMID:29556500
17. Minamino T, Miyauchi H, Yoshida T, Ishida Y, Yoshida H, Komuro I. Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: role of telomere in endothelial dysfunction. *Circulation.* 2002; 105:1541–44. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000013836.85741.17> PMID:11927518
 18. Childs BG, Gluscevic M, Baker DJ, Laberge RM, Marquess D, Dananberg J, van Deursen JM. Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing. *Nat Rev Drug Discov.* 2017; 16:718–35. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.116> PMID:28729727
 19. Xu M, Pirtskhalava T, Farr JN, Weigand BM, Palmer AK, Weivoda MM, Inman CL, Ogronnik MB, Hachfeld CM, Fraser DG, Onken JL, Johnson KO, Verzosa GC, et al. Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nat Med.* 2018; 24:1246–56. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0092-9> PMID:29988130
 20. Zhu Y, Tchkonja T, Pirtskhalava T, Gower AC, Ding H, Giorgadze N, Palmer AK, Ikeno Y, Hubbard GB, Lenburg M, O'Hara SP, LaRusso NF, Miller JD, et al. The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell.* 2015; 14:644–58. <https://doi.org/10.1111/acer.12344> PMID:25754370
 21. Chang J, Wang Y, Shao L, Laberge RM, Demaria M, Campisi J, Janakiraman K, Sharpless NE, Ding S, Feng W, Luo Y, Wang X, Aykin-Burns N, et al. Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nat Med.* 2016; 22:78–83. <https://doi.org/10.1038/nm.4010> PMID:26657143
 22. Pan J, Li D, Xu Y, Zhang J, Wang Y, Chen M, Lin S, Huang L, Chung EJ, Citrin DE, Wang Y, Hauer-Jensen M, Zhou D, Meng A. Inhibition of Bcl-2/xl With ABT-263 Selectively Kills Senescent Type II Pneumocytes and Reverses Persistent Pulmonary Fibrosis Induced by Ionizing Radiation in Mice. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2017; 99:353–61. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2017.02.216> PMID:28479002
 23. Bussian TJ, Aziz A, Meyer CF, Swenson BL, van Deursen JM, Baker DJ. Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline. *Nature.* 2018; 562:578–82. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0543-y> PMID:30232451
 24. Acosta JC, Banito A, Wuestefeld T, Georgilis A, Janich P, Morton JP, Athineos D, Kang TW, Lasitschka F, Andrulis M, Pascual G, Morris KJ, Khan S, et al. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol.* 2013; 15:978–90. <https://doi.org/10.1038/ncb2784> PMID:23770676
 25. Shimamoto A, Kagawa H, Zensho K, Sera Y, Kazuki Y, Osaki M, Oshimura M, Ishigaki Y, Hamasaki K, Kodama Y, Yuasa S, Fukuda K, Hirashima K, et al. Reprogramming suppresses premature senescence phenotypes of Werner syndrome cells and maintains chromosomal stability over long-term culture. *PLoS One.* 2014; 9:e112900. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112900> PMID:25390333
 26. Nagano T, Nakano M, Nakashima A, Onishi K, Yamao S, Enari M, Kikkawa U, Kamada S. Identification of cellular senescence-specific genes by comparative transcriptomics. *Sci Rep.* 2016; 6:31758. <https://doi.org/10.1038/srep31758> PMID:27545311
 27. Eggert T, Wolter K, Ji J, Ma C, Yevsa T, Klotz S, Medina-Echeverz J, Longerich T, Forgues M, Reisinger F, Heikenwalder M, Wang XW, Zender L, Greten TF. Distinct Functions of Senescence-Associated Immune Responses in Liver Tumor Surveillance and Tumor Progression. *Cancer Cell.* 2016; 30:533–47. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.09.003> PMID:27728804
 28. Pienimaeki-Roemer A, Konovalova T, Musri MM, Sigruener A, Boettcher A, Meister G, Schmitz G. Transcriptomic profiling of platelet senescence and platelet extracellular vesicles. *Transfusion.* 2017; 57:144–56. <https://doi.org/10.1111/trf.13896> PMID:28026009
 29. Tabata M, Kadomatsu T, Fukuhara S, Miyata K, Ito Y, Endo M, Urano T, Zhu HJ, Tsukano H, Tazume H, Kaikita K, Miyashita K, Iwawaki T, et al. Angiotensin-like protein 2 promotes chronic adipose tissue inflammation and obesity-related systemic insulin resistance. *Cell Metab.* 2009; 10:178–88. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.08.003> PMID:19723494
 30. Farhat N, Thorin-Trescases N, Voghel G, Villeneuve L, Mamarbachi M, Perrault LP, Carrier M, Thorin E. Stress-induced senescence predominates in endothelial cells isolated from atherosclerotic chronic smokers. *Can J Physiol Pharmacol.* 2008; 86:761–69. <https://doi.org/10.1139/Y08-082> PMID:19011671
 31. Farhat N, Thorin-Trescases N, Mamarbachi M, Villeneuve L, Yu C, Martel C, Duquette N, Gayda M, Nigam A, Juneau M, Allen BG, Thorin E. Angiotensin-like 2 promotes atherogenesis in mice. *J Am Heart*

- Assoc. 2013; 2:e000201.
<https://doi.org/10.1161/JAHA.113.000201>
PMID:23666461
32. Horio E, Kadomatsu T, Miyata K, Arai Y, Hosokawa K, Doi Y, Ninomiya T, Horiguchi H, Endo M, Tabata M, Tazume H, Tian Z, Takahashi O, et al. Role of endothelial cell-derived angptl2 in vascular inflammation leading to endothelial dysfunction and atherosclerosis progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014; 34:790–800.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.303116>
PMID:24526691
33. Thorin-Trescases N, Hayami D, Yu C, Luo X, Nguyen A, Larouche JF, Lalongé J, Henri C, Arsenault A, Gayda M, Juneau M, Lambert J, Thorin E, Nigam A. Exercise Lowers Plasma Angiopoietin-Like 2 in Men with Post-Acute Coronary Syndrome. *PLoS One.* 2016; 11:e0164598.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164598>
PMID:27736966
34. Gellen B, Thorin-Trescases N, Sosner P, Gand E, Saulnier PJ, Ragot S, Fraty M, Laugier S, Ducrocq G, Moutaigne D, Llaty P, Rigalleau V, Zaoui P, et al. ANGPTL2 is associated with an increased risk of cardiovascular events and death in diabetic patients. *Diabetologia.* 2016; 59:2321–30.
<https://doi.org/10.1007/s00125-016-4066-5>
PMID:27491833
35. Yosef R, Pilpel N, Papismadov N, Gal H, Ovadya Y, Vadai E, Miller S, Porat Z, Ben-Dor S, Krizhanovsky V. p21 maintains senescent cell viability under persistent DNA damage response by restraining JNK and caspase signaling. *EMBO J.* 2017; 36:2280–95.
<https://doi.org/10.15252/embj.201695553>
PMID:28607003
36. Noly PE, Labbé P, Thorin-Trescases N, Fortier A, Nguyen A, Thorin E, Carrier M. Reduction of plasma angiopoietin-like 2 after cardiac surgery is related to tissue inflammation and senescence status of patients. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2019. Epub ahead of print. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2018.12.047>
PMID:30745045
37. Erusalimsky JD. Vascular endothelial senescence: from mechanisms to pathophysiology. *J Appl Physiol* (1985). 2009; 106:326–32.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.91353.2008>
PMID:19036896
38. Gimbrone MA Jr, García-Cardeña G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res.* 2016; 118:620–36.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306301>
PMID:26892962
39. Chen S, Kapturczak M, Loiler SA, Zolotukhin S, Glushakova OY, Madsen KM, Samulski RJ, Hauswirth WW, Campbell-Thompson M, Berns KI, Flotte TR, Atkinson MA, Tisher CC, Agarwal A. Efficient transduction of vascular endothelial cells with recombinant adeno-associated virus serotype 1 and 5 vectors. *Hum Gene Ther.* 2005; 16:235–47.
<https://doi.org/10.1089/hum.2005.16.235>
PMID:15761263
40. Tazume H, Miyata K, Tian Z, Endo M, Horiguchi H, Takahashi O, Horio E, Tsukano H, Kadomatsu T, Nakashima Y, Kunitomo R, Kaneko Y, Moriyama S, et al. Macrophage-derived angiopoietin-like protein 2 accelerates development of abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; 32:1400–09.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.247866>
PMID:22556334
41. Minamino T, Miyauchi H, Yoshida T, Komuro I. Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: role of telomeres in endothelial dysfunction. *J Cardiol.* 2003; 41:39–40.
PMID:12564113
42. Thorin-Trescases N, Thorin E. High Circulating Levels of ANGPTL2: Beyond a Clinical Marker of Systemic Inflammation. *Oxid Med Cell Longev.* 2017; 2017:1096385.
<https://doi.org/10.1155/2017/1096385>
PMID:29138671
43. Yu C, Luo X, Duquette N, Thorin-Trescases N, Thorin E. Knockdown of angiopoietin like-2 protects against angiotensin II-induced cerebral endothelial dysfunction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2015; 308:H386–97.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00278.2014>
PMID:25527773
44. Yu C, Luo X, Farhat N, Daneault C, Duquette N, Martel C, Lambert J, Thorin-Trescases N, Rosiers CD, Thorin E. Lack of angiopoietin-like-2 expression limits the metabolic stress induced by a high-fat diet and maintains endothelial function in mice. *J Am Heart Assoc.* 2014; 3:e001024.
<https://doi.org/10.1161/JAHA.114.001024>
PMID:25128474
45. Hall BM, Balan V, Gleiberman AS, Strom E, Krasnov P, Virtuoso LP, Rydkina E, Vujcic S, Balan K, Gitlin II, Leonova KI, Consiglio CR, Gollnick SO, et al. p16(Ink4a) and senescence-associated β -galactosidase can be induced in macrophages as part of a reversible response to physiological stimuli. *Aging (Albany NY).* 2017; 9:1867–84.
<https://doi.org/10.18632/aging.101268>
PMID:28768895

