

Université de Montréal

# Étude du rôle des miARN dans les pathologies vasculaires de l'oeil

par Catherine Ménard

Département de Biochimie, Université de Montréal  
Faculté de Médecine

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de doctorat  
en biochimie

Évaluée par un jury composé par les personnes suivantes :

*Président : Dr Pascal Chartrand*  
*Directeur de recherche : Dr Przemyslaw (Mike) Sapiaha*  
*Codirecteur de recherche: Dr Vincent DeGuire*  
*Membre du jury : Dre Christine Vande Velde*  
*Membre du jury externe : Dr Patrick Provost*  
*Représentant de la doyenne de la Faculté : Dr Éric Milot*

31 Décembre, 2019



## Résumé

Une des pathologies les plus répandues dans les pays développés est la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). Elle se présente sous différentes formes dont la plus sévère est caractérisée par la présence de formation de néo-vascularisation provenant de la choroïde (CNV) migrant vers la rétine. Malheureusement, le diagnostic peut être seulement posé une fois que les symptômes apparaissent et que la vision est déjà affectée. Récemment, un vif engouement s'est porté sur les microARN (miARN), devenus des molécules d'intérêt pour le développement de biomarqueurs et représentant également un important potentiel thérapeutique. *Nous avons donc émis l'hypothèse que l'identification de miRNA dans un contexte de DMLA avec CNV permettrait de caractériser leurs rôles, tant au niveau de l'identification de biomarqueurs que de nouvelles cibles thérapeutiques.*

**Le premier objectif de notre projet était d'identifier chez l'humain une signature de miARN spécifique à la forme humide de la DMLA.** Pour ce faire, nous avons réalisé un criblage des miARN dans l'humeur vitrée de patients. Nous avons observé une augmentation des niveaux de miR-146a et une diminution de miR-106b et miR-152 spécifique à la DMLA. Cette signature fut confirmée dans le plasma de cette même cohorte de patients. D'autre part, l'exploration de bases de données AMD Gene Consortium (AGC) et Ingenuity Pathway Analysis (IPA) a démontré une relation entre les miARN détectés et des mutations génétiques associées à la forme DMLA avec CNV. En effet, nous avons identifié un SNP (*single-nucleotide polymorphism* ou SNP) (rs1063320) dans un site de liaison de miR-152 du gène *HLA-G*. **Le second objectif était d'explorer la possibilité d'utiliser, du point de vue thérapeutique, un des miARN identifiés au 1<sup>er</sup> objectif.** Nous avons, tout d'abord, quantifié l'expression de miR-146a, miR-106b et miR152 dans un des modèles classiques de la DMLA avec CNV chez la souris (brûlures par laser). Le candidat retenu fut miR-106b, puisqu'en plus d'être impliqué dans l'angiogenèse, son expression dans le modèle animal reflétait de plus près celle obtenue chez les patients. Suite à ces résultats, nous avons: exploré **A)** le mécanisme influençant la diminution de l'expression de miR-106b et **B)** l'effet de sa surexpression sur l'angiogenèse. D'abord en **A)**, nous avons observé une activation de la voie de PERK dans notre modèle animal de CNV induite par laser menant à une diminution de l'expression de *MCM7* et du polycistron miR-106b~25. .

Ensuite en **B**), nous avons pu observer l'effet anti-angiogénique de miR-106b sur la migration des cellules endothéliales *in vitro* et sur la formation de NV *in vivo*. L'action anti-angiogénique de miR-106b pourrait ainsi avoir un potentiel thérapeutique important sur la formation de la CNV dans la DMLA.

**Mots-clés** : DMLA, microARN, biomarqueurs, CNV, miR-106b, PERK

## Abstract

Age-related macular degeneration (AMD) is a leading cause of blindness worldwide affecting individuals over the age of 60. The neovascular form (NV AMD) is characterized by choroidal neovascularization (CNV) and is responsible for the majority of central vision impairment. Unfortunately, diagnostic of AMD can only be done after symptoms have appeared and loss of visual field occurred. Recently, there is a growing interest in microRNAs (miRNAs) for their eventual use in the development of new biomarkers or new therapeutic strategies. ***Our hypothesis is that wet AMD is associated with specific signature of several miRNAs that can be used as biomarkers for the disease. These miRNAs can be harnessed for therapeutic interventions.***

**Our first objective was to identify a specific signature of miRNAs for wet AMD** by using non-biased microRNA arrays and individual TaqMan qPCRs. We profiled miRNAs in the vitreous humour and plasma of patients with NV AMD. We identified a disease-associated increase in miR-146a and a decrease in miR-106b and miR-152 in the vitreous humour, which was reproducible in plasma. Moreover, miR-146a/miR-106b ratios discriminated patients with NV AMD with an area under the Receiver Operating Characteristic curve (ROC AUC) of 0,977 in vitreous humour and 0,915 in plasma, suggesting potential for a blood-based diagnostic. Furthermore, using the AGC and IPA database, we mapped a NV AMD-associated single nucleotide polymorphism (SNP) (rs1063320) in a binding site for miR-152-3p in the HLA-G gene.

**Our second objective was to explore the therapeutic potential of a specific miRNA (identified in objective 1).** First, we explored the expression levels of miR-146a, miR-106b and miR-152 in the laser burn mouse model. We demonstrated that levels of miR-106b were significantly decreased in this mouse model of CNV. We divided this objective in two parts: **Part A**, explore mechanisms causing miR-106b downregulation and **part B**, study the therapeutic potential of miR-106b on the inhibition of angiogenesis and CNV formation. **First**, we showed that expression of the miR-106b-25 cluster is negatively regulated by the ER stress pathway of protein kinase RNA-like ER kinase (PERK) and a reduction in levels of *MCM7*, the host gene of miR-106b. **Second**, we demonstrated that therapeutic delivery of miR-106b to the retina with lentiviral vectors protects against aberrant retinal neovascularization in two distinct

mouse models of pathological neo-vascularization. Results from this study suggest that miRNAs, such as miR-106b, have the potential to be used as multitarget therapeutics for conditions characterized by aberrant retinal neovascularization.

**Keywords:** AMD, microRNA, biomarkers, CNV, miR-106b, PERK

# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures .....	x
Liste des abréviations.....	xiii
Remerciements.....	xvii
Chapitre 1 : Introduction.....	1
Introduction.....	2
I. L'œil.....	2
1. Présentation de l'œil .....	2
2. L'humeur vitrée .....	3
3. Tissus postérieurs de l'œil .....	3
a) La rétine .....	4
b) L'épithélium pigmenté de la rétine (ÉPR) et la choroïde .....	6
4. La vascularisation de la rétine.....	8
II. Formation et structure des vaisseaux sanguins .....	10
1. Structure des vaisseaux sanguins .....	10
a) Endothélium vasculaire.....	11
b) Jonctions cellulaires et perméabilité vasculaire.....	12
2. L'angiogenèse.....	14
3. Facteurs de croissance.....	17
a) Le VEGF .....	18
b) Récepteurs liant le VEGF .....	22
c) Les corécepteurs de VEGF .....	24
d) La guidance de la croissance vasculaire .....	24

III.	Pathologies vasculaires de l'œil.....	26
1.	La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) .....	26
a)	Facteurs de risque de la DMLA .....	27
b)	Pathogénèse.....	29
2.	Diagnostic des pathologies vasculaires de l'œil .....	32
3.	Thérapies actuelles contre la néovascularisation pathologique de la rétine .....	34
a)	Laser, photo coagulation et thérapie photo dynamisme.....	35
b)	Inhibiteurs du VEGF.....	35
c)	Thérapies géniques.....	37
4.	Modèles murins.....	38
a)	Modèle d'induction de CNV par laser .....	38
b)	Modèle murin de rétinopathies prolifératives induites à l'oxygène (OIR).....	39
IV.	Les miARN.....	41
1.	Découverte .....	41
2.	Biogenèse des miARN.....	42
3.	Modes d'action des miARN.....	44
a)	Mécanisme de liaison des miARN à l'ARNm.....	44
b)	Régulation de la traduction par les miARN.....	47
c)	Regulation post-transcriptionnelle de l'expression des miARN.....	48
4.	Circulation systémique et sécrétion des miARN .....	50
a)	Mode de sécrétions des miARN et communication cellulaire.....	50
b)	Biomarqueurs et diagnostique.....	52
5.	Implication dans les pathologies.....	54
a)	Les angiomiR .....	55
b)	Les membres de la famille miR-17.....	56
c)	Implication des miARN dans les maladies oculaires.....	58
6.	Traiter avec les miARN .....	59
a)	La thérapie avec les miARN et la DMLA .....	60
Chapitre 2 : Article 1.....		62
1.	Mise en contexte .....	63



2. Contributions des auteurs.....	63
3. Article.....	64
a) ABSTRACT.....	64
b) INTRODUCTION .....	65
c) RESULTS .....	66
d) DISCUSSION.....	70
e) MATERIALS AND METHODS.....	73
f) REFERENCES .....	79
g) FIGURES.....	82
Chapitre 3 : Article 2.....	91
1. Mise en contexte : .....	92
2. Contributions des auteurs.....	92
3. Article .....	94
a) ABSTRACT.....	95
b) INTRODUCTION .....	96
c) RESULTS .....	97
d) DISCUSSION.....	100
e) MATERIALS AND METHODS.....	102
f) REFERENCES .....	107
Chapitre 4: Discussion .....	118
1. Phase 1 : Identification de miARN chez les patients souffrant de la forme humide de la DMLA.....	119
2. Phase 2 : Étude du potentiel thérapeutique des miARNs identifiés à la phase 1 .....	131
A) Quel mécanisme cellulaire affecte l'expression de miR-106b?.....	133
B) Quel effet a l'expression de miR-106b sur l'angiogenèse et quel est son potentiel thérapeutique pour la forme humide de la DMLA?.....	135
Conclusion .....	140
Bibliographie.....	i
Annexe 1: Cell Met. 2013.....	i

Annexe 2: PNAS 2019.....	ii
Annexe 3: Tableau S2 Oncotarget, 2016 (Chapitre 2).....	iii
Annexe 4: Tableau S3 Oncotarget, 2016 (Chapitre 2).....	ix

## Liste des tableaux

<b>Tableau I.</b>	Patient baseline statistics.....	86
<b>Tableau II.</b>	Clinical characteristics of patients having undergone vitreous biopsy.....	87
<b>Tableau III.</b>	Compilations des études sur la détection des miARN chez les patients souffrant de la DMLA.....	126

# Liste des figures

## *Chapitre 1*

<b>Figure 1.</b>	Schéma de la structure de l'œil.....	2
<b>Figure 2.</b>	Schéma des couches cellulaires de la rétine .....	5
<b>Figure 3.</b>	Schéma de l'organisation tissulaire de la choroïde,.....	7
<b>Figure 4.</b>	Schéma des réseaux vasculaires de la rétine.....	8
<b>Figure 5.</b>	Représentation des jonctions des cellules endothéliales.....	12
<b>Figure 6.</b>	Schématisation des étapes de l'angiogenèse.....	15
<b>Figure 7.</b>	Schématisation de la différenciation cellulaire par la voie Notch .....	17
<b>Figure 8.</b>	Isoformes et récepteurs du VEGF (adapté de (Grothey and Galanis 2009)).....	19
<b>Figure 9.</b>	Schématisation des voies de signalisation du stress du réticulum endoplasmique .....	22
<b>Figure 10.</b>	Schéma d'une rétine saine et d'une rétine atteinte des différentes formes de la DMLA (A normal, B forme sèche et C forme humide.....	30
<b>Figure 11.</b>	Exemples d'imagerie de l'œil .....	33
<b>Figure 12.</b>	Schématisation du modèle murin OIR .....	40
<b>Figure 13.</b>	Schématisation de la biogénèse des miARN.....	44
<b>Figure 14.</b>	Modes de liaison des miARN au ARNm.....	46
<b>Figure 15.</b>	Modes de sécrétions des miARN .....	52
<b>Figure 16.</b>	Famille de miR-17 et la séquence de leur noyau .....	57

## *Chapitre 2*

<b>Figure 1.</b>	Human vitreous humour profiling identifies 5 potential miRNAs deregulated in NV AMD.	82
<b>Figure 2:</b>	Validation of expression profiles for miR-146a, miR-106b and miR-152 in the vitreous humour of patients with NV AMD. ....	83
<b>Figure 3:</b>	Expression profiles of miRNAs in plasma mirror levels found in vitreous humour.	84

<b>Figure 4:</b> The miR-146a/miR-106b ratio in vitreous humour and blood is predictive of NV AMD. ....	85
<b>Figure 5:</b> Supplemental Figure 1: Hemolysis index in correlation with raw CT values.....	88
<b>Figure 6:</b> Supplemental Figure 2: Normalization of plasma miRNAs by weighted mean conserves expression profile .....	89
<b>Figure 7:</b> Supplemental Figure 3: Loci encoding putative hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-106b-5p, and hsa-miR-152-3p target motifs.....	90

### *Chapitre 3*

<b>Figure 1.</b> The initiation of retinal neo-vascularization is associated with the downregulation of miR-106b expression.....	112
<b>Figure 2.</b> PERK activation provokes miR-106b-25 cluster and MCM7 host gene downregulation in CVN mouse model. ....	113
<b>Figure 3.</b> miR-106b exerts an anti-angiogenic effect via regulation of VEGFA and HIF1 $\alpha$ protein expression. ....	114
<b>Figure 4.</b> miR-106b decreases choroidal neovascularization following intraocular LV-miR-106b administration in CNV mouse model. ....	115
<b>Figure 5.</b> miR-106b decreases retinal neovascularization following intraocular LV-miR-106b administration in the OIR mouse model. ....	116
<b>Figure 6.</b> Supplemental Figure 1 .....	117

### *Chapitre 4*

<b>Figure 1.</b> Boucle de rétroaction négative de la réponse immunitaire par miR-146a .....	123
<b>Figure 2.</b> Détection de l'expression de miR-146a, de miR-106b et de miR-152 dans le modèle murin de CNV induite par brûlures avec un laser.....	132

**Figure 3.** Classement par famille des polycistrons de miR17~92, miR-106a~miR-363 et miR-106b~25 en fonction des séquences des noyaux..... 155

**Figure 4.** Schématisation conceptuelle du rôle de miR-106b dans la formation de CNV 1419

## Liste des abréviations

AAV: Adeno-Associated virus

AGC : AMD gene consortium

AGE : produits de glycosylation avancés

Ago : Argonaute

AR : Aldose Réductase

ATF6: Activating Transcription Factor 6

BIP : Binding immunoglobulin protein

BHR: Barrière Hémato-Rétinienne

BHRe: Barrière Hémato-Rétinienne externe

BHRi: Barrière Hémato-Rétinienne interne

BRD4 : Bromodomain-containing protein 4

CE: Cellules Endothéliales

CML: Cellules Musculaires Lisses

DLL: Delta-Like

DME: Rétinopathie du diabète avec œdème maculaire (Diabetic Macular Edema)

DMLA: Dégénérescence Maculaire Liée à l'Âge

DR: Diabetic Retinopathy (rétinopathie du diabète)

E2F: adenovirus E2 promoter binding Factor

ÉP: cellules Épithéliales Pigmentaires

ÉPR : Épithélium Pigmenté de la Rétine

ET-1: Endothélin-1

EGF: Epidermal Growth Factor

FDA: Food and Drugs Administration

FGF: Fibroblast Growth Factor

Flk-1: Fetal liver kinase-1

Flt-1: Fms-like tyrosine kinase-1

Flt-4: Fms-like tyrosine kinase-4

HDL: High Density lipid (lipide de haute densité)

HIF-1: Hypoxia Inducing Factor 1  
HSC70: Heat Shock Cognate  
HSP90: Heat Shock Protein  
HUVEC: Human Umbilical Vascular Endothelial Cell  
IGF: Insuline-like Growth Factor  
IPA: Ingenuity Pathway Analysis  
IRAK: Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 4  
IRE1 $\alpha$ : Inositol Requiring 1  
JA: Jonction Adhérente  
JAG-1 : JAGGED 1  
JAM : Junction Adhesion Molecules (molécules d'adhésion jonctionnelle)  
JS: Jonction Serrée  
KDR: Kinase insert Domain containing Receptor  
MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinases  
MCM7: Minichromosome Maintenance Complex Component 7  
miARN: microARN  
MMP : MetalloProtéinase Matricielle  
NO: Monoxyde d'Azote  
NPM1 : Nuléophosmine 1  
Nrf2 : Nuclear factor-like 2  
NRP: Neuropiline  
NV : Néo-Vascularisation  
OIR : Oxygen induced retinopathy (rétinopathie induite par l'oxygène)  
PAF: Facteur d'Activation Plaquettaire  
PAI: Plasminogen Activator Inhibitor  
pARNi: petit ARN interférant  
PC: Péricyte  
PDGF: Platelet-Derived Growth Factor  
PDR: Proliferatives diabetic rethinopathies (Rétinopathies prolifératives du diabète)  
PERK: PKR-like ER Kinase  
PGI2: Prostacycline



PIGF: Placental Growth Factor  
PI3K: Phosphatidylinositol 3- kinase  
PLC $\gamma$ : Phospholipase C $\gamma$   
PMR: Protéines Mal Repliées  
POLII : Polymérase II  
Pre-miR: Précurseur de miARN  
Pri-miR: transcrit primaire de miARN  
RE: Réticulum Endoplasmique  
RISC : RNA-induced silencing complex  
ROP: Rétinopathie du prématuré  
ROS: molécules d'oxygène réactives  
SH2: Src Homology-2  
shARN: petit ARN en épingle à cheveux  
TGF- $\beta$ : Transformation Growth Factor  
TRAF6: TNF Receptor Associated Factor  
TIMP: Tissue Inhibitor of Metalloproteinases  
TRBP: Transactivation Response element RNA-Binding Protein  
TSP1: Thrombospondin 1  
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor  
VEGFR1: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1  
VEGFR2: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2  
VEGFR3: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3  
VSVG: Vesicular Cytomegalovirus Glycoprotein

*À mes enfants et ma tendre moitié qui m'ont soutenue toutes ces années et qui étaient mes rayons de soleil dans les moments les plus sombres de mon parcours de PhD.*

# Remerciements

Le chemin à parcourir pour la réalisation d'une thèse est très sinueux et rempli d'obstacles et de réussites. Tout ce travail n'aurait pu être réalisé par moi seule. Un bon nombre de personnes ont contribué directement dans le projet, ou de manière aussi importante, ont simplement su m'encourager et me soutenir tout au long de ces années.

D'abord, il est important de souligner le rôle de mon directeur de recherche Dr Mike (Przemyslaw) Sapięha. Je désire te remercier pour m'avoir accepté dans ton équipe, pour ton soutien et ta présence. Tu as toujours été hyper disponible pour répondre à mes questions et souvent avec une rapidité des plus surprenantes. Merci aussi pour tes encouragements, même lorsque les projets semblaient être dans une impasse et que l'on se questionne sur nos capacités. Tu as toujours su souligner mes efforts et me montrer que tu étais fier lorsque je réussais à débloquent le projet. Merci Mike pour m'avoir encouragé à être plus autonome en me guidant mais en me laissant aussi explorer les solutions. Je ne veux surtout pas oublier de te remercier pour toutes les histoires que tu nous racontais, des anecdotes amusantes lors de tes congrès ou visites à l'étranger ! C'est toujours agréable d'avoir une bonne discussion avec toi qu'elle soit scientifique ou non !

Ensuite, je souhaite remercier mon co-directeur, Dr Vincent DeGuire. Nous partageons tous les deux une fascination pour les miARN, la mienne a débuté à la fin de ton PhD ce qui m'a conduit à faire le mien chez Mike. Merci, d'abord, de m'avoir permis de rencontrer Mike et de réaliser mon doctorat dans son laboratoire. Merci pour ton soutien et ton encadrement tout au long de mes études doctorales. C'est toujours un plaisir de travailler avec toi. Nos discussions scientifiques et tes commentaires m'ont toujours beaucoup apporté. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir poussé à dépasser mes limites. Sans ta co-direction, mon PhD aurait été beaucoup plus difficile à réaliser.

Bien entendu, je désire remercier tous ceux qui ont participé de près ou de loin à l'évolution de mon projet. Merci Dr Miloudi, pour tout. Merci beaucoup Khalil pour ton soutien, tes conseils, ton calme... D'avoir passé des heures à réviser mes données, mes analyses et mes papiers ! Tu as été d'une aide précieuse pour relever les défis que j'ai rencontrés pendant toutes ces années. Merci à Malika Oubaha, qui m'a beaucoup appris scientifiquement, à la

planification expérimentale mon projet, à avoir plus d'autonomie et surtout à avoir confiance en moi. Merci à Gaëlle Mawambo avec qui, j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler, rire et partager les stress des différentes étapes de notre doctorat que nous vivions au même moment. Merci à Célia Parinot, avec qui j'ai beaucoup aimé travailler et qui m'a aidé à finir les dernières expériences. J'ai beaucoup aimé nos pauses café et aussi te taquiner avec mes expressions québécoises. Merci Célia car tu as toujours su quoi dire pour m'encourager et diminuer mon stress. Et surtout, merci pour ces longues heures de lectures de ma thèse! Aga! Thank you so much, you started in the lab few months before me and all these years with you brought me, for sure, a precious help during my PhD but also a great friendship that, I hope will continue for a long time. Thanks Aga! Merci à Ariel Wilson, un rayon de soleil dans un labo. Toujours souriante et prête à nous aider. Merci pour tout, en particulier pour ton travail de correction de mes textes en anglais et surtout pour le dernier article. Merci François pour ton aide avec les injections intra oculaires de souris, pour tous tes conseils et nos discussions. Merci Karine pour ta patience et ton aide dans les stratégies de clonage. Tu m'as beaucoup aidé et j'ai beaucoup aimé travailler avec toi. Tu es remarquablement bien organisée, une collègue que tout le monde voudrait. Merci à Fred Pilon, qui a toujours su m'accorder un accueil enthousiaste chaque matin lorsque j'arrivais au labo, comme si ça faisait 6 mois que l'on ne s'était pas vu! Merci pour ton enthousiasme, c'est tellement agréable de travailler avec toi! Merci à Sullivan, un collègue devenu un ami. Nous avons passé beaucoup de belles soirées à jouer au Majic! Je désire remercier aussi mes collègues Elisabeth, Normand, Roberto, Frédérick, Rachel, Sergio et Guillaume que j'ai cotoyé et qui ont su rendre mes journées amusantes et agréables.

Je souhaite remercier mes collègues qui sont passé par le laboratoire au début de mon doctorat. Agustin, je me rappellerai toujours de ta rigueur scientifique et des mille une discussions que nous avons en travaillant. J'ai appris mes premières techniques de modèles murins dans l'œil avec toi. Je désire aussi remercier mes collègues Éric Lapalme, Nicolas Tétreault, Nicholas Sitaras et Chintan Patel.

Je tiens aussi à remercier mes collaborateurs le Dr Flavio Rezende, qui nous a permis d'avoir accès aux échantillons humains de vitré et de sang. Merci au Dr John-Paul SanGiovanni pour ses analyses biostatistiques de SNPs. Je désire aussi remercier tous les collaborateurs qui ont participé de près ou de loin au projet.

Je veux remercier les membres de mon comité de thèse Dre Christine Vande Velde, qui était présidente et qui a fait un travail remarquable. Merci pour tes commentaires constructifs et ton soutien tout au long de mes études. Merci aussi à Dr Pascal Chartrand, c'était pour moi une fierté de t'avoir comme membre de mon comité. Pour avoir déjà travaillé avec toi dans le passé, tu es un chercheur que j'estime beaucoup. Merci de m'avoir soutenu tout au long de mon doctorat. Merci aux membres du jury de mon examen pré-doc d'avoir pris le temps de faire mon évaluation et qui ont cru en mes capacités.

Il n'y a pas que l'entourage professionnel qui a contribué à la réussite de mon PhD. Je voudrais remercier mes ami(e)s et ma famille. Merci Suzanne pour m'avoir sorti au hockey, que l'on perde ou que l'on gagne, c'était toujours amusant une soirée au centre Bell ensemble ! Mon amie Sophie qui a eu le courage de lire mon intro pour faire une correction du français et qui a toujours été là pour moi. Mon amie Kareen, même si on est loin d'être voisine, on se vide le cœur sur messenger et on en rit après ! Merci Kareen pour tous ces beaux moments! Je voudrais remercier toutes mes amies pour votre patience car ma disponibilité était très limitée. Merci pour m'avoir attendu et pour ces moments divertissants qui m'ont permis d'avoir un équilibre mental.

Je désire remercier mes beaux-parents Charles et Priscilla qui ont toujours cru en moi et ont toujours démontré beaucoup de fierté à ma réussite. Merci pour tous ces bons soupers en famille remplis d'encouragements. Je désire remercier du plus profond de mon cœur mes parents. Ma mère qui a toujours cru en moi, même quand moi-même n'y croyais plus. Tu as toujours été un exemple de persévérance pour moi. Tu nous as toujours appris à ne pas lâcher et foncer. Sans ces qualités, je n'aurais pas passé au travers du doctorat. Merci à mon père, Pierre, qui a toujours démontré de la fierté et qui a toujours pensé que sa fille était capable! Merci pour ta présence et ton aide précieuse à la maison. Merci à mes frères Steve et Emmanuel avec qui je passe toujours des moments agréables et amusants me permettant de décrocher. Merci aussi Manu, pour ces soirées de jeux de sociétés.

Pour terminer, je désire remercier mes proches qui partagent mon quotidien et ont dû vivre eux aussi mes hauts et mes bas. Guillaume, Guillaume mille mercis! Pour tous les soupers et tout ce que tu faisais à la maison au début de mon doctorat. Tu as mis ta carrière sur pause pour m'aider. Merci pour ta patience, ta patience légendaire. Ton souci de mon bien-être, tu fais toujours tout pour que je me sente bien et me simplifier la vie. Merci surtout pour ton amour et

ta confiance. Merci pour ces heures de calculs mathématiques pour la normalisation de mes arrays. Merci pour ton soutien informatique, tu me sauves la vie combien fois par mois?! Merci à mes fils, grâce à eux, les problèmes s'envolent et on joue. Esteban, tellement attentionné qui s'assure toujours d'aider sa maman quand elle est trop fatiguée. Benjamin, tu es affectueux. Tes calins sont tellement réparateurs et tu as toujours une belle parole à me dire dans les jours où je suis le plus découragée. Edouard, le petit dernier, même si tu demandes beaucoup d'attention de maman, tu sais réchauffer mon cœur et me recentrer sur l'essentiel.

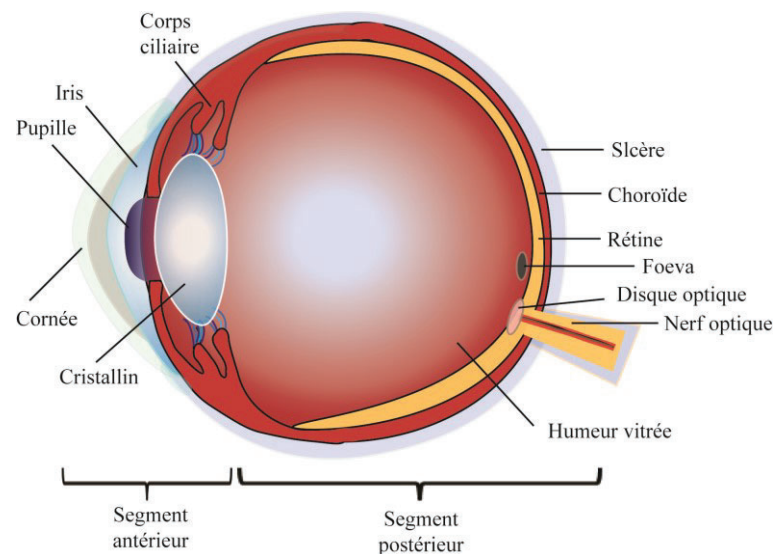
# **Chapitre 1 : Introduction**

# Introduction

## I. L'œil

### 1. Présentation de l'œil

L'œil est responsable d'un sens unique: la vue. Effectivement, les yeux servent de communication directe entre le cerveau et le monde extérieur où se situe l'organisme. Structurellement, l'œil est divisé en deux segments: le segment antérieur et le segment postérieur. Le segment antérieur comprend la cornée, la pupille, l'iris et l'humeur aqueuse. Le cristallin et le corps ciliaire délimitent le segment antérieur du segment postérieur. Ce dernier est composé de l'humeur vitrée, de la rétine, de la choroïde et de la sclère (**Figure 1**). Lors de la détection d'une image par les yeux, un flux lumineux va alors traverser les différentes couches tissulaires dans un ordre précis; passant par la cornée, l'humeur aqueuse le cristallin et l'humeur vitrée pour se rendre vers la rétine. Le signal visuel est alors acheminé par le nerf optique pour être transmis au cerveau. Ainsi, l'image traitée par l'organisme permet la perception visuelle de son environnement (Martemyanov and Sampath 2017)



**Figure 1.** Schéma de la structure de l'œil



## **2. L'humeur vitrée**

L'œil est caractérisé par sa forme ronde et globulaire. Cette forme est maintenue par une substance liquide et gélatineuse appelée l'humeur vitrée ou corps vitré. Celle-ci est transparente pour permettre la transmission de la lumière et se retrouve en contact direct avec la rétine. L'humeur vitrée occupe 80 % du volume de l'œil (J.Sebag 1998). Puisque le corps vitré est un fluide corporel, il se compose principalement d'eau soit à près de 99 % (Bishop 1996). Sa nature sous forme de gel visqueux est due à la présence d'un réseau de fibres de collagène (Hikichi, Akiba et al. 1997, de Smet, Gad Elkareem et al. 2013). Le collagène de type II est le plus abondant du corps vitré. La fonction principale du collagène est d'apporter une force mécanique absorbant le choc à la suite d'un coup reçu par l'œil (Bishop 1996). Outre le collagène, d'autres macromolécules sont également présentes dans l'humeur vitrée, dont le hyaluronan (Sebag and Balazs 1989). Ce dernier interagit avec les fibres de collagène ce qui permet de limiter la diffusion de la lumière et d'assurer la transparence de ce fluide qui est important pour la clarté de la vision (Bishop 1996).

Une autre caractéristique du corps vitré est le fait qu'il est dépourvu de cellules mise à part une faible concentration de cellules hyalocytes. Ces cellules se retrouvent principalement dans la partie postérieure de l'oeil (de Smet, Gad Elkareem et al. 2013). Ce sont des cellules de type macrophage pouvant exercer la phagocytose et ayant un rôle dans l'inflammation (Grabner, Boltz et al. 1980, Sakamoto and Ishibashi 2011). Les hyalocytes participent à la synthèse de la matrice extracellulaire et sont, en plus, impliquées dans la production des molécules de l'humeur vitrée tels le collagène et le hyaluronan (Sakamoto and Ishibashi 2011). Pendant le vieillissement, l'humeur vitrée subit des modifications de sa composition et de sa structure. Ces changements du mènent à la liquéfaction du corps vitré et à la formation d'agrégats. Ces phénomènes, fortement associés au vieillissement, contribuent au développement de pathologies oculaires (Bishop, Holmes et al. 2004).

## **3. Tissus postérieurs de l'œil**

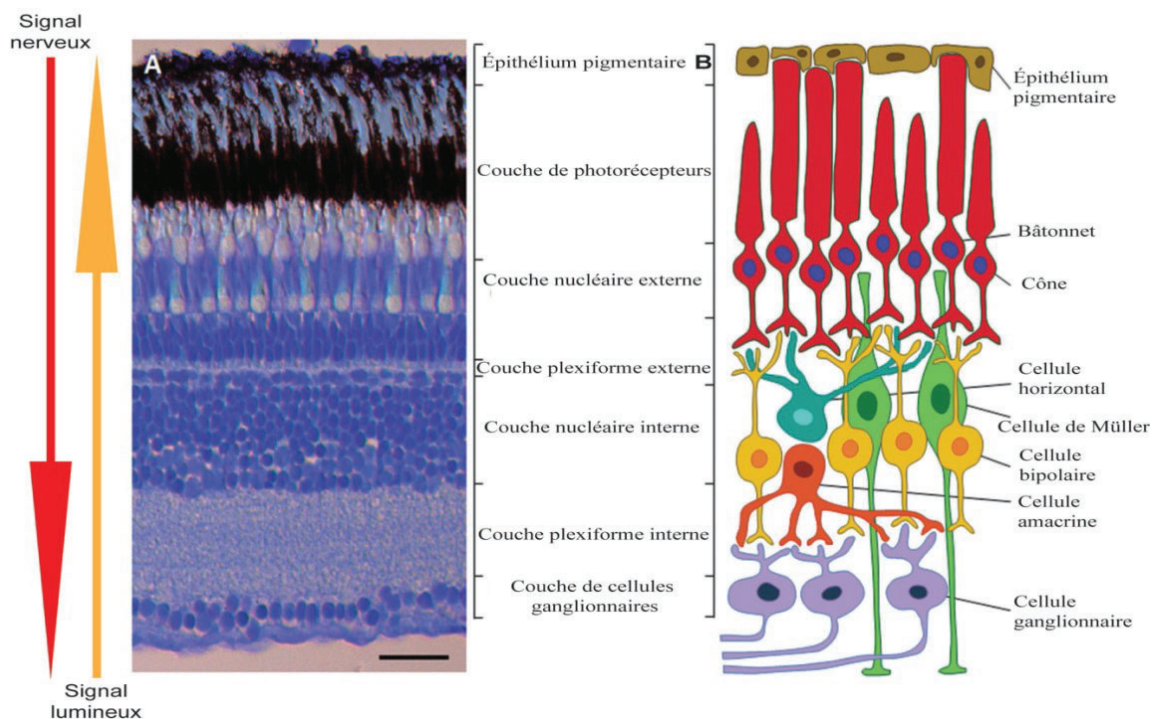
L'œil a une composition tissulaire complexe puisqu'elle comprend un réseau interconnecté de cellules nerveuses, vasculaires et immunitaires toutes importantes dans le fonctionnement de la vision. Les tissus postérieurs de l'œil comprennent la choroïde, l'épithélium pigmentaire et la rétine. La couche vasculaire est composée de la choroïde (réseau vasculaire externe) qui avoisine l'épithélium pigmentaire qui, lui, est formé de cellules épithéliales pigmentées (**ÉP**) (Hoon, Okawa et al. 2014). La rétine constitue la couche nerveuse (interne) où se retrouvent les photorécepteurs. Elle se spécialise dans la transformation du signal lumineux à un signal neurologique qui sera interprété par le cerveau. Ce phénomène biologique permettant la vue est un des plus énergivores de l'organisme (Wong-Riley 2010). Cet apport énergétique est, en grande partie, fourni par la choroïde qui assure ainsi le bon fonctionnement de la rétine et de la vision.

#### a) **La rétine**

La structure de la rétine a été largement étudiée et la récente apparition d'imageries oculaires sophistiquées a permis de mieux la caractériser. Ce tissu neuronal est orchestré par une organisation cellulaire complexe (Brown and Masland 2001). Le tissu rétinien est divisé en trois couches cellulaires. Tout d'abord, **la couche externe** contient les photorécepteurs. Les noyaux des photorécepteurs sont localisés plus précisément dans la couche nucléaire externe et les cellules horizontales sont situées dans la couche plexiforme externe. Ensuite, **la couche interne** comprend la couche nucléaire interne, composée de cellules bipolaires, et la couche interne plexiforme, composée de cellules amacrines. Finalement, la troisième couche la plus interne de la rétine est **la couche de cellules ganglionnaires (Figure 2A)**.

On peut compter des millions de neurones dans la rétine qui sont classés en cinq types différents (de l'extérieur vers l'intérieur de l'œil): les photorécepteurs, les cellules horizontales, les cellules bipolaires, les cellules amacrines et les cellules ganglionnaires de la rétine (**Figure 2B**) (Ramón y Cajal 1972). Deux types de photorécepteurs sont présents: les cônes et les bâtonnets. Les bâtonnets sont très abondants, puisque la rétine en possède plus de 100 millions. Ils sont responsables de la vision périphérique et nocturne. Les cônes sont plutôt responsables de la vision centrale et ont pour fonction la visualisation des détails et des couleurs (Masland 2012). Ils sont présents en forte concentration dans une zone en cavité de la

rétine appelée : la *macula*. Celle-ci permet la vision centrale présente chez les primates, dont l'humain, mais est absente chez certains mammifères comme les rongeurs (rats, souris) (Zeiss 2010). Lorsque le signal lumineux est capté par les photorécepteurs, ceux-ci le transmettent aux cellules bipolaires et ensuite aux cellules ganglionnaires. Les cellules horizontales et amacrines affinent la vision en agissant sur les cellules bipolaires et ganglionnaires. Ce sont finalement les cellules ganglionnaires qui transmettent le signal vers le cerveau par leurs axones composant le nerf optique. Ainsi, l'image est analysée et permet à l'organisme de prendre une décision en fonction de ce qu'il voit (Kolb 1997).



**Figure 2.** Schéma des couches cellulaires de la rétine (adapté de (Gramage, Li et al. 2014), figure 1)

En plus de l'important nombre de cellules neuronales contenues dans la rétine, d'autres types cellulaires y sont présents. D'une abondance plutôt limitée, ces cellules sont, néanmoins, indispensables au bon fonctionnement de la rétine. Par exemple, on retrouve des cellules gliales, tels les microglies, les astrocytes et les cellules de Müller. Les microglies sont des cellules dérivées des cellules immunitaires sanguines qui résident dans la rétine. Les cellules de Müller sont des cellules gliales qui assurent l'homéostasie neuronale de la rétine, alors que les astrocytes ont un rôle dans la stabilisation de l'intégrité vasculaire. On retrouve, en plus, les

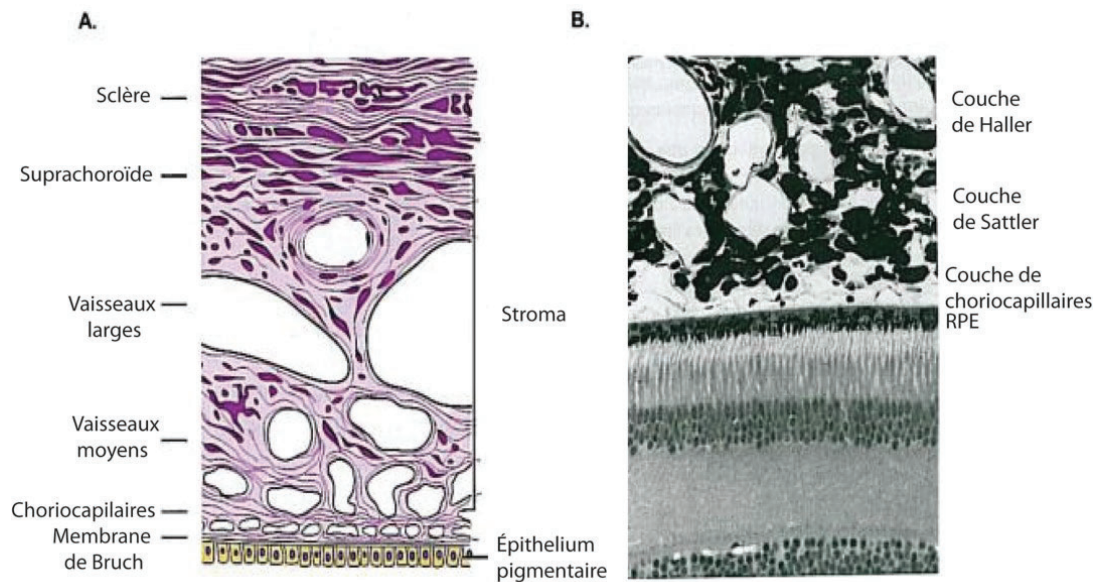
cellules vasculaires, dont les péricytes, les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales qui composent les vaisseaux sanguins rétiniens. La complexité de la composition cellulaire de la rétine démontre bien la richesse de ce tissu (Ramón y Cajal 1972, Kolb 1997).

### **b) L'épithélium pigmenté de la rétine (ÉPR) et la choroïde**

Les cellules épithéliales pigmentées (ÉP) sont situées dans la couche externe de la rétine et positionnées en monocouches de façon contiguë avec les photorécepteurs (**Figure 2A**). Elles se retrouvent avoisinant la membrane de Bruch et celle-ci assure la séparation des ÉP de la choroïde. Les cellules ÉP sont attachées entre elles par des jonctions serrées et constituent ainsi la barrière hématorétinienne externe (Peyman and Bok 1972, Bok 1993). Elles possèdent plusieurs fonctions importantes, dont la régulation du transport des nutriments provenant de la circulation sanguine de la choroïde vers les photorécepteurs. Elles ont, en plus, un rôle très important de protection de la rétine contre l'oxydation en absorbant l'énergie excédentaire provenant de la lumière. Les cellules ÉP agissent aussi sur le cycle de la vision en assurant le maintien de l'excitabilité des photorécepteurs. Elles préservent l'intégrité cellulaire des photorécepteurs en phagocytant et recyclant des nutriments ou déchets provenant du segment externe de la rétine. Finalement, elles agissent aussi sur la stabilité du réseau vasculaire à l'aide de la sécrétion de facteurs de croissance (Strauss 2005). Les ÉP exercent donc un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie tissulaire de la rétine.

Du côté externe de la membrane de Bruch se situe la choroïde, un réseau vasculaire complexe contenant plusieurs catégories de vaisseaux sanguins tels des capillaires, des artérioles et veinules. Elle est séparée de l'épithélium pigmentaire rétinien par la membrane de Bruch qui sert de barrière protectrice en contrôlant le passage moléculaire entre la choroïde et la rétine (**Figure 3A**) (Kaur, Foulds et al. 2008). La choroïde est composée de 4 couches. Dans la première couche, la plus profonde, se trouve la membrane de Bruch suivie par la lame choroïdo-capillaire. Ensuite, les couches de Sattler et de Haller (aussi appelée stroma) servent de soutien aux couches des vaisseaux moyens et larges. Finalement, la couche la plus externe de la choroïde, se trouvant près de la sclère, est la suprachoroïde (**Figure 3**) (Nickla and Wallman 2010).

La composition cellulaire de la choroïde inclue principalement des cellules de types vasculaires : des cellules endothéliales (CE), des cellules murales, des cellules musculaires lisses (CML), présentes dans les vaisseaux plus larges, ainsi que des péricytes (PC) dans les microvaisseaux (Saint-Geniez and D'Amore 2004). En plus des vaisseaux, la choroïde se compose aussi de cellules structurales (fibroblastes), immunitaires, neuronales et pigmentaires (mélanocytes). Les cellules neuronales présentes dans la choroïde sont connectées aux CML qui ont pour fonction de réguler la vasoconstriction et la vasodilatation des artères de la choroïde pénétrant la partie stromale (**Figure 3A**). Cette dernière forme la couche structurale extravasculaire contenant une forte quantité de collagène qui forme un tissu plus rigide et structurel pour l'œil (Nickla and Wallman 2010).



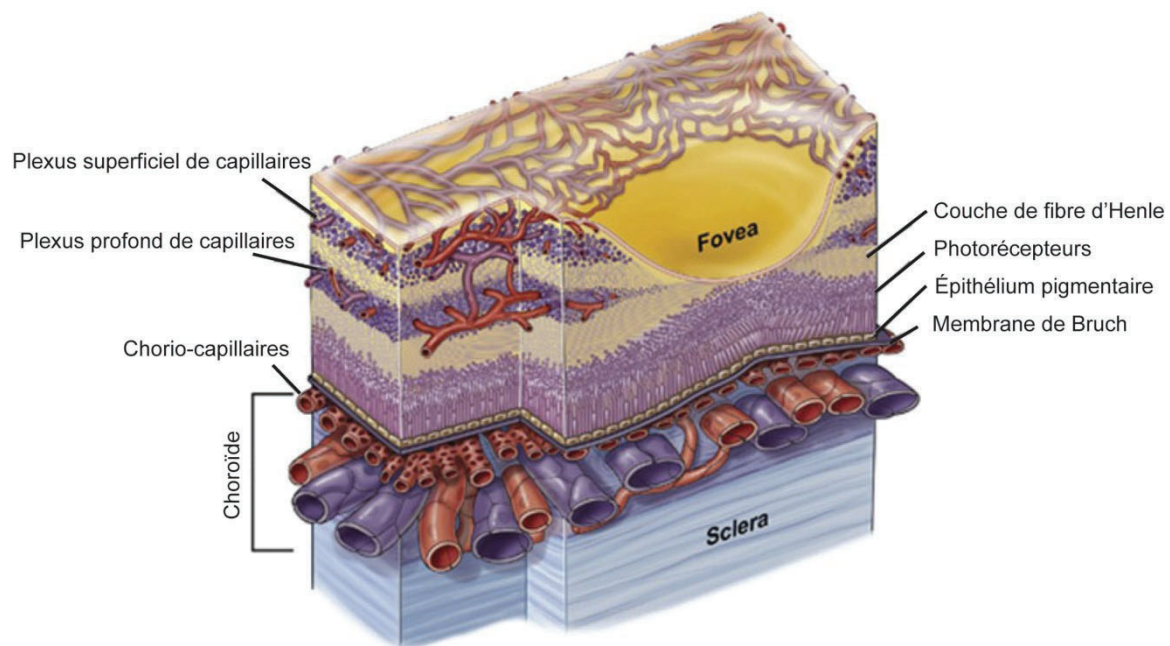
**Figure 3.** Schéma de l'organisation tissulaire de la choroïde (adapté de (Mitchell 2011), figure 2)

Avec plus d'un siècle d'étude, il est bien connu la principale fonction de la choroïde est de subvenir aux besoins énergétiques de la rétine et d'assurer l'élimination de ses débris cellulaires. Cependant, d'autres fonctions ont été attribuées à la choroïde, comme la thermorégulation et la sécrétion de facteurs de croissance (Wallman, Wildsoet et al. 1995, Sobrin and Seddon 2013). L'importance de la choroïde est loin d'être négligeable car la

déstabilisation de l'apport nutritif à la rétine peut avoir des conséquences nocives sur le fonctionnement de l'œil et de la vision. De même qu'au niveau du drainage tissulaire, l'accumulation de déchets cellulaires peut affecter la stabilité de la membrane de Bruch et peut favoriser le développement de pathologies telle la DMLA (Nickla and Wallman 2010).

#### 4. La vascularisation de la rétine

Lors du développement de l'œil, la structure vasculaire prend place très tôt au cours du stade embryonnaire. Celle-ci sera modifiée tout au long de l'embryogenèse jusqu'à la naissance. Certains vaisseaux disparaîtront et d'autres se formeront. Chez l'humain, le réseau vasculaire de la rétine émerge du disque optique, puis se développe vers les périphéries pour atteindre la maturité à la naissance. Chez d'autres mammifères comme la souris, la maturation se complète seulement après la naissance (Connolly, Hores et al. 1988). Finalement, il en résulte deux principaux réseaux vasculaires indépendants : le réseau vasculaire interne de la rétine et le réseau externe (la choroïde).



**Figure 4.** Schéma des réseaux vasculaires de la rétine (adapté de Newman 2013)

La rétine est un tissu comportant des zones avasculaires et un réseau vasculaire interne comprenant deux différents plexus de capillaires situés à la couche interne ganglionnaire (**Figure 4**). Ces capillaires sont principalement formés de CE fortement associées entre elles par des jonctions cellulaires. Les CE interagissent aussi avec les cellules de Müller, les astrocytes et les péricytes, ce qui permet de favoriser l'intégrité vasculaire. Avec la matrice extracellulaire, les CE forment la barrière hématorétinienne (BHR) qui permet un contrôle des molécules qui peuvent migrer vers le tissu en fonction de ses besoins. La BHR est séparée en deux niveaux : la BHR interne (BHRi) et externe (BHRe). La BHRi est située au niveau des capillaires de la couche ganglionnaire, alors que la BHRe est située au niveau de la choroïde (Saint-Geniez and D'Amore 2004). Au niveau de la BHRi, les CE retrouvées dans les capillaires de la rétine n'ont pas de fenestration. Cette particularité permet de restreindre davantage la pénétration des molécules dans le tissu, assurant ainsi sa fonction de barrière.

D'autre part, le réseau vasculaire externe (ou plexus vasculaire choroïdien) prend naissance très tôt pendant le développement de l'œil et devient le principal apport de nutriments vers le tissu nerveux rétinien. Le réseau de capillaires juxtaposé à la membrane de Bruch constitue la couche choroïdo-capillaire. La plus forte densité de capillaires se retrouve au centre de la macula; une zone appelée la *fovéa* (Saint-Geniez and D'Amore 2004). Ces capillaires sont formés de CE associées entre elles par des jonctions cellulaires. De la même façon que la membrane hématorétinienne, la BHRe permet la séparation entre les cellules ÉP et la choroïde. De plus, l'association des cellules ÉP à la membrane de Bruch favorise l'efficacité de la BHRe (Williams and Rizzolo 1997) ainsi qu'un apport suffisant en nutriments et en oxygène requis au bon fonctionnement du tissu rétinien.

Les réseaux vasculaires de la rétine ont fait l'objet d'une panoplie d'études puisqu'ils sont d'une importance cruciale pour s'assurer du bon fonctionnement de ce tissu. La déstabilisation de l'homéostasie vasculaire conduit vers plusieurs pathologies oculaires telles : la rétinopathie du prématuré, les rétinopathies du diabète et la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). Cette dernière sera abordée plus en détail dans des sections ultérieures,

puisqu'elle est au centre de l'étude réalisée dans cette thèse. Pour être en mesure de bien comprendre cette pathologie oculaire, nous allons d'abord discuter de la formation et la structure des vaisseaux sanguins de l'organisme.

## **II. Formation et structure des vaisseaux sanguins**

L'irrigation vasculaire des tissus est indispensable au développement et au bon fonctionnement de l'organisme. La formation des vaisseaux sanguins se fait par différents mécanismes tels la vasculo-genèse et l'angiogenèse. La vasculo-genèse prend place principalement pendant le développement. Lors de l'embryogenèse, la formation des vaisseaux se produit par vasculo-genèse c'est-à-dire à partir d'une cellule primitive vasculaire ou hémangioblaste. Ce phénomène débute par l'agrégation de ces cellules qui conduit vers la naissance d'une structure tubulaire constituant le nouveau vaisseau sanguin fonctionnel (Swift and Weinstein 2009, Chung and Ferrara 2011). Une fois l'organisme formé, la croissance des vaisseaux sanguins fait appel à un autre phénomène physiologique : l'angiogenèse. Contrairement à la vasculo-genèse, l'angiogenèse ne se produit pas à partir de cellules primitives, mais à partir de vaisseaux préexistants (Wallman, Wildsoet et al. 1995, Risau 1997, Swift and Weinstein 2009). Pour se faire, une série de mécanismes cellulaires et moléculaires participera à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. L'angiogenèse sera décrite plus en détail dans une prochaine partie.

### **1. Structure des vaisseaux sanguins**

Les vaisseaux sanguins sont des structures tubulaires formées de CE, de péricytes, de cellules musculaires lisses, de collagène et de tissu conjonctif. Les cellules musculaires lisses sont principalement retrouvées au niveau des artères. Ces cellules contrôlent la vasoconstriction et vasodilatation. Les péricytes sont plutôt retrouvés dans les capillaires associés aux CE. Ces dernières forment la couche interne des vaisseaux sanguins de l'organisme (Potente and Makinen 2017). Elles sont en contact direct avec la circulation et constituent l'endothélium vasculaire. Même si on observe une certaine hétérogénéité cellulaire des CE en fonction du type



de vaisseaux sanguins ou du tissu où le vaisseau sanguin se situe (Chi, Chang et al. 2003), les CE ont des rôles communs tel le contrôle du passage des molécules en circulation vers le tissu. En effet, les CE sont associées entre elles par des molécules de jonctions cellulaires permettant d'ajuster la perméabilité vasculaire selon les besoins du tissu.

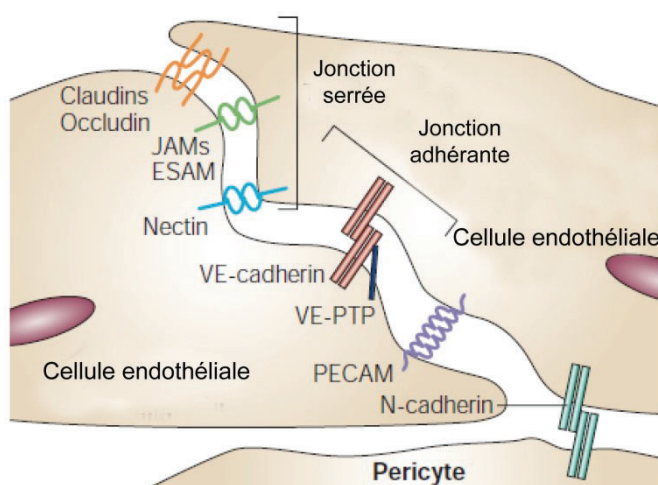
#### a) Endothélium vasculaire

L'endothélium vasculaire exerce plusieurs fonctions aussi importantes les unes que les autres (Aird 2006). En contact direct avec la circulation sanguine, l'endothélium a un rôle endocrinien des plus importants. Effectivement, il est responsable de la sécrétion d'hormones ou molécules solubles, selon les besoins du tissu. Constituant l'interface entre le sang et le tissu, les CE sont les plus sensibles aux variations de la composition et de la pression du sang. Ces cellules agissent en première ligne en réponse aux différents stress vasculaires (Potente and Makinen 2017). Par exemple, les CE expriment des molécules de surface agissant en tant que détecteur des changements de leur environnement. Effectivement, les perturbations dans les niveaux d'oxygène, d'oxyde nitrique (**NO**) et de molécules réactives d'oxygène vont influencer l'action des CE. L'endothélium a aussi pour rôle le maintien de la pression sanguine en contrôlant la vasodilatation par la sécrétion de molécules comme le NO ou la prostacycline (**PGI<sub>2</sub>**) et la vasoconstriction en sécrétant l'angiotensine II, des prostaglandines, le facteur d'activation plaquettaire (**PAF**) et l'endothélin-1 (**ET-1**) (Pearson 2000, Wagner, Christ et al. 1992). En plus d'agir sur la pression sanguine, le NO et le PGI<sub>2</sub> ont aussi un effet sur la coagulation sanguine en prévenant l'agrégation des plaquettes (Cines, Pollak et al. 1998, Pearson 1999). L'endothélium participe aussi à la fibrinolyse en relâchant un activateur de plasminogène de type cellulaire (t-PA) et l'urokinase (Emeis, Hoekzema et al. 1995). D'autre part, les CE sécrètent des facteurs de croissance vasculaire tel le **VEGF** (Vascular Endothelium Growth Facteur) initialement connu pour sa capacité à déstabiliser les jonctions cellulaires des CE et à augmenter la perméabilité vasculaire (Ferrara 1999). La sécrétion de VEGF active également la prolifération des CE et permet l'induction de la formation de néo vaisseaux à la suite des signaux hypoxiques produits par les tissus. L'augmentation de la perméabilité vasculaire par la perte de jonction laisse passer différentes molécules contribuant à l'activation

de l'angiogenèse pathologique. En conséquence, l'équilibre de l'endothélium vasculaire est fortement lié à son propre rôle de maintien de l'homéostasie vasculaire.

## b) Jonctions cellulaires et perméabilité vasculaire

Le déplacement des fluides et des molécules du sang vers les tissus est primordial pour permettre une nutrition et un drainage adéquat des tissus. Dans le but de maintenir l'intégrité fonctionnelle de la rétine, une régulation précise de la perméabilité vasculaire est indispensable pour assurer la santé oculaire et une bonne vision. Pour assurer le contrôle strict des mouvements moléculaires vers les tissus, des jonctions serrées (JS) sont présentes entre les CE des capillaires. En effet, les CE expriment à leur surface des protéines transmembranaires d'adhésion, incluant les occludines, claudines et les molécules d'adhésion jonctionnelle (JAM) (Morita, Sasaki et al. 1999) (Figure 5).



**Figure 5.** Représentation des jonctions des cellules endothéliales (adapté de (Dejana 2004), figure 1a)

En plus de JS, les CE possèdent aussi des jonctions adhérentes (JA) impliquant d'autres molécules d'adhésion : les cadhérines. Celles-ci sont des glycoprotéines membranaires qui sont impliquées dans l'adhésion cellule-cellule et dépendent de la présence d'ions calcium ( $Ca^{2+}$ )

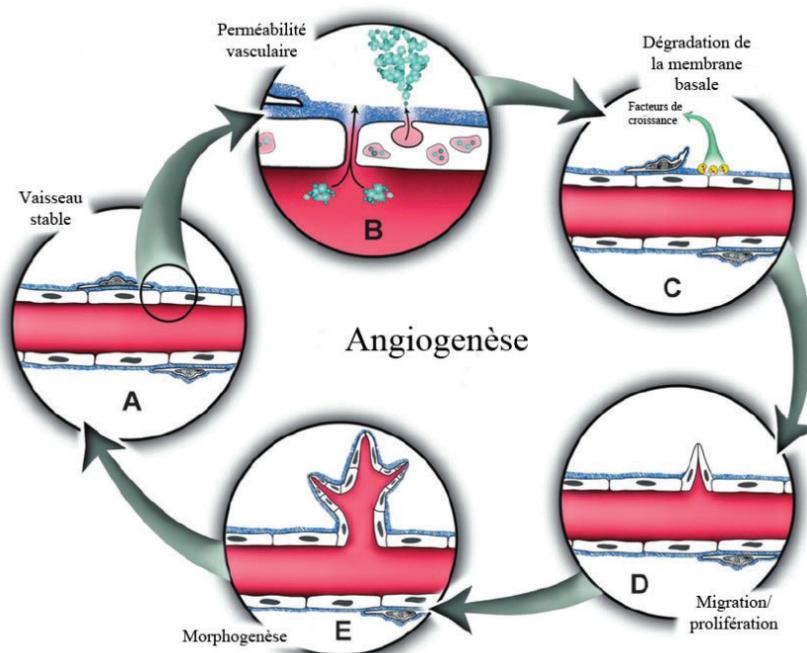
(Takeichi 1991). Elles sont ancrées dans le cytoplasme par associations avec les caténines; des protéines cytoplasmiques liées aux microfilaments d'actine (**Figure 5**) (Dejana 1996). Les cadhérines sont divisées en sous-classes et sont généralement spécifiques au type cellulaire où elles se localisent (cellules épithéliales, neuronales ou endothéliales). On retrouve les VE-cadhérine (Vascular Endotheliales-Cadherin) à la surface membranaire des CE, alors que les cellules neuronales exprimeront à leur surface des N-Cadherin (Neuronal Cadherin) et les cellules épithéliales des E-Cadherin. Les différentes cadhérines ont un domaine intracellulaire commun qui est conservé entre les sous-classes (Takeichi 1991, Dejana 2004). La régulation des JA des CE passe par la présence de facteurs de croissance dans le milieu extracellulaire. L'exemple le mieux étudié est celui du VEGF qui a la capacité d'activer la protéine tyrosine kinase Src. Cette dernière phosphoryle ensuite la tyrosine Y685 des VE-cadhérines, provoquant ainsi leur dissociation avec les protéines  $\beta$ -caténines et conduisant à la déstabilisation des JA (Gavard and Gutkind 2006). D'un point de vue physiologique, les JA des CE sont non seulement importantes pour la régulation de la perméabilité vasculaire, mais possèdent aussi plusieurs rôles favorisant l'homéostasie vasculaire. Ces protéines peuvent, entre autres, induire une signalisation intracellulaire selon les signaux externes. Certaines protéines des JA comme la  $\beta$ -caténines et la plakoglobine peuvent être internalisées pour se translocaliser vers le noyau et agir en tant que facteur de transcription (Ben-Ze'ev and Geiger 1998). Puisque ces protéines transmembranaires sont associées aux microfilaments d'actine, elles agissent sur le remodelage du cytosquelette et par conséquent sur la forme des cellules (Dudek and Garcia 2001, Dejana 2004).

La variabilité du type, de la morphologie et de la localisation des jonctions d'adhérence cellulaire sont finement régulées selon les besoins du tissu. On observe, en plus, une certaine plasticité de ces jonctions ce qui permet un ajustement de la perméabilité vasculaire. L'augmentation de la perméabilité vasculaire permet, dans un contexte physiologique, de réguler le passage des leucocytes de la circulation vers les tissus en augmentant l'espace intercellulaire. Lors d'un contexte vasculaire pathologique, plusieurs stress chroniques peuvent affecter l'intégrité des CE. Il en résultera alors d'une perméabilité soutenue qui est caractéristique des vaisseaux pathologiques que l'on retrouve dans les maladies oculaires

vasculaires. Par conséquent, la présence de perméabilité vasculaire corrèle avec la sévérité des symptômes de perte de vision.

## 2. L'angiogenèse

L'angiogenèse est un phénomène indispensable dans les tissus sains adultes pour permettre la cicatrisation, la croissance des cheveux et le cycle menstruel (Ruitter, Schlingemann et al. 1993, Ferrara, Chen et al. 1998, Yano, Brown et al. 2001, Chung and Ferrara 2011) . L'angiogenèse se produit en cinq principales étapes : la déstabilisation des jonctions, la dégradation de la membrane basale, la protrusion (migration et prolifération), l'élongation (morphogenèse) et la maturation (stabilisation du vaisseau) (**Figure 6**). Lors d'une agression tissulaire, qu'elle soit causée par de l'ischémie, de l'inflammation ou lors de présence de cellules tumorales, des signaux proangiogéniques sont relâchés. Il y a alors une augmentation de l'expression et de la sécrétion de VEGF, des FGF, de NO, de l'ANG-2 et de chémokines. L'initiation de l'angiogenèse se produit lorsque ces facteurs sont en quantité suffisante pour provoquer le détachement des péricytes, le remodelage morphologique des CE et la déstabilisation de leurs jonctions d'adhérence intercellulaires (Carmeliet and Jain 2011, Potente, Gerhardt et al. 2011). En conséquence, il y a une augmentation de la perméabilité vasculaire (**Figure 6B**) ce qui provoque ensuite la dégradation de la matrice extracellulaire (**Figure 6C**) par l'action de métalloprotéinases matricielles (**MMPs**) (Klagsbrun and Moses 1999). Cette dégradation matricielle est importante puisqu'elle permet de passer à l'étape suivante de l'angiogenèse : la protrusion (**Figure 6D**). Celle-ci consiste dans la migration et la prolifération cellulaire des EC responsables de l'initiation de la formation du nouveau vaisseau sanguin. Ensuite, il y a une élongation du vaisseau (**Figure 6E**) qui se produit en direction des gradients de facteurs proangiogéniques et chimioattractant tel le VEGF. Lorsque le nouveau vaisseau est complètement formé, il y a attachement des péricytes et rétablissement de la membrane basale. Finalement, le résultat de l'angiogenèse est un vaisseau sanguin stable et mature (**Figure 6A**).

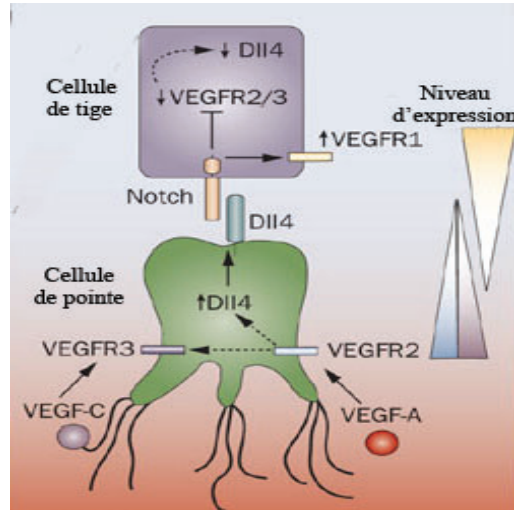


**Figure 6.** Schématisation des étapes de l'angiogenèse A) Vaisseau stable, B) Déstabilisation des jonctions, C) Dégradation de la membrane basale, D) Protrusion et E) Élongation (adapté de Bryan Cell Mol Life Sci. 2007, figure 1)

Une des voies de signalisation des plus connue pour être impliquée dans l'angiogenèse est la voie de NOTCH. Celle-ci, hautement conservée des nématodes aux vertébrés, est bien décrite pour son rôle important dans la différenciation cellulaire (Artavanis-Tsakonas, Rand et al. 1999). Chez les mammifères, on compte 4 différents récepteurs de NOTCH (NOTCH1-4) qui possèdent tous un domaine extracellulaire, transmembranaire et intracellulaire (Mizutani, Taniguchi et al. 2001). Le récepteur NOTCH interagit avec un de ses cinq ligands JAGGED 1 et 2 (**JAG**) et Delta-like 1-3 et 4 (**DLL**), par leur domaine extracellulaire (Kume 2009). JAG et DLL sont aussi des protéines membranaires qui sont connues pour avoir des effets opposés à la suite de leur liaison avec NOTCH. Effectivement, DLL-4 a un effet négatif sur l'angiogenèse alors que JAG-1 a un effet proangiogénique sur les vaisseaux de la rétine (Lobov, Renard et al. 2007, Benedito, Roca et al. 2009).

Cette voie de signalisation est l'exemple parfait démontrant la plasticité fonctionnelle des CE. L'activation de NOTCH après sa liaison avec un de ses ligands exprimés en surface d'une cellule avoisinante provoque une différenciation cellulaire. En fonction du ligand lié à

NOTCH, soit JAG-1 ou DLL-4, la CE se différenciera soit en cellule de pointe ou de tige respectivement. Les CE changeront de conformation pour permettre à une CE de pointe de migrer vers le gradient de VEGF. Les cellules de pointe sont caractérisées par la présence de filopodes servant de capteur pour la migration cellulaire en direction des facteurs proangiogéniques. La cellule de pointe n'exprime pas le même ligand de NOTCH que la cellule de tige voisine (Potente, Gerhardt et al. 2011). En effet, les cellules de pointe sont soumises à une forte concentration de VEGF qui induit la production de DLL-4. Celui-ci s'associera au récepteur NOTCH1 d'une cellule de tige voisine assurant le maintien du phénotype et favorisant l'expression de JAG-1 de cette dernière. Exprimé en surface des cellules de tige, JAG-1 se lie avec le récepteur NOTCH membranaire d'une cellule de pointe voisine et favorise la préservation du phénotype celle-ci qui poursuit sa migration vers les facteurs de croissance (Carmeliet, De Smet et al. 2009, De Smet, Segura et al. 2009) et **Figure 7**). La différenciation des CE en cellule de tête ou de tige induite par NOTCH influence aussi l'expression membranaire des récepteurs du VEGF (**VEGFR**). Effectivement, les cellules de tête exprimeront les récepteurs VEGFR2/3 alors que les cellules tige le VEGFR1. Pendant la migration des CE de tête, les CE de la tige prolifèrent et s'assemblent en forme de tube. Le vaisseau sanguin naissant croîtra et se ramifiera pour rétablir l'irrigation du tissu. Le bon déroulement de l'angiogenèse est donc fortement lié à la signalisation par la voie Notch. En context physiologique, des facteurs inhibiteurs de l'angiogenèse vont mettre fin à la croissance vasculaire et assurer la maturation du vaisseau. Par contre, dans un contexte pathologique, les facteurs pro-angiogéniques sont sécrétés de façon continue et désorganisée. Ils peuvent ainsi provoquer une instabilité vasculaire menant vers un état pathologique.



**Figure 7.** Schématisation de la différenciation cellulaire par la voie Notch (adapté de (Carmeliet, De Smet et al. 2009), figure 4)

### 3. Facteurs de croissance

Pour permettre un contrôle strict du déroulement de l'angiogenèse, l'expression de facteurs de croissance et de leurs récepteurs se doit d'être régulée précisément. Le VEGF est l'exemple le plus commun et sera discuté plus en détail à la prochaine section. En bref, il agit dans l'initiation de l'angiogenèse en déstabilisant les jonctions vasculaires, assurant la prolifération et la migration cellulaire. D'autres facteurs de croissance sont tout aussi importants; dont le facteur de croissance des fibroblastes (**FGF**), le facteur de croissance transformant bêta (**TGF- $\beta$** ), le facteur de croissance dérivé des plaquettes (**PDGF**) et le facteur de croissance analogue à l'insuline (**IGF**) (Klagsbrun and Moses 1999, Carmeliet and Jain 2011). Le FGF est le premier facteur de croissance décrit pour activer l'angiogenèse. Les CE sécrètent plus spécifiquement le FGF $\beta$ . Il favorise la migration, la prolifération et la formation de tubules des CE (Beenken and Mohammadi 2009). Le TGF- $\beta$  favorise la maturation des vaisseaux en participant à la prolifération, la migration des cellules murales et en participant à la reformation de la matrice extracellulaire (Pardali, Goumans et al. 2010). Le PDGF intervient quant à lui lors de la maturation des vaisseaux en stimulant le recrutement des péricytes (Lindahl, Johansson et al. 1997, Hellberg, Ostman et al. 2010).

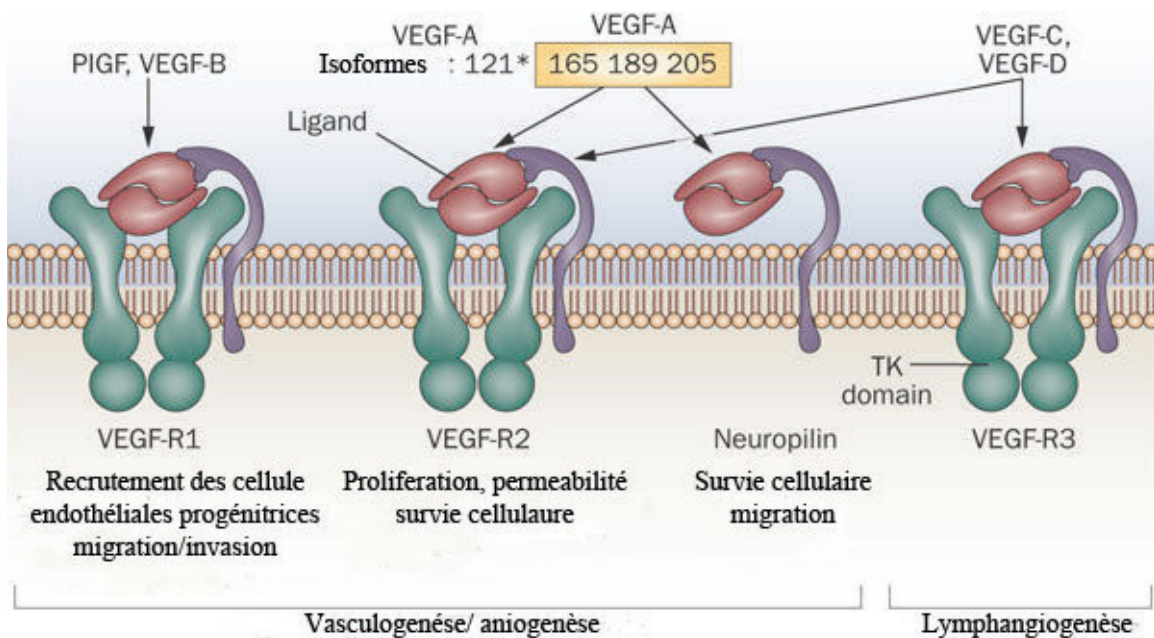
La régulation de l'angiogenèse inclue également l'expression de facteurs anti-angiogéniques. Généralement, ces facteurs sont des fragments protéiques qui proviennent du clivage de protéines comme l'angiostatine (fragment du plasminogène), l'endostatine (issue du collagène XVIII), les activateurs/inhibiteurs de plasminogène (**PAIs** : *plasminogen activator inhibitors*) et les inhibiteurs des métalloprotéases tissulaires (**TIMP**: *tissue inhibitors of metalloproteinases*) (Senger, Galli et al. 1983, O'Reilly, Holmgren et al. 1994, Klagsbrun and Moses 1999). Ces régulateurs négatifs sont cruciaux puisqu'ils freinent l'angiogenèse et évitent une hyper vascularisation et une croissance anarchique vasculaire souvent observée lors du développement de maladies vasculaires et de tumeurs. En effet, dans le cas des cellules tumorales, on observe même une inhibition de facteurs anti-angiogéniques permettant ainsi la croissance soutenue de la vascularisation et assurant l'irrigation de la tumeur en expansion. L'angiogenèse saine résulte donc d'une étroite régulation des facteurs pro-angiogénique et anti-angiogéniques.

#### a) Le VEGF

Depuis sa découverte dans les années 80 par le docteur Senger et ses collaborateurs (Senger, Galli et al. 1983), le VEGF est un facteur de croissance des plus étudié. Son rôle dans l'angiogenèse a été largement discuté et revu (Klagsbrun and D'Amore 1996, Ferrara 1999, Neufeld, Cohen et al. 1999). Puisque son implication dans l'équilibre vasculaire est indéniable, sa dérégulation est associée autant à des malformations au niveau du développement qu'à la pathogenèse d'un nombre important de maladies. La famille du VEGF compte sept membres : le VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD, VEGFE, VEGFF et le PIGF (*Placenta growth factor*) (Ferrara 1999, Ferrara 2001, Olsson, Dimberg et al. 2006, Ribatti 2008) (**Figure 8**). Le VEGFA est le régulateur principal de l'angiogenèse physiologique et pathologique. Cinq isoformes du VEGFA de 121, 145, 165, 189 et 206 acides aminés peuvent résulter de l'épissage alternatif de l'ARNm du VEGFA (Houck, Ferrara et al. 1991, Tischer, Mitchell et al. 1991, Harper and Bates 2008). Les isoformes du VEGFA sont généralement actives sous forme d'homodimère d'environ 45 KDa et ont des actions biologiques en fonction de leur capacité à lier l'héparine et le protéoglycan (Byrne, Bouchier-Hayes et al. 2005). Selon l'isoforme exprimée, le VEGFA se



localisera différemment au niveau cellulaire. Alors que le VEGFA<sub>121</sub> est entièrement sécrété, le VEGFA<sub>165</sub> se retrouve autant dans le milieu extracellulaire qu'associé à la membrane cellulaire et le VEGFA<sub>188</sub> est exprimé exclusivement à la membrane cellulaire (Park, Keller et al. 1993). Comme discuté au préalable, le VEGF agit à plusieurs niveaux sur la régulation de l'angiogenèse. Le VEGFA<sub>165</sub> a une propriété mitogénique sur les CE jusqu'à cent fois supérieure au VEGFA<sub>121</sub> et est considéré comme le plus puissant facteur proangiogénique (Keyt, Nguyen et al. 1996, Papetti and Herman 2002). Le VEGFA<sub>121</sub> est plutôt impliqué dans le développement en régulant la migration des angioblastes (Cleaver and Krieg 1998). Dans la rétine humaine, ce sont principalement les isoformes VEGFA<sub>121</sub> et VEGFA<sub>165</sub>, qui sont exprimées par les cellules ganglionnaires et par les cellules amacrines. Chez la souris, on retrouve des isoformes homologues, le VEGFA<sub>120</sub> et le VEGFA<sub>164</sub> (Shima, Kuroki et al. 1996). D'ailleurs, ce sont également ces formes de VEGF qui sont impliquées dans le développement de maladies oculaires et tumorales (Papetti and Herman 2002).



**Figure 8.** Isoformes et récepteurs du VEGF (adapté de (Grothey and Galanis 2009))

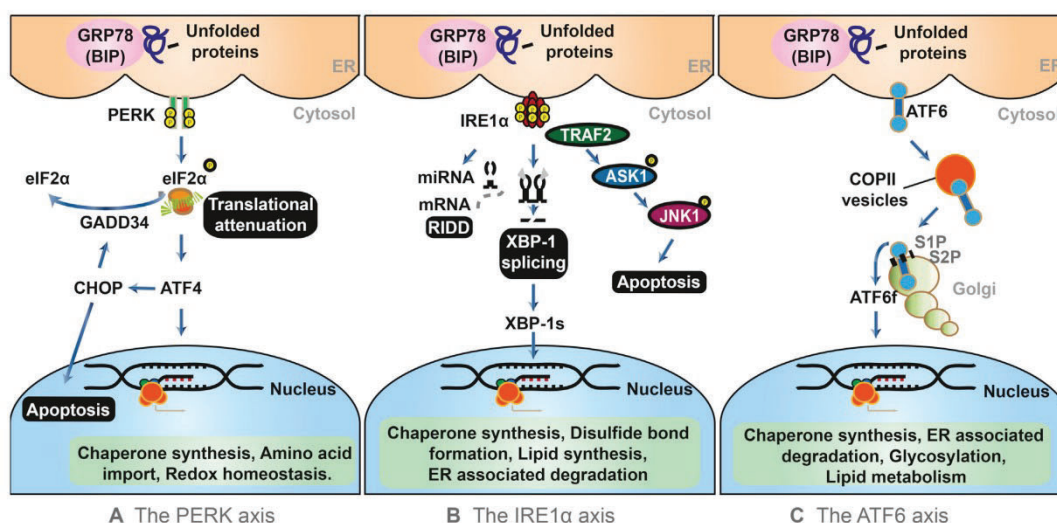
L'expression des isoformes du VEGFA est régulée par un nombre important d'hormones, facteurs de croissance et cytokines. En effet, lorsque différents types cellulaires (des fibroblastes, myoblastes, ostéoblastes ou CE) en cultures sont exposés à l'interleukine-6 $\beta$  (IL-

6β), au PDGF (Platelet-derived Growth Factor), au EGF (Epidermal growth factor), au TGF-β et à la prostaglandine E2, une augmentation de la transcription de son ARNm est observée (Finkenzeller, Marme et al. 1992, Goldman, Kim et al. 1993, Harada, Nagy et al. 1994, Pertovaara, Kaipainen et al. 1994, Cohen, Nahari et al. 1996). D'autres molécules incluant le NO et les esters de phorbol sont aussi responsables de l'augmentation de l'expression du VEGFA (Garrido, Saule et al. 1993, Tudor, Flook et al. 1995). L'hypoxie, qui est le résultat d'une diminution significative d'oxygène dans un tissu, est également un puissant régulateur de l'expression du VEGFA et de ses récepteurs. Plusieurs études ont démontré les mécanismes expliquant l'implication de l'hypoxie dans la transcription du VEGF (Shweiki, Itin et al. 1992, Shima, Deutsch et al. 1995, Semenza 1996, Ramakrishnan, Anand et al. 2014). Le facteur d'induction à l'hypoxie (**HIF1**) est un capteur des niveaux d'oxygène et il se stabilise lorsque la concentration d'oxygène est diminuée. Il agit en tant que facteur de transcription qui s'associe à des séquences d'amplification de transcription près du promoteur du gène cible. Des domaines de reconnaissance d'HIF-1 sont présents dans le gène du VEGF et participent à l'augmentation de ce dernier pendant l'hypoxie (Pugh, Tan et al. 1991, Goldberg and Schneider 1994, Minchenko, Salceda et al. 1994). Un fait surprenant est que même si l'augmentation de VEGF lors de l'hypoxie est clairement démontrée, l'induction de la transcription de l'ARNm se fait de façon négligeable chez les cellules ÉP de la rétine qui sont exposées à un environnement hypoxique. Dans ce cas, il serait plutôt question d'une stabilité prolongée de l'ARNm qui serait la cause de l'augmentation de l'expression protéique du VEGF (Shima, Deutsch et al. 1995). Les études de Shima et de ses collaborateurs ont démontré que la demi-vie de l'ARNm du VEGF passait d'une trentaine de minutes à plusieurs heures (jusqu'à 8h) lorsque les ÉP de la rétine passaient d'un environnement en normoxique vers un environnement hypoxique. Il est d'autant plus intéressant de constater que le prolongement de la demi-vie de l'ARNm est associé à la présence d'une séquence consensus riche en adénine et en uracile (AU), présente dans le 3'UTR de l'ARNm du VEGF, appelée ARE (AU rich element) et caractérisée pour sa participation à la stabilité de l'ARNm (Gingerich, Feige et al. 2004). Ces éléments ARE sont reconnus par les protéines de liaison aux éléments ARE (ARE-PB). Plus récemment, des études ont démontré que des régions riches en cytosine et adénine CA (**CARE**) seraient présentes dans le 3'UTR de l'ARNm du VEGF. Une régulation traductionnelle serait donc exercée par la collaboration de

protéines liant les CARE (CARE-PB) ainsi que par l'action de petits ARN fonctionnels tels les microARN (Jafarifar, Yao et al. 2011).