46. Hall BM, Balan V, Gleiberman AS, Strom E, Krasnov P, Virtuoso LP, Rydkina E, Vujcic S, Balan K, Gitlin I, Leonova K, Polinsky A, Chernova OB, Gudkov AV. Aging of mice is associated with p16(Ink4a)- and β -galactosidase-positive macrophage accumulation that can be induced in young mice by senescent cells. *Aging (Albany NY)*. 2016; 8:1294–315. <https://doi.org/10.18632/aging.100991> PMID:27391570
47. Vaughan DE, Rai R, Khan SS, Eren M, Ghosh AK. Plasminogen Activator Inhibitor-1 Is a Marker and a Mediator of Senescence. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017; 37:1446–52. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.309451> PMID:28572158
48. Cvetkovic D, Lafaro R, Giamelli J, Suvro S, Erb M, Yaghoubian S. Quadruple Vessel Coronary Artery Bypass Grafting in a 14-Year-Old Child With Plasminogen Activator Inhibitor-1 4G/4G Gene Polymorphism. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth*. 2016; 20:163–67. <https://doi.org/10.1177/1089253216631426> PMID:26848133
49. Khan SS, Shah SJ, Klyachko E, Baldrige AS, Eren M, Place AT, Aviv A, Puterman E, Lloyd-Jones DM, Heiman M, Miyata T, Gupta S, Shapiro AD, Vaughan DE. A null mutation in *SERPINE1* protects against biological aging in humans. *Sci Adv*. 2017; 3:e1617. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aao1617> PMID:29152572
50. van Deursen JM. The role of senescent cells in ageing. *Nature*. 2014; 509:439–46. <https://doi.org/10.1038/nature13193> PMID:24848057
51. Westphal D, Dewson G, Czabotar PE, Kluck RM. Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1813:521–31. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.12.019> PMID:21195116
52. Zhu Y, Tchkonja T, Fuhrmann-Stroissnigg H, Dai HM, Ling YY, Stout MB, Pirtskhalava T, Giorgadze N, Johnson KO, Giles CB, Wren JD, Niedernhofer LJ, Robbins PD, Kirkland JL. Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors. *Aging Cell*. 2016; 15:428–35. <https://doi.org/10.1111/acer.12445> PMID:26711051
53. Nowak G, Karrar A, Holmén C, Nava S, Uzunel M, Hulténby K, Sumitran-Holgersson S. Expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 or Tie-2 on peripheral blood cells defines functionally competent cell populations capable of reendothelialization. *Circulation*. 2004; 110:3699–707. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000143626.16576.51> PMID:15381639
54. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Böhm M, Nickenig G. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med*. 2005; 353:999–1007. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043814> PMID:16148285
55. Voghel G, Thorin-Trescases N, Farhat N, Nguyen A, Villeneuve L, Mamarbachi AM, Fortier A, Perrault LP, Carrier M, Thorin E. Cellular senescence in endothelial cells from atherosclerotic patients is accelerated by oxidative stress associated with cardiovascular risk factors. *Mech Ageing Dev*. 2007; 128:662–71. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2007.09.006> PMID:18022214
56. Horiguchi H, Endo M, Miyamoto Y, Sakamoto Y, Odagiri H, Masuda T, Kadomatsu T, Tanoue H, Motokawa I, Terada K, Morioka MS, Manabe I, Baba H, Oike Y. Angiopoietin-like protein 2 renders colorectal cancer cells resistant to chemotherapy by activating spleen tyrosine kinase-phosphoinositide 3-kinase-dependent anti-apoptotic signaling. *Cancer Sci*. 2014; 105:1550–59. <https://doi.org/10.1111/cas.12554> PMID:25287946
57. Hristov M, Erl W, Linder S, Weber PC. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Blood*. 2004; 104:2761–66. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-10-3614> PMID:15242875
58. Sabatier F, Camoin-Jau L, Anfosso F, Sampol J, Dignat-George F. Circulating endothelial cells, microparticles and progenitors: key players towards the definition of vascular competence. *J Cell Mol Med*. 2009; 13:454–71. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00639.x> PMID:19379144

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table S1. Sequences of the shRNAs.

shRNA	sequence
Angptl2	GCAGAGTCTTCCAATCAGTTAATCAAGAGTTAACTGATTGGAAGACTCTGC
Scramble*	CCTAAGGTTAAGTCGCCCTCGCTCGAGCGAGGGCGACTTAACCTTAGG

* The scramble sequence is directed against *luciferase* not expressed in mammals.

Table S2. Clinical profiles of the atherosclerotic patients undergoing artery bypass graft surgery and/or valve replacement.

	All CAD patients <i>n</i> =26	Valve +CABG <i>n</i> =10	CABG <i>n</i> =16
Age (years)	67±2	69±2	65±2
Sex (men, %)	24 (92%)	10 (100%)	14 (88%)
Height (m)	1.71±0.02	1.68±0.01	1.73±0.03
Weight (kg)	84.6±2.5	84.1±3.8	85.0±3.5
BMI (kg/m ²)	28.9±0.8	29.8±2.0	28.3±0.9
Risk factors (<i>n</i>, %)			
Dyslipidemia	24 (92%)	8 (80%)	16 (100%)
Hypertension	22 (85%)	9 (90%)	13 (81%)
Obesity	12 (46%)	6 (60%)	6 (38%)
Diabetes	11 (42%)	3 (30%)	8 (50%)
Active smoker	3 (12%)	1 (10%)	2 (12%)
Ex-smoker	9 (35%)	4 (40%)	5 (31%)
COPD	2 (8%)	2 (20%)	0 (0%)
Family history of CVD	9 (35%)	4 (40%)	5 (31%)
Medication			
β-blockers	22 (85%)	8 (80%)	14 (88%)
ACE inhibitors	4 (15%)	1 (10%)	3 (29%)

AR antagonists	6 (23%)	3 (30%)	3 (29%)
Diuretic	9 (35%)	3 (30%)	6 (38%)
Hypoglycemic agent	9 (35%)	1 (10%)	8 (50%)
Anticoagulant	4 (15%)	1 (10%)	3 (19%)
Aspirin	24 (92%)	8 (80%)	16 (100%)
Statin	25 (96%)	9 (90%)	16 (100%)

Blood analysis

Total cholesterol (mmol/L)	3.3±0.2	3.3±0.3	3.2±0.3
Cholesterol-LDL (mmol/L)	1.5±0.2	1.5±0.2	1.5±0.3
Cholesterol-HDL (mmol/L)	1.2±0.07	1.0±0.1	1.3±0.09
Triglycerides (mmol/L)	1.4±0.1	1.7±0.3	1.2±0.1
HbA1C (%)	0.064±0.008 (11)	0.059±0.03 (3)	0.066±0.003 (8)

Data are mean±SEM of (n) patients. No significant difference between groups (One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test, or Kruskal Wallis followed by Dunn's post hoc test for non Gaussian distribution).

Abbreviations: ACE inhibitors, angiotensin converting enzyme inhibitors; AR antagonists, angiotensin II receptors antagonists; BMI, body mass index; CAD, coronary artery disease; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; CVD, cardiovascular disease; HbA1C, glycated hemoglobin A1C.

Table S3. Mouse primers used to quantify gene expression using quantitative RT-PCR.

Target gene	Forward	Reverse
<i>Angptl2</i>	GATCCAGAGTGACCAGAATC	TCTCAGGCTTACCAGGTAG
<i>Bax</i>	AGCAAAGTGGTCTCAAGGC	CCACAAAGATGGTCACTGTC
<i>Bcl2</i>	GTGGTGGAGGAACTCTTCAG	GTTCCACAAAGGCATCCAG
<i>BGH</i>	TGCCTTCCTTGACCCT	CCTTGCTGTCTGCCC
<i>Cd34</i>	TGAGATGACATCACCCACCG	GCCAACTCACTTCTCGGAT
<i>Cd68</i>	CATCAGAGCCCAGTACAGTCTACC	AATTCTGCGCCATGAATGTCC
<i>CycloA</i>	CCGATGACGAGCCCTTGG	GCCGCCAGTGCCATTATG
<i>Icam-1</i>	CAATTCACACTGAATGCCAGCTC	CAAGCAGTCCGTCTCGTCCA
<i>Il-1β</i>	TGCCACCTTTGACAGTGATG	TGATGTGCTGCTGCGAGATT
<i>Mcherry</i>	AGGTCAAGACCACCTAAAA	CTGTTCCACGATGGTGTAGT
<i>Mcp1</i>	GCAGGTCCCTGTCATGCTTC	CTCTCCAGCCTACTCATTGGG
<i>p21</i>	TGTCGCTGTCTTGCCTCT	AGACCAATCTGCGCTTGG
<i>Pai-1</i>	TTGTCCAGCGGGACCTAGAG	AAGTCCACCTGTTCCACCATAGTCT

Angptl2, angiotensin-like 2; Icam-1, intracellular adhesion molecule; IL-1β, interleukin 1β; Mcp1, Monocyte chemoattractant protein 1; CycloA, cyclophilin A.

Table S4. Human primers used to quantify gene expression using quantitative RT-PCR.

Target gene	Forward	Reverse
<i>ANGPTL2</i>	CCCCAACACCTTCCACTAAG	AACAGAATCCAGCATCCCG
<i>TNFα</i>	CTCTTCTGCCTGCTGCACTT	CTCTCAGCTCCACGCCATTG
<i>IL-8</i>	CTCTTGGCAGCCTTCCTGAT	TTCTGTGTTGGCGCAGTGTG
<i>IL-6</i>	GACAGCCACTCACCTCTTCA	CACCAGGCAAGTCTCCTCAT
<i>p21</i>	GGACCTGTCACTGTCTTGTA	CCTCTTGGAGAAGATCAGCCG
<i>GAPDH</i>	AATCCCATCACCATCTTCCA	AAATGAGCCCCAGCCTTC

ANGPTL2, angiotensin-like 2; TNF- α , Tumor necrosis factor; IL-8, interleukin 8; IL-6, interleukin 6.

Chapitre 6 – Discussion

Au terme de ce projet, nous avons confirmé le lien direct entre l'Angptl2, l'ATL et la sénescence. L'inhibition de l'expression de l'Angptl2 vasculaire à un stade très précoce de l'ATL (sans présence de plaques) a limité la progression des lésions athérosclérotiques et diminué la sénescence endothéliale dans notre modèle de souris dyslipidémiques âgées de six mois, l'âge où les plaques apparaissent. De plus, nous avons élucidé un mécanisme potentiel *in vivo* pouvant expliquer la réduction de la taille des plaques d'athérome associée à la diminution de la sénescence endothéliale. En effet, sous l'effet du blocage de l'expression de l'Angptl2 vasculaire, nous avons mis en évidence une voie sénolytique par laquelle les CE sénescents sont éliminés par apoptose (**Figure 3**). La suppression des CE sénescents entraîne alors une réparation de l'endothélium par le recrutement de cellules endothéliales progénitrices, tout ceci permettant l'atténuation de l'environnement pro-inflammatoire dans la paroi vasculaire à l'origine de l'athérogenèse. Ces résultats suggèrent un rôle potentiel de l'Angptl2 dans la résistance à l'apoptose des CE sénescents qui sera discuté dans cette partie. Par ailleurs, les corps apoptotiques des CE sénescents éliminés pourraient entraîner le recrutement de cellules endothéliales progénitrices pour renouveler l'endothélium, un mécanisme dont je discuterai également. Je comparerai les effets du traitement en condition préventive avec ceux d'une vaine approche curative, à un stade plus avancé de l'ATL. Et enfin, j'exposerai les limites de l'étude.

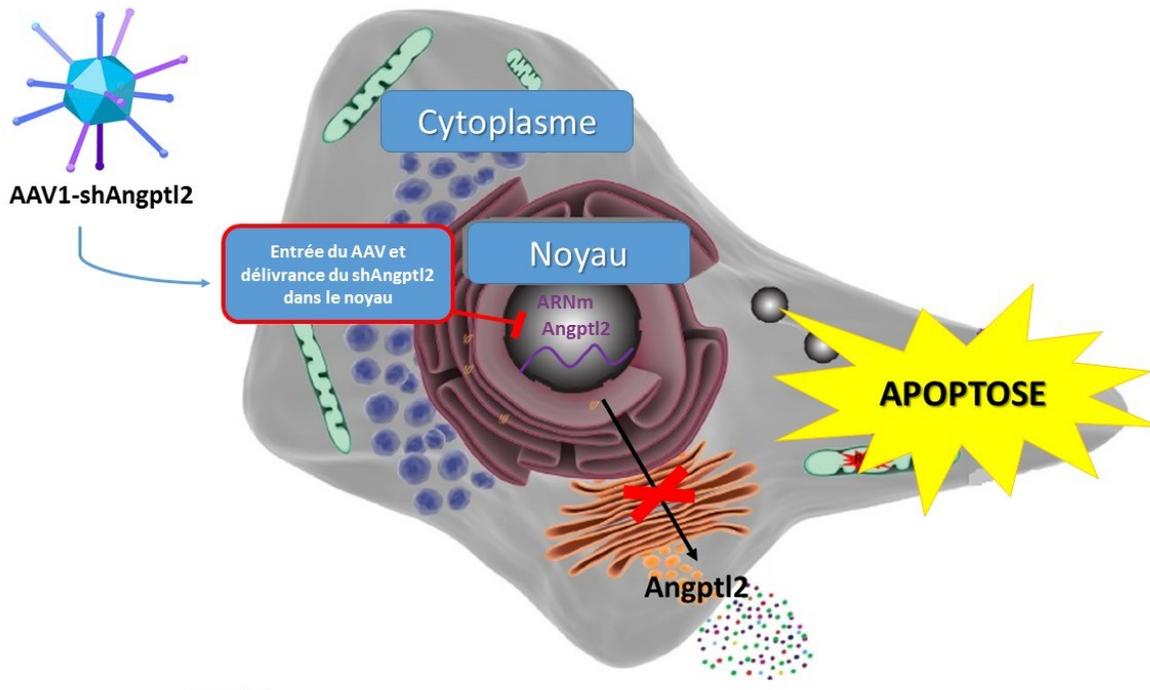


Figure 3 : Approche sénolytique par le blocage de l'Angptl2 à l'aide d'un AAV1-shAngptl2 dans une cellule endothéliale sénescence. (inspirée d'une figure de la revue (112))

Par quelle voie l'Angptl2 pourrait-elle favoriser la résistance à l'apoptose des CE sénescences au niveau des lésions athérosclérotiques ?

Notre étude suggère que l'Angptl2 joue un rôle anti-apoptotique dans les CE sénescences de souris ATX sévèrement dyslipidémiques mais le mécanisme moléculaire dans le contexte de l'ATL n'a pas été établi. Alors que les CE sénescences sont en arrêt de prolifération, plusieurs études *in vitro* ont montré que les CE sénescences sont moins susceptibles d'entrer en apoptose que les CE non sénescences sous l'influence d'un stress *in vitro*, dépendamment de son intensité (234–236). Il existe un nombre limité d'études concernant la place qu'occupe l'Angptl2 dans le processus d'apoptose mais deux études ont montré qu'elle possède un rôle anti-apoptotique dans différents contextes. Effectivement, l'Angptl2 favorise la survie de cellules colorectales cancéreuses après un traitement antinéoplasique en régulant les gènes de la famille Bcl2 via la voie de signalisation Syk-PI3K (225). De même, une autre étude a montré que l'Angptl2 empêche l'apoptose de CE en culture en induisant la phosphorylation de ERK1/2 et de Akt, démontrant une nouvelle fois son activité anti-apoptotique via la voie de signalisation PI3K/Akt (182). Or, nos résultats ont montré

que, dans un contexte de sénescence répllicative prématurée, le blocage de l'expression de l'Angptl2 favorise l'élimination des CE sénescents par apoptose. Une hypothèse est que l'Angptl2 pourrait contribuer à la régulation positive de la voie PI3K/Akt dans les CE sénescents entraînant ainsi leur survie. À l'inverse, le blocage de l'expression de l'Angptl2 contribuerait à la régulation négative de la voie PI3K/Akt dans les CE sénescents menant ainsi à l'apoptose des CE sénescents. Par conséquent, l'inhibition de l'expression de l'Angptl2 dans les CE sénescents de souris athérosclérotiques permettrait leur élimination par apoptose via la régulation négative de la voie PI3K/Akt.

Par quels mécanismes les CE sénescents peuvent-elle être éliminées des lésions athérosclérotiques?

Ce mécanisme n'a pas été investigué lors de mon étude. Cependant, d'après la littérature et dans le contexte de l'ATL, les cellules apoptotiques peuvent être éliminées non seulement par les macrophages et les cellules dendritiques mais aussi par les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses (237). Les cellules apoptotiques libèrent différents types de signaux (lysophosphatidylcholine, ATP, sphingosine-1 phosphate, HSP, IL-1, acide urique) pour recruter les phagocytes. En plus de l'attraction des phagocytes par divers signaux, les cellules apoptotiques se conditionnent pour faciliter l'interaction en régulant positivement ou en transloquant des molécules à leur surface comme par exemple, la phosphatidylsérine (237). Après l'interaction avec les phagocytes, les corps apoptotiques sont internalisés et dégradés par fusion avec les endosomes et les lysosomes (238). Dans le cas de mon étude, nous pourrions supposer que les cellules endothéliales apoptotiques sont éliminées par les macrophages, les cellules dendritiques ou par d'autres cellules endothéliales grâce à la libération des signaux énumérés ci-dessus et grâce à la régulation positive de certaines protéines de surface comme la phosphatidylsérine. Par ailleurs, les cellules saines sont protégées de l'apoptose par l'expression de CD31 et CD47 (238) qui permettent la répulsion des phagocytes. De ce fait, il aurait été intéressant de détecter les niveaux protéiques de ces marqueurs afin de quantifier le nombre de cellules saines comparé au nombre de cellules apoptotiques qui auraient possiblement une expression diminuée voire pas d'expression de ces deux marqueurs.

Par quels mécanismes les CE sénescents éliminées des lésions athérosclérotiques entraineraient-elles le recrutement de cellules endothéliales progénitrices ?

Dans notre étude, nous avons pu démontrer qu'après la suppression des CE sénescents par apoptose, des cellules endothéliales progénitrices colonisent l'endothélium afin de le restaurer. Malheureusement, le mécanisme moléculaire impliqué n'a pas été mis en évidence mais plusieurs pistes sont possibles. Lorsque les cellules entrent en apoptose, des particules membranaires appelées corps apoptotiques bourgeonnent à leur surface jusqu'à leur libération dans la circulation afin de transmettre divers signaux aux cellules de l'organisme (239,240). Ces corps apoptotiques induisent la prolifération et la différenciation de cellules endothéliales progénitrices d'où leur rôle important dans la réparation tissulaire et l'angiogenèse (239,240). De plus, l'abondance de corps apoptotiques dérivées de CE provenant de lésions athérosclérotiques est associée à une dysfonction endothéliale et à une rigidité artérielle (241), ceci suggère que l'endommagement de la paroi vasculaire lié au vieillissement vasculaire favorise l'émergence de CE apoptotiques. Dans notre modèle, l'apoptose des CE induite par l'inhibition de l'Angptl2 pourrait donc être amplifiée par l'effet superposé de l'apoptose induite par les conditions pathologiques de l'ATL. Dans la littérature, il existe plusieurs facteurs impliqués dans le recrutement des cellules endothéliales progénitrices. Par exemple, les corps apoptotiques dérivés des CE dans les capillaires de la rétine induisent la sécrétion de cytokines pro-angiogéniques et de chimiokines, et l'expression de molécules d'adhésion pour faciliter le recrutement des cellules endothéliales progénitrices afin de réparer les microvaisseaux rétinien (242). De façon intéressante, une étude a mis en évidence un mécanisme d'action permettant le recrutement de cellules endothéliales progénitrices par les corps apoptotiques de CE situées sur des lésions athérosclérotiques (243). Les corps apoptotiques dérivés des CE sont transférés aux CE voisines pour induire l'expression de la chimiokine CXCL12, impliquée dans le recrutement des cellules endothéliales progénitrices. La production de CXCL12 est induite en amont par le microARN-126 contenu dans les corps apoptotiques qui entraîne la stimulation de son récepteur CXCR4 et la phosphorylation de ERK1/2. Ainsi, la production de CXCL12 est augmentée et entraîne le recrutement massif de cellules endothéliales progénitrices afin de restaurer la barrière endothéliale, de diminuer l'ATL et d'augmenter la stabilité des plaques (243). En parallèle, le microARN-126 induit également une diminution de la molécule d'adhésion VCAM1 (243) limitant ainsi l'infiltration des macrophages et la progression de l'ATL. Finalement, les corps apoptotiques libérés par les CE sénescents éliminées par le blocage de l'expression de

l'Angptl2 dans notre modèle de souris dyslipidémiques pourraient donc atténuer l'inflammation associée à l'ATL en renouvelant la barrière endothéliale par le recrutement de cellules endothéliales progénitrices induit par des chimiokines comme IL1- β ou CCL2 et en diminuant l'expression de molécules d'adhésion comme VCAM1 et ICAM1.

Est-ce que le traitement administré de manière préventive serait également adapté à une approche curative, à un stade plus avancé de l'ATL ?

En parallèle de l'approche préventive qui a consisté à injecter les AAV1 dans notre modèle de souris dyslipidémiques avant le développement des plaques, des données préliminaires ont pu être obtenues concernant l'approche curative dans laquelle les souris ont reçu la même dose de AAV1 mais à l'âge de six mois, lorsque les plaques étaient apparentes. La période d'incubation a été similaire à celle de l'approche préventive, c'est à dire de trois mois ; par conséquent, les souris étaient âgées de neuf mois à la fin de l'étude. Notre hypothèse était qu'avec un traitement curatif, nous pourrions stabiliser l'ATL et la sénescence endothéliale. Contrairement aux résultats de l'approche préventive, nous n'avons pas observé de diminution de la taille des plaques d'athérome trois mois après l'injection chez les souris âgées de neuf mois ayant reçu le AAV1-shAngptl2 comparé aux contrôles. Aussi, nous n'avons pas noté de changement significatif concernant l'expression de l'Angptl2, des marqueurs de sénescence (p21 et p16) et des marqueurs inflammatoires (CD68 et TNF α) dans la paroi vasculaire des souris âgées de neuf mois ayant reçu le AAV1-shAngptl2 comparé aux contrôles. Ces données préliminaires montrent que le traitement utilisé dans l'approche préventive n'est pas adapté aux conditions expérimentales de l'approche curative, lorsque les plaques d'athérome sont déjà présentes. Ceci pourrait s'expliquer par le fait qu'à un stade avancé de l'ATL, le renouvellement de l'endothélium et le recrutement des monocytes/macrophages seraient exacerbés et que ces nouvelles cellules ne seraient pas infectées, ce qui pourrait masquer l'effet bénéfique des cellules initialement infectées par le AAV1-shAngptl2 dans la paroi vasculaire.

Évidemment notre étude a plusieurs limites. Les expériences ont été réalisées exclusivement sur des niveaux d'ARNm puisque le nombre de cellules sur une aorte thoracique de souris est limité, ce qui explique également la variabilité du nombre de souris par groupe. En

augmentant le nombre de souris, nous aurions pu éventuellement les séparer en deux groupes, l'un réservé pour les expériences sur l'ARNm et l'autre pour les expériences sur les niveaux protéiques. Les expériences sur les niveaux protéiques auraient considérablement crédibilisé notre étude puisque nous aurions pu les comparer à l'expression génique de tous les facteurs mentionnés dans l'article. Par ailleurs, notre modèle de souris dyslipidémiques est un modèle drastique dispensé d'une diète riche en gras pour développer l'ATL, ce qui est un avantage majeur. Mais, dans le contexte de notre étude, il aurait été plus judicieux de croiser ce modèle avec un modèle de vieillissement accéléré (p16-3MR ou INK-ATTAC) afin d'avoir une sénescence mieux établie dans le contexte de l'ATL. En effet, nous n'avons pas détecté de variation concernant les niveaux d'expression de p21, marqueur de sénescence, dans la média après l'administration du shAngptl2 contrairement à l'endothélium, ce qui insinuerait que les cellules de la média ne sont pas sénescents. Afin de renforcer le criblage des marqueurs inflammatoires, nous aurions pu tester les niveaux d'expression de cytokines anti-inflammatoires afin de constater si les résultats s'opposeraient à ceux des cytokines pro-inflammatoires après l'administration du shAngptl2. Nous sommes conscients que les macrophages ne sont pas les seuls acteurs importants dans la pathogenèse de l'ATL, d'autres cellules immunitaires jouent aussi un rôle crucial dans l'amplification de l'inflammation chronique associée à l'ATL. Pour cela, nous aurions pu cibler des marqueurs de cellules dendritiques, de cellules tueuses naturelles et de lymphocytes pour compléter notre étude. Finalement, nous nous sommes concentrés principalement sur un design d'étude *in vivo* d'où le manque de mécanistique dans notre article publié.