L'augmentation de l'expression du VEGF par l'hypoxie implique aussi une autre voie bien connue, celle de la réponse au stress du réticulum endoplasmique (**RE**) par la présence de protéines mal repliées (**PMR**). Ces deux voies sont fortement interreliées puisqu'elles entrent en action lors de stress cellulaires dont la diminution en oxygène (Ghosh, Lipson et al. 2010, Maekawa and Inagi 2017). L'étude de Gosh a démontré que, à la suite de conditions hypoxiques, la réponse au stress du RE avait un effet positif sur l'expression de *VEGFA* qui pouvait être médiée par les trois acteurs principaux de cette voie: la protéine kinase *RNA-like ER kinase* (**PERK**), la protéine *Inositol Requiring Enzyme-1  $\alpha$*  (**IRE1 $\alpha$** ) et la protéine *Activating Transcription Factor-6* (**ATF-6**) (Ghosh, Lipson et al. 2010, Binet and Sapieha 2015). Ces protéines sont en fait des capteurs transmembranaires présents dans le réticulum endoplasmique. Elles sont activées par la présence de PMR présentes dans le RE et qui s'associent à la protéine *binding immunoglobulin protein* (**BIP**) aussi appelée, *glucose-regulated protein 78* (**GRP78**) (Bertolotti, Zhang et al. 2000). Cette liaison mène à la dissociation de BIP et active les trois axes de la réponse du stress ER. Le premier axe, la voie PERK, s'active suite à homodimérisation de PERK qui ensuite induit son autophosphorylation. PERK phosphorylera ensuite la protéine *eukaryotic Initiation Factor* (**eIF2**) affectant la traduction protéique globale (Harding, Zhang et al. 1999). Cette phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  favorise alors la transcription de la protéine *Activating Transcription Factor-4* (**ATF4**) (Lu, Harding et al. 2004). Ce facteur de transcription aura ensuite un effet sur l'expression de protéines proapoptotiques (**Figure 9A**). Le second axe de la réponse au stress du RE implique la dissociation de GRP78 (ou **BIP**) avec IRE1 $\alpha$ . Similaire à PERK, IRE1 $\alpha$  se multimérise et s'autophosphoryle. IRE1 $\alpha$  possède une activité sérine/thréonine kinase et un domaine d'endonucléase au C-terminal (Cox, Shamu et al. 1993, Yoshida, Matsui et al. 2001, Lee, Dey et al. 2008). Cette activité d'endonucléase permet à IRE1 $\alpha$  de cliver des ARNm ou même des miARN (Hollien and Weissman 2006, Upton, Wang et al. 2012). Le clivage de l'ARNm du facteur de transcription *X-Box protein 1* (**XBPI**) fait partie d'une des principales réponses à l'activation d'IRE1 $\alpha$  qui participe à la régulation de la synthèse des membranes du RE (Lee, Iwakoshi et al. 2003) favorisant la gestion des PMR et

l'ubiquitination des protéines. Le domaine sérine/thréonine kinase d'IRE1 $\alpha$  participe à l'activation du facteur nucléaire kappa-B (NF $\kappa$ B) menant vers une réponse pro-inflammatoire (Lee, Iwakoshi et al. 2003, Rosenfeld, Brown et al. 2006) (**Figure 9B**). Le dernier axe du stress du RE est celui d'ATF6. Sa dissociation avec GRP78 provoque alors sa translocation vers l'appareil de golgi où il subira des modifications exercées par des protéases. Le principal rôle d'ATF6 est d'assurer une protection contre le stress du RE (**Figure 9C**) (Yamamoto, Takahara et al. 2010).



**Figure 9.** Schématisation des voies de signalisation du stress du réticulum endoplasmique ((Binet and Sapieha 2015), figure 1)

La régulation de l'expression du VEGF dépend donc d'une panoplie de facteurs incluant des cytokines, des hormones et facteurs de croissances et des voies de signalisation reliée à des stress cellulaires comme l'hypoxie et le stress du RE. Cette complexité démontre bien l'importance du contrôle précis de son expression pour éviter de développer un état pathologique.

## b) Récepteurs liant le VEGF

L'action du VEGF se fait via sa liaison à un de ses récepteurs et son effet biologique dépend du récepteur avec lequel il s'associe. Ces derniers ont ensuite une influence sur le signal intracellulaire transduit suite à leur liaison avec leur ligand. Les récepteurs du VEGF les plus

connus font partie de la famille des récepteurs tyrosine kinase : **VEGFR1** (**Flt-1** : *fms-like tyrosine kinase-1*), **VEGFR2** (**Flk-1** : *fetal liver kinase-1*), **VEGFR3** (**Flt-4** : *fms-like tyrosine kinase-4*) (Figure 8) et **KDR** (*kinase insert domain containing receptor* chez la souris et le rat). Le VEGFR1 et le VEGFR2 sont principalement exprimés dans les EC vasculaires alors que le VEGFR3 dans les EC des vaisseaux lymphatiques (Fong, Rossant et al. 1995, Dumont, Jussila et al. 1998, Fong, Zhang et al. 1999). Les récepteurs VEGFR ont tous une partie extracellulaire qui contient des domaines d'immunoglobulines (Ig) permettant la liaison spécifique de leur ligand. Puisque ce sont des récepteurs membranaires, ils possèdent un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire. La présence de tyrosines kinases dans le domaine cytoplasmique des VEGFRs permet la transduction du signal. La liaison du VEGFA au VEGFR1 ou au VEGFR2 induit leur homodimérisation déclenchant ensuite leur autophosphorylation (Olsson, Dimberg et al. 2006). La transmission du signal est ensuite médiée par une cascade de phosphorylation impliquant entre autres les voies de la phosphatidylinositol 3-kinase (**PI3K**) et de la phospholipase C $\gamma$  (**PLC $\gamma$** ) via leur domaine **SH2** (Src homology-2) respectif (Guo, Jia et al. 1995). Le VEGFA lie le VEGFR1 avec une affinité plus forte que le VEGFR2. En plus de lier le VEGFA, le récepteur VEGFR2 peut lier le VEGFC et D (McColl, Baldwin et al. 2003). La propriété mitogénique du VEGFA est conférée par la signalisation du VEGFR2 via l'activation de PLC $\gamma$  et des MAPK (*Mitogen activated protein kinases*) (Wei, 2004). L'association du VEGFA au VEGFR1 induit une phosphorylation du récepteur et de PLC $\gamma$  sans avoir un effet sur la mitogenèse des EC (Seetharam, Gotoh et al. 1995). Le VEGFR1 se lie aussi au PIGF, un autre facteur ayant une faible activité mitotique (Hauser and Weich 1993, Barleon, Hauser et al. 1994, Klagsbrun and D'Amore 1996, Koch and Claesson-Welsh 2012). Le VEGFR1 semble moduler l'association entre le VEGFA et le VEGFR2 permettant ainsi la régulation de la ramification vasculaire (Kappas, Zeng et al. 2008). La signalisation par le VEGFR2 est responsable d'une majorité des fonctions cellulaires des EC en régulant leur survie, leur prolifération, leur migration et la formation des tubes vasculaires (Ferrara, Gerber et al. 2003, Koch and Claesson-Welsh 2012).

### c) Les corécepteurs de VEGF

En plus de former des dimères, les récepteurs VEGFRs peuvent lier des corécepteurs: les Neuropilines -1, -2 (**NRP1**, **NRP2**), les intégrines, l'Ephrine-B2<sup>144</sup> et l'Héparane sulfate protéoglycane (**HSPG**) (Neufeld, Cohen et al. 2002, Sawamiphak, Seidel et al. 2010) (Tessler, Rockwell et al. 1994, Somanath, Ciocea et al. 2009). Les Neuropilines sont des glycoprotéines membranaires ayant une courte queue cytoplasmique qui est démunie de domaine tyrosine kinase (Ballmer-Hofer, Andersson et al. 2011). Pour générer un signal les NRP nécessitent donc la formation de complexes avec d'autres récepteurs (Prahst, Heroult et al. 2008). Même si les NRP sont généralement exprimés dans les cellules neuronales, ils sont également présents à la surface des CE. Dans les CE, NRP1 agit comme corécepteur du VEGFR2 en augmentant l'affinité de ce récepteur pour le VEGFA (Soker, Takashima et al. 1998). NRP1 est également capable de lier une autre protéine : la Sémaphorine 3A (**Sema3A**) qui est une protéine de guidance neuronale. L'action de NRP1 dans l'angiogenèse a été démontrée chez la souris par Kitsukawa et ses collègues. En effet, la surexpression de son ligand Sema3A provoque une vascularisation excessive engendrant des anomalies dans les systèmes cardiovasculaires et nerveux (Kitsukawa, Shimono et al. 1995, Kitsukawa, Shimizu et al. 1997). Cette même équipe a montré en 1997, que la délétion complète de NRP1 est létale au stade embryonnaire E12.5. Les embryons présentaient des défauts neurologiques et vasculaires sévères au cours du développement (Kitsukawa, Shimizu et al. 1997). Ces études démontrent bien que l'association entre les VEGFR et NRP sont un excellent exemple de la connexion entre la croissance vasculaire et neuronale.

### d) La guidance de la croissance vasculaire

La rétine est un tissu neuronal qui ne peut exister sans la présence d'un réseau vasculaire précis. La maturation adéquate de ce système vasculaire dépend de la croissance des vaisseaux sanguins. Des molécules sécrétées dans le milieu extracellulaire les dirigent soit en les attirant ou en les repoussant. Il est bien connu que le VEGF agit en tant que chimio-attractant pendant

l'angiogenèse. Les sémaphorines, nétrines et éphrines sont d'autres exemples de molécules classiques de guidance vasculaire (Neufeld, Cohen et al. 2002). Les sémaphorines (Séma) de classe 3 sont des protéines sécrétées originellement décrites pour leur effet répulsif sur les axones. Depuis, leurs actions a été observées dans une multitude de systèmes biologiques (respiratoire, cardio-vasculaire, immunitaire) (Yazdani and Terman 2006). Un membre de cette classe, la Séma 3A, a la capacité de repousser les EC en migration pendant l'angiogenèse (Miao, Soker et al. 1999, Serini, Valdembrì et al. 2003, Acevedo, Barillas et al. 2008). Le récepteur NRP1, récepteur commun de la Sema3A et du VEGF, est exprimé par les cellules ganglionnaires de la rétine (CGR) et les EC. La collaboration entre les CGR et EC se reflète d'autant par la sécrétion de VEGF que de la Sema 3 A par les CGR qui régulent la vascularisation de la rétine (Soker, Takashima et al. 1998). Les neurones de la rétine contrôlent ainsi leur propre vascularisation qui doit s'orchestrer parfaitement pendant son développement.

Le déséquilibre dans l'expression des molécules guidances vasculaires conduit inévitablement à des pathologies vasculaires. Les rétinopathies du prématuré (**ROP**), du diabète (**RD**) et la dégénérescence maculaire liée à l'âge (**DMLA**) en sont d'excellents exemples d'atteinte de la santé oculaire vasculaire. Ces pathologies sont caractérisées par une mauvaise prolifération des vaisseaux sanguins ce qui engendre une perte de la vision due à une dégénérescence neuronale de la rétine. Par exemple, dans les modèles murins de rétinopathie du prématuré (**ROP**), il a été démontré l'implication de la Sema3A dans la perturbation de la croissance vasculaire de la rétine chez les souris (Joyal, Sitaras et al. 2011). Le dérèglement de l'angiogenèse peut engendrer la formation de néo-vascularisation pathologique. Ces vaisseaux ne sont donc pas physiologiques, c'est-à-dire qu'ils sont plus fragiles, plus perméables et moins compétents. Ils se caractérisent par des ramifications non structurées provoquant des conséquences néfastes sur la santé de l'organisme. Un grand nombre de pathologies sont étroitement liées à la présence d'angiogenèse pathologique comme certaines maladies cardio-vasculaires, immunitaires, oculaires et tumorales.

### **III. Pathologies vasculaires de l'œil**

L'équilibre vasculaire de la rétine est crucial pour assurer le fonctionnement visuel de l'œil. En effet la rétine est un tissu hautement spécialisé et peut être affecté par une altération de ses vaisseaux sanguins. La croissance anarchique de néo-vaisseaux est impliquée dans plusieurs pathologies vasculaires de l'œil, telles : les rétinopathies du diabète (**RD**), la dégénérescence vasculaire liée à l'âge (**DMLA**), la rétinopathie oxydative du prématuré (**ROP**), l'obstruction de veines dans la rétine, la myopie pathogénique, l'uvéite et le glaucome (Usui, Westenskow et al. 2015). Cette croissance vasculaire désorganisée est appelée la néo-vascularisation (**NV**) pathologique. Elle est généralement causée par une perte de vaisseaux dus à un stress physiologique. Cette perte de vaisseaux sanguins prive le tissu d'oxygène et de nutriments, le qualifiant d'ischémique. Le manque d'oxygène du tissu le conduit vers un état hypoxique qui favorise la production de facteurs de croissance vasculaires. Ce qui peut aboutir avec l'apparition de vaisseaux sanguins perméables et pathologiques dans les différentes couches de la rétine. L'incapacité de la rétine à former des vaisseaux de façon adéquate, mène vers sa dégradation et conséquemment vers un état pathologique de l'œil. La majorité des cas de pertes de vision chez la population âgée des pays développés sont associés à la DMLA qui est le sujet d'étude de cet ouvrage.

#### **1. La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA)**

La DMLA est la principale cause de perte de vision chez les adultes de plus de 50 ans des pays industrialisés. Elle se classe en troisième position sur le plan mondiale des maladies visuelles sévères. L'institut américaine nationale de l'œil (NEI) estime que près de 10 millions d'américains souffrent présentement d'une forme de DMLA (Friedman, O'Colmain et al. 2004, Ambati, Atkinson et al. 2013). Cette prévalence est comparable à celle du cancer ou de l'Alzheimer qui touchent respectivement près de 12 millions et 5 millions d'américains (Brookmeyer, Johnson et al. 2007, Hayat, Howlader et al. 2007). La DMLA se traduit par une affectation de la macula qui a comme conséquence l'altération de la vision centrale associée soit à une atrophie géographique ou une néovascularisation pathologique de la choroïde (**CNV**).



Cette dégradation irréversible de la macula est très handicapante pour les patients. La DMLA est une maladie multifactorielle complexe. Son développement est causé autant par des facteurs génétiques qu'environnementaux (tabagisme, obésité et vieillissement). En effet, il est estimé que les cas de DMLA augmenteront dans les années à venir de façon importante et ce en lien avec le vieillissement de la population.

#### a) Facteurs de risque de la DMLA

L'histoire familiale de la pathologie est une information importante pour assurer un suivi sur le développement de la DMLA (Smith and Mitchell 1998). En effet, on observe que certaines prédispositions génétiques sont associées au développement de la DMLA (Fritsche, Chen et al. 2013). Des études ont démontré le lien concret entre le polymorphisme mononucléique (single nucleotid polymorphism ou **SNP**) et la prédisposition génétique pour la DMLA (Iyengar, Klein et al. 2004, Spencer, Olson et al. 2011, Fritsche, Chen et al. 2013). Suite à une méta-analyse à l'échelle mondiale, plusieurs SNP présents dans des locus des gènes *ARMS-2HTRA1*, *CFH*, *C20CFB*, *C3*, *TIMP3*, *APOE*, *CETP*, *VEGFA*, *LIPC*, *CFI* *COL10A1* ET *TNFRSF10A* (Fritsche, Chen et al. 2013). Les gènes identifiés portant des SNP sont principalement associés à l'inflammation, à l'activation du complément et à l'angiogenèse; des mécanismes cellulaires connues pour être altérés dans la DMLA (Hall, Cooke Bailey et al. 2015). Plus d'une vingtaine de locus contenant des SNP associés à la DMLA ont été identifiés, ces études sont d'une importance cruciale puisqu'elles permettent d'explorer de nouvelles méthodes de détection précoce de la maladie. Le contexte génétique fait, sans conteste, partie des facteurs de risque les plus importants de prédisposition favorisant l'apparition de la DMLA. Cependant, son développement est aussi relié à certains facteurs environnementaux qui contribuent à augmenter sa prévalence.

Parmi les facteurs environnementaux, le tabagisme augmente significativement la prévalence de la DMLA (Cruickshanks, Klein et al. 1993, Seddon, Willett et al. 1996, Klein and Francis 2003, Cho, Seddon et al. 2004). Depuis que l'équipe du Dr Peatkau a découvert en 1978 que la consommation de cigarette est un facteur de risque environnemental majeur pour le

développement de la DMLA, de nombreuses études ont étudié l'impact du tabagisme sur l'apparition et la progression de cette pathologie oculaire (Hyman, Liliensfeld et al. 1983, Klein, Klein et al. 1993, Smith, Mitchell et al. 1996, Vingerling, Hofman et al. 1996, Tamakoshi, Yuzawa et al. 1997, Delcourt, Diaz et al. 1998, Evans, Fletcher et al. 2005, Thornton, Edwards et al. 2005). L'utilisation de modèles murins exposés à la nicotine a renforcé le lien entre la sévérité de la CNV et le tabagisme (Suner, Espinosa-Heidmann et al. 2004). Le tabagisme provoque un vieillissement prématuré de l'organisme en favorisant une augmentation du flot sanguin, l'agrégation des plaquettes, un stress oxydatif maintenu et une diminution de la quantité de lipides de haute densité (**HDL**) (Sobrin and Seddon 2014). Toutes ces perturbations vasculaires et stress cellulaires soutenus influencent la détérioration de la MB et donc l'intégrité tissulaire de la rétine.

Malgré le fort lien entre le tabagisme et la DMLA, d'autres facteurs de risques environnementaux peuvent favoriser ou non son apparition. C'est le cas des habitudes alimentaires qui peuvent avoir un effet positif ou néfaste sur la santé de l'œil. Effectivement, différentes études portant sur le lien entre la diète et la DMLA furent réalisées. Beaucoup d'études traitant de l'effet d'une alimentation riche en antioxydants comme la zeaxanthine et les caroténoïdes ont démontré l'impact positif qu'ils avaient sur la santé visuelle en repoussant le développement de la DMLA (Ajani, Willett et al. 1994, Seddon, Ajani et al. 1994, Delcourt, Carriere et al. 2006, Ma, Dou et al. 2012). Les omégas 3 sont, en plus, reconnus pour assurer le maintien de la santé et ont démontré des effets protecteurs de la macula par leurs propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires et anti-angiogéniques (Hughes, Pinder et al. 1996, Luostarinen and Saldeen 1996, Calder 2001, Hida, Fujita et al. 2003). Cependant, les habitudes alimentaires peuvent aussi avoir un effet néfaste et favoriser l'apparition de DMLA. En effet, des études ont démontré que l'obésité et la présence de gras abdominal augmentaient considérablement les risques de souffrir de DMLA (Seddon, Cote et al. 2003). Plus récemment, une étude utilisant un modèle murin de DMLA a démontré la corrélation positive entre l'alimentation riche en gras et l'amplitude de la CNV (Andriessen, Wilson et al. 2016).

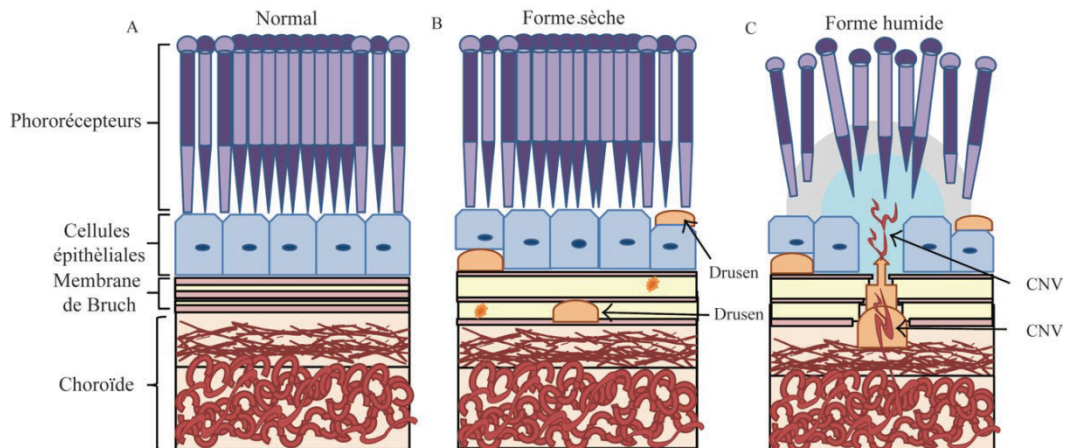
Dans les facteurs environnementaux qui favorisent l'apparition de symptômes de DMLA, c'est le vieillissement qui est le plus prédominant (Hogan and Alvarado 1967, Sharma, Sharma et al. 2014). En effet, il est connu depuis des décennies que le simple fait de vieillir

apporte des modifications de la rétine. D'abord, en 1967, les recherches d'Hogan et collaborateurs ont démontré par une étude histologique l'épaississement de la MB (membrane de Bruch) lors du vieillissement (Hogan and Alvarado 1967). Par la suite, d'autres études ont appuyé ces observations en montrant, qu'avec l'âge, une accumulation naturelle d'agrégats jaunâtres nommés drusen dans l'espace entre les EPR et la MB contribue à l'épaississement de la MB (Grindle and Marshall 1978, Bressler, Silva et al. 1994, Ramrattan, van der Schaft et al. 1994, Spraul and Grossniklaus 1997). En plus, lors du vieillissement, les cellules EP se débarrassent plus difficilement des toxines provoquant ainsi une accumulation de dépôts de lipofuscine. La lipofuscine est un composé non dégradable qui a la propriété d'absorber la lumière et d'émettre de la fluorescence (Delori, Goger et al. 2001). Ces stress cellulaires font partie intégrante du phénomène du vieillissement. La capacité des cellules à réguler les stress oxydatifs influence grandement le développement de la DMLA. Il est aussi à noter qu'au cours du vieillissement, il y a une importante perte de capillaires sanguins au niveau de l'œil. Ce déficit s'explique par une dégénérescence des péricytes entourant les capillaires suscitant donc une instabilité vasculaire (Kaur, Foulds et al. 2008). Cette diminution de capillaires sanguins provoque une diminution du flot sanguin au niveau de la choroïde et donc une hypoxie/ischémie locale pouvant favoriser la formation de CNV. D'autres changements sont observés avec l'avancement de l'âge, dont le rétrécissement des télomères et des altérations des fonctions cellulaires affectant le métabolisme des lipides, l'autophagie, les fonctions protéolytiques, les fonctions des lysosomes et même des mitochondries. Ces phénomènes cellulaires liés au vieillissement produisent des changements morphologiques qui influencent l'homéostasie tissulaire de la rétine (Sharma, Sharma et al. 2014). L'effet du vieillissement sur les tissus peut varier entre les individus en fonction de leur identité génétique. La DMLA est une pathologie très complexe comportant une combinaison de multiples facteurs de risques qui ne peuvent être négligés afin de bien comprendre leurs impacts précis sur la pathogénèse de la DMLA.

## **b) Pathogénèse**

Il existe deux formes de DMLA : la forme sèche et la plus sévère, la forme humide (Figure 10). La forme sèche est caractérisée par la dégradation graduelle des EPR au niveau de la *macula* dû à l'accumulation de drusen. Elle se développe très lentement et a un faible impact

sur la vision. Sa forme avancée est le résultat de la perte de photorécepteurs et d'une atrophie géographique à la *macula*. La forme sèche est la plus fréquente représentant près de 90 % des cas de DMLA. Dans 10 à 15 % des cas, il y a apparition de la forme humide (Guyer, Fine et al. 1986, Wong, Chakravarthy et al. 2008, Ambati, Atkinson et al. 2013). Celle-ci a un impact négatif et drastique sur la vision centrale. En effet, une fois enclenchée, la dégénérescence de la *macula* est rapide et irréversible. La présence de CNV est caractéristique de la forme humide qui se manifeste par la migration de vaisseaux sanguins de la choroïde vers la rétine (Figure 10). La perte de la vision centrale est causée par l'accumulation de liquide dans le tissu rétinien au niveau de la *macula* provenant des vaisseaux perméables, par la mort de photorécepteurs et la détérioration de la *macula*. L'accumulation de drusen est un point commun aux deux formes et participent de façon importante au développement de cette pathologie. Ces agrégats affectent donc, en fonction de leur abondance et de leur grosseur, l'équilibre fonctionnel entre la choroïde, la MB et l'EPR (Ratnapriya and Chew 2013).



**Figure 10.** Schéma d'une rétine saine et d'une rétine atteinte des différentes formes de la DMLA (A normal, B forme sèche et C forme humide (adapté de (Al Gwairi, Thach et al. 2016), figure 3)

Le contenu des drusen joue aussi un rôle important dans la pathogenèse de la forme humide de la DMLA. Les drusen sont essentiellement composés de produits du complément (actifs ou non), d'agrégats de lipoprotéines, de débris cellulaires, d'oxystéroles, de phospholipides oxydés et d'ARN *Alu* (Spraul and Grossniklaus 1997, Sharma, Sharma et al. 2014). Ils contiennent des formes oxydées de lipoprotéines et de forte quantité d'OxLDL et de 7-Ketocholesterol (Javitt and Javitt 2009). De plus, l'environnement des cellules EP est un

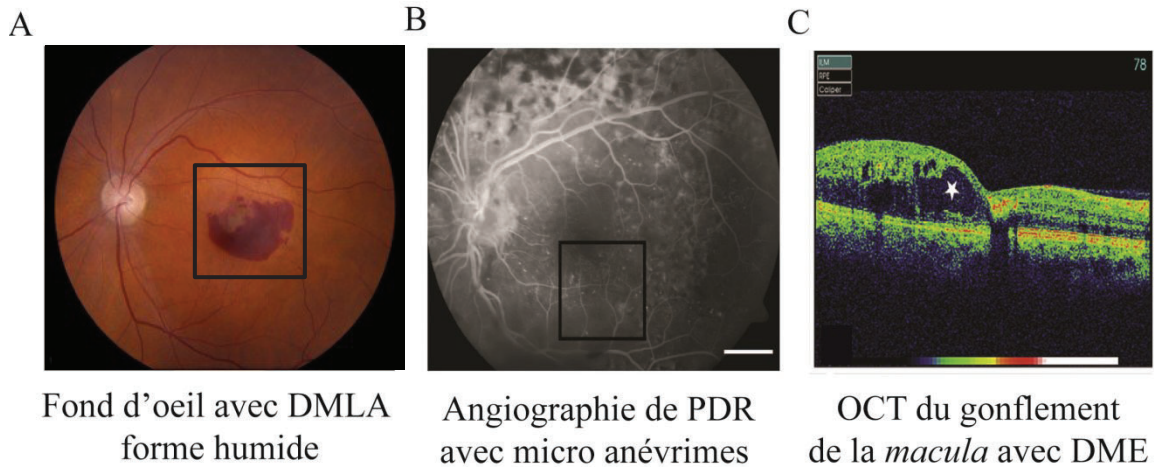
milieu naturellement oxydant par sa constante exposition à lumière et par sa demande élevée en oxygène, nécessaire pour répondre aux besoins énergétiques des photorécepteurs. Les molécules oxydées présentes dans les drusen ainsi que la dérégulation de mécanismes cellulaires contribuent ensemble à créer un environnement hostile où le stress oxydatif devient chronique (Blasiak, Petrovski et al. 2014). Un stress oxydatif maintenu résulte par une incapacité des EP à gérer ce milieu oxydant et provoque l'activation persistante de la voie ROS (*Radical oxygen species*). L'accumulation de lipofuscine est aussi connue pour activer la voie ROS (Hohn, Jung et al. 2010) menant à l'oxydation de lipides et de protéines (Cecarini, Gee et al. 2007, Fruhwirth, Loidl et al. 2007). Les protéines oxydées sont normalement dégradées dans le protéasome puisqu'elles peuvent avoir des défauts de repliements suite à leur oxydation qui aurait modifié leurs propriétés chimiques. L'activation de ROS affecte, en plus, l'action des protéasomes et favorise l'activation de la réponse aux protéines mal repliées (**RPM**) (Rakhit, Cunningham et al. 2002, Cao and Kaufman 2014, Zeeshan, Lee et al. 2016). La présence de protéines mal repliées induit alors la réponse du stress de RE en activant les voies de PERK/IRE1 $\alpha$ /ATF6. Lorsque celles-ci sont activées de façon continue, elles participent à la sur-expression du VEGFA et de facteurs pro-inflammatoires propices à la formation de la CNV (Fernandes, Guo et al. 2006). Il a été démontré que la présence d'OxLDL pouvait favoriser l'augmentation de l'expression de VEGFA par l'activation de la voie PERK/ATF4 de la réponse au stress du RE (Oskolkova, Afonyushkin et al. 2008). En effet, le facteur de transcription ATF4 a des séquences de reconnaissance sur le gène du VEGFA présents permettant de contrôler l'expression de ce dernier dans les cellules EP (Roybal, Yang et al. 2004). Il a été en plus démontré que les OxLDL favoriseraient, via une signalisation par ATF4, l'expression de gènes pro-inflammatoires participants au développement de la CNV (Gargalovic, Gharavi et al. 2006). En outre, l'accumulation de drusen, d'autres effets du vieillissement peuvent contribuer au développement de la DMLA.

L'épaississement de la MB, étroitement lié à l'apparition de drusen est aussi une conséquence du vieillissement. Ce phénomène a pour effet une diminution de la perméabilité de la MB ce qui affecte l'efficacité des échanges nutritifs avec les cellules EP et les photorécepteurs (Loffler and Lee 1986, Kaur, Foulds et al. 2008, Al Gwairi, Thach et al. 2016). La dysfonction des cellules EP est au centre du développement de la DMLA puisqu'elle provoque l'activation

des capteurs de l'ischémie et à l'hypoxie (dont HIF1 $\alpha$ ). Il a été démontré qu'HIF1 $\alpha$  aurait un rôle dans la progression de la DMLA (Inoue, Yanagi et al. 2007). En effet, la stabilisation du facteur HIF1 $\alpha$  lors d'hypoxie est connue pour activer la transcription du VEGFA et ainsi favorise la formation de CNV (Arjamaa, Nikinmaa et al. 2009). HIF1 $\alpha$  participe, en plus, à l'activation des voies de réponses au stress du RE (Truettner, Hu et al. 2009). Les voies de la réponse au stress du RE et au stress oxydatif sont inter-reliées entre-elles. Par exemple, le stress oxydatif peut induire le stress de RE en provoquant l'accumulation de protéines oxydées mal repliées. Produisant ainsi une amplification de la production de molécules stimulant la croissance vasculaire (Salminen, Kauppinen et al. 2010). Le rôle du stress oxydatif a été démontré dans le développement de la CNV de la DMLA mais aussi dans différentes pathologies du vieillissement telles l'athérosclérose, l'Alzheimer, le parkinson et le cancer (Dong, Xie et al. 2009, Sheridan, Pate et al. 2009, Kim, Kim et al. 2015, Shaw, Stiles et al. 2016). Ainsi, le vieillissement cellulaire provoque un environnement oxydant et altère les fonctions biologiques causant des répercussions importantes sur la santé oculaire.

## 2. Diagnostic des pathologies vasculaires de l'œil

Il y a plus d'un siècle que l'on arrive à visualiser les vaisseaux sanguins de la rétine. Effectivement, la première méthode utilisée était l'examen du fond d'œil. Elle fut développée en 1891 par un ophtalmologiste allemand Dr Gerloff. Ce fut en 1910 que cette technique fut couplée à l'utilisation de la caméra (photographie) par Gullstrand, un concept encore utilisé de nos jours et qui lui a valu le prix Nobel (Abramoff, Garvin et al. 2010, Abramoff, Reinhardt et al. 2010) (**Figure 11A**). Ensuite, il y a eu l'apparition de l'angiographie avec fluorescéine (Novotny and Alvis 1961) (**Figure 11B**) et plus tard vers 1990, l'arrivée des images de tomographie en cohérence optique (**OCT**) de coupe transversale de l'œil (Figure 11C). Cette technique a permis d'apporter une vision différente et de compléter les outils de diagnostic déjà présents (Huang, Swanson et al. 1991). Depuis la révolution informatique, une meilleure visualisation de la rétine et des diagnostics plus précis ont été obtenus grâce à une évolution importante de l'imagerie médicale.



**Figure 11.** Exemples d'imagerie de l'œil **A)** Fond d'œil avec DMLA (<https://webeye.ophth.uiowa.edu/eyeforum/tutorials/AMD-medical-student/>, Figure 5), **B)** Angiographie d'un œil avec PDR (rétinopathie diabétique proliférative) (Dejda, Mawambo et al. 2014) et **C)** OCT d'œil avec DME (Vroman, Klaassen et al. 2013)

L'image du fond d'œil se fait de routine lors d'examen de l'état de santé des yeux. Cette technique permet la visualisation par la pupille (dilatée ou non), du fond de l'œil incluant la vascularisation, l'état de la rétine, de la macula et du disque du nerf optique (Abramoff, Garvin et al. 2010). L'analyse du fond d'œil est d'une grande utilité pour assurer un suivi régulier de la santé visuelle. Principalement, chez les individus souffrant de pathologies systémiques comme le diabète (hyperglycémie chronique) ou l'insuffisance rénale (hypertension chronique) qui, avec les années, affectent l'état des vaisseaux de la rétine et par le fait même la vision. Cette méthode est non invasive et permet rapidement de savoir s'il y a une détérioration de la rétine. Dans le cas de la DMLA, on observe la présence d'aggrégats (drusen) dans les images de fond d'œil comme premier signe de la maladie. De plus, la lipofuscine est un composé fluorescent qui peut être détecté à l'examen par fond d'œil (Sparrow, Wu et al. 2010). Dans les cas plus sévères, les images de fond d'œil vont montrer la présence d'exsudats à la zone de la macula provenant de la CNV. L'observation du fond d'œil est indispensable pour s'assurer d'un suivi dans le temps de la santé visuelle cependant, elle nécessite l'utilisation d'autres technologies d'examen pour confirmer un diagnostic. Par exemple, l'angiographie avec fluorescéine reste indispensable pour identifier la CNV de la forme humide de la DMLA.

Pour confirmer un diagnostic fait par l'examen du fond d'œil, des angiographies avec fluorescéine peuvent être réalisées afin d'observer la présence de CNV pour les cas de DMLA. Elle consiste en l'injection systémique d'une substance fluorescente qui circule dans tout l'organisme et permet donc de voir l'état des vaisseaux (Novotny and Alvis 1961). Comme une partie de la fluorescéine injectée reste en circulation, elle permet de visualiser l'exsudat causé par la perméabilité vasculaire pathologique (Yannuzzi, Ober et al. 2004). Cette technique nous informe donc sur l'intégrité des barrières hémato-rétiniennes. L'angiographie avec fluorescéine est par contre une méthode invasive et ne s'utilise qu'en complément d'images de fond d'œil (Cavallerano 1996). Plus récemment, dans le domaine de l'ophtalmologie, est apparue l'imagerie avec ordinateur permettant de reproduire une image d'une coupe transversale de la rétine. Le principe de l'OCT est d'utiliser l'émission de lumière infra-rouge et la capacité réfractaire des tissus permettant une reconstruction d'images 2D ou 3D ayant une résolution de l'ordre du micromètre. Cette méthode est présentement très courante dans le suivi de la progression des rétinopathies (Huang, Swanson et al. 1991, Abramoff, Garvin et al. 2010). Elle permet de mesurer, par exemple, l'épaississement de la rétine causée par l'accumulation d'exsudat caractéristique de l'œdème maculaire. La prévention des rétinopathies vient premièrement avec un suivi constant de la santé visuelle. La majorité des cas sera diagnostiquée suite à l'apparition de symptômes visuels chez le patient. En somme, un diagnostic précis permet d'adapter le traitement qui sera utilisé dans le but d'avoir de meilleures chances de ralentir la dégradation de la vision.

### **3. Thérapies actuelles contre la néovascularisation pathologique de la rétine**

Les thérapies présentement utilisées agissent pour diminuer la NV et l'œdème causé par la perméabilité vasculaire. Selon le cas pathologique, les patients sont traités soit par photo coagulation avec laser, par thérapies de photo dynamisme ou par l'utilisation anti-VEGF. Dans tous les traitements qui seront discutés dans la prochaine section, tous ont leur propre efficacité selon les symptômes à traiter, mais tous ont leurs effets secondaires qui sont souvent loin d'être



négligeables. Il sera, en plus, question d'un nouveau type de thérapie en développement; la thérapie génique.

#### **a) Laser, photo coagulation et thérapie photo dynamisme**

Les thérapies les plus connues pour diminuer les symptômes de pathologies vasculaires de la rétine ont débuté par l'utilisation du laser dans les années 50. Cette technique appelée la photo coagulation permet de brûler avec le laser la NV en croissance. Le but de la photo coagulation est simplement de détruire les zones ischémiques qui sont responsable de l'hypoxie chronique et de la formation de NV. Le laser permet aussi de coaguler les zones de NV pour limiter leur développement. L'utilisation du laser, quoique destructive sur le plan tissulaire, a permis de diminuer de 50 % les cas de perte de vue causée par la formation de NV (Fine, Hawkins et al. 1991, Hanout, Ferraz et al. 2013, Usui, Westenskow et al. 2015).

De façon moins fréquente, la thérapie par photo dynamisme est principalement utilisée pour réduire la NV dans les cas de DMLA avec CNV. Un agent photosensible (vertéporfine) est injecté dans la circulation sanguine systémique. Celui s'accumule au niveau des sites d'embranchements vasculaires nouvellement formés. Cet agent est activé par un laser qui provoque l'adhésion des plaquettes déclenchant ainsi la coagulation et l'occlusion des lésions de CNV (Hanout, Ferraz et al. 2013, Usui, Westenskow et al. 2015). Ces méthodes de traitement avec lasers sont encore largement utilisées pour limiter les dommages causés par la perturbation vasculaire et micro vasculaire de la rétine. Celles-ci ont permis à beaucoup de patients atteints de la DMLA de conserver une partie de leur vision et une meilleure qualité de vie et ce plus longtemps.

#### **b) Inhibiteurs du VEGF**

Plus récemment, dans le monde de la thérapie vasculaire de l'œil, sont arrivés les inhibiteurs du VEGF. À la suite d'une panoplie d'études, le VEGF fut reconnu comme une molécule cible de choix. Effectivement, sa surexpression dans les pathologies vasculaires a amplement été démontrée. Il semble alors évident que son inhibition devienne une thérapie avec

un énorme potentiel. Il existe différents types d'anti-VEGF. Le premier qui fut approuvé, le Pegaptanib, était sous forme d'aptamer (oligonucléotide synthétique d'ARN spécifique à l'isoforme VEGFA165 (Gragoudas, Adamis et al. 2004). Ensuite, il y eut l'apparition du bevacizumab (Avastin), le premier anticorps monoclonal pouvant neutraliser le VEGF. Sa première utilisation fut, en tant qu'agent anti-angiogénique contre le cancer (Hurwitz 2004). L'Avastin fait maintenant parti des traitements utilisés contre la formation de la CNV chez les patients souffrant de la DMLA (Hanout, Ferraz et al. 2013). D'autres anti-VEGF ont été produits par la suite dont le Ranibizumab, qui est un fragment Fab (Fragment de l'anticorps liant l'antigène) dérivé de l'anticorps monoclonal Bevacizumab (Presta, Chen et al. 1997). Le Ranibizumab a été spécialement développé pour son affinité pour toutes les isoformes du VEGF permettant une meilleure affinité et efficacité du traitement (Rosenfeld, Brown et al. 2006, Hanout, Ferraz et al. 2013). Un autre inhibiteur du VEGF, l'Aflibercept, a été développé par la production d'une chimère de protéines recombinantes des récepteurs VEGFR1 et VEGFR2 fusionnées au domaine Fc de l'immunoglobuline G1 (**IgG1**). En plus de pouvoir lier toutes les isoformes du VEGFA et VEGFB, l'Aflibercept peut aussi lier le facteur de croissance du placenta (**PIGF**) lui permettant ainsi d'avoir une action prolongée dans le temps (Holash, Davis et al. 2002, Heier, Brown et al. 2012). L'arrivée des anti-VEGF sur le marché a permis une révolution des traitements des pathologies vasculaires de l'œil. Leur action permet même dans certains cas un regain visuel par une diminution significative d'œdème maculaire. Avantageux par leur côté peu invasif, ils semblent être plus efficaces lorsqu'ils sont combinés aux traitements avec le laser. De nombreuses études ont démontré que ces inhibiteurs de VEGF sont efficaces, sécuritaires et généralement bien tolérés par les patients (Avery 2006, Avery, Pieramici et al. 2006, Manzano, Peyman et al. 2006, Shahar, Avery et al. 2006), ce qui leur a valu une place de choix dans les traitements des maladies vasculaires de l'œil. Cependant, il est encore mal compris pourquoi certains patients démontrent une résistance aux anti-VEGF (Kokame, deCarlo et al. 2019). D'autre part, la communauté scientifique reste concernée par les effets secondaires d'une utilisation à long terme des inhibiteurs du VEGF. Même si l'administration intra oculaire d'anti-VEGF est peu invasive, son efficacité nécessite souvent plusieurs doses. Puisque le VEGF est reconnu pour être essentiel pour l'homéostasie des photorécepteurs, des neurones et des capillaires, son blocage à long terme pourrait en affecter l'équilibre. Des études ont appuyé ce fait en montrant que le VEGF est essentiel pour les fonctions visuelles et qu'une inhibition

totale peut avoir des conséquences neurotoxiques. (Robinson, Ju et al. 2001, Saint-Geniez, Maharaj et al. 2008). D'où l'importance de poursuivre les recherches sur d'autres cibles thérapeutiques ou d'autres méthodes, comme les thérapies géniques, pour cibler le VEGF.

### **c) Thérapies géniques**

Depuis l'apparition des traitements des anti-VEGFA, il y a eu un progrès notable au niveau du contrôle des pathologies vasculaires de l'œil. Par contre la toxicité de leur utilisation à long terme reste toujours questionable d'où, le fort intérêt d'opter pour d'autres stratégies thérapeutiques. Par exemple, en s'attaquant plutôt à la production de la protéine en ciblant son ARNm. En effet, des études ont démontré l'efficacité de l'inhibition de VEGF en ciblant son ARNm par l'utilisation de petits ARN interférents (ARNi), de petits ARN en épingle à cheveux (shARN) ou même de microARN (miARN). Certaines stratégies ciblent aussi des facteurs de croissance comme le PIGF, le PEDF ou même la surexpression de protéines anti-angiogéniques comme l'angiotensine ou l'endostatine (Reich, Fosnot et al. 2003, Hua, Lv et al. 2006, Macrae, Zhou et al. 2006). Les recherches demeurent actives et la thérapie génique semble prometteuse pour un grand nombre de pathologies. Plusieurs méthodes sont présentement en phase clinique I, II ou III. De plus, la thérapie génique permet d'avoir un effet sur la surexpression du VEGF sans inactiver totalement son action vaso-protecteur et neuro-protecteur (Lai, Shen et al. 2002, Tolentino, Brucker et al. 2004). Les modes de libération des molécules utilisant des vecteurs viraux tels les adénovirus modifiés AAV (adeno-associated virus) ou lentivirus ont beaucoup évolué depuis les dernières années (Lai, Lai et al. 2002, Fu, Fu et al. ExRNA 2019). L'utilisation de modèle animaux est un outil précieux pour étudier l'efficacité et comprendre le mécanisme d'action et d'évaluer la biosécurité des nouvelles molécules potentielles pour la thérapie génique. L'approche génétique n'en est qu'à ses débuts puisqu'une meilleure compréhension du rôle précis des gènes ciblés est nécessaire afin d'éviter tout débalancement de l'homéostasie du tissu de la rétine.

## 4. Modèles murins

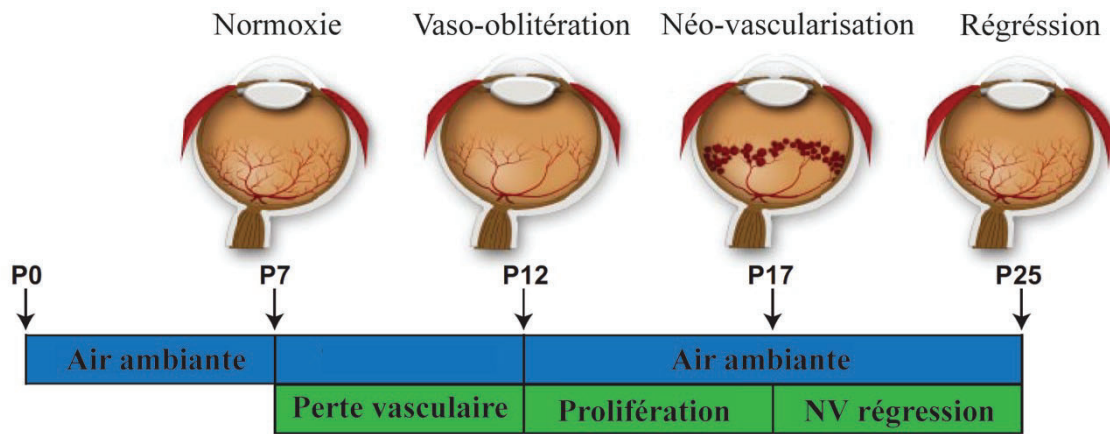
La compréhension des mécanismes biochimiques ou génétiques du développement de la DMLA ne peut se faire sans l'utilisation d'un organisme complet. La rétine est un tissu complexe et unique où une collaboration étroite entre le plexus vasculaire et neuronal implique plusieurs types cellulaires. La rétine des rongeurs ressemble à celle des humains à l'exception de son absence de *macula* et que son développement vasculaire se termine après la naissance (Fruttiger 2007). Cette dernière particularité rend l'utilisation des rongeurs avantageuse, principalement lors de l'étude du développement des vaisseaux de la rétine ou de la NV pathologique de l'œil humain. La rétine de la souris est même un modèle de choix pour étudier l'angiogenèse en général puisque ce tissu est d'un accès facile. Plusieurs modèles murins ont été conçus pour mimer les effets biologiques de la DMLA permettant ainsi de mieux comprendre les mécanismes entourant leur développement et de tester des traitements potentiels.

### a) Modèle d'induction de CNV par laser

Ce modèle murin a été développé spécifiquement pour étudier la formation de CVN observée au cours de la DMLA. Ce modèle consiste en l'utilisation d'un laser causant une brûlure de la rétine et déstabilisant la MB. La brûlure par laser est caractérisée par une induction de mécanismes pro-inflammatoires et pro-angiogéniques. La CNV induite mime alors la forme humide de la DMLA où la formation de nouveaux vaisseaux sanguins migre de la choroïde vers la rétine. Des souris adultes de 6 à 8 semaines subissent quatre brûlures également réparties dans les 4 cadrans de l'œil. Seulement 3 jours suivant les brûlures, on note déjà des changements biologiques et un pic d'intensité de NV est observé après 7 jours (Lambert, Lecomte et al. 2013). Ce modèle est avantageux car il permet de reproduire rapidement la forme humide de la DMLA et d'étudier le mécanisme de l'inflammation et de l'angiogenèse pathologique qui sont caractéristiques de la forme humide de la maladie. De plus, il a été largement utilisé pour la validation de traitements anti-VEGF et de traitements potentiels de la DMLA avec CNV (Lambert, Lecomte et al. 2013).

## b) Modèle murin de rétinopathies prolifératives induites à l'oxygène (OIR)

Le modèle de rétinopathie induit par oxygène (**OIR**) fut développé par le Dr. E.L. Smith et collaborateurs en 1994 (Smith, Wesolowski et al. 1994) et était initialement utilisé pour étudier la rétinopathie oxydative du prématuré (**ROP**). Ce modèle a pour but de mimer les conséquences de l'exposition des bébés prématurés à l'hyperoxygénation lorsqu'ils sont mis dans un incubateur. L'avantage du modèle OIR est que le développement vasculaire de la rétine de la souris se termine après la naissance. En effet, au moment de leur naissance, il est équivalent au développement vasculaire l'œil d'un fœtus de 16 semaines de grossesse (Fruttiger 2007). Ceci permet d'observer comment la formation des vaisseaux de la rétine peut être perturbée suite à l'exposition à une forte concentration d'oxygène. Pour ce faire, des souriceaux de 7 jours de vie (P7) sont exposés, et ce pendant 5 jours consécutifs (de P7 à P12), à une concentration d'oxygène de 75 %. Ils sont ensuite remis à l'air ambiant à P12. Deux phases sont observées dans ce modèle. D'abord, la première phase est nommée la phase d'oblitération. Elle se caractérise par la perte de capillaires rétiniens et se produit entre P12 et P14. Pendant cette phase, le tissu devenu ischémique suite à la détérioration vasculaire, induit des signaux d'hypoxie. En conséquence, des mécanismes proangiogéniques se déclenchent pour ensuite passer à la deuxième phase. Cette dernière est la phase proliférative avec formation de NV dont la plus forte intensité correspond à P17 (jour 17) (**Figure 12**). Dans ce modèle, on remarque à P17 des zones ischémiques (non-vascularisées) dans la rétine et la présence de bourgeons de NV pathologiques (Smith, Wesolowski et al. 1994) (**Figure 12**). En plus de permettre d'étudier la formation de NV caractéristique de la ROP, ce modèle est également utilisé pour comprendre les mécanismes de l'angiogenèse pathologique de la forme proliférative RD et de la formation de CNV chez la DMLA (Stahl, Connor et al. 2010). Un autre avantage de ce modèle murin est la capacité de pouvoir utiliser des animaux manipulés génétiquement (par exemple des souris transgéniques pour un gène d'intérêt) et d'observer l'effet de cette manipulation génétique sur les défauts de développement vasculaires de la rétine. Ainsi, on peut comprendre l'implication de l'inactivation ou de la surexpression d'un gène spécifique dans le développement des rétinopathies. Le modèle OIR est devenu un modèle par excellence pour tester les traitements anti-VEGF et tout autre traitement potentiel pour les rétinopathies prolifératives.



**Figure 12.** Schématisation du modèle murin OIR (Adapté de (Stahl, Connor et al. 2010))

La mise en place de modèles murins est cruciale pour les avancées dans la compréhension et la lutte contre les pathologies. L'utilisation de la rétine des souris est un excellent outil pour étudier les mécanismes impliqués dans l'angiogenèse pathologique. Les modèles murins ont permis d'identifier des molécules clés comme le VEGF ayant des rôles prépondérants dans le développement des pathologies vasculaires. L'utilisation de ces modèles animaux permet aussi de tester les thérapies géniques dont celles utilisant des miARN. Ces modèles murins sont donc indispensables à l'avancé de la recherche sur les rétinopathies.

## IV. Les miARN

### 1. Découverte

Pendant des décennies et bien avant que le code génétique humain soit entièrement décodé en 2000, la communauté scientifique voyait les protéines comme les éléments dominants, voire même exclusifs de la régulation de tous les mécanismes cellulaires biologiques. L'attention était totalement rivée sur les voies de signalisation des protéines. Hormis l'ARN ribosomal et de transfert, l'ARN était simplement considéré comme le résultat de la transcription génique et le précurseur de la traduction des protéines. À cette époque, on était loin de se douter à quel point l'ARN avait un rôle crucial dans la régulation de la synthèse protéique. Un des pionniers dans ce domaine de recherche, fut le groupe d'Ambros qui avait remarqué qu'une petite molécule d'ARN, *lin-4*, qui avait la capacité d'inhiber la traduction de la protéine LIN-14 (Lee, Feinbaum et al. 1993). Les études d'Ambros et Ruvkun ont effectivement démontré que le gène *lin-4* ne codait pas pour une protéine, mais produisait plutôt des molécules d'ARN de 61 nucléotides et de 22 nucléotides, dont le plus long est le précurseur du plus court. Le fragment d'ARN le plus court correspondait alors à la forme mature et fonctionnelle de *lin-4*. Ce dernier pouvait s'associer avec une séquence anti-sens spécifique présente dans la région du 3'UTR de l'ARNm de *LIN14* et réprimer sa traduction. Un fait qui fut surprenant est que malgré la diminution de l'expression protéique, le niveau d'expression de l'ARNm restait inchangé (Lee, Feinbaum et al. 1993, Wightman, Ha et al. 1993). Cependant, les observations de l'équipe d'Ambros faites en 1993 chez l'organisme *C. elegans* ne furent pas considérées avec l'importance qu'elles méritaient à ce moment puisqu'elles semblaient être spécifiques à cet organisme. Ces études furent mises de côté pendant plusieurs années jusqu'à ce que la démonstration de l'existence de *let-7*, une petite molécule d'ARN qui avait aussi un rôle de régulation négative de la traduction protéique. La conservation évolutive de *let-7* entre les espèces a ensuite été démontré chez les animaux, la drosophile, les plantes et même chez les virus (Hamilton and Baulcombe 1999, Pasquinelli, Reinhart et al. 2000, Bartel 2004, Pfeffer, Zavolan et al. 2004).

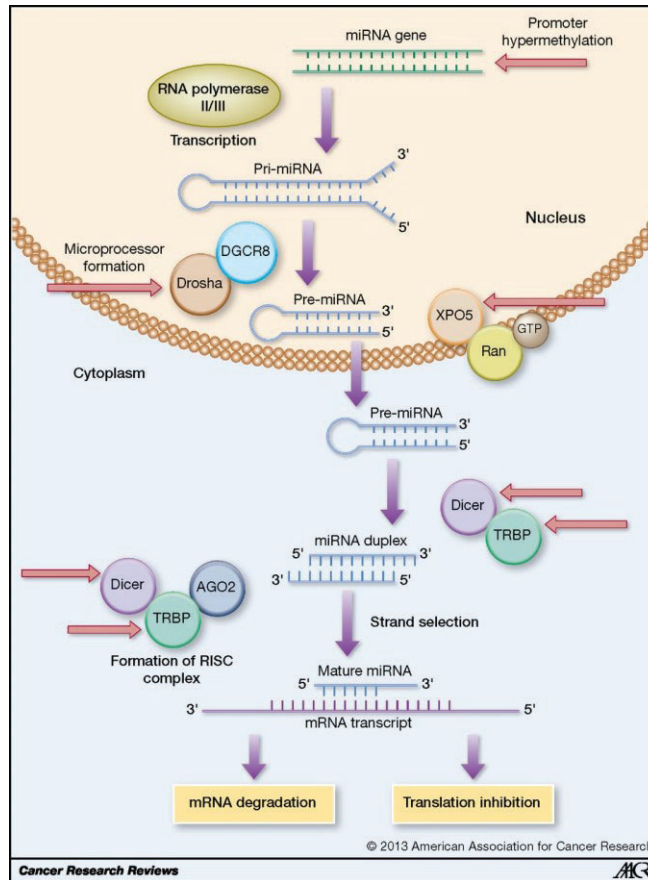
Par la suite, un nombre important d'études ont été portées sur l'identification de ces petites molécules d'ARN nommées les microARN (**miARN**). Les recherches qui ont suivi ont mis en lumière plusieurs caractéristiques propres au miARN. Par exemple, la capacité d'un seul miARN de reconnaître des centaines d'ARNm et ainsi de contrôler la synthèse d'un nombre important de protéines. (Lim, Lau et al. 2005, Baek, Villen et al. 2008, Selbach, Schwanhaussner et al. 2008). Il est maintenant bien connu que les miARN participent à la majorité des processus biologiques contrôlant ainsi la synthèse de la plupart des protéines (Friedman, Farh et al. 2009). Conséquemment les défauts d'expression de certains miARN furent associés au développement de nombreuses pathologies incluant les maladies oculaires (Raghunath and Perumal 2015). Dans cette section, il sera discuté de la biogenèse, de la fonction, des modes de sécrétion des miARN et de leurs implications dans les pathologies vasculaires de l'œil, telle que la DMLA.

## 2. Biogenèse des miARN

La production d'ARN vient de la transcription d'ADN par une polymérase présente dans le noyau. Dans le cas des miARN, c'est la polymérase II (**POLII**) qui est la principale responsable de leur transcription, sauf pour certains cas où elle se produit par l'action de la polymérase III (Cai, Hagedorn et al. 2004, Borchert, Lanier et al. 2006). En effet, la **POLII** lie près de 88 % des promoteurs de miRNA qui sont situés à 500pb en amont du site d'initiation (Zhou, Ruan et al. 2007). La régulation de la transcription des miARN peut se faire par deux modes différents. Soit par l'action d'un promoteur propre au miARN (miARN intergénique) ou soit par la régulation d'un promoteur agissant sur la transcription d'un gène hôte (miARN intragénique) (Gulyaeva and Kushlinskiy 2016). Dans le dernier cas, le miARN se loge dans un des introns de l'ARNm. Ces deux types de régulation semblent cependant être équitablement répandus lors de la biogenèse des miARN (Saini, Griffiths-Jones et al. 2007). Les études récentes réalisées par Chaulk et ses collaborateurs ont démontré que les miARN se retrouvent majoritairement sous forme de polycistron, c'est-à-dire qu'un groupe de miARN sera traduit sur un même transcrit d'ARN (Chaulk, Ebhardt et al. 2016). La liaison d'un seul promoteur peut alors réguler l'expression de plusieurs miARN simultanément. Un des exemples les plus connus est celui du polycistron miR-17~92 (Mogilyansky and Rigoutsos 2013).



Suite à leur transcription, les miARN doivent subir une maturation pour ensuite exécuter leurs fonctions biologiques. Une série d'étapes est nécessaire pour que le transcrit primaire puisse devenir un miARN mature et fonctionnel (**Figure 13**). La première étape se passe dans le noyau de la cellule où l'ARN transcrit subit des clivages. À cette étape, on parle plutôt de pri-miR (transcrit primaire), un simple brin d'ARN ayant une structure en tige-boucle unique et contenant des sites de clivage reconnus par DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region 8) et DROSHA. Le pri-miR, un fragment d'ARN pouvant dépasser 1000 nucléotides, est fréquemment constitué de plusieurs précurseurs de miARN (**Pre-miR**) suite à la transcription d'un polycistron (Bartel 2004, Chaulk, Ebhardt et al. 2016). Le résultat de ces clivages constitue le pre-miR, une molécule d'environ 65 à 70 nucléotides toujours en structure tige boucle, qui possède un groupe phosphate à l'extrémité 5' et un groupement hydroxyle au 3'. Ce pre-miR est reconnu par la protéine de transport EXPORTIN-5 qui permet sa translocation vers le cytoplasme où a lieu la suite de sa maturation (Lund, Guttinger et al. 2004). Le clivage du pre-miR par Dicer permet l'association de **TRBP** (transactivation response element RNA-binding protein) qui ensuite recrute le complexe *RNA-induced silencing complex* (**RISC**). Ce complexe est composé notamment d'une protéine Argonaute (**Ago**) et des chaperones **HSC70** (Heat shock cognate) et **HSP90** (Heat shock protein). Le complexe RISC/Ago participe à la sélection d'un des deux brins complémentaires. Il en résulte un brin d'ARN d'environ 22-23 nucléotides qui forme le miARN mature. Celui-ci reste associé au complexe, lui assurant une stabilité biologique et fonctionnelle (Bartel 2004, Denli, Tops et al. 2004, Carthew and Sontheimer 2009). Le brin complémentaire du miARN mature est généralement dégradé par la suite, mais à quelques exceptions près (environ 10 %), il s'agit d'un miARN très faiblement exprimé (Schwarz, Hutvagner et al. 2003). Dans certains cas, les miARN (des mirtrons) contournent cette voie de maturation par DROSHA et passent plutôt par les voies d'épissage des ARNm (Berezikov, Chung et al. 2007). Une fois sa maturation terminée, le miARN peut exercer son action de répression de la traduction protéique via leur liaison aux ARNm.



**Figure 13.** Schématisation de la biogénèse des miARN, (tiré de Mulrane AACR 2013, figure 1)

### 3. Modes d'action des miARN

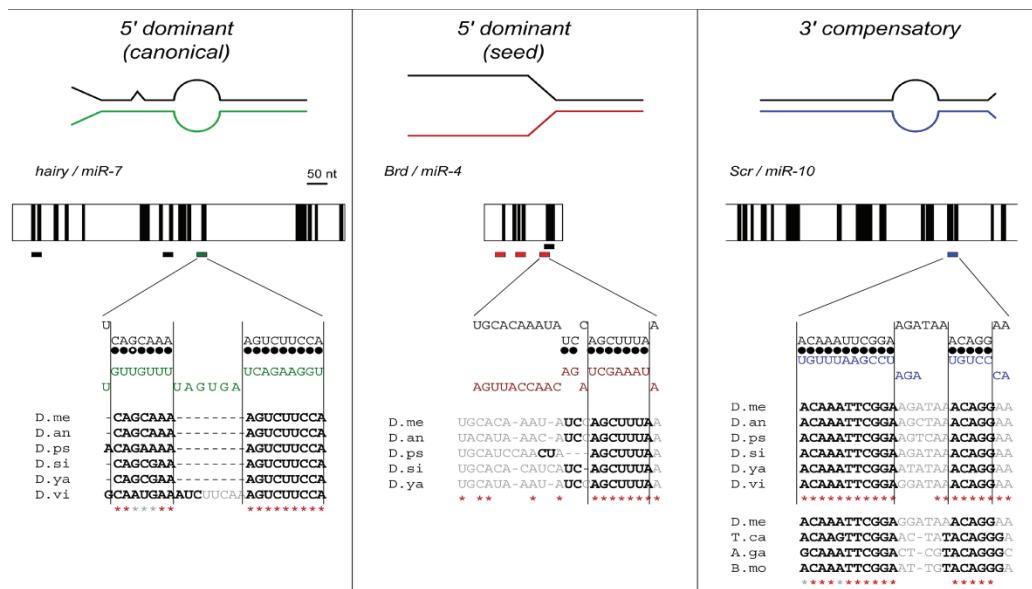
#### a) Mécanisme de liaison des miARN à l'ARNm

Une fois mature, le miARN, associé au complexe RISC/AGO2, se dirige vers son ou ses ARNm cibles pour exercer son action de répression de la traduction protéique. Les miARN possèdent une séquence de reconnaissance de l'ARNm, cette séquence de 7 à 8 nucléotides est appelé le noyau du miARN ou *seed* (de l'anglais). Ce noyau va se lier de façon complémentaire à une séquence qui se retrouve, la majorité du temps, dans le 3'UTR des l'ARNm ciblés. Les mécanismes de régulation de la liaison de miARN à l'ARNm sont complexes. Les recherches pour comprendre ces mécanismes se sont d'abord amorcées avec les études sur *lin-14/let-7* qui

ont démontré que l'ARNm de *lin-14* contient plusieurs sites de liaison pour *let 7*. Une région d'environ huit nucléotides, le noyau du miARN s'associe dans la région 3'UTR de l'ARNm et provoque la répression de la protéine LET 7 (Lee, Feinbaum et al. 1993, Wightman, Ha et al. 1993, Bartel 2009). L'apparition des outils bio-informatiques combinés aux technologies de clonage ont démystifié les mécanismes d'association de la région du noyau des miARN aux ARNm ciblés. Les analyses extensives à l'aide de programmes bio-informatiques (par exemple: TarBase) ont permis de faire les calculs nécessaires d'appariements possibles pour l'identification d'ARNm cibles. Ces calculs sont basés sur les règles de Crick et Watson. Chez les plantes, la liaison avec l'ARNm se fait avec un appariement parfait. Dans ce cas, le site Piwi d'AGO2 peut ensuite cliver l'ARNm et ainsi provoquer sa dégradation (Parker and Song 2004, Yekta, Shih et al. 2004, Ma, Yuan et al. 2005) Alors que chez les animaux, la liaison des miARN à leur ARNm se fait avec un appariement imparfait et l'ARNm n'est pas dégradé. Cette particularité pose un défi important à relever pour les bio-informaticiens étudiant les cibles spécifiques des miARN chez les animaux et donc chez l'humain (Sethupathy, Corda et al. 2006, Bartel 2009).

L'analyse à l'aide de la bio-informatique ne suffit pas pour confirmer les interactions possibles entre un miARN et ses ARNm cibles. Les résultats obtenus par ces analyses doivent, en effet, être ensuite validés dans des systèmes biologiques. C'est à l'aide de techniques de biologie moléculaire qu'il est possible de confirmer la capacité répressive du miARN sur un ARNm cible et les mécanismes d'association entre miARN et ARNm (Brennecke, Stark et al. 2005). Trois principaux mécanismes d'interaction entre miARN-ARNm ont été observés (**Figure 14**). Le premier est celui qui constitue le mode principal retrouvé chez les mammifères : l'appariement de type 5' (**Figure 14** au centre). Dans ce type d'interaction, le noyau du miARN est l'élément principal de la reconnaissance de l'ARNm. Le deuxième mécanisme est celui de la compensation en 3' (**Figure 14** à droite) qui consiste à une liaison du noyau avec des mésappariements. Comme son nom l'indique, ce manque de complémentarité est compensé par un appariement supplémentaire avec la région 3' du miARN. Enfin, le dernier mécanisme est le 5' canonique (**Figure 14** à gauche) se fait plutôt par la liaison des extrémités 5' et 3' du miARN (Sethupathy, Megraw et al. 2006, Bartel 2009). Peut importe les mécanismes de liaison du

miARN sur son ARNm, l'efficacité avec laquelle sa répression est exercée peut aussi dépendre de plusieurs facteurs.



**Figure 14.** Modes de liaison des miARN au ARNm tiré de (Brennecke, Stark et al. 2005) figure 4)

Dans ces facteurs, l'accessibilité et la localisation du site de liaison dans l'ARNm jouent un rôle clé dans la force d'inhibition par les miARN. La structure de l'ARNm peut aussi favoriser ou même nuire à la liaison du miARN et influencer son action. De plus, la présence de protéines liées à l'ARNm peut soit agir en compétition ou en collaboration pour l'association du miARN (Kertesz, Iovino et al. 2007). Il a été démontré que la position du site de liaison à l'ARN aux extrémités 3' ou 5' augmentait significativement l'inhibition de la traduction par miARN (Kloosterman, Wienholds et al. 2004, Grimson, Farh et al. 2007). De plus, la longueur du noyau du miARN influence son efficacité de répression puisque la présence d'un noyau de huit nucléotides spécifiques semble optimale. Une inhibition moins importante est notable avec sept nucléotides, mais à partir de six, il y a une perte totale de cette inhibition dans le cas d'une liaison au 3'UTR de l'ARNm (Bartel 2009). La compréhension des modes de liaisons des miARN aux ARNm cibles permet de mieux prévoir l'intensité de leur action répressive. Malgré tout, il est encore difficile d'expliquer pourquoi, dans certains, cas on observe une diminution de l'ARNm alors que dans d'autres associations le niveau d'ARNm demeure inchangé. Le domaine d'étude des miARN reste encore très complexe puisque certaines études ont même

observé une augmentation de l'expression de protéine suite à l'action d'un miARN (Vasudevan, Tong et al. 2007).

## **b) Régulation de la traduction par les miARN**

La régulation de la traduction protéique par les miRNA comporte plusieurs éléments qui compliquent la compréhension de leur effet biologique. Une des particularités des miARN est que leur fonction inhibitrice n'est pas totale. En effet, un miRNA réprime en moyenne 33 % de l'expression protéique (Baek, Villen et al. 2008). Le groupe de Flynt et Lai ont mis en lumière trois modes d'action utilisés par les miARN. Le premier mode d'action est un effet neutre où il n'y a pas d'effet biologique noté. Le deuxième mode est de type interrupteur qui a un effet drastique sur l'expression de la cible et ainsi un effet biologique marqué. Ce second mode est retrouvé surtout au niveau du développement de l'organisme où l'action d'un miARN se fait au niveau à la différenciation cellulaire (Flynt and Lai 2008). La dernière classe de modes de régulation, principalement utilisée par les miARN, consiste à produire un effet biologique de type tampon. Ce mode de régulation affecte subtilement l'expression d'une protéine cible et ce sont les effets additionnés de répression simultanée de plusieurs protéines qui produisent un effet biologique global (Flynt and Lai 2008).

Généralement, l'effet d'un seul miARN aura un effet répressif correspondant à une diminution maximale de 50% du niveau d'expression de la protéine (Baek, Villen et al. 2008). L'intensité de l'effet répressif du miARN est fortement associée au nombre de sites présents sur l'ARNm et reconnus par des miARN. Un ARNm peut contenir plusieurs sites de liaison pour un miARN, ce qui aura un effet de répression supérieure que lorsqu'un seul site est présent (Flynt and Lai 2008). De plus, un même ARNm peut être lié par différents miARN dont les effets additionnés affecteront le niveau d'expression de la protéine de façon plus importante. Ce mécanisme implique alors que plusieurs miARN, qui ont un niveau d'expression différent entre eux, peuvent affecter l'expression de la même protéine. (Friedman, Farh et al. 2009). Dans beaucoup de cas, plusieurs cibles d'un même miARN font partie de la même voie de

signalisation (Tsang, Ebert et al. 2010). L'effet biologique global est alors beaucoup plus marqué.

Certaines familles de miARN possèdent un noyau identique proposant ainsi un effet de redondance entre eux. Le premier exemple de ce phénomène fut observé par Linsley et ses collaborateurs où la famille de miR-16 participe à différentes étapes de la progression du cycle cellulaire. Dans cette étude, le groupe a identifié la présence de noyaux identiques chez miR-15, miR-16 et miR-106b (Linsley, Schelter et al. 2007). L'étude de l'effet biologique des miARN est extrêmement complexe en considérant tous les modes de régulations possibles. Le développement d'outils permettant le criblage de l'expression des miARN et de leurs cibles a contribué à éclaircir certains de ces mécanismes sophistiqués de leurs modes d'action. Enfin, l'efficacité de leur action de régulation est fortement liée à leur niveau d'expression. La régulation post-transcriptionnelle de l'expression des miARN va alors affecter l'expression de leurs protéines cibles. Tout changement dans le niveau d'expression d'un miARN peut donc avoir des conséquences biologiques.

### **c) Régulation post-transcriptionnelle de l'expression des miARN.**

La régulation de l'expression des miARN est très importante pour que leurs fonctions soient exercées adéquatement dans le but de maintenir l'homéostasie de l'organisme. Plusieurs stratégies utilisées par les miARN permettent un contrôle de leur expression. Par contre, des irrégularités dans les mécanismes de la biogenèse des miARN peuvent affecter leur efficacité. Par exemple, les perturbations dans l'expression des enzymes clés de leur maturation (Dicer ou DROSHA) vont influencer la population de miARN exprimés (Hata and Kashima 2016). Les modifications de polyadénylation dans les étapes d'épissage ou de leur transport peuvent aussi affecter leur maturation et ainsi diminuer l'expression de leur forme mature fonctionnelle (Gulyaeva and Kushlinskiy 2016). La maturation du miARN est donc extrêmement complexe et demande une régulation très précise pour assurer leur expression adéquate. Malgré tout, d'autres éléments peuvent affecter les niveaux d'expression des miARN.

Certains facteurs peuvent affecter la fonctionnalité des miARN, la stabilité et la demie-vie des miARN peuvent varier et mener ou non vers leur dégradation (Towler, Jones et al. 2015,

Gulyaeva and Kushlinskiy 2016). En effet, le niveau d'expression des miARN peut aussi être affecté par l'activité ribonucléase de certaines enzymes. Par exemple, IRE1 $\alpha$  a été associée au clivage et la dégradation de miARNs. Cette protéine effectrice de la voie des PMR du stress du RE est bien connue pour son activité ribonucléase exercée sur l'ARNm de **XBPI** (X-box binding protein 1) (Upton, Wang et al. 2012). Bien entendu, d'autres mécanismes peuvent participer à la dégradation des miARN mais généralement leur dégradation se fait en grande partie dans les exosomes (Zhang, Qin et al. 2012). Réunis, tous ces mécanismes affectant les niveaux d'expression des miARN démontrent à quel point la régulation est précise et pointue.

L'équilibre de l'expression des miARN est donc très important. Une stratégie évolutive permettant le contrôle de leur expression, est la spécificité cellulaire et tissulaire de l'expression de certains miARN. Plusieurs études ont démontré la spécificité cellulaire des miARN pendant le développement des mouches (drosophiles), poissons (poissons zébrés) et souris (Margaret 2012). Un grand nombre d'exemples pourraient être cités, par exemple l'expression spécifique d'une isoforme de tropomyosin-1 exprimée exclusivement dans l'estomac, le cerveau et l'épiderme et non dans les muscles. L'expression spécifique de miR-1 dans les muscles expliquerait la répression de cette isoforme dans ce tissu. Un fait étonnant est que cette expression de miR-1 spécifique aux tissus musculaires semble conservée chez les vertébrés (Stark, Brennecke et al. 2005). Une étude réalisée par Ludwig et ses collaborateurs a permis d'observer la distribution de la spécificité des miARN dans les tissus chez l'humain (Ludwig, Leidinger et al. 2016). Cette spécificité assure ainsi le contrôle de l'expression des miARN dans certains tissus et un déséquilibre peut mener vers un état tissulaire désorganisé. Un changement dans leur profil d'expression résulte généralement de conséquences pathologiques.

## 4. Circulation systémique et sécrétion des miARN

Dans la dernière décennie, une étonnante découverte bouleversa le monde des miARN. Des études ont démontré que ceux-ci avaient la faculté de voyager librement et stablement dans le plasma. Jusqu'à ce moment, les molécules ARN étaient toutes reconnues pour leur instabilité dans la circulation y étant rapidement dégradées par des enzymes ribonucléases (ARNases). Ces observations ont contribué à mettre les miARN dans une classe à part d'ARN. La première évidence de la sécrétion des miARN fut révélée par le groupe de Valadi lors d'une étude *in vitro* où les exosomes sécrétés dans le milieu contenaient une population de miARN qui pouvaient exercer une action de répression spécifique dans une cellule hôte (Valadi, Ekstrom et al. 2007). Dans l'étude de Chim et collaborateurs, la présence de miARN fut observée dans le plasma de femmes enceintes et conclurent que ces miARN provenaient en fait du placenta (Chim, Shing et al. 2008). Par la suite, la présence de miARN sécrétés dans l'organisme fut confirmée subséquemment à leur détection dans la majorité des fluides humains (Weber, Baxter et al. 2010). Plusieurs recherches apportèrent ensuite de nombreuses évidences sur les niveaux de miARN détectés dans les fluides qui peuvent être associés à des maladies (De Guire, Robitaille et al. 2013). Ces études ouvrirent donc la porte à une nouvelle classe de biomarqueurs.

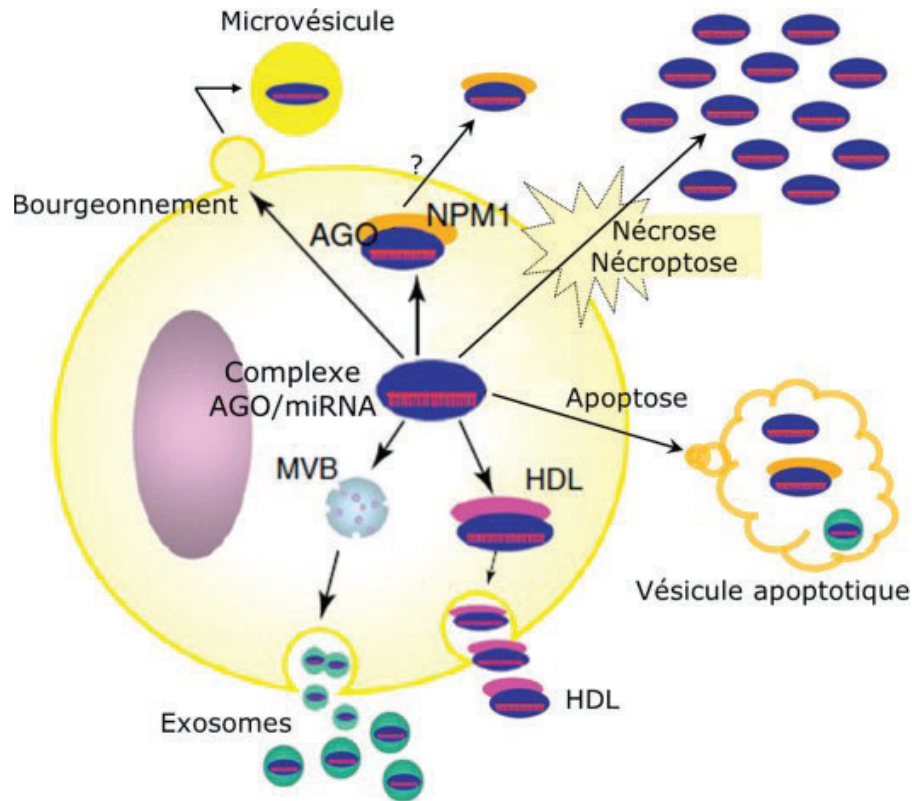
### a) Mode de sécrétions des miARN et communication cellulaire

La détection de miARN dans la circulation éveilla une série de questions sur les mécanismes possibles permettant la stabilité des miARN sécrétés. À ce jour, les modes de sécrétion de miARN peuvent être classés en deux catégories : la sécrétion passive et la sécrétion active. La sécrétion passive consiste en la libération de miARN suite à l'augmentation de perméabilité vasculaire, de bris tissulaire, d'inflammation ou lors de mort cellulaire soit par apoptose ou nécrose (**Figure 15**). En ce qui a trait à la sécrétion active, elle peut se produire soit par bourgeonnement, par la libération de microvésicules ou exosomes ou par une sécrétion de miARN non encapsulés, mais associés à un complexe protéique (Chen, Liang et al. 2012). Lors de la sécrétion active de miARN, la protéine AGO2 est étroitement liée à leur stabilité en circulation. Seule l'association d'AGO2 avec le miARN est suffisante pour lui permettre de



voyager librement dans la circulation et ce sans l'aide de transport vésiculaire (Arroyo, Chevillet et al. 2011). De plus, l'enrichissement d'AGO2 dans les exosomes suggèrent son implication dans la stabilité de miARN encapsulés (Gibbings, Ciaudo et al. 2009). D'autres protéines liant l'ARN ont aussi été associées à la stabilisation des miARN extracellulaires. La protéine nucléophosmine 1 (**NPM1**) a aussi été observée pour s'associer aux miARN sécrétés (Wang, Zhang et al. 2010). Les miARN peuvent aussi se retrouver dans les fluides de l'organisme liés aux lipoprotéines. En effet, il a été noté dans l'étude de Vickers, que les miARN associés aux HDL sont fonctionnels et exercent une répression spécifique dans les cellules récipients (Vickers, Palmisano et al. 2011). Ces différentes stratégies permettent aux miARN d'avoir la particularité de circuler dans les fluides en évitant la dégradation (**Figure 15**).

La présence de miARN dans les vésicules est maintenant bien établie et fait aussi partie des stratégies qu'ils utilisent pour assurer leur stabilité (**Figure 15**). La sécrétion de microvésicules semble commune à plusieurs types cellulaires : les plaquettes, les lymphocytes, les cellules neuronales, les cellules endothéliales, etc. De nombreuses études démontrent la capacité des miARN à réguler l'expression de gènes via une communication intercellulaire les catégorisant comme de nouveaux messagers de type « hormone » (Chen, Liang et al. 2012). Des effets biologiques des miARN intercellulaires ont été observés suite à leur sécrétion par les exosomes ou les microvésicules. Effectivement, des microvésicules sécrétées par les cellules THP-1 (Lignée de monocytes dérivants de monocytes d'un patient leucémique) contenant une forte abondance de miR-150 ont la capacité d'avoir un effet répressif sur l'expression d'un de leurs gènes cibles *cMYC* qui est exprimé dans les cellules endothéliales de microvaisseaux humains. L'inhibition de l'expression des protéines ciblées par miR-150 provoquait alors un effet positif sur la migration de ces CE (Zhang, Liu et al. 2010). Inversement, les CE peuvent aussi avoir un effet sur l'activation des monocytes par la sécrétion de microvésicules contenant des miARN pro-inflammatoires (Njock, Cheng et al. 2015). Les mécanismes de formation de vésicules incorporant des miARN et de reconnaissance des cellules cibles restent encore très méconnus. Ce qui contribue à augmenter les défis à surmonter lors de l'étude des mécanismes d'action biologique des miARN et de leur impact sur les pathologies.



**Figure 15.** Modes de sécrétions des miARN (tiré de Zendjabil 2017)

## b) Biomarqueurs et diagnostique

La découverte de la présence des miARN dans la majorité des fluides humains a provoqué une explosion d'études sur l'association d'un niveau d'expression spécifique à une pathologie donnée. On parle alors de signature d'expression de miARN, dont les premières ont été associées à la détection de différents cancers (Chen, Ba et al. 2008, Lawrie 2008, Mitchell, Parkin et al. 2008). Le problème principal découlant de cette découverte fut que plus le nombre d'études n'augmentaient et moins les résultats semblaient aller dans le même sens. L'exemple de miR-141 illustre bien la complexité des résultats obtenus. D'abord, sa surexpression fut associée avec l'avancement de la grossesse (Chim, Shing et al. 2008). Par la suite, d'autres études démontrèrent sa surexpression lors de différents cancers (Cheng, Zhang et al. 2011, Gonzales, Fink et al. 2011, Selth, Townley et al. 2013). La communauté scientifique dû faire

part de rigueur lors d'analyse des données et ont dû tenir compte de plusieurs aspects pendant leur l'étude. Premièrement, au moment de la planification de l'étude, il est important de tenir compte du sexe et de l'âge des patients dans chaque groupe pour s'assurer l'homogénéité des groupes. Par exemple, des groupes contenant plus d'hommes ou plus de femmes pourraient altérer les résultats. Il a été démontré qu'il y avait une expression plus élevée de miR-130b et miR-80b chez les hommes et que chez les femmes. L'âge est aussi un facteur important à être considéré lors de la formation des groupes à l'étude puisque le vieillissement a aussi un effet sur l'expression des miARN (ElSharawy, Keller et al. 2012, Wang, Yuan et al. 2012). De plus, tout patient souffrant d'une autre maladie que celle à l'étude devrait être exclue pour ne pas affecter les résultats. Deuxièmement, la signature des miARN semble être exclusive à un fluide donné. Par exemple certains miARN seront présents seulement dans le plasma et non dans les larmes ou la salive (Weber, Baxter et al. 2010). Finalement, il est important de tenir compte des différents modes de sécrétions, afin de comparer entre eux les effets des miARN encapsulés et ceux en libre circulation.

La reproductibilité des résultats dépend non seulement du fait que l'on compare les mêmes fluides pour la signature de miARN pour une maladie donnée, mais dépend en plus des méthodes d'extractions des miARN provenant du fluide en question. En fait, toutes les étapes expérimentales peuvent être propices à l'altération de la signature des miARN (De Guire, Robitaille et al. 2013). Pour cette raison, plusieurs études ont comparé les méthodes expérimentales et ont permis à la communauté scientifique de mieux choisir ses outils selon ses avantages et ses inconvénients (Pritchard, Cheng et al. 2012). Par exemple, il a été noté que le fait de changer de plateforme expérimentale peut modifier les résultats (Lander 1999, Johnson, Li et al. 2007). La rigueur de la démarche expérimentale est de mise pour assurer la validité des résultats.

Une fois que la partie expérimentale est accomplie, c'est l'étape d'analyse qui suit. Cette étape est très importante pour obtention d'un résultat représentant le plus près possible la réalité biologique liée à la pathologie et au sujet sain. L'avancement des méthodes de détection des miARN et l'utilisation de cartes de miARN a été très utile. Ces cartes peuvent contenir un groupe de miARN potentiels pouvant être détectés dans l'essai. Elles sont très avantageuses

considérant la capacité des miARN à cibler plusieurs gènes ou pour étudier les miARN connus pour être associés à des voies biologiques impliquées dans la pathologie étudiée. Cependant, les données deviennent de plus en plus complexe à analyser et demandent des analyses bioinformatiques exhaustives. La normalisation des données est une étape cruciale qui peut avoir un effet important sur les résultats obtenus. De plus, pour renforcer leur valeur des biomarqueurs, l'utilisation de plus d'une signature de miARN associée à la maladie est fortement suggéré. Certains miARN sont liés à plus d'une maladie. La combinaison de la surexpression et de la répression de différents miARN augmente de façon importante la spécificité du biomarqueur (De Guire, Robitaille et al. 2013). Le potentiel de l'utilisation des miARN pour la détection des maladies est énorme, mais demande une importante rigueur scientifique provenant de ceux qui effectuent ces recherches autant au niveau expérimental que lors des analyses (De Guire, Robitaille et al. 2013).

## **5. Implication dans les pathologies**

Avec l'innombrable quantité d'études sur l'utilisation des miARN pour la détection de maladies, il est devenu clair qu'un changement de leur expression est peut-être associé de façon spécifique au développement de pathologies. Effectivement, un changement dans l'expression de miARN peut avoir d'importantes conséquences biologiques en modifiant la synthèse de leurs protéines cibles. La régulation de leur expression se fait d'abord au niveau transcriptionnel. Ainsi, des modifications dans leur promoteur comme la présence de méthylation ou même de mutations affectant la liaison des facteurs de transcription peuvent changer le niveau de transcription des miARN. Par exemple, l'hyperméthylation du promoteur de miR-132 réduit son expression et est associée au cancer du côlon (Qin, Ke et al. 2015). De plus, les changements dans l'expression de leurs facteurs de transcription vont affecter les niveaux de miRNA qui sont exprimés ensuite. La variation de l'expression de facteurs de transcription peut dépendre d'un grand nombre de phénomènes internes (biologiques) ou externes (environnementaux). La surexpression d'hormones et le stress peuvent par exemple affecter le niveau d'expression de certains miARN (Katchy and Williams 2016).

L'avancement des études a permis un certain classement des miARN selon leur effet biologique. Certains favorisant, par exemple, la formation de cancer (oncomiR), l'inflammation ou encore l'angiogenèse. Ces derniers furent classés dans la famille des angiomiR dont il sera

question dans la prochaine section. Ceux-ci peuvent agir soit de façon pro-angiogénique ou anti-angiogénique ayant la capacité d’agir sur l’activité biologique des CE et la croissance des vaisseaux sanguins. Ils sont en plus, impliqués dans un grand nombre de pathologies vasculaires.

#### a) Les angiomiR

Les premières études démontrant l’importance de miARN dans l’angiogenèse ont été réalisées par la délétion des enzymes indispensables à leur biogenèse: DROSHA et Dicer. Une étude, qui démontre bien l’impact biologique important se produisant lors d’un défaut de maturation des miARN, est celle où une délétion globale de Dicer a été produite *in vivo*. Cette absence de Dicer s’est avérée létale chez la souris au stade embryonnaire E7.5 (Bernstein, Kim et al. 2003). Les délétions de Dicer ont ensuite été produites dans des types cellulaires précis. Par exemple, chez les souris dont Dicer est supprimé dans les CE exclusivement, les CE démontrent des défauts dans les réponses angiogéniques suite à une hypoxie/ischémie ou après une exposition au VEGF (Suarez, Fernandez-Hernando et al. 2008). Il a été noté que cette délétion spécifique aux CE provoque une surexpression du facteur thrombospondine 1 (TSP-1) un anti-angiogénique puissant. La simple inactivation *in vitro* des enzymes DROSHA et Dicer par l’utilisation de siARN dans les CE provoque, en plus, une inhibition de la formation de tubules dans le matrigel. Les effets de l’inactivation de Dicer semblent, par contre, plus importants que ceux observés avec DROSHA (Kuehbach, Urbich et al. 2007, Suarez, Fernandez-Hernando et al. 2007, Suarez, Fernandez-Hernando et al. 2008). Depuis, il est clair que la dérégulation de l’expression et de la maturation des miARN est cruciale pour plusieurs réponses biologiques dont l’angiogenèse. L’inhibition d’enzymes importantes pour la maturation des miARN démontrent bien, d’un point de vue global, leur importance biologique. Néanmoins, le changement d’expression d’un ou de certains miARN comporte aussi des effets biologiques notables.

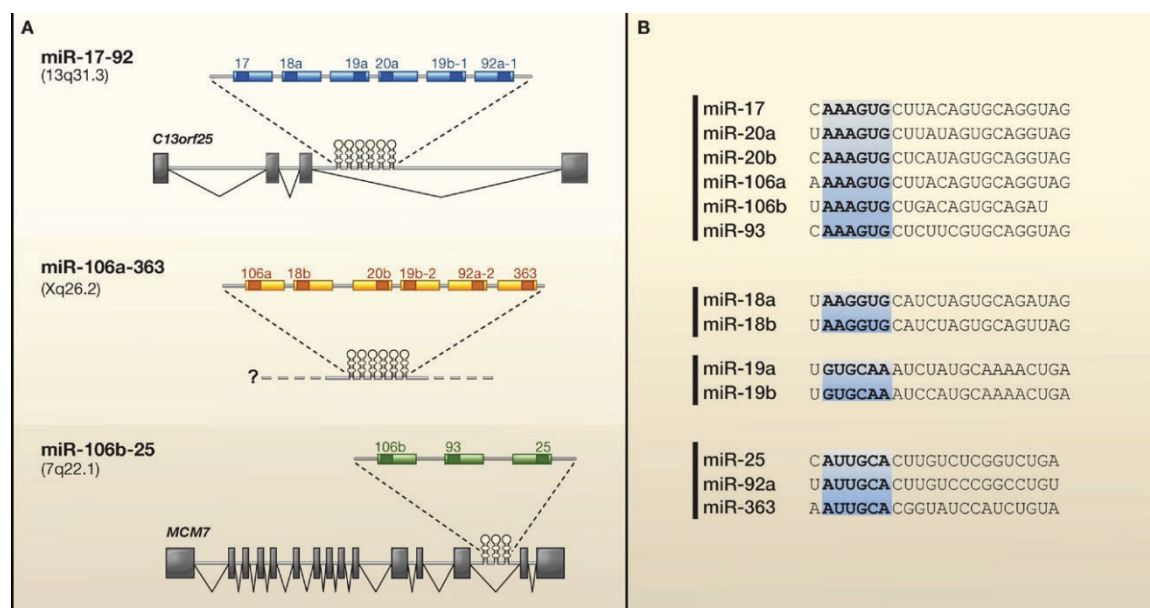
Certains miARN sont spécifiquement associés à des fonctions angiogéniques. Par exemple, miR-126 est l’unique miARN qui a été identifié pour être exprimé exclusivement dans les CE. Celui-ci a un rôle important dans l’intégrité vasculaire et l’angiogenèse (Wang, Aurora et al. 2008). L’identification des miARN clés de la régulation de l’action des CE pendant

l'angiogenèse s'est fait lors d'une étude réalisée en 2006 résultant de l'identification de 27 miARN fortement exprimés dans des cellules endothéliales ombilicales humaines (HUVEC). Une quinzaine d'entre eux ont été prédits pour cibler des récepteurs angiogéniques (Poliseno, Tuccoli et al. 2006). Ces études ont permis d'identifier une série de miARN pouvant être classés dans les angiomiR incluant la famille de Let-7, miR-10a, le polycistron miR17-92, miR126, miR130a, miR132, miR-210, miR-218, miR-221/222, miR-296 et miR-320. Leur action sur les CE et leurs gènes cibles qui sont responsables de participer à l'angiogenèse est très bien détaillée dans l'article de revue de Landskroner (Landskroner-Eiger, Moneke et al. 2013). Ainsi, certaines familles de miARN sont davantage associées aux mécanismes biologiques impliqués dans l'angiogenèse.

### **b) Les membres de la famille miR-17**

La famille de miR-17 est un bon exemple de miARN faisant partie des AngiomiR. Celle-ci incluent trois polycistrons différents: miR17~92, miR106a~363 et miR106b~25 qui ont été classés dans la même famille. Cette classification est due au fait que certains d'entre eux ont la séquence de leur noyau identique et sont considérés des paralogues tels miR-17, miR-20a, miR-20b, miR106a, miR106b et miR-93 (**Figure 16**). Ces miARN ont donc des effets redondants sur leurs cibles, mais leur expression est régulée différemment. Effectivement, ils sont localisés sur différents chromosomes et dans les introns de gènes hôtes différents (Mendell 2008) et **Figure 16**). Le polycistron miR17~92 a d'abord été identifié en tant qu'oncomiR pour sa capacité, en ciblant cMYC, à induire des lymphomes des cellules B (He, Thomson et al. 2005). Ce polycistron contient six miARN dont miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b1 et miR-92a (Mendell 2008). Le premier lien fait avec l'angiogenèse fut en 2006 où un groupe démontra la capacité de miR-17-92 à inhiber la production de la protéine anti-angiogénique **TSP-1** (Dews, Homayouni et al. 2006). Ensuite, l'étude de Suarez réalisée en 2008 a démontré que la réintroduction des miARN de cette famille ciblant le VEGF permettait de rétablir les propriétés angiogéniques des CE ayant subi une délétion de DICER (Suarez, Fernandez-Hernando et al. 2007, Suarez, Fernandez-Hernando et al. 2008). Plus récemment, lors de l'étude menée par le Dr. Nunes et ses collègues, il a été observé que les miARN de la famille de miR-17 sont réprimés après une induction de l'hypoxie dans les tissus de la rétine

lors de l'utilisation du modèle murin OIR. En effet, lorsque la rétine est analysée les heures suivants la sortie de la chambre d'hyperoxygénation (P12), on note une diminution de l'expression de cette famille de miARN qui participe à l'initiation de l'angiogenèse pathologique. Cette diminution a ensuite comme impact une surexpression des facteurs pro-angiogéniques tels VEGFA et HIF1a qui sont ciblés par ces miARN (Nunes, Dias Neto et al. 2015). D'autres études préalables avaient aussi montré des évidences de l'activité anti-angiogénique des membres du polycistron miR-17~92. En effet, leur surexpression dans les cellules endothéliales diminuait la formation de tubules dans le matrigel. Il a été, en plus, démontré que l'inhibition *in vivo* de miR-92a, favorisait la croissance vasculaire (Bonauer, Carmona et al. 2009, Doebele, Bonauer et al. 2010). Dans une autre étude, il a été noté que la délétion du polycistron miR-106b~25 chez des souris ayant subi une ischémie fémorale provoque un défaut de revascularisation du muscle de la cuisse (Semo, Sharir et al. 2014). L'angiogenèse est un phénomène biologique des plus importants et sa régulation par les miARN est loin d'être totalement comprise, mais les recherches futures pourraient apporter de nouvelles façons de réguler l'angiogenèse pathologique.



**Figure 16.** Famille de miR-17 et la séquence de leur noyau, tiré de (Mendell 2008)

### c) Implication des miARN dans les maladies oculaires

L'identification de miARN responsables de la régulation de l'angiogenèse a permis d'étudier leur rôle plus spécifique au niveau de la formation de NV oculaire. Dans le cadre de cette étude, le focus sera sur le rôle des miARN dans la forme humide de la DMLA (avec CNV). Une récapitulation des études sur l'implication des miARN dans la pathogenèse de la DMLA fut réalisée par Kawa en 2014 et ensuite mise à jour par Berber et ses collaborateurs quelques années plus tard (Berber, Grassmann et al. 2017). Dans cette dernière revue, une liste exhaustive de miARN fut créée par la combinaison des études soit *in vitro* ou *in vivo*, à l'aide de modèles murins ou associés à la signature observée chez les patients. Cette analyse exhaustive de la littérature a permis de faire ressortir certains miARN qui à la fois ont une expression dérégulée chez les patients et dans des modèles expérimentaux. Par exemple miR-146a, miR-17 miR-125 et miR-155 sont surexprimés dans le modèle murin OIR, dans les cellules humaines EP de la rétine ayant subi un stress oxydatif et dans la rétine ou le vitré de patients souffrant de DMLA. Alors que miR-106b et miR184 étaient plutôt diminués chez les patients souffrant de DMLA et dans le modèle OIR (Berber, Grassmann et al. 2017). Certains de ces miARN semblent très prometteurs pour le développement de traitements. En effet, miR-146a, miR-184 et miR-155 sont impliqués dans l'angiogenèse et l'inflammation, des processus biologiques qui font partie de la pathologie. Par exemple, une délétion de miR-155 chez les souris avait un effet préventif sur la NV dysfonctionnelle formée dans le modèle OIR et un effet négatif sur la population de microglies. Curieusement, il a même été démontré que la corrélation inverse entre l'expression de miR-155 et miR-184 semble être associée dans les mécanismes inflammatoires chez certaines infections (Derrick, Last et al. 2016). Certains groupes comme celui de Shen et ses collaborateurs ont utilisé les technologies de *microarray* pour identifier une signature spécifique des miARN de rétines de souris hypoxiques. Ils ont noté une augmentation de certains miARN (miR-106a, miR-146, miR-181, miR-199a, miR-214, miR-424 et miR-451) alors que d'autres avaient une expression diminuée (miR-31, miR-150 et miR-184). Il est intéressant de noter que le rétablissement de l'expression des pré-miR-31, pré-miR-150 et pré-miR-184 permettait une diminution de NV présente dans ces modèles murins (Shen, Yang et al. 2008). L'augmentation du nombre d'études sur les miARN impliqués dans la DMLA permet de mieux comprendre leur



action dans la pathogenèse de cette maladie et ainsi les utiliser soit au niveau de développement de nouvelles stratégies thérapeutiques ou pour développer des tests diagnostic plus spécifiques à cette maladie.

## **6. Traiter avec les miARN**

La recherche sur le potentiel thérapeutique des miARN apporte de nombreux défis de taille. Comme il est largement discuté dans l'article de revue de Li et Rana, plusieurs éléments doivent être tenus en compte lors du développement thérapeutique ciblant les miARN (Li and Rana 2014). En fonction de la stratégie utilisée, il faut tenir compte de différents éléments. Par exemple, si le but est de rétablir l'expression d'un miRNA sous exprimé (mimétisme ou mimique) ou à l'inverse diminuer sa surexpression (inhibition ou antagomiR). Il faut considérer la stabilité de la molécule injectée, la spécificité des méthodes de livraison et les effets secondaires. Ces derniers peuvent être causés par la liaison du miRNA à d'autres cibles non impliquées dans la pathologie en question. Trois méthodes différentes d'inhibition utilisant des anti-miARN synthétiques ou des plasmides d'expression sont connues. Les éponges de miARN ont été développées dans le but d'entrer en compétition avec les ARNm ciblés. Cette méthode consiste à utiliser des plasmides contenant des sites complémentaires pour favoriser la liaison d'un ou des miARN et ainsi annuler leur effet répressif sur l'ARNm (Ebert, Neilson et al. 2007). Une deuxième façon d'inactiver les miARN est de produire des molécules anti-sens qui s'associeront spécifiquement avec ceux-ci. Finalement, une dernière méthode est l'utilisation de molécules inhibant certaines étapes de la biogenèse des miARN et bloque la maturation de ceux-ci (Landskroner-Eiger, Moneke et al. 2013, Li and Rana 2014). Une fois la méthode d'inactivation ou d'expression du miARN est choisie, l'élément suivant à considérer est comment celui-ci sera administré.

La façon dont sont livrées ces molécules joue un rôle primordial dans l'efficacité des miARN de moduler de façon souhaitée l'expression protéique. La spécificité tissulaire de la bioactivité recherchée de ces molécules représente encore un défi important pour leur utilisation thérapeutique. L'injection de ces molécules non couplées limite grandement leur distribution dans les tissus. Plusieurs stratégies ont été mises en place pour optimiser leur livraison. Par

exemple, le couplage miR-122 à une molécule de cholestérol a permis d'augmenter son effet d'antagomiR dans plusieurs tissus (Kruzfeldt, Rajewsky et al. 2005). L'utilisation des liposomes, originalement développé pour le transport de siARNs est aussi une autre option de livraison (Morrissey, Lockridge et al. 2005). Le développement de thérapies ciblant les miARN est en constante progression. Beaucoup de travail reste encore à faire sur la compréhension de leur fonction biologique et de leur régulation de la traduction protéique. Il faut, en plus, garder en tête que certains miARN peuvent avoir des effets redondants avec leur noyau identique et que leurs actions se font en fonction de leur spécificité tissulaire. Ensembles, les caractéristiques des miARN provoquent un énorme casse-tête pour la prédiction des effets secondaires possibles lors de leur utilisation thérapeutique. Malgré les défis de la thérapie ciblant les miARN, plusieurs études progressent au niveau clinique et semblent très prometteuses (Li and Rana 2014, Li and Rana 2014).

#### **a) La thérapie avec les miARN et la DMLA**

Il y a encore très peu d'études sur la modulation thérapeutique des miARN en phase clinique. Le seul étant en phase II est le produit Miravirsén par la compagnie Santaris Pharma au Danemark. Cette molécule est un anti-sens, un antagomiR de miR-122. L'utilisation d'un inhibiteur de miR-122 se fait dans le cadre d'infection HCV (Jopling, Yi et al. 2005, Li and Rana 2014). Des études sur une molécule mimique de miR-34, connue pour ses capacités de suppression de tumeurs a réussi à se rendre aux études cliniques de phase I, mais a dû être avorté puisque des effets secondaires immunitaires furent notés (Bouchie 2013, Li and Rana 2014). Ce qui démontre les défis de taille qui attendent les groupes de recherche clinique. Le plus grand défi est d'assurer la distribution, l'absorption et le métabolisme adéquats de ces nouvelles molécules introduites dans l'organisme. Par exemple, il a été observé que l'administration orale apportait une absorption limitée de ces molécules. L'administration locale (topique, intraoculaire) de ce type de molécules semble plus efficace et même plus que les modes d'injections sous-cutanées ou intraveineuses qui doivent passer par le métabolisme du foie avant de se rendre au tissu ciblé. Dans le cas des patients souffrant de la DMLA, ils reçoivent déjà des injections locales intraoculaires lors de l'administration des anti-VEGF. Cette administration locale est considérée non-invasive, rapide et facile d'administration. L'injection de miARN

directement dans l'œil pourrait être avantageuse puisqu'elle permettrait une action directe sur les tissus de l'œil sans passer par la circulation. D'autres études cliniques utilisent les injections subrétinaux, mais cette technique se fait par une intervention chirurgicale plus invasive (Chakraborty, Sharma et al. 2017). Le développement de vecteurs stables pour moduler l'expression de miARN dans le but de traiter les pathologies est en constante évolution. Il ne demeure pas moins que le potentiel thérapeutique est loin d'être négligeable et très prometteur.

Considérant les éléments de la littérature nous avons posé **l'hypothèse suivante**: *La détection de miARN spécifiques à la DMLA chez l'humain pourrait apporter de nouvelles pistes pour développer des biomarqueurs et aussi de nouvelles avenues thérapeutiques*. Notre **premier objectif** était d'identifier chez l'humain une signature de miARN spécifiques à la forme humide de la DMLA ainsi que d'identifier, à l'aide de bases de données, les polymorphismes associés à la DMLA qui sont présents dans les gènes cibles des miARN identifiés. Notre **deuxième objectif** était d'explorer la possibilité d'utiliser, au point de vue thérapeutique, un des miARN identifiés au 1er objectif, en étudiant le mécanisme d'action influençant la régulation de l'expression du miR sélectionné et son effet sur l'angiogenèse pathologique.

## **Chapitre 2 : Article 1**

## 1. Mise en contexte

La DMLA est une pathologie oculaire de la rétine dont l'incidence est directement associée au vieillissement de la population. La forme la plus sévère se manifeste par la croissance de vaisseaux pathologiques et perméables (CNV) provenant de la choroïde et migrant vers la rétine. Cette forme de DMLA est la plus néfaste sur la vision et provoque des dommages irréversibles. La détection précoce de l'apparition de la forme humide de la DMLA pourrait être utile pour intervenir plus tôt et espérer pouvoir la progression de la maladie. L'utilisation d'un biomarqueur pour la détection de cette pathologie permettrait le diagnostic avant les premiers signes de pertes de vision. La détection de signatures d'expression de miARN en circulation démontre un fort potentiel en tant que biomarqueur. De plus, l'identification de la présence de polymorphisme de nucléotides (SNPs) présents dans les sites de liaisons de miARN localisés dans des gènes associés au développement de la forme humide de la DMLA pourrait servir d'outil pour l'établissement de nouveaux biomarqueurs. L'objectif principal de cette étude était donc de réaliser un criblage des miARN présent dans le vitré de patient souffrant de la forme avancée de la DMLA et d'établir une corrélation avec leur niveau d'expression dans la circulation sanguine. L'objectif suivant était d'identifier des SNPs associés à la forme humide de la DMLA et présents dans les sites de liaisons des miARN trouvés préalablement. Cette étude est une des pionnières de la détection de miARN dans le vitré humain et la première à faire une corrélation avec leur présence dans le plasma. Bien que beaucoup de recherches se soient penchées sur les signatures d'expression spécifiques de miARN dans les cancers, très peu d'études ont à ce jour fait l'association avec la DMLA.

## 2. Contributions des auteurs

Toutes les expériences ont été réalisées par moi-même Catherine Ménard. Les échantillons de vitrées et de sang ont été obtenue par Dr Flavio A. Rezende. Dr Khalil Miloudi a analysé les résultats du criblage des miARN dans le vitré et produit la carte d'expression. Toutes les analyses des résultats ont été effectuées par Catherine Ménard et vérifiées par Dr Khalil Miloudi. L'analyse de polymorphismes de nucléotides a été réalisée à l'aide de tests bio-informatiques réalisés par le Dr John Paul SanGiovanni. L'article a été entièrement rédigé par Catherine Ménard et ensuite, vérifié et corrigé par Dr Khalil Miloudi, Dre Ariel Wilson, Dr Nicholas Tétreault, Dr Pierre Hardy, Dr Vincent De Guire et Dr Przemyslaw Sapieha. Les tableaux et figures ont été conceptualisés et montés par Catherine Ménard et finalisés par Dr Khalil Miloudi. **Article publié dans Oncotarget en mars 2016**

### 3. Article

#### MicroRNA signatures in vitreous humour and plasma of patients with exudative AMD

Catherine Ménard<sup>1</sup>, Flavio A. Rezende<sup>2</sup>, Khalil Miloudi<sup>4</sup>, Ariel Wilson<sup>3</sup>, Nicolas Tétreault<sup>1</sup>, Pierre Hardy<sup>5</sup>, John Paul SanGiovanni<sup>6</sup>, Vincent De Guire<sup>7</sup> and Przemyslaw Sapieha<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup> Department of Biochemistry, Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Centre, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

<sup>2</sup> Department of Ophthalmology, Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Centre, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

<sup>3</sup> Department of Engineering Physics, École Polytechnique de Montréal, Laser Processing and Plasmonics Laboratory, Montreal, Quebec, Canada

<sup>4</sup> Department of Neuroscience, McGill University, Montreal, Quebec, Canada

<sup>5</sup> Departments of Pediatrics and Pharmacology, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

<sup>6</sup> Laboratory of Membrane Biochemistry and Biophysics, Nutritional Neuroscience Section, NIAAA, NIH, Bethesda, MD, United States of America

<sup>7</sup> Department of Clinical Biochemistry, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Quebec, Canada

*Correspondence to:* Przemyslaw Sapieha, *email:* [mike.sapieha@umontreal.ca](mailto:mike.sapieha@umontreal.ca)

*Correspondence to:* Vincent De Guire, *email:* [vdeguire.hmr@ssss.gouv.qc.ca](mailto:vdeguire.hmr@ssss.gouv.qc.ca)

*Keywords:* age-related macular degeneration, AMD, microRNAs, miRNA, biomarkers, Gerotarget

*Received:* January 14, 2016 *Accepted:* March 10, 2016 *Published:* March 22, 2016

#### a) ABSTRACT

Age-related macular degeneration (AMD) is a leading cause of blindness worldwide affecting individuals over the age of 50. The neovascular form (NV AMD) is characterized by choroidal neovascularization (CNV) and responsible for the majority of central vision impairment. Using non-biased microRNA arrays and individual TaqMan qPCRs, we profiled miRNAs in the vitreous humour and plasma of patients with NV AMD. We identified a disease-associated increase in miR-146a and a decrease in miR-106b and miR-152 in the vitreous humour which was reproducible in plasma. Moreover, miR-146a/miR-106b ratios discriminated patients with NV AMD with an area under the Receiver Operating Characteristic curve (ROC AUC) of 0,977 in vitreous humour and 0,915 in plasma suggesting potential for a blood-based diagnostic. Furthermore, using the AMD Gene Consortium (AGC) we mapped a NV AMD-associated SNP (rs1063320) in a binding site for miR-152-3p in the HLA-G gene. The relationship between our detected miRNAs and NV AMD related genes was also investigated using gene sets derived from the Ingenuity Pathway Analysis (IPA). To our knowledge, our study is the first to correlate

vitreal and plasma miRNA signatures with NV AMD, highlighting potential future worth as biomarkers and providing insight on NV AMD pathogenesis.

## **b) INTRODUCTION**

Age-related macular degeneration (AMD) is a progressive retinal pathology affecting the elderly. It is estimated that over 10 million Americans have a form of AMD and this figure is predicted to triple in the next 25 years [1, 2]. Consequently, AMD is the most important cause of vision loss in individuals over 50 and by some estimates affects more than 25% of the population over 80 years of age [3, 4]. There are two major clinical subtypes of sight-threatening AMD: dry atrophic AMD and wet exudative AMD [5]. Dry AMD is characterized by geographic atrophy while the neovascular form of AMD (NV AMD), by the growth of abnormal leaky choroidal vessels into the retina [6]. The exudative form is responsible for the majority of central vision impairment and legal blindness and accounts for 90% of clinical cases with loss of sight [1].

While genome-wide association (GWA) studies have successfully identified genetic links to AMD, there remains a void in our understanding of how extrinsic modulators of gene expression impact disease outcome. In this regard, there has been growing interest over the last decade in small non-coding RNAs called microRNAs (miRNAs) and their role as potent suppressor of gene expression in health and disease [7]. It is current thought that miRNAs control the expression of over a third of human genes and are key regulators of every primary biological process including angiogenesis, inflammation, cellular proliferation, apoptosis, differentiation, organogenesis and many more [8-11]. To date, more than 2000 of these small RNAs of about 20 nucleotides have been identified in humans and they are highly conserved throughout species [7]. Interestingly, hundreds of small RNAs have been detected in a spectrum of body fluids such as blood, urine, vitreous humour, saliva, cerebrospinal fluid and more [12, 13]. Studies have shown that in addition to being detectable in blood cells, miRNAs circulate in secreted exosomes [14, 15], micro-vesicles [16], apoptotic bodies [17], bound to the AGO2 complex [18] and in lipoproteins [19]. Much like hormones, miRNAs are secreted and provide highly specific signatures for conditions ranging from kidney disease to cancer. Moreover, SNPs that can disrupt or enhance binding of miRNAs have been reported in microRNA binding sites (miRSNPs) in specific genes and polymorphisms in miRNA binding sites are currently being

assessed as potential biomarkers in oncology [20]. Interestingly, several circulating miRNAs are involved in the regulation of angiogenic and inflammatory process that are at the center of AMD pathophysiology [11, 21].

In the present study, we profiled miRNAs in the vitreous humour and plasma of patients suffering from NV AMD and control patients with non-vascular ocular pathology. We were able to identify a differential expression profile for 3 miRNAs (miR-146a-5p, miR-106b-5p, and miR-152-3p) in vitreous humour and validated this profile in circulation. We applied our findings on differential miRNA expression patterns to results from the AMD Gene Consortium (AGC) [22] and searched for NV AMD-associated DNA sequence variants resident in genomic regions encoding our three NV AMD-associated miRNAs and 484 associated binding motifs. We identified a NV AMD-associated sequence variant in HLA-G (rs1063320) that overlapped a genomic region with the capacity to encode a binding motif for hsa-miR-152-3p. In addition, numerous sequence variants resident in genes encoding products that are regulated by miR-146a-5p, miR-106b-5p and miR-152-3p are strongly associated with NV AMD. To our knowledge, this study is the first to identify miRNA signatures in patients suffering from NV AMD and highlights their potential future applications as diagnostic or prognostic tools.

### c) RESULTS

#### **Profiling miRNAs in vitreous humour reveals distinct expression patterns in patients with NV AMD compared to control patients with nonvascular ocular pathology**

All AMD patients undergoing miRNA profiling were diagnosed with pronounced CNV by Optical Coherence Tomography (OCT) (Figure 1A and 1B, right panels) and fundus image analysis (Figure 1A and 1B, left panel) before collection of vitreous humour. Patient characteristics are outlined in Tables 1 and 2. The vitreous humour of patients with nonvascular pathology (epiretinal membrane or macular hole) was used as a control. Large scale miRNA profiling using micro arrays (panel A: Applied Biosystems) was conducted on the vitreous humour of 4 patients with NV AMD and 2 control patients (work flow in Figure 1C). After analyzing individual amplification curves, 26 miRNAs had detectable amplification profiles (Figure 1D-1F). Of these, 5 miRNAs showed disease-specific expression profiles after weighted mean normalization and determination of qPCR efficiency (Figure 1E) [23, 24] where qPCR



efficiencies were calculated with raw fluorescence values and gave a more precise estimation of the quantity of miRNA in the sample. This additional analysis is useful to compare qPCR reactions with similar efficiency and avoid a batch effect between different plates and qPCR reactions [25]. We applied a cut-off of 80% efficiency and excluded results under this limit. Specifically, vitreous from patients with NV AMD showed an increase in the levels of miR-548a (3.58 fold; P= 0.04) and miR-146a-5p (6.2 fold; P= 0.020) and a decrease for miR-106b (-5,73 fold; P= 0.010), miR-152 (-5,63 fold; P= 0.046) and miR-205 (-3.56 fold; P= 0.047) (Figure 1G) Together, these results offer novel evidence for differential miRNA expression in the vitreous of patients with exudative AMD, suggestive of either their implication in AMD pathology or being produced as a consequence of NV AMD.

### **Validation of NV AMD-associated miRNAs in vitreous humour of larger cohorts**

In order to ascertain validity of the data obtained by micro arrays, we evaluated miRNA expression profiles by individual TaqMan micro in a larger cohort of patients (Table 1). As housekeeping miRNAs are not established for vitreous humour and qPCR array data did not yield a candidate, we normalized using the weighted mean of qPCRs. Results were normalized and presented as log<sub>2</sub>- transformed qPCR fold-change (Figure 2). In addition, we included corresponding fold change values in linear scale to appreciate the difference between groups. Consistent with micro array data, individual miRNA qPCRs confirmed an increase in levels in the vitreous humour of patients with NV AMD of miR-146a (Figure 2A) by ~ 3 ( $3.02 \pm 0.5830$ ), and a decrease in levels of 152 (Figure 2C) by ~ 3 ( $0.33 \pm 0.132$ ). Levels of miR- 106b also decreased (Figure 2B) by ~4 ( $0.23 \pm 0.0797$ ) in NV AMD patients where this miRNA was predominantly undetected (corresponding log<sub>2</sub> values: miR-146A,  $2.02 \pm 0.3587$ ; P = 0.0043; miR-106b,  $-1.92 \pm 0.3822$ , P = 0.003; miR152,  $-2.63 \pm 0.8569$ , P = 0.0137). Conversely, the expression of miR-548a and miR-205 (both detected by micro array) did not vary significantly in the validation cohorts. Similar to array analysis, efficiency of qPCR reactions was calculated with raw fluorescence values to precisely estimate the amount of miRNAs in each sample and to compare samples with similar efficiencies [23, 24].

To determine if age was a confounding factor, we analyzed levels of miRNAs against patient age. No significant correlation was observed between individual age and the fold change of

miRNAs (miR-146a  $r^2 = 0.1769$ , miR-106b  $r^2 = 0.0314$  and miR-152  $r^2 = 0.1926$ ) supporting the idea that the observed signature of vitreous humour miRNAs was attributed to NV AMD. AMD-specific expression of plasma miRNAs mirror levels found in vitreous humour

To determine if AMD-specific miRNA signatures can be obtained via less invasive routes, we profiled levels of miR-146a, miR-106b and miR-152 in plasma. miR-16 was used as a reference as previously described [26]. Plasma samples were tested for hemolysis and samples with an index higher than 1 were excluded (Supplemental Figure 1A). With a cutoff of hemolysis index at 1, no correlation was observed between miR-16 (Supplemental Figure 1B) and the 3 investigated miRNAs between groups (Supplemental Figure 1C -1E). As for the vitreous humour, results were normalized and presented as log<sub>2</sub>-transformed qPCR fold-change (Figure 3). Fold change values in linear scale are also presented.

Similar to that observed in vitreous humour, miR-146a was significantly increased (Figure 3A) by  $\sim 2.5$  ( $2.57 \pm 0.311$ ) in the plasma of patients with NV AMD while miR-106b (Figure 3B) and miR-152 (Figure 3C) were respectively decreased by  $\sim 1.5$  ( $0.65 \pm 0.1281$ ) and  $1.7$  ( $0.58 \pm 0.064$ ) (corresponding log<sub>2</sub> values: MiR-146-a,  $1.035 \pm 0.312$ ,  $P = 0.0388$ , miR106b,  $-0.81 \pm 0.3366$ ,  $P = 0.0301$ , miR-152,  $-0.71 \pm 0.225$ ,  $P = 0.0463$ ). Similar magnitudes and expression profiles were obtained when miRNAs were normalized with weighted mean over miR-16 (Supplemental Figure 2).

Similar to the vitreous humour, no significant correlation was drawn between patient age and levels of miRNAs (miR-146a  $r^2 = 0.1787$ , miR-106b  $r^2 = 0.1564$  and miR-152  $r^2 = 0.0243$ ). Together, these results suggest that detection of plasma miRNAs mirrors profiles found in the vitreous humour and correlates with NV AMD.

### **Vitreous humour or plasma ratio of miR-146a/ miR-106b predicts NV AMD**

Combinations of levels of different miRNAs can significantly augment the predictive value of these biomarkers [7]. We evaluated the potential of the miR-146a/miR-106b ratio to identify NV AMD patients (Figure 4). Our data demonstrated that ratios from both vitreous humour and

plasma were significantly increased by  $\sim 10$  ( $10.35 \pm 4.10$ ,  $P = 0.016$ ) and  $\sim 1.7$  ( $1.68 \pm 0.22$ ,  $P = 0.0072$ ). We then assessed the diagnostic accuracy of these ratios as predictors of NV AMD. In this regard, Receiver Operating Characteristic (ROC) analysis is widely used to quantify how accurately a medical test can discriminate between a diseased and a non-diseased state. The resulting ROC curve is created by plotting true positive rate against false positive rate at different threshold settings. The area under the curve (AUC) then represents the probability that a random AMD patient is ranked as more likely to have AMD than a randomly chosen control patient. A maximal AUC value of 1 means that the test perfectly discriminates AMD and non-diseased patients. The ROC AUC for miR-146a/miR-106b ratio was 0,977 in the vitreous humour (Figure 4C:  $P = 0.0005$  95% confidence interval 0.9205 to 1.034) and 0,914 in plasma (Figure 4D:  $P = 0.0186$ ; 95% confidence interval 0.7346 to 1.094). These results strongly underscore potential for plasma miR-146a/miR-106b ratios as a non-invasive biomarker for NV AMD.

### **Investigation of NV AMD-associated Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in miR-146a-5p, miR-106b-5p, and miR-152-3p binding sites**

Dysregulation of miRNA expression is central to several human diseases. Moreover, mutations in miRNA binding sites leading to increased or decreased binding affinity can also contribute to pathophysiology. We filtered NV AMD-associated SNPs from the 77,000 person AMD Gene Consortium (AGC) cohort [22] to search for NV AMD-associated SNPs in the experimentally determined (see Methods and Table S1) target gene binding sites of miR-146a, miR-106b and miR-152. We identified a NV AMD-associated SNP in the 3'UTR of HLA-G gene, in a binding site for miR-152-3p (rs1063320). This SNP attained a P-value of 0.026 (Q-value = 0.116) for NV AMD relationship in the AGC and is found in chromosome 6 spanning nucleotide base positions 29830959 to 29830978. This finding reinforces the involvement of miR-152 in AMD pathogenesis. Further work is needed to characterize the involvement of HLA-G in AMD progression and the impact of this SNP on miR-152 binding affinity.

We next evaluated the relationship between our detected miRNAs and NV AMD related genes, using gene sets derived from the Ingenuity Pathway Analysis (IPA). The IPA Knowledge Base provides annotations on miRNA-gene relationships; we used these gene sets to filter the AGC

findings on NV AMD-associated SNPs resident in genes associated with miR-146a-5p, miR-106b-5p, and miR-152-3p. Table S2 (Annexe 3 in the thesis) contains the gene lists and functional annotations for each miRNA. Table S3 (Annexe 4 in the thesis) contains NV AMD-SNP findings for all SNPs present in each NV AMD-related gene (significant at  $P < 0.005$ ) with a binding site for any of the 3 identified miRs. The IPA gene set includes 57 genes containing miR-146a-5p binding sites. Six of these genes (CFH, NFKB1, LTB, MCPH1, COL13A1, and MMP9) carry SNPs associated with NV AMD at  $P$ -values  $< 0.005$  in the AGC - we computed  $Q$ -values to determine that NV AMD-associated sequence variants in each of these miR-146a-5p gene binding sequences showed an expected proportion of false positives among significant tests that was less than 2% (Table S3). There were 19 genes in the IPA gene set containing binding sites for miR-106b-5p. Of these, 1 gene (SMAD3) contains SNPs associated with NV AMD at  $P$ -values  $< 0.005$  in the AGC cohort.  $Q$ -values for the strongest relationships with NV AMD were less than 0.035, indicating that the expected proportion of false positives among significant tests was less than 3.5% (Table S3). Finally, there were 10 genes with miR-152-3p binding sites in the IPA gene set. Beside the SNP in the HLA-G binding site, none of these genes in the AGC cohort contained SNPs associated with NV AMD at  $P$ -values  $< 0.005$ . Supplemental Figure 3 contains plots predicted miR-146a-5p, miR-106b-5p, and miR-152-3p binding sites in genes in the chromosomal position of AGC findings on NV AMD.

#### **d) DISCUSSION**

The prevalence of AMD in developed countries will continue to rise dramatically with the aging population [4, 6, 27]. To our knowledge, the present study is the first to profile miRNAs in human vitreous humour from patients with NV AMD. We used a bilateral approach where we first investigated miRNA signatures in vitreous humour and correlated the identified miRNAs with plasma levels in corresponding patients. Specific miRNA signatures in vitreous humour of patients with NV AMD lead us to identify three miRNAs (miR-146a, miR-106b and miR-152) that vary with disease (not with age) and have described roles in inflammation and angiogenesis. Secondly, using a GWA study we identified miRSNPs located in binding sites in genes associated with CNV phenotypes in AMD for these three miRNAs. DNA sequence variants

found in miRNA binding sites could increase or decrease their binding and hence influence their function as translation regulators.

The presence of miRNAs in human vitreous humour may be important both in further understanding AMD pathogenesis and may provide insight on systemic biomarkers for AMD diagnostic. Of the 3 miRNAs identified, only one (miR-146a) was significantly increased and 2 decreased (miR-106b and miR-152) in NV AMD. Our results suggest a 3.0 fold increase in miR-146a in the vitreous humour of patients with NV AMD. In line with our findings, Lukiw et al. showed a 3-fold increase of miR-146a in the retina of patients with AMD [28]. Induction of miR-146a may be a protective mechanism that dampens innate immunity [29, 30]. MiR-146a has been reported to be induced by lipopolysaccharide (LPS), as well as by inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  [29, 31, 32] and has the ability to influence inflammatory cascades by interfering with IRAK and TRAF-6 [29, 33] as well as by directly down-regulating IL-6 [34]. Both IL-1 $\beta$  and IL-6 are associated with progression of CNV [33, 35], hence, miR-146a may be a protective regulator of inflammation in NV AMD. Finally, it is notable that the mature hsa-miR-146a-5p miRNA has been shown to bind the CFH gene in human neural [36, 37] and vascular endothelial cells [38].

Conversely, the detected reduction of miR-106b and miR-152 in the vitreous humour may exacerbate CNV given that miR-106b can decrease VEGF-A expression [39, 40]. In this line, a recent study implicated miR-106b in post-ischemic neovascularization in mice [41] via miR-106b-dependant regulation of IL-8 [42, 43]. Similarly, the significant decrease of miR-152 may aggravate CNV by allowing angiogenic factors involved in AMD such as Fibroblast growth factor 2 (**FGF2**) to rise [44]. The tandem dysregulation of miR-106b and miR-152 could therefore contribute to increasing the burden of pro-angiogenic factors such as VEGF, FGF2 and IL-8 in the vitreous humour/retina, yielding an environment conducive to propagation of CNV [45].

Noninvasive biomarkers are still lacking for early detection of AMD. Profiling of miRNAs in body fluids such as blood shows promises for diagnostic, follow up and prognostic of human diseases [10]. Having for main goal to identify circulating miRNAs specific to AMD, we chose to first profile vitreous humour of patients with AMD. While Grassman et al. and Szermraj et

al. both reported AMD-specific miRNA profiles in blood; our study was designed to correlate vitreous humour and blood miRNAs [46, 47]. When compared together, best hits for AMD-specific miRNAs in blood do not replicate between studies. However, it is worth mentioning that Szemraj et al. also reported an increase for miR-146a in the blood of their AMD cohort. Our profiling strategy initially called for identification of prospective miRNAs in vitreous humour and then used different analytical strategies that can potentially explain discrepancies between studies. This includes the matrix used, methods of RNA isolation, large scale profiling technologies and more [10]. In order to usefully translate our finding to a diagnostic test, signatures of circulating miRNAs must be established early in the disease process or ideally prior to onset. A non-invasive and predictive marker could be of interest considering the fact that lifestyle modifications (diet, smoking, obesity, etc.) can influence development of AMD. Future studies will need to be designed to address this point.

To further investigate the potential involvement of miR-146a, miR-106b and miR-152 in AMD pathogenesis, we used experimentally validated miRNA targets to filter specific NV AMD associated loci in the AGC. The value of our findings on the residence of a NV-AMD-associated SNP in a hsa-miR-152-3p target-encoding site is to guide future work, with a possible focus on HLA-G. However, the 3 million AGC probe feature set contained less than 5% of sequence variants within putative miR-146a-5p, miR-106b-5p and miR-152-3p predicted binding sites limiting the coverage of our analysis. To overcome this limitation, we further evaluated the relationship between our detected miRNAs and NV AMD related genes, using gene sets derived from the Ingenuity Pathway Analysis (IPA). Interestingly, 10% of hsa-miR-146a-5p targets also had AMD associated sequence variants with P-values  $< 0.005$  and false discovery rates  $< 1.5\%$ .

Our study provides the first evidence that a specific miRNA signature is found both in the vitreous humour and plasma of patients with exudative AMD. As such, it offers proof-of-concept that miRNAs in systemic circulation may potentially be biomarkers for AMD and provides novel insight into miRNA-driven pathogenesis. Moreover, analysis of specificity and sensitivity (ROC curves) of the ratio between miR146a/106b suggests their potential for plasma-based biomarkers of NV AMD. In addition, detection of SNPs located in miRNA binding sites may be predictive of disease development. From a therapeutic perspective, miRNAs are

endogenous multi-target molecules and hence can be harnessed to modify disease outcome. They fill the growing interest in drug design for multi-target drugs. Generating synthetic therapeutic miRNAs or antagomirs is cost-effective and easy to produce and clinical trials are currently underway using inhibitors or synthetic mimics of miRNAs [21, 48]. Therapeutic miRNAs may also influence the effects of prospective treatments for AMD such as Rapamycin (inhibitor of mTOR) [49] which has been suggested to decrease symptoms of AMD [50-53]. Taken together, identifying specific miRNA biomarkers for AMD would provide an invaluable tool for early intervention and disease modification. Therapeutic modulation of miRNAs may provide an alternative and may significantly reduce costs and toxicity of current anti-VEGF biologics and offer new therapeutic avenues to supplement the current options used to manage CNV.

## e) MATERIALS AND METHODS

### **Vitreous humour sample and blood collection**

All patients previously diagnosed with Wet AMD were followed and operated by a single vitreoretinal surgeon (F.A. Rezende). Control patients underwent surgical treatment for nonvascular pathology (epiretinal membrane or macular hole) by the same surgeon. In an operating room setting, patients underwent surgery under local retro/peribulbar anesthesia. A 5% povidone-iodine solution was used to clean the periocular skin, and topical instillation into the eye and within the cul-de-sac was left in place for 5 minutes. Three-port 25-gauge trans conjunctival pars plana vitrectomy was performed through 25-gauge valved cannulas (Alcon). Under microscope visualization using a wide-angle viewing system (Resight, Zeiss), undiluted vitreous humour was collected with a 25-gauge vitrector. Vitreous humour was aliquoted in sterilized tubes and directly frozen on dry ice. Blood collection had been proceeding before solutes (IV) installation and vitreous humour biopsy. Blood was collected in tube containing 7.2 mg of K2 EDTA tube (purple). To collect plasma, blood was centrifuged for 10 min at 1500 X g RPM. The plasma was transferred in new tubes and immediately frozen at -80°C.

### **miRNA array and microRNA extraction**

Total RNA was isolated from vitreous humour samples by using TRIzol® Reagent (Invitrogen) in accordance with the manufacturer's instructions. Equal volumes of 50µl of vitreous humour were used for miRNA extraction using 50µl of TRIzol® and 1µl of 20mg/ml of glycogen was added to increase the extraction specificity. Total RNA was eluted in 20µl of DEPC water. Total RNA samples of 2 controls and 4 wet AMD patients were shipped to IRIC's genomic platform (Université de Montréal) to process the Human MicroRNA Card A v2 (Life Technologies). Retrotranscription (RT) was processed with the Megaplex™ RT for TaqMan® MicroRNA Assays (Human Pool A), followed by microRNA pre-amplification with the Megaplex™ PreAmp primers kit for TaqMan® MicroRNA Assays (Human Pool A) and the qPCR array assay (Human Card A including detection of 384 microRNAs and endogenous controls). A plate with ultrapure water was processed as negative control for primer dimerization detection.

### **Individual qPCR validation**

MicroRNAs from 50µl of vitreous humour or plasma were extracted with the TaqMan® miRNA ABC magnetic kit (Anti-miRNA Bead Capture for Human Panel A) by following instructions supplied by Life Technologies. Elution was done in 50µl and 100µl for vitreous humour and plasma respectively. RT and pre-amplifications were processed as indicated in the protocol for creating custom RT and pre-amplification pools using 20X TaqMan® MicroRNA Assays from Life Technologies. 5µl of RT and qPCR primers from each TaqMan® MicroRNA Assays (miR-205, miR-106b, miR-146a, miR-152, and miR-548a) were pooled in a total volume of 500µl TE buffer pH 8.0. 3µl of extracted microRNA was used to for the TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies), 2.5µl of RT product was used for pre-amplification was assessed with 12 cycles as recommended in the Life Technologies protocol. Total volume (25µl) of pre-amplification product was diluted with 175µl of 0.1X TE buffer, pH 8.0. 2µl of the dilution was used as template in a total volume of 10µl of 20X TaqMan® MicroRNA Assay for each miRNA identified in the array (miR-205, miR-106b, miR-146a, miR-152, and miR-548a). The same strategy was processed plasma samples. qPCRs were processed 3 to 4 times to avoid technical variation.

### **Normalization and statistical analysis**



Realtime PCR gives expression levels of the gene/ miR as a threshold cycle (Ct) (inversely proportional to relative expression of target gene/miR). According to Taqman protocol, 40 cycles were considered as the detection threshold, above which miRs were considered as undetectable.

In order to normalize miRNA data and calculate fold changes of each miRNA,  $\Delta Ct$  values were calculated by subtracting the Ct value of the endogenous control from the Ct of the target. However, except for plasma samples where miR16 is recognized as an endogenous control, at present there is no consensus concerning suitable miR endogenous control miR. To minimize systematic technical or experimental variation in vitreous humour samples, we opted here for a method considering all miR (miR16, miR106b, miR146a and miR152) as endogenous controls, also called weighted normalization, as follow:

$$Ct_0 = \sum_j^n Ct_j \times \frac{\left(\frac{1}{STD(Ct_j)}\right)^{wmp}}{\sum_{i=1}^n \frac{1}{STD(Ct_i)}}$$

n corresponding to the number of genes (miRNAs), j to miRNAs, i to sample and wmp to the weighted mean power.

Technically, this miR Ct<sub>0</sub> average was used as endogenous reference, for each sample.

$$\Delta Ct = Ct_{miR} - Ct_0$$

The  $\Delta\Delta Ct$  was then calculated by subtracting the  $\Delta Ct$  average of control patients from AMD patient.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{AMD} - \Delta Ct_{control}$$

Fold change (FC) was calculated using the following formula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , where the value 2 represents a theoretical micro efficiency of 100%. For more accuracy, we evaluated micro array and TaqMan individual qPCR efficiency with free online software QPCR, which calculated 85% for the qPCR array (1,7) and 88% for individual qPCR (1,75).

$$FC = \text{Efficiency}^{-\Delta\Delta Ct}$$

For performing T-statistics, variance should be normally distributed (bell curve); a log<sub>2</sub> transformation was then applied to fold change values.

Log-transformed data =  $\text{Log}(\text{Fold change} + 2)$

Log-transformed data were finally median-centered (average log-transformed controls then equaled 0).

Graphical data =  $\text{Log-transformed data} - \text{mean}(\text{Log-transformed control})$

Student T-test was used to statistically compare the fold change value of each group, with a and  $p < 0.05$  considered as significantly different. All samples showing efficiency with less than 80% of amplification, weak amplification curves, with clinical issues (ex: glaucoma, eye medical treatment,) or outliers (<http://graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>) were excluded of the analysis.

### **miR-associated SNP analysis**

#### Data sources & subjects:

We used public-access results from the National Eye Institute-supported AMD Gene Consortium (AGC) [22] to address our aims. In 2013 the AGC published findings from a large-scale multi-center genome-wide study on the molecular genetics of AMD (<http://nih.gov/news/health/mar2013/nei-03.htm>). All AGC research was conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki and was initiated only after approval by institutional review boards (IRB) in each of the 18 participating centers. Informed consent was obtained from all participants. Details of human subject procedures, IRB approvals, and references to consenting processes exist at: <http://www.nature.com/ng/journal/v45/n4/extref/ng.2578-S1.pdf> — pp. 30—41. All AGC data have been de-identified.

The analytic sample contained > 4450 people with NV AMD and > 40,000 age- and sex-matched AMD-free controls of European and Asian ancestry. All findings passed quality assessment tests for completeness of genotyping and Hardy-Weinberg equilibrium. Details on methods and quality control procedures exist in Fritsche et al. [22]

#### Regions of interest:

Gene annotations and positional coordinates for genes encoding hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-152-3p, and their target motifs were obtained with the Ensembl 80 database (21 March 2015, GRCh38.p2, <http://useast.ensembl.org/index.html>) via an interface to TarBase7 (<http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/>) in the Regulation 80 utility. Lists of genes encoding miRNA targets that have been validated with luciferase reporter assays,

qPCR, and Western blots were assembled for each of the 3 miRNAs from TarBase 7 (<http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=tarbase/index>) and miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/>) - in some cases positional coordinates of miRNA motif-encoding areas were not available. Computational evidence on location of hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-106b-5p, and hsa-miR-152-3p motif-encoding regions was obtained with microT-CDS (<http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/>), applying a threshold of greater  $> 0.70$  for strong prediction) and miRDB (<http://mirdb.org/miRDB/>), applying a Target Score threshold  $> 80$ ). We used HaploReg v3 ([http://www.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg\\_v3.php](http://www.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg_v3.php)) with data from the 1000 Genomes Project to identify co-inherited loci ( $R^2 > 0.80$ , EUR cohort as reference) as valid proxy measures in cases that SNPs in miRNA target motif regions were not present in the gene chip feature set reported by AGC. The Ingenuity Pathway Analysis knowledge base (June 2015 version) was used to identify genes in which DNA sequence or DNA sequence products have been implicated to affect or to be affected by hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-106b-5p, or hsa-miR-152-3p.

#### Data analysis :

In Phase 1 we annotated and enumerated aspects of genomic regions of interest - these included positional coordinates of motif-encoding regions, resident genes, and DNA sequence variants within the encoding regions. The next step (Phase 2) was to assess putative differences in allelic frequencies in miRNA target-encoding loci between people with NV AMD and their age- and sex-matched peers. The AGC probe set was not optimized for such purposes and thus we elected to also examine findings in all other loci in target-encoding genes (Phase 3) for the purpose of determining which NV AMD-associated genes may be the most promising candidates for focused work on miRNA target-encoding regions.

NV AMD-gene relationships were analyzed in Phases 2 and 3 from AGC data using findings from additive models adjusted for population stratification.[22] In Phase 2, inferences were based an alpha-level of 0.05 and adjusted by the number of tested SNPs in each motif-encoding region ( $P = 0.05/(N)^{1/2}$ ). In Phase 3 we evaluated findings in regions of interest with Bonferroni-adjusted P-values and Q-values (Q-values were computed with QValue software package ([www.genomics.princeton.edu/storeylab/qvalue](http://www.genomics.princeton.edu/storeylab/qvalue))).

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Aouatef Benlemmouden for assistance with clinical sampling. We thank the IRIC (Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie; Montreal) genomic platform team for micro array processing. We thank AGC participants and the AGC Research Group for their valuable contributions to this research project. We thank Peter SanGiovanni and Emily Perry at EMBL-EBI for guidance on constructing and running an API script to efficiently extract data from Ensembl 80 for bioinformatic analysis.

#### **CONFLICTS OF INTEREST**

We do not have any disclosure or conflict of interest in the study.

#### **GRANT SUPPORT**

PS holds a Canada Research Chair in Retinal Cell Biology and The Alcon Research Institute Young Investigator Award. This work was supported by operating grants to PS from the Foundation Fighting Blindness Canada and the Canadian Institutes of Health Research (221478) and Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (418637). Additional support was obtained from the Fondation HMR, Réseau en Recherche en Santé de la Vision du Quebec and the Fond en Recherche en Ophtalmologie de l'UdeM.

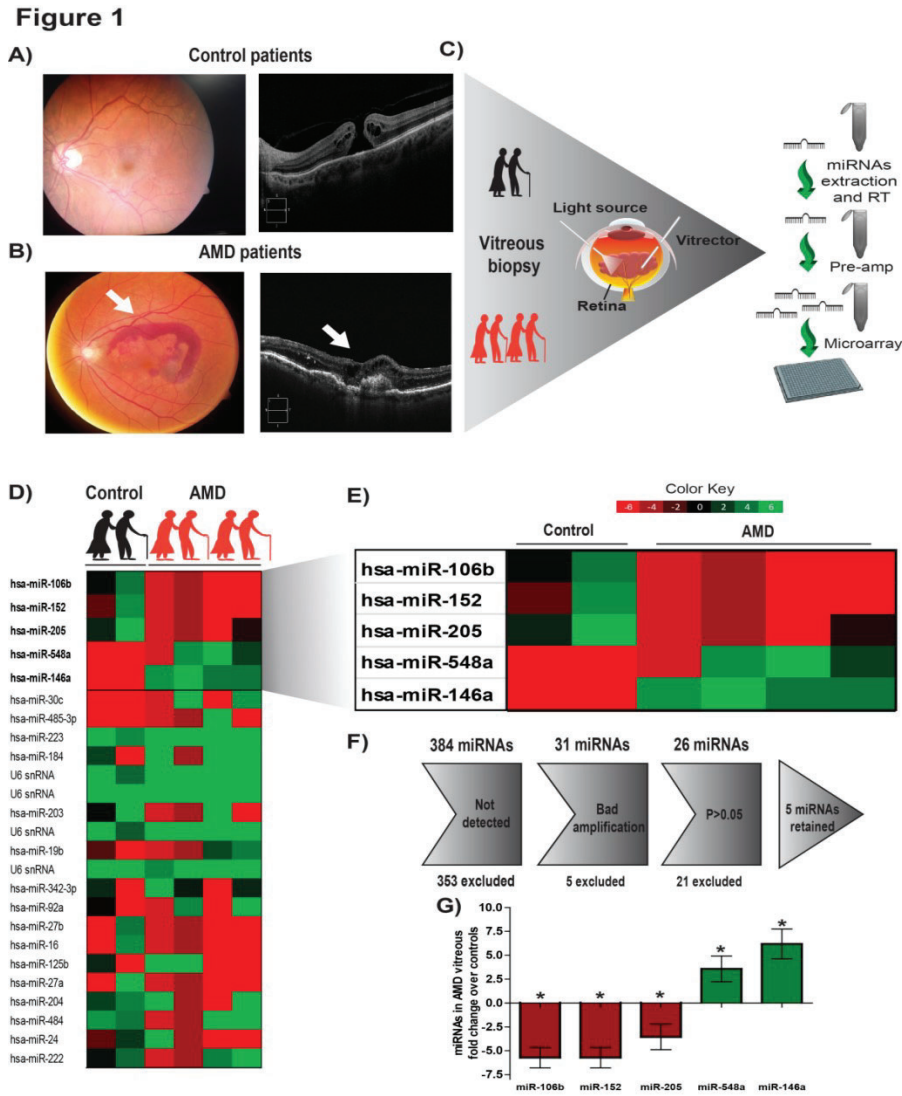
## f) REFERENCES

1. Ambati J, Ambati BK, Yoo SH, Ianchulev S and Adamis AP. Age-related macular degeneration: etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies. *Surv Ophthalmol.* 2003; 48:257-293.
2. Cruess A, Zlateva G, Xu X and Rochon S. Burden of illness of neovascular age-related macular degeneration in Canada. *Canadian journal of ophthalmology.* 2007; 42:836-843.
3. Smith W, Assink J, Klein R, Mitchell P, Klaver CC, Klein BE, Hofman A, Jensen S, Wang JJ and de Jong PT. Risk factors for age-related macular degeneration: Pooled findings from three continents. *Ophthalmology.* 2001; 108:697-704.
4. Friedman DS, O'Colmain BJ, Munoz B, Tomany SC, McCarty C, de Jong PT, Nemesure B, Mitchell P, Kempen J and Eye Diseases Prevalence Research G. Prevalence of age-related macular degeneration in the United States. *Archives of ophthalmology.* 2004; 122:564-572.
5. Jager RD, Mieler WF and Miller JW. Age-related macular degeneration. *N Engl J Med.* 2008; 358:2606-2617.
6. Ambati J and Fowler BJ. Mechanisms of age-related macular degeneration. *Neuron.* 2012; 75:26-39.
7. De Guire V, Robitaille R, Tetreault N, Guerin R, Menard C, Bambace N and Sapiéha P. Circulating miRNAs as sensitive and specific biomarkers for the diagnosis and monitoring of human diseases: promises and challenges. *Clinical biochemistry.* 2013; 46(10-11):846-860.
8. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS and Johnson JM. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature.* 2005; 433:769-773.
9. Selbach M, Schwanhauser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R and Rajewsky N. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature.* 2008; 455:58-63.
10. De Guire V, Caron M, Scott N, Menard C, Gaumont-Leclerc MF, Chartrand P, Major F and Ferbeyre G. Designing small multiple-target artificial RNAs. *Nucleic acids research.* 2010; 38:e140.
11. Esau C, Kang X, Peralta E, Hanson E, Marcusson EG, Ravichandran LV, Sun Y, Koo S, Perera RJ, Jain R, Dean NM, Freier SM, Bennett CF, Lollo B and Griffey R. MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *The Journal of biological chemistry.* 2004; 279:52361-52365.
12. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, Galas DJ and Wang K. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem.* 2010; 56:1733-1741.
13. Ragusa M, Caltabiano R, Russo A, Puzzo L, Avitabile T, Longo A, Toro MD, Di Pietro C, Purrello M and Reibaldi M. MicroRNAs in vitreous humor from patients with ocular diseases. *Molecular vision.* 2013; 19:430-440.
14. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ and Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology.* 2007; 9:654-659.
15. Thery C. Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. *F1000 biology reports.* 2011; 3:15.
16. Cocucci E, Racchetti G and Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends in cell biology.* 2009; 19:43-51.
17. Zernecke A, Bidzhekov K, Noels H, Shagdarsuren E, Gan L, Denecke B, Hristov M, Koppel T, Jahantigh MN, Lutgens E, Wang S, Olson EN, Schober A and Weber C. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Science signaling.* 2009; 2:ra81.
18. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, Mitchell PS, Bennett CF, Pogosova-Agadjanyan EL, Stirewalt DL, Tait JF and Tewari M. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2011; 108:5003-5008.
19. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD and Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nature cell biology.* 2011; 13:423-433.
20. Salzman DW and Weidhaas JB. SNPing cancer in the bud: microRNA and microRNA-target site polymorphisms as diagnostic and prognostic biomarkers in cancer. *Pharmacology & therapeutics.* 2013; 137:55-63.
21. Lanford RE, Hildebrandt-Eriksen ES, Petri A, Persson R, Lindow M, Munk ME, Kauppinen S and Orum H. Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science.* 2010; 327:198-201.
22. Fritsche LG, Chen W, Schu M, Yaspan BL, Yu Y, Thorleifsson G, Zack DJ, Arakawa S, Cipriani V, Ripke S, Igo RP, Jr., Buitendijk GH, Sim X, Weeks DE, Guymer RH, Merriam JE, et al. Seven new loci associated with age-related macular degeneration. *Nature genetics.* 2013; 45:433-439, 439e431-432.
23. Qureshi R and Sacan A. A novel method for the normalization of microRNA RT-PCR data. *BMC medical genomics.* 2013; 6 Suppl 1:S14.
24. Pabinger S, Thallinger GG, Snajder R, Eichhorn H, Rader R and Trajanoski Z. QPCR: Application for real-time PCR data management and analysis. *BMC bioinformatics.* 2009; 10:268.
25. Freeman WM, Walker SJ and Vrana KE. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques.* 1999; 26:112-122, 124-115.

26. Kirschner MB, Kao SC, Edelman JJ, Armstrong NJ, Vallely MP, van Zandwijk N and Reid G. Haemolysis during sample preparation alters microRNA content of plasma. *PLoS one*. 2011; 6:e24145.
27. Hayat MJ, Howlader N, Reichman ME and Edwards BK. Cancer statistics, trends, and multiple primary cancer analyses from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. *Oncologist*. 2007; 12:20-37.
28. Lukiw WJ, Surjadypta B, Dua P and Alexandrov PN. Common micro RNAs (miRNAs) target complement factor H (CFH) regulation in Alzheimer's disease (AD) and in age-related macular degeneration (AMD). *International journal of biochemistry and molecular biology*. 2012; 3:105-116.
29. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ and Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006; 103:12481- 12486.
30. Wang S, Koster KM, He Y and Zhou Q. miRNAs as potential therapeutic targets for age-related macular degeneration. *Future medicinal chemistry*. 2012; 4:277-287.
31. Kutty RK, Nagineni CN, Samuel W, Vijayarathy C, Jaworski C, Duncan T, Cameron JE, Flemington EK, Hooks JJ and Redmond TM. Differential regulation of microRNA- 146a and microRNA-146b-5p in human retinal pigment epithelial cells by interleukin-1beta, tumor necrosis factor-alpha, and interferon-gamma. *Molecular vision*. 2013; 19:737-750.
32. Moschos SA, Williams AE, Perry MM, Birrell MA, Belvisi MG and Lindsay MA. Expression profiling in vivo demonstrates rapid changes in lung microRNA levels following lipopolysaccharide-induced inflammation but not in the anti-inflammatory action of glucocorticoids. *BMC genomics*. 2007; 8:240.
33. Iyer A, Zurolo E, Prabowo A, Fluiter K, Spliet WG, van Rijen PC, Gorter JA and Aronica E. MicroRNA-146a: a key regulator of astrocyte-mediated inflammatory response. *PLoS one*. 2012; 7:e44789.
34. Bhaumik D, Scott GK, Schokrpur S, Patil CK, Orjalo AV, Rodier F, Lithgow GJ and Campisi J. MicroRNAs miR- 146a/b negatively modulate the senescence-associated inflammatory mediators IL-6 and IL-8. *Aging (Albany NY)*. 2009; 1:402-411. doi: 10.18632/aging.100042.
35. Lavalette S, Raoul W, Houssier M, Camelo S, Levy O, Calippe B, Jonet L, Behar-Cohen F, Chemtob S, Guillonneau X, Combadiere C and Sennlaub F. Interleukin- 1beta inhibition prevents choroidal neovascularization and does not exacerbate photoreceptor degeneration. *Am J Pathol*. 2011; 178:2416-2423.
36. Hill JM, Zhao Y, Clement C, Neumann DM and Lukiw WJ. HSV-1 infection of human brain cells induces miRNA-146a and Alzheimer-type inflammatory signaling. *Neuroreport*. 2009; 20:1500-1505.
37. Satoh J. MicroRNAs and their therapeutic potential for human diseases: aberrant microRNA expression in Alzheimer's disease brains. *J Pharmacol Sci*. 2010; 114:269-275.
38. Hsieh CH, Rau CS, Jeng SF, Lin CJ, Chen YC, Wu CJ, Lu TH, Lu CH and Chang WN. Identification of the potential target genes of microRNA-146a induced by PMA treatment in human microvascular endothelial cells. *Exp Cell Res*. 39. El Baroudi M, Cora D, Bosia C, Osella M and Caselle M. A curated database of miRNA mediated feed-forward loops involving MYC as master regulator. *PLoS one*. 2011; 6:e14742.
40. Kwak N, Okamoto N, Wood JM and Campochiaro PA. VEGF is major stimulator in model of choroidal neovascularization. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2000; 41:3158-3164.
41. Semo J, Sharir R, Afek A, Avivi C, Barshack I, Maysel-Auslender S, Krelin Y, Kain D, Entin-Meer M, Keren G and George J. The 106b approximately 25 microRNA cluster is essential for neovascularization after hindlimb ischaemia in mice. *European heart journal*. 2014; 35:3212-3223.
42. Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elnor VM, Elnor SG and Strieter RM. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science*. 1992; 258:1798-1801.
43. Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ and Singh RK. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *Journal of immunology*. 2003; 170:3369- 3376.
44. Cheng Z, Ma R, Tan W and Zhang L. MiR-152 suppresses the proliferation and invasion of NSCLC cells by inhibiting FGF2. *Experimental & molecular medicine*. 2014; 46:e112.
45. de Oliveira Dias JR, Rodrigues EB, Maia M, Magalhaes O, Jr., Penha FM and Farah ME. Cytokines in neovascular age-related macular degeneration: fundamentals of targeted combination therapy. *The British journal of ophthalmology*. 2011; 95:1631-1637.
46. Grassmann F, Schoenberger PG, Brandl C, Schick T, Hasler D, Meister G, Fleckenstein M, Lindner M, Helbig H, Fauser S and Weber BH. A circulating microRNA profile is associated with late-stage neovascular age-related macular degeneration. *PLoS one*. 2014; 9:e107461.
47. Szmraj M, Bielecka-Kowalska A, Oszejca K, Krajewska M, Gos R, Jurowski P, Kowalski M and Szmraj J. Serum MicroRNAs as Potential Biomarkers of AMD. *Med Sci Monit*. 2015; 21:2734-2742.
48. Trang P, Wiggins JF, Daige CL, Cho C, Omotola M, Brown D, Weidhaas JB, Bader AG and Slack FJ. Systemic delivery of tumor suppressor microRNA mimics using a neutral lipid emulsion inhibits lung tumors in mice. *Mol Ther*. 2011; 19:1116-1122.

49. Totary-Jain H, Sanoudou D, Ben-Dov IZ, Dautriche CN, Guarnieri P, Marx SO, Tuschl T and Marks AR. Reprogramming of the microRNA transcriptome mediates resistance to rapamycin. *The Journal of biological chemistry*. 2013; 288:6034-6044.
50. Kolosova NG, Muraleva NA, Zhdankina AA, Stefanova NA, Fursova AZ and Blagosklonny MV. Prevention of age-related macular degeneration-like retinopathy by rapamycin in rats. *Am J Pathol*. 2012; 181:472-477.
51. Blagosklonny MV. Validation of anti-aging drugs by treating age-related diseases. *Aging (Albany NY)*. 2009; 1:281-288. doi: 10.18632/aging.100034.
52. Blagosklonny MV. TOR-centric view on insulin resistance and diabetic complications: perspective for endocrinologists and gerontologists. *Cell Death Dis*. 2013; 4:e964.
53. Zheng XF. Chemoprevention of age-related macular regeneration (AMD) with rapamycin. *Aging (Albany NY)*. 2012; 4:375-376. doi: 10.18632/aging.100469.

g) FIGURES

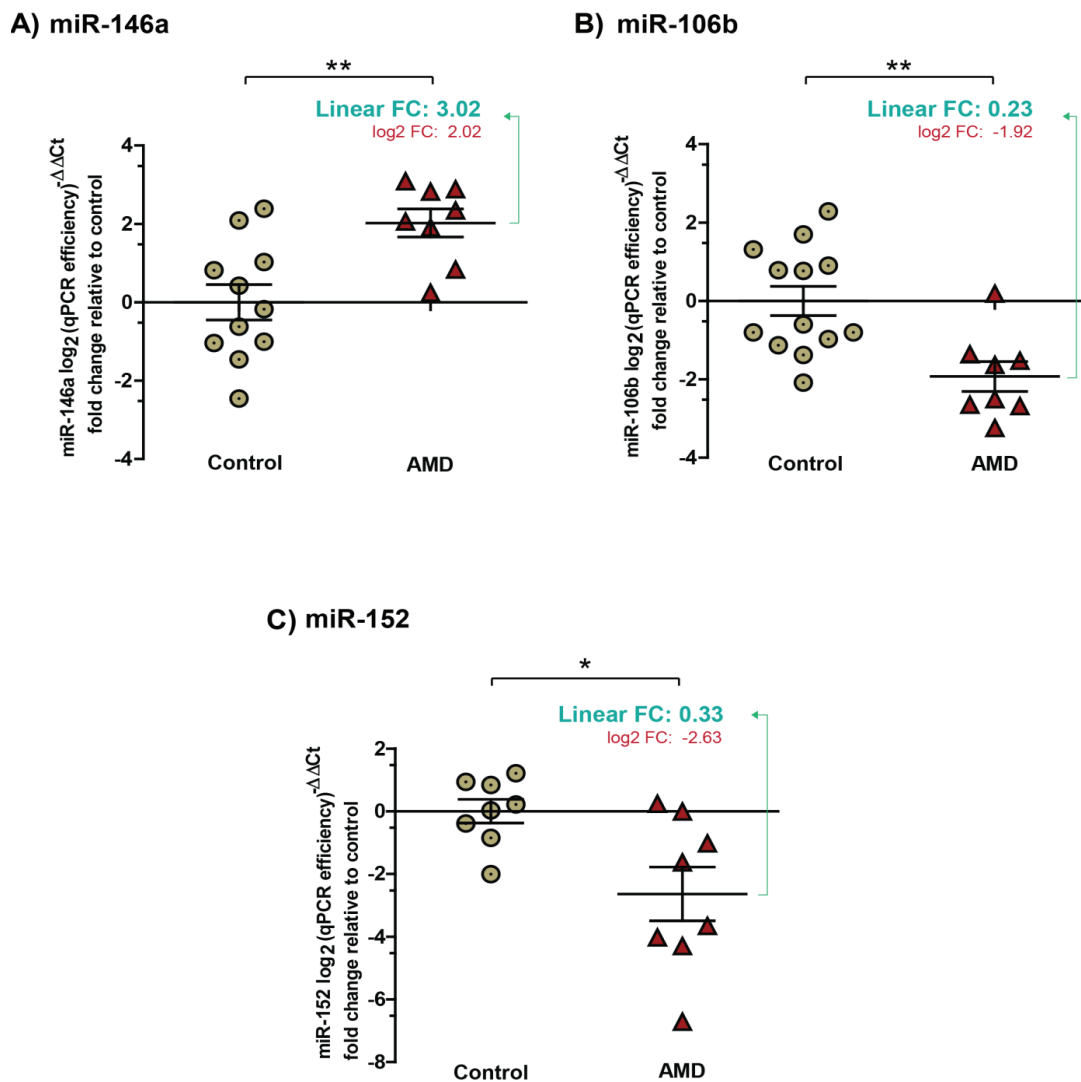


**Figure 1.** Human vitreous humour profiling identifies 5 potential miRNAs deregulated in NV AMD.

Vitreous humour biopsies were performed on patients with non-vascular ocular pathology (Epiretinal membrane or macular hole) A. or patients with exudative AMD (white arrow points to CNV) B. C. A work flow describing the process from patient to miRNA micro arrays. Initial pilot screen was on two samples from control patients and 4 samples from the AMD group. D. Complete heat map of miRNAs detected by micro arrays. E. Heatmap representing miRNAs identified to have a significant difference ( $P < 0.05$ ). F. Gray arrow defines steps of exclusion. G. Histogram representation of 5 miRNAs deregulated in AMD compared to the level detected in control group (expressed as  $\log_2$  (qPCR efficiency)- $\Delta$ Ct fold change relative to control).