Chapitre 7 – Conclusion et perspectives

Notre objectif était d'apprécier les effets bénéfiques d'une inhibition de l'expression de l'Angptl2 au niveau de la sénescence vasculaire et de la progression de l'ATL dans un modèle de souris dyslipidémiques ayant une expression endogène élevée d'Angptl2. À l'aide d'un AAV1-shAngptl2, nous avons montré que le blocage de l'expression de l'Angptl2 dans la paroi vasculaire provoque l'apoptose des CE sénescents et favorise la réparation de l'endothélium ce qui atténue l'inflammation vasculaire et par conséquent, diminue l'attraction et l'infiltration des monocytes. Mes résultats suggèrent donc que le recrutement des monocytes par l'endothélium endommagé joue un rôle crucial dans l'amplification de l'inflammation. Ainsi, la restauration de la barrière endothéliale permet de diminuer l'attraction des monocytes circulants et l'inflammation limitant ainsi la progression de l'ATL. Nos travaux sont les premiers à avoir mis en lumière le lien entre l'Angptl2 et la sénescence vasculaire dans notre modèle de souris dyslipidémiques et ce lien est appuyé par des données cliniques montrant une corrélation entre l'Angptl2 et le marqueur de sénescence p21 dans des artères mammaires de patients coronariens. Considérant l'apoptose comme le mécanisme commun à tous les sénolytiques, le blocage de l'expression de l'Angptl2 vasculaire s'avère être une voie sénolytique dans la sénescence endothéliale associée à l'ATL.

Bien que nous ayons identifié une nouvelle voie sénolytique *in vivo* à travers l'Angptl2 vasculaire dans l'ATL, le mécanisme sous-jacent reste inconnu. Pour y remédier, une étude *in vitro* dans des CE en culture devrait confirmer si le blocage de l'expression de l'Angptl2 à l'aide d'un *shRNA* induit l'apoptose des CE sénescents par la voie de signalisation PI3K/Akt exposée dans la discussion. À l'inverse, dans le même modèle il serait bon de tester l'effet d'une surexpression de l'Angptl2 afin de vérifier si l'Angptl2 favorise la survie des CE sénescents via la voie de signalisation PI3K/Akt. Finalement, l'approche curative n'a pas abouti mais il serait judicieux d'augmenter le nombre de souris pour améliorer la puissance de l'étude et dépasser les données préliminaires. Dans cette continuité, il serait également pertinent d'augmenter le nombre d'injections voire la dose de AAV1 afin de réduire significativement l'expression de l'angptl2 dans l'endothélium et dans la paroi vasculaire et donc de pouvoir valider notre hypothèse selon laquelle une répression tardive de l'angptl2 ralentit le processus d'ATL.

Références bibliographiques

1. Kirkwood TBL. Understanding the odd science of aging. *Cell*. 25 févr 2005;120(4):437-47.
2. Fried LP, Tangen CM, Walston J, Newman AB, Hirsch C, Gottdiener J, et al. Frailty in older adults: evidence for a phenotype. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. mars 2001;56(3):M146-156.
3. Rockwood K, Mitnitski A, Song X, Steen B, Skoog I. Long-term risks of death and institutionalization of elderly people in relation to deficit accumulation at age 70. *J Am Geriatr Soc*. juin 2006;54(6):975-9.
4. OMS | Vieillesse et santé [Internet]. WHO. [cité 8 janv 2018]. Disponible sur: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs404/fr/>
5. Oeppen J, Vaupel JW. Demography. Broken limits to life expectancy. *Science*. 10 mai 2002;296(5570):1029-31.
6. Finch CE, Crimmins EM. Inflammatory exposure and historical changes in human life-spans. *Science*. 17 sept 2004;305(5691):1736-9.
7. Canada - Espérance de vie à la naissance (année) | Statistiques [Internet]. [cité 8 nov 2019]. Disponible sur: <http://perspective.usherbrooke.ca/bilan/tend/CAN/fr/SP.DYN.LE00.IN.html>
8. Stiefel MC, Perla RJ, Zell BL. A healthy bottom line: healthy life expectancy as an outcome measure for health improvement efforts. *Milbank Q*. mars 2010;88(1):30-53.
9. Kassebaum NJ, Arora M, Barber RM, Bhutta ZA, Brown J, Carter A, et al. Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 315 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE), 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet*. 8 oct 2016;388(10053):1603-58.
10. Feeny D, Furlong W, Torrance GW, Goldsmith CH, Zhu Z, DePauw S, et al. Multiattribute and single-attribute utility functions for the health utilities index mark 3 system. *Med Care*. févr 2002;40(2):113-28.
11. Gouvernement du Canada SC. L'espérance de vie ajustée sur la santé au Canada [Internet]. 2018 [cité 8 nov 2019]. Disponible sur: <https://www150.statcan.gc.ca/n1/pub/82-003-x/2018004/article/54950-fra.htm>
12. Government of Canada SC. Mortality: Overview, 2012 and 2013 - ARCHIVED [Internet]. 2019 [cité 8 nov 2019]. Disponible sur: <https://www150.statcan.gc.ca/n1/pub/91-209-x/2017001/article/14793-eng.pdf>

13. Masoro EJ. Subfield history: caloric restriction, slowing aging, and extending life. *Sci Aging Knowledge Environ.* 26 févr 2003;2003(8):RE2.
14. Oh WJ, Jacinto E. mTOR complex 2 signaling and functions. *Cell Cycle.* 15 juill 2011;10(14):2305-16.
15. Silver N, Proctor GB, Arno M, Carpenter GH. Activation of mTOR coincides with autophagy during ligation-induced atrophy in the rat submandibular gland. *Cell Death Dis.* 2010;1:e14.
16. Stein S, Matter CM. Protective roles of SIRT1 in atherosclerosis. *Cell Cycle.* 15 févr 2011;10(4):640-7.
17. Blagosklonny MV. Linking calorie restriction to longevity through sirtuins and autophagy: any role for TOR. *Cell Death Dis.* 2010;1:e12.
18. Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature.* 16 nov 2006;444(7117):337-42.
19. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell.* 15 déc 2006;127(6):1109-22.
20. Trichopoulos A, Kouris-Blazos A, Wahlqvist ML, Gardellis C, Ligiou P, Polychronopoulos E, et al. Diet and overall survival in elderly people. *BMJ.* 2 déc 1995;311(7018):1457-60.
21. Kurotani K, Akter S, Kashino I, Goto A, Mizoue T, Noda M, et al. Quality of diet and mortality among Japanese men and women: Japan Public Health Center based prospective study. *BMJ.* 22 mars 2016;352:i1209.
22. Osler M, Schroll M. Diet and mortality in a cohort of elderly people in a north European community. *Int J Epidemiol.* févr 1997;26(1):155-9.
23. Bonaccio M, Pounis G, Cerletti C, Donati MB, Iacoviello L, de Gaetano G, et al. Mediterranean diet, dietary polyphenols and low grade inflammation: results from the MOLI-SANI study. *Br J Clin Pharmacol.* 2017;83(1):107-13.
24. Bonaccio M, Ruggiero E, Di Castelnuovo A, Costanzo S, Persichillo M, De Curtis A, et al. Fish intake is associated with lower cardiovascular risk in a Mediterranean population: Prospective results from the Moli-sani study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* oct 2017;27(10):865-73.
25. Guasch-Ferré M, Hu FB, Martínez-González MA, Fitó M, Bulló M, Estruch R, et al. Olive oil intake and risk of cardiovascular disease and mortality in the PREDIMED Study. *BMC Medicine.* 13 mai 2014;12(1):78.

26. Bonaccio M, Castelnuovo AD, Pounis G, Curtis AD, Costanzo S, Persichillo M, et al. Relative contribution of health-related behaviours and chronic diseases to the socioeconomic patterning of low-grade inflammation. *International journal of public health*. 1 juin 2017;62(5):551-62.
27. Barbaresko J, Koch M, Schulze MB, Nöthlings U. Dietary pattern analysis and biomarkers of low-grade inflammation: a systematic literature review. *Nutr Rev*. août 2013;71(8):511-27.
28. Boccardi V, Esposito A, Rizzo MR, Marfella R, Barbieri M, Paolisso G. Mediterranean diet, telomere maintenance and health status among elderly. *PLoS ONE*. 2013;8(4):e62781.
29. Pedersen BK, Saltin B. Evidence for prescribing exercise as therapy in chronic disease. *Scand J Med Sci Sports*. févr 2006;16 Suppl 1:3-63.
30. Adami PE, Negro A, Lala N, Martelletti P. The role of physical activity in the prevention and treatment of chronic diseases. *Clin Ter*. 2010;161(6):537-41.
31. Warburton DE, Charlesworth S, Ivey A, Nettlefold L, Bredin SS. A systematic review of the evidence for Canada's Physical Activity Guidelines for Adults. *Int J Behav Nutr Phys Act*. 11 mai 2010;7:39.
32. Samitz G, Egger M, Zwahlen M. Domains of physical activity and all-cause mortality: systematic review and dose-response meta-analysis of cohort studies. *Int J Epidemiol*. 1 oct 2011;40(5):1382-400.
33. Farahmand B, Broman G, Faire UD, Vågerö D, Ahlbom A. Golf: a game of life and death – reduced mortality in Swedish golf players. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*. 2009;19(3):419-24.
34. Nusselder WJ, Looman CWN, Franco OH, Peeters A, Slingerland AS, Mackenbach JP. The relation between non-occupational physical activity and years lived with and without disability. *J Epidemiol Community Health*. sept 2008;62(9):823-8.
35. Lee C-D, Sui X, Hooker SP, Hébert JR, Blair SN. Combined impact of lifestyle factors on cancer mortality in men. *Ann Epidemiol*. oct 2011;21(10):749-54.
36. Ahmed HM, Blaha MJ, Nasir K, Rivera JJ, Blumenthal RS. Effects of physical activity on cardiovascular disease. *Am J Cardiol*. 15 janv 2012;109(2):288-95.
37. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 6 juin 2013;153(6):1194-217.
38. Maicher A, Kastner L, Dees M, Luke B. Deregulated telomere transcription causes replication-dependent telomere shortening and promotes cellular senescence. *Nucleic Acids Res*. août 2012;40(14):6649-59.