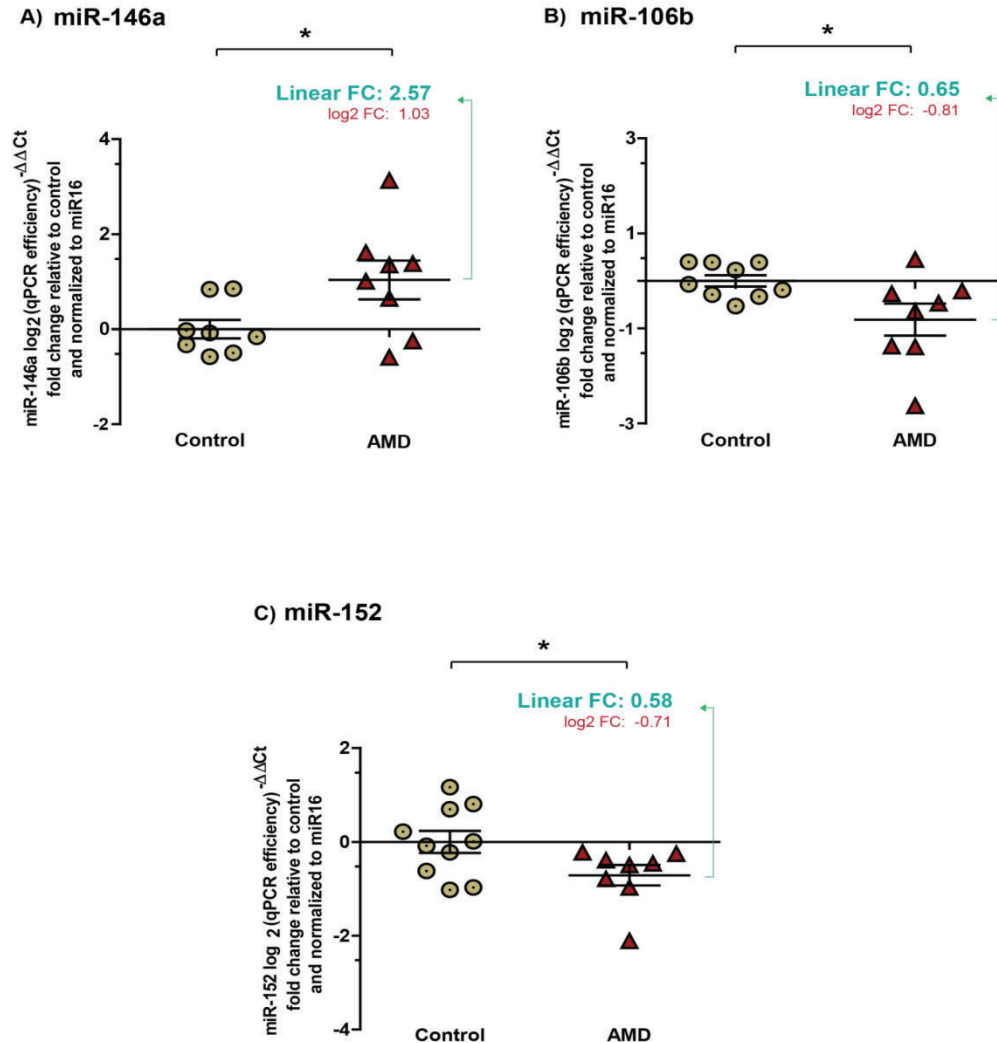
**Figure 2**



**Figure 2:** Validation of expression profiles for miR-146a, miR-106b and miR-152 in the vitreous humour of patients with NV AMD.

Data are represented in  $\log_2(\text{qPCR efficiency})^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  fold change relative to control in graphs. A. miR-146a increased by  $\sim 3$  ( $3.02 \pm 0.5830$ ) (corresponding  $\log_2$  values:  $2.02 \pm 0.3587$ ,  $P = 0.0043$ ). B. Significantly decreased levels of miR-106b by  $\sim 4$  ( $0.23 \pm 0.0797$ ) (corresponding  $\log_2$  values:  $-1.92 \pm 0.3822$ ,  $P = 0.003$ ) and C. miR-152 by  $\sim 3$  ( $0.33 \pm 0.132$ ) (corresponding  $\log_2$  values:  $-2.63 \pm 0.8569$ ,  $P = 0.0137$ ) were detected in vitreous humour of patients with NV AMD.

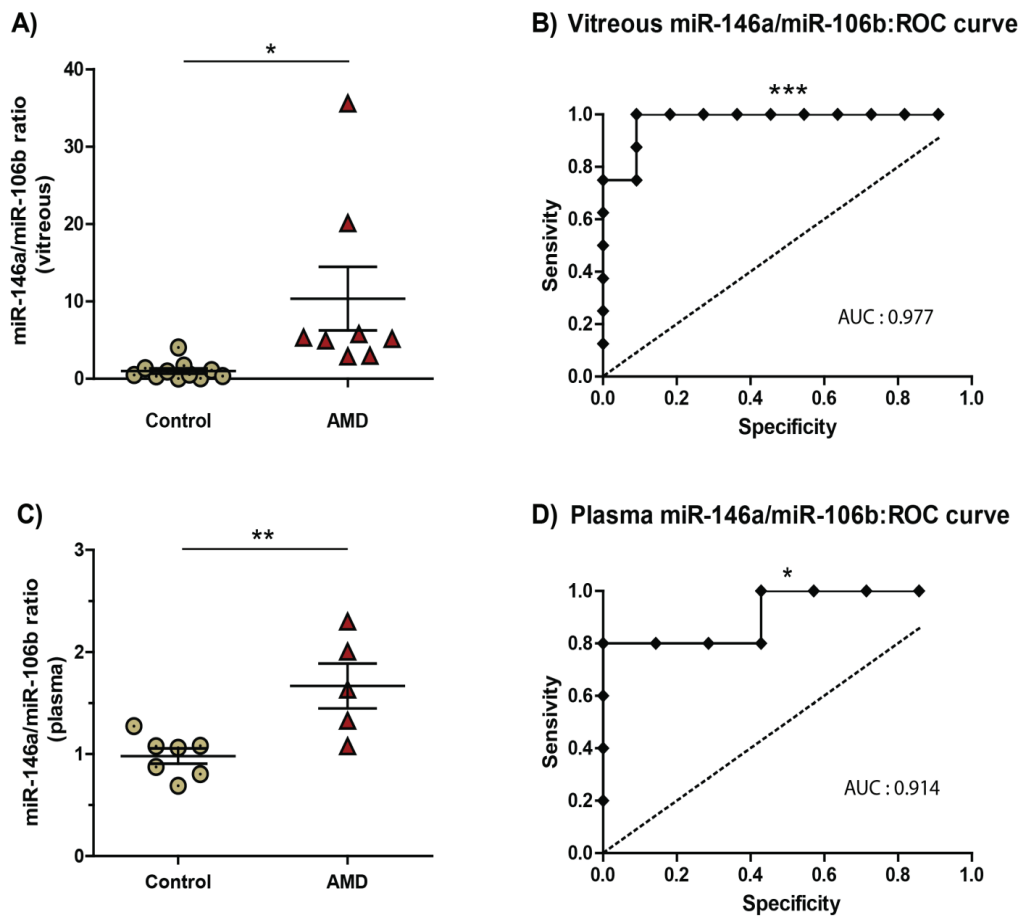
**Figure 3**



**Figure 3:** Expression profiles of miRNAs in plasma mirror levels found in vitreous humour.

Plasma collected from the same patients as vitreous humour profiled in figures 1 & 2. Data are represented in  $\log_2$  (qPCR efficiency)<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> fold change relative to control in graphics A. A significant increase by  $\sim 2.5$  ( $2.57 \pm 0.311$ ) (corresponding  $\log_2$  values:  $1.035 \pm 0.312$ ,  $P = 0.0388$ ) was detected for miR-146a in plasma from patients with NV AMD. Significant decreases in B. miR-106b by  $\sim 1.5$  ( $0.65 \pm 0.1281$ ) (corresponding  $\log_2$  values:  $-0.81 \pm 0.3366$ ,  $p = 0.0301$ ) and C. in miR-152 by  $\sim 1.7$  ( $0.58 \pm 0.064$ ) (corresponding  $\log_2$  values:  $-0.71 \pm 0.225$ ,  $P = 0.0463$ ) were also detected in the plasma of patients with NV AMD.

**Figure 4**



**Figure 4:** The miR-146a/miR-106b ratio in vitreous humour and blood is predictive of NV AMD.

MiR-146a/miR-106b fold change ratio was calculated for AMD and control for A. vitreous humour ( $10.35 \pm 4.10$ ,  $P = 0.016$ ) and C. plasma ( $1.68 \pm 0.22$ ,  $P = 0.0072$ ). The area under the Receiver Operating Characteristic curve (ROC AUC) for miR-146a/miR-106b ratio was B) 0,977 in the vitreous humour ( $P = 0.0005$ ; 95% confidence interval 0.9205 to 1.034) and B. 0,914 in plasma ( $P = 0.0186$ ; 95% confidence interval 0.7346 to 1.094)

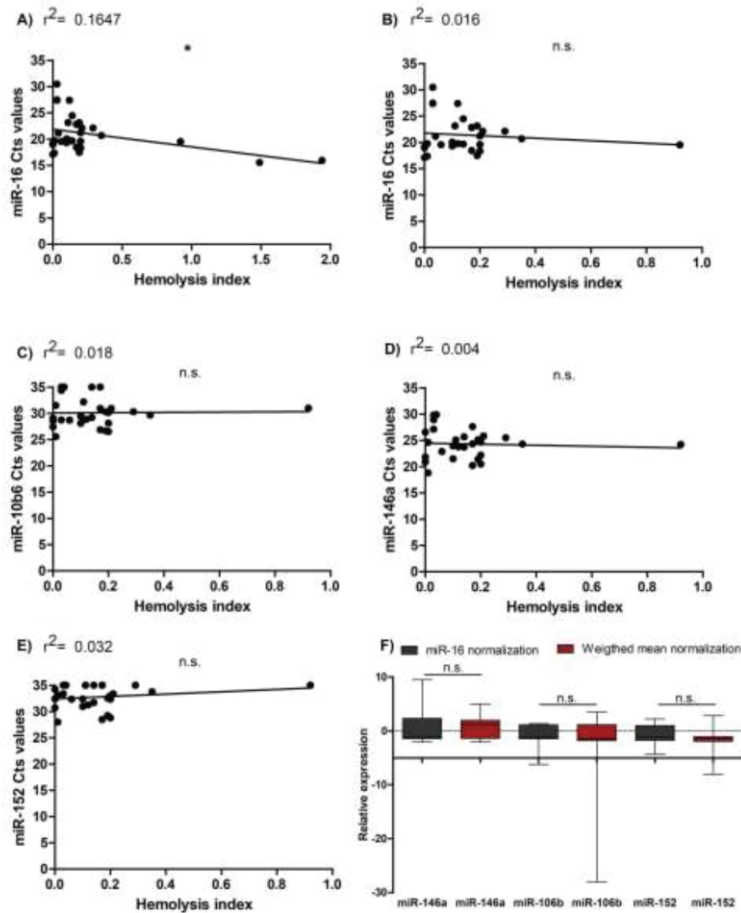
**Tableau I.** Patient baseline statistics

<b>Characteristics</b>			<b>Control Group</b>	<b>Neovascular AMD</b>
<b>Number of individuals</b>			13	13
<b>Means</b>	<b>group</b>	<b>average;</b>	66.6 [11.2]	81.9 [9.1]
<b>(S.D.)[ages]</b>				
<b>Female Percentage (%)</b>			85%	69%
<b>OCT Values</b>			N.A	>250µm
<b>Control type number :</b>				
<b>Epi-retinal membrane (ERM)</b>			8	N.A.
<b>Macular hole (MH)</b>			5	N.A.

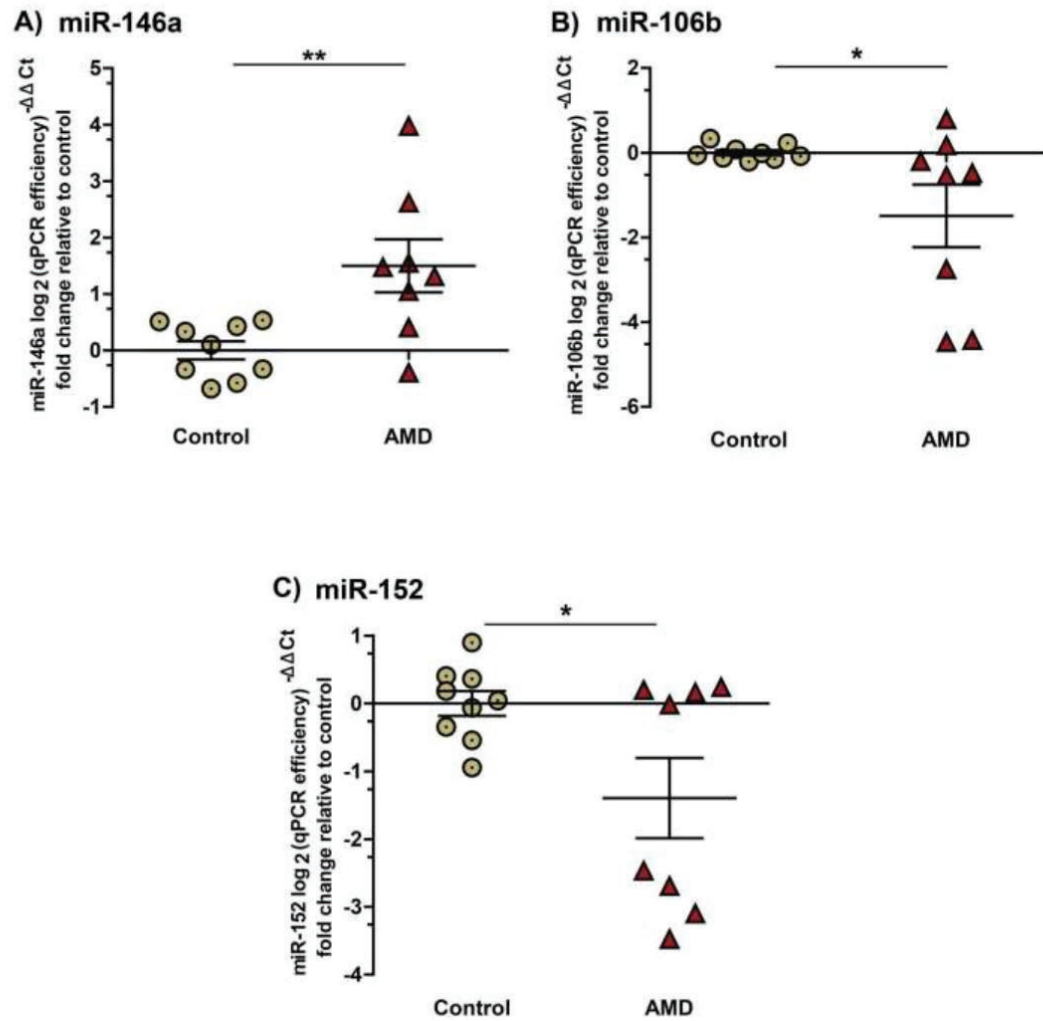
**Tableau II.** Clinical characteristics of patients having undergone vitreous biopsy

Samples	Sex	Age	Patients conditions	OCT ( $\mu\text{m}$ )	Analysis
<b>C1</b>	F	54	NA	NA	qPCR
<b>C2</b>	F	81	MH	NA	qPCR
<b>C3</b>	F	65	MH	NA	qPCR
<b>C4</b>	F	76	MH	NA	qPCR
<b>C5</b>	F	70	ERM	NA	microarray and qPCR
<b>C6</b>	F	46	ERM	NA	qPCR
<b>C7</b>	F	84	ERM	NA	qPCR
<b>C8</b>	M	78	ERM	NA	qPCR
<b>C9</b>	F	63	CAT-MH	NA	microarray
<b>C10</b>	F	66	ERM	NA	qPCR
<b>C11</b>	F	54	ERM	NA	qPCR
<b>C12</b>	F	72	ERM	NA	qPCR
<b>C13</b>	M	57	ERM	NA	qPCR
<b>AMD1</b>	M	76	NAIVE	401	microarray
<b>AMD2</b>	M	86	NAIVE	438	microarray
<b>AMD3</b>	F	91	NAIVE	301	qPCR
<b>AMD4</b>	M	76	ACTIVE	260	microarray
<b>AMD5</b>	F	85	NAIVE	382	qPCR
<b>AMD6</b>	F	94	NAIVE	1077	qPCR
<b>AMD7</b>	M	63	NAIVE	622	qPCR
<b>AMD8</b>	F	96	NAIVE	1150	microarray and qPCR
<b>AMD9</b>	F	74	NAIVE	289	qPCR
<b>AMD10</b>	F	87	NAIVE	223	qPCR
<b>AMD11</b>	F	75	NAIVE	361	qPCR
<b>AMD12</b>	F	85	NAIVE	250	qPCR
<b>AMD13</b>	F	75	NAIVE	492	qPCR

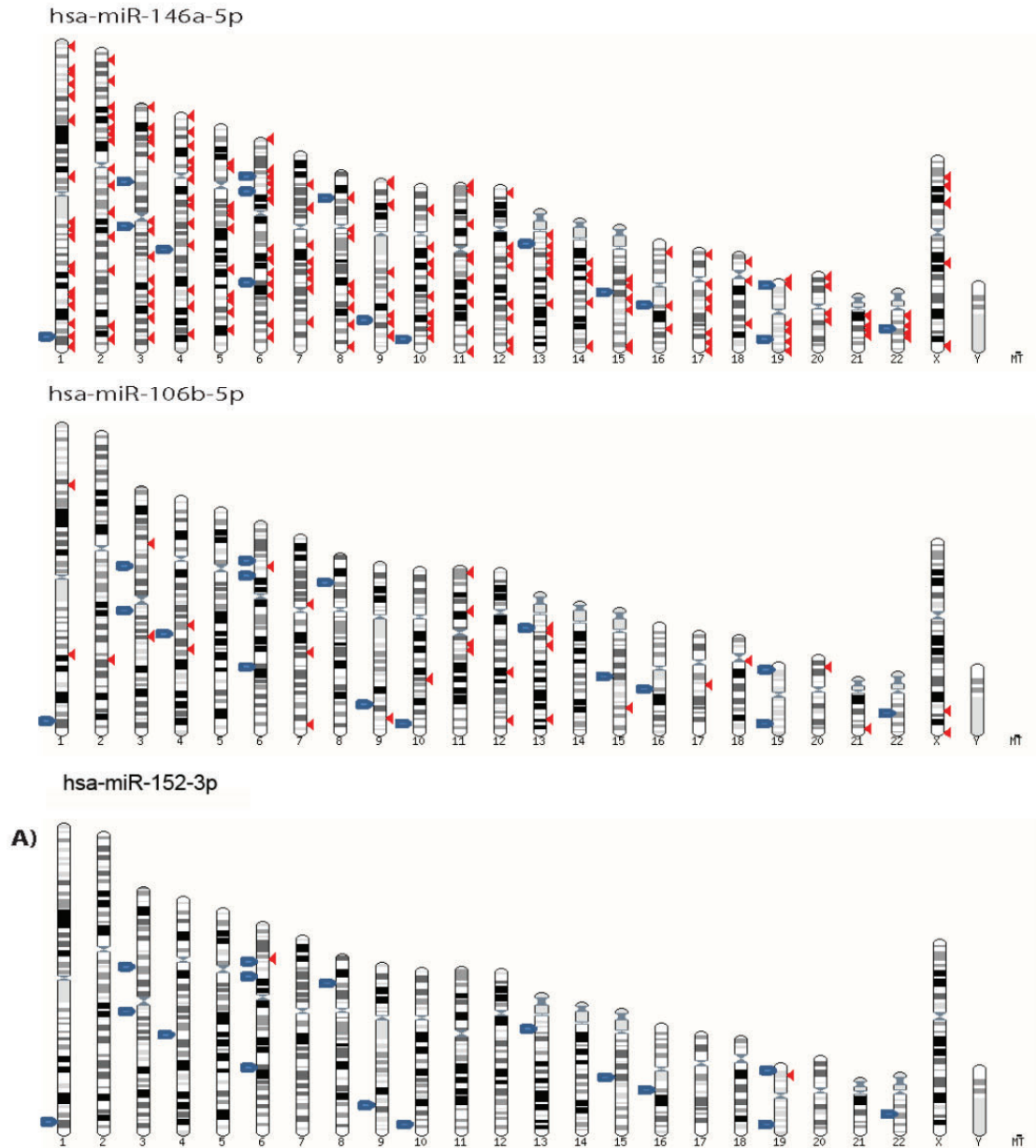
Vitreous and plasma from a cohort of 13 patients with non-vascular retinal pathology (control group) and 13 patients with NV AMD. AMD: Age related Macular Degeneration with CNV (choroid neovascularization); naive: before anti-VEGF treatment; NA: not applicable; MH: Macular Hole; CAT: Catheter; ERM: epiretinal membrane; OCT: Optical Coherence Tomography. Analysis by microarray and/or qPCR (individual TaqMan miRNA assay).



Supplemental Figure 1: Hemolysis index in correlation with raw CT values and 695 comparison of normalization strategies. **A.** miR-16 raw CT values without the cutoff 696 of the hemolysis index at 1. A significant negative correlation ( $P=0.0235$ ) is obtained with a  $r^2_{697} = 0.1647$ . **B.** When the cutoff is set for samples with a hemolysis index  $> 1$ , no 698 significant correlation is observed for miR-16. **C., D. and E)** No correlation is found 699 between raw CT detection and hemolysis index for miR-146a, miR-106b and miR-152 700 respectively. **F.** Comparison of both normalization strategies miR-16 (gray) vs weighted 701 mean (red) including relative expression for all samples. No significant difference is 702 observed between normalization strategies.



**Supplemental Figure 2: Normalization of plasma miRNAs by weighted mean conserves expression profiles.** Plasma was collected from the same patients as the vitreous humour profiled in figures 1 & 2. Data are represented in  $\log_2(\text{qPCR efficiency})^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  fold change relative to control in graphics A. A significant increase of  $\sim 1.5$  ( $1.500 \pm 0.4705$ ,  $P = 0.0064$ ) was detected for miR-146a in plasma from patients with NV AMD. Significant decreases in B. miR-106b by  $\sim 1.5$  ( $-1.489 \pm 0.7397$ ,  $P = 0.0496$ ) and C. in miR-152 by  $\sim 1.5$  ( $-1.394 \pm 0.5916$ ,  $p = 0.0318$ ) was detected in the plasma of patients with NV AMD.



**Supplemental Figure 3: Loci encoding putative hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-106b-5p, and hsa-miR-152-3p target motifs.** Red arrows indicate position of miRNA loci within chromosomes, blue arrows indicate locations of SNPs attaining genome-wide statistical significance ( $P < 5 \times 10^{-7}$ ) for association with AMD. Positional coordinates of pertinent regions were obtained with the Ensembl 80 database (21 March 2015, GRCh38.p2).



## **Chapitre 3 : Article 2**

## **1. Mise en contexte :**

De nos jours, les études sur les thérapies géniques évoluent de manière importante. Il ne s'agit plus de seulement inactiver une protéine cible, mais plutôt d'intervenir en amont, c'est-à-dire à la production même de la protéine en question. C'est dans cette optique, qu'un grand nombre d'études sont apparues sur l'utilisation thérapeutique des miARN. Un grand avantage de ceux-ci est leur capacité à contrôler simultanément l'expression d'un grand nombre de protéines. Puisque les traitements contre la forme humide de la DMLA sont limités ou s'attaquent seulement à un nombre restreint de protéines, dont la plus connue est le VEGFA, l'étude de l'utilisation des miARN comme traitement est indispensable. Dans notre étude précédente, nous avons identifié des miARNs dont l'expression était affectée chez les patients souffrant de la DMLA. Nous nous sommes donc intéressés à miR-106b puisque c'est un miARN déjà connu pour être impliqué dans la régulation de l'angiogenèse. L'objectif principal de cette étude était de tester la capacité de miR-106b à diminuer l'apparition de NV dans des modèles murins. Puisque son expression était diminuée de façon significative chez les patients, nous avons utilisé un système de lentivirus permettant d'exprimer miR-106b (mimic) pour rétablir son expression. Par la suite, nous avons aussi investigué par quel mécanisme l'expression de miR-106b était affecté. Les résultats obtenus dans cette étude permettront d'établir le potentiel thérapeutique de miR-106b

## **2. Contributions des auteurs**

J'ai, Catherine Ménard, fait la conception du projet, réaliser la majorité des expériences, analysé les données et rédigé l'article. Ariel Wilson a participé à la vérification des analyses des données et à la rédaction de l'article. Agnieszka Dejda a participé aux expériences avec le modèle OIR et fait les injections intra-oculaires chez les bébés souris. Khalil Miloudi a fait les expériences et les analyses d'ECIS et les injections intra-oculaires chez l'adulte. François Binet a participé à la réalisation des injections de lentivirus dans les yeux de souris adulte. Célia Parinot a participé aux études *in vitro* avec les lentivirus et effectué des RT-qPCR et d'immunobuvardage. Frédérique Pilon et Rachel Juneau ont fait les quantifications des aires

avasculaires et de bourgeons de NV dans le modèle OIR. Elisabeth MMA Andriessen a fourni des échantillons pour la quantification de miR106b dans le modèle de CNV induit avec laser. Gaëlle Mawambo a fourni des échantillons pour la quantification de miR-106b dans le modèle murin OIR. John Paul SanGiovanni a participé à la révision de l'article. Vincent De Guire et Przemyslaw Sapiha ont participé à la conception du projet, la direction et l'encadrement expérimental, l'analyse des données et la rédaction de l'article.

Article en révision dans le journal Aging (08-2020).

### 3. Article

#### Title: miR-106b suppresses retinal neovascularization

**Authors:** Catherine Ménard<sup>1</sup>, Ariel M. Wilson<sup>1</sup>, Agnieszka Dejda<sup>2</sup>, Khalil Miloudi<sup>3</sup>, François Binet<sup>2</sup>, Célia Parinot<sup>2</sup>, Frédérique Pilon<sup>2</sup>, Rachel Juneau<sup>2</sup>, Elisabeth MMA Andriessen<sup>2</sup>, Gaëlle Mawambo<sup>1</sup>, John Paul SanGiovanni<sup>4</sup>, Vincent De Guire<sup>1\*</sup>, Przemyslaw Sapieha<sup>1,2,3\*</sup>

#### Affiliations:

<sup>1</sup> Department of Biochemistry, Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Centre, University of Montreal, Montreal, Quebec, H1T 2M4, Canada;

<sup>2</sup> Department of Ophthalmology, Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Centre, University of Montreal, Montreal, Quebec, H1T 2M4, Canada;

<sup>3</sup> Department of Neurology-Neurosurgery, McGill University, Montreal, Quebec, H3A 2B4 Canada.

<sup>4</sup> Department of Nutritional Sciences, The University of Arizona, 1230 North Cherry Avenue, Tucson, AZ 85719, USA

\*Correspondence: Przemyslaw (Mike) Sapieha, Ph.D.  
E-mail: [mike.sapieha@umontreal.ca](mailto:mike.sapieha@umontreal.ca)

Or  
Vincent De Guire, PhD, DEPD, CSPQ  
E-mail: [vdeguire.hmr@ssss.gouv.qc.ca](mailto:vdeguire.hmr@ssss.gouv.qc.ca)

Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Centre  
5415 L'Assomption Boulevard, Montreal,  
Qc, H1T 2M4, Canada  
TEL: (514) 252-3400 ext. 7711. FAX: (514) 252-3430.

**Keywords:** microRNA, miR106, PERK, neovascularization, angiogenesis, OIR, VEGFA, Age-Related Macular Degeneration

**a) ABSTRACT**

MicroRNAs are small non-coding RNAs that post-transcriptionally regulate gene expression. We recently demonstrated that levels of miR-106b were significantly decreased in the vitreous and plasma of patients with neovascular age-related macular degeneration (AMD). Here we show that expression of the miR-106b-25 cluster is negatively regulated by the ER stress pathway of protein kinase RNA-like ER kinase (PERK) in a mouse model of AMD. A reduction in levels of miR-106b triggers vascular growth both in vivo and in vitro by inducing production of the pro-angiogenic factors. We demonstrate that therapeutic delivery of miR-106b to the retina with lentiviral vectors protects against aberrant retinal angiogenesis in two distinct mouse models of pathological neo-vascularization. Results from this study suggest that miRNAs such as miR-106b have the potential to be used as multitarget therapeutics for conditions characterized by aberrant retinal neovascularization.

## **b) INTRODUCTION**

Age-related macular degeneration (AMD) is a common [1] and complex [2, 3] disease of aging and the leading cause of irreversible loss of sight in elderly people [4-6]. Early forms of AMD are characterized by subretinal lipoproteinaceous deposits, local attrition of photoreceptors [7] and loss of visual sensitivity [8]. Late forms of AMD are defined by geographic atrophy (loss of retinal pigment epithelium and photoreceptors) [9] and/or pathologic choroidal neovascularization (CNV) characterized by vascular sprouting from the choriocapillaris into the neural retina or subretinal space [10]. The neovascular form (NV AMD or exudative AMD) accounts for over 80% of the vision loss associated with AMD [11].

The advent of therapies targeting vascular endothelial growth factor (VEGF) has significantly improved the quality of life of patients suffering from NV AMD [12-15]. However, not all patients with AMD respond to anti-VEGF therapies [16]. Sustained reduction in retinal VEGF levels can lead to neurotoxicity [17] and degeneration of RPE-choroicapillaris in mouse models [18]. Importantly, assessment by fundus photography and fundus fluorescein angiography of patients on anti-VEGF therapy showed accelerated development of geographic atrophy [19, 20]. These findings justify the need for continued exploration of novel therapeutic interventions.

Given that several inflammatory and growth factors in addition to VEGF [10, 21, 22] are associated with the pathogenesis of NV AMD, a multi-targeted approach is warranted. In this regard, therapeutic delivery of miRNAs may offer a promising venue. miRNAs are small non-coding RNAs of around 20 nucleotides that act as post-transcriptional regulatory elements of most cellular processes [23]. miRNAs mediate repression of gene expression with the potential of a single miRNA to target mRNA transcripts from hundreds of genes [24]. We previously elucidated a specific miRNA signature in the vitreous and plasma of patients with NV AMD — we observed a NV AMD associated increase in miR-146a and a decrease in miR-106b and miR-152 [25]. Interestingly, within our cohort, we found that both vitreous- and plasma-based miR-146a/miR-106b ratios had greater than 90% discriminatory power for classification of patients with NV AMD with an area under the receiver operating characteristic curve of 0,977 in vitreous humour and 0,915 in plasma, suggesting potential for a blood-based diagnostic. These results are concordant with the evidence based in humans and model systems — upregulation of miR-

146a, miR-17 (a miR containing the same seed sequence as miR-106b), miR-125 and miR-155 are associated with human AMD and a mouse model of oxygen induced retinopathy (OIR) [26-30]. miRNAs targeting VEGFA (miR-184, miR-150 and miR-106b) have also been found downregulated in human AMD and in animal models [28, 31, 32]. Here, we aimed to determine the mechanism leading to the down regulation of mir-106b in AMD and to characterize the therapeutic potential of upregulating miR-106b for NV AMD.

## c) RESULTS

### **miR-106b is downregulated in the choroid after laser-induced CNV**

In order to evaluate the potential role of miR-106b in CNV and NV AMD, we employed the laser burn-induced neovascularization mouse model. First, we assessed levels of miR-106b-5p (henceforth referred to as miR-106b) in choroid after laser-induced CNV (**Figure 1A**) by qPCR. In parallel, a cohort of mice were perfused with FITC-dextran (green) to visualize the extent of CNV followed by staining of choroid with IsolectinB4 (in red) to assess burn size at three different time points after laser burn (**Figure 1B**). In line with our previously reported findings for human vitreous and plasma from patients with active NV AMD [25], choroidal miR-106b expression was significantly downregulated in retinal specimens at all investigated time points, with statistically significant decreases of ~40% at day 3, and ~50% at days 7 and 14, relative to control animals (**Figure 1C-E**). These findings suggest that the observed decrease in miR-106b directly precedes initiation of CNV.

### **The PERK arm of the ER stress response is involved in retinal suppression of the mmu-miR-106b~25 cluster in laser-induced CNV.**

Upon confirmation of a reduction in retinal miR-106b during the CNV mouse model, we sought to investigate the underlying mechanism. MiR-106b is a member of the miR-106b~25 cluster (mmu-miR-106b, mmu-miR-25 and mmu-miR-93) and targets (among other loci) the 13<sup>th</sup> intron of protein-coding gene minichromosome maintenance complex component 7 (*MCM7* [33]) and regulation of miR-106b expression is tightly correlated with *MCM7* transcription. Previous studies have linked activation of the protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK, also known as Eif2ak3) arm of ER-stress pathways and consequent activation of activating

transcription factor 4 (ATF4) as a potential mechanism causing downregulation of the *MCM7* gene and consequently, the mmu-miR-106b~25 cluster [34] (**Figure 2A**). We therefore investigated if the regulation of mmu-miR-106b occurred at the transcriptional level through activation of ER stress effector pathway PERK.

To better characterise PERK activation, we examined its downstream effectors. Phosphorylation of eIF2 $\alpha$  was increased after laser burn with a significant ~2-fold rise at 7 days (**Figure 2B** and **C**). Moreover, a significant upregulation of the ATF4 transcript was also detected with a ~2.0-fold increase 7 days after laser burn (**Figure 2D**). We also assessed the effect of PERK activation on the *MCM7* gene transcript and miR-106b~25 cluster by qPCR analysis. At 7 days after laser burn, a significant decrease of ~35% in *MCM7* transcript expression was observed (**Figure 2E**). Additionally all members of the miR-106b~25 cluster (miR-106b, miR-25 and miR-93) were downregulated 3 days after laser burns with decreases of ~0.24-fold, ~0.37-fold and ~0.60-fold for miR-25, miR-93 and miR-106b, respectively (**Figure 2F**). To confirm that PERK can mediate repression of hsa-miR-106b, we infected Human Retinal Microvascular Endothelial Cells (HRMECs) cells with a lentivirus carrying short hairpin (sh) RNA against PERK. After 72 hours, we observed a significant ~2-fold increase in hsa-miR-106b expression in cultured cells (**Figure 2G**). Taken together, these results support a PERK-associated decrease in miR-106b in laser-induced CNV.

### **miR-106b targets effectors of angiogenesis**

To confirm the involvement of miR-106b in the regulation of AMD related angiogenesis, we quantified protein levels of experimentally validated miR-106b targets involved in the neovascularization process. Previous studies demonstrated that miR-106b can influence expression of VEGFA and HIF1 $\alpha$  [35]. In line with a decrease in miR-106b, we confirmed the upregulation of VEGFA (~3-fold) and HIF1 $\alpha$  (~1.71-fold) in choroid specimens 3 days after laser burn (**Figure 3A-D**). Importantly, we did not observe variations at the mRNA level for these targets, suggesting post transcriptional regulation of their protein expression, characteristic of miRNA regulation (**supplemental Figure 1A**). These results further suggest that the loss of



miR-106b expression can contribute to the expression of angiogenic proteins that promote neovascularization.

### **miR-106b influences HRMEC migration and choroidal vascular sprouting**

We sought to characterize the effects of miR-106b on cellular processes involved in angiogenesis. We first evaluated the role of miR-106b on HRMEC migration in a wound healing/cell migration assay performed by electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) assay. Cells were infected with Lv.miR-106b, Lv.shVEGFA, Lv.shPERK or control Lv.shGFP for 72 hours, plated at confluency and submitted to an electric pulse in the center of the well to provoke cell detachment, resulting in a region of 250 $\mu$ m diameter devoid of cells (**Figure 3E**). Cell migration into the empty space was quantified at 8 hours by measurement of impedance, which increases as cells cover the cell surface. We found that HRMEC migration was reduced in all three LV-treated dishes compared to control Lv.shGFP (blue line) (**Figure 3F-H**). Cells infected with Lv.shPERK became the less migratory (**Figure 3H**). Lv.miR-106b prevented migration of HRMEC to a similar extent as Lv.shVEGFA (**Figure 3F and G**). To confirm that miR-106b reduced migration of HRMEC, we performed a scratch assay (**Figure 3I**). As above, significant decreases in cell migration were observed in all treatment groups when compared to controls with a ~45% reduction in Lv.shVEGFA, ~50% reduction with LV-miR-106b and ~45% with the Lv.shPERK when compared to control Lv.shGFP (100% of migration) (**Figure 3I and J**).

NV AMD is characterized by pathological neovascularization of the choriocapillaris. We therefore used *ex-vivo* mouse choroid explants and assessed sprouting angiogenesis. Similar to findings reported above, we observed a ~27% reduction in sprouting area with LV-miR-106b, a ~23% reduction with Lv.shPERK, while Lv.shVEGFA resulted in a reduction of ~42% compared to control Lv.shGFP (**Figure 3K and L**). Taken together these results further highlight the anti-angiogenic properties of miR-106b and provide rationale to test miR-106b delivery *in vivo*.

### **Intraocular injection of Lv-miR-106b decreases choroidal neovascularization**

Endothelial cell migration and sprouting are key process involved in angiogenesis. We next tested the outcome of therapeutic delivery of miR-106b in models of pathological retinal angiogenesis. We first performed laser burns on 8 week-old mice to trigger CNV, directly followed by intravitreal injection of either Lv.miR-106b or positive control Lv.shVEGF. Choroids were collected 7 days after laser burns and quantified (**Figure 4A**). Lv.miR-106b led to ~45% reduction of neo-angiogenesis and prevented CNV to a similar extent as Lv.shVEGF (**Figure 4B-C**).

To confirm these findings, we next assessed the anti-angiogenic properties of miR-106b in the mouse model of oxygen-induced retinopathy [36]. Mouse pups were injected at P4 and P7 with Lv.miR-106b, negative control Lv.shGFP or positive control Lv.shVEGFA. From P7 to P12 pups were exposed to 75% oxygen and returned to room air from P12 until maximal neovascularization at P17 (**Figure 5A**). Similar to what was observed for CNV, retinas treated with Lv.miR-106b showed a significant ~50% reduction in pathological neovascularization compared to Lv.shGFP and a similar reduction to levels observed with Lv.shVEGFA (**Figure 5B-H**). Collectively, these results suggest that therapeutic delivery of miR-106b prevents pathological retinal angiogenesis.

### **d) DISCUSSION**

The diagnostic and therapeutic potential of miRNAs for ocular diseases is promising yet still requires proof of concept. We have previously shown that levels of miR-106b decrease in the vitreous and plasma of human patients with NV AMD [32]. In the current study, we demonstrate that much like in patients, there is a reduction in choroidal miR-106b in mouse retinas following laser burn induced-CNV. Furthermore, we provide evidence that the downregulation involves transcriptional inhibition of the 106b~25 cluster by the PERK pathway. Consequently, therapeutic intravitreal administration of miR-106b through lentiviral vectors inhibited pathological retinal neovascularization across models. These findings were supported by in vitro

and ex-vivo data that confirmed the role of miR-106b in preventing cellular mechanisms that lead to angiogenesis including cell migration and sprouting.

The pathogenesis of AMD is associated with oxidative stress, hypoxia, inflammation and proteotoxic stress, which can trigger pathways of ER-stress [37]. We observed activation of the PERK axis with phosphorylation of eIF2 $\alpha$  and increase in ATF4 mRNA after laser burn. Activated PERK typically influences protein synthesis through phosphorylation of eIF2 $\alpha$ , leading to global translation arrest [38] while transcripts with alternative upstream open reading frames, such as ATF4, are translated and can mediate an antioxidant response and expand the ER's folding capacity [39]. With sustained activation, ATF4 can also drive transcription of proapoptotic factors and lead to apoptosis by inducing CHOP [39]. The PERK pathway is thought to be influenced by miRNAs. For example, miR-204 represses PERK [40] while miR-30b-5p and miR-30c-5p regulate eIF2 $\alpha$ , and miR-214 downregulates ATF4 expression [41]. Similarly, to what has been reported in mouse embryonic fibroblasts [34], our data suggest that PERK suppresses miR-106b during choroidal neovascularization and thus render the retina more conducive to neovascularization.

We demonstrated the anti-angiogenic properties of miR-106b in models of retinal (OIR) and choroidal (laser CNV) neovascularization. The magnitude of suppression was comparable to that of suppression of VEGFA or PERK inhibition by shRNA. MiR-106b also significantly decreased choroidal sprouting. MiR-106b is a member of miR-17 family with reported anti-angiogenic properties [42, 43]. Furthermore, our results are consistent with previous studies demonstrating the anti-angiogenic properties of miR-106b in cell culture via STAT3 inhibition [44] and in mice in a model of hind limb ischemia.

Currently, there are efforts to devise therapeutics that simultaneously inhibit several factors involved in retinal vascular disease given the clinical success of compounds such as Aflibercept [45]. miRNAs regulate translation of multiple genes and hence may be considered as multi-target inhibitors. Their potential to mitigate retinal disease will grow as comprehensive landscapes of miRNAs in health and disease are established [26, 46]. Preclinical trials are underway for mimics or inhibition of specific miRNAs [47]. Overall, this study demonstrates

a new role for miR-106b and highlights its potential for suppressing pathological retinal neovascularization.

## **e) MATERIALS AND METHODS**

### **Animals**

All studies were performed according to the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research and were approved by the Animal Care Committee of the University of Montreal in agreement with the guidelines established by the Canadian Council on Animal Care. C57Bl/6 wild-type were purchased from The Jackson Laboratory and CD1 nursing mothers from Charles River Laboratory.

### **Cell line**

Human retinal microvascular endothelial cells (HRMECs) (Cell System, Kirkland, USA) were used from passages 6 to 11. HRMECs were cultured in EGM-2 microvascular medium (Lonza, Switzerland). For scratch assay experiments and for Electric Cell-substrate Impedance Sensing (ECIS), cells were starved overnight then cultured in EBM-2 medium (2% fetal bovine serum).

### **O<sub>2</sub>-induced retinopathy (OIR)**

Mouse pups (C57Bl/6, Jackson Labs) and their fostering mothers (CD1, Charles River) were exposed to 75% O<sub>2</sub> from postnatal day 7 (P7) until day 12 and returned to room air. This model serves as a proxy to human ocular neovascular diseases such as ROP and diabetic retinopathy characterized by a late phase of destructive pathological angiogenesis [48, 49]. Upon return to room air, hypoxia-driven neovascularization (NV) develops from P14 onwards [36]. Dissected retinas were flatmounted and incubated overnight with fluoresceinated isolectin B4 (1:100) in 1mM CaCl<sub>2</sub> to determine extent of avascular area or neovascularization area at P17 using ImageJ and the SWIFT-NV method [50].

### **Laser-induced CNV**

At the age of 11 weeks, mice were anesthetized with a 10% ketamine and 4% xylazine solution, and their Bruch's membrane was ruptured using an argon laser as described previously [51]. Two weeks after CNV induction, the mice were perfused with 0.5 ml of 15 mg/ml of fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran (average molecular weight 20,000) (Sigma Aldrich, CA) and euthanized. Eyes were enucleated and processed for analysis by immunohistochemistry. The sclera-choroid-RPE cell complex was mounted onto a slide, and the burns were photographed with an Olympus FV1000 microscope. The neovascularization was captured and the lesion caused by the laser impact was captured in a Z-stack. The Z-stacks were compressed into one image, and the FITC-dextran-labeled neovascular area and the area of the lesion were measured per lesion in ImageJ.

### **Immunohistofluorescence**

Eyes were fixed for 30 min in 4% PFA at room temperature, before dissection to isolate retinas (OIR) or choroids (LB-CNV). Flatmounted retinas or choroids were stained with Rhodamine labeled Griffonia (Bandeiraea) Simplicifolia Lectin I (RL-1102; Vector Laboratories) in 1 mM CaCl<sub>2</sub> in PBS. The sclera-choroid-RPE cell complex was mounted onto a slide, and the burns photographed with an Olympus FV1000 microscope. The neovascularization was captured in a Z-stack, and the lesion caused by the laser impact was captured in a single-plane image. The Z-stacks were compressed into one image, and the FITC-dextran-labeled neovascular area and the area of the lesion were measured per lesion in ImageJ.

### **Quantifications**

For visualization of pan-retinal vasculature (OIR model), dissected retinas were flatmounted and incubated overnight with rhodamine-labeled Griffonia (Bandeiraea) Simplicifolia Lectin I (Vector Laboratories Inc.) in 1 mM CaCl<sub>2</sub> in PBS for retinal vasculature. The extent of avascular area or neovascularization area at P17 was determined using ImageJ and the SWIFT\_NV method [50]. For laser burn model: Eyes were fixed for 30 min in 4% PFA at room temperature, before dissection of the sclera-choroid-RPE cell complex. After a secondary fixation of 15 min in 4% PFA at room temperature, the choroids were stained with rhodamine-labeled Griffonia (Bandeiraea) Simplicifolia Lectin I (Vector Laboratories Inc.) in 1 mM CaCl<sub>2</sub> in PBS.

### **Western Blot analysis**

For assessment of choroidal protein levels, in laserburn model, eyes were enucleated from mice 3 days after burn. RIPA buffer with anti-protease and anti-phosphatase (BioRad) was freshly prepared to manually with a piston to homogenize tissues and for cells lysis. Protein concentration was assessed by BCA assay (Sigma-Aldrich, Oakville, CA), and 30ug of protein analyzed for each condition by standard SDS-PAGE technique using Bis-Acrylamide gel 10% or 12.5% depending of protein size. Total protein transfer on nitrocellulose or PVDF membranes (Bio-Rad, Mississauga, ON, CA) was evaluated with Ponceau Red (Sigma-Aldrich, Oakville, CA). All antibodies blotting was proceed has recommendation of manufacturers.

**Antibodies:** Phospho-eIF2 $\alpha$  (Ser51) (Cell signaling Technology, Whitby, CA), Total-eIF2 $\alpha$  (Cell signaling Technology, Whitby, CA),  $\beta$ -actin (8H10D10) (Cell signaling Technology, Whitby, CA), VEGFA (C1) (Santa Cruz Biotechnology, INC, Texas, USA), HIF1 $\alpha$  (H1alpha67) (Novus Biologicals, Oakville, CA).

### **Quantitative real time polymerase chain reaction analysis**

RNA extraction was performed with TRIzol® Reagent (Life Technology, Waltham, USA) as suggested by manufacturer protocol. DNase digestion to prevent amplification of genomic DNA was then performed to prevent amplification of genomic DNA (Invitrogen, Waltham, USA). iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (Bio-Rad, Mississauga, CA) was used to generate cDNA from 1 $\mu$ g of total RNA. Real time qPCR was performed to quantify gene expression using SYBR® Green reagent (Applied Biosystem TM, USA) and was processed with an ABI 7500 Real-Time PCR machine.  $\beta$ -actin was used as a reference gene. Primer (Integrated DNA Technologies) sequences are listed in supplementary Table 1. miRNAs extraction was performed with TRIzol® Reagent, Retrotranscription reaction was done with TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystem, USA) using 100ng of total RNA in each reaction following manufacturer protocol. Real-time PCR was processed with TaqMan miR assay 20X and Universal master mix II No-UNG 2x for TaqMan Reaction (Applied Biosystem, USA). See list of primers in Supplemental Table 1.

### **Lentivirus plasmid constructions:**

Lentiviral constructs were produced with the PCR insertion kit (Q5 Site-Directed Mutagenesis kit, New England BioLabs®inc). The following sequence for shVEGFA and mature miR-106b sequence were inserted sh-VEGFA: 5' GAGCGGAGAAAGCATTTG TTTCTCGAGAAACAAATGCTTTCTCCGCTCTTTT 3', miR-106b: 5'TAAAGTGCT GACAGTGCAGATCTCGAGATCTGCACTGTCAGCACTTTATTTT-3'.All constructs were verified by Genome Quebec sequencing. Constructs of shIRE1 $\alpha$  and shPERK were previously published by our group [52].

### **Preparation of lentivirus**

We produced infectious lentiviral vectors by transfecting lentivector and packaging vectors into HEK293T cells (Invitrogen) as previously described (Dull et al. Journal of Virology, 1998). Viral supernatants were concentrated by ultracentrifugation (>500-fold). Viral efficiency was confirmed by real-time-PCR and Western blot.

### **Intravitreal injections**

For the OIR model, P4, P7, C57BL/6 pups were anesthetized with 3.0% isoflurane and injected in the vitreous chamber with 0.5  $\mu$ l of lentivirus. Retinas were collected at P17 for vasculature analysis. For the laser burn model, 8 to 10 week old C57BL/6 mice were injected right after laser burn in the vitreous chamber with 1  $\mu$ l of lentivirus. Choroids were collected 7 days post burns for CNV quantification.

### **Scratch assay**

Scrach assays were performed with pre-infected HRMECs cells (72hr) in 6 well plates until confluency. Scratches were done with 200 $\mu$ l sterile tips and media was replaced with with EBM-2 medium (2% fetal bovine serum). Pictures were taken at time 0 (moment of the scratch) and after 8 hours with a 2x objective using an inverted microscope (Zeiss Axio Imager) and migration distances were quantified with Image J software.

### **Electric cell-substrate impedance sensing migration assay (ECIS)**

Real time analysis of trans and inter-endothelial impedance was performed by plating  $1 \times 10^5$  pre-infected (72 hours) HRMECs cells into 8 well arrays (8W10E for migration assays, 40 electrodes per well) (Applied BioPhysics, Troy, NY, USA). Cells were allowed to grow at confluency leading to a capacitance of 10 nF. An electric shock was applied to the center of each well removing cells attached at that spot, permitting quantification of migrating cells.

### **Choroid ex-vivo explant assay**

Choroids from adult C57Bl/6 mice were dissected and sectioned into 1 mm squares, which were immediately transferred to reduced growth factor Matrigel. Lentiviral infections were performed 24h hours after in EBM basal medium (Lonza). Choroid explants were photographed with an inverted microscope (Zeiss Axio Imager) after 48 hours (at the beginning of choroid vessels growth), and at 72 hours to 96 hours post infection to follow vessels growth. Variation in the vascular area surrounding the choroid explants was calculated using Image J software [53].

### **Statistical Analyses**

Data are presented as mean  $\pm$  SEM. GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA; [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)) was used to analyze the statistical significance. We used Student's t test to compare groups of two, and one-way ANOVA with Bonferroni post-hoc analysis for groups of 3 and more; data with  $P < 0.05$  were considered statistically different: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$ .

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

**Funding:** This work was supported by operating grants from The Foundation Fighting Blindness Canada, the Canadian Diabetes Association (DI-3-18-5444-PS), the Canadian Institutes of Health Research (Foundation grant #353770 to P.S), the Canadian the Heart & Stroke Foundation Canada (G-16-00014658 to P.S.), and Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (418637 to P.S.). P.S. holds the Wolfe Professorship in Translational Research and a Canada Research Chair in Retinal Cell Biology. We also thank the Fonds de Recherche en Ophtalmologie de l'Université de Montréal (FROUM) and the RRSV.



**Conflicts of interest:** We do not have any disclosure or conflict of interest in the study.

## f) REFERENCES

1. Klein R, Klein BE. The prevalence of age-related eye diseases and visual impairment in aging: current estimates. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013; 54: ORSF5-ORSF13.
2. Miller JW. Age-related macular degeneration revisited--piecing the puzzle: the LXIX Edward Jackson memorial lecture. *Am J Ophthalmol.* 2013; 155: 1-35 e13.
3. Gorin MB. Genetic insights into age-related macular degeneration: controversies addressing risk, causality, and therapeutics. *Mol Aspects Med.* 2012; 33: 467-86.
4. Friedman DS, O'Colmain BJ, Munoz B, Tomany SC, McCarty C, de Jong PT, Nemesure B, Mitchell P, Kempen J. Prevalence of age-related macular degeneration in the United States. *Arch Ophthalmol.* 2004; 122: 564-72.
5. Kempen JH, O'Colmain BJ, Leske MC, Haffner SM, Klein R, Moss SE, Taylor HR, Hamman RF. The prevalence of diabetic retinopathy among adults in the United States. *Arch Ophthalmol.* 2004; 122: 552-63.
6. Maberley DA, Hollands H, Chuo J, Tam G, Konkall J, Roesch M, Veselinovic A, Witzigmann M, Bassett K. The prevalence of low vision and blindness in Canada. *Eye (Lond).* 2006; 20: 341-6.
7. Schuman SG, Koreishi AF, Farsiu S, Jung SH, Izatt JA, Toth CA. Photoreceptor layer thinning over drusen in eyes with age-related macular degeneration imaged in vivo with spectral-domain optical coherence tomography. *Ophthalmology.* 2009; 116: 488-96 e2.
8. Midena E, Vujosevic S, Convento E, Manfre A, Cavarzeran F, Pilotto E. Microperimetry and fundus autofluorescence in patients with early age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol.* 2007; 91: 1499-503.
9. Sarks SH. Ageing and degeneration in the macular region: a clinico-pathological study. *Br J Ophthalmol.* 1976; 60: 324-41.
10. Guillonneau X, Eandi CM, Paques M, Sahel JA, Sapiéha P, Sennlaub F. On phagocytes and macular degeneration. *Prog Retin Eye Res.* 2017; 61: 98-128.

11. Sobrin L, Seddon JM. Nature and nurture- genes and environment- predict onset and progression of macular degeneration. *Prog Retin Eye Res.* 2013.
12. Brown D, Kaiser P, Michels M, Soubrane G, Heier J, Kim R, Sy J, Schneider S. Ranibizumab versus verteporfin for neovascular age-related macular degeneration. *The New England Journal of Medicine.* 2006; 355: 1432-44.
13. Rosenfeld P, Brown D, Heier J, Boyer D, Kaiser P, Chung C, Kim R. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *The New England Journal of Medicine.* 2006; 355: 1419-31.
14. Mitchell P. A systematic review of the efficacy and safety outcomes of anti-VEGF agents used for treating neovascular age-related macular degeneration: comparison of ranibizumab and bevacizumab. *Current Medical Research and Opinion.* 2011; 27: 1465-75.
15. Jacob J, Brié H, Leys A, Levecq L, Mergaerts F, Denhaerynck K, Vancayzeele S, Van Craeyveld E, Abraham I, MacDonald K. Six-year outcomes in neovascular age-related macular degeneration with ranibizumab. *International journal of ophthalmology.* 2017; 10: 81-90.
16. Amoaku WM, Chakravarthy U, Gale R, Gavin M, Ghanchi F, Gibson J, Harding S, Johnston RL, Kelly SP, Lotery A, Mahmood S, Menon G, Sivaprasad S, et al. Defining response to anti-VEGF therapies in neovascular AMD. *Eye (Lond).* 2015; 29: 1397-8.
17. Robinson GS, Ju M, Shih SC, Xu X, McMahan G, Caldwell RB, Smith LE. Nonvascular role for VEGF: VEGFR-1, 2 activity is critical for neural retinal development. *FASEB J.* 2001; 15: 1215-7.
18. Saint-Geniez M, Maharaj AS, Walshe TE, Tucker BA, Sekiyama E, Kurihara T, Darland DC, Young MJ, D'Amore PA. Endogenous VEGF is required for visual function: evidence for a survival role on muller cells and photoreceptors. *PLoS One.* 2008; 3: e3554.
19. Grunwald JE, Daniel E, Huang J, Ying GS, Maguire MG, Toth CA, Jaffe GJ, Fine SL, Blodi B, Klein ML, Martin AA, Hagstrom SA, Martin DF, et al. Risk of geographic atrophy in the comparison of age-related macular degeneration treatments trials. *Ophthalmology.* 2014; 121: 150-61.
20. Grunwald JE, Pistilli M, Ying GS, Maguire MG, Daniel E, Martin DF, Comparison of Age-related Macular Degeneration Treatments Trials Research G. Growth of geographic atrophy in the comparison of age-related macular degeneration treatments trials. *Ophthalmology.* 2015; 122: 809-16.
21. Klein R, Knudtson MD, Klein BE, Wong TY, Cotch MF, Liu K, Cheng CY, Burke GL, Saad MF, Jacobs DR, Jr., Sharrett AR. Inflammation, complement factor h, and age-related macular degeneration: the Multi-ethnic Study of Atherosclerosis. *Ophthalmology.* 2008; 115: 1742-9.

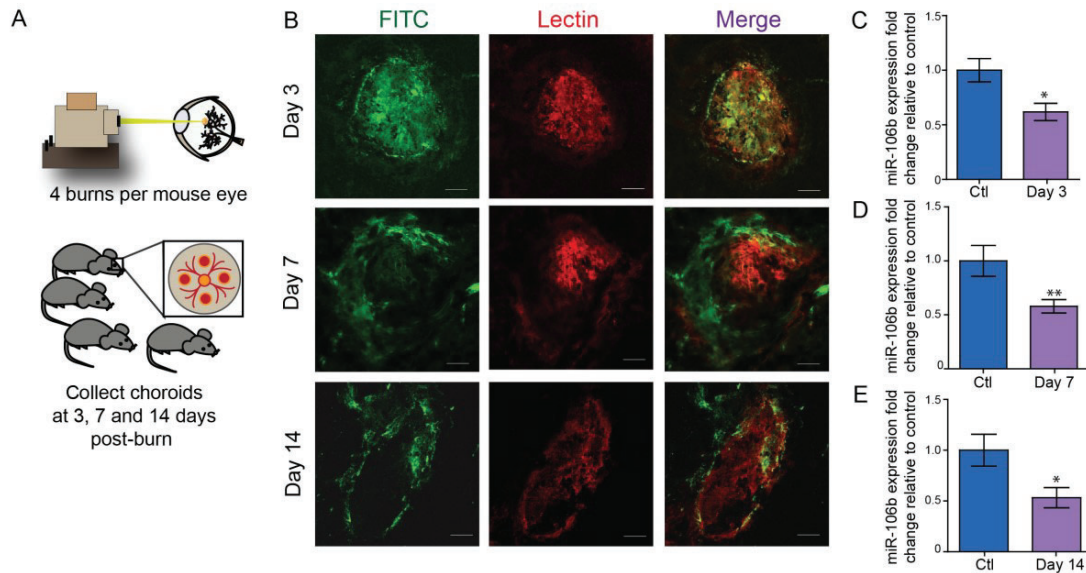
22. Ambati J, Fowler BJ. Mechanisms of age-related macular degeneration. *Neuron*. 2012; 75: 26-39.
23. Huang Y, Shen X, Zou Q, Wang S, Tang S, Zhang G. Biological functions of microRNAs: a review. *Journal of Physiology and Biochemistry*. 2011; 67: 129-39.
24. Baek D, Villén J, Shin C, Camargo F, Gygi S, Bartel D. The impact of microRNAs on protein output. *Nature*. 2008; 455: 64-71.
25. Ménard C, Rezende F, Miloudi K, Wilson A, Tétreault N, Hardy P, SanGiovanni J, De Guire V, Sapiéha P. MicroRNA signatures in vitreous humour and plasma of patients with exudative AMD. *Oncotarget*. 2016; 7: 19171-84.
26. Liu CH, Sun Y, Li J, Gong Y, Tian KT, Evans LP, Morss PC, Fredrick TW, Saba NJ, Chen J. Endothelial microRNA-150 is an intrinsic suppressor of pathologic ocular neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 112: 12163-8.
27. Yan L, Lee S, Lazzaro DR, Aranda J, Grant MB, Chaqour B. Single and Compound Knock-outs of MicroRNA (miRNA)-155 and Its Angiogenic Gene Target CCN1 in Mice Alter Vascular and Neovascular Growth in the Retina via Resident Microglia. *J Biol Chem*. 2015; 290: 23264-81.
28. Shen J, Yang X, Xie B, Chen Y, Swaim M, Hackett SF, Campochiaro PA. MicroRNAs regulate ocular neovascularization. *Mol Ther*. 2008; 16: 1208-16.
29. Ertekin S, Yildirim O, Dinc E, Ayaz L, Fidanci SB, Tamer L. Evaluation of circulating miRNAs in wet age-related macular degeneration. *Mol Vis*. 2014; 20: 1057-66.
30. Berber P, Grassmann F, Kiel C, Weber BH. An Eye on Age-Related Macular Degeneration: The Role of MicroRNAs in Disease Pathology. *Mol Diagn Ther*. 2017; 21: 31-43.
31. Nunes DN, Dias-Neto E, Cardo-Vila M, Edwards JK, Dobroff AS, Giordano RJ, Mandelin J, Brentani HP, Hasselgren C, Yao VJ, Marchio S, Pereira CA, Passetti F, et al. Synchronous down-modulation of miR-17 family members is an early causative event in the retinal angiogenic switch. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 112: 3770-5.
32. Menard C, Rezende FA, Miloudi K, Wilson A, Tetreault N, Hardy P, SanGiovanni JP, De Guire V, Sapiéha P. MicroRNA signatures in vitreous humour and plasma of patients with exudative AMD. *Oncotarget*. 2016.
33. Mendell J. miRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease. *Cell*. 2008; 133: 217-22.
34. Gupta S, Read DE, Deepti A, Cawley K, Gupta A, Oommen D, Verfaillie T, Matus S, Smith MA, Mott JL, Agostinis P, Hetz C, Samali A. Perk-dependent repression of miR-106b-

- 25 cluster is required for ER stress-induced apoptosis. *Cell Death and Disease*. 2012; 3: e333-e.
35. Nunes D, Dias Neto E, Cardó Vila M, Edwards J, Dobroff A, Giordano R, Mandelin J, Brentani H, Hasselgren C, Yao V, Marchiò S, Pereira CAB, Passetti F, et al. Synchronous down-modulation of miR-17 family members is an early causative event in the retinal angiogenic switch. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015; 112: 3770-5.
36. Smith LE, Wesolowski E, McLellan A, Kostyk SK, D'Amato R, Sullivan R, D'Amore PA. Oxygen-induced retinopathy in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1994; 35: 101-11.
37. Salminen A, Kauppinen A, Hyttinen JM, Toropainen E, Kaarniranta K. Endoplasmic reticulum stress in age-related macular degeneration: trigger for neovascularization. *Mol Med*. 2010; 16: 535-42.
38. Harding HP, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*. 1999; 397: 271-4.
39. Binet F, Sapienza P. ER Stress and Angiogenesis. *Cell Metab*. 2015; 22: 560-75.
40. Xu G, Chen J, Jing G, Grayson TB, Shalev A. miR-204 Targets PERK and Regulates UPR Signaling and beta-Cell Apoptosis. *Mol Endocrinol*. 2016; 30: 917-24.
41. McMahon M, Samali A, Chevet E. Regulation of the unfolded protein response by noncoding RNA. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2017; 313: C243-C54.
42. Bonauer A, Carmona G, Iwasaki M, Mione M, Koyanagi M, Fischer A, Burchfield J, Fox H, Doebele C, Ohtani K, Chavakis E, Potente M, Tjwa M, et al. MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice. *Science*. 2009; 324: 1710-3.
43. Doebele C, Bonauer A, Fischer A, Scholz A, Reiss Y, Urbich C, Hofmann W-K, Zeiher A, Dimmeler S. Members of the microRNA-17-92 cluster exhibit a cell-intrinsic antiangiogenic function in endothelial cells. *Blood*. 2010; 115: 4944-50.
44. Maimaiti A, Yang Y, Ma Y. MiR-106b exhibits an anti-angiogenic function by inhibiting STAT3 expression in endothelial cells. *Lipids in Health and Disease*. 2016; 15: 51-.
45. Sarwar S, Clearfield E, Soliman MK, Sadiq MA, Baldwin AJ, Hanout M, Agarwal A, Sepah YJ, Do DV, Nguyen QD. Aflibercept for neovascular age-related macular degeneration. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016; 2: Cd011346.
46. Desjarlais M, Rivera JC, Lahaie I, Cagnone G, Wirt M, Omri S, Chemtob S. MicroRNA expression profile in retina and choroid in oxygen-induced retinopathy model. *PLoS One*. 2019; 14: e0218282.

47. Hanna J, Hossain GS, Kocerha J. The Potential for microRNA Therapeutics and Clinical Research. *Front Genet.* 2019; 10: 478.
48. Sapieha P, Joyal J-S, Rivera J, Kermorvant Duchemin E, Sennlaub F, Hardy P, Lachapelle P, Chemtob S. Retinopathy of prematurity: understanding ischemic retinal vasculopathies at an extreme of life. *The Journal of Clinical Investigation.* 2010; 120: 3022-32.
49. Stahl A, Connor K, Sapieha P, Chen J, Dennison R, Krah N, Seaward M, Willett K, Aderman C, Guerin K, Hua J, Löfqvist C, Hellström A, et al. The mouse retina as an angiogenesis model. *Investigative ophthalmology & visual science.* 2010; 51: 2813-26.
50. Stahl A, Connor KM, Sapieha P, Willett KL, Krah NM, Dennison RJ, Chen J, Guerin KI, Smith LEH. Computer-aided quantification of retinal neovascularization. *Angiogenesis.* 2009; 12: 297-301.
51. Lambert V, Lecomte J, Hansen S, Blacher S, Gonzalez M-L, Struman I, Sounni N, Rozet E, de Tullio P, Foidart J, Rakic J-M, Noel A. Laser-induced choroidal neovascularization model to study age-related macular degeneration in mice. *Nature Protocols.* 2013; 8: 2197-211.
52. Binet F, Mawambo G, Sitaras N, Tetreault N, Lapalme E, Favret S, Cerani A, Leboeuf D, Tremblay S, Rezende F, Juan AM, Stahl A, Joyal JS, et al. Neuronal ER Stress Impedes Myeloid-Cell-Induced Vascular Regeneration through IRE1alpha Degradation of Netrin-1. *Cell Metab.* 2013; 17: 353-71.
53. Shao Z, Friedlander M, Hurst C, Cui Z, Pei D, Evans L, Juan A, Tahiri H, Tahir H, Duhamel F, Chen J, Sapieha P, Chemtob S, et al. Choroid sprouting assay: an ex vivo model of microvascular angiogenesis. *PLoS ONE.* 2013; 8: e69552-e.aging: current estimates. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013; 54: ORSF5-ORSF13.

## g) FIGURES

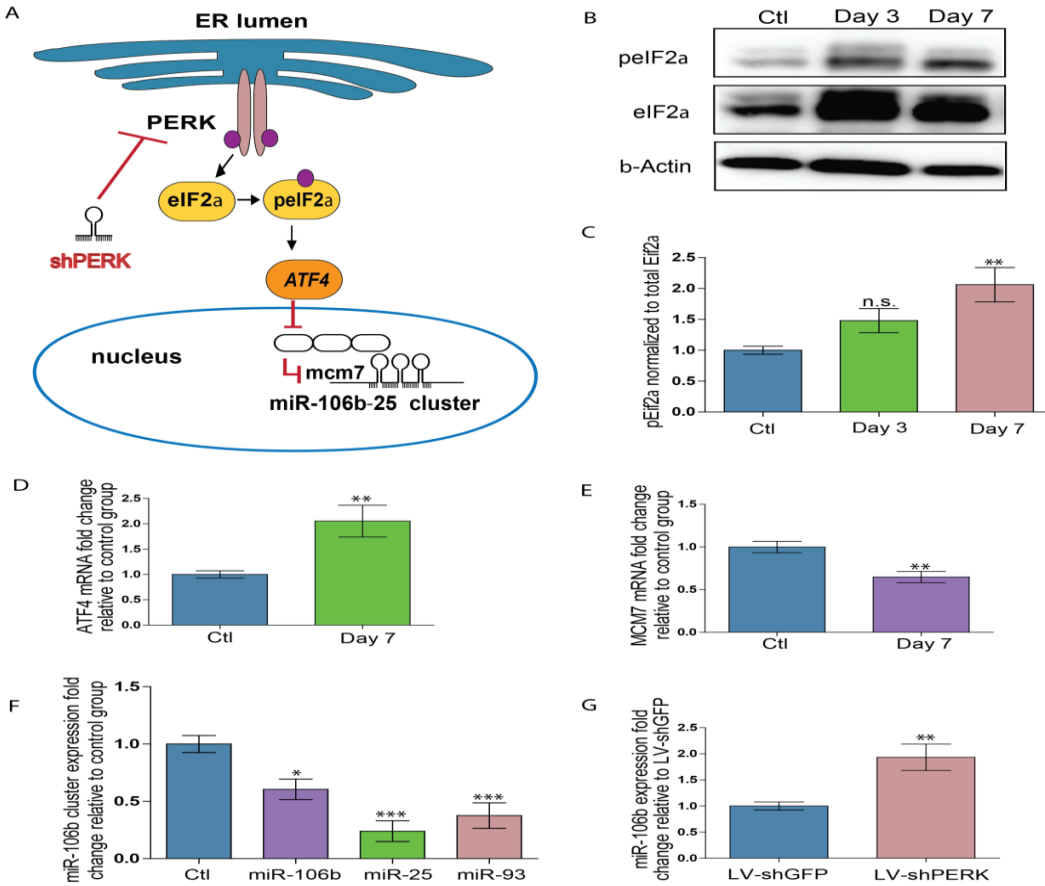
Figure 1



**Figure 1.** The initiation of retinal neo-vascularization is associated with downregulation of miR-106b expression.

**A)** Schematic of laser burn CNV mouse model. **B)** CNV (Green: FITC vascular perfusion), Burn (Red: Lectin) and merge 3 days after burns (top row), 7 days after burns (middle row), and 14 days after burns (bottom row). **C)** Choroidal expression of miR-106b by qPCR assessed 3 days after burns (n=8) **D)** choroid miR-106b expression by qPCR quantification 7 days after burns (n=13); **E)** choroid miR-106b expression by qPCR quantification 14 days after burns (n=10); Scale bar = 50 $\mu$ m. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. Unpaired Two-tailed Student's t test was used for the analysis, \*P < 0.05; \*\*P < 0.001; \*\*\*P < 0.0001.

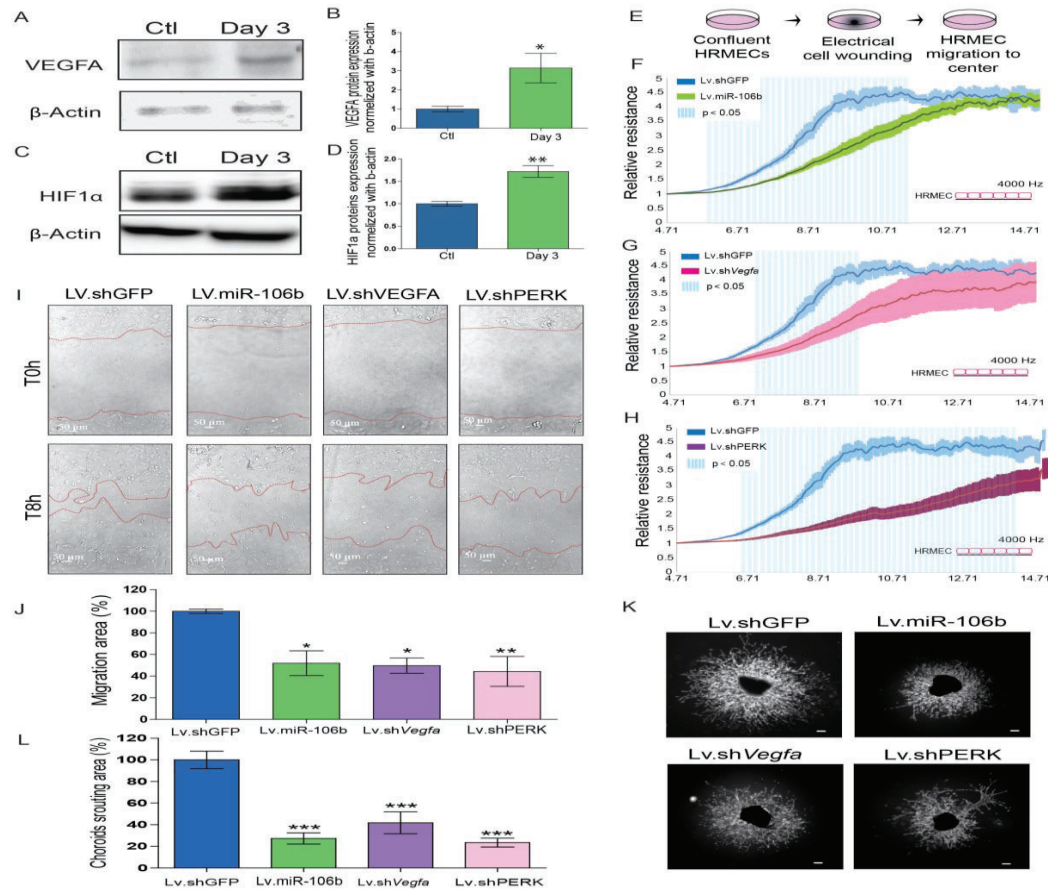
Figure 2



**Figure 2.** PERK activation provokes miR-106b-25 cluster and MCM7 host gene downregulation in a mouse model of CNV.

**A)** Schematic of ER stress activation of PERK pathway. **B)** Western blot of Phospho-EIF2 $\alpha$ , total-EIF2 $\alpha$  and  $\beta$ -actin in control choroids, and 3 and 7 days after burns, and **C)** quantification in control choroids, and at day 3 (n=7) and day 7 after burns (n=6). **D)** *Aft4* mRNA expression in choroids 7 days after burns (n=10), **E)** *Mcm7* mRNA expression in choroids 7 days after laser burn (n=14), **F)** miR106~25 cluster member expression in choroids 3 days after laser burn (miR-106b (n=7), miR-25 (n=6) and miR-93 (n=5) **G)** miR-106b expression after infection of HRMECs with LV-shGFP (negative control), and LV-shPERK (n=5). Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. One-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test was performed on groups of 3 or more, and unpaired Two-tailed Student's t test was used for the analysis of groups of 2, \*P <0.05; \*\*P<0.001; \*\*\*P<0.0001.

Figure 3

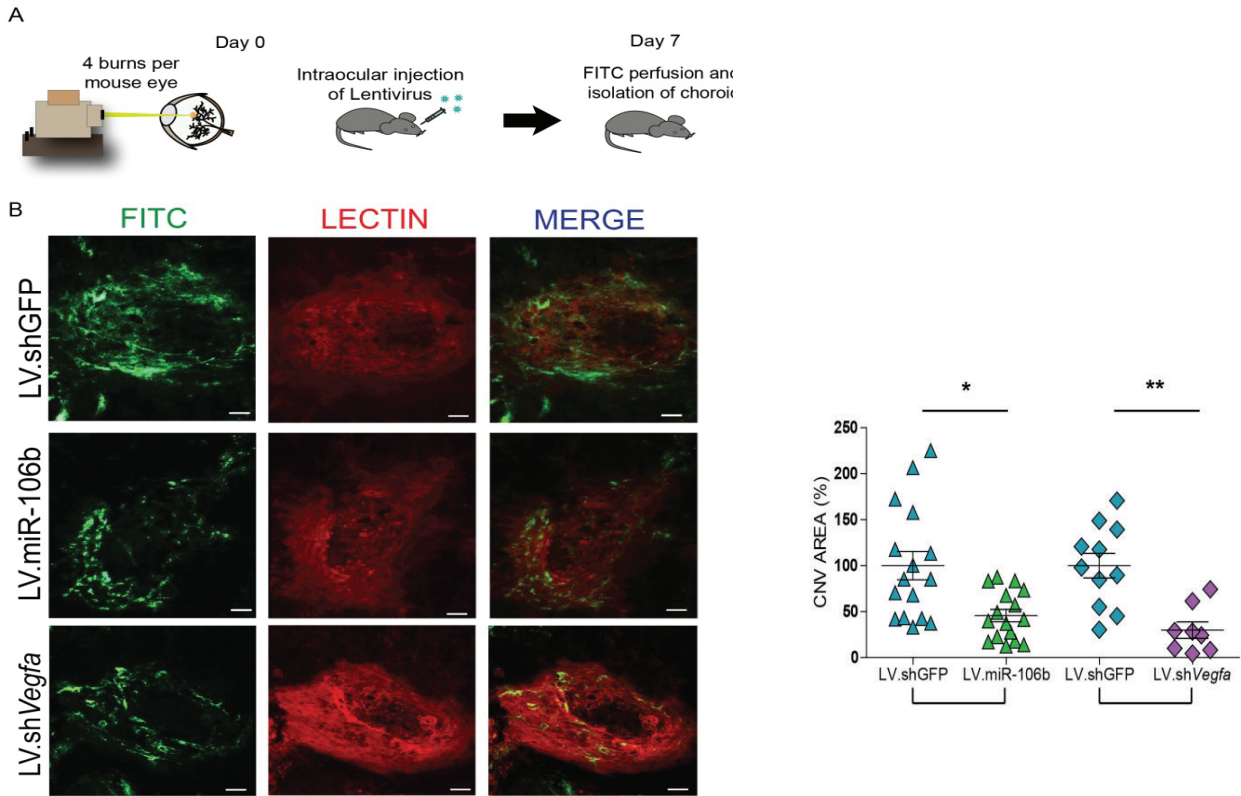


**Figure 3.** miR-106b exerts an anti-angiogenic effect via regulation of VEGFA and HIF1 $\alpha$ , and impairs retinal endothelial cell migration.