39. Pritz T, Lair J, Ban M, Keller M, Weinberger B, Krismer M, et al. Plasma cell numbers decrease in bone marrow of old patients. *Eur J Immunol.* mars 2015;45(3):738-46.
40. Buffa S, Pellicanò M, Bulati M, Martorana A, Goldeck D, Caruso C, et al. A novel B cell population revealed by a CD38/CD24 gating strategy: CD38-CD24- B cells in centenarian offspring and elderly people. *Age (Dordr).* oct 2013;35(5):2009-24.
41. Deng M, Lu Z, Zheng J, Wan X, Chen X, Hirayasu K, et al. A motif in LILRB2 critical for Angptl2 binding and activation. *Blood.* 7 août 2014;124(6):924-35.
42. Baëhl S, Garneau H, Le Page A, Lorrain D, Viens I, Svoltelis A, et al. Altered neutrophil functions in elderly patients during a 6-month follow-up period after a hip fracture. *Exp Gerontol.* mai 2015;65:58-68.
43. Nyugen J, Agrawal S, Gollapudi S, Gupta S. Impaired functions of peripheral blood monocyte subpopulations in aged humans. *J Clin Immunol.* nov 2010;30(6):806-13.
44. Spielmann G, McFarlin BK, O'Connor DP, Smith PJW, Pircher H, Simpson RJ. Aerobic fitness is associated with lower proportions of senescent blood T-cells in man. *Brain Behav Immun.* nov 2011;25(8):1521-9.
45. Naylor K, Li G, Vallejo AN, Lee W-W, Koetz K, Bryl E, et al. The influence of age on T cell generation and TCR diversity. *J Immunol.* 1 juin 2005;174(11):7446-52.
46. Weinberger B, Lazard L, Weiskirchner I, Keller M, Neuner C, Fischer K-H, et al. Healthy aging and latent infection with CMV lead to distinct changes in CD8+ and CD4+ T-cell subsets in the elderly. *Hum Immunol.* févr 2007;68(2):86-90.
47. Almanzar G, Schwaiger S, Jenewein B, Keller M, Herndler-Brandstetter D, Würzner R, et al. Long-term cytomegalovirus infection leads to significant changes in the composition of the CD8+ T-cell repertoire, which may be the basis for an imbalance in the cytokine production profile in elderly persons. *J Virol.* mars 2005;79(6):3675-83.
48. Wolfson SA, Kalmanson GM, Rubini ME, Guze LB. EPIDEMIOLOGY OF BACTERIURIA IN A PREDOMINANTLY GERIATRIC MALE POPULATION. *Am J Med Sci.* août 1965;250:168-73.
49. Sapey E, Greenwood H, Walton G, Mann E, Love A, Aaronson N, et al. Phosphoinositide 3-kinase inhibition restores neutrophil accuracy in the elderly: toward targeted treatments for immunosenescence. *Blood.* 9 janv 2014;123(2):239-48.
50. Fontana L, Zhao E, Amir M, Dong H, Tanaka K, Czaja MJ. Aging promotes the development of diet-induced murine steatohepatitis but not steatosis. *Hepatology.* mars 2013;57(3):995-1004.

51. Franceschi C, Campisi J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. juin 2014;69 Suppl 1:S4-9.
52. Tracy RP. Emerging relationships of inflammation, cardiovascular disease and chronic diseases of aging. *Int J Obes Relat Metab Disord*. déc 2003;27 Suppl 3:S29-34.
53. Morrisette-Thomas V, Cohen AA, Fülöp T, Riesco É, Legault V, Li Q, et al. Inflamm-aging does not simply reflect increases in pro-inflammatory markers. *Mech Ageing Dev*. juill 2014;139:49-57.
54. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*. mai 2011;1813(5):878-88.
55. Franceschi C, Capri M, Monti D, Giunta S, Olivieri F, Sevini F, et al. Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mech Ageing Dev*. janv 2007;128(1):92-105.
56. Chung HY, Kim DH, Lee EK, Chung KW, Chung S, Lee B, et al. Redefining Chronic Inflammation in Aging and Age-Related Diseases: Proposal of the Senoinflammation Concept. *Aging Dis*. 1 avr 2019;10(2):367-82.
57. De la Fuente M. Effects of antioxidants on immune system ageing. *Eur J Clin Nutr*. août 2002;56 Suppl 3:S5-8.
58. Weisberg SP, Hunter D, Huber R, Lemieux J, Slaymaker S, Vaddi K, et al. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest*. janv 2006;116(1):115-24.
59. Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol*. 25 mars 2010;316(2):129-39.
60. Zapata HJ, Shaw AC. Aging of the human innate immune system in HIV infection. *Curr Opin Immunol*. août 2014;29:127-36.
61. Derhovanessian E, Maier AB, Hähnel K, Beck R, de Craen AJM, Slagboom EP, et al. Infection with cytomegalovirus but not herpes simplex virus induces the accumulation of late-differentiated CD4+ and CD8+ T-cells in humans. *J Gen Virol*. déc 2011;92(Pt 12):2746-56.
62. Abadir PM, Walston JD, Carey RM, Siragy HM. Angiotensin II Type-2 receptors modulate inflammation through signal transducer and activator of transcription proteins 3 phosphorylation and TNF α production. *J Interferon Cytokine Res*. juin 2011;31(6):471-4.
63. Benigni A, Cassis P, Remuzzi G. Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging. *EMBO Mol Med*. juill 2010;2(7):247-57.

64. Soysal P, Stubbs B, Lucato P, Luchini C, Solmi M, Peluso R, et al. Inflammation and frailty in the elderly: A systematic review and meta-analysis. *Ageing Res Rev.* 2016;31:1-8.
65. Botto N, Berti S, Manfredi S, Al-Jabri A, Federici C, Clerico A, et al. Detection of mtDNA with 4977 bp deletion in blood cells and atherosclerotic lesions of patients with coronary artery disease. *Mutat Res.* 15 févr 2005;570(1):81-8.
66. Mahmoudi M, Gorenne I, Mercer J, Figg N, Littlewood T, Bennett M. Statins use a novel Nijmegen breakage syndrome-1-dependent pathway to accelerate DNA repair in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 26 sept 2008;103(7):717-25.
67. Åstrand H, Stålhand J, Karlsson J, Karlsson M, Sonesson B, Länne T. In vivo estimation of the contribution of elastin and collagen to the mechanical properties in the human abdominal aorta: effect of age and sex. *Journal of Applied Physiology.* 11 nov 2010;110(1):176-87.
68. Franklin SS, Jacobs MJ, Wong ND, L'Italien GJ, Lapuerta P. Predominance of isolated systolic hypertension among middle-aged and elderly US hypertensives: analysis based on National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) III. *Hypertension.* mars 2001;37(3):869-74.
69. Bouissou C, Lacolley P, Dabire H, Safar ME, Gabella G, Duchatelle V, et al. Increased stiffness and cell-matrix interactions of abdominal aorta in two experimental nonhypertensive models: long-term chemically sympathectomized and sinoaortic denervated rats. *J Hypertens.* mars 2014;32(3):652-8.
70. Virmani R, Avolio AP, Mergner WJ, Robinowitz M, Herderick EE, Cornhill JF, et al. Effect of aging on aortic morphology in populations with high and low prevalence of hypertension and atherosclerosis. Comparison between occidental and Chinese communities. *Am J Pathol.* nov 1991;139(5):1119-29.
71. Wang Mingyi, Zhang Jing, Jiang Li-Qun, Spinetti Gaia, Pintus Gianfranco, Monticone Robert, et al. Proinflammatory Profile Within the Grossly Normal Aged Human Aortic Wall. *Hypertension.* 1 juill 2007;50(1):219-27.
72. Rauscher FM, Goldschmidt-Clermont PJ, Davis BH, Wang T, Gregg D, Ramaswami P, et al. Aging, progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis. *Circulation.* 29 juill 2003;108(4):457-63.
73. Karra R, Vemullapalli S, Dong C, Herderick EE, Song X, Slosek K, et al. Molecular evidence for arterial repair in atherosclerosis. *PNAS.* 15 nov 2005;102(46):16789-94.
74. Stary HC. Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults. *Arteriosclerosis.* févr 1989;9(1 Suppl):119-32.

75. Mozaffarian Dariush, Benjamin Emelia J., Go Alan S., Arnett Donna K., Blaha Michael J., Cushman Mary, et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2016 Update. *Circulation*. 26 janv 2016;133(4):e38-360.
76. Ogita H, Liao J. Endothelial function and oxidative stress. *Endothelium*. avr 2004;11(2):123-32.
77. Victor VM, Rocha M, Solá E, Bañuls C, Garcia-Malpartida K, Hernández-Mijares A. Oxidative stress, endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Curr Pharm Des*. 2009;15(26):2988-3002.
78. de Cavanagh EMV, Inserra F, Ferder L. Angiotensin II blockade: a strategy to slow ageing by protecting mitochondria? *Cardiovasc Res*. 1 janv 2011;89(1):31-40.
79. Kume N, Cybulsky MI, Gimbrone MA. Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells. *J Clin Invest*. sept 1992;90(3):1138-44.
80. Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature*. 27 août 1998;394(6696):894-7.
81. Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, et al. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell*. août 1998;2(2):275-81.
82. Liao JK. Linking endothelial dysfunction with endothelial cell activation. *J Clin Invest*. févr 2013;123(2):540-1.
83. Miller YI, Chang M-K, Binder CJ, Shaw PX, Witztum JL. Oxidized low density lipoprotein and innate immune receptors. *Curr Opin Lipidol*. oct 2003;14(5):437-45.
84. Rudijanto A. The role of vascular smooth muscle cells on the pathogenesis of atherosclerosis. *Acta Med Indones*. juin 2007;39(2):86-93.
85. Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation*. 1 juin 1995;91(11):2844-50.
86. Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I. *Circulation*. 7 oct 2003;108(14):1664-72.
87. Finn AV, Nakano M, Narula J, Kolodgie FD, Virmani R. Concept of vulnerable/unstable plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. juill 2010;30(7):1282-92.