A) Western blot of VEGFA and  $\beta$ -actin from control choroids and 3 days after burns, and B) quantification of VEGFA on  $\beta$ -actin (n=4). C) Western blot of HIF1 $\alpha$  and  $\beta$ -actin from control choroids and 3 days after burns, and D) quantification of HIF1 $\alpha$  on  $\beta$ -actin (n=4). E) Schematic of ECIS cell migration assay procedure, F) HRMEC migration by ECIS with LV-shVEGFA compared to LV-shGFP (n=4), G) HRMEC migration by ECIS with LV-miR-106b compared to LV-shGFP (n=4), H) HRMEC migration by ECIS with LV-shPERK compared to LV-shGFP (n=4). I) HRMEC scratch assay infected 72h with LV-shGFP, LV-shVEGFA, LV-miR-106b and LV-shPERK at T0h and after 8h. J) Migration area quantification of scratch assay with LV-shVEGFA (n=4), LV-miR-106b (n=4), and LV-shPERK compared to LV-shGFP (n=4). K) Sprouting assay with choroid explants infected with LV-shGFP, LV-shVEGFA, LV-miR-106b, and LV-shPERK, L) Sprouting area quantification with LV-shVEGFA (n=9), LV-miR-106b (n=9), LV-shPERK respectively compared to LV-shGFP control (n=8). Scale bar = 500  $\mu$ m. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Unpaired Two-tailed Student's t test was used for the analysis of groups of 2, and one-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test was performed on groups of 3 or more, \*P < 0.05; \*\*P < 0.001; \*\*\*P < 0.0001.



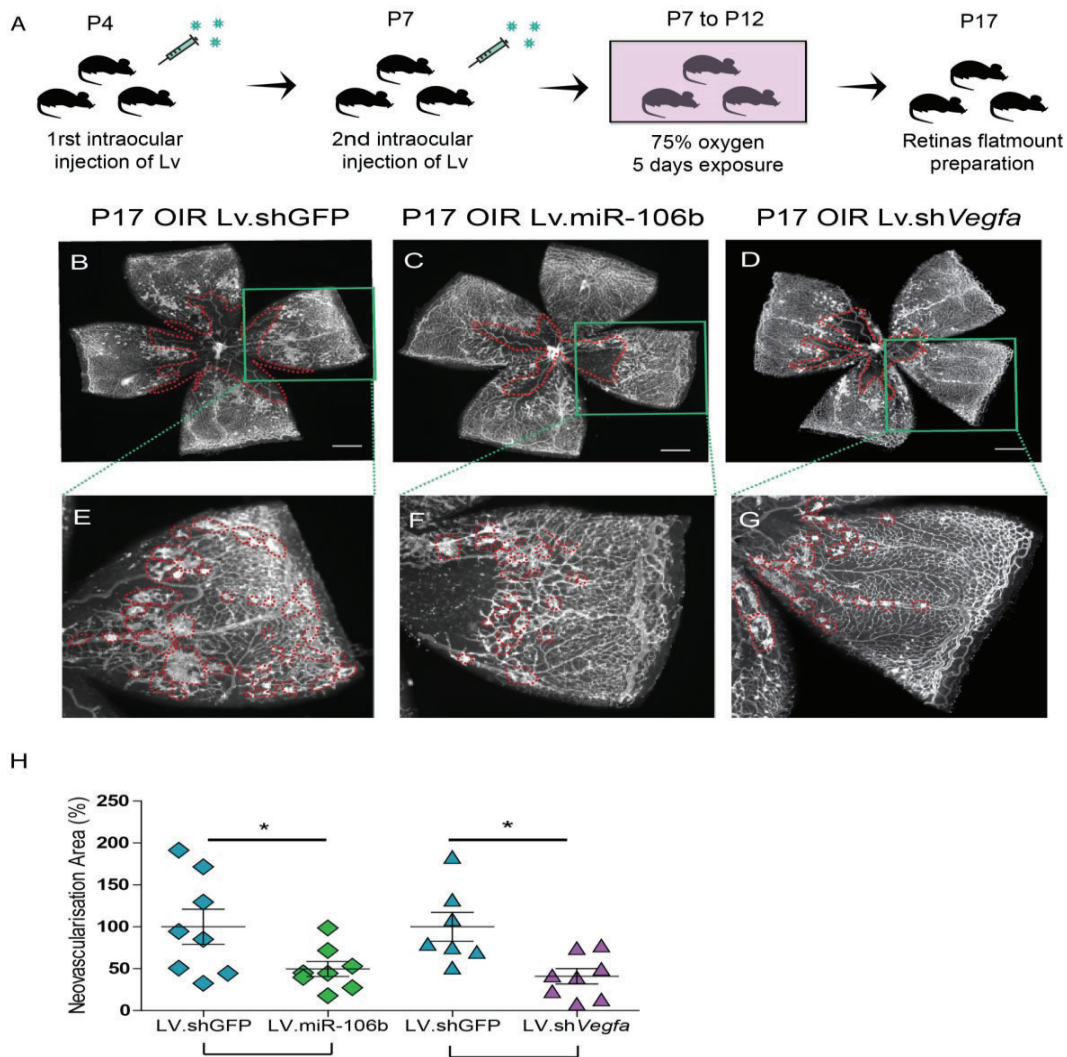
Figure 4



**Figure 4.** miR-106b decreases choroidal neovascularization in a CNV mouse model.

**A)** Schematic of intraocular injection of LV.miR-106b or LV.shVEGFA in laser burn mice model. **B)** Burn in red (lectin), CNV in green (FITC) and merge with LV-miR-106b compared with LV.shGFP, **C)** CNV/Burns ratios quantification after LV.miR-106b (triangles, n=16 burns/4 mice) and LV.shVEGFA (diamonds, n=8 burns/3 mice). **D)** Burn in red (lectin), CNV in green (FITC) and merge with LV-shVEGFA compared with LV-shGFP, **E)** CNV/Burns ratios quantification (n=8 burns/3 mice), **G)** CNV area quantification after LV.miR-106b (triangles, n=16 burns/4 mice) and LV.shVEGFA (diamonds, n=8 burns/3 mice). Scale bar = 50µm. Data are expressed as mean ± S.E.M. Unpaired Two-tailed Student's t test was used for the analysis of groups of 2, and one-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test was performed on groups of 3 or more, \*P < 0.05; \*\*P < 0.001; \*\*\*P < 0.0001.

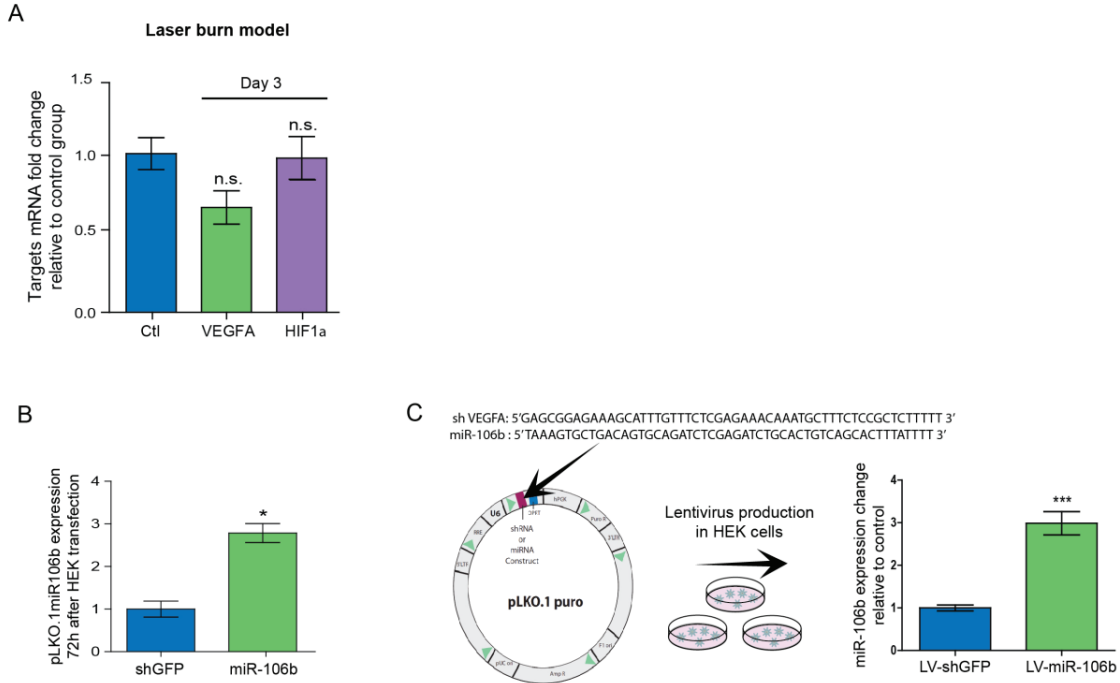
Figure 5



**Figure 5.** miR-106b decreases retinal neovascularization in the OIR mouse model.

**A)** Schematic of intraocular injection of LV-miR-106b or LV.shVEGFA in the OIR mice model. **B)** P17 retina flatmounted after 75% O<sub>2</sub> with intraocular injection of LV.shGFP, and **E)** magnified petal. **C)** P17 retina flatmounted after 75% O<sub>2</sub> with intraocular injection of LV-miR-106b, and **F)** magnified petal. **D)** P17 retina flatmounted after 75% O<sub>2</sub> with intraocular injection of LV-shVEGFA, and **G)** magnified petal. **H)** Neovascular area quantification after LV-miR-106b injection (n=8). **I)** Neovascular area quantification after LV-shVEGFA injection (n=8). Scale bars, 500 μm and 200 μm (for higher-magnification petal images). Data are expressed as mean ± S.E.M. Unpaired Two-tailed Student's t test was used for the analysis of groups of 2, and one-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test was performed on groups of 3 or more, \*P < 0.05; \*\*P < 0.001; \*\*\*P < 0.0001.

Supplemental Figure 1



Supplemental Figure 1.

**A)** VEGFA and HIF1 $\alpha$  mRNA expression in choroids 3 days after laser burn (VEGFA n=5, HIF1 $\alpha$  n=7). **B)** LV-miR-106b expression after plasmid transfection in HEK cells (n=4). **C)** Schematic of plasmid construction, virus production and LV-miR-106b expression 72hrs after viral infection of HRMECs. **D)** VEGFA mRNA expression in HRMECs 72hrs after LV-shVEGFA infection. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Unpaired Two-tailed Student's t test was used for the analysis, \*P <0.05; \*\*P<0.001; \*\*\*P<0.0001.

## **Chapitre 4: Discussion**

L'intérêt sur l'implication des miARN dans les maladies ne cesse de grandir. Plus les études se multiplient et dévoilent de nouvelles caractéristiques des miARN, plus ils deviennent des molécules de choix autant pour la détection que pour le traitement de pathologies. Notre étude s'est concentrée sur l'implication des miARN dans la forme de DMLA avec CNV. Très peu d'études ont portées sur le rôle des miARN dans la DMLA. Dans cette optique, nous avons élaboré un plan de recherche linéaire en deux phases: **1)** procéder à l'identification de miARN chez des patients souffrant de DMLA et **2)** évaluer le potentiel thérapeutique d'un miARN identifié en 1. Nous avons obtenu, suite à nos observations, une signature d'expression de miARN spécifiques pour la DMLA. Notre étude était la première à corrélérer cette signature dans le vitré et le plasma de ces patients. À la lumière de ces résultats, nous avons pu démontrer qu'un de ces miARN identifiés et connu pour être impliqué dans l'angiogenèse était un candidat potentiel thérapeutique.

## **1. Phase 1 : Identification de miARN chez les patients souffrant de la forme humide de la DMLA**

Les miARN sont présents en circulation dans la majorité des fluides humains, mais ce n'est qu'en 2013 que la première étude sur la présence de miARN dans le vitré est sortie (Weber, Baxter et al. 2010, Ragusa, Caltabiano et al. 2013). Bien que leur abondance dans ce dernier est beaucoup plus faible que dans le sang, il était pertinent d'étudier les variations de leur présence dans le vitré pendant les conditions pathologiques de la forme humide de la DMLA. De cette façon, nous pouvions obtenir une évaluation locale de leur expression chez les gens souffrant de cette maladie. Grâce à l'obtention d'échantillons de vitrés provenant de patients atteints de DMLA avec CNV, nous avons pu faire un criblage des miARN présents. Pour le groupe contrôle de notre étude, nous avons utilisé des patients souffrant de trou maculaire ou de membrane épirétinienne qui subissaient une vitriectomie. Puisque cette intervention chirurgicale est invasive (Neffendorf, Gupta et al. 2017), le vitré de personne entièrement saine n'est pas disponible. Les patients choisis souffraient de pathologies oculaires non-vasculaires. En effet, le trou maculaire est une perte de vision au niveau de la *macula* suite à un traumatisme comme un coup. Ils sont appelés les trous maculaires traumatiques. Il existe aussi les trous maculaires idiopathiques causés par un déplacement du corps vitré (Bikbova, Oshitari et al. 2019). Tel le

trou maculaire, la membrane épirétinienne est aussi un trouble mécanique affectant la vision. Elle se développe à partir de tissu cicatriciel de la rétine et provoque un renflement ou des plis au niveau de la *macula* (Stevenson, Prospero Ponce et al. 2016). Cette réalité de notre étude devient une limite qu'il faut tenir compte lors de l'évaluation du potentiel de biomarqueurs des miARNs identifiés.

Le criblage effectué par *array de RT-qPCR* nous a confirmé la faible abondance des miARN dans le corps vitré. En effet, moins de 10% des miARN, sur une possibilité de 384 au total, ont été détectés dans cet essai. L'analyse de ceux qui ont été détectés, nous a permis d'identifier une signature significative de certains miARN spécifiques à la forme humide de la DMLA en comparaison avec le groupe contrôle. L'expression de deux miARN dont miR-548a et miR-146a étaient augmentées significativement alors que trois étaient diminuées de façon significative, soient miR-106b, miR-152 et miR-205. Suite à ces résultats, il était primordial de valider ces observations en utilisant la technique de réaction en chaîne par polymérase (rtPCR) individuelle pour chacun des cinq miARN identifiés. Cette technique de détection est plus sensible et spécifique que les *array de RT-qPCR*. De plus, le nombre de patients par groupe a été augmenté pour s'assurer d'avoir une meilleure représentation des conditions de la DMLA. Ainsi les résultats obtenus en *array de RT-qPCR* ont été validés pour trois des cinq miARN identifiés dont l'augmentation de miR-146a, la diminution de miR-106b et de miR-152 dans le vitrés des patients souffrant de DMLA. Bien que les observations obtenues dans ce fluide corporel nous informent des dérèglements locaux de la maladie, la collecte de vitrée est une intervention invasive comparativement à la prise de sang. Dans le but d'évaluer leur potentiel de biomarqueur, nous avons confirmé que cette signature de miARN présente dans le vitré s'observait dans le plasma de cette même cohorte de patients. Nous avons opté pour l'utilisation du plasma dans notre étude car il est obtenu sans déclencher les mécanismes de coagulation contrairement au sérum. En effet, les plaquettes qui sont impliquées dans la coagulation peuvent sécréter des miARN et modifier la composition (Wang, Yuan et al. 2012). La corrélation que nous avons établie entre le vitré et le plasma est unique à notre étude et appuie grandement le potentiel de cette signature pour le développement de biomarqueurs. Dans la majorité des recherches effectuées pour l'identification de biomarqueurs chez la DMLA, les analyses des miARN se

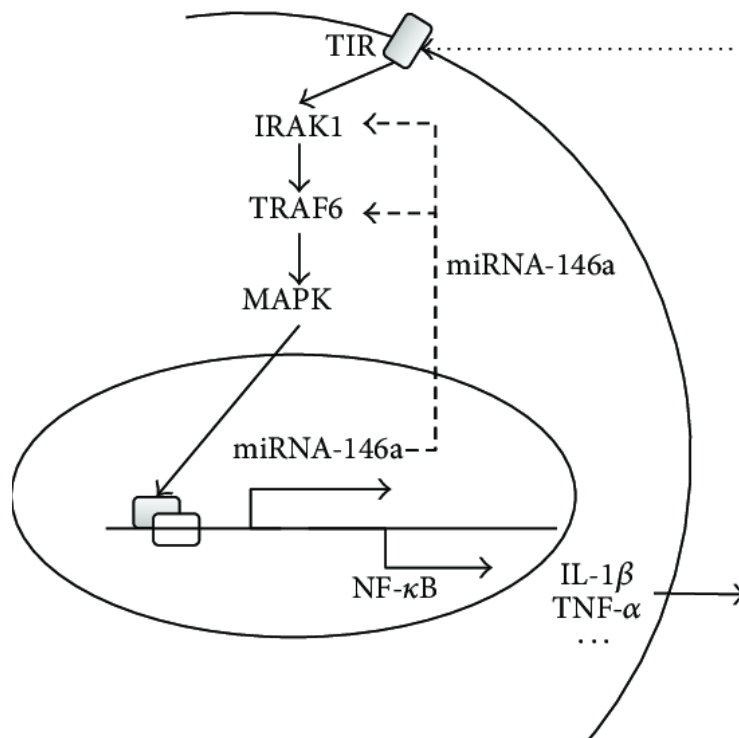
font seulement dans un fluide ou un tissu précis tel le sang ou la rétine. (Lukiw, Surjyadipta et al. 2012, Grassmann, Schoenberger et al. 2014).

Les observations obtenues sur les niveaux des miARN détectés corrélerent avec la pathogenèse de la DMLA. Dans un premier temps, l'augmentation de miR-146a dans ce contexte pathologique a été observée dans d'autres études. En effet, le groupe de Lukiw a noté une augmentation de miR-146a dans les tissus de la rétine de patients souffrant de la DMLA (Lukiw, Surjyadipta et al. 2012). Plus récemment, l'étude de Romano a rapporté un niveau élevé de miR-146a dans le sérum de patients avec DMLA et aussi chez le rat dans un modèle animal mimant la DMLA (Romano, Platania et al. 2017). Une augmentation de miR-146a a, en plus, été observée dans la forme sèche de la DMLA avec atrophie géographique (**GA**) par le groupe de Bhattacharjee en 2016 (Bhattacharjee, Zhao et al. 2016). MiR-146a fait partie de la famille miR-146 qui contient que deux membres, miR-146a et miR-146b, tous deux sont fortement associés aux mécanismes de l'inflammation (Paterson and Kriegel 2017). La surexpression de la famille miR-146 a été préalablement observée dans le cancer du sein avec métastases (Bhaumik, Scott et al. 2008) et a ensuite été notée chez des pathologies associées à l'inflammation. Effectivement, une augmentation de miR-146a a été démontrée dans les régions du cerveau avec neuro-inflammation chez les patients atteints d'Alzheimer (Lukiw, Zhao et al. 2008). L'expression de miR146a/b est aussi élevée dans certaines maladies cardiovasculaires inflammatoires, par exemple dans les plaques d'athérosclérose, dans l'infarctus du myocarde et la maladie de l'artère coronaire (Takahashi, Satoh et al. 2010, Zidar, Bostjancic et al. 2011, Raitoharju, Oksala et al. 2013).

L'implication de miR-146a dans l'inflammation et l'immunité innée est bien documentée dans la littérature (Sheedy and O'Neill 2008, Saba, Sorensen et al. 2014, Paterson and Kriegel 2017). Son expression est reliée à la présence de différentes cytokines participant à l'initiation et le maintien de l'inflammation. Effectivement, la stimulation de cellules ÉPR humaines avec l'interleukine 1 $\beta$  (**IL-1 $\beta$** ), en présence du facteur nécrotique tumoral alpha (**TNF $\alpha$** ) influence positivement le niveau d'expression de miR-146a (Kutty, Nagineni et al. 2013). Son expression serait dépendante du facteur de transcription NF- $\kappa$ B suite à une stimulation des récepteurs TLR, plus précisément le TLR-4 (Taganov, Boldin et al. 2006, Sheedy and O'Neill 2008). La transcription et la production de miR-146a ont un effet de

rétroaction négative puisqu'il cible directement l'expression des protéines IRAK (interleukin-1 receptor-associated kinase 4) et TRAF6 (**Figure 17**) (Taganov, Boldin et al. 2006, Iyer, Zurolo et al. 2012), des effecteurs clés impliqués dans l'activation de l'immunité innée (Akira and Takeda 2004). Le rôle de miR-146a se situe au niveau de la régulation négative de la voie de signalisation activée via le TLR-4 (Saba, Sorensen et al. 2014). Dans le contexte pathologique de la DMLA, la surexpression de miR-146a peut s'expliquer par la présence constante des cytokines IL-1 $\beta$  et TNF $\alpha$ . Ces cytokines participent à l'amplification de la CNV (de Oliveira Dias, Rodrigues et al. 2011, Ambati, Atkinson et al. 2013). Il a été, en effet, démontré qu'il y avait une forte abondance de TNF $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  dans les tissus de patients avec CNV et une présence accrue d'IL-1 $\beta$  dans le vitré de patient souffrant de la DMLA (Oh, Takagi et al. 1999, Zhao, Bai et al. 2015). Enfin, il a été observé que la présence de l'interleukine 6 (IL-6), une cible directe de miR-146a (Bhaumik, Scott et al. 2009), est associée à la formation de la CNV (Lavalette, Raoul et al. 2011) Finalement, il a été démontré que l'expression de miR-146a était altérée avec le vieillissement qui ensuite avait un impact sur le métabolisme des lipides des macrophages. L'accumulation de lipides dans les drusen est fortement associée au vieillissement et au développement de la DMLA (Jiang, Xiang et al. 2012). Ces observations soutiennent l'implication de miR-146a dans la DMLA avec CNV.





**Figure 1.** Boucle de rétroaction négative de la réponse immunitaire par miR-146a (Wei, Wang et al. 2016)

Dans un deuxième temps, nous avons observé une diminution significative de miR-152. Ce dernier fait partie de la famille miR148/152 qui sont des miARN fortement associés au développement de cancers (Chen, Song et al. 2013). Une diminution de miR-152 est observée dans plusieurs types de cancers tel le cancer des ovaires, de l'endomètre de l'utérus, du sein, de la prostate, du foie et dans certains cancers pulmonaires (non small cell lung cancer : NSCLC) ou gastriques (Liu, Li et al. 2016). Il a été démontré que son expression avait un effet d'inhibition de la prolifération, de la migration cellulaire et sur l'invasion tumorale (Xu, Jiang et al. 2013, Zhu, Li et al. 2013, Cheng, Ma et al. 2014, Wu, Huang et al. 2014). La faible expression de miR-152 dans un contexte tumoral favorise ainsi l'angiogenèse permettant l'irrigation des tumeurs. Dans notre étude, nous avons aussi noté cette diminution de miR-152 qui peut ainsi faciliter la formation de CNV. En effet, en ciblant ADAM17, miR-152 provoque une inhibition de la prolifération et de la migration de cellules endothéliales ombilicales humaines (HUVEC) (Wu, Huang et al. 2014). Des étapes de l'angiogenèse qui sont importantes à la réalisation de la

croissance de nouveaux vaisseaux sanguins. De plus, ADAM17 est une métalloprotéinase qui est impliquée dans l'activation de la voie NOTCH, une voie clé participant à l'angiogenèse. Le groupe de Xu a aussi démontré qu'en ciblant le récepteur du facteur de croissance de l'insuline 1 et le substrat pour le récepteur de l'insuline 1 (IGF-IR et IRS1), miR-152 avait un effet de suppression sur l'expression du VEGF et conséquemment sur l'angiogenèse (Xu, Jiang et al. 2013). Il a aussi été observé que l'expression du FGF2 était directement réprimée par l'action de miR-152 (Cheng, Ma et al. 2014). Bien que miR-152 soit principalement documenté dans les cancers, la diminution de son expression dans la DMLA est cohérente puisque cette diminution affecte positivement l'expression de facteurs de croissance tel le FGF2 impliqué dans la formation de CNV dans la DMLA (de Oliveira Dias, Rodrigues et al. 2011).

Dans un troisième temps, nous avons observé la diminution de l'expression de miR-106b chez les patients souffrant de DMLA. Ce dernier fait partie de la grande famille de miR-17 qui comprend trois différents polycistrons, soit miR-17~92, miR-106a~363 et miR106b~25 qui sont exprimés sur différents chromosomes (Mendell 2008). La famille miR-17 est classée parmi les oncomiR pour leur capacité à réguler l'expression de protéines oncogènes et pour leurs signatures dans les cancers (Zhang, Pan et al. 2007, Ventura, Young et al. 2008). Un effet généralisé par tous les membres de cette famille est l'augmentation de leur expression dans les cancers à l'exception de miR106b où son expression diminue dans le cancer ovarien et les tumeurs des cellules géantes des os (Chen, Chen et al. 2015, Wang, Yin et al. 2015) Il est intéressant de noter que l'expression des miARN d'un même polycistron peut être régulée individuellement. En effet, on peut retrouver un promoteur ou un épissage alternatif affectant individuellement un miARN (Moi, Braaten et al. 2019). Du côté des pathologies oculaires, la famille miR-17 a aussi été impliquée dans le rétinoblastome, une tumeur de la rétine où leur surexpression a été démontrée comme un élément important participant à son développement. D'autre part, l'étude d'Ertekin a montré que plusieurs membres de la famille miR-17 dont miR-17, miR-20a et miR-106a avaient aussi une expression élevée dans le plasma de patient souffrant de la DMLA avec CNV. Un fait intéressant est qu'ils ont noté une diminution de miR-25, mais aucun changement significatif des autres membres du polycistron miR106b~25 (miR-106b et miR-93) (Ertekin, Yildirim et al. 2014).

La diminution observée de l'expression de miR-106b dans notre étude aurait pour effet de favoriser le développement de la CNV. En effet, son expression a un effet anti-angiogénique puisqu'il cible directement le VEGF qui est bien connu pour son implication dans la formation de NV (Nunes, Dias Neto et al. 2015). L'étude de Nunes a démontré une diminution de l'expression de différents membres de la famille miR-17 dont miR-106b dans le modèle murin OIR. Dans cette étude, ils ont démontré à l'aide d'essais avec rapporteur luciférase, la capacité de miR-106b à cibler directement le VEGF et HIF1 $\alpha$ . L'implication de miR-106b dans la formation de NV a été soulignée dans un modèle murin d'ischémie fémorale (Semo, Sharir et al. 2014). De plus, dans les travaux de Maimaiti, cet effet d'inhibition de l'angiogenèse par miR-106b a été observé dans les cellules endothéliales HUVEC en ciblant STAT3 (Maimaiti, Yang et al. 2016). Une autre cible directe de miR-106b est l'interleukine-8 (**IL-8**) (Chuang, Luo et al. 2012). L'expression d'IL-8 est connue pour avoir un effet positif sur l'angiogenèse (Koch, Polverini et al. 1992, Li, Dubey et al. 2003). De plus, IL-8 est impliqué dans l'inflammation et le stress oxydatif présent dans la DMLA (de Oliveira Dias, Rodrigues et al. 2011). La perte de l'expression de miR-106b pourrait donc pour effet d'augmenter l'expression de protéines telle le VEGF, HIF1 $\alpha$  et IL-8 favorisant ainsi la formation de CNV chez les patients atteints de la forme humide de la DMLA.

Au moment de notre étude, seulement quelques recherches portaient sur la signature de miARN associée à la présence de la DMLA (**Tableau 1**) (Ertekin, Yildirim et al. 2014, Grassmann, Schoenberger et al. 2014, Szemraj, Bielecka-Kowalska et al. 2015). Ensuite les études de Ren et Pogue se sont ajoutés (Ren, Liu et al. 2017, Pogue and Lukiw 2018). Un fait qui est surprenant, est la grande divergence des résultats obtenus entre ces études. Effectivement, on remarque une grande variabilité des résultats entre les signatures de miARN observées. En fait, le problème principal est que plusieurs facteurs peuvent influencer les résultats tels les facteurs environnementaux (alimentation, tabagisme, sédentarité) et de santé entourant le patient, les méthodes d'extraction et d'analyse peuvent avoir un effet sur les miARN présents dans le fluide étudié. Notamment, l'âge, l'alimentation, la médication, la consommation de drogues, d'alcool et de cigarettes ainsi que les conditions de la santé peuvent influencer l'expression des miARN en circulation (Wang and Cui 2012). Il est donc très important, avant de pouvoir comparer des études, de s'assurer que l'on détient le plus d'informations possible

sur les sujets qui seront à l'étude et d'avoir une homogénéisation des méthodes utilisées. Dans plusieurs travaux qui ont pour but l'identification d'une signature de miARN spécifique à une pathologie, les informations ne sont pas toujours complètes. Souvent, les dossiers médicaux des sujets d'étude ou des patients ne contiennent pas les détails sur les habitudes alimentaires, de tabagisme et sur la consommation de drogues ou d'alcool. Lors de notre étude, nous étions limités sur le nombre de patients et sur les informations sur ceux-ci. Étant donné que nous avons utilisé des échantillons de vitrés qui sont collectés lors d'une intervention chirurgicale considérée invasive, ces échantillons sont donc plus difficiles à obtenir que ceux du sang par exemple. Par conséquent, notre groupe d'individus souffrant de la DMLA avait une moyenne d'âge plus élevée que le groupe d'individus contrôle. Sachant, que l'âge peut affecter l'expression de miARN, nous nous sommes donc assurés qu'il n'y avait pas de corrélation entre l'expression des miARN et l'âge des individus pour chaque groupe (Noren Hooten, Fitzpatrick et al. 2013). L'historique de santé des patients ou des individus du groupe contrôle sont des informations dont il faut tenir compte pour s'assurer d'avoir un échantillonnage le plus homogène possible. Dans notre étude, nous avons exclu les individus qui souffrent de diabète ou d'autres maladies oculaires que la DMLA tel le glaucome, les rétinopathies, uvéites ou autres pathologies oculaires vasculaires qui pourraient influencer le niveau de miARN dans les fluides. De plus, le type de fluide biologique utilisé peut faire aussi varier la détection de miARN (Meyer, Pfaffl et al. 2010). Même provenant du sang le choix entre le plasma et le sérum peut affecter les miARN présents, en effet, il a été observé qu'il se retrouvait une plus grande quantité de miARN dans le plasma que le sérum (Etheridge, Lee et al. 2011, Wang, Yuan et al. 2012, Max, Bertram et al. 2018). On doit donc prendre en considération ce fait avant de comparer nos résultats avec des études utilisant le sérum comme l'étude de Grassman et de Szemraj par exemple. Un autre facteur influençant la détection de miARN est de quelle façon les échantillons sont traités. En effet, lors de la collection de plasma ou de sérum à partir du sang, il faut s'assurer d'éviter l'hémolyse des globules rouges pouvant libérer des miARN et influencer les résultats (Kirschner, Kao et al. 2011). Dans notre étude, nous avons testé tous nos échantillons de plasma pour la présence d'hémolyse et exclu ceux qui en avaient.

**Tableau III.** Compilations des études sur la détection des miARN chez les patients souffrant de la DMLA.

Échantillons	Signature	Méthodes	Normalisation	Références
Sérum	<b>Augmentation</b> de miR-4258, miR-889, et Let-7	<b>Extraction:</b> mirVana PARIS Kit (Ambion) <b>Détection:</b> TaqMan® Human MicroRNA Array A et B	U6 small nuclear RNA	Szemraj Med. Sci. Monit., 2015
Plasma	<b>Augmentation</b> de miR-17-5p, miR-20a-5p, miR-24-3p, miR-106a-5p, and miR-223-3p <b>Diminution</b> de miR-21-5p, miR-25-3p, miR-140-3p, miR-146b-5p, miR-192-5p, miR-335-5p, miR-342-3p, miR-374a-5p, miR-410, miR-574-3p, and miR-660-5p	<b>Extraction:</b> High Pure miRNA Isolation Kit (Roche) <b>Détection:</b> microfluidic high-throughput qRT-PCR	Global mean normalization	Ertekin Mol Vis 2014
Humeur vitrée et plasma	<b>Augmentation</b> de miR-146a et <b>diminution</b> de miR-106b et miR-152	<b>Extraction :</b> Trizol <b>Détection:</b> TaqMan® Human MicroRNA Array A	Weigthed mean et miR-16	Ménard 2016
Sérum	<b>Augmentation:</b> hsa-miR-301-3p, hsa-miR-361-5p,	<b>Extraction :</b> mirVana PARIS Kit (Ambion) <b>Détection:</b> Ion Total RNA-Seq v2 kit (Life Technologies)	hsa-miR-451-5p	Grassmann PLOS One 2014
Rétine humaine	<b>Augmentation</b> de miR-9, miR-34a, miR-125b et miR-146a	<b>Extraction:</b> PureLink™ (Invitrogen) <b>Détection:</b> biofluidic miRNA arrays	miRNA-183 and/or 5SRNA	Bhattacharjee PLOS One 2016
Exosomes extrait du sérum	<b>Augmentation</b> de miR-486-5p and miR-626 <b>Diminution</b> de miR-885-5p	Array de qPCR	?	Elbay, Scand J Clin Lab Invest. 2019

Les méthodes d'extraction, de quantification et d'analyse font aussi parties des facteurs cruciaux pouvant influencer les résultats obtenus lors de la recherche de biomarqueurs (Etheridge, Lee et al. 2011). Il a été noté qu'il y avait une différence dans l'expression de miARN selon les méthodes d'extraction et les techniques pour mesurer l'expression des miARN (Ach, Wang et al. 2008, Meyer, Kaiser et al. 2012, Brunet-Vega, Pericay et al. 2015) . Il peut même y avoir des différences entre les plateformes pour les mêmes échantillons (Johnson, Li et al. 2007). La normalisation est aussi une étape très critique pour l'interprétation des résultats puisqu'aucun miARN n'est établi pour la normalisation dans les fluides humains. Dans les méthodes de normalisation les plus utilisées, il y a l'utilisation d'un miARN endogène dont l'expression est stable dans tous les échantillons (Meyer, Pfaffl et al. 2010). Par exemple, dans les travaux de Grassman, ils ont utilisé un miARN qui était exprimé stablement dans leurs échantillons, miR-451-5p alors que dans l'étude de Hooten, ils ont utilisé miR-191. Le désavantage de cette normalisation est qu'elle est difficilement reproductible pour d'autres contextes pathologiques ou d'autres fluides. Notamment dans notre étude, aucun miARN endogène n'était exprimé assez stablement pour être utilisé en tant que référence pour l'analyse de nos échantillons de vitrés. Nous avons alors opté pour la normalisation avec la moyenne pondérée qui consiste à normaliser avec les valeurs d'écart type de tous les miRNA détectés. L'avantage de cette technique est qu'elle tient compte de l'abondance des différents miARN détectés en donnant plus d'importance au miARN plus abondants (Qureshi and Sacan 2013). La moyenne pondérée a été utilisée pour la normalisation des échantillons de vitrés et de plasma. Nous avons ensuite comparé les résultats de cette normalisation dans le plasma avec une normalisation supplémentaire utilisant miR-16 (Kok, Halliani et al. 2015). Cette double normalisation de nos échantillons nous a permis d'obtenir des résultats solides puisqu'ils étaient sensiblement les mêmes avec ces deux types de normalisation. De plus, nos résultats sont reproductibles dans les deux types de fluides augmentant la spécificité des miARN que nous avons identifiés pour la forme humide de la DMLA.

L'identification de miR-146a, miR-106b et miR-152 dans notre étude nous a permis d'avoir une signature d'expression associée au stade avancé de la DMLA avec CNV. Lors d'une étude future, il serait important de valider si cette signature est spécifique seulement au stade avancé de la DMLA avec CNV ou si elle pourrait nous permettre de faire un diagnostic à un

stade plus précoce. En effet, en mesurant l'expression de miR-146a, miR-106b et miR-152 à différents stades de la maladie, nous pourrions avoir plus l'information sur le moment de la progression de la maladie où leur expression change. De plus, une comparaison avec la forme sèche de la DMLA nous apporterait encore plus d'indication sur la nature de la spécificité de cette signature. De plus, il faut noter que ces miARN sont aussi associés à d'autres maladies. L'augmentation du niveau d'expression de miR-146a est aussi associée à l'Alzheimer par exemple alors que la diminution de miR-106b à certains cancers. La spécificité des biomarqueurs est un élément important pour assurer la précision de la détection de la maladie avant de poser un diagnostic. Un ratio de l'expression des miARN permet d'augmenter la sensibilité et la spécificité avec l'aide de l'utilisation de courbes ROC (de l'anglais receiver operating curve) (De Guire, Robitaille et al. 2013). Le calcul des courbes ROC (de l'anglais : receiver operative characteristic) permet d'illustrer en graphique les résultats positifs en fonction des faux positifs. L'aire sous la courbe (AUC) représente alors la probabilité que le ratio obtenu chez un patient soit atteint de DMLA où la valeur 1 correspond à 100% de chance. Nous avons alors fait un ratio entre l'expression détectée pour miR146a sur l'expression de miR-106b. Suite à la production de la courbe ROC avec les ratios de miR-146a/miR106b, nous avons obtenus une valeur AUC de 0,977 pour les échantillons de vitré et de 0,914 pour le plasma. Ce ratio miR-146a/miR-106b était optimal puisque les ratios miR146/miR-152 et miR-106b/ miR152 n'ont pas démontré une corrélation significative et spécifique à la forme humide de la DMLA. Le choix du ratio de miR-146a/miR106b était optimal et selon nos résultats, semble avoir un grand potentiel pour développement de biomarqueurs et pour des études futures incluant une plus grande cohorte de patients (Kok, de Ronde et al. 2018).

Il est maintenant bien établi qu'une modification de l'expression de miARN peut conduire vers le développement de pathologies. La mesure de leur changement d'expression peut servir pour le diagnostic de maladies. Mentionnons également, que, des mutations dans le site de liaisons des miARN, peuvent, soit augmenter ou diminuer l'affinité de la liaison de ce dernier avec son gène cible. Notamment, le polymorphisme mononucléique (SNP) peut affecter la force de liaison entre les miARN et l'ARNm. Certes, les facteurs de risque génétiques sont substantiels au développement de la DMLA et plusieurs SNP y ont été associés (Klaver, Wolfs et al. 1998, Fritsche, Chen et al. 2013, Fritsche, Igl et al. 2016). De ce fait, nous avons effectué

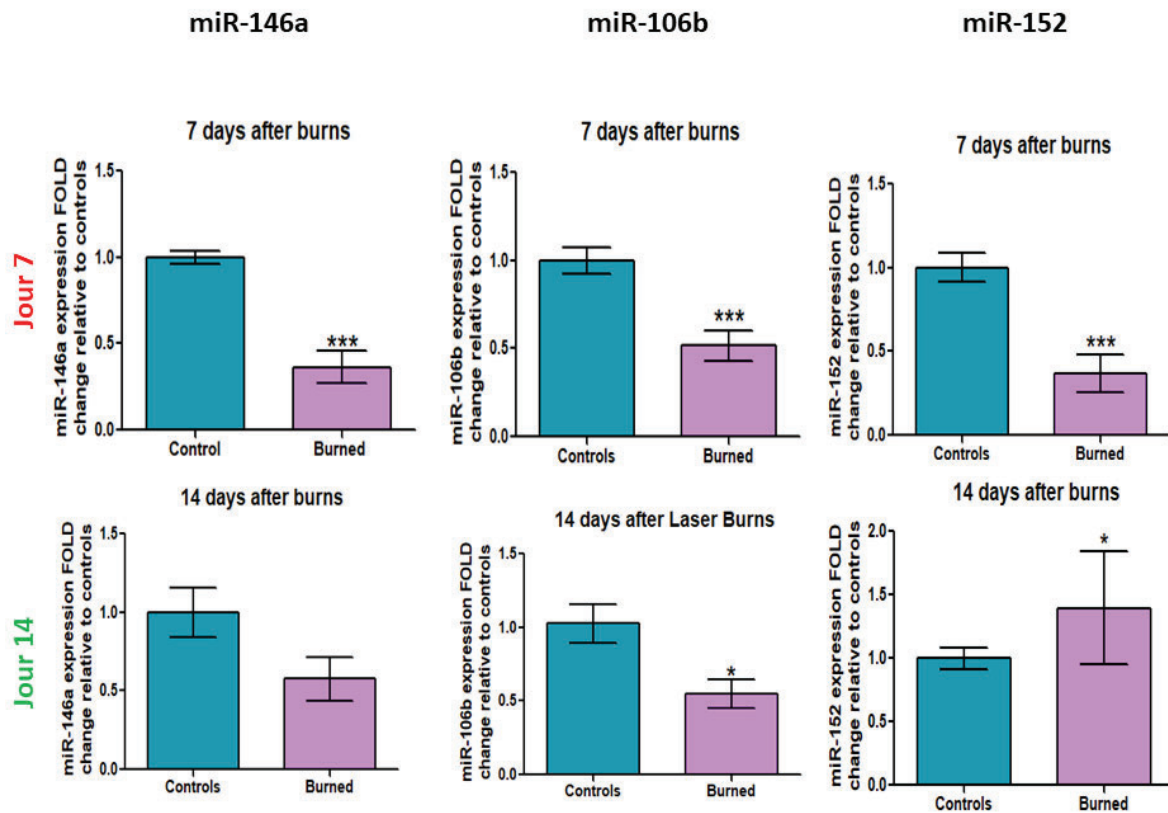
une étude à large spectre dans une cohorte du consortium génétique de la DMLA (AGC) incluant 77 000 individus pour des SNP associés à la forme humide. Notre recherche s'est concentrée sur la présence de SNP dans les sites de liaisons des miARN identifiés soit miR-146a, miR-106b et miR-152. Nous avons identifié un SNP (rs1063320) présent dans le 3' UTR du gène HLA-G d'un site de liaison pour miR-152. Néanmoins, parmi les 3 millions de sondes incluses dans l'AGC, seulement 5% des gènes (avec des SNP) contenaient des sites de liaison pour miR-146a, miR-106b et miR-152. Dans le but d'approfondir notre étude, nous avons ensuite recherché une relation entre les gènes associés avec la DMLA et les miARN que nous avons identifiés. Pour ce faire, nous avons utilisé la base de données des voies de signalisation Ingenuity Pathway Analysis (IPA). De cette base de données, nous avons identifié 57 gènes cibles de miR-146a, dont 6 qui contiennent des SNP associés à la forme humide de la DMLA. De même que 19 gènes contenant des sites de liaison pour miR-106b dont un avec des SNPs liés à la DMLA avec NV. Enfin, 10 gènes cibles pour miR-152 ont été identifiés avec IPA, mais aucun nouveau SNP, mis à part celui dans le gène HLA-G, n'a été identifié. D'autres études ont démontré que la présence de SNP dans des gènes du complément et de l'inflammation était associée à la DMLA (Klaver, Wolfs et al. 1998, Fritsche, Chen et al. 2013, Fritsche, Igl et al. 2016). L'identification de SNP peut également servir au développement de biomarqueurs pour le pronostic, la prévention et de nouveaux types de traitements de la DMLA. D'ailleurs, l'utilisation de SNP comme outils de diagnostic est aussi en étude pour le cancer (Salzman and Weidhaas 2013). D'autre part, la présence de SNP localisés dans les sites de liaisons ou dans les gènes cibles de miR-146a, miR-106b et miR-152 pourrait influencer leur valeur en tant que biomarqueurs. En effet, dans l'étude de San Giovanni et ses collaborateurs une approche approfondie est utilisée pour déterminer que les SNP peuvent affecter les interactions entre miARN et ARNm. Cette recherche combine des études de biomarqueurs pour la DMLA utilisant les miARN, les gènes cibles de ces miARN et les SNP associés à la maladie. Il en est sorti que les SNP identifiés se retrouvaient principalement dans les gènes de régulation de l'activation du complément (RCA) et dans le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Un fait intéressant est qu'ils ont démontré que la présence de SNP dans un site de liaison de miARN peut diminuer et même augmenter leur force de liaison avec l'ARNm cible (SanGiovanni, SanGiovanni et al. 2017). En somme, la présence de SNP peut être un très bon outil de biomarqueur et influencer la liaison entre les miARN et l'ARNm.



Dans cette première section, notre étude s'est concentrée sur l'identification de miARN comme biomarqueurs potentiels de la forme humide de la DMLA. Nous avons observé une augmentation spécifique de miR-146a et une diminution de miR-106b et miR-152 dans le vitré de patients qui corrélaient avec leur plasma. De plus, le ratio de miR-146a/miR-106b a permis d'associer de façon plus spécifique et plus sensible cette signature de miARN à la DMLA. Pour compléter notre étude, nous avons fait la recherche SNP qui seraient présents dans des sites de liaison de ces miARN. Nous avons identifié un SNP dans un site de liaison de miR-152 dans le gène HLA-G. Les avancements de cette étude pourront contribuer aux futures recherches pour le développement de biomarqueurs spécifiques à la DMLA avec NV. De plus, l'identification de ces miARN en lien avec la DMLA peuvent aussi participer à des recherches futures sur le développement sur de nouveaux traitements qui sera le sujet de la prochaine section.

## **2. Phase 2 : Étude du potentiel thérapeutique des miARNs identifiés à la phase 1**

Pour procéder à l'étude du potentiel thérapeutique de miR-146a, miR-106b et miR-152, nous avons opté pour l'utilisation d'un modèle classique murin de formation de CVN caractéristique de la forme humide de la DMLA. Ce modèle consiste à faire une brûlure à l'aide d'un laser qui percera la membrane de Bruch et provoque la formation de NV de la choroïde vers la rétine. Le pic de néovascularisation se produit 7 jours après les brûlures. Nous avons alors collecté les choroïdes de souris ayant subi des brûlures après 7 jours et 14 jours. Nous avons mesuré les niveaux d'expression de miR-146a, miR106b et miR152 et comparé avec l'expression de ces miARN dans les choroïdes de souris du groupe contrôle (de même genre et même âge) (**Figure 2**).



**Figure 2.** Détection de l'expression de miR-146a, de miR-106b et de miR-152 dans le modèle murin de CNV induite par brûlures avec un laser (à jour 7 et jour 14).

Suite aux résultats obtenus, nous pouvons observer que miR146a n'est pas augmenté dans le modèle animal comme chez l'humain. On note même une diminution significative. On peut expliquer ce résultat au fait que miR-146a est un miARN associé au vieillissement et à la sénescence (Bhaumik, Scott et al. 2009) et notre modèle murin n'est pas un modèle de vieillissement. MiR-146a a aussi un rôle important de régulation négative de l'inflammation (Figure 1). On peut donc, d'une certaine façon, s'attendre de voir une diminution de son expression lorsque les mécanismes biologiques de l'inflammation sont très actifs comme c'est le cas dans ce modèle de CNV induite par brûlures. Effectivement, la cicatrisation des brûlures fait appel à l'inflammation pour se produire. De plus, miR-146a n'est pas le candidat idéal pour

travailler avec ce modèle de CNV car, comme mentionné précédemment, il est aussi augmenté dans la forme sèche (Berthacee). L'implication de miR-146a dans le développement de la DMLA est fortement appuyé dans la littérature mais ne représentait pas le meilleur potentiel au point de vue thérapeutique pour le modèle utilisé.

D'autre part, l'expression de miR-152 était inconsistante dans le modèle murin. Nous observons une diminution significative de miR-152 après 7 jours, au pic de néo-vascularisation. En lien avec les résultats obtenus chez l'humain, la diminution de miR-152 dans un contexte de formation de NV est logique puisque ce miARN est associé à des mécanismes de prolifération cellulaires et cible des facteurs de croissance. Par contre, son expression tend à augmenter de façon significative 14 jours après les brûlures. Dans ce modèle les souris ne souffrent pas réellement de DMLA, mais d'un mécanisme de cicatrisation. Une diminution de la néo-vascularisation est normalement observée après 14 jours. Ce qui pourrait expliquer la différence d'expression entre les deux temps pour miR-152. Cependant, cette variabilité rend plus ardue l'étude de son potentiel thérapeutique. Nous avons donc poursuivi notre étude avec miR-106b. L'expression de ce dernier est constante dans le modèle, et ce dès 3 jours après les brûlures (figure, Chapitre 3). Enfin, son expression corrèle avec les observations que nous avons obtenues chez l'humain (Chapitre 2). Suite à ces observations, nous avons voulu répondre à deux questions : A) **Quel mécanisme cellulaire peut affecter la production de miR-106b et comment son expression peut être réprimée?** B) **Quel effet a l'expression de miR-106b sur l'angiogenèse et quel est son potentiel thérapeutique pour la forme humide de la DMLA?**

#### **A) Quel mécanisme cellulaire affecte l'expression de miR-106b?**

La diminution de l'expression d'un miARN peut être causée par deux phénomènes soit la dégradation de ce dernier ou soit en diminuant sa production. Lors de notre étude, nous avons plutôt observé un contrôle de son expression au niveau transcriptionnel. miR-106b fait parti d'un polycistron appelé miR-106b~25. Celui-ci est localisé dans 13<sup>e</sup> intron du gène *MCM7* (Minichromosome Maintenance Complex Component 7), le polycistron miR106b~25 est donc généralement transcrit avec le même promoteur que son gène hôte (Ventura, Young et al. 2008). Il a, par contre, été observé dans certaines études sur le cancer du sein et chez les cellules

megakariocytaire, une expression différentielle de MCM7 et du polycistron miR-106b~25. La transcription de ce dernier se fait alors par la signalisation du TGF- $\beta$  et cJun. Ces études démontrent bien la complexité de la régulation de ce polycistron.

MCM7 est une protéine qui participe à l'initiation de la réplication de l'ADN à l'aide de sa fonction d'hélicase (Maiorano, Lutzmann et al. 2006). L'augmentation de son expression est associée à différents cancers tels le cancer du côlon, le cancer gastrique (adénocarcinome) et le neuroblastome (Kang, Tong et al. 2014). Son expression est augmentée par la régulation du facteur de transcription N-MYC dans les lignées cellulaires de neuroblastomes (Shohet, Hicks et al. 2002) mais peut aussi être induite par C-MYC, E2F et BRD4 (Bromodomain-containing protein 4) (Petrocca, Vecchione et al. 2008, Mertz, Conery et al. 2011). En ce qui a trait à sa répression, celle-ci a été associée à l'expression des facteurs de transcription Nrf2 (Nuclear factor-like 2) et ATF4 (Gupta, Read et al. 2012). Ce dernier est un effecteur de la voie de signalisation de PERK impliqué dans la réponse au stress du réticulum endoplasmique. Cette voie participe aussi à l'angiogenèse pathologique et au développement de la DMLA (Sauer, Patel et al. 2008, Libby and Gould 2010). L'activation de la voie PERK affecte donc négativement la transcription de l'ARNm de MCM7 et du polycistron miR-106b~25 (Gupta, Read et al. 2012). Nous avons donc exploré la possibilité que la diminution de l'expression de miR-106b soit reliée à l'activation de cette voie dans un contexte de DMLA. D'abord, nous avons quantifié la présence de phosphorylation de la protéine eIF2a, protéine effectrice en aval de PERK. Nous avons observé une augmentation significative de la phosphorylation d'eIF2a 7 jours après les brûlures. Ceci aurait pour effet d'augmenter significativement l'expression du facteur de transcription ATF4 et conséquemment, de diminuer la transcription de l'ARNm de *mcm7* et du polycistron miR-106b~25 dans notre modèle murin de CNV par laser (Figure 2 du Chapitre 3). Les résultats que nous avons obtenus suggèrent une régulation négative de la transcription de miR-106b par l'activation de la voie PERK dans un contexte de formation de CNV.

La réponse au stress du RE est connue pour être impliquée dans la DMLA autant dans la forme sèche que dans la forme humide (Sauer, Patel et al. 2008, Libby and Gould 2010). La présence de lipides oxydés dans les agrégats retrouvés dans la forme sèche mène vers un milieu

oxydant une production de protéines altérées et favorise la perte ÉP et des photorécepteurs (Handa, Cano et al. 2017). De plus, le stress oxydatif, connu pour favoriser l'activation de la voie du stress du RE, est présent de façon constante dans la rétine. En effet, la rétine est un milieu très oxydant avec son exposition constante à la lumière, son haut niveau de métabolisme et de consommation d'oxygène. Dans la forme humide, l'activation du stress de RE favoriserait la formation de NV par une augmentation de la production du VEGFA de façon importante puisque les trois axes de la réponse au stress du RE (PERK, IRE1 $\alpha$  et ATF6) possèdent tous la capacité induire la production de VEGF. En effet, il est connu que le facteur de transcription ATF4, de la voie PERK, possède un site de liaison sur le promoteur du VEGFA (Roybal, Hunsaker et al. 2005). De même que XBP1, de la voie IRE1 $\alpha$ , et qu'ATF6 peuvent aussi se lier sur le promoteur du VEGFA (Binet and Sapieha 2015). Plusieurs études ont démontré l'implication de la voie de RE dans la DMLA. Suggérant ainsi un potentiel important pour le développement de traitements contre la DMLA en ciblant les chaperones impliquées dans le stress du RE ou en utilisant des composés chimiques diminuant directement le stress du RE (Sauer, Patel et al. 2008). Il est aussi intéressant de noter que la voie de la réponse au stress du RE, ainsi que la diminution de l'expression de miR-106b sont associées à d'autres maladies neurologiques dégénératives comme l'alzheimer (Hebert, Horre et al. 2009, Salminen, Kauppinen et al. 2009). Mis ensemble, les résultats obtenus soulignent l'importance de la voie PERK dans la régulation de miR-106b.

### **B) Quel effet a l'expression de miR-106b sur l'angiogenèse et quel est son potentiel thérapeutique pour la forme humide de la DMLA?**

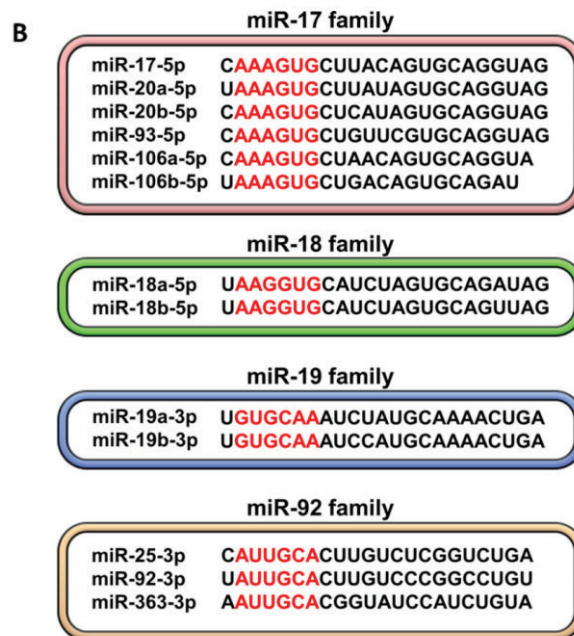
De prime abord, nous nous sommes intéressés à l'expression de protéines associées à la formation de NV dans notre modèle murin. Nous avons noté une augmentation significative de VEGFA et de HIF1 $\alpha$  seulement au niveau protéique. En effet, aucune variation significative des ARNm de ces protéines n'a été pas observée suggérant que l'augmentation de l'expression de ces protéines est due par une perte de contrôle de leur traduction qui pourrait être régulée par l'action de miARN. On peut expliquer ce résultat de la façon suivante : Les ARNm de VEGFA

et HIF1 $\alpha$  sont des cibles de miR-106b et la perte d'expression de ce dernier favorise leur traduction sans affecter leur niveau de transcription. Pour faire suite à ces résultats, nous avons voulu approfondir le rôle de miR-106b dans l'angiogenèse par des tests *in vitro* sur des cellules endothéliales de la rétine, des tests *ex vivo* sur des explants de choroïdes et *in vivo* à l'aide de deux modèles murins de NV. L'ensemble de ces expériences proposent une étude complète sur l'implication des mécanismes de l'angiogenèse pathologique associés à la formation de CNV.

Les cellules endothéliales sont les maîtres du jeu lorsqu'il s'agit de déclencher la formation de nouveaux vaisseaux. Les mécanismes de prolifération et de migration des CE sont impliqués dans les étapes de l'initiation et de l'élongation dans l'angiogenèse (Michiels 2003). La surexpression de miR-106b dans les CE a démontré son action répressive sur la migration cellulaire dans deux essais différents (Figure 3 du Chapitre 3). Cette suppression de la migration fut comparable à l'action de l'inhibition de l'expression du VEGFA avec la présence d'un petit ARN en forme tige-boucle (shRNA). Nous n'avons pas observé un effet de miR-106b sur la prolifération cellulaire (données non montrées). Puisque l'effet répressif de miR-106b semble se produire au niveau de la migration cellulaire, un mécanisme impliqué dans la formation des tubules, nous avons utilisé des explants de tissus de choroïdes placés dans un matrigel permettant la formation de tubules. Les explants exposés à une plus forte expression de miR-106b démontraient une progression plus lente et une formation des tubules diminuées. Finalement, nous avons utilisé deux modèles murins de NV pathologiques pour vérifier l'effet anti-angiogénique de miR-106b. D'abord, le modèle d'induction de CNV par laser utilisé dans cette étude et ensuite, le modèle d'induction de rétinopathie proliférative par hyper-oxygénation (OIR). Dans les deux modèles, la surexpression de miR-106b permet la diminution de la formation de NV de manière importante et comparable au shVEGFA. Ensemble, ces résultats soulignent bien le rôle anti-angiogénique de miR-106b et démontrent son potentiel thérapeutique pour diminuer la présence de CNV dans la DMLA

Puisque miR-106b et les autres membres du polycistron (miR-25 et miR-93) sont tous diminués dans notre modèle animal. Il serait intéressant de voir si la surexpression de tous les membres du polycistron dans ces modèles aurait une répression plus importante sur la formation de NV. En effet, il est fréquent de retrouver des noyaux identiques chez des miARN d'un même

polycistron et les miARN ayant la même séquence de noyau sont classés par famille. Dans ce cas-ci, miR-106b et miR-93 font partie de la famille miR-17. Celle-ci inclue miR-17, miR-20a, miR-20b, miR-93, miR-106a et miR-106b, qui tous partagent la même séquence pour leur noyau et qui peuvent alors lier les mêmes ARNm cibles (Mendell 2008). Plusieurs études ont démontré l'action de miR-93 dans l'angiogenèse. Même que de ce polycistron, il est le mieux documenté sur son action. Il a été démontré que miR-93, tout comme miR-106b, cible le VEGFA et IL-8. MiR-93 est exprimé dans les cellules endothéliales, il est impliqué dans leur prolifération et le contrôle de leur glycolyse (Kuosmanen, Kansanen et al. 2018). La combinaison de la surexpression des membres du pdu polycistron ou encore de la même famille de miARN pourrait être considérée dans de futures études sur le développement de traitements ciblant l'angiogenèse et dans les cas de DMLA avec CNV.



**Figure 3.** Classement par famille des polycistrons de miR17~92, miR-106a~miR-363 et miR-106b~25 en fonction des séquences des noyaux (Melhich, Biomedicine & Pharmacotherapy 107 (2018))

Un des avantages des miARN pour le développement de thérapies est leur capacité à réguler la traduction de plusieurs protéines simultanément. En effet, comme nous l'avons

mentionné précédemment, la surexpression de miR-106b permet la diminution de plusieurs protéines participant au développement de la DMLA tels le VEGFA, HIF1 $\alpha$ , IL-8b et STAT3; des protéines impliquées dans l'angiogenèse. Cette particularité des miARN d'avoir la capacité de diminuer plusieurs protéines associées à un même processus pathologiques, telle la formation de CNV, permet d'avoir un effet biologique plus important et une diminution de la toxicité. Ce qui apporte au miARN un potentiel thérapeutique notable. L'utilisation d'anti-VEGF, même si leur efficacité a été démontrée en clinique, ne modulent que le VEGF. Les autres joueurs de la formation de la CNV ne sont pas affectés ce qui pourrait expliquer qu'une partie des patients est résistante à ces traitements. De plus, la nécessité de faire une série d'injections pour optimiser le traitement soulève le risque d'avoir des conséquences néfastes au point de l'homéostasie vasculaire et neuronale de l'œil. Pour cette raison, l'utilisation de miARN pour inhiber l'action pathologique du VEGF est très intéressante puisque les miARN agissent en répresseur modéré de la traduction protéique. L'utilisation de miARN permet donc de diminuer l'expression d'une protéine produite de manière excessive tout en gardant un certain niveau de son expression. L'utilisation des miARN au point de vue thérapeutique représente beaucoup de potentiel pour la régulation fine de l'expression de protéines impliquées dans le développement de maladies. Les défis de taille qui attendent les membres de la communauté scientifique se situent au niveau de la livraison thérapeutique et des effets secondaires probables des miARN.

Les résultats obtenus dans cette étude soulignent le rôle de miR-106b autant dans la détection que le développement de nouvelles cibles thérapeutiques de la DMLA. Du côté de la détection, d'autres études sont nécessaires pour procéder au développement de biomarqueurs. En effet, en tenant compte du haut taux de variabilité entre les études de biomarqueurs, il sera important dans le futur de limiter toutes les variations expérimentales et analytiques. Le développement de procédures standardisées pourrait diminuer les différences de résultats en les études. Du côté thérapeutique, il faut cependant tenir compte des limites expérimentales des modèles murins utilisés. Par exemple, même si le modèle de brûlures par laser mime très bien les mécanismes angiogéniques et inflammatoires de la forme humaine de la DMLA, il comporte certaines limites. Comme le fait que la souris ne possède pas de *macula* ce qui pourrait résulter avec une divergence dans les réponses observées chez les humains lors de l'essai de nouveaux traitements. Aussi la DMLA est une pathologie du vieillissement alors que les souris



utilisé dans ce modèle ont un âge plus près d'un jeune adulte. Plusieurs mécanismes biologiques reliés au vieillissement et connus pour être responsables du développement de la DMLA ne peuvent être présents dans ce modèle. Malgré tout, ce modèle est très utile pour tester le potentiel thérapeutique d'un miARN ciblant la formation de CVN.

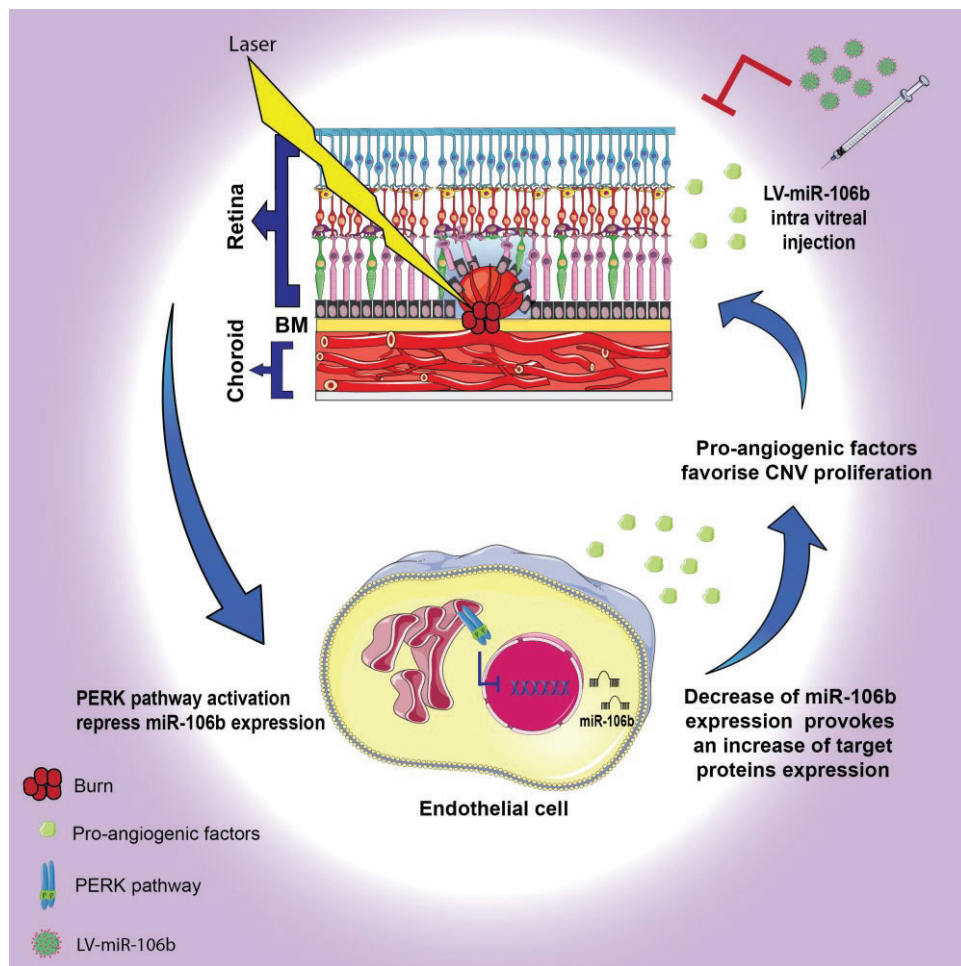
Au cours des dernières années, plusieurs groupes de recherche ont travaillé à optimiser l'utilisation des miARN d'un point de vue thérapeutique. Dans notre étude, nous avons utilisé les lentivirus pour assurer le transport de miR-106b et du shVEGF. L'utilisation de lentivirus permet d'infecter avec un virus non répliquatif autant des cellules répliquatives quiescentes et non répliquatives (Manjunath, Wu et al. 2009). De plus, la capsule de notre virus exprime des protéines de surfaces des glycoprotéines (*vesicular stomatitis virus* glycoprotein : **VSV-G**) qui permettent au virus d'infecter différents types cellulaires et de passer par la voie d'endocytose (Aiken 1997). Puisque nous procédions par des injections intra vitréales dans l'œil des souris la livraison était assurée de façon locale et augmentait la biodisponibilité de miR-106b dans notre étude. Lors du développement de traitements en étude clinique. Il est important de minimiser le risque d'avoir des effets secondaires et surtout d'immunogénicité des molécules injectées. Les lentivirus même s'ils ont démontré leur biosécurité peuvent malgré avoir un effet sur le système immunitaire (Thomas, Ehrhardt et al. 2003). D'autres méthodes non virales d'encapsulation des miARN ont été étudiées pour diminuer ces risques comme l'utilisation de miARN transportés par des exosomes ou même de nanoparticules de lipides (Belfiore, Saunders et al. 2018). Les nanoparticules de lipides sont de plus en plus convoitées puisqu'elles sont avantageuses avec leurs propriétés biocompatibles, biodégradables, facile à produire et à faible coût et aussi de faible toxicité et immunogénicité (Campani, Salzano et al. 2016). Il est même possible de pouvoir modifier les molécules exprimées en surface de ces vésicules pour augmenter leur spécificité cellulaire lors de traitements et ainsi diminuer les risques des effets secondaires indésirables (Scheideler, Vidakovic et al. 2019). En ce moment, aucun miARN n'a encore passé l'approbation du **FDA** (de l'anglais: USA Food and Drug Administration) pour son administration clinique (Fu ExRNA 2019). Par contre, tout récemment le premier ARN interférant (siARN) a passé les normes du FDA en 2018. Nous sommes très prêts de voir les premières thérapies utilisant les miARN arriver en clinique. Le travail d'un grand nombre de chercheurs a permis beaucoup d'avancement dans le domaine de la thérapie génique.

## Conclusion

Dans le cadre de cette étude, nous avons eu une approche linéaire. Nous avons débuté par l'identification chez l'humain d'une signature d'expression de miARN qui étaient présents dans le vitré et le plasma de patients atteints de la forme humide de la DMLA. Cette signature spécifique représente un fort potentiel au niveau diagnostique. Ensuite, nous avons démontré le potentiel thérapeutique et anti-angiogénique de miR-106b dans des modèles animaux de NV pathologique. La première phase (biomarqueurs) de l'étude a permis d'associer miR-146a, miR-152 et miR-106b avec la DMLA. Nécessairement, pour se rendre vers un test clinique de biomarqueurs, il faudra poursuivre cette étude de façon plus exhaustive. Par exemple, la validation de la signature et de l'utilisation du ratio miR146a/miR-106b dans une plus grande cohorte est de mise. Il serait aussi intéressant de quantifier l'expression de miR-146a, miR-106b et miR-152 dans le sang de patients souffrant de la DMLA à différents stades de la maladie, incluant la forme sèche et des patients traités avec des anti-VEGF. Les résultats de cette étude pourraient raffiner la spécificité de ces miARNs pour certains stades la DMLA et permettre de développer un test de détection précoce de cette pathologie.

La seconde phase (thérapeutique) du projet a permis de souligner le potentiel de miR-106b comme un futur traitement anti-NV. Notre étude suggère un rôle anti-angiogénique pour miR-106b. Nous avons pu établir un modèle (**Figure 3**) résumant le mécanisme que nous avons établi. Lors de la brûlure par laser (ou du développement de la DMLA), des mécanismes de stress cellulaires sont enclenchés et activent la voie de signalisation PERK du stress du RE. Cette dernière, affecte négativement la transcription de miR-106b et favorise l'augmentation de l'expression de facteurs pro-angiogéniques. Le rétablissement de l'expression de miR-106b à l'aide de lentivirus permet d'observer une diminution de la formation de CNV chez la souris (**Figure 3**). Il serait intéressant, lors de la réalisation de futures études de tenir compte de l'effet de la réintroduction du polycistron complet (miR-106b~25) sur la formation de NV pathologique. Nous avons noté une diminution de tous les membres du polycistron dans notre modèle murin. De plus, il serait aussi important d'évaluer le rôle des autres membres de la famille miR-17, en particulier ceux qui possèdent la même séquence de noyau que miR-106b et qui pourraient avoir des actions biologiques redondantes. Pour terminer, dans notre étude, le

transport du miR s'est fait à l'aide d'un système d'encapsulation de type lentiviral qui a permis s'assurer l'infection d'un grand nombre de types cellulaires différents de l'œil des souris utilisées dans nos modèles animaux. Le développement d'un traitement impliquant l'encapsulation d'un miARN fonctionnel au niveau clinique pourrait demander par contre une spécificité cellulaire plus précise et une plus faible immunogénicité pour éviter les effets secondaires indésirables lors du traitement de la DMLA. Dans l'avenir, les recherches portant sur les méthodes efficaces, sécuritaires et stables de libérations des miARN pourront changer le monde thérapeutique pour un grand nombre de pathologies.



**Figure 4.** Schématisation conceptuelle du rôle de miR-106b dans la formation de CNV

## Bibliographie

- Abramoff, M. D., M. K. Garvin and M. Sonka (2010). "Retinal imaging and image analysis." IEEE Rev Biomed Eng **3**: 169-208.
- Abramoff, M. D., J. M. Reinhardt, S. R. Russell, J. C. Folk, V. B. Mahajan, M. Niemeijer and G. Quellec (2010). "Automated early detection of diabetic retinopathy." Ophthalmology **117**(6): 1147-1154.
- Acevedo, L. M., S. Barillas, S. M. Weis, J. R. Gothert and D. A. Cheresh (2008). "Semaphorin 3A suppresses VEGF-mediated angiogenesis yet acts as a vascular permeability factor." Blood **111**(5): 2674-2680.
- Ach, R. A., H. Wang and B. Curry (2008). "Measuring microRNAs: comparisons of microarray and quantitative PCR measurements, and of different total RNA prep methods." BMC Biotechnol **8**: 69.
- Aiken, C. (1997). "Pseudotyping human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by the glycoprotein of vesicular stomatitis virus targets HIV-1 entry to an endocytic pathway and suppresses both the requirement for Nef and the sensitivity to cyclosporin A." J Virol **71**(8): 5871-5877.
- Aird, W. C. (2006). "Mechanisms of endothelial cell heterogeneity in health and disease." Circ Res **98**(2): 159-162.
- Ajani, U. A., W. C. Willett and J. M. Seddon (1994). "Reproducibility of a food frequency questionnaire for use in ocular research. Eye Disease Case-Control Study Group." Invest Ophthalmol Vis Sci **35**(6): 2725-2733.
- Akira, S. and K. Takeda (2004). "Toll-like receptor signalling." Nat Rev Immunol **4**(7): 499-511.
- Al Gwairi, O., L. Thach, W. Zheng, N. Osman and P. J. Little (2016). "Cellular and Molecular Pathology of Age-Related Macular Degeneration: Potential Role for Proteoglycans." J Ophthalmol **2016**: 2913612.
- Ambati, J., J. P. Atkinson and B. D. Gelfand (2013). "Immunology of age-related macular degeneration." Nat Rev Immunol **13**(6): 438-451.
- Ambati, J. and B. J. Fowler (2012). "Mechanisms of age-related macular degeneration." Neuron **75**(1): 26-39.
- Amoaku, W. M., U. Chakravarthy, R. Gale, M. Gavin, F. Ghanchi, J. Gibson, S. Harding, R. L. Johnston, S. P. Kelly, A. Lotery, S. Mahmood, G. Menon, S. Sivaprasad, J. Talks, A. Tufail and Y. Yang (2015). "Defining response to anti-VEGF therapies in neovascular AMD." Eye (Lond) **29**(10): 1397-1398.
- Andriessen, E. M., A. M. Wilson, G. Mawambo, A. Dejda, K. Miloudi, F. Sennlaub and P. Sapienza (2016). "Gut microbiota influences pathological angiogenesis in obesity-driven choroidal neovascularization." EMBO Mol Med **8**(12): 1366-1379.
- Arjamaa, O., M. Nikinmaa, A. Salminen and K. Kaarniranta (2009). "Regulatory role of HIF-1 $\alpha$  in the pathogenesis of age-related macular degeneration (AMD)." Ageing Res Rev **8**(4): 349-358.
- Arroyo, J. D., J. R. Chevillet, E. M. Kroh, I. K. Ruf, C. C. Pritchard, D. F. Gibson, P. S. Mitchell, C. F. Bennett, E. L. Pogosova-Agadjanyan, D. L. Stirewalt, J. F. Tait and M. Tewari (2011). "Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(12): 5003-5008.

Artavanis-Tsakonas, S., M. D. Rand and R. J. Lake (1999). "Notch signaling: cell fate control and signal integration in development." Science **284**(5415): 770-776.

Avery, R. L. (2006). "Regression of retinal and iris neovascularization after intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment." Retina **26**(3): 352-354.

Avery, R. L., D. J. Pieramici, M. D. Rabena, A. A. Castellarin, M. A. Nasir and M. J. Giust (2006). "Intravitreal bevacizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration." Ophthalmology **113**(3): 363-372 e365.

Baek, D., J. Villén, C. Shin, F. Camargo, S. Gygi and D. Bartel (2008). "The impact of microRNAs on protein output." Nature **455**(7209): 64-71.

Baek, D., J. Villen, C. Shin, F. D. Camargo, S. P. Gygi and D. P. Bartel (2008). "The impact of microRNAs on protein output." Nature **455**(7209): 64-71.

Ballmer-Hofer, K., A. E. Andersson, L. E. Ratcliffe and P. Berger (2011). "Neuropilin-1 promotes VEGFR-2 trafficking through Rab11 vesicles thereby specifying signal output." Blood **118**(3): 816-826.

Barleon, B., S. Hauser, C. Schollmann, K. Weindel, D. Marme, A. Yayon and H. A. Weich (1994). "Differential expression of the two VEGF receptors flt and KDR in placenta and vascular endothelial cells." J Cell Biochem **54**(1): 56-66.

Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." Cell **116**(2): 281-297.

Bartel, D. P. (2009). "MicroRNAs: target recognition and regulatory functions." Cell **136**(2): 215-233.

Beenken, A. and M. Mohammadi (2009). "The FGF family: biology, pathophysiology and therapy." Nat Rev Drug Discov **8**(3): 235-253.

Belfiore, L., D. N. Saunders, M. Ranson, K. J. Thurecht, G. Storm and K. L. Vine (2018). "Towards clinical translation of ligand-functionalized liposomes in targeted cancer therapy: Challenges and opportunities." J Control Release **277**: 1-13.

Ben-Ze'ev, A. and B. Geiger (1998). "Differential molecular interactions of beta-catenin and plakoglobin in adhesion, signaling and cancer." Curr Opin Cell Biol **10**(5): 629-639.

Benedito, R., C. Roca, I. Sorensen, S. Adams, A. Gossler, M. Fruttiger and R. H. Adams (2009). "The notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis." Cell **137**(6): 1124-1135.

Berber, P., F. Grassmann, C. Kiel and B. H. Weber (2017). "An Eye on Age-Related Macular Degeneration: The Role of MicroRNAs in Disease Pathology." Mol Diagn Ther **21**(1): 31-43.

Berber, P., F. Grassmann, C. Kiel and B. H. F. Weber (2017). "An Eye on Age-Related Macular Degeneration: The Role of MicroRNAs in Disease Pathology." Molecular Diagnosis & Therapy **21**(1): 31-43.

Berezikov, E., W. J. Chung, J. Willis, E. Cuppen and E. C. Lai (2007). "Mammalian mirtron genes." Mol Cell **28**(2): 328-336.

Bernstein, E., S. Y. Kim, M. A. Carmell, E. P. Murchison, H. Alcorn, M. Z. Li, A. A. Mills, S. J. Elledge, K. V. Anderson and G. J. Hannon (2003). "Dicer is essential for mouse development." Nat Genet **35**(3): 215-217.

Bertolotti, A., Y. Zhang, L. M. Hendershot, H. P. Harding and D. Ron (2000). "Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response." Nat Cell Biol **2**(6): 326-332.

Bhattacharjee, S., Y. Zhao, P. Dua, E. I. Rogaev and W. J. Lukiw (2016). "microRNA-34a-Mediated Down-Regulation of the Microglial-Enriched Triggering Receptor and Phagocytosis-Sensor TREM2 in Age-Related Macular Degeneration." *PLoS One* **11**(3): e0150211.

Bhaumik, D., G. K. Scott, S. Schokrpur, C. K. Patil, J. Campisi and C. C. Benz (2008). "Expression of microRNA-146 suppresses NF-kappaB activity with reduction of metastatic potential in breast cancer cells." *Oncogene* **27**(42): 5643-5647.

Bhaumik, D., G. K. Scott, S. Schokrpur, C. K. Patil, A. V. Orjalo, F. Rodier, G. J. Lithgow and J. Campisi (2009). "MicroRNAs miR-146a/b negatively modulate the senescence-associated inflammatory mediators IL-6 and IL-8." *Aging (Albany NY)* **1**(4): 402-411.

Bikbova, G., T. Oshitari, T. Baba, S. Yamamoto and K. Mori (2019). "Pathogenesis and Management of Macular Hole: Review of Current Advances." *J Ophthalmol* **2019**: 3467381.

Binet, F., G. Mawambo, N. Sitaras, N. Tetreault, E. Lapalme, S. Favret, A. Cerani, D. Leboeuf, S. Tremblay, F. Rezende, A. M. Juan, A. Stahl, J. S. Joyal, E. Milot, R. J. Kaufman, M. Guimond, T. E. Kennedy and P. Sapienza (2013). "Neuronal ER Stress Impedes Myeloid-Cell-Induced Vascular Regeneration through IRE1alpha Degradation of Netrin-1." *Cell Metab* **17**(3): 353-371.

Binet, F. and P. Sapienza (2015). "ER Stress and Angiogenesis." *Cell Metab* **22**(4): 560-575.

Bishop, P. (1996). "The biochemical structure of mammalian vitreous." *Eye (Lond)* **10** ( Pt 6): 664-670.

Bishop, P. N., D. F. Holmes, K. E. Kadler, D. McLeod and K. J. Bos (2004). "Age-related changes on the surface of vitreous collagen fibrils." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**(4): 1041-1046.

Blasiak, J., G. Petrovski, Z. Vereb, A. Facsko and K. Kaarniranta (2014). "Oxidative stress, hypoxia, and autophagy in the neovascular processes of age-related macular degeneration." *Biomed Res Int* **2014**: 768026.

Bok, D. (1993). "The retinal pigment epithelium: a versatile partner in vision." *J Cell Sci Suppl* **17**: 189-195.

Bonauer, A., G. Carmona, M. Iwasaki, M. Mione, M. Koyanagi, A. Fischer, J. Burchfield, H. Fox, C. Doebele, K. Ohtani, E. Chavakis, M. Potente, M. Tjwa, C. Urbich, A. Zeiher and S. Dimmeler (2009). "MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice." *Science* **324**(5935): 1710-1713.

Bonauer, A., G. Carmona, M. Iwasaki, M. Mione, M. Koyanagi, A. Fischer, J. Burchfield, H. Fox, C. Doebele, K. Ohtani, E. Chavakis, M. Potente, M. Tjwa, C. Urbich, A. M. Zeiher and S. Dimmeler (2009). "MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice." *Science* **324**(5935): 1710-1713.

Borchert, G. M., W. Lanier and B. L. Davidson (2006). "RNA polymerase III transcribes human microRNAs." *Nat Struct Mol Biol* **13**(12): 1097-1101.

Bouchie, A. (2013). "First microRNA mimic enters clinic." *Nat Biotechnol* **31**(7): 577.

Brennecke, J., A. Stark, R. B. Russell and S. M. Cohen (2005). "Principles of microRNA-target recognition." *PLoS Biol* **3**(3): e85.

Bressler, N. M., J. C. Silva, S. B. Bressler, S. L. Fine and W. R. Green (1994). "Clinicopathologic correlation of drusen and retinal pigment epithelial abnormalities in age-related macular degeneration." *Retina* **14**(2): 130-142.

Brookmeyer, R., E. Johnson, K. Ziegler-Graham and H. M. Arrighi (2007). "Forecasting the global burden of Alzheimer's disease." *Alzheimers Dement* **3**(3): 186-191.

Brown, D., P. Kaiser, M. Michels, G. Soubrane, J. Heier, R. Kim, J. Sy and S. Schneider (2006). "Ranibizumab versus verteporfin for neovascular age-related macular degeneration." The New England Journal of Medicine **355**(14): 1432-1444.

Brown, S. P. and R. H. Masland (2001). "Spatial scale and cellular substrate of contrast adaptation by retinal ganglion cells." Nat Neurosci **4**(1): 44-51.

Brunet-Vega, A., C. Pericay, M. E. Quilez, M. J. Ramirez-Lazaro, X. Calvet and S. Lario (2015). "Variability in microRNA recovery from plasma: Comparison of five commercial kits." Anal Biochem **488**: 28-35.

Byrne, A. M., D. J. Bouchier-Hayes and J. H. Harmey (2005). "Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF)." J Cell Mol Med **9**(4): 777-794.

Cai, X., C. H. Hagedorn and B. R. Cullen (2004). "Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs." RNA **10**(12): 1957-1966.

Calder, P. C. (2001). "omega 3 polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity." World Rev Nutr Diet **88**: 109-116.

Campani, V., G. Salzano, S. Lusa and G. De Rosa (2016). "Lipid Nanovectors to Deliver RNA Oligonucleotides in Cancer." Nanomaterials (Basel) **6**(7).

Cao, S. S. and R. J. Kaufman (2014). "Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in cell fate decision and human disease." Antioxid Redox Signal **21**(3): 396-413.

Carmeliet, P., F. De Smet, S. Loges and M. Mazzone (2009). "Branching morphogenesis and antiangiogenesis candidates: tip cells lead the way." Nat Rev Clin Oncol **6**(6): 315-326.

Carmeliet, P. and R. K. Jain (2011). "Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis." Nature **473**(7347): 298-307.

Carthew, R. W. and E. J. Sontheimer (2009). "Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs." Cell **136**(4): 642-655.

Cavallerano, A. A. (1996). "Ophthalmic fluorescein angiography." Optom Clin **5**(1): 1-23.

Cecarini, V., J. Gee, E. Fioretti, M. Amici, M. Angeletti, A. M. Eleuteri and J. N. Keller (2007). "Protein oxidation and cellular homeostasis: Emphasis on metabolism." Biochim Biophys Acta **1773**(2): 93-104.

Chakraborty, C., A. R. Sharma, G. Sharma, C. G. P. Doss and S. S. Lee (2017). "Therapeutic miRNA and siRNA: Moving from Bench to Clinic as Next Generation Medicine." Mol Ther Nucleic Acids **8**: 132-143.

Chaulk, S. G., H. A. Ehardt and R. P. Fahlman (2016). "Correlations of microRNA:microRNA expression patterns reveal insights into microRNA clusters and global microRNA expression patterns." Mol Biosyst **12**(1): 110-119.

Chen, S., X. Chen, Y. L. Xiu, K. X. Sun and Y. Zhao (2015). "Inhibition of Ovarian Epithelial Carcinoma Tumorigenesis and Progression by microRNA 106b Mediated through the RhoC Pathway." PLoS One **10**(5): e0125714.

Chen, X., Y. Ba, L. Ma, X. Cai, Y. Yin, K. Wang, J. Guo, Y. Zhang, J. Chen, X. Guo, Q. Li, X. Li, W. Wang, Y. Zhang, J. Wang, X. Jiang, Y. Xiang, C. Xu, P. Zheng, J. Zhang, R. Li, H. Zhang, X. Shang, T. Gong, G. Ning, J. Wang, K. Zen, J. Zhang and C. Y. Zhang (2008). "Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases." Cell Res **18**(10): 997-1006.

Chen, X., H. Liang, J. Zhang, K. Zen and C. Y. Zhang (2012). "Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication." Trends Cell Biol **22**(3): 125-132.

Chen, Y., Y. X. Song and Z. N. Wang (2013). "The microRNA-148/152 family: multi-faceted players." Mol Cancer **12**: 43.

Cheng, H., L. Zhang, D. E. Cogdell, H. Zheng, A. J. Schetter, M. Nykter, C. C. Harris, K. Chen, S. R. Hamilton and W. Zhang (2011). "Circulating plasma MiR-141 is a novel biomarker for metastatic colon cancer and predicts poor prognosis." PLoS One **6**(3): e17745.

Cheng, Z., R. Ma, W. Tan and L. Zhang (2014). "MiR-152 suppresses the proliferation and invasion of NSCLC cells by inhibiting FGF2." Exp Mol Med **46**: e112.

Chi, J. T., H. Y. Chang, G. Haraldsen, F. L. Jahnsen, O. G. Troyanskaya, D. S. Chang, Z. Wang, S. G. Rockson, M. van de Rijn, D. Botstein and P. O. Brown (2003). "Endothelial cell diversity revealed by global expression profiling." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(19): 10623-10628.

Chim, S. S., T. K. Shing, E. C. Hung, T. Y. Leung, T. K. Lau, R. W. Chiu and Y. M. Lo (2008). "Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma." Clin Chem **54**(3): 482-490.

Cho, E., J. M. Seddon, B. Rosner, W. C. Willett and S. E. Hankinson (2004). "Prospective study of intake of fruits, vegetables, vitamins, and carotenoids and risk of age-related maculopathy." Arch Ophthalmol **122**(6): 883-892.

Chuang, T. D., X. Luo, H. Panda and N. Chegini (2012). "miR-93/106b and their host gene, MCM7, are differentially expressed in leiomyomas and functionally target F3 and IL-8." Mol Endocrinol **26**(6): 1028-1042.

Chung, A. S. and N. Ferrara (2011). "Developmental and pathological angiogenesis." Annu Rev Cell Dev Biol **27**: 563-584.

Cines, D. B., E. S. Pollak, C. A. Buck, J. Loscalzo, G. A. Zimmerman, R. P. McEver, J. S. Pober, T. M. Wick, B. A. Konkle, B. S. Schwartz, E. S. Barnathan, K. R. McCrae, B. A. Hug, A. M. Schmidt and D. M. Stern (1998). "Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders." Blood **91**(10): 3527-3561.

Cleaver, O. and P. A. Krieg (1998). "VEGF mediates angioblast migration during development of the dorsal aorta in *Xenopus*." Development **125**(19): 3905-3914.

Cohen, T., D. Nahari, L. W. Cerem, G. Neufeld and B. Z. Levi (1996). "Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor." J Biol Chem **271**(2): 736-741.

Connolly, S. E., T. A. Hores, L. E. Smith and P. A. D'Amore (1988). "Characterization of vascular development in the mouse retina." Microvasc Res **36**(3): 275-290.

Cox, J. S., C. E. Shamu and P. Walter (1993). "Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase." Cell **73**(6): 1197-1206.

Cruickshanks, K. J., R. Klein and B. E. Klein (1993). "Sunlight and age-related macular degeneration. The Beaver Dam Eye Study." Arch Ophthalmol **111**(4): 514-518.

De Guire, V., R. Robitaille, N. Tetreault, R. Guerin, C. Menard, N. Bambace and P. Sapielha (2013). "Circulating miRNAs as sensitive and specific biomarkers for the diagnosis and monitoring of human diseases: promises and challenges." Clin Biochem **46**(10-11): 846-860.

de Oliveira Dias, J. R., E. B. Rodrigues, M. Maia, O. Magalhaes, Jr., F. M. Penha and M. E. Farah (2011). "Cytokines in neovascular age-related macular degeneration: fundamentals of targeted combination therapy." Br J Ophthalmol **95**(12): 1631-1637.

De Smet, F., I. Segura, K. De Bock, P. J. Hohensinner and P. Carmeliet (2009). "Mechanisms of vessel branching: filopodia on endothelial tip cells lead the way." Arterioscler Thromb Vasc Biol **29**(5): 639-649.

de Smet, M. D., A. M. Gad Elkareem and A. H. Zwinderman (2013). "The vitreous, the retinal interface in ocular health and disease." Ophthalmologica **230**(4): 165-178.



Dejana, E. (1996). "Endothelial adherens junctions: implications in the control of vascular permeability and angiogenesis." *J Clin Invest* **98**(9): 1949-1953.

Dejana, E. (2004). "Endothelial cell-cell junctions: happy together." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(4): 261-270.

Dejda, A., G. Mawambo, A. Cerani, K. Miloudi, Z. Shao, J. F. Daudelin, S. Boulet, M. Oubaha, F. Beaudoin, N. Akla, S. Henriques, C. Menard, A. Stahl, J. S. Delisle, F. A. Rezende, N. Labrecque and P. Sapielha (2014). "Neuropilin-1 mediates myeloid cell chemoattraction and influences retinal neuroimmune crosstalk." *J Clin Invest* **124**(11): 4807-4822.

Delcourt, C., I. Carriere, M. Delage, P. Barberger-Gateau, W. Schalch and P. S. Group (2006). "Plasma lutein and zeaxanthin and other carotenoids as modifiable risk factors for age-related maculopathy and cataract: the POLA Study." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**(6): 2329-2335.

Delcourt, C., J. L. Diaz, A. Ponton-Sanchez and L. Papoz (1998). "Smoking and age-related macular degeneration. The POLA Study. Pathologies Oculaires Liees a l'Age." *Arch Ophthalmol* **116**(8): 1031-1035.

Delori, F. C., D. G. Goger, B. R. Hammond, D. M. Snodderly and S. A. Burns (2001). "Macular pigment density measured by autofluorescence spectrometry: comparison with reflectometry and heterochromatic flicker photometry." *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis* **18**(6): 1212-1230.

Denli, A. M., B. B. Tops, R. H. Plasterk, R. F. Ketting and G. J. Hannon (2004). "Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex." *Nature* **432**(7014): 231-235.

Derrick, T., A. R. Last, S. E. Burr, C. H. Roberts, M. Nabicassa, E. Cassama, R. L. Bailey, D. C. Mabey, M. J. Burton and M. J. Holland (2016). "Inverse relationship between microRNA-155 and -184 expression with increasing conjunctival inflammation during ocular Chlamydia trachomatis infection." *BMC Infect Dis* **16**: 60.

Desjarlais, M., J. C. Rivera, I. Lahaie, G. Cagnone, M. Wirt, S. Omri and S. Chemtob (2019). "MicroRNA expression profile in retina and choroid in oxygen-induced retinopathy model." *PLoS One* **14**(6): e0218282.

Dews, M., A. Homayouni, D. Yu, D. Murphy, C. Sevigani, E. Wentzel, E. E. Furth, W. M. Lee, G. H. Enders, J. T. Mendell and A. Thomas-Tikhonenko (2006). "Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster." *Nat Genet* **38**(9): 1060-1065.

Doebele, C., A. Bonauer, A. Fischer, A. Scholz, Y. Reiss, C. Urbich, W.-K. Hofmann, A. Zeiher and S. Dimmeler (2010). "Members of the microRNA-17-92 cluster exhibit a cell-intrinsic antiangiogenic function in endothelial cells." *Blood* **115**(23): 4944-4950.

Doebele, C., A. Bonauer, A. Fischer, A. Scholz, Y. Reiss, C. Urbich, W. K. Hofmann, A. M. Zeiher and S. Dimmeler (2010). "Members of the microRNA-17-92 cluster exhibit a cell-intrinsic antiangiogenic function in endothelial cells." *Blood* **115**(23): 4944-4950.

Dong, A., B. Xie, J. Shen, T. Yoshida, K. Yokoi, S. F. Hackett and P. A. Campochiaro (2009). "Oxidative stress promotes ocular neovascularization." *J Cell Physiol* **219**(3): 544-552.

Dudek, S. M. and J. G. Garcia (2001). "Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability." *J Appl Physiol* (1985) **91**(4): 1487-1500.

Dumont, D. J., L. Jussila, J. Taipale, A. Lymboussaki, T. Mustonen, K. Pajusola, M. Breitman and K. Alitalo (1998). "Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3." *Science* **282**(5390): 946-949.

Ebert, M. S., J. R. Neilson and P. A. Sharp (2007). "MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells." *Nat Methods* **4**(9): 721-726.

ElSharawy, A., A. Keller, F. Flachsbart, A. Wendschlag, G. Jacobs, N. Kefer, T. Brefort, P. Leidinger, C. Backes, E. Meese, S. Schreiber, P. Rosenstiel, A. Franke and A. Nebel (2012). "Genome-wide miRNA signatures of human longevity." *Aging Cell* **11**(4): 607-616.

Emeis, J. J., R. Hoekzema and A. F. de Vos (1995). "Inhibiting interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha does not reduce induction of plasminogen activator inhibitor type-1 by endotoxin in rats in vivo." *Blood* **85**(1): 115-120.

Ertekin, S., O. Yildirim, E. Dinç, L. Ayaz, S. Fidancı and L. Tamer (2014). "Evaluation of circulating miRNAs in wet age-related macular degeneration." *Molecular vision* **20**: 1057-1066.

Ertekin, S., O. Yildirim, E. Dinc, L. Ayaz, S. B. Fidanci and L. Tamer (2014). "Evaluation of circulating miRNAs in wet age-related macular degeneration." *Mol Vis* **20**: 1057-1066.

Etheridge, A., I. Lee, L. Hood, D. Galas and K. Wang (2011). "Extracellular microRNA: a new source of biomarkers." *Mutat Res* **717**(1-2): 85-90.

Evans, J. R., A. E. Fletcher and R. P. Wormald (2005). "28,000 Cases of age related macular degeneration causing visual loss in people aged 75 years and above in the United Kingdom may be attributable to smoking." *Br J Ophthalmol* **89**(5): 550-553.

Fernandes, A. F., W. Guo, X. Zhang, M. Gallagher, M. Ivan, A. Taylor, P. Pereira and F. Shang (2006). "Proteasome-dependent regulation of signal transduction in retinal pigment epithelial cells." *Exp Eye Res* **83**(6): 1472-1481.

Ferrara, N. (1999). "Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis." *Kidney Int* **56**(3): 794-814.

Ferrara, N. (2001). "Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis." *Am J Physiol Cell Physiol* **280**(6): C1358-1366.

Ferrara, N., H. Chen, T. Davis-Smyth, H. P. Gerber, T. N. Nguyen, D. Peers, V. Chisholm, K. J. Hillan and R. H. Schwall (1998). "Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis." *Nat Med* **4**(3): 336-340.

Ferrara, N., H. P. Gerber and J. LeCouter (2003). "The biology of VEGF and its receptors." *Nat Med* **9**(6): 669-676.

Fine, S. L., B. S. Hawkins and M. G. Maguire (1991). "Krypton Laser photocoagulation for neovascular lesions of age-related macular degeneration." *Arch Ophthalmol* **109**(5): 614-615.

Finkenzeller, G., D. Marme, H. A. Weich and H. Hug (1992). "Platelet-derived growth factor-induced transcription of the vascular endothelial growth factor gene is mediated by protein kinase C." *Cancer Res* **52**(17): 4821-4823.

Flynt, A. S. and E. C. Lai (2008). "Biological principles of microRNA-mediated regulation: shared themes amid diversity." *Nat Rev Genet* **9**(11): 831-842.

Fong, G. H., J. Rossant, M. Gertsenstein and M. L. Breitman (1995). "Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium." *Nature* **376**(6535): 66-70.

Fong, G. H., L. Zhang, D. M. Bryce and J. Peng (1999). "Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice." *Development* **126**(13): 3015-3025.

Friedman, D. S., B. J. O'Colmain, B. Munoz, S. C. Tomany, C. McCarty, P. T. de Jong, B. Nemesure, P. Mitchell and J. Kempen (2004). "Prevalence of age-related macular degeneration in the United States." *Arch Ophthalmol* **122**(4): 564-572.

Friedman, R. C., K. K. Farh, C. B. Burge and D. P. Bartel (2009). "Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs." *Genome Res* **19**(1): 92-105.

Fritsche, L. G., W. Chen, M. Schu, B. L. Yaspan, Y. Yu, G. Thorleifsson, D. J. Zack, S. Arakawa, V. Cipriani, S. Ripke, R. P. Igo, Jr., G. H. Buitendijk, X. Sim, D. E. Weeks, R. H.

Guymmer, J. E. Merriam, P. J. Francis, G. Hannum, A. Agarwal, A. M. Ambrecht, I. Audo, T. Aung, G. R. Barile, M. Benchaboune, A. C. Bird, P. N. Bishop, K. E. Branham, M. Brooks, A. J. Brucker, W. H. Cade, M. S. Cain, P. A. Campochiaro, C. C. Chan, C. Y. Cheng, E. Y. Chew, K. A. Chin, I. Chowers, D. G. Clayton, R. Cojocar, Y. P. Conley, B. K. Cornes, M. J. Daly, B. Dhillon, A. O. Edwards, E. Evangelou, J. Fagerness, H. A. Ferreyra, J. S. Friedman, A. Geirsdottir, R. J. George, C. Gieger, N. Gupta, S. A. Hagstrom, S. P. Harding, C. Haritoglou, J. R. Heckenlively, F. G. Holz, G. Hughes, J. P. Ioannidis, T. Ishibashi, P. Joseph, G. Jun, Y. Kamatani, N. Katsanis, N. K. C, J. C. Khan, I. K. Kim, Y. Kiyohara, B. E. Klein, R. Klein, J. L. Kovach, I. Kozak, C. J. Lee, K. E. Lee, P. Lichtner, A. J. Lotery, T. Meitinger, P. Mitchell, S. Mohand-Said, A. T. Moore, D. J. Morgan, M. A. Morrison, C. E. Myers, A. C. Naj, Y. Nakamura, Y. Okada, A. Orlin, M. C. Ortube, M. I. Othman, C. Pappas, K. H. Park, G. J. Pauer, N. S. Peachey, O. Poch, R. R. Priya, R. Reynolds, A. J. Richardson, R. Ripp, G. Rudolph, E. Ryu, J. A. Sahel, D. A. Schaumberg, H. P. Scholl, S. G. Schwartz, W. K. Scott, H. Shahid, H. Sigurdsson, G. Silvestri, T. A. Sivakumaran, R. T. Smith, L. Sobrin, E. H. Souied, D. E. Stambolian, H. Stefansson, G. M. Sturgill-Short, A. Takahashi, N. Tosakulwong, B. J. Truitt, E. E. Tsironi, A. G. Uitterlinden, C. M. van Duijn, L. Vijaya, J. R. Vingerling, E. N. Vithana, A. R. Webster, H. E. Wichmann, T. W. Winkler, T. Y. Wong, A. F. Wright, D. Zelenika, M. Zhang, L. Zhao, K. Zhang, M. L. Klein, G. S. Hageman, G. M. Lathrop, K. Stefansson, R. Allikmets, P. N. Baird, M. B. Gorin, J. J. Wang, C. C. Klaver, J. M. Seddon, M. A. Pericak-Vance, S. K. Iyengar, J. R. Yates, A. Swaroop, B. H. Weber, M. Kubo, M. M. Deangelis, T. Leveillard, U. Thorsteinsdottir, J. L. Haines, L. A. Farrer, I. M. Heid, G. R. Abecasis and A. M. D. G. Consortium (2013). "Seven new loci associated with age-related macular degeneration." *Nat Genet* **45**(4): 433-439, 439e431-432.

Fritsche, L. G., W. Igl, J. N. Bailey, F. Grassmann, S. Sengupta, J. L. Bragg-Gresham, K. P. Burdon, S. J. Hebring, C. Wen, M. Gorski, I. K. Kim, D. Cho, D. Zack, E. Souied, H. P. Scholl, E. Bala, K. E. Lee, D. J. Hunter, R. J. Sardell, P. Mitchell, J. E. Merriam, V. Cipriani, J. D. Hoffman, T. Schick, Y. T. Lechanteur, R. H. Guymmer, M. P. Johnson, Y. Jiang, C. M. Stanton, G. H. Buitendijk, X. Zhan, A. M. Kwong, A. Boleda, M. Brooks, L. Gieser, R. Ratnapriya, K. E. Branham, J. R. Foerster, J. R. Heckenlively, M. I. Othman, B. J. Vote, H. H. Liang, E. Souzeau, I. L. McAllister, T. Isaacs, J. Hall, S. Lake, D. A. Mackey, I. J. Constable, J. E. Craig, T. E. Kitchner, Z. Yang, Z. Su, H. Luo, D. Chen, H. Ouyang, K. Flagg, D. Lin, G. Mao, H. Ferreyra, K. Stark, C. N. von Strachwitz, A. Wolf, C. Brandl, G. Rudolph, M. Olden, M. A. Morrison, D. J. Morgan, M. Schu, J. Ahn, G. Silvestri, E. E. Tsironi, K. H. Park, L. A. Farrer, A. Orlin, A. Brucker, M. Li, C. A. Curcio, S. Mohand-Said, J. A. Sahel, I. Audo, M. Benchaboune, A. J. Cree, C. A. Rennie, S. V. Goverdhan, M. Grunin, S. Hagbi-Levi, P. Campochiaro, N. Katsanis, F. G. Holz, F. Blond, H. Blanche, J. F. Deleuze, R. P. Igo, Jr., B. Truitt, N. S. Peachey, S. M. Meuer, C. E. Myers, E. L. Moore, R. Klein, M. A. Hauser, E. A. Postel, M. D. Courtenay, S. G. Schwartz, J. L. Kovach, W. K. Scott, G. Liew, A. G. Tan, B. Gopinath, J. C. Merriam, R. T. Smith, J. C. Khan, H. Shahid, A. T. Moore, J. A. McGrath, R. Laux, M. A. Brantley, Jr., A. Agarwal, L. Ersoy, A. Caramoy, T. Langmann, N. T. Saksens, E. K. de Jong, C. B. Hoyng, M. S. Cain, A. J. Richardson, T. M. Martin, J. Blangero, D. E. Weeks, B. Dhillon, C. M. van Duijn, K. F. Doheny, J. Romm, C. C. Klaver, C. Hayward, M. B. Gorin, M. L. Klein, P. N. Baird, A. I. den Hollander, S. Fauser, J. R. Yates, R. Allikmets, J. J. Wang, D. A. Schaumberg, B. E. Klein, S. A. Hagstrom, I. Chowers, A. J. Lotery, T. Leveillard, K. Zhang, M. H. Brilliant, A. W. Hewitt, A. Swaroop, E. Y. Chew, M. A. Pericak-Vance, M. DeAngelis, D. Stambolian, J. L. Haines, S. K. Iyengar, B. H. Weber, G. R. Abecasis and I. M.

Heid (2016). "A large genome-wide association study of age-related macular degeneration highlights contributions of rare and common variants." Nat Genet **48**(2): 134-143.

Fruhwrith, G. O., A. Loidl and A. Hermetter (2007). "Oxidized phospholipids: from molecular properties to disease." Biochim Biophys Acta **1772**(7): 718-736.

Fruttiger, M. (2007). "Development of the retinal vasculature." Angiogenesis **10**(2): 77-88.

Gargalovic, P. S., N. M. Gharavi, M. J. Clark, J. Pagnon, W. P. Yang, A. He, A. Truong, T. Baruch-Oren, J. A. Berliner, T. G. Kirchgessner and A. J. Lusis (2006). "The unfolded protein response is an important regulator of inflammatory genes in endothelial cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(11): 2490-2496.

Garrido, C., S. Saule and D. Gospodarowicz (1993). "Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor gene expression in ovarian bovine granulosa cells." Growth Factors **8**(2): 109-117.

Gavard, J. and J. S. Gutkind (2006). "VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin." Nat Cell Biol **8**(11): 1223-1234.

Ghosh, R., K. L. Lipson, K. E. Sargent, A. M. Mercurio, J. S. Hunt, D. Ron and F. Urano (2010). "Transcriptional regulation of VEGF-A by the unfolded protein response pathway." PLoS One **5**(3): e9575.

Gibbins, D. J., C. Ciaudo, M. Erhardt and O. Voinnet (2009). "Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity." Nat Cell Biol **11**(9): 1143-1149.

Gingerich, T. J., J. J. Feige and J. LaMarre (2004). "AU-rich elements and the control of gene expression through regulated mRNA stability." Anim Health Res Rev **5**(1): 49-63.

Goldberg, M. A. and T. J. Schneider (1994). "Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin." J Biol Chem **269**(6): 4355-4359.

Goldman, C. K., J. Kim, W. L. Wong, V. King, T. Brock and G. Y. Gillespie (1993). "Epidermal growth factor stimulates vascular endothelial growth factor production by human malignant glioma cells: a model of glioblastoma multiforme pathophysiology." Mol Biol Cell **4**(1): 121-133.

Gonzales, J. C., L. M. Fink, O. B. Goodman, Jr., J. T. Symanowski, N. J. Vogelzang and D. C. Ward (2011). "Comparison of circulating MicroRNA 141 to circulating tumor cells, lactate dehydrogenase, and prostate-specific antigen for determining treatment response in patients with metastatic prostate cancer." Clin Genitourin Cancer **9**(1): 39-45.

Gorin, M. B. (2012). "Genetic insights into age-related macular degeneration: controversies addressing risk, causality, and therapeutics." Mol Aspects Med **33**(4): 467-486.

Grabner, G., G. Boltz and O. Forster (1980). "Macrophage-like properties of human hyalocytes." Invest Ophthalmol Vis Sci **19**(4): 333-340.

Gragoudas, E. S., A. P. Adamis, E. T. Cunningham, Jr., M. Feinsod, D. R. Guyer and V. I. S. i. O. N. C. T. Group (2004). "Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration." N Engl J Med **351**(27): 2805-2816.

Gramage, E., J. Li and P. Hitchcock (2014). "The expression and function of midkine in the vertebrate retina." Br J Pharmacol **171**(4): 913-923.

Grassmann, F., P. G. Schoenberger, C. Brandl, T. Schick, D. Hasler, G. Meister, M. Fleckenstein, M. Lindner, H. Helbig, S. Fauser and B. H. Weber (2014). "A circulating microrna profile is associated with late-stage neovascular age-related macular degeneration." PLoS One **9**(9): e107461.

Grimson, A., K. K. Farh, W. K. Johnston, P. Garrett-Engele, L. P. Lim and D. P. Bartel (2007). "MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing." Mol Cell **27**(1): 91-105.

Grindle, C. F. and J. Marshall (1978). "Ageing changes in Bruch's membrane and their functional implications." Trans Ophthalmol Soc U K **98**(1): 172-175.

Grothey, A. and E. Galanis (2009). "Targeting angiogenesis: progress with anti-VEGF treatment with large molecules." Nat Rev Clin Oncol **6**(9): 507-518.

Grunwald, J. E., E. Daniel, J. Huang, G. S. Ying, M. G. Maguire, C. A. Toth, G. J. Jaffe, S. L. Fine, B. Blodi, M. L. Klein, A. A. Martin, S. A. Hagstrom, D. F. Martin and C. R. Group (2014). "Risk of geographic atrophy in the comparison of age-related macular degeneration treatments trials." Ophthalmology **121**(1): 150-161.

Grunwald, J. E., M. Pistilli, G. S. Ying, M. G. Maguire, E. Daniel, D. F. Martin and G. Comparison of Age-related Macular Degeneration Treatments Trials Research (2015). "Growth of geographic atrophy in the comparison of age-related macular degeneration treatments trials." Ophthalmology **122**(4): 809-816.

Guillonau, X., C. M. Eandi, M. Paques, J. A. Sahel, P. Sapieha and F. Sennlaub (2017). "On phagocytes and macular degeneration." Prog Retin Eye Res **61**: 98-128.

Gulyaeva, L. F. and N. E. Kushlinskiy (2016). "Regulatory mechanisms of microRNA expression." J Transl Med **14**(1): 143.

Guo, D., Q. Jia, H. Y. Song, R. S. Warren and D. B. Donner (1995). "Vascular endothelial cell growth factor promotes tyrosine phosphorylation of mediators of signal transduction that contain SH2 domains. Association with endothelial cell proliferation." J Biol Chem **270**(12): 6729-6733.

Gupta, S., D. E. Read, A. Deepti, K. Cawley, A. Gupta, D. Oommen, T. Verfaillie, S. Matus, M. A. Smith, J. L. Mott, P. Agostinis, C. Hetz and A. Samali (2012). "Perk-dependent repression of miR-106b-25 cluster is required for ER stress-induced apoptosis." Cell Death and Disease **3**: e333-e333.

Guyer, D. R., S. L. Fine, M. G. Maguire, B. S. Hawkins, S. L. Owens and R. P. Murphy (1986). "Subfoveal choroidal neovascular membranes in age-related macular degeneration. Visual prognosis in eyes with relatively good initial visual acuity." Arch Ophthalmol **104**(5): 702-705.

Hall, J. B., J. N. Cooke Bailey, J. D. Hoffman, M. A. Pericak-Vance, W. K. Scott, J. L. Kovach, S. G. Schwartz, A. Agarwal, M. A. Brantley, Jr., J. L. Haines and W. S. Bush (2015). "Estimating cumulative pathway effects on risk for age-related macular degeneration using mixed linear models." BMC Bioinformatics **16**: 329.

Hamilton, A. J. and D. C. Baulcombe (1999). "A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants." Science **286**(5441): 950-952.

Handa, J. T., M. Cano, L. Wang, S. Datta and T. Liu (2017). "Lipids, oxidized lipids, oxidation-specific epitopes, and Age-related Macular Degeneration." Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids **1862**(4): 430-440.

Hanna, J., G. S. Hossain and J. Kocerha (2019). "The Potential for microRNA Therapeutics and Clinical Research." Front Genet **10**: 478.

Hanout, M., D. Ferraz, M. Ansari, N. Maqsood, S. Kherani, Y. J. Sepah, N. Rajagopalan, M. Ibrahim, D. V. Do and Q. D. Nguyen (2013). "Therapies for neovascular age-related macular degeneration: current approaches and pharmacologic agents in development." Biomed Res Int **2013**: 830837.

Harada, S., J. A. Nagy, K. A. Sullivan, K. A. Thomas, N. Endo, G. A. Rodan and S. B. Rodan (1994). "Induction of vascular endothelial growth factor expression by prostaglandin E2 and E1 in osteoblasts." J Clin Invest **93**(6): 2490-2496.

Harding, H. P., Y. Zhang and D. Ron (1999). "Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase." Nature **397**(6716): 271-274.

Harper, S. J. and D. O. Bates (2008). "VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics?" Nat Rev Cancer **8**(11): 880-887.

Hata, A. and R. Kashima (2016). "Dysregulation of microRNA biogenesis machinery in cancer." Crit Rev Biochem Mol Biol **51**(3): 121-134.

Hauser, S. and H. A. Weich (1993). "A heparin-binding form of placenta growth factor (PlGF-2) is expressed in human umbilical vein endothelial cells and in placenta." Growth Factors **9**(4): 259-268.

Hayat, M. J., N. Howlader, M. E. Reichman and B. K. Edwards (2007). "Cancer statistics, trends, and multiple primary cancer analyses from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program." Oncologist **12**(1): 20-37.

He, L., J. M. Thomson, M. T. Hemann, E. Hernando-Monge, D. Mu, S. Goodson, S. Powers, C. Cordon-Cardo, S. W. Lowe, G. J. Hannon and S. M. Hammond (2005). "A microRNA polycistron as a potential human oncogene." Nature **435**(7043): 828-833.

Hebert, S. S., K. Horre, L. Nicolai, B. Bergmans, A. S. Papadopoulou, A. Delacourte and B. De Strooper (2009). "MicroRNA regulation of Alzheimer's Amyloid precursor protein expression." Neurobiol Dis **33**(3): 422-428.

Heier, J. S., D. M. Brown, V. Chong, J. F. Korobelnik, P. K. Kaiser, Q. D. Nguyen, B. Kirchhof, A. Ho, Y. Ogura, G. D. Yancopoulos, N. Stahl, R. Vitti, A. J. Berliner, Y. Soo, M. Anderesi, G. Groetzbach, B. Sommerauer, R. Sandbrink, C. Simader, U. Schmidt-Erfurth, View and V. S. Groups (2012). "Intravitreal aflibercept (VEGF trap-eye) in wet age-related macular degeneration." Ophthalmology **119**(12): 2537-2548.

Hellberg, C., A. Ostman and C. H. Heldin (2010). "PDGF and vessel maturation." Recent Results Cancer Res **180**: 103-114.

Hida, M., H. Fujita, K. Ishikura, S. Omori, M. Hoshiya and M. Awazu (2003). "Eicosapentaenoic acid inhibits PDGF-induced mitogenesis and cyclin D1 expression via TGF-beta in mesangial cells." J Cell Physiol **196**(2): 293-300.

Hikichi, T., J. Akiba, N. Ueno, A. Yoshida and B. Chakrabarti (1997). "Cross-linking of vitreous collagen and degradation of hyaluronic acid induced by bilirubin-sensitized photochemical reaction." Jpn J Ophthalmol **41**(3): 154-159.

Hogan, M. J. and J. Alvarado (1967). "Studies on the human macula. IV. Aging changes in Bruch's membrane." Arch Ophthalmol **77**(3): 410-420.

Hohn, A., T. Jung, S. Grimm and T. Grune (2010). "Lipofuscin-bound iron is a major intracellular source of oxidants: role in senescent cells." Free Radic Biol Med **48**(8): 1100-1108.

Holash, J., S. Davis, N. Papadopoulos, S. D. Croll, L. Ho, M. Russell, P. Boland, R. Leidich, D. Hylton, E. Burova, E. Ioffe, T. Huang, C. Radziejewski, K. Bailey, J. P. Fandl, T. Daly, S. J. Wiegand, G. D. Yancopoulos and J. S. Rudge (2002). "VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(17): 11393-11398.

Hollien, J. and J. S. Weissman (2006). "Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response." Science **313**(5783): 104-107.

Hoon, M., H. Okawa, L. Della Santina and R. O. Wong (2014). "Functional architecture of the retina: development and disease." Prog Retin Eye Res **42**: 44-84.

Houck, K. A., N. Ferrara, J. Winer, G. Cachianes, B. Li and D. W. Leung (1991). "The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA." *Mol Endocrinol* **5**(12): 1806-1814.

Hua, Z., Q. Lv, W. Ye, C. K. Wong, G. Cai, D. Gu, Y. Ji, C. Zhao, J. Wang, B. B. Yang and Y. Zhang (2006). "MiRNA-directed regulation of VEGF and other angiogenic factors under hypoxia." *PLoS One* **1**: e116.

Huang, D., E. A. Swanson, C. P. Lin, J. S. Schuman, W. G. Stinson, W. Chang, M. R. Hee, T. Flotte, K. Gregory, C. A. Puliafito and et al. (1991). "Optical coherence tomography." *Science* **254**(5035): 1178-1181.

Huang, Y., X. Shen, Q. Zou, S. Wang, S. Tang and G. Zhang (2011). "Biological functions of microRNAs: a review." *Journal of Physiology and Biochemistry* **67**(1): 129-139.

Hughes, D. A., A. C. Pinder, Z. Piper, I. T. Johnson and E. K. Lund (1996). "Fish oil supplementation inhibits the expression of major histocompatibility complex class II molecules and adhesion molecules on human monocytes." *Am J Clin Nutr* **63**(2): 267-272.

Hurwitz, H. (2004). "Integrating the anti-VEGF-A humanized monoclonal antibody bevacizumab with chemotherapy in advanced colorectal cancer." *Clin Colorectal Cancer* **4 Suppl 2**: S62-68.

Hyman, L. G., A. M. Lilienfeld, F. L. Ferris, 3rd and S. L. Fine (1983). "Senile macular degeneration: a case-control study." *Am J Epidemiol* **118**(2): 213-227.

Inoue, Y., Y. Yanagi, K. Matsuura, H. Takahashi, Y. Tamaki and M. Araie (2007). "Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha and 2alpha in choroidal neovascular membranes associated with age-related macular degeneration." *Br J Ophthalmol* **91**(12): 1720-1721.

Iyengar, S. K., B. E. Klein, R. Klein, G. Jun, J. H. Schick, C. Millard, R. Liptak, K. Russo, K. E. Lee and R. C. Elston (2004). "Identification of a major locus for age-related cortical cataract on chromosome 6p12-q12 in the Beaver Dam Eye Study." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(40): 14485-14490.

Iyer, A., E. Zurolo, A. Prabowo, K. Fluiter, W. G. Spliet, P. C. van Rijen, J. A. Gorter and E. Aronica (2012). "MicroRNA-146a: a key regulator of astrocyte-mediated inflammatory response." *PLoS One* **7**(9): e44789.

J. Sebag (1998). "Macromolecular structure of the corpus vitreus." *Progress in Polymer Science* **23**(3).

Jacob, J., H. Brié, A. Leys, L. Levecq, F. Mergaerts, K. Denhaerynck, S. Vancayzeele, E. Van Craeyveld, I. Abraham and K. MacDonald (2017). "Six-year outcomes in neovascular age-related macular degeneration with ranibizumab." *International journal of ophthalmology* **10**(1): 81-90.

Jafarifar, F., P. Yao, S. M. Eswarappa and P. L. Fox (2011). "Repression of VEGFA by CA-rich element-binding microRNAs is modulated by hnRNP L." *EMBO J* **30**(7): 1324-1334.

Javitt, N. B. and J. C. Javitt (2009). "The retinal oxysterol pathway: a unifying hypothesis for the cause of age-related macular degeneration." *Curr Opin Ophthalmol* **20**(3): 151-157.

Jiang, M., Y. Xiang, D. Wang, J. Gao, D. Liu, Y. Liu, S. Liu and D. Zheng (2012). "Dysregulated expression of miR-146a contributes to age-related dysfunction of macrophages." *Aging Cell* **11**(1): 29-40.

Johnson, W. E., C. Li and A. Rabinovic (2007). "Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods." *Biostatistics* **8**(1): 118-127.

Jopling, C. L., M. Yi, A. M. Lancaster, S. M. Lemon and P. Sarnow (2005). "Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA." Science **309**(5740): 1577-1581.

Joyal, J. S., N. Sitaras, F. Binet, J. C. Rivera, A. Stahl, K. Zaniolo, Z. Shao, A. Polosa, T. Zhu, D. Hamel, M. Djavari, D. Kunik, J. C. Honore, E. Picard, A. Zabeida, D. R. Varma, G. Hickson, J. Mancini, M. Klagsbrun, S. Costantino, C. Beausejour, P. Lachapelle, L. E. Smith, S. Chemtob and P. Sapienza (2011). "Ischemic neurons prevent vascular regeneration of neural tissue by secreting semaphorin 3A." Blood **117**(22): 6024-6035.

Kang, W., J. H. Tong, A. W. Chan, A. S. Cheng, J. Yu and K. To (2014). "MCM7 serves as a prognostic marker in diffuse-type gastric adenocarcinoma and siRNA-mediated knockdown suppresses its oncogenic function." Oncol Rep **31**(5): 2071-2078.

Kappas, N. C., G. Zeng, J. C. Chappell, J. B. Kearney, S. Hazarika, K. G. Kallianos, C. Patterson, B. H. Annex and V. L. Bautch (2008). "The VEGF receptor Flt-1 spatially modulates Flk-1 signaling and blood vessel branching." J Cell Biol **181**(5): 847-858.

Katchy, A. and C. Williams (2016). "Expression Profiles of Estrogen-Regulated MicroRNAs in Breast Cancer Cells." Methods Mol Biol **1366**: 373-393.

Kaur, C., W. S. Foulds and E. A. Ling (2008). "Blood-retinal barrier in hypoxic ischaemic conditions: basic concepts, clinical features and management." Prog Retin Eye Res **27**(6): 622-647.

Kempen, J. H., B. J. O'Colmain, M. C. Leske, S. M. Haffner, R. Klein, S. E. Moss, H. R. Taylor and R. F. Hamman (2004). "The prevalence of diabetic retinopathy among adults in the United States." Arch Ophthalmol **122**(4): 552-563.

Kertesz, M., N. Iovino, U. Unnerstall, U. Gaul and E. Segal (2007). "The role of site accessibility in microRNA target recognition." Nat Genet **39**(10): 1278-1284.

Keyt, B. A., H. V. Nguyen, L. T. Berleau, C. M. Duarte, J. Park, H. Chen and N. Ferrara (1996). "Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors. Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis." J Biol Chem **271**(10): 5638-5646.

Kim, G. H., J. E. Kim, S. J. Rhie and S. Yoon (2015). "The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases." Exp Neurobiol **24**(4): 325-340.

Kirschner, M. B., S. C. Kao, J. J. Edelman, N. J. Armstrong, M. P. Valley, N. van Zandwijk and G. Reid (2011). "Haemolysis during sample preparation alters microRNA content of plasma." PLoS One **6**(9): e24145.

Kitsukawa, T., M. Shimizu, M. Sanbo, T. Hirata, M. Taniguchi, Y. Bekku, T. Yagi and H. Fujisawa (1997). "Neuropilin-semaphorin III/D-mediated chemorepulsive signals play a crucial role in peripheral nerve projection in mice." Neuron **19**(5): 995-1005.

Kitsukawa, T., A. Shimono, A. Kawakami, H. Kondoh and H. Fujisawa (1995). "Overexpression of a membrane protein, neuropilin, in chimeric mice causes anomalies in the cardiovascular system, nervous system and limbs." Development **121**(12): 4309-4318.

Klagsbrun, M. and P. A. D'Amore (1996). "Vascular endothelial growth factor and its receptors." Cytokine Growth Factor Rev **7**(3): 259-270.

Klagsbrun, M. and M. A. Moses (1999). "Molecular angiogenesis." Chem Biol **6**(8): R217-224.

Klaver, C. C., R. C. Wolfs, J. J. Assink, C. M. van Duijn, A. Hofman and P. T. de Jong (1998). "Genetic risk of age-related maculopathy. Population-based familial aggregation study." Arch Ophthalmol **116**(12): 1646-1651.



Klein, M. L. and P. J. Francis (2003). "Genetics of age-related macular degeneration." Ophthalmol Clin North Am **16**(4): 567-574.

Klein, R. and B. E. Klein (2013). "The prevalence of age-related eye diseases and visual impairment in aging: current estimates." Invest Ophthalmol Vis Sci **54**(14): ORSF5-ORSF13.

Klein, R., B. E. Klein, K. L. Linton and D. L. DeMets (1993). "The Beaver Dam Eye Study: the relation of age-related maculopathy to smoking." Am J Epidemiol **137**(2): 190-200.

Klein, R., M. D. Knudtson, B. E. Klein, T. Y. Wong, M. F. Cotch, K. Liu, C. Y. Cheng, G. L. Burke, M. F. Saad, D. R. Jacobs, Jr. and A. R. Sharrett (2008). "Inflammation, complement factor h, and age-related macular degeneration: the Multi-ethnic Study of Atherosclerosis." Ophthalmology **115**(10): 1742-1749.

Kloosterman, W. P., E. Wienholds, R. F. Ketting and R. H. Plasterk (2004). "Substrate requirements for let-7 function in the developing zebrafish embryo." Nucleic Acids Res **32**(21): 6284-6291.

Koch, A. E., P. J. Polverini, S. L. Kunkel, L. A. Harlow, L. A. DiPietro, V. M. Elner, S. G. Elner and R. M. Strieter (1992). "Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis." Science **258**(5089): 1798-1801.

Koch, S. and L. Claesson-Welsh (2012). "Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors." Cold Spring Harb Perspect Med **2**(7): a006502.

Kok, M. G., A. Halliani, P. D. Moerland, J. C. Meijers, E. E. Creemers and S. J. Pinto-Sietsma (2015). "Normalization panels for the reliable quantification of circulating microRNAs by RT-qPCR." FASEB J **29**(9): 3853-3862.

Kok, M. G. M., M. W. J. de Ronde, P. D. Moerland, J. M. Ruijter, E. E. Creemers and S. J. Pinto-Sietsma (2018). "Small sample sizes in high-throughput miRNA screens: A common pitfall for the identification of miRNA biomarkers." Biomol Detect Quantif **15**: 1-5.

Kokame, G. T., T. E. deCarlo, K. N. Kaneko, J. N. Omizo and R. Lian (2019). "Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Resistance in Exudative Macular Degeneration and Polypoidal Choroidal Vasculopathy." Ophthalmol Retina **3**(9): 744-752.

Kolb, H. (1997). "Amacrine cells of the mammalian retina: neurocircuitry and functional roles." Eye (Lond) **11 ( Pt 6)**: 904-923.

Krutzfeldt, J., N. Rajewsky, R. Braich, K. G. Rajeev, T. Tuschl, M. Manoharan and M. Stoffel (2005). "Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'." Nature **438**(7068): 685-689.

Kuehbacher, A., C. Urbich, A. M. Zeiher and S. Dimmeler (2007). "Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis." Circ Res **101**(1): 59-68.

Kume, T. (2009). "Novel insights into the differential functions of Notch ligands in vascular formation." J Angiogenesis Res **1**: 8.

Kuosmanen, S. M., E. Kansanen, M. U. Kaikkonen, V. Sihvola, K. Pulkkinen, H. K. Jyrkkanen, P. Tuoresmaki, J. Hartikainen, M. Hippelainen, H. Kokki, P. Tavi, S. Heikkinen and A. L. Levonen (2018). "NRF2 regulates endothelial glycolysis and proliferation with miR-93 and mediates the effects of oxidized phospholipids on endothelial activation." Nucleic Acids Res **46**(3): 1124-1138.

Kutty, R. K., C. N. Nagineni, W. Samuel, C. Vijayasarathy, C. Jaworski, T. Duncan, J. E. Cameron, E. K. Flemington, J. J. Hooks and T. M. Redmond (2013). "Differential regulation of microRNA-146a and microRNA-146b-5p in human retinal pigment epithelial cells by interleukin-1beta, tumor necrosis factor-alpha, and interferon-gamma." Mol Vis **19**: 737-750.

Lai, C. M., Y. K. Lai and P. E. Rakoczy (2002). "Adenovirus and adeno-associated virus vectors." DNA Cell Biol **21**(12): 895-913.

Lai, Y. K., W. Y. Shen, M. Brankov, C. M. Lai, I. J. Constable and P. E. Rakoczy (2002). "Potential long-term inhibition of ocular neovascularisation by recombinant adeno-associated virus-mediated secretion gene therapy." Gene Ther **9**(12): 804-813.

Lambert, V., J. Lecomte, S. Hansen, S. Blacher, M.-L. Gonzalez, I. Struman, N. Sounni, E. Rozet, P. de Tullio, J. Foidart, J.-M. Rakic and A. Noel (2013). "Laser-induced choroidal neovascularization model to study age-related macular degeneration in mice." Nature Protocols **8**(11): 2197-2211.

Lambert, V., J. Lecomte, S. Hansen, S. Blacher, M. L. Gonzalez, I. Struman, N. E. Sounni, E. Rozet, P. de Tullio, J. M. Foidart, J. M. Rakic and A. Noel (2013). "Laser-induced choroidal neovascularization model to study age-related macular degeneration in mice." Nat Protoc **8**(11): 2197-2211.

Lander, E. S. (1999). "Array of hope." Nat Genet **21**(1 Suppl): 3-4.

Landskroner-Eiger, S., I. Moneke and W. C. Sessa (2013). "miRNAs as modulators of angiogenesis." Cold Spring Harb Perspect Med **3**(2): a006643.

Lavalette, S., W. Raoul, M. Houssier, S. Camelo, O. Levy, B. Calippe, L. Jonet, F. Behar-Cohen, S. Chemtob, X. Guillonneau, C. Combadiere and F. Sennlaub (2011). "Interleukin-1beta inhibition prevents choroidal neovascularization and does not exacerbate photoreceptor degeneration." Am J Pathol **178**(5): 2416-2423.

Lawrie, C. H. (2008). "MicroRNA expression in lymphoid malignancies: new hope for diagnosis and therapy?" J Cell Mol Med **12**(5A): 1432-1444.

Lee, A. H., N. N. Iwakoshi and L. H. Glimcher (2003). "XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response." Mol Cell Biol **23**(21): 7448-7459.

Lee, K. P., M. Dey, D. Neculai, C. Cao, T. E. Dever and F. Sicheri (2008). "Structure of the dual enzyme Ire1 reveals the basis for catalysis and regulation in nonconventional RNA splicing." Cell **132**(1): 89-100.

Lee, R. C., R. L. Feinbaum and V. Ambros (1993). "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*." Cell **75**(5): 843-854.

Li, A., S. Dubey, M. L. Varney, B. J. Dave and R. K. Singh (2003). "IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis." J Immunol **170**(6): 3369-3376.

Li, Z. and T. Rana (2014). "Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges." Nature Reviews Drug Discovery **13**(8): 622-638.

Li, Z. and T. M. Rana (2014). "Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges." Nat Rev Drug Discov **13**(8): 622-638.

Libby, R. T. and D. B. Gould (2010). "Endoplasmic reticulum stress as a primary pathogenic mechanism leading to age-related macular degeneration." Adv Exp Med Biol **664**: 403-409.

Lim, L. P., N. C. Lau, P. Garrett-Engele, A. Grimson, J. M. Schelter, J. Castle, D. P. Bartel, P. S. Linsley and J. M. Johnson (2005). "Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs." Nature **433**(7027): 769-773.

Lindahl, P., B. R. Johansson, P. Leveen and C. Betsholtz (1997). "Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice." Science **277**(5323): 242-245.

Linsley, P. S., J. Schelter, J. Burchard, M. Kibukawa, M. M. Martin, S. R. Bartz, J. M. Johnson, J. M. Cummins, C. K. Raymond, H. Dai, N. Chau, M. Cleary, A. L. Jackson, M. Carleton and L. Lim (2007). "Transcripts targeted by the microRNA-16 family cooperatively regulate cell cycle progression." Mol Cell Biol **27**(6): 2240-2252.

Liu, C. H., Y. Sun, J. Li, Y. Gong, K. T. Tian, L. P. Evans, P. C. Morss, T. W. Fredrick, N. J. Saba and J. Chen (2015). "Endothelial microRNA-150 is an intrinsic suppressor of pathologic ocular neovascularization." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(39): 12163-12168.

Liu, X., J. Li, F. Qin and S. Dai (2016). "miR-152 as a tumor suppressor microRNA: Target recognition and regulation in cancer." Oncol Lett **11**(6): 3911-3916.

Lobov, I. B., R. A. Renard, N. Papadopoulos, N. W. Gale, G. Thurston, G. D. Yancopoulos and S. J. Wiegand (2007). "Delta-like ligand 4 (Dll4) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(9): 3219-3224.

Loffler, K. U. and W. R. Lee (1986). "Basal linear deposit in the human macula." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **224**(6): 493-501.

Lu, P. D., H. P. Harding and D. Ron (2004). "Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response." J Cell Biol **167**(1): 27-33.

Ludwig, N., P. Leidinger, K. Becker, C. Backes, T. Fehlmann, C. Pallasch, S. Rheinheimer, B. Meder, C. Stahler, E. Meese and A. Keller (2016). "Distribution of miRNA expression across human tissues." Nucleic Acids Res **44**(8): 3865-3877.

Lukiw, W. J., B. Surjyadipta, P. Dua and P. N. Alexandrov (2012). "Common micro RNAs (miRNAs) target complement factor H (CFH) regulation in Alzheimer's disease (AD) and in age-related macular degeneration (AMD)." Int J Biochem Mol Biol **3**(1): 105-116.

Lukiw, W. J., Y. Zhao and J. G. Cui (2008). "An NF-kappaB-sensitive micro RNA-146a-mediated inflammatory circuit in Alzheimer disease and in stressed human brain cells." J Biol Chem **283**(46): 31315-31322.

Lund, E., S. Guttinger, A. Calado, J. E. Dahlberg and U. Kutay (2004). "Nuclear export of microRNA precursors." Science **303**(5654): 95-98.

Luostarinen, R. and T. Saldeen (1996). "Dietary fish oil decreases superoxide generation by human neutrophils: relation to cyclooxygenase pathway and lysosomal enzyme release." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **55**(3): 167-172.

Ma, J. B., Y. R. Yuan, G. Meister, Y. Pei, T. Tuschl and D. J. Patel (2005). "Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein." Nature **434**(7033): 666-670.

Ma, L., H. L. Dou, Y. M. Huang, X. R. Lu, X. R. Xu, F. Qian, Z. Y. Zou, H. L. Pang, P. C. Dong, X. Xiao, X. Wang, T. T. Sun and X. M. Lin (2012). "Improvement of retinal function in early age-related macular degeneration after lutein and zeaxanthin supplementation: a randomized, double-masked, placebo-controlled trial." Am J Ophthalmol **154**(4): 625-634 e621.

Maberley, D. A., H. Hollands, J. Chuo, G. Tam, J. Konkak, M. Roesch, A. Veselinovic, M. Witzigmann and K. Bassett (2006). "The prevalence of low vision and blindness in Canada." Eye (Lond) **20**(3): 341-346.

Macrae, I. J., K. Zhou, F. Li, A. Repic, A. N. Brooks, W. Z. Cande, P. D. Adams and J. A. Doudna (2006). "Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer." Science **311**(5758): 195-198.

Maekawa, H. and R. Inagi (2017). "Stress Signal Network between Hypoxia and ER Stress in Chronic Kidney Disease." Front Physiol **8**: 74.

Maimaiti, A., Y. Yang and Y. Ma (2016). "MiR-106b exhibits an anti-angiogenic function by inhibiting STAT3 expression in endothelial cells." Lipids in Health and Disease **15**: 51-51.

Maiorano, D., M. Lutzmann and M. Mechali (2006). "MCM proteins and DNA replication." Curr Opin Cell Biol **18**(2): 130-136.

Manjunath, N., H. Wu, S. Subramanya and P. Shankar (2009). "Lentiviral delivery of short hairpin RNAs." Adv Drug Deliv Rev **61**(9): 732-745.

Manzano, R. P., G. A. Peyman, P. Khan and M. Kivilcim (2006). "Testing intravitreal toxicity of bevacizumab (Avastin)." Retina **26**(3): 257-261.

Martemyanov, K. A. and A. P. Sampath (2017). "The Transduction Cascade in Retinal ON-Bipolar Cells: Signal Processing and Disease." Annu Rev Vis Sci **3**: 25-51.

Masland, R. H. (2012). "The neuronal organization of the retina." Neuron **76**(2): 266-280.

Max, K. E. A., K. Bertram, K. M. Akat, K. A. Bogardus, J. Li, P. Morozov, I. Z. Ben-Dov, X. Li, Z. R. Weiss, A. Azizian, A. Sopeyin, T. G. Diacovo, C. Adamidi, Z. Williams and T. Tuschl (2018). "Human plasma and serum extracellular small RNA reference profiles and their clinical utility." Proc Natl Acad Sci U S A **115**(23): E5334-E5343.

McColl, B. K., M. E. Baldwin, S. Roufail, C. Freeman, R. L. Moritz, R. J. Simpson, K. Alitalo, S. A. Stacker and M. G. Achen (2003). "Plasmin activates the lymphangiogenic growth factors VEGF-C and VEGF-D." J Exp Med **198**(6): 863-868.

McMahon, M., A. Samali and E. Chevet (2017). "Regulation of the unfolded protein response by noncoding RNA." Am J Physiol Cell Physiol **313**(3): C243-C254.

Ménard, C., F. Rezende, K. Miloudi, A. Wilson, N. Tétréault, P. Hardy, J. SanGiovanni, V. De Guire and P. Sapiéha (2016). "MicroRNA signatures in vitreous humour and plasma of patients with exudative AMD." Oncotarget **7**(15): 19171-19184.

Menard, C., F. A. Rezende, K. Miloudi, A. Wilson, N. Tétréault, P. Hardy, J. P. SanGiovanni, V. De Guire and P. Sapiéha (2016). "MicroRNA signatures in vitreous humour and plasma of patients with exudative AMD." Oncotarget.

Mendell, J. (2008). "miRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease." Cell **133**(2): 217-222.

Mendell, J. T. (2008). "miRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease." Cell **133**(2): 217-222.

Mertz, J. A., A. R. Conery, B. M. Bryant, P. Sandy, S. Balasubramanian, D. A. Mele, L. Bergeron and R. J. Sims, 3rd (2011). "Targeting MYC dependence in cancer by inhibiting BET bromodomains." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(40): 16669-16674.

Meyer, S. U., S. Kaiser, C. Wagner, C. Thirion and M. W. Pfaffl (2012). "Profound effect of profiling platform and normalization strategy on detection of differentially expressed microRNAs--a comparative study." PLoS One **7**(6): e38946.

Meyer, S. U., M. W. Pfaffl and S. E. Ulbrich (2010). "Normalization strategies for microRNA profiling experiments: a 'normal' way to a hidden layer of complexity?" Biotechnol Lett **32**(12): 1777-1788.

Miao, H. Q., S. Soker, L. Feiner, J. L. Alonso, J. A. Raper and M. Klagsbrun (1999). "Neuropilin-1 mediates collapsin-1/semaphorin III inhibition of endothelial cell motility: functional competition of collapsin-1 and vascular endothelial growth factor-165." J Cell Biol **146**(1): 233-242.

Michiels, C. (2003). "Endothelial cell functions." J Cell Physiol **196**(3): 430-443.

Midena, E., S. Vujosevic, E. Convento, A. Manfre, F. Cavarzeran and E. Pilotto (2007). "Microperimetry and fundus autofluorescence in patients with early age-related macular degeneration." Br J Ophthalmol **91**(11): 1499-1503.

Miller, J. W. (2013). "Age-related macular degeneration revisited--piecing the puzzle: the LXIX Edward Jackson memorial lecture." Am J Ophthalmol **155**(1): 1-35 e13.

Minchenko, A., S. Salceda, T. Bauer and J. Caro (1994). "Hypoxia regulatory elements of the human vascular endothelial growth factor gene." Cell Mol Biol Res **40**(1): 35-39.

Mitchell, P. (2011). "A systematic review of the efficacy and safety outcomes of anti-VEGF agents used for treating neovascular age-related macular degeneration: comparison of ranibizumab and bevacizumab." Current Medical Research and Opinion **27**(7): 1465-1475.

Mitchell, P. S., R. K. Parkin, E. M. Kroh, B. R. Fritz, S. K. Wyman, E. L. Pogosova-Agadjanyan, A. Peterson, J. Noteboom, K. C. O'Briant, A. Allen, D. W. Lin, N. Urban, C. W. Drescher, B. S. Knudsen, D. L. Stirewalt, R. Gentleman, R. L. Vessella, P. S. Nelson, D. B. Martin and M. Tewari (2008). "Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(30): 10513-10518.

Mizutani, T., Y. Taniguchi, T. Aoki, N. Hashimoto and T. Honjo (2001). "Conservation of the biochemical mechanisms of signal transduction among mammalian Notch family members." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(16): 9026-9031.

Mogilyansky, E. and I. Rigoutsos (2013). "The miR-17/92 cluster: a comprehensive update on its genomics, genetics, functions and increasingly important and numerous roles in health and disease." Cell Death Differ **20**(12): 1603-1614.

Moi, L., T. Braaten, K. Al-Shibli, E. Lund and L. R. Busund (2019). "Differential expression of the miR-17-92 cluster and miR-17 family in breast cancer according to tumor type; results from the Norwegian Women and Cancer (NOWAC) study." J Transl Med **17**(1): 334.

Morita, K., H. Sasaki, M. Furuse and S. Tsukita (1999). "Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells." J Cell Biol **147**(1): 185-194.

Morrissey, D. V., J. A. Lockridge, L. Shaw, K. Blanchard, K. Jensen, W. Breen, K. Hartsough, L. Machemer, S. Radka, V. Jadhav, N. Vaish, S. Zinnen, C. Vargeese, K. Bowman, C. S. Shaffer, L. B. Jeffs, A. Judge, I. MacLachlan and B. Polisky (2005). "Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs." Nat Biotechnol **23**(8): 1002-1007.

Neffendorf, J. E., B. Gupta and T. H. Williamson (2017). "Intraoperative complications of patients undergoing small-gauge and 20-gauge vitrectomy: a database study of 4,274 procedures." Eur J Ophthalmol **27**(2): 226-230.

Neufeld, G., T. Cohen, S. Gengrinovitch and Z. Poltorak (1999). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors." FASEB J **13**(1): 9-22.

Neufeld, G., T. Cohen, N. Shraga, T. Lange, O. Kessler and Y. Herzog (2002). "The neuropilins: multifunctional semaphorin and VEGF receptors that modulate axon guidance and angiogenesis." Trends Cardiovasc Med **12**(1): 13-19.

Nickla, D. L. and J. Wallman (2010). "The multifunctional choroid." Prog Retin Eye Res **29**(2): 144-168.

Njock, M. S., H. S. Cheng, L. T. Dang, M. Nazari-Jahantigh, A. C. Lau, E. Boudreau, M. Roufaiel, M. I. Cybulsky, A. Schober and J. E. Fish (2015). "Endothelial cells suppress monocyte activation through secretion of extracellular vesicles containing antiinflammatory microRNAs." Blood **125**(20): 3202-3212.

Noren Hooten, N., M. Fitzpatrick, W. H. Wood, 3rd, S. De, N. Ejiogu, Y. Zhang, J. A. Mattison, K. G. Becker, A. B. Zonderman and M. K. Evans (2013). "Age-related changes in microRNA levels in serum." Aging (Albany NY) **5**(10): 725-740.

Novotny, H. R. and D. L. Alvis (1961). "A method of photographing fluorescence in circulating blood in the human retina." Circulation **24**: 82-86.

Nunes, D., E. Dias Neto, M. Cardó Vila, J. Edwards, A. Dobroff, R. Giordano, J. Mandelin, H. Brentani, C. Hasselgren, V. Yao, S. Marchiò, C. A. B. Pereira, F. Passetti, G. Calin, R. Sidman,

W. Arap and R. Pasqualini (2015). "Synchronous down-modulation of miR-17 family members is an early causative event in the retinal angiogenic switch." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **112**(12): 3770-3775.

Nunes, D. N., E. Dias-Neto, M. Cardo-Vila, J. K. Edwards, A. S. Dobroff, R. J. Giordano, J. Mandelin, H. P. Brentani, C. Hasselgren, V. J. Yao, S. Marchio, C. A. Pereira, F. Passetti, G. A. Calin, R. L. Sidman, W. Arap and R. Pasqualini (2015). "Synchronous down-modulation of miR-17 family members is an early causative event in the retinal angiogenic switch." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(12): 3770-3775.

O'Reilly, M. S., L. Holmgren, Y. Shing, C. Chen, R. A. Rosenthal, Y. Cao, M. Moses, W. S. Lane, E. H. Sage and J. Folkman (1994). "Angiostatin: a circulating endothelial cell inhibitor that suppresses angiogenesis and tumor growth." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **59**: 471-482.

Oh, H., H. Takagi, C. Takagi, K. Suzuma, A. Otani, K. Ishida, M. Matsumura, Y. Ogura and Y. Honda (1999). "The potential angiogenic role of macrophages in the formation of choroidal neovascular membranes." Invest Ophthalmol Vis Sci **40**(9): 1891-1898.

Olsson, A. K., A. Dimberg, J. Kreuger and L. Claesson-Welsh (2006). "VEGF receptor signalling - in control of vascular function." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(5): 359-371.

Oskolkova, O. V., T. Afonyushkin, A. Leitner, E. von Schlieffen, P. S. Gargalovic, A. J. Lusis, B. R. Binder and V. N. Bochkov (2008). "ATF4-dependent transcription is a key mechanism in VEGF up-regulation by oxidized phospholipids: critical role of oxidized sn-2 residues in activation of unfolded protein response." Blood **112**(2): 330-339.

Papetti, M. and I. M. Herman (2002). "Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis." Am J Physiol Cell Physiol **282**(5): C947-970.

Pardali, E., M. J. Goumans and P. ten Dijke (2010). "Signaling by members of the TGF-beta family in vascular morphogenesis and disease." Trends Cell Biol **20**(9): 556-567.

Park, J. E., G. A. Keller and N. Ferrara (1993). "The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF." Mol Biol Cell **4**(12): 1317-1326.

Parker, R. and H. Song (2004). "The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover." Nat Struct Mol Biol **11**(2): 121-127.

Pasquinelli, A. E., B. J. Reinhart, F. Slack, M. Q. Martindale, M. I. Kuroda, B. Maller, D. C. Hayward, E. E. Ball, B. Degnan, P. Muller, J. Spring, A. Srinivasan, M. Fishman, J. Finnerty, J. Corbo, M. Levine, P. Leahy, E. Davidson and G. Ruvkun (2000). "Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA." Nature **408**(6808): 86-89.

Paterson, M. R. and A. J. Kriegel (2017). "MiR-146a/b: a family with shared seeds and different roots." Physiol Genomics **49**(4): 243-252.

Pearson, J. D. (1999). "Endothelial cell function and thrombosis." Baillieres Best Pract Res Clin Haematol **12**(3): 329-341.

Pearson, J. D. (2000). "Normal endothelial cell function." Lupus **9**(3): 183-188.

Pertovaara, L., A. Kaipainen, T. Mustonen, A. Orpana, N. Ferrara, O. Saksela and K. Alitalo (1994). "Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells." J Biol Chem **269**(9): 6271-6274.

Petrocca, F., A. Vecchione and C. M. Croce (2008). "Emerging role of miR-106b-25/miR-17-92 clusters in the control of transforming growth factor beta signaling." Cancer Res **68**(20): 8191-8194.

Peyman, G. A. and D. Bok (1972). "Peroxidase diffusion in the normal and laser-coagulated primate retina." Invest Ophthalmol **11**(1): 35-45.

Pfeffer, S., M. Zavolan, F. A. Grasser, M. Chien, J. J. Russo, J. Ju, B. John, A. J. Enright, D. Marks, C. Sander and T. Tuschl (2004). "Identification of virus-encoded microRNAs." Science **304**(5671): 734-736.

Pogue, A. I. and W. J. Lukiw (2018). "Up-regulated Pro-inflammatory MicroRNAs (miRNAs) in Alzheimer's disease (AD) and Age-Related Macular Degeneration (AMD)." Cell Mol Neurobiol **38**(5): 1021-1031.

Poliseno, L., A. Tuccoli, L. Mariani, M. Evangelista, L. Citti, K. Woods, A. Mercatanti, S. Hammond and G. Rainaldi (2006). "MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs." Blood **108**(9): 3068-3071.

Potente, M., H. Gerhardt and P. Carmeliet (2011). "Basic and therapeutic aspects of angiogenesis." Cell **146**(6): 873-887.

Potente, M. and T. Makinen (2017). "Vascular heterogeneity and specialization in development and disease." Nat Rev Mol Cell Biol **18**(8): 477-494.

Prahs, C., M. Herault, A. A. Lanahan, N. Uziel, O. Kessler, N. Shraga-Heled, M. Simons, G. Neufeld and H. G. Augustin (2008). "Neuropilin-1-VEGFR-2 complexing requires the PDZ-binding domain of neuropilin-1." J Biol Chem **283**(37): 25110-25114.

Presta, L. G., H. Chen, S. J. O'Connor, V. Chisholm, Y. G. Meng, L. Krummen, M. Winkler and N. Ferrara (1997). "Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders." Cancer Res **57**(20): 4593-4599.

Pritchard, C. C., H. H. Cheng and M. Tewari (2012). "MicroRNA profiling: approaches and considerations." Nat Rev Genet **13**(5): 358-369.

Pugh, C. W., C. C. Tan, R. W. Jones and P. J. Ratcliffe (1991). "Functional analysis of an oxygen-regulated transcriptional enhancer lying 3' to the mouse erythropoietin gene." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(23): 10553-10557.

Qin, J., J. Ke, J. Xu, F. Wang, Y. Zhou, Y. Jiang and Z. Wang (2015). "Downregulation of microRNA-132 by DNA hypermethylation is associated with cell invasion in colorectal cancer." Onco Targets Ther **8**: 3639-3648.

Qureshi, R. and A. Sacan (2013). "A novel method for the normalization of microRNA RT-PCR data." BMC Med Genomics **6 Suppl 1**: S14.

Raghunath, A. and E. Perumal (2015). "Micro-RNAs and their roles in eye disorders." Ophthalmic Res **53**(4): 169-186.

Ragusa, M., R. Caltabiano, A. Russo, L. Puzzo, T. Avitabile, A. Longo, M. D. Toro, C. Di Pietro, M. Purrello and M. Reibaldi (2013). "MicroRNAs in vitreous humor from patients with ocular diseases." Mol Vis **19**: 430-440.

Raitoharju, E., N. Oksala and T. Lehtimäki (2013). "MicroRNAs in the atherosclerotic plaque." Clin Chem **59**(12): 1708-1721.

Rakhit, R., P. Cunningham, A. Furtos-Matei, S. Dahan, X. F. Qi, J. P. Crow, N. R. Cashman, L. H. Kondejewski and A. Chakrabarty (2002). "Oxidation-induced misfolding and aggregation of superoxide dismutase and its implications for amyotrophic lateral sclerosis." J Biol Chem **277**(49): 47551-47556.

Ramakrishnan, S., V. Anand and S. Roy (2014). "Vascular endothelial growth factor signaling in hypoxia and inflammation." J Neuroimmune Pharmacol **9**(2): 142-160.

Ramón y Cajal, S. (1972). The structure of the retina. Springfield, Ill., C. C. Thomas.

Ramrattan, R. S., T. L. van der Schaft, C. M. Mooy, W. C. de Bruijn, P. G. Mulder and P. T. de Jong (1994). "Morphometric analysis of Bruch's membrane, the choriocapillaris, and the choroid in aging." Invest Ophthalmol Vis Sci **35**(6): 2857-2864.

Ratnapriya, R. and E. Y. Chew (2013). "Age-related macular degeneration-clinical review and genetics update." Clin Genet **84**(2): 160-166.

Reich, S. J., J. Fosnot, A. Kuroki, W. Tang, X. Yang, A. M. Maguire, J. Bennett and M. J. Tolentino (2003). "Small interfering RNA (siRNA) targeting VEGF effectively inhibits ocular neovascularization in a mouse model." Mol Vis **9**: 210-216.

Ren, C., Q. Liu, Q. Wei, W. Cai, M. He, Y. Du, D. Xu, Y. Wu and J. Yu (2017). "Circulating miRNAs as Potential Biomarkers of Age-Related Macular Degeneration." Cell Physiol Biochem **41**(4): 1413-1423.

Ribatti, D. (2008). "The discovery of the placental growth factor and its role in angiogenesis: a historical review." Angiogenesis **11**(3): 215-221.

Risau, W. (1997). "Mechanisms of angiogenesis." Nature **386**(6626): 671-674.

Robinson, G. S., M. Ju, S. C. Shih, X. Xu, G. McMahon, R. B. Caldwell and L. E. Smith (2001). "Nonvascular role for VEGF: VEGFR-1, 2 activity is critical for neural retinal development." FASEB J **15**(7): 1215-1217.

Romano, G. L., C. B. M. Platania, F. Drago, S. Salomone, M. Ragusa, C. Barbagallo, C. Di Pietro, M. Purrello, M. Reibaldi, T. Avitabile, A. Longo and C. Bucolo (2017). "Retinal and Circulating miRNAs in Age-Related Macular Degeneration: An In vivo Animal and Human Study." Front Pharmacol **8**: 168.

Rosenfeld, P., D. Brown, J. Heier, D. Boyer, P. Kaiser, C. Chung and R. Kim (2006). "Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration." The New England Journal of Medicine **355**(14): 1419-1431.

Roybal, C. N., L. A. Hunsaker, O. Barbash, D. L. Vander Jagt and S. F. Abcouwer (2005). "The oxidative stressor arsenite activates vascular endothelial growth factor mRNA transcription by an ATF4-dependent mechanism." J Biol Chem **280**(21): 20331-20339.

Roybal, C. N., S. Yang, C. W. Sun, D. Hurtado, D. L. Vander Jagt, T. M. Townes and S. F. Abcouwer (2004). "Homocysteine increases the expression of vascular endothelial growth factor by a mechanism involving endoplasmic reticulum stress and transcription factor ATF4." J Biol Chem **279**(15): 14844-14852.

Ruiter, D. J., R. O. Schlingemann, J. R. Westphal, M. Denijn, F. J. Rietveld and R. M. De Waal (1993). "Angiogenesis in wound healing and tumor metastasis." Behring Inst Mitt(92): 258-272.

Saba, R., D. L. Sorensen and S. A. Booth (2014). "MicroRNA-146a: A Dominant, Negative Regulator of the Innate Immune Response." Front Immunol **5**: 578.

Saini, H. K., S. Griffiths-Jones and A. J. Enright (2007). "Genomic analysis of human microRNA transcripts." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(45): 17719-17724.

Saint-Geniez, M. and P. A. D'Amore (2004). "Development and pathology of the hyaloid, choroidal and retinal vasculature." Int J Dev Biol **48**(8-9): 1045-1058.

Saint-Geniez, M., A. S. Maharaj, T. E. Walshe, B. A. Tucker, E. Sekiyama, T. Kurihara, D. C. Darland, M. J. Young and P. A. D'Amore (2008). "Endogenous VEGF is required for visual function: evidence for a survival role on muller cells and photoreceptors." PLoS One **3**(11): e3554.

Sakamoto, T. and T. Ishibashi (2011). "Hyalocytes: essential cells of the vitreous cavity in vitreoretinal pathophysiology?" Retina **31**(2): 222-228.



Salminen, A., A. Kauppinen, J. M. Hyttinen, E. Toropainen and K. Kaarniranta (2010). "Endoplasmic reticulum stress in age-related macular degeneration: trigger for neovascularization." Mol Med **16**(11-12): 535-542.

Salminen, A., A. Kauppinen, T. Suuronen, K. Kaarniranta and J. Ojala (2009). "ER stress in Alzheimer's disease: a novel neuronal trigger for inflammation and Alzheimer's pathology." J Neuroinflammation **6**: 41.

Salzman, D. W. and J. B. Weidhaas (2013). "SNPping cancer in the bud: microRNA and microRNA-target site polymorphisms as diagnostic and prognostic biomarkers in cancer." Pharmacol Ther **137**(1): 55-63.

SanGiovanni, J. P., P. M. SanGiovanni, P. Sapiha and V. De Guire (2017). "miRNAs, single nucleotide polymorphisms (SNPs) and age-related macular degeneration (AMD)." Clin Chem Lab Med **55**(5): 763-775.

Sapiha, P., J.-S. Joyal, J. Rivera, E. Kermorvant Duchemin, F. Sennlaub, P. Hardy, P. Lachapelle and S. Chemtob (2010). "Retinopathy of prematurity: understanding ischemic retinal vasculopathies at an extreme of life." The Journal of Clinical Investigation **120**(9): 3022-3032.

Sarks, S. H. (1976). "Ageing and degeneration in the macular region: a clinico-pathological study." Br J Ophthalmol **60**(5): 324-341.

Sarwar, S., E. Clearfield, M. K. Soliman, M. A. Sadiq, A. J. Baldwin, M. Hanout, A. Agarwal, Y. J. Sepah, D. V. Do and Q. D. Nguyen (2016). "Aflibercept for neovascular age-related macular degeneration." Cochrane Database Syst Rev **2**: Cd011346.