88. Davies MJ. Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. The Paul Dudley White Lecture 1995. *Circulation*. 15 oct 1996;94(8):2013-20.
89. Ross R, Wight TN, Strandness E, Thiele B. Human atherosclerosis. I. Cell constitution and characteristics of advanced lesions of the superficial femoral artery. *Am J Pathol*. janv 1984;114(1):79-93.
90. Authors/Task Force Members:, Catapano AL, Graham I, De Backer G, Wiklund O, Chapman MJ, et al. 2016 ESC/EAS Guidelines for the Management of Dyslipidaemias: The Task Force for the Management of Dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and European Atherosclerosis Society (EAS) Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Atherosclerosis*. 2016;253:281-344.
91. Ray KK, Seshasai SRK, Erqou S, Sever P, Jukema JW, Ford I, et al. Statins and all-cause mortality in high-risk primary prevention: a meta-analysis of 11 randomized controlled trials involving 65,229 participants. *Arch Intern Med*. 28 juin 2010;170(12):1024-31.
92. Robinson JG, Farnier M, Krempf M, Bergeron J, Luc G, Averna M, et al. Efficacy and safety of alirocumab in reducing lipids and cardiovascular events. *N Engl J Med*. 16 avr 2015;372(16):1489-99.
93. Sabatine MS, Giugliano RP, Wiviott SD, Raal FJ, Blom DJ, Robinson J, et al. Efficacy and safety of evolocumab in reducing lipids and cardiovascular events. *N Engl J Med*. 16 avr 2015;372(16):1500-9.
94. Keech A, Simes RJ, Barter P, Best J, Scott R, Taskinen MR, et al. Effects of long-term fenofibrate therapy on cardiovascular events in 9795 people with type 2 diabetes mellitus (the FIELD study): randomised controlled trial. *Lancet*. 26 nov 2005;366(9500):1849-61.
95. Kotwal S, Jun M, Sullivan D, Perkovic V, Neal B. Omega 3 Fatty acids and cardiovascular outcomes: systematic review and meta-analysis. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*. nov 2012;5(6):808-18.
96. Barter PJ, Caulfield M, Eriksson M, Grundy SM, Kastelein JJP, Komajda M, et al. Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N Engl J Med*. 22 nov 2007;357(21):2109-22.
97. Schwartz GG, Olsson AG, Abt M, Ballantyne CM, Barter PJ, Brumm J, et al. Effects of Dalcetrapib in Patients with a Recent Acute Coronary Syndrome. *New England Journal of Medicine*. 29 nov 2012;367(22):2089-99.
98. Bloomfield D, Carlson GL, Sapre A, Tribble D, McKenney JM, Littlejohn TW, et al. Efficacy and safety of the cholesteryl ester transfer protein inhibitor anacetrapib as monotherapy

- and coadministered with atorvastatin in dyslipidemic patients. *Am Heart J.* févr 2009;157(2):352-360.e2.
99. Millar JS, Reyes-Soffer G, Jumes P, Dunbar RL, deGoma EM, Baer AL, et al. Anacetrapib lowers LDL by increasing ApoB clearance in mildly hypercholesterolemic subjects. *J Clin Invest.* juin 2015;125(6):2510-22.
 100. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research.* 1 déc 1961;25(3):585-621.
 101. O'Sullivan RJ, Karlseder J. Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nat Rev Mol Cell Biol.* mars 2010;11(3):171-81.
 102. Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol.* 2013;75:685-705.
 103. Storer M, Mas A, Robert-Moreno A, Pecoraro M, Ortells MC, Di Giacomo V, et al. Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell.* 21 nov 2013;155(5):1119-30.
 104. Krizhanovsky V, Yon M, Dickins RA, Hearn S, Simon J, Miething C, et al. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell.* 22 août 2008;134(4):657-67.
 105. Jun J-I, Lau LF. The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing. *Nat Cell Biol.* juill 2010;12(7):676-85.
 106. Helman A, Klochendler A, Azazmeh N, Gabai Y, Horwitz E, Anzi S, et al. p16(Ink4a)-induced senescence of pancreatic beta cells enhances insulin secretion. *Nat Med.* avr 2016;22(4):412-20.
 107. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell.* 7 mars 1997;88(5):593-602.
 108. Baker DJ, Childs BG, Durik M, Wijers ME, Sieben CJ, Zhong J, et al. Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature.* 11 févr 2016;530(7589):184-9.
 109. Childs BG, Baker DJ, Wijshake T, Conover CA, Campisi J, van Deursen JM. Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis. *Science.* 28 2016;354(6311):472-7.
 110. Baar MP, Brandt RMC, Putavet DA, Klein JDD, Derks KWJ, Bourgeois BRM, et al. Targeted Apoptosis of Senescent Cells Restores Tissue Homeostasis in Response to Chemotoxicity and Aging. *Cell.* 23 2017;169(1):132-147.e16.

111. d'Adda di Fagagna F. Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat Rev Cancer*. juill 2008;8(7):512-22.
112. Hernandez-Segura A, Nehme J, Demaria M. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol*. 2018;28(6):436-53.
113. Stein GH, Drullinger LF, Soulard A, Dulić V. Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol Cell Biol*. mars 1999;19(3):2109-17.
114. Fridlyanskaya I, Alekseenko L, Nikolsky N. Senescence as a general cellular response to stress: A mini-review. *Exp Gerontol*. déc 2015;72:124-8.
115. McHugh D, Gil J. Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *J Cell Biol*. 2 janv 2018;217(1):65-77.
116. Cristofalo VJ, Sharf BB. Cellular senescence and DNA synthesis. Thymidine incorporation as a measure of population age in human diploid cells. *Exp Cell Res*. févr 1973;76(2):419-27.
117. Prata LGPL, Ovsyannikova IG, Tchkonja T, Kirkland JL. Senescent cell clearance by the immune system: Emerging therapeutic opportunities. *Semin Immunol*. 2018;40:101275.
118. Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. sept 2007;8(9):729-40.
119. Freund A, Orjalo AV, Desprez P-Y, Campisi J. Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol Med*. mai 2010;16(5):238-46.
120. Baker DJ, Wijshake T, Tchkonja T, LeBrasseur NK, Childs BG, van de Sluis B, et al. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature*. 2 nov 2011;479(7372):232-6.
121. Coppé J-P, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Muñoz DP, Goldstein J, et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol*. 2 déc 2008;6(12):2853-68.
122. Young ARJ, Narita M. SASP reflects senescence. *EMBO Rep*. mars 2009;10(3):228-30.
123. Kortlever RM, Higgins PJ, Bernards R. Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence. *Nat Cell Biol*. août 2006;8(8):877-84.
124. Kirkland JL, Tchkonja T. Cellular Senescence: A Translational Perspective. *EBioMedicine*. juill 2017;21:21-8.

125. Lawless C, Wang C, Jurk D, Merz A, Zglinicki T von, Passos JF. Quantitative assessment of markers for cell senescence. *Exp Gerontol.* oct 2010;45(10):772-8.
126. Terlecki-Zaniewicz L, Lämmermann I, Latreille J, Bobbili MR, Pils V, Schosserer M, et al. Small extracellular vesicles and their miRNA cargo are anti-apoptotic members of the senescence-associated secretory phenotype. *Aging (Albany NY).* 19 2018;10(5):1103-32.
127. Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld LCW, Douma S, van Doorn R, Desmet CJ, et al. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell.* 13 juin 2008;133(6):1019-31.
128. Acosta JC, O’Loughlen A, Banito A, Guijarro MV, Augert A, Raguz S, et al. Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell.* 13 juin 2008;133(6):1006-18.
129. Freund A, Patil CK, Campisi J. p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *EMBO J.* 20 avr 2011;30(8):1536-48.
130. Kang C, Xu Q, Martin TD, Li MZ, Demaria M, Aron L, et al. The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4. *Science.* 25 sept 2015;349(6255):aaa5612.
131. Hoare M, Ito Y, Kang T-W, Weekes MP, Matheson NJ, Patten DA, et al. NOTCH1 mediates a switch between two distinct secretomes during senescence. *Nat Cell Biol.* 2016;18(9):979-92.
132. Demaria M, Ohtani N, Youssef SA, Rodier F, Toussaint W, Mitchell JR, et al. An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev Cell.* 22 déc 2014;31(6):722-33.
133. Desagher S, Martinou JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* sept 2000;10(9):369-77.
134. Meier P, Vousden KH. Lucifer’s Labyrinth—Ten Years of Path Finding in Cell Death. *Molecular Cell.* 14 déc 2007;28(5):746-54.
135. Childs BG, Baker DJ, Kirkland JL, Campisi J, van Deursen JM. Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Rep.* nov 2014;15(11):1139-53.
136. Burton DGA, Faragher RGA. Cellular senescence: from growth arrest to immunogenic conversion. *Age (Dordr).* 2015;37(2):27.
137. Yosef R, Pilpel N, Tokarsky-Amiel R, Biran A, Ovadya Y, Cohen S, et al. Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nat Commun.* 6 avr 2016;7:11190.

138. Hayward RL, Macpherson JS, Cummings J, Monia BP, Smyth JF, Jodrell DI. Antisense Bcl-xl down-regulation switches the response to topoisomerase I inhibition from senescence to apoptosis in colorectal cancer cells, enhancing global cytotoxicity. *Clin Cancer Res.* juill 2003;9(7):2856-65.
139. Tang JJ, Shen C, Lu YJ. Requirement for pre-existing of p21 to prevent doxorubicin-induced apoptosis through inhibition of caspase-3 activation. *Mol Cell Biochem.* oct 2006;291(1-2):139-44.
140. Zhu Y, Tchkonina T, Pirtskhalava T, Gower AC, Ding H, Giorgadze N, et al. The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell.* août 2015;14(4):644-58.
141. Fuhrmann-Stroissnigg H, Ling YY, Zhao J, McGowan SJ, Zhu Y, Brooks RW, et al. Identification of HSP90 inhibitors as a novel class of senolytics. *Nat Commun.* 4 sept 2017;8(1):1-14.
142. Baker DJ, Perez-Terzic C, Jin F, Pitel K, Niederländer NJ, Jeganathan K, et al. Opposing roles for p16Ink4a and p19Arf in senescence and ageing caused by BubR1 insufficiency. *Nat Cell Biol.* juill 2008;10(7):825-36.
143. Childs BG, Baker DJ, Wijshake T, Conover CA, Campisi J, van Deursen JM. Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis. *Science.* 28 2016;354(6311):472-7.
144. Cawthon RM, Smith KR, O'Brien E, Sivatchenko A, Kerber RA. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *Lancet.* 1 févr 2003;361(9355):393-5.
145. Minamino T, Miyauchi H, Yoshida T, Ishida Y, Yoshida H, Komuro I. Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: role of telomere in endothelial dysfunction. *Circulation.* 2 avr 2002;105(13):1541-4.
146. Matthews C, Gorenne I, Scott S, Figg N, Kirkpatrick P, Ritchie A, et al. Vascular smooth muscle cells undergo telomere-based senescence in human atherosclerosis: effects of telomerase and oxidative stress. *Circ Res.* 21 juill 2006;99(2):156-64.
147. Rossman MJ, Kaplon RE, Hill SD, McNamara MN, Santos-Parker JR, Pierce GL, et al. Endothelial cell senescence with aging in healthy humans: prevention by habitual exercise and relation to vascular endothelial function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1 nov 2017;313(5):H890-5.
148. Warboys CM, de Luca A, Amini N, Luong L, Duckles H, Hsiao S, et al. Disturbed flow promotes endothelial senescence via a p53-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* mai 2014;34(5):985-95.

149. Hayashi T, Matsui-Hirai H, Miyazaki-Akita A, Fukatsu A, Funami J, Ding Q-F, et al. Endothelial cellular senescence is inhibited by nitric oxide: implications in atherosclerosis associated with menopause and diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 7 nov 2006;103(45):17018-23.
150. Zhu C, Yu Y, Montani J-P, Ming X-F, Yang Z. Arginase-I enhances vascular endothelial inflammation and senescence through eNOS-uncoupling. *BMC Res Notes*. 2 févr 2017;10(1):82.
151. Krouwer VJD, Hekking LHP, Langelaar-Makkinje M, Regan-Klapisz E, Post JA. Endothelial cell senescence is associated with disrupted cell-cell junctions and increased monolayer permeability. *Vascular Cell*. 28 août 2012;4(1):12.
152. Wang J, Uryga AK, Reinhold J, Figg N, Baker L, Finigan A, et al. Vascular Smooth Muscle Cell Senescence Promotes Atherosclerosis and Features of Plaque Vulnerability. *Circulation*. 17 nov 2015;132(20):1909-19.
153. Song Y, Shen H, Schenten D, Shan P, Lee PJ, Goldstein DR. Aging enhances the basal production of IL-6 and CCL2 in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. janv 2012;32(1):103-9.
154. Spinetti G, Wang M, Monticone R, Zhang J, Zhao D, Lakatta EG. Rat aortic MCP-1 and its receptor CCR2 increase with age and alter vascular smooth muscle cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. août 2004;24(8):1397-402.
155. Wang M, Takagi G, Asai K, Resuello RG, Natividad FF, Vatner DE, et al. Aging increases aortic MMP-2 activity and angiotensin II in nonhuman primates. *Hypertension*. juin 2003;41(6):1308-16.
156. Cudejko C, Wouters K, Fuentes L, Hannou SA, Paquet C, Bantubungi K, et al. p16INK4a deficiency promotes IL-4-induced polarization and inhibits proinflammatory signaling in macrophages. *Blood*. 1 sept 2011;118(9):2556-66.
157. Kim E-C, Kim J-R. Senotherapeutics: emerging strategy for healthy aging and age-related disease. *BMB Rep*. janv 2019;52(1):47-55.
158. Chang J, Wang Y, Shao L, Laberge R-M, Demaria M, Campisi J, et al. Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nat Med*. janv 2016;22(1):78-83.
159. Zhu Y, Doornebal EJ, Pirtskhalava T, Giorgadze N, Wentworth M, Fuhrmann-Stroissnigg H, et al. New agents that target senescent cells: the flavone, fisetin, and the BCL-XL inhibitors, A1331852 and A1155463. *Aging (Albany NY)*. 08 2017;9(3):955-63.

160. Jeon OH, Kim C, Laberge R-M, Demaria M, Rathod S, Vasserot AP, et al. Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment. *Nat Med.* juin 2017;23(6):775-81.
161. Wang Y, Chang J, Liu X, Zhang X, Zhang S, Zhang X, et al. Discovery of piperlongumine as a potential novel lead for the development of senolytic agents. *Aging (Albany NY).* 19 2016;8(11):2915-26.
162. Hwang HV, Tran DT, Rebuffatti MN, Li C-S, Knowlton AA. Investigation of quercetin and hyperoside as senolytics in adult human endothelial cells. *PLoS ONE.* 2018;13(1):e0190374.
163. Laberge R-M, Zhou L, Sarantos MR, Rodier F, Freund A, de Keizer PLJ, et al. Glucocorticoids suppress selected components of the senescence-associated secretory phenotype. *Aging Cell.* août 2012;11(4):569-78.
164. Moiseeva O, Deschênes-Simard X, St-Germain E, Igelmann S, Huot G, Cadar AE, et al. Metformin inhibits the senescence-associated secretory phenotype by interfering with IKK/NF- κ B activation. *Aging Cell.* juin 2013;12(3):489-98.
165. Orjalo AV, Bhaumik D, Gengler BK, Scott GK, Campisi J. Cell surface-bound IL-1 α is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network. *Proc Natl Acad Sci USA.* 6 oct 2009;106(40):17031-6.
166. Pitozzi V, Mocali A, Laurenzana A, Giannoni E, Cifola I, Battaglia C, et al. Chronic resveratrol treatment ameliorates cell adhesion and mitigates the inflammatory phenotype in senescent human fibroblasts. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* avr 2013;68(4):371-81.
167. Lim H, Park H, Kim HP. Effects of flavonoids on senescence-associated secretory phenotype formation from bleomycin-induced senescence in BJ fibroblasts. *Biochem Pharmacol.* 15 août 2015;96(4):337-48.
168. Demidenko ZN, Zubova SG, Bukreeva EI, Pospelov VA, Pospelova TV, Blagosklonny MV. Rapamycin decelerates cellular senescence. *Cell Cycle.* 15 juin 2009;8(12):1888-95.
169. Tilstra JS, Robinson AR, Wang J, Gregg SQ, Clauson CL, Reay DP, et al. NF- κ B inhibition delays DNA damage-induced senescence and aging in mice. *J Clin Invest.* juill 2012;122(7):2601-12.
170. Xu M, Tchkonja T, Ding H, Ogrodnik M, Lubbers ER, Pirtskhalava T, et al. JAK inhibition alleviates the cellular senescence-associated secretory phenotype and frailty in old age. *Proc Natl Acad Sci USA.* 17 nov 2015;112(46):E6301-6310.
171. Kang HT, Park JT, Choi K, Kim Y, Choi HJC, Jung CW, et al. Chemical screening identifies ATM as a target for alleviating senescence. *Nat Chem Biol.* 2017;13(6):616-23.

172. Yang L, Shu T, Liang Y, Gu W, Wang C, Song X, et al. GDC-0152 attenuates the malignant progression of osteosarcoma promoted by ANGPTL2 via PI3K/AKT but not p38MAPK signaling pathway. *Int J Oncol.* avr 2015;46(4):1651-8.
173. Yang HH, Hwangbo K, Zheng MS, Son J-K, Kim HY, Baek SH, et al. Inhibitory effects of juglanin on cellular senescence in human dermal fibroblasts. *J Nat Med.* juill 2014;68(3):473-80.
174. Yang HH, Hwangbo K, Zheng MS, Cho JH, Son J-K, Kim HY, et al. Quercetin-3-O- β -D-glucuronide isolated from *Polygonum aviculare* inhibits cellular senescence in human primary cells. *Arch Pharm Res.* 2014;37(9):1219-33.
175. Yang HH, Hwangbo K, Zheng MS, Cho JH, Son J-K, Kim HY, et al. Inhibitory effects of (-)-loliolide on cellular senescence in human dermal fibroblasts. *Arch Pharm Res.* 2015;38(5):876-84.
176. Kang T-W, Yevesa T, Woller N, Hoenicke L, Wuestefeld T, Dauch D, et al. Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature.* 9 nov 2011;479(7374):547-51.
177. Kojima Y, Volkmer J-P, McKenna K, Civelek M, Lusis AJ, Miller CL, et al. CD47-blocking antibodies restore phagocytosis and prevent atherosclerosis. *Nature.* 04 2016;536(7614):86-90.
178. Pereira BI, Devine OP, Vukmanovic-Stejic M, Chambers ES, Subramanian P, Patel N, et al. Senescent cells evade immune clearance via HLA-E-mediated NK and CD8+ T cell inhibition. *Nat Commun.* 03 2019;10(1):2387.
179. André P, Denis C, Soulas C, Bourbon-Caillet C, Lopez J, Arnoux T, et al. Anti-NKG2A mAb Is a Checkpoint Inhibitor that Promotes Anti-tumor Immunity by Unleashing Both T and NK Cells. *Cell.* 13 2018;175(7):1731-1743.e13.
180. Kamiya T, Seow SV, Wong D, Robinson M, Campana D. Blocking expression of inhibitory receptor NKG2A overcomes tumor resistance to NK cells. *J Clin Invest.* 01 2019;129(5):2094-106.
181. Kim I, Moon SO, Koh KN, Kim H, Uhm CS, Kwak HJ, et al. Molecular cloning, expression, and characterization of angiotensin-related protein. angiotensin-related protein induces endothelial cell sprouting. *J Biol Chem.* 10 sept 1999;274(37):26523-8.
182. Kubota Y, Oike Y, Satoh S, Tabata Y, Niikura Y, Morisada T, et al. Cooperative interaction of Angiotensin-like proteins 1 and 2 in zebrafish vascular development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 20 sept 2005;102(38):13502-7.

183. Zheng J, Umikawa M, Cui C, Li J, Chen X, Zhang C, et al. Inhibitory receptors bind ANGPTLs and support blood stem cells and leukaemia development. *Nature*. 30 mai 2012;485(7400):656-60.
184. Tabata M, Kadomatsu T, Fukuhara S, Miyata K, Ito Y, Endo M, et al. Angiopoietin-like protein 2 promotes chronic adipose tissue inflammation and obesity-related systemic insulin resistance. *Cell Metab*. sept 2009;10(3):178-88.
185. Horio E, Kadomatsu T, Miyata K, Arai Y, Hosokawa K, Doi Y, et al. Role of endothelial cell-derived angptl2 in vascular inflammation leading to endothelial dysfunction and atherosclerosis progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. avr 2014;34(4):790-800.
186. Fan X, Shi P, Dai J, Lu Y, Chen X, Liu X, et al. Paired immunoglobulin-like receptor B regulates platelet activation. *Blood*. 9 oct 2014;124(15):2421-30.
187. Carbone C, Piro G, Fassan M, Tamburrino A, Mina MM, Zanotto M, et al. An angiopoietin-like protein 2 autocrine signaling promotes EMT during pancreatic ductal carcinogenesis. *Oncotarget*. 30 mai 2015;6(15):13822-34.
188. Guo D-F, Chenier I, Tardif V, Orlov SN, Inagami T. Type 1 angiotensin II receptor-associated protein ARAP1 binds and recycles the receptor to the plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun*. 31 oct 2003;310(4):1254-65.
189. Guo D-F, Chenier I, Lavoie JL, Chan JSD, Hamet P, Tremblay J, et al. Development of hypertension and kidney hypertrophy in transgenic mice overexpressing ARAP1 gene in the kidney. *Hypertension*. sept 2006;48(3):453-9.
190. Guo DF, Sun YL, Hamet P, Inagami T. The angiotensin II type 1 receptor and receptor-associated proteins. *Cell Res*. sept 2001;11(3):165-80.
191. Savoia C, Burger D, Nishigaki N, Montezano A, Touyz RM. Angiotensin II and the vascular phenotype in hypertension. *Expert Rev Mol Med*. 30 mars 2011;13:e11.
192. Hato T, Tabata M, Oike Y. The role of angiopoietin-like proteins in angiogenesis and metabolism. *Trends Cardiovasc Med*. janv 2008;18(1):6-14.
193. Oike Y, Yasunaga K, Suda T. Angiopoietin-related/angiopoietin-like proteins regulate angiogenesis. *Int J Hematol*. juill 2004;80(1):21-8.
194. Zhang CC, Kaba M, Ge G, Xie K, Tong W, Hug C, et al. Angiopoietin-like proteins stimulate ex vivo expansion of hematopoietic stem cells. *Nat Med*. févr 2006;12(2):240-5.
195. Richardson MR, Robbins EP, Vemula S, Critser PJ, Whittington C, Voytik-Harbin SL, et al. Angiopoietin-like protein 2 regulates endothelial colony forming cell vasculogenesis. *Angiogenesis*. juill 2014;17(3):675-83.