Sauer, T., M. Patel, C. C. Chan and J. Tuo (2008). "Unfolding the Therapeutic Potential of Chemical Chaperones for Age-related Macular Degeneration." Expert Rev Ophthalmol **3**(1): 29-42.

Sawamiphak, S., S. Seidel, C. L. Essmann, G. A. Wilkinson, M. E. Pitulescu, T. Acker and A. Acker-Palmer (2010). "Ephrin-B2 regulates VEGFR2 function in developmental and tumour angiogenesis." Nature **465**(7297): 487-491.

Scheideler, M., I. Vidakovic and R. Prassl (2019). "Lipid nanocarriers for microRNA delivery." Chem Phys Lipids **226**: 104837.

Schuman, S. G., A. F. Koreishi, S. Farsiu, S. H. Jung, J. A. Izatt and C. A. Toth (2009). "Photoreceptor layer thinning over drusen in eyes with age-related macular degeneration imaged in vivo with spectral-domain optical coherence tomography." Ophthalmology **116**(3): 488-496 e482.

Schwarz, D. S., G. Hutvagner, T. Du, Z. Xu, N. Aronin and P. D. Zamore (2003). "Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex." Cell **115**(2): 199-208.

Sebag, J. and E. A. Balazs (1989). "Morphology and ultrastructure of human vitreous fibers." Invest Ophthalmol Vis Sci **30**(8): 1867-1871.

Seddon, J. M., U. A. Ajani, R. D. Sperduto, R. Hiller, N. Blair, T. C. Burton, M. D. Farber, E. S. Gragoudas, J. Haller, D. T. Miller and et al. (1994). "Dietary carotenoids, vitamins A, C, and E, and advanced age-related macular degeneration. Eye Disease Case-Control Study Group." JAMA **272**(18): 1413-1420.

Seddon, J. M., J. Cote, N. Davis and B. Rosner (2003). "Progression of age-related macular degeneration: association with body mass index, waist circumference, and waist-hip ratio." Arch Ophthalmol **121**(6): 785-792.

Seddon, J. M., W. C. Willett, F. E. Speizer and S. E. Hankinson (1996). "A prospective study of cigarette smoking and age-related macular degeneration in women." JAMA **276**(14): 1141-1146.

Seetharam, L., N. Gotoh, Y. Maru, G. Neufeld, S. Yamaguchi and M. Shibuya (1995). "A unique signal transduction from FLT tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor VEGF." *Oncogene* **10**(1): 135-147.

Selbach, M., B. Schwanhaussner, N. Thierfelder, Z. Fang, R. Khanin and N. Rajewsky (2008). "Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs." *Nature* **455**(7209): 58-63.

Selth, L. A., S. L. Townley, A. G. Bert, P. D. Stricker, P. D. Sutherland, L. G. Horvath, G. J. Goodall, L. M. Butler and W. D. Tilley (2013). "Circulating microRNAs predict biochemical recurrence in prostate cancer patients." *Br J Cancer* **109**(3): 641-650.

Semenza, G. L. (1996). "Transcriptional regulation by hypoxia-inducible factor 1 molecular mechanisms of oxygen homeostasis." *Trends Cardiovasc Med* **6**(5): 151-157.

Semo, J., R. Sharir, A. Afek, C. Avivi, I. Barshack, S. Maysel-Auslender, Y. Krelin, D. Kain, M. Entin-Meer, G. Keren and J. George (2014). "The 106b approximately 25 microRNA cluster is essential for neovascularization after hindlimb ischaemia in mice." *Eur Heart J* **35**(45): 3212-3223.

Senger, D. R., S. J. Galli, A. M. Dvorak, C. A. Perruzzi, V. S. Harvey and H. F. Dvorak (1983). "Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid." *Science* **219**(4587): 983-985.

Serini, G., D. Valdembri, S. Zanivan, G. Morterra, C. Burkhardt, F. Caccavari, L. Zammataro, L. Primo, L. Tamagnone, M. Logan, M. Tessier-Lavigne, M. Taniguchi, A. W. Puschel and F. Bussolino (2003). "Class 3 semaphorins control vascular morphogenesis by inhibiting integrin function." *Nature* **424**(6947): 391-397.

Sethupathy, P., B. Corda and A. G. Hatzigeorgiou (2006). "TarBase: A comprehensive database of experimentally supported animal microRNA targets." *RNA* **12**(2): 192-197.

Sethupathy, P., M. Megraw and A. G. Hatzigeorgiou (2006). "A guide through present computational approaches for the identification of mammalian microRNA targets." *Nat Methods* **3**(11): 881-886.

Shahar, J., R. L. Avery, G. Heilweil, A. Barak, E. Zemel, G. P. Lewis, P. T. Johnson, S. K. Fisher, I. Perlman and A. Loewenstein (2006). "Electrophysiologic and retinal penetration studies following intravitreal injection of bevacizumab (Avastin)." *Retina* **26**(3): 262-269.

Shao, Z., M. Friedlander, C. Hurst, Z. Cui, D. Pei, L. Evans, A. Juan, H. Tahiri, H. Tahir, F. Duhamel, J. Chen, P. Sapienza, S. Chemtob, J.-S. Joyal and L. E. H. Smith (2013). "Choroid sprouting assay: an ex vivo model of microvascular angiogenesis." *PLoS ONE* **8**(7): e69552-e69552.

Sharma, K., N. K. Sharma and A. Anand (2014). "Why AMD is a disease of ageing and not of development: mechanisms and insights." *Front Aging Neurosci* **6**: 151.

Shaw, P. X., T. Stiles, C. Douglas, D. Ho, W. Fan, H. Du and X. Xiao (2016). "Oxidative stress, innate immunity, and age-related macular degeneration." *AIMS Mol Sci* **3**(2): 196-221.

Sheedy, F. J. and L. A. O'Neill (2008). "Adding fuel to fire: microRNAs as a new class of mediators of inflammation." *Ann Rheum Dis* **67** Suppl 3: iii50-55.

Shen, J., X. Yang, B. Xie, Y. Chen, M. Swaim, S. F. Hackett and P. A. Campochiaro (2008). "MicroRNAs regulate ocular neovascularization." *Mol Ther* **16**(7): 1208-1216.

Sheridan, C. M., S. Pate, P. Hiscott, D. Wong, D. M. Pattwell and D. Kent (2009). "Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and -2alpha in human choroidal neovascular membranes." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **247**(10): 1361-1367.

Shima, D. T., U. Deutsch and P. A. D'Amore (1995). "Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human epithelial cells is mediated by increases in mRNA stability." FEBS Lett **370**(3): 203-208.

Shima, D. T., M. Kuroki, U. Deutsch, Y. S. Ng, A. P. Adamis and P. A. D'Amore (1996). "The mouse gene for vascular endothelial growth factor. Genomic structure, definition of the transcriptional unit, and characterization of transcriptional and post-transcriptional regulatory sequences." J Biol Chem **271**(7): 3877-3883.

Shohet, J. M., M. J. Hicks, S. E. Plon, S. M. Burlingame, S. Stuart, S. Y. Chen, M. K. Brenner and J. G. Nuchtern (2002). "Minichromosome maintenance protein MCM7 is a direct target of the MYCN transcription factor in neuroblastoma." Cancer Res **62**(4): 1123-1128.

Shweiki, D., A. Itin, D. Soffer and E. Keshet (1992). "Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis." Nature **359**(6398): 843-845.

Smith, L. E., E. Wesolowski, A. McLellan, S. K. Kostyk, R. D'Amato, R. Sullivan and P. A. D'Amore (1994). "Oxygen-induced retinopathy in the mouse." Invest Ophthalmol Vis Sci **35**(1): 101-111.

Smith, W. and P. Mitchell (1998). "Family history and age-related maculopathy: the Blue Mountains Eye Study." Aust N Z J Ophthalmol **26**(3): 203-206.

Smith, W., P. Mitchell and S. R. Leeder (1996). "Smoking and age-related maculopathy. The Blue Mountains Eye Study." Arch Ophthalmol **114**(12): 1518-1523.

Sobrin, L. and J. M. Seddon (2013). "Nature and nurture- genes and environment- predict onset and progression of macular degeneration." Prog Retin Eye Res.

Sobrin, L. and J. M. Seddon (2014). "Nature and nurture- genes and environment- predict onset and progression of macular degeneration." Prog Retin Eye Res **40**: 1-15.

Soker, S., S. Takashima, H. Q. Miao, G. Neufeld and M. Klagsbrun (1998). "Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor." Cell **92**(6): 735-745.

Somanath, P. R., A. Ciocea and T. V. Byzova (2009). "Integrin and growth factor receptor alliance in angiogenesis." Cell Biochem Biophys **53**(2): 53-64.

Sparrow, J. R., Y. Wu, T. Nagasaki, K. D. Yoon, K. Yamamoto and J. Zhou (2010). "Fundus autofluorescence and the bisretinoids of retina." Photochem Photobiol Sci **9**(11): 1480-1489.

Spencer, K. L., L. M. Olson, N. Schnetz-Boutaud, P. Gallins, A. Agarwal, A. Iannaccone, S. B. Kritchevsky, M. Garcia, M. A. Nalls, A. B. Newman, W. K. Scott, M. A. Pericak-Vance and J. L. Haines (2011). "Using genetic variation and environmental risk factor data to identify individuals at high risk for age-related macular degeneration." PLoS One **6**(3): e17784.

Spraul, C. W. and H. E. Grossniklaus (1997). "Characteristics of Drusen and Bruch's membrane in postmortem eyes with age-related macular degeneration." Arch Ophthalmol **115**(2): 267-273.

Stahl, A., K. Connor, P. Sapiha, J. Chen, R. Dennison, N. Krah, M. Seaward, K. Willett, C. Aderman, K. Guerin, J. Hua, C. Löfqvist, A. Hellström and L. E. H. Smith (2010). "The mouse retina as an angiogenesis model." Investigative ophthalmology & visual science **51**(6): 2813-2826.

Stahl, A., K. M. Connor, P. Sapiha, K. L. Willett, N. M. Krah, R. J. Dennison, J. Chen, K. I. Guerin and L. E. H. Smith (2009). "Computer-aided quantification of retinal neovascularization." Angiogenesis **12**(3): 297-301.

Stark, A., J. Brennecke, N. Bushati, R. B. Russell and S. M. Cohen (2005). "Animal MicroRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3'UTR evolution." Cell **123**(6): 1133-1146.

Stevenson, W., C. M. Prospero Ponce, D. R. Agarwal, R. Gelman and J. B. Christoforidis (2016). "Epiretinal membrane: optical coherence tomography-based diagnosis and classification." Clin Ophthalmol **10**: 527-534.

Strauss, O. (2005). "The retinal pigment epithelium in visual function." Physiol Rev **85**(3): 845-881.

Suarez, Y., C. Fernandez-Hernando, J. S. Pober and W. C. Sessa (2007). "Dicer dependent microRNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells." Circ Res **100**(8): 1164-1173.

Suarez, Y., C. Fernandez-Hernando, J. Yu, S. A. Gerber, K. D. Harrison, J. S. Pober, M. L. Iruela-Arispe, M. Merkenschlager and W. C. Sessa (2008). "Dicer-dependent endothelial microRNAs are necessary for postnatal angiogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(37): 14082-14087.

Suner, I. J., D. G. Espinosa-Heidmann, M. E. Marin-Castano, E. P. Hernandez, S. Pereira-Simon and S. W. Cousins (2004). "Nicotine increases size and severity of experimental choroidal neovascularization." Invest Ophthalmol Vis Sci **45**(1): 311-317.

Swift, M. R. and B. M. Weinstein (2009). "Arterial-venous specification during development." Circ Res **104**(5): 576-588.

Szemraj, M., A. Bielecka-Kowalska, K. Oszejca, M. Krajewska, R. Gos, P. Jurowski, M. Kowalski and J. Szemraj (2015). "Serum MicroRNAs as Potential Biomarkers of AMD." Med Sci Monit **21**: 2734-2742.

Taganov, K. D., M. P. Boldin, K. J. Chang and D. Baltimore (2006). "NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(33): 12481-12486.

Takahashi, Y., M. Satoh, Y. Minami, T. Tabuchi, T. Itoh and M. Nakamura (2010). "Expression of miR-146a/b is associated with the Toll-like receptor 4 signal in coronary artery disease: effect of renin-angiotensin system blockade and statins on miRNA-146a/b and Toll-like receptor 4 levels." Clin Sci (Lond) **119**(9): 395-405.

Takeichi, M. (1991). "Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator." Science **251**(5000): 1451-1455.

Tamakoshi, A., M. Yuzawa, M. Matsui, M. Uyama, N. K. Fujiwara and Y. Ohno (1997). "Smoking and neovascular form of age related macular degeneration in late middle aged males: findings from a case-control study in Japan. Research Committee on Chorioretinal Degenerations." Br J Ophthalmol **81**(10): 901-904.

Tessler, S., P. Rockwell, D. Hicklin, T. Cohen, B. Z. Levi, L. Witte, I. R. Lemischka and G. Neufeld (1994). "Heparin modulates the interaction of VEGF165 with soluble and cell associated flk-1 receptors." J Biol Chem **269**(17): 12456-12461.

Thomas, C. E., A. Ehrhardt and M. A. Kay (2003). "Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy." Nat Rev Genet **4**(5): 346-358.

Thornton, J., R. Edwards, P. Mitchell, R. A. Harrison, I. Buchan and S. P. Kelly (2005). "Smoking and age-related macular degeneration: a review of association." Eye (Lond) **19**(9): 935-944.

Tischer, E., R. Mitchell, T. Hartman, M. Silva, D. Gospodarowicz, J. C. Fiddes and J. A. Abraham (1991). "The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing." J Biol Chem **266**(18): 11947-11954.

Tolentino, M. J., A. J. Brucker, J. Fosnot, G. S. Ying, I. H. Wu, G. Malik, S. Wan and S. J. Reich (2004). "Intravitreal injection of vascular endothelial growth factor small interfering RNA

inhibits growth and leakage in a nonhuman primate, laser-induced model of choroidal neovascularization." *Retina* **24**(4): 660.

Towler, B. P., C. I. Jones and S. F. Newbury (2015). "Mechanisms of regulation of mature miRNAs." *Biochem Soc Trans* **43**(6): 1208-1214.

Truettner, J. S., K. Hu, C. L. Liu, W. D. Dietrich and B. Hu (2009). "Subcellular stress response and induction of molecular chaperones and folding proteins after transient global ischemia in rats." *Brain Res* **1249**: 9-18.

Tsang, J. S., M. S. Ebert and A. van Oudenaarden (2010). "Genome-wide dissection of microRNA functions and cotargeting networks using gene set signatures." *Mol Cell* **38**(1): 140-153.

Tuder, R. M., B. E. Flook and N. F. Voelkel (1995). "Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk and Flt in lungs exposed to acute or to chronic hypoxia. Modulation of gene expression by nitric oxide." *J Clin Invest* **95**(4): 1798-1807.

Upton, J. P., L. Wang, D. Han, E. S. Wang, N. E. Huskey, L. Lim, M. Truitt, M. T. McManus, D. Ruggero, A. Goga, F. R. Papa and S. A. Oakes (2012). "IRE1 alpha cleaves select microRNAs during ER stress to derepress translation of proapoptotic Caspase-2." *Science* **338**(6108): 818-822.

Usui, Y., P. D. Westenskow, S. Murinello, M. I. Dorrell, L. Schepke, F. Bucher, S. Sakimoto, L. P. Paris, E. Aguilar and M. Friedlander (2015). "Angiogenesis and Eye Disease." *Annu Rev Vis Sci* **1**: 155-184.

Valadi, H., K. Ekstrom, A. Bossios, M. Sjostrand, J. J. Lee and J. O. Lotvall (2007). "Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells." *Nat Cell Biol* **9**(6): 654-659.

Vasudevan, S., Y. Tong and J. A. Steitz (2007). "Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation." *Science* **318**(5858): 1931-1934.

Ventura, A., A. G. Young, M. M. Winslow, L. Lintault, A. Meissner, S. J. Erkeland, J. Newman, R. T. Bronson, D. Crowley, J. R. Stone, R. Jaenisch, P. A. Sharp and T. Jacks (2008). "Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters." *Cell* **132**(5): 875-886.

Vickers, K. C., B. T. Palmisano, B. M. Shoucri, R. D. Shamburek and A. T. Remaley (2011). "MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins." *Nat Cell Biol* **13**(4): 423-433.

Vingerling, J. R., A. Hofman, D. E. Grobbee and P. T. de Jong (1996). "Age-related macular degeneration and smoking. The Rotterdam Study." *Arch Ophthalmol* **114**(10): 1193-1196.

Vroman, R., L. J. Klaassen and M. Kamermans (2013). "Ephaptic communication in the vertebrate retina." *Front Hum Neurosci* **7**: 612.

Wagner, O. F., G. Christ, J. Wojta, H. Vierhapper, S. Parzer, P. J. Nowotny, B. Schneider, W. Waldhausl and B. R. Binder (1992). "Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells." *J Biol Chem* **267**(23): 16066-16068.

Wallman, J., C. Wildsoet, A. Xu, M. D. Gottlieb, D. L. Nickla, L. Marran, W. Krebs and A. M. Christensen (1995). "Moving the retina: choroidal modulation of refractive state." *Vision Res* **35**(1): 37-50.

Wang, J. and Q. Cui (2012). "Specific Roles of MicroRNAs in Their Interactions with Environmental Factors." *J Nucleic Acids* **2012**: 978384.

Wang, K., Y. Yuan, J. H. Cho, S. McClarty, D. Baxter and D. J. Galas (2012). "Comparing the MicroRNA spectrum between serum and plasma." *PLoS One* **7**(7): e41561.

Wang, K., S. Zhang, J. Weber, D. Baxter and D. J. Galas (2010). "Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells." *Nucleic Acids Res* **38**(20): 7248-7259.

Wang, S., A. B. Aurora, B. A. Johnson, X. Qi, J. McAnally, J. A. Hill, J. A. Richardson, R. Bassel-Duby and E. N. Olson (2008). "The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis." *Dev Cell* **15**(2): 261-271.

Wang, T., H. Yin, J. Wang, Z. Li, H. Wei, Z. Liu, Z. Wu, W. Yan, T. Liu, D. Song, X. Yang, Q. Huang, W. Zhou and J. Xiao (2015). "MicroRNA-106b inhibits osteoclastogenesis and osteolysis by targeting RANKL in giant cell tumor of bone." *Oncotarget* **6**(22): 18980-18996.

Weber, J. A., D. H. Baxter, S. Zhang, D. Y. Huang, K. H. Huang, M. J. Lee, D. J. Galas and K. Wang (2010). "The microRNA spectrum in 12 body fluids." *Clin Chem* **56**(11): 1733-1741.

Wei, J., J. Wang, Y. Zhou, S. Yan, K. Li and H. Lin (2016). "MicroRNA-146a Contributes to SCI Recovery via Regulating TRAF6 and IRAK1 Expression." *Biomed Res Int* **2016**: 4013487.

Wightman, B., I. Ha and G. Ruvkun (1993). "Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*." *Cell* **75**(5): 855-862.

Williams, C. D. and L. J. Rizzolo (1997). "Remodeling of junctional complexes during the development of the outer blood-retinal barrier." *Anat Rec* **249**(3): 380-388.

Wong-Riley, M. T. (2010). "Energy metabolism of the visual system." *Eye Brain* **2**: 99-116.

Wong, T. Y., U. Chakravarthy, R. Klein, P. Mitchell, G. Zlateva, R. Buggage, K. Fahrback, C. Probst and I. Sledge (2008). "The natural history and prognosis of neovascular age-related macular degeneration: a systematic review of the literature and meta-analysis." *Ophthalmology* **115**(1): 116-126.

Wu, Y., A. Huang, T. Li, X. Su, H. Ding, H. Li, X. Qin, L. Hou, Q. Zhao, X. Ge, T. Fang, R. Wang, C. Gao, J. Li and N. Shao (2014). "MiR-152 reduces human umbilical vein endothelial cell proliferation and migration by targeting ADAM17." *FEBS Lett* **588**(12): 2063-2069.

Xu, G., J. Chen, G. Jing, T. B. Grayson and A. Shalev (2016). "miR-204 Targets PERK and Regulates UPR Signaling and beta-Cell Apoptosis." *Mol Endocrinol* **30**(8): 917-924.

Xu, Q., Y. Jiang, Y. Yin, Q. Li, J. He, Y. Jing, Y. T. Qi, Q. Xu, W. Li, B. Lu, S. S. Peiper, B. H. Jiang and L. Z. Liu (2013). "A regulatory circuit of miR-148a/152 and DNMT1 in modulating cell transformation and tumor angiogenesis through IGF-IR and IRS1." *J Mol Cell Biol* **5**(1): 3-13.

Yamamoto, K., K. Takahara, S. Oyadomari, T. Okada, T. Sato, A. Harada and K. Mori (2010). "Induction of liver steatosis and lipid droplet formation in ATF6alpha-knockout mice burdened with pharmacological endoplasmic reticulum stress." *Mol Biol Cell* **21**(17): 2975-2986.

Yan, L., S. Lee, D. R. Lazzaro, J. Aranda, M. B. Grant and B. Chaqour (2015). "Single and Compound Knock-outs of MicroRNA (miRNA)-155 and Its Angiogenic Gene Target CCN1 in Mice Alter Vascular and Neovascular Growth in the Retina via Resident Microglia." *J Biol Chem* **290**(38): 23264-23281.

Yannuzzi, L. A., M. D. Ober, J. S. Slakter, R. F. Spaide, Y. L. Fisher, R. W. Flower and R. Rosen (2004). "Ophthalmic fundus imaging: today and beyond." *Am J Ophthalmol* **137**(3): 511-524.

Yano, K., L. F. Brown and M. Detmar (2001). "Control of hair growth and follicle size by VEGF-mediated angiogenesis." *J Clin Invest* **107**(4): 409-417.

Yazdani, U. and J. R. Terman (2006). "The semaphorins." *Genome Biol* **7**(3): 211.

Yekta, S., I. H. Shih and D. P. Bartel (2004). "MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA." *Science* **304**(5670): 594-596.

- Yoshida, H., T. Matsui, A. Yamamoto, T. Okada and K. Mori (2001). "XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor." *Cell* **107**(7): 881-891.
- Zeeshan, H. M., G. H. Lee, H. R. Kim and H. J. Chae (2016). "Endoplasmic Reticulum Stress and Associated ROS." *Int J Mol Sci* **17**(3): 327.
- Zeiss, C. J. (2010). "Animals as models of age-related macular degeneration: an imperfect measure of the truth." *Vet Pathol* **47**(3): 396-413.
- Zhang, B., X. Pan, G. P. Cobb and T. A. Anderson (2007). "microRNAs as oncogenes and tumor suppressors." *Dev Biol* **302**(1): 1-12.
- Zhang, Y., D. Liu, X. Chen, J. Li, L. Li, Z. Bian, F. Sun, J. Lu, Y. Yin, X. Cai, Q. Sun, K. Wang, Y. Ba, Q. Wang, D. Wang, J. Yang, P. Liu, T. Xu, Q. Yan, J. Zhang, K. Zen and C. Y. Zhang (2010). "Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration." *Mol Cell* **39**(1): 133-144.
- Zhang, Z., Y. W. Qin, G. Brewer and Q. Jing (2012). "MicroRNA degradation and turnover: regulating the regulators." *Wiley Interdiscip Rev RNA* **3**(4): 593-600.
- Zhao, M., Y. Bai, W. Xie, X. Shi, F. Li, F. Yang, Y. Sun, L. Huang and X. Li (2015). "Interleukin-1beta Level Is Increased in Vitreous of Patients with Neovascular Age-Related Macular Degeneration (nAMD) and Polypoidal Choroidal Vasculopathy (PCV)." *PLoS One* **10**(5): e0125150.
- Zhou, X., J. Ruan, G. Wang and W. Zhang (2007). "Characterization and identification of microRNA core promoters in four model species." *PLoS Comput Biol* **3**(3): e37.
- Zhu, C., J. Li, Q. Ding, G. Cheng, H. Zhou, L. Tao, H. Cai, P. Li, Q. Cao, X. Ju, X. Meng, C. Qin, L. Hua, P. Shao and C. Yin (2013). "miR-152 controls migration and invasive potential by targeting TGFalpha in prostate cancer cell lines." *Prostate* **73**(10): 1082-1089.
- Zidar, N., E. Bostjancic, D. Glavac and D. Stajer (2011). "MicroRNAs, innate immunity and ventricular rupture in human myocardial infarction." *Dis Markers* **31**(5): 259-265.

## **Annexe 1: Cell Met. 2013**

**Neuron-derived semaphorin 3A is an early inducer of vascular permeability in diabetic retinopathy via neuropilin-1.**

Contribution égale des auteurs: Cerani A., Tétreault N., Ménard C.



# Neuron-Derived Semaphorin 3A Is an Early Inducer of Vascular Permeability in Diabetic Retinopathy via Neuropilin-1

Agustin Cerani,<sup>1,2,4</sup> Nicolas Tetreault,<sup>2,3,4</sup> Catherine Menard,<sup>2,4</sup> Eric Lapalme,<sup>1</sup> Chintan Patel,<sup>1</sup> Nicholas Sitaras,<sup>1</sup> Felix Beaudoin,<sup>2</sup> Dominique Leboeuf,<sup>2</sup> Vincent De Guire,<sup>2</sup> François Binet,<sup>1</sup> Agnieszka Dejda,<sup>2</sup> Flavio A. Rezende,<sup>1</sup> Khalil Miloudi,<sup>3</sup> and Przemyslaw Sapieha<sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Centre, University of Montreal, Montreal, QC H1T 2M4, Canada

<sup>2</sup>Department of Biochemistry, Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Centre, University of Montreal, Montreal, QC H1T 2M4, Canada

<sup>3</sup>Department of Neurology-Neurosurgery, McGill University, Montreal, QC H3A 2B4, Canada

<sup>4</sup>These authors contributed equally to this work

\*Correspondence: [mike.sapieha@umontreal.ca](mailto:mike.sapieha@umontreal.ca)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2013.09.003>

## SUMMARY

The deterioration of the inner blood-retinal barrier and consequent macular edema is a cardinal manifestation of diabetic retinopathy (DR) and the clinical feature most closely associated with loss of sight. We provide evidence from both human and animal studies for the critical role of the classical neuronal guidance cue, semaphorin 3A, in instigating pathological vascular permeability in diabetic retinas via its cognate receptor neuropilin-1. We reveal that semaphorin 3A is induced in early hyperglycemic phases of diabetes within the neuronal retina and precipitates initial breakdown of endothelial barrier function. We demonstrate, by a series of orthogonal approaches, that neutralization of semaphorin 3A efficiently prevents diabetes-induced retinal vascular leakage in a stage of the disease when vascular endothelial growth factor neutralization is inefficient. These observations were corroborated in  $Tg^{Cre-Esr1}/Nrp1^{flox/flox}$  conditional knockout mice. Our findings identify a therapeutic target for macular edema and provide further evidence for neurovascular crosstalk in the pathogenesis of DR.

## INTRODUCTION

Diabetic retinopathy (DR) is the most prominent complication of diabetes and the leading cause of blindness in working-age individuals (Kempner et al., 2004). It is characterized by an initial microvascular degeneration followed by a compensatory but pathological hypervascularization mounted by the hypoxic retina in an attempt to reinstate metabolic equilibrium (Cheung and Wong, 2008; Sapieha, 2012). Although often initially asymptomatic, loss of sight is provoked primarily by diabetic macular edema (DME), vitreous hemorrhages, and in advanced cases, preretinal neovascularization and tractional retinal detachment (Antonetti et al., 2012; Wang et al., 2012). Of these, DME is the most common cause of central vision loss in diabetics, affecting

over 25% of patients suffering from diabetes (Moss et al., 1998). It is triggered secondary to the deterioration of the blood-retinal barrier (BRB) and the consequent increase in extravasation of fluids and plasma components into the vitreous cavity. Ultimately, the decrease in retinal vascular barrier function leads to vasogenic edema and pathological retinal thickening.

Although significant effort has been invested in elucidating the mechanisms that govern destructive preretinal neovascularization in DR (Silva et al., 2010; Stahl et al., 2010; Wang et al., 2012), considerably less is known about the cellular processes that lead to increased retinal vascular permeability. Moreover, current standards of care present non-negligible side effects. These include increased cataract formation and a harmful rise in intraocular pressure with intravitreal use of corticosteroid (Silva et al., 2010). Similarly, anti-VEGF (vascular endothelial growth factor) therapies, which in general exhibit respectable safety profiles, may be associated with increased thromboembolic events (Stewart, 2012), possible neuronal toxicity (Foxton et al., 2013; Robinson et al., 2001; Saint-Geniez et al., 2008), and geographic atrophy (Martin et al., 2011; 2012) when used as frequent long-term regimens. Moreover, the first and most widely used form of treatment is panretinal photocoagulation, for either proliferative diabetic retinopathy (PDR) or grid/focal laser for DME. Laser-based photocoagulation approaches destroy hypoxic retinal tissue secreting proangiogenic factors and inadvertently lead to reduced visual field or central or para-central scotomas. These therapeutic limitations highlight the need for novel pharmacological interventions.

Current investigations into the molecular mechanisms that cause DME have largely focused on VEGF. This may be attributed in part to the fact that the prominent clinical features of DR have led to the general inference that it is entirely of a microvascular nature. Yet, evidence points to early changes in the neural retina (Kern and Engerman, 1996; Barber et al., 1998; 2005; Gastinger et al., 2008). While there is irrefutable evidence for a neurovascular link in the progression of DR (Antonetti et al., 2012), neurovascular crosstalk has received limited attention in the context of DR pathogenesis. Consistent with a breakdown in neurovascular crosstalk in ischemic retinopathies, we have recently shown that semaphorin 3A (SEMA3A), a classic neuronal guidance cue that also affects endothelial cell behavior, is produced by stressed retinal ganglion cells (RGCs) and

partakes in deviating neovessels toward physiologically avascular regions of the eye (Joyal et al., 2011).

In neurons, binding of SEMA3A to its cognate receptor neuropilin-1 (NRP1) provokes cytoskeletal collapse via plexins (Takahashi et al., 1999); the transduction mechanism in endothelial cells remains ill defined (Gelfand et al., 2009). Neuropilin-1 has the particular ability to bind two structurally dissimilar ligands via distinct sites on its extracellular domain (Gluzman-Poltorak et al., 2001; Lee et al., 2002; Mamluk et al., 2002). It binds SEMA3A (Klagsbrun and Eichmann, 2005; Miao et al., 1999), provoking cytoskeletal collapse and VEGF<sub>165</sub> (Gluzman-Poltorak et al., 2001; Klagsbrun and Eichmann, 2005; Klagsbrun et al., 2002; Mamluk et al., 2002), enhancing binding to VEGFR2, and thus increasing its angiogenic potential (Soker et al., 2002). Crystallographic evidence revealed that VEGF<sub>165</sub> and Sema3A do not directly compete for Nrp1, but rather can simultaneously bind to Nrp1 at distinct, nonoverlapping sites (Appleton et al., 2007). Moreover, genetic studies show that NRP1 distinctly regulates the effects of VEGF and SEMA3A on neuronal and vascular development (Vieira et al., 2007). Notably, it was proposed that, similar to VEGF, Sema3A may itself promote vascular permeability (Acevedo et al., 2008); this is a counterintuitive observation, given the divergent biological roles of VEGF and Sema3A. However, the role of Sema3A in mediating the breakdown of barrier function, such as that observed in diabetic retinopathy, has not been explored to date.

Here we provide evidence for the role of a neuron-derived guidance cue (Sema3A) in disrupting retinal barrier function in diabetic retinopathy. We demonstrate in both human patients and animal models that ocular Sema3A is robustly induced in the early stages of diabetes and mediates, via NRP1, the breakdown of the inner BRB. Neutralizing Sema3A may represent an attractive alternative therapeutic strategy to counter pathologic vascular permeability in DR.

## RESULTS

### Sema3A Is Elevated in the Vitreous of Human Patients Suffering from Diabetic Retinopathy

In order to evaluate the potential role of Sema3A in mediating the edematous phenotype observed in DR, we first sought to determine the presence of this guidance cue in the vitreous of patients suffering from DME. Vitreous was recovered during standard vitreoretinal surgery from 21 patients. Ten samples were obtained from patients suffering from DME and 11 from control patients (nonvascular pathology) undergoing surgery for macular hole (MH) or epiretinal membrane (ERM) (Table 1). Spectral-domain optical coherence tomography (SD-OCT) was performed, and three-dimensional (3D) retinal maps were generated to evaluate the extent of retinal damage and edema. In contrast to controls, sampled DME patients showed significant retinal swelling, specifically in the macular and perimacular zones (Figures 1A–1D).

Consistent with a prospective role in DME, ELISA-based detection of Sema3A revealed a significant increase in the vitreous of patients suffering from DME when compared to nonvascular ocular pathologies (control median 3.79 ng/ml [interquartile range {IQR}: 25%, 75%: 2.08 ng/ml, 5.58 ng/ml]; DME median 16.27 ng/ml [IQR: 25%, 75%: 5.770 ng/ml, 35.36 ng/ml];  $p = 0.0464$ ) (Figure 1E). Western blot analysis of vitreous from

**Table 1. Characteristics of Patients Having Undergone Vitreous Biopsy**

Sample	Age (Years)	Db Type	Duration (Years)	Retinopathy	Analysis
C1	65	NA	NA	ERM	WB/ELISA
C2	74	NA	NA	MH	WB/ELISA
C3	63	NA	NA	MH	WB
C4	71	NA	NA	MER	WB
C5	78	NA	NA	other	WB
C6	59	NA	NA	MH	ELISA
C7	52	NA	NA	MH	ELISA
C8	59	NA	NA	MH	ELISA
C9	69	NA	NA	ERM	ELISA
C10	54	NA	NA	ERM	ELISA
C11	68	NA	NA	ERM	ELISA
DME1	74	2	2	DME	WB/ELISA
DME2	75	2	10	DME	WB/ELISA
DME3	69	2	20	DME	WB/ELISA
DME4	49	2	3	DME	WB/ELISA
DME5	74	2	15	DME	WB/ELISA
DME6	76	2	30	DME	WB/ELISA
DME7	81	2	–	DME	WB/ELISA
DME8	74	2	15	DME	WB
DME9	62	2	22	DME	ELISA
DME10	63	2	23	DME	ELISA

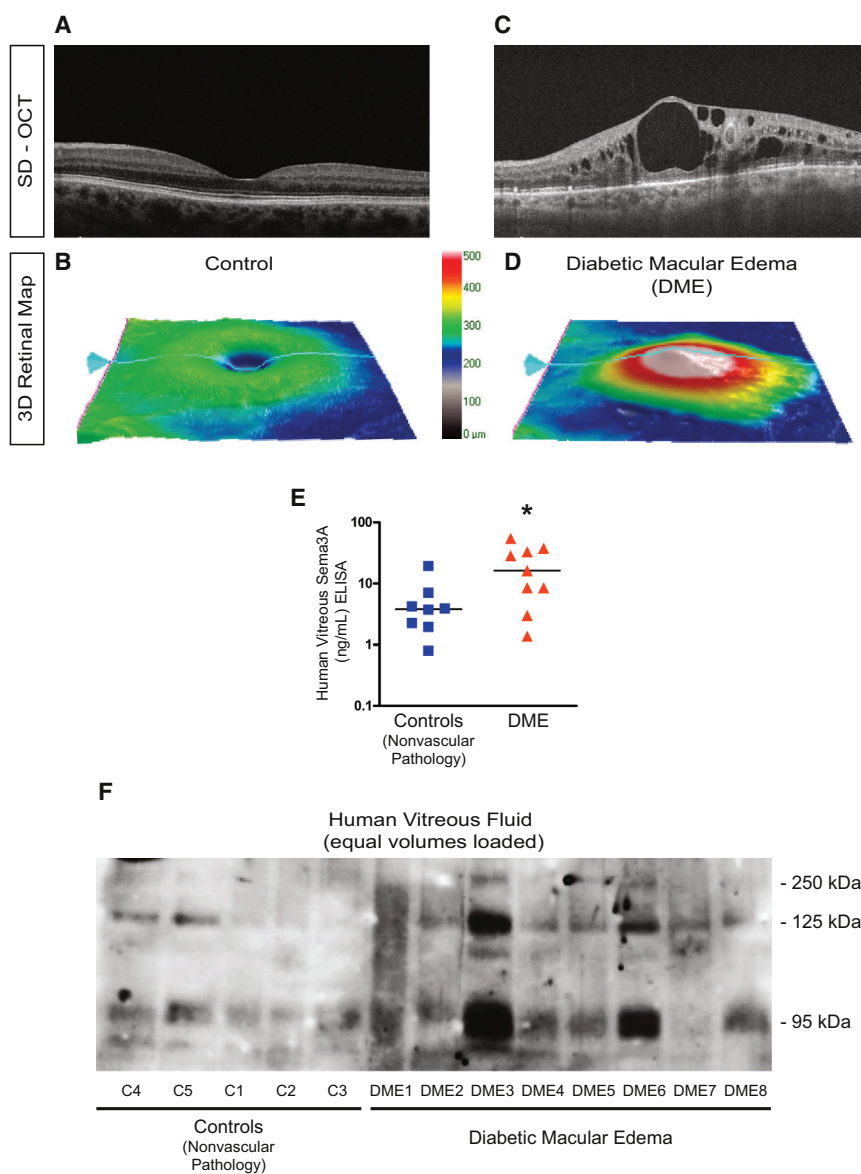
Demographics of patients selected for vitreous biopsy. Vitreous samples were obtained from 11 controls (nonvascular pathology) and 10 DME patients and analyzed by western blot and ELISA. C, control (nonvascular pathology); Db, diabetes; DME, diabetic macular edema; ERM, epiretinal membrane; MH, macular hole; NA, not applicable; WB, western blot.

patients corroborated data obtained by ELISA and revealed that Sema3A (~125 kDa and ~95kDa) (Klebanov et al., 2009; Koppel and Raper, 1998) was robustly induced in most patients affected by DME (Figure 1F). Specificity of the  $\alpha$ -Sema3A antibody employed was verified by shRNA-mediated knockdown of *Sema3A* in human cells expressing high levels of endogenous Sema3A (HeLa) and by immunoblotting serially diluted recombinant Sema3A protein (Figure S1 available online). Detailed patient characteristics are presented in Table 1. These data on human subjects provide the rationale to explore the role of Sema3A in the context of diabetes-induced BRB breakdown.

### Neuronal SEMA3A Is Upregulated in the Early Phases of Streptozotocin-Induced Diabetes

Given the elevated levels of Sema3A in the vitreous of DME patients, we sought to elucidate the dynamics and pattern of *Sema3A* expression in a mouse model of type 1 diabetes mellitus (T1DM). Streptozotocin (STZ) was administered over 5 consecutive days to ~6-week-old C57BL/6J mice, and glycemia was monitored according to the scheme depicted in Figure 2A (modified from Xu et al., 2001). Mice were considered diabetic if their nonfasted glycemia was higher than 17 mM (300 mg/dl).

As early as 4 weeks after induction of diabetes, retinal levels of Sema3A were over 2-fold higher in STZ-treated mice when compared to vehicle-injected controls, while VEGF levels



**Figure 1. Sema3A Is Elevated in the Vitreous of Human Diabetic Patients Suffering from Diabetic Retinopathy**

(A and B) Spectral domain optical coherence tomography (SD-OCT) (A) and 3D retinal maps from healthy eyes (B).

(C and D) In patients suffering from DME, significant retinal swelling (C) mostly in the macular and perimacular zones was noted (D).

(E) ELISA of vitreous humor for Sema3A from control patients with nonvascular pathology and patients suffering from DME. Horizontal lines represent medians for each group.

(F) Western blot analysis of equal volumes of vitreous humor revealed a pronounced induction of Sema3A (~125 kDa and 95 kDa) in a number of patients suffering from DME. See Figure S1 for antibody specificity.

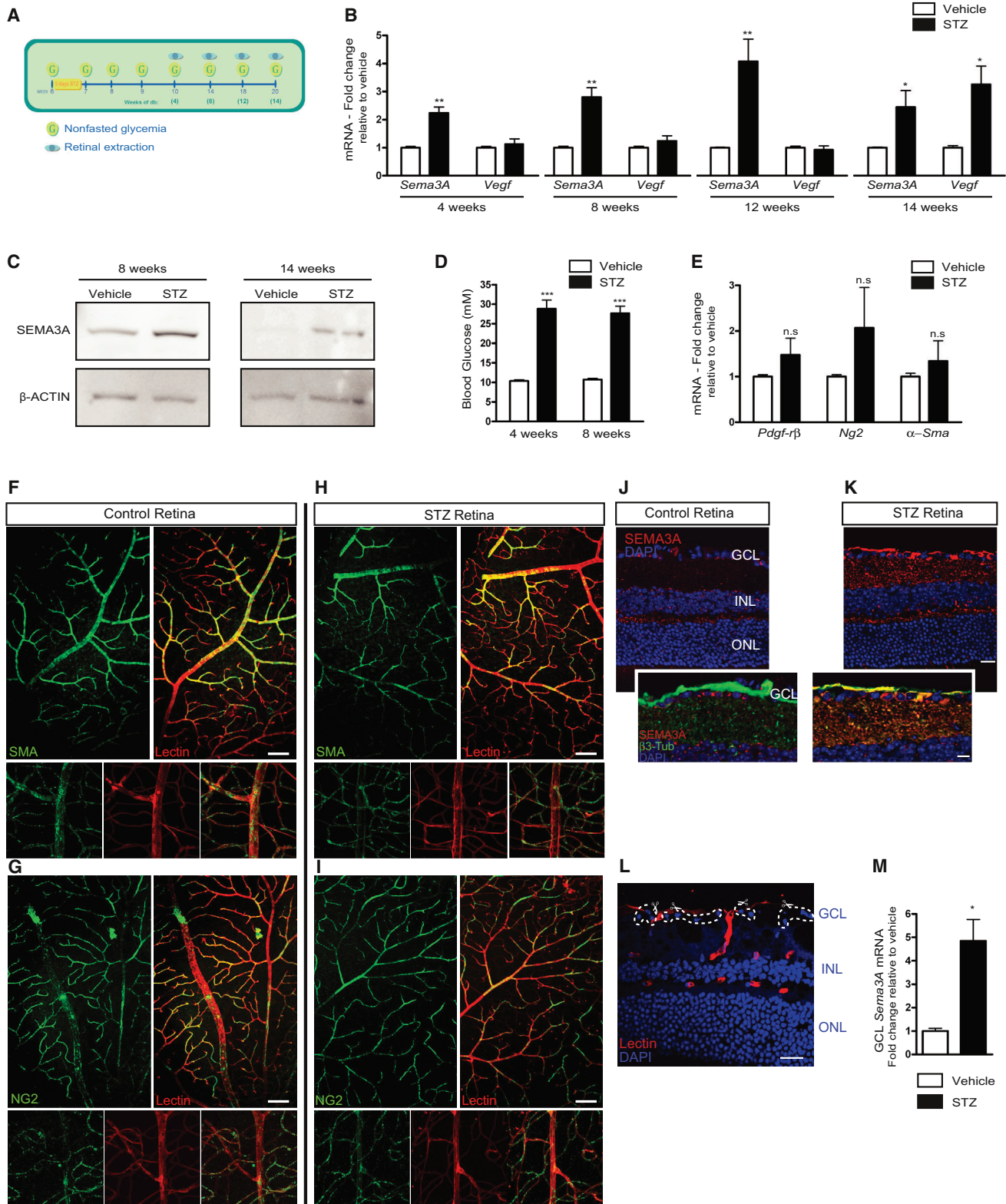
and 8 weeks of diabetes (citrate,  $10.72 \pm 0.3030$ ; STZ,  $27.70 \pm 1.780$ ;  $p < 0.0001$ ,  $n = 11$ ) (Figure 2D). To corroborate that the observed rise in retinal SEMA3A was provoked by the diabetic state of mice and not STZ toxicity, we investigated retinal *Sema3A* expression in leptin-receptor-deficient (*db/db*) mice, which are a model of type 2 diabetes mellitus (Sapieha et al., 2012). At 24 weeks of life, *db/db* mice showed a 2.5-fold increase in levels of retinal *Sema3A* mRNA when compared to heterozygous *db/+* controls ( $2.5 \pm 0.05$ ;  $p = 0.0013$ ,  $n = 3$ ). These data suggest that *Sema3A* was induced as a consequence of diabetes and not off-target effects of STZ (Figure S2).

Importantly, the rise in *Sema3A* expression was an early event in pathogenesis, as it preceded pericyte loss, because

both STZ- and vehicle-treated mice showed no significant difference in transcript levels for pericyte markers platelet-derived growth factor receptor- $\beta$  (*Pdgfr- $\beta$* ;  $1.477 \pm 0.364$ ;  $p = 0.219$ ,  $n = 11$ ), NG2 proteoglycan (*Ng2*;  $2.065 \pm 0.886$ ;  $p = 0.316$ ,  $n = 4$ ), or alpha smooth muscle actin ( $\alpha$ -*Sma*;  $1.342 \pm 0.441$ ;  $p = 0.494$ ,  $n = 4$ ) (Figure 2E). Similarly, immunofluorescence on retinal flatmounts from control and STZ animals confirmed similar vascular coverage by NG2 and SMA-expressing pericytes (Figures 2F–2I).

We next investigated the cellular localization of SEMA3A in the diabetic mouse retina. Immunofluorescence on retinal cryosections revealed that SEMA3A was strongly expressed by retinal neurons of the ganglion cell layer (GCL) (Figures 2J and 2K). Colocalization with the RGC marker  $\beta$ III-tubulin confirmed that SEMA3A localized to retinal ganglion cells (RGCs) within the diabetic retina (Figure 2K, inset). Consistent with this retinal immunolocalization, laser-capture microdissection of the retinal

remained unchanged (mean fold increase over control  $\pm$  SEM: *Sema3A*,  $2.234 \pm 0.214$ ;  $p = 0.0045$ ; *Vegf*,  $1.123 \pm 0.192$ ;  $p = 0.559$ ,  $n = 5$ ) (Figure 2B). Significantly higher retinal levels of *Sema3A* persisted at 8 weeks (*Sema3A*,  $2.80 \pm 0.340$ ;  $p = 0.0011$ ; *Vegf*,  $1.236 \pm 0.193$ ;  $p = 0.266$ ,  $n = 8$ ), 12 weeks (*Sema3A*,  $4.07 \pm 0.798$ ;  $p = 0.00846$ ; *Vegf*,  $0.923 \pm 0.145$ ;  $p = 0.612$ ,  $n = 4$ ), and 14 weeks (*Sema3A*,  $2.44 \pm 0.593$ ;  $p = 0.0334$ ; *Vegf*,  $3.26 \pm 0.65$ ;  $p = 0.0253$ ,  $n = 3$ ). Importantly, throughout the early time points of diabetes, VEGF levels in STZ-treated mice remained at similar levels to that observed in vehicle-treated littermates, as has been previously described (Mima et al., 2012), and only started to increase at 14 weeks. The rise in retinal SEMA3A in diabetic mice was confirmed by western blotting at 8 and 14 weeks (Figure 2C). As expected, at all analyzed time points, STZ-treated mice showed pathologically elevated blood glucose levels of  $\sim 30$  mM for both 4 weeks (citrate,  $10.36 \pm 0.2935$ ; STZ,  $28.81 \pm 2.204$ ;  $p < 0.0001$ ,  $n = 7$ )



**Figure 2. Neuronal Sema3A Is Upregulated in the Early Phases of Streptozotocin-Induced Diabetes**

(A) Streptozotocin (STZ) was administered to ~6-week-old C57BL/6J mice, and glycemia was monitored according to scheme; a mouse with nonfasted glycemia higher than 17 mM (300 mg/dl) was considered diabetic.

(legend continued on next page)

## Cell Metabolism

## Sema3A Induces Vascular Permeability in Diabetes

ganglion cell layer from normal and diabetic mice followed by quantitative RT-PCR revealed an ~5-fold increase of *Sema3A* transcript in RGCs from STZ retinas when compared to age-matched nondiabetic controls ( $4.848 \pm 0.9178$ ;  $p = 0.014$ ,  $n = 3$ ) (Figures 2L and 2M). These data provide evidence for the local production of SEMA3A by diabetic neurons in close proximity to the retinal vascular plexus and agree with a role for SEMA3A in mediating the vascular phenotype associated with DME and PDR.

## Retinal Barrier Function Is Compromised by SEMA3A

Given the increase in levels of retinal Sema3A observed in the vitreous samples of patients with DME and SEMA3A in mouse retinas in the early stages of diabetes (Figure 2), we proceeded to investigate the propensity of Sema3A to disrupt vascular barrier function. We tested concentrations of Sema3A detected in the vitreous of patients with DME (Figure 1). Because we are assessing acute retinal vascular permeability at 24 hr postinjection and not a protracted effect as would be expected in actual human DME, the tested concentrations of Sema3A were ascending from the pathophysiological levels detected in Figure 1. Retinal vascular permeability was determined by Evans blue (EB) permeation after a single intravitreal injection of Sema3A into adult mouse eyes. Vascular leakage augmented step-wise with increasing concentrations of Sema3A. The increase in vascular leakage reached significance at 25 ng/ml of Sema3A and rose thereafter (mean fold increase over vehicle control  $\pm$  SEM: 25 ng/ml,  $1.302 \pm 0.005$ ;  $p = 0.0003$ ; 50 ng/ml,  $1.648 \pm 0.059$ ;  $p = 0.0082$ ; 100 ng/ml,  $2.21 \pm 0.140$ ;  $p = 0.0131$ ; 200 ng/ml,  $2.57 \pm 0.0967$ ;  $p = 0.0038$ ) (Figure 3A). Concordantly, wet weights of retinas were measured directly upon removing the retina from the eyecup and increased with higher concentrations of intravitreal Sema3A (Figure S3). In order to compare the magnitude of Sema3A-induced retinal vascular permeability with that of VEGF, we scaled the doses to concentrations of VEGF previously reported to induce vascular permeability in murine models (Acevedo et al., 2008) and corrected for molarity. A single intravitreal injection of VEGF<sub>165</sub> (50 ng/ $\mu$ l) induced a similar magnitude of permeability ( $1.801 \pm 0.0934$ ;  $p < 0.01$ ) as Sema3A (100 ng/ $\mu$ l;  $2.136 \pm 0.392$ ;  $p < 0.05$ ) or a combination of both Sema3A and VEGF ( $2.258 \pm 0.411$ ;  $p < 0.05$ ) (Figure 3B). Notably, the scaled doses provoked an increase in retinal vascular permeability similar to those of lower concentration

(Figure 3A), suggesting a maximal response of Sema3A-induced retinal permeability at lower concentrations. Each dose in Figures 2A and 2B was tested in three distinct experiments with a total of nine mice each.

The propensity of Sema3A to induce vascular leakage was corroborated by confocal imaging of retinal sagittal sections where increased EB permeation (red) throughout the retina signifies elevated plasma albumin extravasation and translates into increased retinal edema (Figure 3C). Notably, with an intravitreal injection of Sema3A, compromised barrier function was also noted in choroidal vessels in addition to retinal vessels. While the mouse retina does not have a macula proper, the observed Sema3A-mediated retinal plasma extravasation taken with the elevated vitreal levels of Sema3A in human patients (Figure 1) are suggestive of a role in mediating loss of barrier function in DME.

Further evidence for the ability of Sema3A to compromise endothelial barrier function was obtained from real-time analysis of transendothelial electric resistance (Murakami et al., 2008) (Figures 3D and 3E). Treatment of an intact monolayer of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) with Sema3A reduced endothelial monolayer impedance (measured from an interval between 3.26 hr and 6 hr;  $0.048 > p > 0.009$ ;  $n = 3$ ) and hence provoked a drop in barrier function in the first 6 hr by a magnitude similar to, yet lower than, VEGF (measured from an interval between 1.12 hr and 6 hr;  $0.045 > p > 0.001$ ;  $n = 4$ ) (Figure 3D).

We next proceeded to determine if Sema3A activated classical signaling pathways that have reported roles in promoting vascular permeability. In this respect, we investigated (by western blot analysis) the activation profiles of Src and focal adhesion kinase (FAK) that are known to transduce extracellular signals that provoke the loosening of endothelial cell junctions (Acevedo et al., 2008; Eliceiri et al., 1999; Schepke et al., 2008) (Figure 3F). Stimulation of human retinal microvascular endothelial cells (HRMECs) by either Sema3A (100 ng/ml) or VEGF (50 ng/ml) lead to robust phosphorylation of Src at Tyr416 in the activation loop of the kinase domain, which is reported to enhance enzyme activity (Hunter, 1987) (Figure 3G). In turn, FAK was phosphorylated on Tyr576 and Tyr577 (sites for Src kinases) (Figure 3H). Ultimately, the adherens junction protein vascular endothelial (VE)-cadherin became phosphorylated on Tyr731, which is a posttranslational modification associated with increased vascular permeability (Potter

(B) At 4 weeks after induction of diabetes, retinal *Sema3A* mRNA levels rose more than 2-fold in STZ-treated mice when compared to vehicle-injected controls ( $p = 0.0045$ ,  $n = 5$ ), ~3-fold at 8 weeks ( $p = 0.0011$ ,  $n = 8$ ), 4-fold at 12 weeks ( $p = 0.00846$ ,  $n = 4$ ), and ~2.5 fold at 14 weeks ( $p = 0.0334$ ,  $n = 3$ ). Conversely, VEGF levels remained unchanged until 14 weeks, at which point they rose by ~3-fold ( $p = 0.0253$ ,  $n = 3$ ). Data are represented as mean  $\pm$  SEM.

(C) Western blot analysis of retinas confirmed that protein levels of SEMA3A were elevated in diabetic mice. See Figure S1 for antibody specificity.

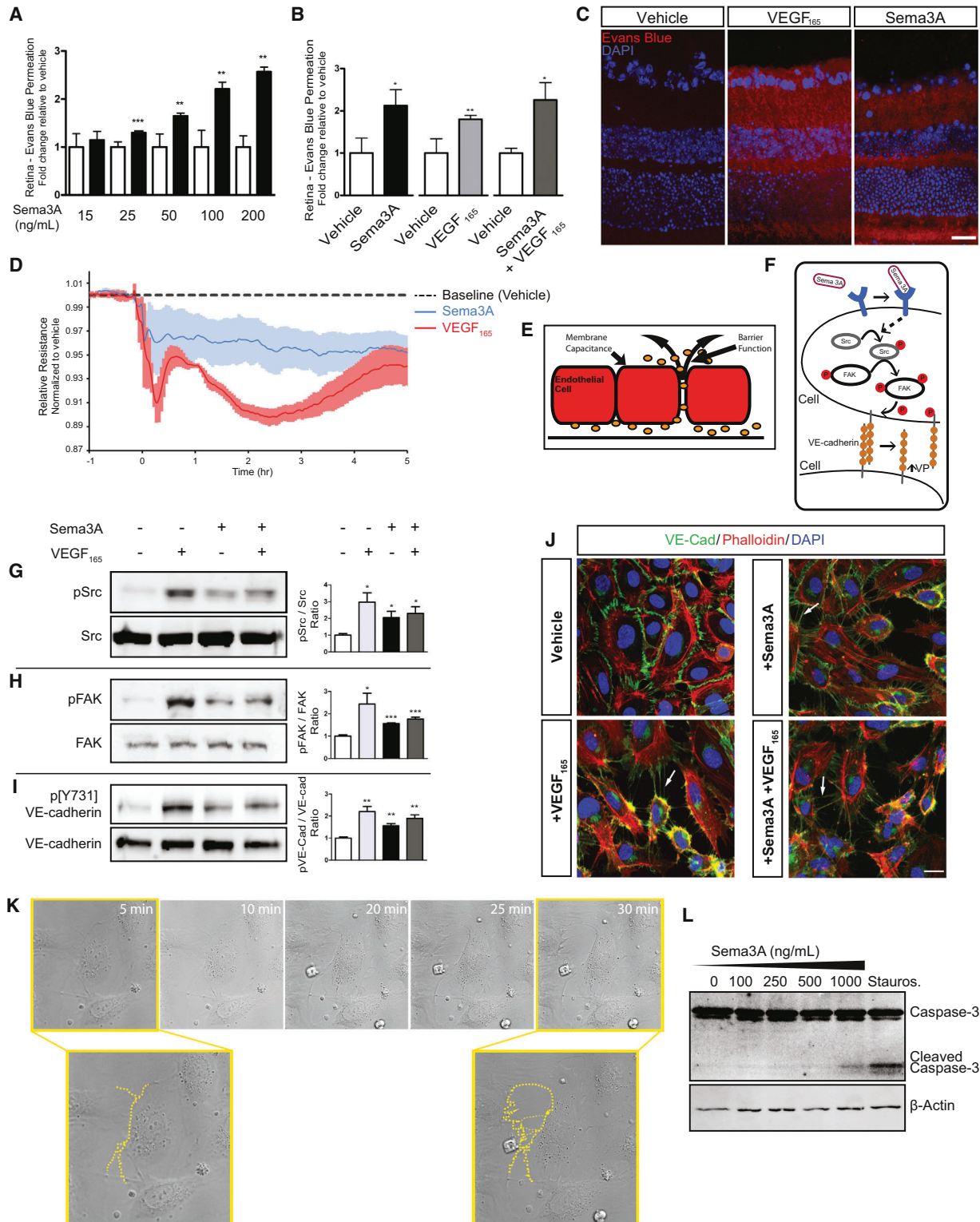
(D) At all weeks of diabetes, STZ-treated mice showed pathologically elevated blood glucose of ~30 mM ( $p < 0.0001$ ,  $n = 7$ ). See Figure S2 for retinal *Sema3A* expression in *db/db* mice.

(E) The rise in *Sema3A* expression preceded pericyte loss as evidenced by similar levels of transcripts for pericyte-related markers platelet-derived growth factor receptor- $\beta$  (*Pdgfr- $\beta$* ), neuron-glial antigen 2 (*Ng2*) proteoglycan, and alpha smooth muscle actin ( $\alpha$ -*Sma*) in STZ- and vehicle-treated mice. Data are represented as mean  $\pm$  SEM.

(F–I) Equivalent vascular coverage by pericytes 8 weeks after STZ injection as depicted by pericyte-specific markers  $\alpha$ -*Sma* (F) and *Ng2* (G) in control retinas and  $\alpha$ -*Sma* (H) and *Ng2* (I) in STZ retinas (representative of at least three separate experiments). Scale bar = 100  $\mu$ m.

(J and K) Immunofluorescence on retinal cryosections revealed that SEMA3A protein was minimally expressed in healthy retinas (J) but robustly induced by retinal ganglion cells (RGCs) in the ganglion cell layer (GCL) at 8 weeks after STZ injection (K), as confirmed by colocalization with the RGC marker  $\beta$ III-tubulin (insets). Representative images of three independent experiments. Scale bar = 20  $\mu$ m; inset = 10  $\mu$ m.

(L and M) Laser-capture micro-dissection of the GCL from normal or diabetic mice followed by quantitative RT-PCR confirmed an ~5-fold induction of *Sema3A* in neurons in close proximity to the inner retinal vascular bed ( $p = 0.014$ ,  $n = 3$ ). Data are represented as mean  $\pm$  SEM. Scale bar = 20  $\mu$ m.



**Figure 3. Retinal Barrier Function Is Compromised by SEMA3A**

(A) Dose response for Sema3A-induced retinal vascular permeability (VP) as determined by Evans blue (EB) permeation (white bars are vehicle and black bars are Sema3A treated; n = 3 [9 mice] for each dose). Data are represented as mean ± SEM.

(B) Intravitreal injection of Sema3A resulted in a similar increase in retinal VP (p < 0.01, n = 3 [9 mice]) as observed with intravitreal administration of VEGF (p < 0.05, n = 3 [9 mice]) and with a combination of both Sema3A and VEGF (p < 0.001, n = 3 [9 mice]). Values expressed relative to vehicle injected retinas ± SEM. See also Figure S3 for wet weights of Sema3A-treated retinas.

(legend continued on next page)

## Cell Metabolism

### Sema3A Induces Vascular Permeability in Diabetes

et al., 2005; Schlaepfer et al., 1994) (Figure 3I). Consistent with the above data on retinal permeability (Figures 3A and 3C), we did not observe an additive or synergistic effect when stimulation of HRMECs was performed with a combination of Sema3A and VEGF, suggesting a potential eventual convergence of signaling pathways for both factors (Figures 3G–3I).

The ability of an endothelial cell to maintain intact intercellular junctions dictates the quality of barrier function. We therefore investigated changes in endothelial cell morphology secondary to Sema3A exposure. Consistent with a role in inducing vascular permeability, confocal microscopy of Sema3A-treated HRMECs revealed pronounced formation of vascular retraction fibers as determined by VE-cadherin and phalloidin staining (white arrows; Figure 3J). The retraction was similar to that observed with VEGF alone or with a combination of VEGF and Sema3A. Membrane retraction is corroborated by time-lapse imaging, and the dotted yellow lines represent the cell-cell interface of two endothelial cells (Figure 3K). While not a direct measure of cell permeability, these *in vitro* results highlight the morphological changes induced by Sema3A.

Importantly, at the doses employed in our study (100–200 ng/ml), Sema3A did not induce cell death or apoptosis in HRMECs, as determined by assessment of activation (cleavage) of caspase-3 (Figure 3L). These data support the role of Sema3A in mediating the breakdown of endothelial cell barrier function and further substantiate the involvement of Sema3A in diabetes-induced retinal vascular permeability.

#### Inhibition of Neuron-Derived SEMA3A Efficiently Reduces Pathological Vascular Permeability in T1DM

To investigate the therapeutic potential of blocking SEMA3A in diabetic retinopathy, we proceeded to inhibit it using two distinct approaches: virally delivered interference RNA or a SEMA3A trap. The magnitude of retinal vascular leakage was assessed 8 weeks after administration of STZ in adult mice. At this time point, flatmount retinas from STZ mice show elevated expression of phosphorylated VE-cadherin in lectin-stained retinal endothelial cells (Figure 4A), and animals have a significant ~57% increase in retinal vascular leakage (Figure 4B) (citrate,  $1.000 \pm 0.1284$ ; STZ,  $1.568 \pm 0.1323$ ,  $p = 0.027$ ;  $n = 4$  distinct experiments with a total of 12 mice).

Recent evidence suggests that retinal neurons exert an important influence on the blood vessels that perfuse them (Antonetti et al., 2012; Binet et al., 2013; Fukushima et al., 2011; Joyal et al., 2011; Kim et al., 2011; Sapieha et al., 2008). In light of the robust expression of *Sema3A* in diabetic RGCs (Figure 2), we sought to

inhibit production of this guidance cue directly in RGCs using a lentiviral (Lv) vector carrying small hairpin RNAs (shRNAs) against *Sema3A* (Joyal et al., 2011). We generated Lv vectors with a VSVG capsid, which exhibits high tropism for RGCs when delivered intravitreally (Binet et al., 2013; Joyal et al., 2011; Sapieha et al., 2008) (Figure 4C). Efficiency of this approach was confirmed, as a single intravitreal injection of Lv.sh*Sema3A* at 5 weeks of life (1 week prior to STZ administration) lead to a significant (~63%) reduction in retinal *Sema3A* expression at the 8-week time point after STZ administration when all analysis was carried out (mean fold increase over control  $\pm$  SEM =  $0.3767 \pm 0.07911$ ;  $p = 0.0014$ ,  $n = 3$ ) (Figure 4D). Lv.sh*Sema3A*-mediated reduction in retinal *Sema3A* expression provoked an ~50% decrease in vascular leakage when compared to control Lv.shGFP ( $0.5105 \pm 0.1347$ ;  $p = 0.022$ ,  $n = 3$  distinct experiments with a total of 9 mice) (Figure 4E), thus validating the strategy of targeting *Sema3A* in neurons of the GCL to counter pathological vascular leakage in diabetes.

In order to therapeutically neutralize vitreal SEMA3A, we employed recombinant mouse soluble NRP1 (rmNRP1) as a bivalent trap for both SEMA3A and VEGF. Neuropilin-1 is a single-pass receptor with its extracellular domain subdivided into distinct subdomains of which a1a2 bind SEMA3A and b1b2 bind VEGF (Geretti et al., 2008) (Figure 4F). Intravitreal injections of rmNRP1 at 6 and 7 weeks after STZ administration lead to a ~50% reduction in retinal permeability when compared to vehicle-injected controls, as measured at 8 weeks after STZ ( $0.5538 \pm 0.1459$ ,  $p = 0.012$ ,  $n = 6$  distinct experiments with a total of 18 mice) (Figure 4G). This reduction was of similar magnitude to that observed with gene silencing of *Sema3A* (Figure 4E). Importantly, neutralization of VEGF with a neutralizing antibody for mouse VEGF<sub>164</sub> was not effective at reducing vascular permeability at this early stage of diabetes (vehicle versus anti-VEGF:  $0.975 \pm 0.0707$ ;  $p = 0.7302$ ; rmNRP1 versus anti-mVEGF:  $p = 0.035$ ,  $n = 5$  distinct experiments with a total of 14 mice). This is likely attributed to the fact that VEGF is not increased in diabetic retinas at this early time point (8 weeks), while *Sema3A* is robustly induced (Figure 2). Together, these data suggest that neutralization of SEMA3A in the diabetic retina is an effective strategy to reduce vasogenic edema (Figure 4H).

#### Conditional Knockout of *Nrp1* Prevents SEMA3A-Induced Retinal Barrier Function Breakdown

In light of NRP1 being the cognate receptor for SEMA3A, we sought to determine whether deletion of *Nrp1* protects against

(C) Confocal images of retinal sections injected with vehicle, VEGF, or Sema3A; red signal depicts leakage of Evans blue/albumin into the retina. Representative images of three independent experiments. Scale bar = 30  $\mu$ m.

(D) Transendothelial resistance measured in real time by ECIS demonstrates that Sema3A effectively reduces endothelial barrier function (3.26–6 hr;  $0.048 > p > 0.009$ ;  $n = 3$ ) to a level similar to that observed with VEGF (1.12–6 hr;  $0.045 > p > 0.001$ ;  $n = 4$ ).

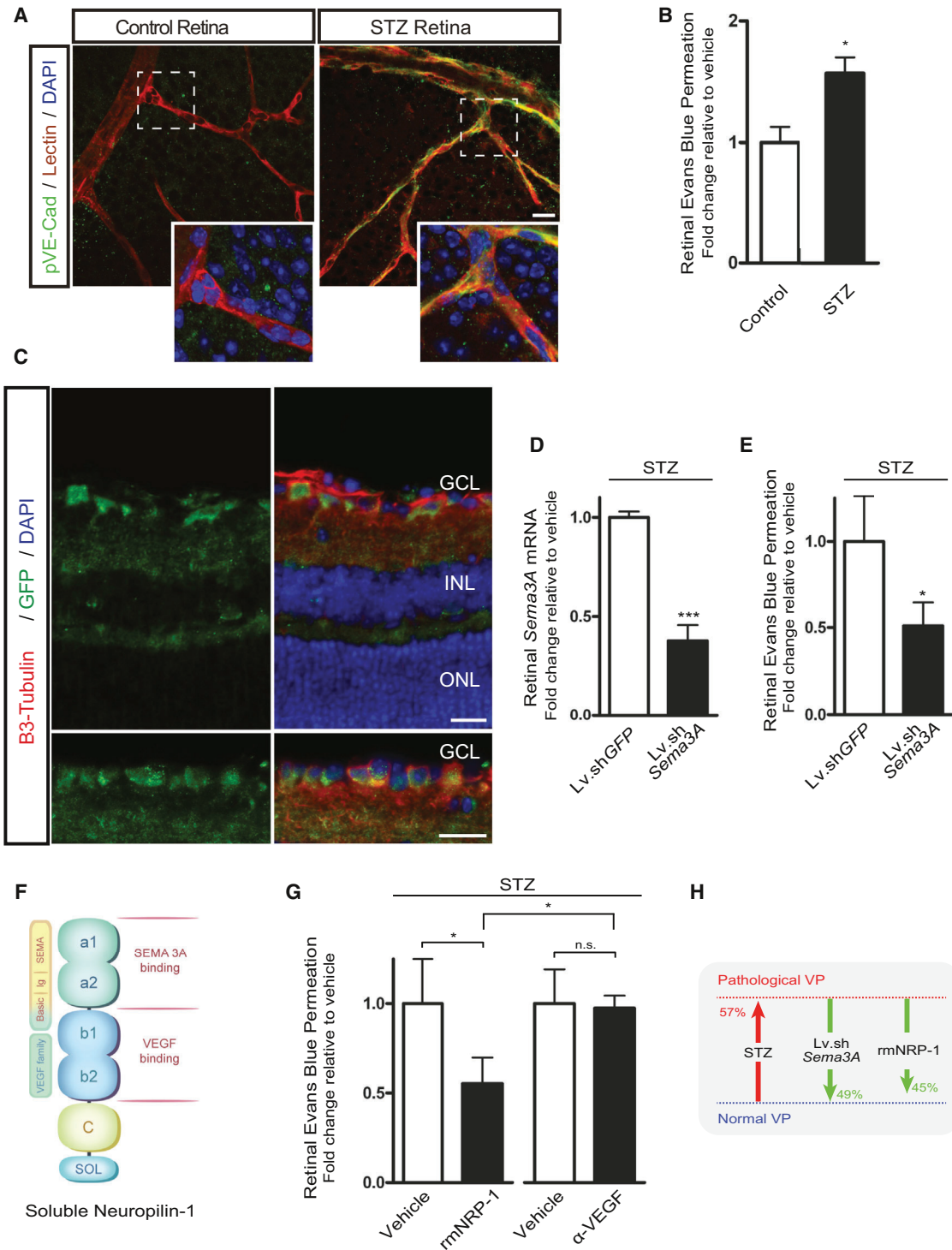
(E) ECIS measures true barrier function by assessing the resistance of the paracellular pathway between the cells.

(F–I) Working hypothesis for Sema3A-mediated vascular permeability (F). Treatment of HRMECs with either Sema3A or VEGF leads to robust phosphorylation of Src at Tyr416 (G), FAK on Tyr576 and Tyr577 (H), and the adherence junction protein VE-cadherin on Tyr731 (I). An additive or enhanced effect was not observed when stimulation was performed with a combination of Sema3A and VEGF. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  relative to vehicle  $\pm$  SEM.

(J) Confocal microscopy of Sema3A-treated HRMECs revealed formation of vascular retraction fibers as determined by VE-cadherin and phalloidin staining (white arrows); retraction was similar to that seen with VEGF alone or with a combination of VEGF and Sema3A. Scale bar = 20  $\mu$ m.

(K) Membrane retraction is corroborated by time-lapse imaging, where dotted yellow lines represent the cell-cell interface.

(L) Sema3A doses employed in our study (100–200 ng/ml) did not induce cell death or apoptosis, as determined by assessment of activation of caspase-3. Representative images of three independent experiments are shown.



**Figure 4. Targeted Silencing of Neuron-Derived *Sema3A* or Intravitreal Neutralization of SEMA3A Efficiently Reduces Diabetes-Induced Retinal Vascular Permeability**

(A) Retinal flatmounts at 8 weeks following STZ-injection show elevated VE-cadherin phosphorylation (linked to higher permeability) on lectin-positive retinal vessels. Representative images of three independent experiments are shown. Scale bar = 20  $\mu$ m.

(B) STZ-treated mice show a 56.8% increase in permeability ( $p = 0.027$ ;  $n = 4$  [12 mice]). Data are represented as mean  $\pm$  SEM.

(C) Lentiviral vectors with a VSVG capsid exhibit high tropism for RGCs when delivered intravitreally, as depicted by a reporter Lv vector carrying GFP. Scale bar = 20  $\mu$ m.

(D and E) A single intravitreal injection of Lv.sh*Sema3A* 5 weeks after induction of diabetes lead to a significant 62.3% reduction in retinal *Sema3A* expression ( $p = 0.0014$ ,  $n = 3$ ) (D) and provoked a proportional 49.5% decrease in vascular leakage ( $p = 0.022$ ,  $n = 3$  [9 mice]) (E). Data are represented as mean  $\pm$  SEM.

(legend continued on next page)



## Cell Metabolism

## Sema3A Induces Vascular Permeability in Diabetes

SEMA3A-induced vascular permeability. Because systemic germline deletion of *Nrp1* is embryonic lethal (Jones et al., 2008; Kawasaki et al., 1999; Kitsukawa et al., 1997), we generated a whole-animal tamoxifen-inducible (Tam-inducible) Cre mouse (Tg<sup>Cre-Esr1</sup>) to induce the conditional deletion of exon 2 of *Nrp1* (Figure 5A). To validate Cre recombination at the *Nrp1* locus and confirm disruption of *Nrp1* in vivo, Tg<sup>Cre-Esr1</sup> mice were crossed with *Nrp1*<sup>fl/fl</sup> mice (Gu et al., 2003). Progeny were given tamoxifen systemically (400 μg/mouse) over a period of 5 consecutive days at 6–9 weeks of age. This dosing regimen lead to an efficient knockout of *Nrp1* in the circulatory system, as determined by western blot (Figure 5B) and quantitative PCR (qPCR) (mean fold increase over control ± SEM = 0.07843 ± 0.03176; p = 0.0012) of heart tissue (Figure 5C), and resulted in a near complete absence of NRP1 in retinal vessels (Figure 5D). Tam-treated Tg<sup>Cre-Esr1</sup>/*Nrp1*<sup>fl/fl</sup> mice did not show any difference in body weight, size, or open-field activity when compared with littermates from 4–20 weeks of age (data not shown). Importantly, Tam-treated Tg<sup>Cre-Esr1</sup>/*Nrp1*<sup>fl/fl</sup> mice with disrupted retinal vascular *Nrp1* were protected against Sema3A-induced retinal vascular permeability (1.276 ± 0.2901; p = 0.36; n = 7 distinct experiments with 21 mice) (Figure 5E), while control Tam-treated Tg<sup>Cre-Esr1</sup>/*Nrp1*<sup>+/+</sup> mice showed a 3-fold increase in vascular leakage in response to Sema3A (2.972 ± 0.2045; p = 0.00065; n = 3 distinct experiments with a total of 9 mice). Conversely, disruption of *Nrp1* did not influence VEGF-induced vascular retinal permeability (Tam-treated Tg<sup>Cre-Esr1</sup>/*Nrp1*<sup>fl/fl</sup> vehicle versus VEGF: 1.814 ± 0.1188, p = 0.0024, n = 3 distinct experiments with a total of 9 mice; Tam-treated Tg<sup>Cre-Esr1</sup>/*Nrp1*<sup>+/+</sup> vehicle versus VEGF: 1.783 ± 0.2440; p = 0.032, n = 3 distinct experiments with a total of 9 mice) (Figure 5F), suggesting that VEGF-induced retinal vascular permeability does not require NRP1. This is in accordance with previous work (Pan et al., 2007). In line with a role for NRP1 in mediating Sema3A-induced vascular permeability, knockdown of *Nrp1* in HRMECs by Lv.sh*Nrp1* prevents phosphorylation of Src, FAK, and VE-Cadherin (Figures 5G–5I). Efficiency of short hairpin RNA (sh)-mediated knockdown of *Nrp1* was validated by qPCR (Figure S4). Collectively, these data confirm that Sema3A-mediated inner blood-retinal barrier function breakdown is NRP1 dependent.

## DISCUSSION

Therapeutic strategies to treat complications associated with diabetic retinopathy until recently consisted predominantly in controlling systemic metabolic deregulation (Silva et al., 2010). While laser photocoagulation and targeted treatments, such as locally administered corticosteroids and recently approved anti-VEGF therapies, are currently available, their off-target effects underscore the need to explore novel therapeutic avenues. In the present study, we provide evidence that Sema3A provokes vascular barrier breakdown in the early phases of dia-

betic retinopathy and ultimately precipitates DME when vascular pericyte coverage is still unperturbed. While the biological functions of semaphorins have been studied for the past 20 years (Luo et al., 1993), novel physiological roles continue to emerge (Acevedo et al., 2008; Bernard et al., 2012; Bouvrée et al., 2012; Fukushima et al., 2011; Gu et al., 2002; 2003; Guttmann-Raviv et al., 2007; Joyal et al., 2011; Kim et al., 2011; Le Guelte et al., 2012; Maione et al., 2009; Matsuoka et al., 2011; Serini et al., 2003; Suto et al., 2007). We demonstrate that in a healthy mature retina, *Sema3A* is modestly expressed, whereas in diabetes, retinal ganglion neurons, which are in intimate proximity of retinal vessels (Sapieha, 2012), significantly increase production of this classic guidance cue. Through its cognate receptor *Nrp1*, *Sema3A* provokes loosening of endothelial cell junctions and leads to vasogenic edema (Figure 5J).