196. Kadomatsu T, Uragami S, Akashi M, Tsuchiya Y, Nakajima H, Nakashima Y, et al. A molecular clock regulates angiopoietin-like protein 2 expression. *PLoS ONE*. 2013;8(2):e57921.
197. Kitazawa M, Nagano M, Masumoto K-H, Shigeyoshi Y, Natsume T, Hashimoto S. Angiopoietin-like 2, a circadian gene, improves type 2 diabetes through potentiation of insulin sensitivity in mice adipocytes. *Endocrinology*. juill 2011;152(7):2558-67.
198. Aoi J, Endo M, Kadomatsu T, Miyata K, Nakano M, Horiguchi H, et al. Angiopoietin-like protein 2 is an important facilitator of inflammatory carcinogenesis and metastasis. *Cancer Res*. 15 déc 2011;71(24):7502-12.
199. Odagiri H, Kadomatsu T, Endo M, Masuda T, Morioka MS, Fukuhara S, et al. The secreted protein ANGPTL2 promotes metastasis of osteosarcoma cells through integrin $\alpha 5\beta 1$, p38 MAPK, and matrix metalloproteinases. *Sci Signal*. 21 janv 2014;7(309):ra7.
200. Endo M, Yamamoto Y, Nakano M, Masuda T, Odagiri H, Horiguchi H, et al. Serum ANGPTL2 levels reflect clinical features of breast cancer patients: implications for the pathogenesis of breast cancer metastasis. *Int J Biol Markers*. 30 sept 2014;29(3):e239-245.
201. Li Q, Gong W, Yang Z, Lu B, Yang Y, Zhao W, et al. Serum Angptl2 levels are independently associated with albuminuria in type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. juin 2013;100(3):385-90.
202. Farhat N, Thorin-Trescases N, Mamarbachi M, Villeneuve L, Yu C, Martel C, et al. Angiopoietin-like 2 promotes atherogenesis in mice. *J Am Heart Assoc*. 10 mai 2013;2(3):e000201.
203. Usui T, Ninomiya T, Nagata M, Takahashi O, Doi Y, Hata J, et al. Angiopoietin-like protein 2 is associated with chronic kidney disease in a general Japanese population: the Hisayama Study. *Circ J*. 2013;77(9):2311-7.
204. Okada T, Tsukano H, Endo M, Tabata M, Miyata K, Kadomatsu T, et al. Synovocyte-derived angiopoietin-like protein 2 contributes to synovial chronic inflammation in rheumatoid arthritis. *Am J Pathol*. mai 2010;176(5):2309-19.
205. Ogata A, Endo M, Aoi J, Takahashi O, Kadomatsu T, Miyata K, et al. The role of angiopoietin-like protein 2 in pathogenesis of dermatomyositis. *Biochem Biophys Res Commun*. 17 févr 2012;418(3):494-9.
206. Toyono T, Usui T, Yokoo S, Kimakura M, Nakagawa S, Yamagami S, et al. Angiopoietin-Like Protein 2 Is a Potent Hemangiogenic and Lymphangiogenic Factor in Corneal Inflammation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1 juin 2013;54(6):4278-85.

207. Zhao J, Tian Z, Kadomatsu T, Xie P, Miyata K, Sugizaki T, et al. Age-dependent increase in angiopoietin-like protein 2 accelerates skeletal muscle loss in mice. *J Biol Chem*. 02 2018;293(5):1596-609.
208. Farhat N, Thorin-Trescases N, Voghel G, Villeneuve L, Mamarbachi M, Perrault LP, et al. Stress-induced senescence predominates in endothelial cells isolated from atherosclerotic chronic smokers. *Can J Physiol Pharmacol*. nov 2008;86(11):761-9.
209. Wang Z, Zheng H, Chen H, Lin X, Chen J, Wang L, et al. Elevated Serum Angiopoietin-like Protein 2 in Patients with Acute Coronary Syndrome. *Arch Med Res*. mai 2015;46(4):257-64.
210. Oike Y, Tabata M. Angiopoietin-like proteins--potential therapeutic targets for metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Circ J*. déc 2009;73(12):2192-7.
211. Horio Eiji, Kaikita Koichi, Tabata Mitsuhsa, Zhe Tiam, Tazume Hirokazu, Miyata Keishi, et al. Abstract 11343: Angiopoietin-Like Protein2 (angptl2) Promotes Coronary Endothelial Dysfunction and Atherosclerosis. *Circulation*. 23 nov 2010;122(suppl_21):A11343-A11343.
212. Horio Eiji, Kaikita Koichi, Ogawa Hisao, Oike Yuichi. Abstract 13942: Vascular Tissue-derived Angiopoietin-like Protein2 Accelerates Atherosclerosis Through Increasing Vascular Inflammation. *Circulation*. 26 nov 2013;128(suppl_22):A13942-A13942.
213. Larouche J-F, Yu C, Luo X, Farhat N, Guiraud T, Lalongé J, et al. Acute High-Intensity Intermittent Aerobic Exercise Reduces Plasma Angiopoietin-Like 2 in Patients With Coronary Artery Disease. *Can J Cardiol*. oct 2015;31(10):1232-9.
214. Thorin-Trescases N, Hayami D, Yu C, Luo X, Nguyen A, Larouche J-F, et al. Exercise Lowers Plasma Angiopoietin-Like 2 in Men with Post-Acute Coronary Syndrome. *PLoS ONE*. 2016;11(10):e0164598.
215. Shimomura M, Oyama J-I, Takeuchi M, Shibata Y, Yamamoto Y, Kawasaki T, et al. Acute effects of statin on reduction of angiopoietin-like 2 and glyceraldehyde-derived advanced glycation end-products levels in patients with acute myocardial infarction: a message from SAMIT (Statin for Acute Myocardial Infarction Trial). *Heart Vessels*. oct 2016;31(10):1583-9.
216. Park J, Choi Y, Mizushima R, Yoshikawa T, Myoenzono K, Tagawa K, et al. Dietary modification reduces serum angiopoietin-like protein 2 levels and arterial stiffness in overweight and obese men. *J Exerc Nutrition Biochem*. 30 sept 2019;23(3):39-44.
217. Hata J, Mukai N, Nagata M, Ohara T, Yoshida D, Kishimoto H, et al. Serum Angiopoietin-Like Protein 2 Is a Novel Risk Factor for Cardiovascular Disease in the Community: The Hisayama Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016;36(8):1686-91.

218. Huang C-L, Wu Y-W, Wu C-C, Hwang J-J, Yang W-S. Serum Angiotensin-Like Protein 2 Concentrations Are Independently Associated with Heart Failure. *PLoS ONE*. 2015;10(9):e0138678.
219. Yu C, Luo X, Duquette N, Thorin-Trescases N, Thorin E. Knockdown of angiotensin like-2 protects against angiotensin II-induced cerebral endothelial dysfunction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1 mars 2015;308(5):H386-397.
220. Yu C, Luo X, Farhat N, Daneault C, Duquette N, Martel C, et al. Lack of angiotensin-like-2 expression limits the metabolic stress induced by a high-fat diet and maintains endothelial function in mice. *J Am Heart Assoc*. 15 août 2014;3(4).
221. Voghel G, Thorin-Trescases N, Farhat N, Mamarbachi AM, Villeneuve L, Fortier A, et al. Chronic treatment with N-acetyl-cysteine delays cellular senescence in endothelial cells isolated from a subgroup of atherosclerotic patients. *Mechanisms of ageing and development*. mai 2008;129(5):261.
222. Phillips J. William, Barringhaus Kurt G., Sanders John M., Hesselbacher Sean E., Czarnik Ann C., Manka David, et al. Single Injection of P-Selectin or P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 Monoclonal Antibody Blocks Neointima Formation After Arterial Injury in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Circulation*. 6 mai 2003;107(17):2244-9.
223. Tian Z, Miyata K, Tazume H, Sakaguchi H, Kadomatsu T, Horio E, et al. Perivascular adipose tissue-secreted angiotensin-like protein 2 (Angptl2) accelerates neointimal hyperplasia after endovascular injury. *J Mol Cell Cardiol*. avr 2013;57:1-12.
224. Yang L, Li T, Zha L. Foxc2 Alleviates Ox-LDL-Induced Lipid Accumulation, Inflammation, and Apoptosis of Macrophage via Regulating the Expression of Angptl2. *Inflammation*. 13 mars 2020;
225. Horiguchi H, Endo M, Miyamoto Y, Sakamoto Y, Odagiri H, Masuda T, et al. Angiotensin-like protein 2 renders colorectal cancer cells resistant to chemotherapy by activating spleen tyrosine kinase-phosphoinositide 3-kinase-dependent anti-apoptotic signaling. *Cancer Sci*. déc 2014;105(12):1550-9.
226. Acosta JC, Banito A, Wuestefeld T, Georgilis A, Janich P, Morton JP, et al. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol*. août 2013;15(8):978-90.
227. Nagano T, Nakano M, Nakashima A, Onishi K, Yamao S, Enari M, et al. Identification of cellular senescence-specific genes by comparative transcriptomics. *Sci Rep*. 22 2016;6:31758.

228. Eggert T, Wolter K, Ji J, Ma C, Yevsa T, Klotz S, et al. Distinct Functions of Senescence-Associated Immune Responses in Liver Tumor Surveillance and Tumor Progression. *Cancer Cell*. 10 2016;30(4):533-47.
229. Pienimaeki-Roemer A, Konovalova T, Musri MM, Sigrüener A, Boettcher A, Meister G, et al. Transcriptomic profiling of platelet senescence and platelet extracellular vesicles. *Transfusion*. 2017;57(1):144-56.
230. Shimamoto A, Kagawa H, Zensho K, Sera Y, Kazuki Y, Osaki M, et al. Reprogramming suppresses premature senescence phenotypes of Werner syndrome cells and maintains chromosomal stability over long-term culture. *PLoS ONE*. 2014;9(11):e112900.
231. Noly P-E, Labbé P, Thorin-Trescases N, Fortier A, Nguyen A, Thorin E, et al. Reduction of plasma angiopoietin-like 2 after cardiac surgery is related to tissue inflammation and senescence status of patients. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2019;158(3):792-802.e5.
232. Gendron M-E, Théorêt J-F, Mamarbachi AM, Drouin A, Nguyen A, Bolduc V, et al. Late chronic catechin antioxidant treatment is deleterious to the endothelial function in aging mice with established atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. juin 2010;298(6):H2062-2070.
233. Chen S, Kapturczak M, Loiler SA, Zolotukhin S, Glushakova OY, Madsen KM, et al. Efficient transduction of vascular endothelial cells with recombinant adeno-associated virus serotype 1 and 5 vectors. *Hum Gene Ther*. févr 2005;16(2):235-47.
234. Hampel B, Malisan F, Niederegger H, Testi R, Jansen-Dürr P. Differential regulation of apoptotic cell death in senescent human cells. *Exp Gerontol*. déc 2004;39(11-12):1713-21.
235. Hoffmann J, Haendeler J, Aicher A, Rössig L, Vasa M, Zeiher AM, et al. Aging enhances the sensitivity of endothelial cells toward apoptotic stimuli: important role of nitric oxide. *Circ Res*. 12 oct 2001;89(8):709-15.
236. Zhang J, Patel JM, Block ER. Enhanced apoptosis in prolonged cultures of senescent porcine pulmonary artery endothelial cells. *Mech Ageing Dev*. 31 mars 2002;123(6):613-25.
237. Van Vré EA, Ait-Oufella H, Tedgui A, Mallat Z. Apoptotic cell death and efferocytosis in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. avr 2012;32(4):887-93.
238. Poon IKH, Hulett MD, Parish CR. Molecular mechanisms of late apoptotic/necrotic cell clearance. *Cell Death Differ*. mars 2010;17(3):381-97.
239. Hristov M, Erl W, Linder S, Weber PC. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Blood*. 1 nov 2004;104(9):2761-6.

240. Deregibus MC, Cantaluppi V, Calogero R, Lo Iacono M, Tetta C, Biancone L, et al. Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood*. 1 oct 2007;110(7):2440-8.
241. Boulanger CM, Amabile N, Tedgui A. Circulating microparticles: a potential prognostic marker for atherosclerotic vascular disease. *Hypertension*. août 2006;48(2):180-6.
242. Bhatwadekar AD, Glenn JV, Curtis TM, Grant MB, Stitt AW, Gardiner TA. Retinal endothelial cell apoptosis stimulates recruitment of endothelial progenitor cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. oct 2009;50(10):4967-73.
243. Zerneck A, Bidzhekov K, Noels H, Shagdarsuren E, Gan L, Denecke B, et al. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal*. 8 déc 2009;2(100):ra81.