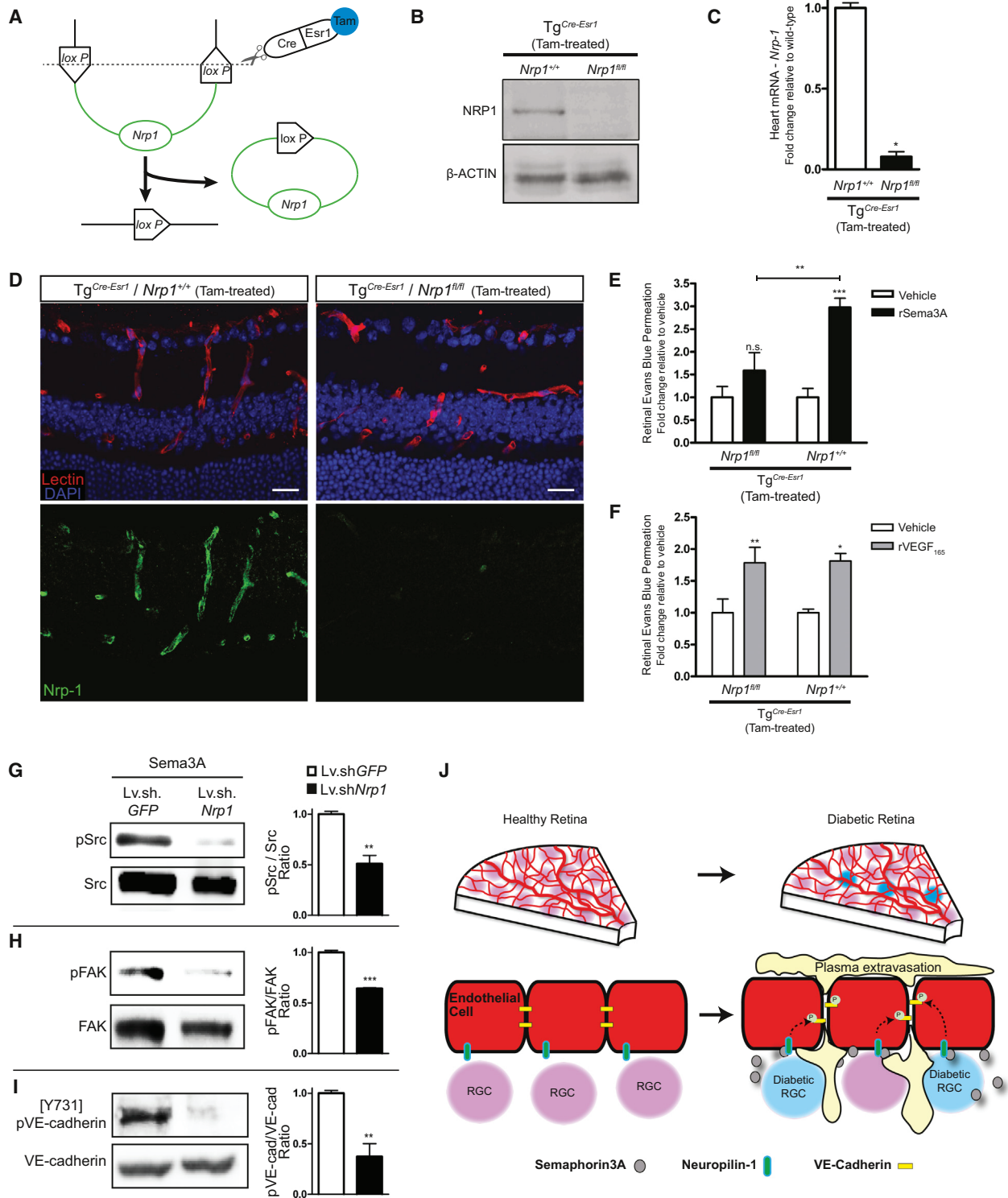
*Sema3A* presents itself as an attractive candidate for therapeutic neutralization in adult ocular vasculopathies, given that its physiological roles are largely limited to embryogenesis. In addition, further properties that make *Sema3A* a noteworthy drug target are its abilities to induce apoptosis and promote cytoskeleton remodeling (Guttmann-Raviv et al., 2007; Klagsbrun and Eichmann, 2005; Miao et al., 1999; Neufeld et al., 2012), which are both salient features of ischemic and proliferative retinopathies such as that of diabetes (Duh, 2011; Sapieha et al., 2010; Wang et al., 2012). Importantly, at the early time points in disease where levels of SEMA3A are elevated, VEGF levels remain low and relatively unchanged compared to nondiabetic controls. Given these expression kinetics and our data demonstrating that neutralization of VEGF may be ineffective in early disease, inhibition of *Sema3A* may be warranted in the primary phases of disease when low VEGF levels are not yet reflective of the level of pathological vascular permeability.

While the introduction of anti-VEGF therapy to attenuate neovascular age-related macular degeneration (AMD), and more recently DME, has resulted in a profound change in clinical treatment paradigms, inhibition of a molecule that plays key roles in vascular homeostasis warrants contemplation in a condition such as diabetes where vascular stability is already compromised. Hence, neutralizing *Sema3A* instead of currently targeted factors such as vasoprotective and neuroprotective VEGF and placental growth factor (PIGF) may provide a valid therapeutic alternative for diabetic retinopathy. Exclusive neutralization of *Sema3A* in the early phase of diabetes would thus permit the baseline levels of VEGF present to play out their protective ocular and systemic roles (Robinson et al., 2001; Stewart, 2012). Alternatively, in later phases of disease, neutralization of *Sema3A* may also be sought as an adjunct to currently employed anti-VEGF therapies such as bevacizumab (Avastin), ranibizumab (Lucentis), or aflibercept (Eylea), given that both proteins seem to be present in later stages of disease and have similar effects on retinal vascular barrier function. In this regard, soluble NRP1 could be employed as a bivalent semaphorin 3A and VEGF trap, due to its intrinsic ability to bind both molecules.

(F) Vitreal SEMA3A was neutralized with a recombinant mouse (rm) soluble NRP1 protein employed as a bivalent trap for both SEMA3A and VEGF.

(G) Intravitreal injection of rmNRP1 in STZ mice at weeks 6 and 7 after induction of diabetes lead to a 48.1% reduction in retinal permeability at week 8 of diabetes (p = 0.012, n = 6 [18 mice]). Conversely, injection of a neutralizing antibody against mouse VEGF was ineffective at reducing diabetes-induced retinal permeability at this stage of disease when compared to vehicle (p = 0.7302, n = 5 [14 mice]). Values are expressed relative to vehicle-injected retinas ± SEM.

(H) Depiction of the magnitude of reversal of pathological vascular permeability with different strategies of SEMA3A neutralization.



**Figure 5. Conditional Knockout of *Nrp1* Prevents Sema3A-Induced Retinal Barrier Function Breakdown**

Tamoxifen (Tam) was administered systemically during a 5-day period to tamoxifen-inducible *Nrp1* floxed B6 mice ( $Tg^{Cre-Esr1}/Nrp1^{fl/fl}$ ).

(A) Graphic depiction of the inducible Cre-loxP system where estrogen receptor 1 (Esr1) forms a complex with Cre recombinase; Tam, when available, binds the Cre-Esr1 complex, allowing its nuclear translocation and the subsequent recombination and/or excision of the floxed target gene *Nrp1*.

(B) Efficiency of *Nrp1* deletion by CRE-Esr1 recombinase is evidenced by decreased Nrp-1 protein.

(C) Similarly, *Nrp-1* mRNA transcript is reduced as determined in heart tissue ( $p = 0.0012$ ;  $n = 2$ ). Data are represented as mean  $\pm$  SEM.

(D) Immunofluorescence in retinal cryosections reveals the efficiency of Tam-induced knockdown of *Nrp1* in lectin-stained retinal vessels.

(legend continued on next page)

## Cell Metabolism

### Sema3A Induces Vascular Permeability in Diabetes

Using Tam-treated  $Tg^{Cre-Esr1}/Nrp1^{fl/fl}$  to conditionally delete *Nrp1* in mature animals, we provide *in vivo* evidence for the role of this receptor in mediating the effects of SEMA3A on vascular barrier function breakdown. NRP1 also acts as a coreceptor for VEGF<sub>165</sub>, increasing its affinity toward VEGF receptor-2 (VEGFR-2), thus enhancing VEGFR-2-mediated chemotaxis, growth of endothelial cells, and angiogenesis (Miao et al., 2000; Soker et al., 1998; 2002). However, in our hands, the effects of VEGF on vascular permeability do not seem to require NRP1, since Tam-treated  $Tg^{Cre-Esr1}/Nrp1^{fl/fl}$  mice showed a magnitude of retinal edema identical to that of control Tam-treated  $Tg^{Cre-Esr1}/Nrp1^{+/+}$  mice, secondary to elevated VEGF administration. This is consistent with previous studies demonstrating that blocking the VEGF or Sema3A binding sites of NRP1 with distinct monoclonal antibodies had no effect on VEGF-induced vascular permeability (Pan et al., 2007). It is important to note that it was previously elegantly demonstrated that selective deletion of *Nrp1* in the endothelium of adult mice renders them resistant to both Sema3A- and VEGF-mediated intradermal vascular permeability (Acevedo et al., 2008). Interestingly, the authors also noted that mice that received systemic treatment with a monoclonal antibody directed against *Nrp1*, known to inhibit VEGF binding, potently inhibited Sema3A-induced permeability yet had little effect on VEGF-induced permeability. These discrepancies highlight the context-dependent contribution of *Nrp1* to VEGF-mediated vascular permeability. It is likely that the point of signaling convergence lies downstream of *Nrp1*, given that costimulation of ECs with both VEGF and SEMA3A does not enhance permeability beyond levels noted when each is applied independently.

Because there is a certain mechanistic overlap in the etiologies of several ocular vasculopathies, such as neovascular AMD, diabetic retinopathy, retinal vein occlusions, and retinopathy of prematurity, treatment paradigms such as anti-VEGFs are being used or explored for more than one ocular vasculopathy. Similarly, Sema3A neutralization may be useful for treating vessel leakage and edema associated with neovascular AMD (Yancopoulos, 2010). Moreover, we have previously demonstrated in a model of oxygen-induced retinopathy (Smith et al., 1994) that in late stages of pathological retinal neovascularization, neuronal-derived SEMA3A forms a repulsive barrier that hinders normal revascularization by misdirecting vessels away from the ischemic retina (Joyal et al., 2011). Hence, inhibition of Sema3A could potentially simultaneously benefit the two main pathognomonic features of DR, i.e., barrier function deterioration and pathological preretinal neovascularization, which separately can lead to loss of vision in diabetes.

By studying neurovascular interplay in diabetes, we obtained insight into a fundamental neurovascular mechanism that medi-

ates pathological barrier function breakdown in diabetic retinopathy. Collectively, our study identifies a therapeutic target, Sema3A, which may be involved beyond DME in diseases in which elevated vascular permeability is a contributing factor, such as neovascular AMD, retinopathy of prematurity, cancer, and stroke.

#### EXPERIMENTAL PROCEDURES

For detailed experimental procedures, please see [Supplemental Information](#).

##### Human Samples

The study conforms to the tenets of the Declaration of Helsinki, and approval of the human clinical protocol and informed consent was obtained from the Maisonrouve-Rosemont Hospital (HMR) ethics committee (Ref. CER: 10059).

##### Vitreotomy

All patients previously diagnosed with DME were followed and operated by a single vitreoretinal surgeon (F.A.R.). Control patients were undergoing surgical treatment for nonvascular pathology (ERM or MH) by the same surgeon (F.A.R.).

##### Animals

All studies were performed according to the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. Tamoxifen-inducible (Tam-inducible) Cre mice ( $Tg^{Cre-Esr1}$ ; no. 004682) and neuropilin-1 floxed mice ( $Nrp1^{tm2Ddg/J}$ ; no. 005247) were purchased from The Jackson Laboratory.

##### Streptozotocin Mouse Model

C57BL/6J mice (6–7 weeks old) were weighed, and their baseline glycemia was measured (Accu-Chek, Roche). Mice were injected intraperitoneally with streptozotocin (Sigma-Aldrich) for 5 consecutive days at 55 mg/kg.

##### Laser-Capture Microdissection

Eyes were enucleated from 14-week-old adult C57BL/6J that had been diabetic for 8 weeks and flash frozen in optimal cutting temperature compound (OCT). Sections of 12  $\mu$ m were dissected with a Zeiss Observer microscope equipped with a PALM MicroBeam device for laser-capture microdissection.

##### Assessment of Sema3A Levels by ELISA

Vitreous samples were frozen on dry ice immediately after biopsy and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . ELISA was performed according to manufacturer's instructions (Uscn Life Science).

##### Western Blotting, Immunofluorescence, Real-Time PCR Analysis, and Antibodies

Please see [Supplemental Information](#).

##### Evans Blue Permeation Assay

Retinal EB permeation was performed with modifications as described in (Xu et al., 2001). EB was injected at 45 mg/kg intravenously, and it was allowed to circulate for 2 hr prior to retinal extraction. Evans blue permeation was quantified by fluorimetry (620 nm max absorbance, 740 nm minimum absorbance

(E) In absence of NRP1, intravitreally administered Sema3A did not increase vascular leakage ( $p = 0.36$ ;  $n = 7$  [21 mice]), while Tam-treated  $Tg^{Cre-Esr1}/Nrp1^{+/+}$  controls show 3-fold higher vascular leakage ( $p = 0.00065$ ;  $n = 3$  [9 mice]). Data are represented as mean  $\pm$  SEM.

(F) Conversely, disruption of *Nrp1* did not influence VEGF-induced vascular retinal permeability ( $p = 0.0024$ ;  $n = 3$  [9 mice]), suggesting that VEGF-induced retinal vascular leakage is independent of NRP1 as previously reported. Data are represented as mean  $\pm$  SEM.

(G–I) *In vitro* knockdown of *Nrp1* in HRMECs by Lv.sh*Nrp1* prevents phosphorylation of Src ( $p = 0.004$ ;  $n = 3$ ) (G), FAK ( $p = 0.0002$ ;  $n = 3$ ) (H), and VE-cadherin ( $p = 0.0081$ ;  $n = 3$ ) (I). Data are represented as mean  $\pm$  SEM. See [Figure S4](#) for efficacy of sh*Nrp1*-mediated knockdown of *Nrp1*.

(J) Graphic depiction of the main findings of the study. In a healthy mature retina, levels of Sema3A are low, whereas in diabetes, retinal ganglion neurons in intimate proximity of retinal vessels significantly increase their production. Through NRP1, Sema3A provokes loosening of endothelial cell junctions and leads to vasogenic edema.

background) with a TECAN Infinite M1000 PRO. EBP (measured in  $\mu\text{l} / [\text{g} \times \text{hr}]$ ) is calculated as  $(\text{EB} [\mu\text{g}] / \text{wet retinal weight} [\text{g}]) / (\text{plasma EB} [\mu\text{g}/\mu\text{l}] \times \text{circulation time} [\text{hr}])$ . Evans blue permeation was expressed relative to controls.

#### Electric Cell-Substrate Impedance Sensing Assay

Real-time analysis of transendothelial electric resistance was performed by plating HUVECs onto 8W10E+ standard 8-well arrays (Applied BioPhysics) at a density of  $10^5$  cells per well. Please see [Supplemental Information](#).

#### Preparation of Lentivirus

Viral vectors were produced as previously described by us ([Binet et al., 2013](#); [Joyal et al., 2011](#)). Please see [Supplemental Information](#).

#### Soluble Recombinant NRP1 and Mouse anti-VEGF

STZ-treated diabetic C57BL/6J mice were intravitreally injected with rmNRP1 from plasmid ([Mamluk et al., 2002](#)) or R&D Systems at 6 and 7 weeks after STZ administration. Specific mouse anti-VEGF was purchased from R&D Systems (AF-493-NA), and  $1 \mu\text{l}$  was injected at  $80 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Retinal Evans blue permeation assay was performed at 8 weeks after STZ treatment as described above.

#### Statistical Analyses

We used Student's *t* test and ANOVA, where appropriate, to compare the different groups;  $p < 0.05$  was considered statistically different. For ELISA, a nonparametric Mann-Whitney test was used. Results were expressed as median and interquartile range (IQR: 25%, 75%).

#### SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes Supplemental Experimental Procedures and four figures and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2013.09.003>.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

P.S. and A.C. conceived and designed the experiments. A.C., N.T., C.M., K.M., F.A.R., A.D., C.P., E.L., N.S., F. Binet, D.L., V.D.G., and F. Beaudoin performed the experiments. A.C., N.T., C.M., K.M., C.P., E.L., A.D., F.A.R., and P.S. analyzed the data. F.A.R. performed all vitreous biopsies. A.C., N.T., C.M., and P.S. assembled the figures. P.S. wrote the manuscript.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The University of Montreal, Hospital Maisonneuve-Rosemont and P.S. have filed a patent pertaining to the results presented in the paper. This work was supported by operating grants to P.S. from the Canadian Diabetes Association (OG-3-11-3329-PS), the Canadian Institutes of Health Research (221478), the Foundation Fighting Blindness Canada, and Les Fonds de Recherche en Ophthalmologie de l'Université de Montréal. P.S. holds a Canada Research Chair in Retinal Cell Biology and The Alcon Research Institute Young Investigator Award. A.C. is supported by scholarships from the Réseau de Recherche en Santé de la Vision du Québec (RRSV). N.S. and F.B. hold a Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) postdoctoral fellowship. F. Beaudoin is supported by the The Whitearn Foundation. We thank Wei Li for the illustration in [Figures 2](#) and [4](#). We thank Lois E.H. Smith for assessment of *Sema3A* in *db/db* mice. We also give special thanks to Aouatef Benlemmouden for coordinating patients for clinical sampling of vitreous.

Received: April 8, 2013

Revised: July 20, 2013

Accepted: August 23, 2013

Published: October 1, 2013

#### REFERENCES

Acevedo, L.M., Barillas, S., Weis, S.M., Göthert, J.R., and Cheresh, D.A. (2008). Semaphorin 3A suppresses VEGF-mediated angiogenesis yet acts as a vascular permeability factor. *Blood* *111*, 2674–2680.

Antonetti, D.A., Klein, R., and Gardner, T.W. (2012). Diabetic retinopathy. *N. Engl. J. Med.* *366*, 1227–1239.

Appleton, B.A., Wu, P., Maloney, J., Yin, J., Liang, W.C., Stawicki, S., Mortara, K., Bowman, K.K., Elliott, J.M., Desmarais, W., et al. (2007). Structural studies of neuropilin/antibody complexes provide insights into semaphorin and VEGF binding. *EMBO J.* *26*, 4902–4912.

Barber, A.J., Lieth, E., Khin, S.A., Antonetti, D.A., Buchanan, A.G., and Gardner, T.W. (1998). Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. Early onset and effect of insulin. *J. Clin. Invest.* *102*, 783–791.

Barber, A.J., Antonetti, D.A., Kern, T.S., Reiter, C.E., Soans, R.S., Krady, J.K., Levison, S.W., Gardner, T.W., and Bronson, S.K. (2005). The *Ins2Akita* mouse as a model of early retinal complications in diabetes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *46*, 2210–2218.

Bernard, F., Moreau-Fauvarque, C., Heitz-Marchaland, C., Zagar, Y., Dumas, L., Fouquet, S., Lee, X., Shao, Z., Mi, S., and Chédotal, A. (2012). Role of transmembrane semaphorin Sema6A in oligodendrocyte differentiation and myelination. *Glia* *60*, 1590–1604.

Binet, F., Mawambo, G., Sitaras, N., Tetreault, N., Lapalme, E., Favret, S., Cerani, A., Leboeuf, D., Tremblay, S., Rezende, F., et al. (2013). Neuronal ER stress impedes myeloid-cell-induced vascular regeneration through IRE1 $\alpha$  degradation of netrin-1. *Cell Metab.* *17*, 353–371.

Bouvrée, K., Brunet, I., Del Toro, R., Gordon, E., Prahst, C., Cristofaro, B., Mathivet, T., Xu, Y., Soueid, J., Fortuna, V., et al. (2012). Semaphorin3A, Neuropilin-1, and PlexinA1 are required for lymphatic valve formation. *Circ. Res.* *111*, 437–445.

Cheung, N., and Wong, T.Y. (2008). Diabetic retinopathy and systemic vascular complications. *Prog. Retin. Eye Res.* *27*, 161–176.

Duh, E.J. (2011). Sema 3A resists retinal revascularization. *Blood* *117*, 5785–5786.

Eliceiri, B.P., Paul, R., Schwartzberg, P.L., Hood, J.D., Leng, J., and Cheresh, D.A. (1999). Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Mol. Cell* *4*, 915–924.

Foxton, R.H., Finkelstein, A., Vijay, S., Dahlmann-Noor, A., Khaw, P.T., Morgan, J.E., Shima, D.T., and Ng, Y.S. (2013). VEGF-A is necessary and sufficient for retinal neuroprotection in models of experimental glaucoma. *Am. J. Pathol.* *182*, 1379–1390.

Fukushima, Y., Okada, M., Kataoka, H., Hirashima, M., Yoshida, Y., Mann, F., Gomi, F., Nishida, K., Nishikawa, S., and Uemura, A. (2011). Sema3E-PlexinD1 signaling selectively suppresses disoriented angiogenesis in ischemic retinopathy in mice. *J. Clin. Invest.* *121*, 1974–1985.

Gastinger, M.J., Kunselman, A.R., Conboy, E.E., Bronson, S.K., and Barber, A.J. (2008). Dendrite remodeling and other abnormalities in the retinal ganglion cells of *Ins2 Akita* diabetic mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *49*, 2635–2642.

Gelfand, M.V., Hong, S., and Gu, C. (2009). Guidance from above: common cues direct distinct signaling outcomes in vascular and neural patterning. *Trends Cell Biol.* *19*, 99–110.

Geretti, E., Shimizu, A., and Klagsbrun, M. (2008). Neuropilin structure governs VEGF and semaphorin binding and regulates angiogenesis. *Angiogenesis* *11*, 31–39.

Gluzman-Poltorak, Z., Cohen, T., Shibuya, M., and Neufeld, G. (2001). Vascular endothelial growth factor receptor-1 and neuropilin-2 form complexes. *J. Biol. Chem.* *276*, 18688–18694.

Gu, C., Limberg, B.J., Whitaker, G.B., Perman, B., Leahy, D.J., Rosenbaum, J.S., Ginty, D.D., and Kolodkin, A.L. (2002). Characterization of neuropilin-1 structural features that confer binding to semaphorin 3A and vascular endothelial growth factor 165. *J. Biol. Chem.* *277*, 18069–18076.

Gu, C., Rodriguez, E.R., Reimert, D.V., Shu, T., Fritzsche, B., Richards, L.J., Kolodkin, A.L., and Ginty, D.D. (2003). Neuropilin-1 conveys semaphorin and VEGF signaling during neural and cardiovascular development. *Dev. Cell* *5*, 45–57.

Guttmann-Raviv, N., Shraga-Heled, N., Varshavsky, A., Guimaraes-Sternberg, C., Kessler, O., and Neufeld, G. (2007). Semaphorin-3A and semaphorin-3F work together to repel endothelial cells and to inhibit their survival by induction of apoptosis. *J. Biol. Chem.* *282*, 26294–26305.

- Hunter, T. (1987). A tail of two src's: mutatis mutandis. *Cell* 49, 1–4.
- Jones, E.A., Yuan, L., Breant, C., Watts, R.J., and Eichmann, A. (2008). Separating genetic and hemodynamic defects in neuropilin 1 knockout embryos. *Development* 135, 2479–2488.
- Joyal, J.-S., Sitaras, N., Binet, F., Rivera, J.C., Stahl, A., Zaniolo, K., Shao, Z., Polosa, A., Zhu, T., Hamel, D., et al. (2011). Ischemic neurons prevent vascular regeneration of neural tissue by secreting semaphorin 3A. *Blood* 117, 6024–6035.
- Kawasaki, T., Kitsukawa, T., Bekku, Y., Matsuda, Y., Sanbo, M., Yagi, T., and Fujisawa, H. (1999). A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development* 126, 4895–4902.
- Kempner, J.H., O'Colmain, B.J., Leske, M.C., Haffner, S.M., Klein, R., Moss, S.E., Taylor, H.R., and Hamman, R.F.; Eye Diseases Prevalence Research Group. (2004). The prevalence of diabetic retinopathy among adults in the United States. *Arch. Ophthalmol.* 122, 552–563.
- Kern, T.S., and Engerman, R.L. (1996). Capillary lesions develop in retina rather than cerebral cortex in diabetes and experimental galactosemia. *Arch. Ophthalmol.* 114, 306–310.
- Kim, J., Oh, W.J., Gaiano, N., Yoshida, Y., and Gu, C. (2011). Semaphorin 3E-Plexin-D1 signaling regulates VEGF function in developmental angiogenesis via a feedback mechanism. *Genes Dev.* 25, 1399–1411.
- Kitsukawa, T., Shimizu, M., Sanbo, M., Hirata, T., Taniguchi, M., Bekku, Y., Yagi, T., and Fujisawa, H. (1997). Neuropilin-semaphorin III/D-mediated chemorepulsive signals play a crucial role in peripheral nerve projection in mice. *Neuron* 19, 995–1005.
- Klagsbrun, M., and Eichmann, A. (2005). A role for axon guidance receptors and ligands in blood vessel development and tumor angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16, 535–548.
- Klagsbrun, M., Takashima, S., and Mamluk, R. (2002). The role of neuropilin in vascular and tumor biology. *Adv. Exp. Med. Biol.* 515, 33–48.
- Klebanov, O., Nitzan, A., Raz, D., Barzilay, A., and Solomon, A.S. (2009). Upregulation of Semaphorin 3A and the associated biochemical and cellular events in a rat model of retinal detachment. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 247, 73–86.
- Koppel, A.M., and Raper, J.A. (1998). Collapsin-1 covalently dimerizes, and dimerization is necessary for collapsing activity. *J. Biol. Chem.* 273, 15708–15713.
- Le Guelle, A., Galan-Moya, E.M., Dwyer, J., Treps, L., Kettler, G., Hebda, J.K., Dubois, S., Auffray, C., Chneiweiss, H., Bidere, N., and Gavard, J. (2012). Semaphorin 3A elevates endothelial cell permeability through PP2A inactivation. *J. Cell Sci.* 125, 4137–4146.
- Lee, P., Goishi, K., Davidson, A.J., Mannix, R., Zon, L., and Klagsbrun, M. (2002). Neuropilin-1 is required for vascular development and is a mediator of VEGF-dependent angiogenesis in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 10470–10475.
- Luo, Y., Raible, D., and Raper, J.A. (1993). Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell* 75, 217–227.
- Maione, F., Molla, F., Meda, C., Latini, R., Zentilin, L., Giacca, M., Seano, G., Serini, G., Bussolino, F., and Giraudo, E. (2009). Semaphorin 3A is an endogenous angiogenesis inhibitor that blocks tumor growth and normalizes tumor vasculature in transgenic mouse models. *J. Clin. Invest.* 119, 3356–3372.
- Mamluk, R., Gechtman, Z., Kutcher, M.E., Gasiunas, N., Gallagher, J., and Klagsbrun, M. (2002). Neuropilin-1 binds vascular endothelial growth factor 165, placenta growth factor-2, and heparin via its b1b2 domain. *J. Biol. Chem.* 277, 24818–24825.
- Martin, D.F., Maguire, M.G., Ying, G.S., Grunwald, J.E., Fine, S.L., Jaffe, G.J., and Jaffe, G.J.; CATT Research Group. (2011). Ranibizumab and bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N. Engl. J. Med.* 364, 1897–1908.
- Martin, D.F., Maguire, M.G., Fine, S.L., Ying, G.S., Jaffe, G.J., Grunwald, J.E., Toth, C., Redford, M., and Ferris, F.L., 3rd.; Comparison of Age-related Macular Degeneration Treatments Trials (CATT) Research Group. (2012). Ranibizumab and bevacizumab for treatment of neovascular age-related macular degeneration: two-year results. *Ophthalmology* 119, 1388–1398.
- Matsuoka, R.L., Nguyen-Ba-Charvet, K.T., Parry, A., Badea, T.C., Chédotal, A., and Kolodkin, A.L. (2011). Transmembrane semaphorin signalling controls laminar stratification in the mammalian retina. *Nature* 470, 259–263.
- Miao, H.Q., Soker, S., Feiner, L., Alonso, J.L., Raper, J.A., and Klagsbrun, M. (1999). Neuropilin-1 mediates collapsin-1/semaphorin III inhibition of endothelial cell motility: functional competition of collapsin-1 and vascular endothelial growth factor-165. *J. Cell Biol.* 146, 233–242.
- Miao, H.Q., Lee, P., Lin, H., Soker, S., and Klagsbrun, M. (2000). Neuropilin-1 expression by tumor cells promotes tumor angiogenesis and progression. *FASEB J.* 14, 2532–2539.
- Mima, A., Qi, W., Hiraoka-Yamamoto, J., Park, K., Matsumoto, M., Kitada, M., Li, Q., Mizutani, K., Yu, E., Shimada, T., et al. (2012). Retinal not systemic oxidative and inflammatory stress correlated with VEGF expression in rodent models of insulin resistance and diabetes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53, 8424–8432.
- Moss, S.E., Klein, R., and Klein, B.E. (1998). The 14-year incidence of visual loss in a diabetic population. *Ophthalmology* 105, 998–1003.
- Murakami, M., Nguyen, L.T., Zhuang, Z.W., Moodie, K.L., Carmeliet, P., Stan, R.V., and Simons, M. (2008). The FGF system has a key role in regulating vascular integrity. *J. Clin. Invest.* 118, 3355–3366.
- Neufeld, G., Sabag, A.D., Rabinovicz, N., and Kessler, O. (2012). Semaphorins in angiogenesis and tumor progression. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a006718.
- Pan, Q., Chanthery, Y., Liang, W.C., Stawicki, S., Mak, J., Rathore, N., Tong, R.K., Kowalski, J., Yee, S.F., Pacheco, G., et al. (2007). Blocking neuropilin-1 function has an additive effect with anti-VEGF to inhibit tumor growth. *Cancer Cell* 11, 53–67.
- Potter, M.D., Barbero, S., and Cheresh, D.A. (2005). Tyrosine phosphorylation of VE-cadherin prevents binding of p120- and beta-catenin and maintains the cellular mesenchymal state. *J. Biol. Chem.* 280, 31906–31912.
- Robinson, G.S., Ju, M., Shih, S.C., Xu, X., McMahon, G., Caldwell, R.B., and Smith, L.E. (2001). Nonvascular role for VEGF: VEGFR-1, 2 activity is critical for neural retinal development. *FASEB J.* 15, 1215–1217.
- Saint-Geniez, M., Maharaj, A.S., Walshe, T.E., Tucker, B.A., Sekiyama, E., Kurihara, T., Darland, D.C., Young, M.J., and D'Amore, P.A. (2008). Endogenous VEGF is required for visual function: evidence for a survival role on müller cells and photoreceptors. *PLoS ONE* 3, e3554.
- Sapieha, P. (2012). Eyeing central neurons in vascular growth and reparative angiogenesis. *Blood* 120, 2182–2194.
- Sapieha, P., Sirinyan, M., Hamel, D., Zaniolo, K., Joyal, J.-S., Cho, J.-H., Honoré, J.-C., Kermorant-Duchemin, E., Varma, D.R., Tremblay, S., et al. (2008). The succinate receptor GPR91 in neurons has a major role in retinal angiogenesis. *Nat. Med.* 14, 1067–1076.
- Sapieha, P., Hamel, D., Shao, Z., Rivera, J.C., Zaniolo, K., Joyal, J.S., and Chemtob, S. (2010). Proliferative retinopathies: angiogenesis that blinds. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 5–12.
- Sapieha, P., Chen, J., Stahl, A., Seaward, M.R., Favazza, T.L., Juan, A.M., Hattori, C.J., Joyal, J.S., Krahe, N.M., Dennison, R.J., et al. (2012). Omega-3 polyunsaturated fatty acids preserve retinal function in type 2 diabetic mice. *Nutr. Diabetes* 2, e36.
- Schepke, L., Aguilar, E., Gariano, R.F., Jacobson, R., Hood, J., Doukas, J., Cao, J., Noronha, G., Yee, S., Weis, S., et al. (2008). Retinal vascular permeability suppression by topical application of a novel VEGFR2/Src kinase inhibitor in mice and rabbits. *J. Clin. Invest.* 118, 2337–2346.
- Schlaepfer, D.D., Hanks, S.K., Hunter, T., and van der Geer, P. (1994). Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature* 372, 786–791.
- Serini, G., Valdembrì, D., Zanivan, S., Morterra, G., Burkhardt, C., Caccavari, F., Zampataro, L., Primo, L., Tamagnone, L., Logan, M., et al. (2003). Class 3 semaphorins control vascular morphogenesis by inhibiting integrin function. *Nature* 424, 391–397.
- Silva, P.S., Cavallerano, J.D., Sun, J.K., Aiello, L.M., and Aiello, L.P. (2010). Effect of systemic medications on onset and progression of diabetic retinopathy. *Nat. Rev. Endocrinol.* 6, 494–508.

- Smith, L.E., Wesolowski, E., McLellan, A., Kostyk, S.K., D'Amato, R., Sullivan, R., and D'Amore, P.A. (1994). Oxygen-induced retinopathy in the mouse. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *35*, 101–111.
- Soker, S., Takashima, S., Miao, H.Q., Neufeld, G., and Klagsbrun, M. (1998). Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* *92*, 735–745.
- Soker, S., Miao, H.Q., Nomi, M., Takashima, S., and Klagsbrun, M. (2002). VEGF165 mediates formation of complexes containing VEGFR-2 and neuropilin-1 that enhance VEGF165-receptor binding. *J. Cell. Biochem.* *85*, 357–368.
- Stahl, A., Connor, K.M., Sapieha, P., Chen, J., Dennison, R.J., Krah, N.M., Seaward, M.R., Willett, K.L., Aderman, C.M., Guerin, K.I., et al. (2010). The mouse retina as an angiogenesis model. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *51*, 2813–2826.
- Stewart, M.W. (2012). The expanding role of vascular endothelial growth factor inhibitors in ophthalmology. *Mayo Clin. Proc.* *87*, 77–88.
- Suto, F., Tsuboi, M., Kamiya, H., Mizuno, H., Kiyama, Y., Komai, S., Shimizu, M., Sanbo, M., Yagi, T., Hiromi, Y., et al. (2007). Interactions between plexin-A2, plexin-A4, and semaphorin 6A control lamina-restricted projection of hippocampal mossy fibers. *Neuron* *53*, 535–547.
- Takahashi, T., Fournier, A., Nakamura, F., Wang, L.H., Murakami, Y., Kalb, R.G., Fujisawa, H., and Strittmatter, S.M. (1999). Plexin-neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors. *Cell* *99*, 59–69.
- Vieira, J.M., Schwarz, Q., and Ruhrberg, C. (2007). Role of the neuropilin ligands VEGF164 and SEMA3A in neuronal and vascular patterning in the mouse. *Novartis Found. Symp.* *283*, 230–235, discussion 235–241.
- Wang, S., Park, J.K., and Duh, E.J. (2012). Novel targets against retinal angiogenesis in diabetic retinopathy. *Curr. Diab. Rep.* *12*, 355–363.
- Xu, Q., Qaum, T., and Adamis, A.P. (2001). Sensitive blood-retinal barrier breakdown quantitation using Evans blue. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *42*, 789–794.
- Yancopoulos, G.D. (2010). Clinical application of therapies targeting VEGF. *Cell* *143*, 13–16.

## **Annexe 2: PNAS 2019**

**NOTCH1 signaling induces pathological vascular permeability in diabetic retinopathy.**

Contribution égale des auteurs: Miloudi K., Oubaha M. et Ménard C.



# NOTCH1 signaling induces pathological vascular permeability in diabetic retinopathy

Khalil Miloudi<sup>a,b,1</sup>, Malika Oubaha<sup>c,1</sup>, Catherine Ménard<sup>c,1</sup>, Agnieszka Dejda<sup>a</sup>, Vera Guber<sup>a</sup>, Gael Cagnone<sup>d,e</sup>, Ariel M. Wilson<sup>c</sup>, Nicolas Tétréault<sup>a</sup>, Gaëlle Mawambo<sup>c</sup>, Francois Binet<sup>c</sup>, Rony Chidiac<sup>e</sup>, Chantal Delisle<sup>e</sup>, Manuel Buscarlet<sup>c</sup>, Agustin Cerani<sup>c</sup>, Sergio Crespo-Garcia<sup>c</sup>, Katie Bentley<sup>f</sup>, Flavio Rezende<sup>a</sup>, Jean-Sebastien Joyal<sup>d</sup>, Frédéric A. Mallette<sup>c,g</sup>, Jean-Philippe Gratton<sup>e</sup>, Bruno Larrivée<sup>a</sup>, and Przemyslaw Sapieha<sup>a,b,2</sup>

<sup>a</sup>Department of Ophthalmology, Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Centre, University of Montreal, Montreal, QC H1T 2M4, Canada; <sup>b</sup>Department of Neurology-Neurosurgery, McGill University, Montreal, QC H3A 2B4 Canada; <sup>c</sup>Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Centre, University of Montreal, Montreal, QC H1T 2M4, Canada; <sup>d</sup>Departments of Pediatrics, Ophthalmology, and Pharmacology, Centre Hospitalier Universitaire Ste-Justine Research Center, Montréal, QC H1T 2M4, Canada; <sup>e</sup>Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, QC H3C 3J7, Canada; <sup>f</sup>Department of Immunology, Genetics and Pathology, Vascular Biology, Uppsala University, 751 85 Uppsala, Sweden; and <sup>g</sup>Department of Medicine, Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Centre, University of Montreal, Montreal, QC H1T 2M4, Canada

Edited by Janet R. Sparrow, Columbia University, New York, NY, and accepted by Editorial Board Member Carl F. Nathan January 18, 2019 (received for review August 28, 2018)

**Diabetic macular edema is a major complication of diabetes resulting in loss of central vision. Although heightened vessel leakiness has been linked to glial and neuronal-derived factors, relatively little is known on the mechanisms by which mature endothelial cells exit from a quiescent state and compromise barrier function. Here we report that endothelial NOTCH1 signaling in mature diabetic retinas contributes to increased vascular permeability. By providing both human and mouse data, we show that NOTCH1 ligands JAGGED1 and DELTA LIKE-4 are up-regulated secondary to hyperglycemia and activate both canonical and rapid noncanonical NOTCH1 pathways that ultimately disrupt endothelial adherens junctions in diabetic retinas by causing dissociation of vascular endothelial-cadherin from  $\beta$ -catenin. We further demonstrate that neutralization of NOTCH1 ligands prevents diabetes-induced retinal edema. Collectively, these results identify a fundamental process in diabetes-mediated vascular permeability and provide translational rationale for targeting the NOTCH pathway (primarily JAGGED1) in conditions characterized by compromised vascular barrier function.**

diabetic macular edema | diabetic retinopathy | NOTCH | JAG1 | DLL4

Diabetes mellitus (DM) is a major health challenge of the 21st century (1). One of the most prevalent primary complications of DM is diabetic retinopathy (DR), which is the leading cause of blindness in the working-age population of industrialized countries (2, 3). Initially characterized by nonproliferative DR with early clinical symptoms of microvascular complications such as microaneurysms and retinal hemorrhages, DR can progress to a proliferative form associated with leaky neovessels, vitreal contraction, and retinal detachment. The most common visual complication that compromises central vision in 25% of diabetic patients is diabetic macular edema (DME) (4), a localized thickening and swelling of the macular area secondary to fluid extravasation. While the root causes of pathological permeability of the retinal vasculature have been linked in part to the progressive overproduction of vasomodulatory molecules, such as vascular endothelial growth factor (VEGF) (5, 6), or neuronal factors produced by stressed neurons, such as semaphorins and netrins (7, 8), there remains a void in our understanding of how mature quiescent endothelial cells (ECs) lose junctional integrity.

Extensively described as a critical pathway regulating developmental angiogenesis (7, 9–13), the NOTCH pathway remains active in the adult vasculature (14) and NOTCH signaling has been proposed to influence adult vascular homeostasis (15). Importantly, NOTCH1 has been shown to maintain vascular endothelium (VE) in a quiescent state (16, 17), and aberrations in NOTCH signaling provoke vascular disorders (18–21), in-

cluding pericyte dysfunction (22, 23). In adults, sustained NOTCH1 activity has been observed in atherosclerotic plaques (24), in premetastatic niches (25), and linked to the generation of a proinflammatory senescent-like phenotype in ECs (24, 25).

NOTCH can also signal in a noncanonical manner where uncleaved NOTCH exerts biological function independent of gene transcription (26). Notably, the unprocessed receptor was reported to signal via a complex with  $\beta$ -catenin (27). This later signaling paradigm may be particularly important in the context of cell–cell adhesion but remains to be explored.

Here we report a role for NOTCH1 in maintaining barrier function in healthy retinas and demonstrate that perturbed NOTCH1 signaling in diabetic retinopathy leads to disruption in the blood retinal barrier. We find elevated NOTCH1 ligands JAG1 and DELTA LIKE-4 (DLL4) in both the vitreous of human DME patients as

## Significance

**Diabetic retinopathy is a major cause of blindness in the working population. The most common cause of visual impairment in diabetic patients is diabetic macular edema (DME). Roughly 40% of patients with DME respond poorly to anti-VEGF therapies, which are a standard of care. Here we provide mechanistic insight for the critical role of NOTCH1 signaling in compromising endothelial junction integrity during diabetes. Besides activating canonical transcriptional pathways, we find that NOTCH1 signaling also provokes disruption of endothelial junctions via noncanonical mechanisms, such as production of nitric oxide and activation of Src signaling, leading to vascular endothelial-cadherin and  $\beta$ -catenin dissociation. Our findings have implications for future therapeutic interventions given that we find elevated NOTCH1 ligands in the vitreous of patients with DME and that their neutralization decreases pathologic vascular permeability.**

Author contributions: K.M., M.O., B.L., and P.S. designed research; K.M., M.O., C.M., A.D., V.G., A.M.W., N.T., G.M., F.B., C.D., A.C., S.C.-G., and F.R. performed research; J.-S.J., F.A.M., J.-P.G., B.L., and P.S. contributed new reagents/analytic tools; K.M., M.O., C.M., A.D., G.C., N.T., F.B., R.C., C.D., M.B., A.C., K.B., B.L., and P.S. analyzed data; and K.M., M.O., C.M., B.L., and P.S. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission. J.R.S. is a guest editor invited by the Editorial Board.

Published under the PNAS license.

<sup>1</sup>K.M., M.O., and C.M. contributed equally to this work.

<sup>2</sup>To whom correspondence should be addressed. Email: Mike.sapieha@umontreal.ca.

This article contains supporting information online at [www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1814711116/-DCSupplemental](http://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1814711116/-DCSupplemental).

Published online February 20, 2019.



well as diabetic mouse retinas and by single-cell RNA sequencing (RNA-seq), we provide evidence that within the retina, constituents of the NOTCH1 pathway are primarily expressed in the VE. Besides activating canonical transcriptional pathways, NOTCH1 signaling also provokes disruption of endothelial junctions via noncanonical mechanisms, such as production of nitric oxide and activation of Src signaling, ultimately leading to VE-cadherin and  $\beta$ -catenin dissociation. Neutralizing NOTCH1 ligands decreases pathologic retinal vascular permeability in diabetic retinas.

## Results

**JAG1 and DLL4 Are Induced in Mouse Diabetic Retinas Secondary to Hyperglycemia.** To investigate the kinetics of expression of NOTCH1 and its ligands during progression of DR, we used the streptozotocin (STZ) mouse model of type 1 diabetes mellitus. STZ was administered to 6-wk-old C57BL/6 mice over 5 consecutive days (mice were considered diabetic when their glycemia exceeded 17 mM) (Fig. 1A).

Reverse-transcription qPCR of retinas at 4 and 8 wk of diabetes confirmed that *Jag1*, *Dll4*, and *Notch1* transcripts rose with diabetes (Fig. 1B and *SI Appendix*, Fig. S1). Similarly, retinal protein levels of NOTCH1 ligands JAG1 and DLL4 (Fig. 1C and D) and effector genes *Hes1*, *Hes5*, and *Hey2* were significantly increased at 8 wk of diabetes (Fig. 1E).

Given the presence of NOTCH1 ligands in diabetic retinas, we next investigated if hyperglycemia itself could trigger production of JAG1 and DLL4 directly in ECs. Human microvascular endothelial cells (HRMECs) were exposed to normal culture media with 5 mM glucose, high concentration of D-glucose (25 mM), or nonmetabolized control L-glucose (25 mM). *Jag1* and *Dll4*, as well as *Hes1*, *Hes5*, and *Hey2* transcripts were induced after 24 h of hyperglycemia (25 mM of D-glucose) compared with control normoglycemia or L-glucose (Fig. 1F and G). Similarly, protein expression of JAG1 and DLL4 also rose in HRMECs after 12, 24, or 48 h of hyperglycemia (Fig. 1H), as did secretion of the ligands into supernatant (Fig. 1I). Together, these mouse data provided the rationale to explore the role of the NOTCH1 pathway in diabetes and specifically in diabetes-induced retinal vascular permeability, which is an early feature of the disease (10).

**Notch1 Pathway Is Activated in VE During Hyperglycemia and Diabetes.** To study the implication of the NOTCH1 pathway in vascular permeability, we first determined the expression of components of this pathway in the retina. Single-cell mRNA transcript analysis of retinas using Drop-seq (28) revealed enrichment in the NOTCH1 pathway in the VE, with certain effectors enriched in Müller glia, astrocytes, and pericytes [Broad Institute MSigDB: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) Notch signaling pathway] (Fig. 2A and *SI Appendix*, Fig. S2A). A t-distributed stochastic neighbor embedding (t-SNE) plot of different clustered retinal cell types with similar transcriptional profiles (*SI Appendix*, Fig. S2B) revealed high expression of *Notch1* (Fig. 2B), *Notch4* (*SI Appendix*, Fig. S2C), *Jag1*, and *Dll4* (Fig. 2C) in the VE, whereas *Notch2* and *-3* are nonvascular (Fig. 2B and *SI Appendix*, Fig. S2C). *Notch4* was not induced in STZ retinas (*SI Appendix*, Fig. S2D). Immunofluorescence staining confirmed NOTCH1 localization on retinal vessels (*SI Appendix*, Fig. S3A). We next isolated retinal vasculature from diabetic retinas by laser-capture microdissection and quantified transcripts of NOTCH1 ligands. Reverse-transcription qPCR analysis of isolated vessels revealed an increase of *Jag1* and *Dll4* mRNA expression at 8 wk of diabetes compared with citrate-injected controls (Fig. 2D). Expression of both JAG1 and DLL4 was perivascular and on retinal vessels during diabetes as confirmed by immunohistochemistry (*SI Appendix*, Fig. S3B).

Given higher expression of *Notch1* and its ligands in diabetic retinas (Figs. 1E–G and 2D and *SI Appendix*, Fig. S3), and expression of *Notch1* effector genes in the VE of mouse retinas

(Fig. 2E), we investigated the extent of activation of this pathway during diabetes and secondary to hyperglycemic stress. These data confirm that the NOTCH1 pathway is activated in the endothelium of diabetic retinas and likely via hyperglycemia.

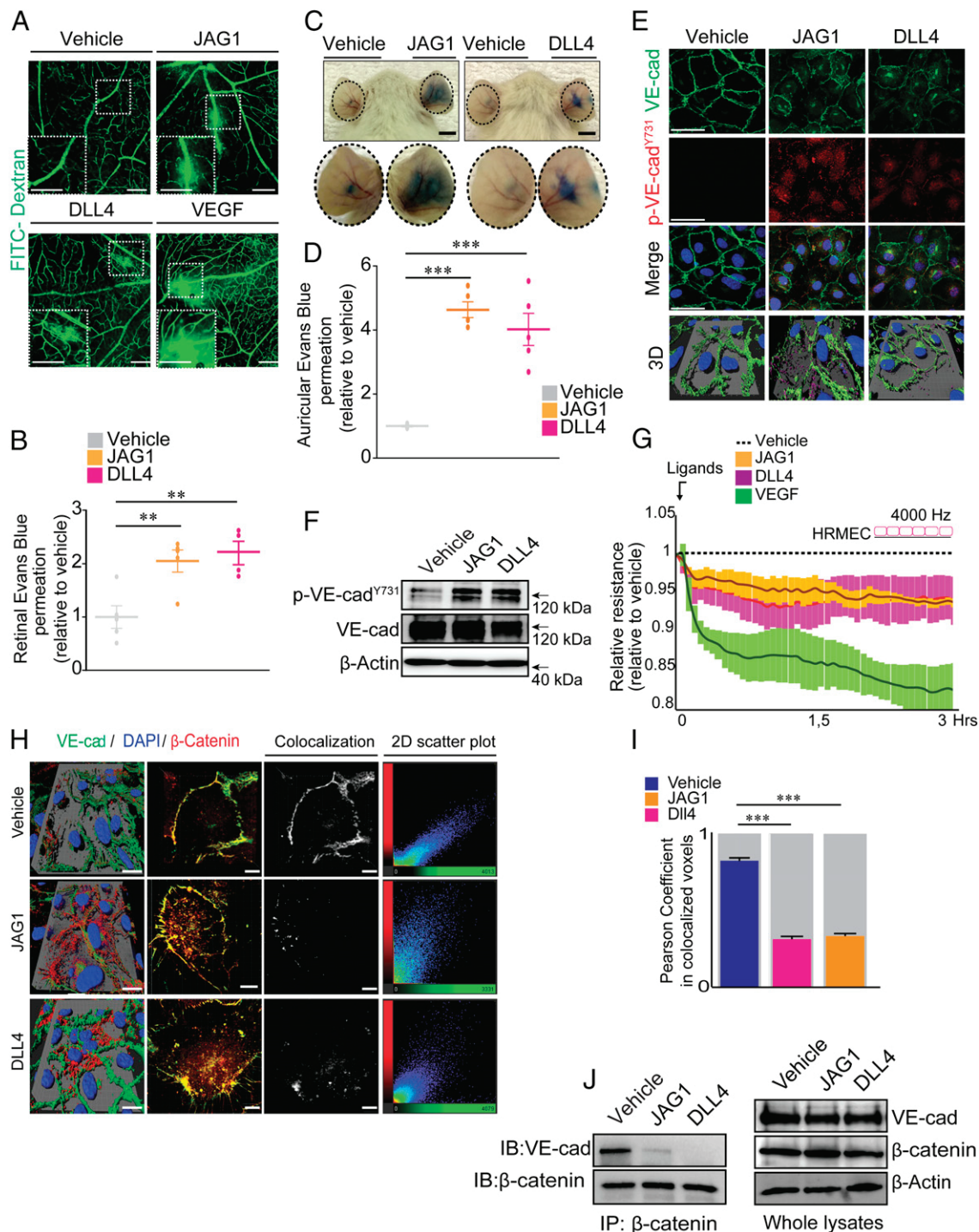
**JAG1 and DLL4 Compromise Retinal Barrier Function via Dissociation of the VE-Cadherin/ $\beta$ -Catenin Complex.** Given the elevated retinal levels of NOTCH1 ligands in conditions associated with retinal edema, we sought to determine the propensity of either JAG1 or DLL4 to compromise retinal vascular barrier function. We injected 1  $\mu$ L of either recombinant JAG1 or DLL4 into the vitreous of adult mice and evaluated vascular leakage. JAG1 was used at a concentration of 2  $\mu$ g/mL and similar molar concentration of DLL4 at 1  $\mu$ g/mL according to previously established ED50s (29, 30) and vitreal dilution. Both JAG1 and DLL4 increased retinal vascular leakage as visualized in retinal flat-mounts following perfusion with FITC-dextran (Fig. 3A) and quantified by the retinal Evans blue assay for macromolecule extravasation (Fig. 3B and *SI Appendix*, Fig. S4A). Similarly, JAG1 and DLL4 induced vascular leakage in an auricular Miles assay, suggesting a conserved mechanism throughout mature vascular beds (Fig. 3C and D).

VE-cadherin is required for maintaining transendothelial junctions and recruits  $\beta$ -catenin as a stabilizing bridge between cadherins and the cytoskeleton (31, 32). Phosphorylation of VE-cadherin on Y731 leads to dissociation of endothelial adherens junctions and results in loss of barrier function (33, 34). We exposed HRMEC monolayers to JAG1 or DLL4 and immunolocalized phosphorylated VE-cadherin/ $\beta$ -catenin (35). Both ligands induced phosphorylation of VE-cadherin on Y731 and provoked its internalization (Fig. 3E). These data were confirmed by Western blot analysis of HRMEC lysates that showed phosphorylation of VE-cadherin on Y731 in response to JAG1 or DLL4 (Fig. 3F). We next measured endothelial permeability in vitro by assessing variations in impedance in HRMEC monolayers with electric cell-substrate impedance sensing. Consistent with our in vivo data, stimulation of HRMECs with either JAG1 or DLL4 significantly decreased the impedance of monolayers (JAG1 0.78–3 h; DLL4 0.85–1.25 h,  $P < 0.05$ ) as a result of compromised cell–cell junctions (Fig. 3G). In addition, either JAG1 or DLL4 disrupted junctions at cell–cell contact points as evidenced by confocal immunofluorescence of VE-cadherin and  $\beta$ -catenin (Fig. 3H) and measurement of their colocalization by Pearson coefficient of overlapping voxels (Fig. 3I). Disruption of adherens junction complexes in HRMECs stimulated with either JAG1 or DLL4 was also confirmed by coimmunoprecipitation of VE-cadherin and  $\beta$ -catenin (Fig. 3J). Given the above results where ECs exposed to high glucose increase expression and secretion of JAG1 and DLL4 (Fig. 1I and J), we explored whether VE-cadherin dissociation from  $\beta$ -catenin could be mimicked by hyperglycemia. Similarly to NOTCH1 ligands, exposure to high glucose (25 mM D-glucose) compromised endothelial adherens junctions (*SI Appendix*, Fig. S4B and C) and led to VE-cadherin/ $\beta$ -catenin dissociation (*SI Appendix*, Fig. S4D). Taken together these data suggest that JAG1 and DLL4 contribute to hyperglycemia-induced vascular permeability.

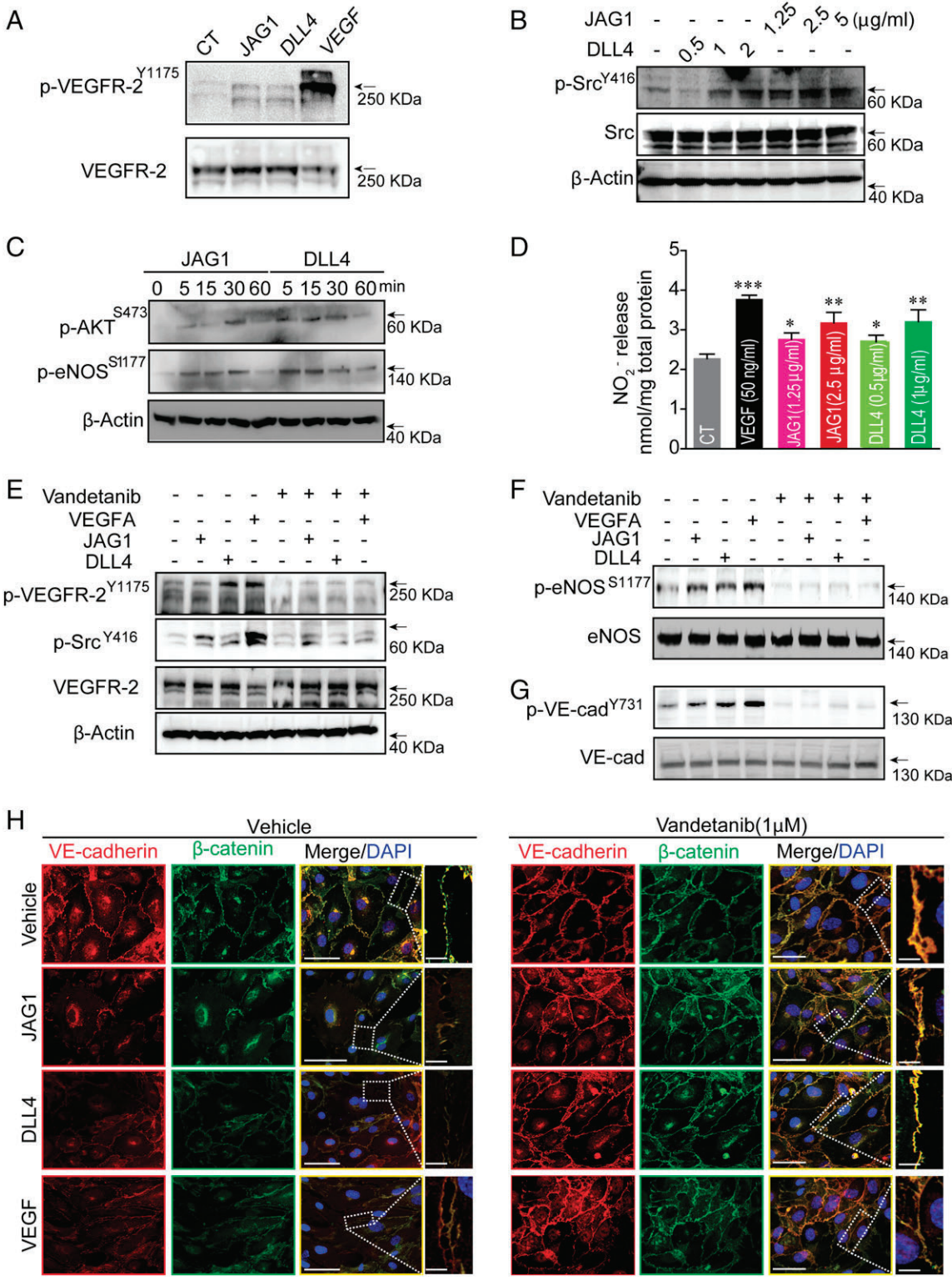
**JAG1 and DLL4 Stimulate VEGFR2-Mediated Src Activation and Nitric Oxide Production.** Endothelial barrier function compromise has been extensively studied in the context of VEGFA-induced activation of VEGFR2 (36–38) and consequent tyrosine phosphorylation of Src (35, 39, 40). Given the interplay between VEGF and NOTCH pathways in immature angiogenic vasculature (9, 11, 41), and Drop-seq data revealing high coexpression of *Notch1* and *Vegfr2* in the VE and Müller glia of retina (*SI Appendix*, Fig. S5), we examined the effects of JAG1 and DLL4 on VEGFR-2 and Src activation. Interestingly, either JAG1 or DLL4 can induce VEGFR2 phosphorylation at tyrosine 1175 in



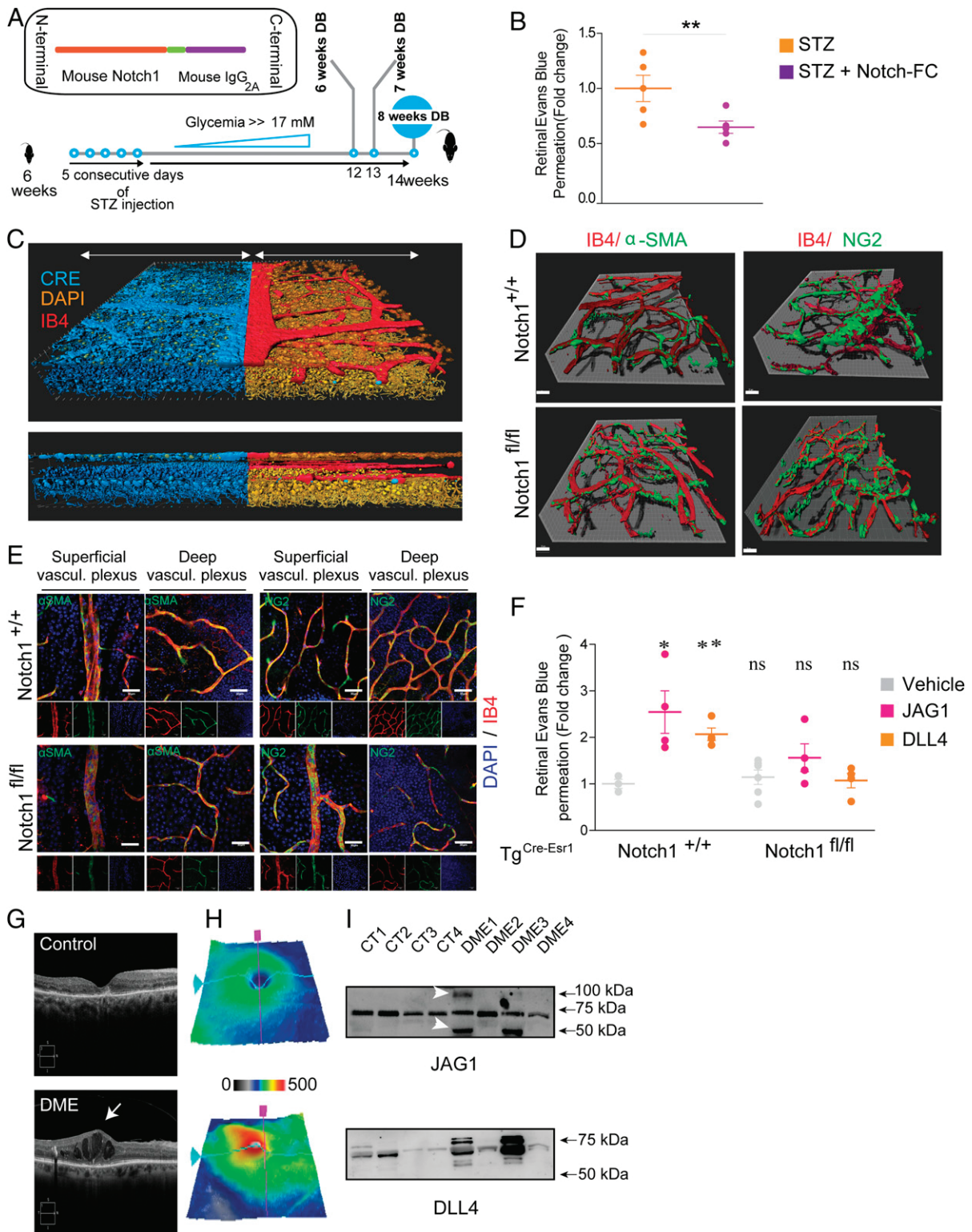




**Fig. 3.** NOTCH1 ligands induce endothelial permeability and adherens junction dissociation. (A) Retinal flatmounts after vascular permeability assay with FITC dextran following intravitreal injection of vehicle, JAG1, DLL4, or VEGF. Higher magnifications are shown in the *Inset*. (Scale bars, 200  $\mu$ m.) (B) Quantification of Evans blue extravasation induced by vehicle (PBS), JAG1, or DLL4. JAG1 ( $1.000 \pm 0.2108$ ,  $2.051 \pm 0.2064$ ,  $n = 5$ ,  $**P < 0.01$ ), DLL4 ( $1.000 \pm 0.2108$ ,  $2.201 \pm 0.2197$ ,  $n = 4$ ,  $**P < 0.01$ ). Data presented relative to control. (C) Representative photographs of CD-1 mouse ears in the auricular Miles assay with intradermal injections of vehicle (PBS), recombinant JAG1, recombinant DLL4, or recombinant VEGF and quantification of Evans blue extravasation in *D*; JAG1 ( $1.000 \pm 0.02879$ ,  $4.635 \pm 0.2498$ ,  $n = 4$ ,  $**P < 0.001$ ) and DLL4 ( $1.000 \pm 0.02879$ ,  $4.021 \pm 0.5037$ ,  $n = 5$ ,  $n = 4$ ,  $***P < 0.001$ ). (Scale bars, 10  $\mu$ m.) (E) Representative immunofluorescence for VE-cadherin (green), phospho-VE-cadherin<sup>Y731</sup> (red), and DAPI (blue) of HRMECs stimulated with JAG1 or DLL4 (30 min). Three-dimensional reconstructions of independent experiment. (Scale bars, 30  $\mu$ m.) (F) Immunoblots for anti-phospho-VE-cadherin<sup>Y731</sup> in HRMECs stimulated with JAG1 or DLL4. Pan VE-cadherin and  $\beta$ -actin are used as loading controls. (G) Paracellular resistance measured in real time by electric cell-substrate impedance sensing demonstrated that JAG1 (yellow), DLL4 (purple), and the positive control VEGF (green) compromise endothelial barrier function (1–3 h,  $n = 3–4$ ), compared with vehicle controls (dashed line) ( $P < 0.05$  for JAG1 at 0.78–3 h; DLL4 at 0.85–1.25 h). (H) Representative 3D reconstruction of immunofluorescence for  $\beta$ -catenin (red), VE-cadherin (green), and DAPI (blue) in HRMECs stimulated with JAG1 or DLL4 (30 min). (Scale bars, 30  $\mu$ m.) Colocalization at cell–cell contacts is assessed by 2D scatter plots and (I) Pearson coefficient correlation of measured fluorescence staining of VE-cadherin and  $\beta$ -catenin.  $***P < 0.001$ . (J) Immunoprecipitation of  $\beta$ -catenin and blotting with anti-VE-cadherin in HRMECs stimulated with JAG1 or DLL4 show dissociation  $\beta$ -catenin from VE-cadherin. Data expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis: one-way ANOVA with Dunnett’s multiple comparison test (B, D, and J).



**Fig. 4.** JAG1 and DLL4 activate VEGFR-2/Src and eNOS/NO pathways. (A) Immunoblot from whole HRMEC lysates stimulated with JAG1 or DLL4 probed for VEGFR-2 phosphorylation at the tyrosines 1175 and total proteins to ensure equal loading. (B) Western blot from HRMEC lysates stimulated for 15 min with ascending doses of JAG1 (1.25, 2.50, 5 μg/mL) and DLL4 (0.5, 1, 2 μg/mL) probed for Src phosphorylation and loading control total Src and β-actin. (C) Immunoblot time course for eNOS and AKT phosphorylation at serines 1177 and 473, respectively, in HRMECs stimulated with JAG1 or DLL4. β-Actin was used as a loading control. (D) Quantification of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> release from serum-starved bovine aortic ECs stimulated for 30 min with different doses of JAG1 (2.50–5 μg/mL), DLL4 (1–2 μg/mL), and VEGF (40 ng/mL). \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001. (E) Following pretreatment for 24 h with Vandetanib (1 μM), HRMECs were stimulated for 30 min with JAG1 (2 μg/mL), DLL4 (1 μg/mL), or VEGF (40 ng/mL) and p-VEGFR2<sup>Y1175</sup> and p-Src<sup>Y416</sup> assessed while (F) phosphorylation of eNOS was determined at serine 1177 and (G) VE-cadherin at tyrosine 731. Pan-VEGFR2, eNOS, VE-cadherin, and β-actin were used as loading controls. (H) Representative confocal micrographs of confluent HRMECs stained for endogenous β-catenin (green), VE-cadherin (red), and DAPI (blue). Higher magnification of outlined regions of cell–cell junctions is shown. (Scale bars: 10 μm; 50 μm in the higher magnification.)



**Fig. 5.** Inhibition of NOTCH1 and its ligands in vivo reduces pathological vascular permeability. (A) Schematic representation of recombinant NOTCH1-trap that was injected into the vitreous at 6 and 7 wk of diabetes. (B) Quantification of Evans blue extravasation at 8 wk of diabetes indicates reduced vascular permeability with NOTCH1-trap (STZ  $1.000 \pm 0.1199$ , STZ + NOTCH1 Fc  $0.6484 \pm 0.05632$ ,  $n = 5$ ,  $*P = 0.0291$ ). (C) Three-dimensional reconstruction confirming vascular expression in  $Tg^{Cre-Esr1}/EYFP$  mice. (D) Immunofluorescence of IsolectinB4 (red),  $\alpha$ -SMA (green), and NG2 (green) staining in 3D reconstructed retinas, and superficial and deep vascular plexus (E) confirm equal pericytes coverage in  $Tg^{Cre-Esr1}/Notch-1^{+/+}$  and  $Tg^{Cre-Esr1}/Notch-1^{fl/fl}$  retinas. (Scale bars, 30  $\mu$ m.) (F) Quantification of Evans blue dye (red) after intraocular injection of vehicle (PBS), JAG1, DLL4, and VEGF (positive control) in  $Tg^{Cre-Esr1}/Notch-1^{+/+}$  and  $Tg^{Cre-Esr1}/Notch-1^{fl/fl}$  retinas.  $Tg^{Cre-Esr1}/Notch-1^{+/+}$  Veh:  $1.000 \pm 0.09914$ ,  $n = 3$ , JAG1:  $2.543 \pm 0.4574$ ,  $n = 4$ ,  $*P < 0.05$ , DLL4:  $2.067 \pm 0.1360$ ,  $n = 4$ ,  $*P < 0.05$ ,  $Tg^{Cre-Esr1}/Notch-1^{fl/fl}$  Veh:  $1.144 \pm 0.1545$ ,  $n = 6$ , NS, JAG1:  $1.561 \pm 0.2988$ ,  $n = 4$ , NS, DLL4:  $1.070 \pm 0.1563$ ,  $n = 4$ , NS. Data expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis: *t* test (B) and one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test (F). (G) SD-OCT and (H) 3D retinal maps of patients suffering from DME with severe retinal swelling (red) in central foveal zones compared with control patients without retinal vascular pathologies. (I) Western blot of equal volume (10  $\mu$ L) of vitreous humor revealed the presence of JAG1 and DLL4 in patients suffering from DME.

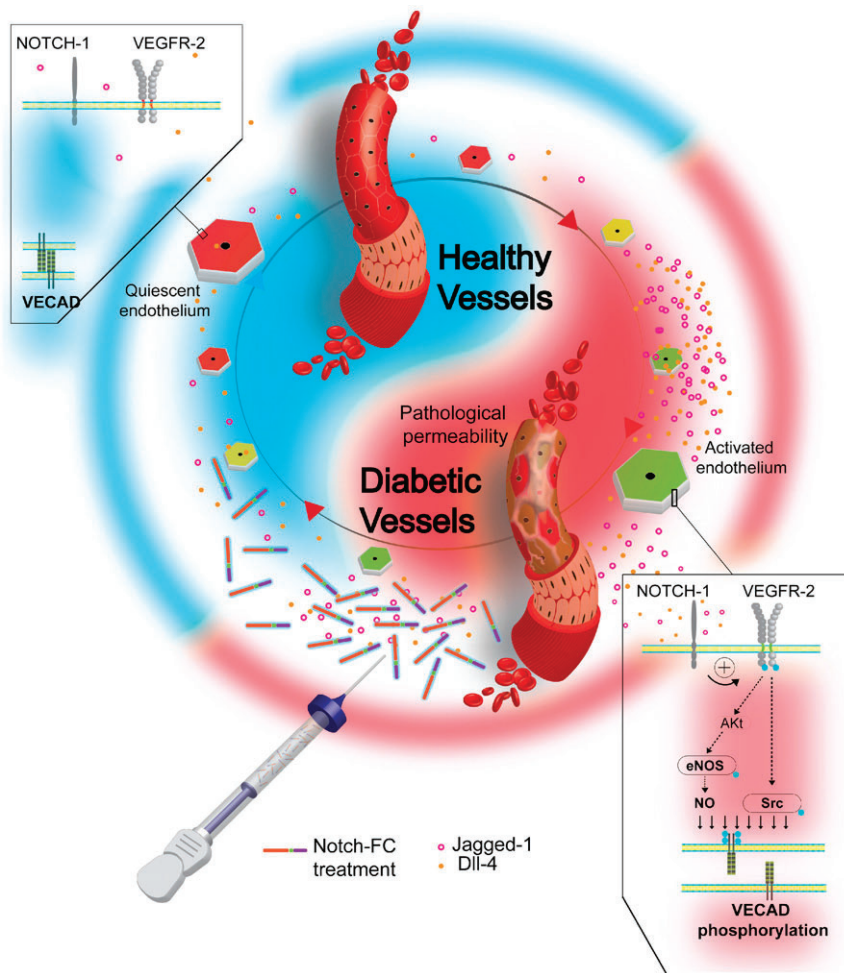


Fig. 6. Graphic representation of findings.

on VEGFR2 and its downstream activation of Src/VE-cadherin and AKT/eNOS/NO pathways.

**Inhibition of NOTCH1 Ligands Reduces Pathological Retinal Vascular Permeability.** We next investigated the potential therapeutic benefit of blocking ligands of NOTCH1 with a soluble NOTCH1-based trap (Fig. 5A). The soluble NOTCH1-trap neutralizes both JAG1 and DLL4 and prevents them from activating pathways that compromise barrier function, such as VE-cadherin phosphorylation (*SI Appendix, Fig. S6A*) or dissolution of  $\beta$ -catenin from VE-Cadherin in an HRMEC monolayer (*SI Appendix, Fig. S6 B–E*). Intravitreal injections of the NOTCH1-trap at 6 and 7 wk after induction of diabetes led to a significant reduction in diabetes-induced vascular permeability by  $\sim 30\%$  at 8 wk after STZ-induced diabetes (Fig. 5B).

To verify the requirement of NOTCH1 in JAG1- and DLL4-induced VE permeability, we next generated a whole-animal tamoxifen-inducible (Tam-inducible) Cre mouse ( $Tg^{Cre-Esr1}$ ) to conditionally delete *Notch1*. Given the robust expression of NOTCH1 in endogenous retinal VE (Fig. 2A, B, and D), we first confirmed that our Tam-inducible Cre recombinase recombines in the retinal vessels. We generated a reporter mouse by breeding  $Tg^{Cre-Esr1}$  mice with  $B6.129 \times 1-Gt(ROSA)26Sor^{Tm1(EYFP)Cos/J}$  mice and with 3D reconstruction of confocal images, we confirmed Cre expression in retinal vessels (Fig. 5C).  $Tg^{Cre-Esr1}$  mice were then crossed with *Notch1<sup>fl/fl</sup>* mouse to generate a  $Tg^{Cre-Esr1}/Notch1<sup>fl/fl</sup>$  mouse. Tamoxifen was administered intraperitoneally

(at 6–10 wk of age) for 5 consecutive days, which led to an efficient NOTCH1 knockout as determined by immunohistochemistry for retinal vasculature (*SI Appendix, Fig. S7A*) and in the whole-retinal lysates by Western blot (*SI Appendix, Fig. S7 B and C*) and qPCR (*SI Appendix, Fig. S7D*). Importantly, immunofluorescence on retinal flatmounts from  $Tg^{Cre/Esr1}/Notch1^{+/+}$  and  $Tg^{Cre/Esr1}/Notch1^{fl/fl}$  mice showed a similar levels of coverage for NG2 and  $\alpha$ SMA, demonstrating that Tam-inducible NOTCH1 knockout does not affect pericyte or smooth muscle cell coverage of retinal vasculature (Fig. 5D and E).

We next injected either JAG1 or DLL4 into the vitreous of  $Tg^{Cre/Esr1}/Notch1^{+/+}$  and  $Tg^{Cre/Esr1}/Notch1^{fl/fl}$  mice and found that mice lacking NOTCH1 maintained baseline vascular permeability, while mice expressing NOTCH1 showed vascular leakage (Fig. 5F). Collectively, these data support the role of JAG1 and DLL4 and their cognate receptor NOTCH1 in diabetes-induced vascular permeability. Additionally, these data suggest that NOTCH1 signaling in diabetes contributes to retinal vascular leakage and that neutralizing NOTCH1 ligands in diabetic retinopathy reduces pathological vascular permeability.

To determine potential clinical significance, we then investigated the levels of NOTCH ligands JAG1 and DLL4 in vitreous of patients suffering from DME (*SI Appendix, Table S1*), selected according to a macular thickness greater than 250  $\mu$ m, as determined by spectral-domain optical coherence tomography (SD-OCT) (Fig. 5G). Representative SD-OCT and 3D retinal maps of

retinas from patients with DME show macular and retinal swelling compared with control patients with nonvascular pathology (Fig. 5 *G* and *H*). Western blot analysis of NOTCH1 ligands revealed an increase in isoforms of JAG1 (Fig. 5*G*, white arrow) and DLL4, in the vitreous of a subset, but not all of patients with DME compared with controls (Fig. 5*I* and *SI Appendix*, Fig. S8).

## Discussion

While primarily studied in the context of cell specification and vascular development, NOTCH signaling has been considerably less investigated in pathology and its potential roles in driving disease mechanisms remain ill-defined. Here we present evidence that in the retina during diabetes, hyperglycemia stimulates production of JAG1 and DLL4 that through NOTCH1, compromise endothelial junctional integrity by perturbing adherens junctions. While JAG1 and DLL4 are less potent inducers of vascular permeability than VEGFA, they remain relevant in a protracted disease, such as DME, where even subtle triggers of vascular permeability can provide meaningful mechanistic and therapeutic insight (Fig. 6).

NOTCH1 has been suggested to partake in ensuring quiescence of the endothelium and contributing to vascular stability by maintaining proper interaction between pericytes and vascular smooth muscle cells (54). Our data supports that in diabetes and in ECs subjected to hyperglycemic conditions, both canonical and noncanonical NOTCH1 signaling is activated. Similar to our finding, hyperglycemia-induced production of JAG1 by ECs was previously reported in vitro (21). However, the same group demonstrated that knockdown of JAG1 specifically in ECs in vivo can prevent retinal microvasculopathy in diabetic mice (20).

While canonical transcriptional events may influence vascular homeostasis in a chronic manner throughout disease, noncanonical activation of endothelial NOTCH1 provokes rapid destabilization of the VE via mechanisms that lead to phosphorylation of VEGFR2, production of NO, and ultimately result in VE cadherin/ $\beta$ -catenin complex dissociation. Production of NO via NOTCH activation (particularly via JAG1) has previously been suggested (51) and is particularly relevant given the role of NO in mediating vascular permeability (44, 55, 56). The mechanisms by which NOTCH signaling regulates phosphorylation of VEGFR2 are not well understood. Interestingly, hyperglycemia has been associated with reactive oxygen species (ROS)-dependent phosphorylation of VEGFR2, independently of ligand binding (57). Given that NOTCH increases NO production and has been shown to regulate ROS production in endothelial cells (58), NOTCH1-dependent phosphorylation of VEGFR2 may be a consequence of exacerbated production of ROS in diabetic conditions. Alternatively, VEGFR2 phosphorylation in the presence of NOTCH ligands may result from decreased association of VE-cadherin and VEGFR2, because VE-cadherin has been shown to limit VEGFR2 signaling by preventing its internalization (59).

In concert, these events contribute to diabetes-induced vasogenic edema in the retina and, hence, suggest that the pathway is amenable to therapeutic modulation. Targeting JAG1 and DLL4 is all of the more plausible given that we observe a rise in secreted forms of the proteins and that a NOTCH1-based trap can be employed to neutralize NOTCH1 ligands and attenuate

retinal barrier function breakdown. Therapeutically beneficial modulation of NOTCH signaling with a biologic has been demonstrated for NOTCH3 in cerebral autosomal-dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy that is characterized by loss of mural cells and vessel instability (60). Machuca-Parra et al. (60) employed a NOTCH3 agonist antibody that activates NOTCH3 and prevented mural cell loss and plasma biomarkers of the disease. While we provide evidence that our NOTCH1-based trap quenches the effects of JAG1 and DLL4 on the VE, we cannot discount direct interaction with plasma membrane-resident effectors.

While typically considered as cell membrane-tethered ligands, we observed that JAG1 and DLL4 are secreted in soluble form during DR and act as paracrine factors. This is similar to what has been described for EC-secreted JAG1 in colorectal cancer, where it promotes cancer stem cells (61), and soluble DLL4, where it prevents choroidal neovascularization in models of age-related macular degeneration (62). Although JAG1 and DLL4 often trigger divergent physiological effects, in our hands both soluble forms seem to compromise retinal barrier function in DR. NOTCH signaling is traditionally activated in response to a polarized signal. Transligands carried by opposing cells activate the NOTCH receptor, whereas *cis*-ligands present on the same cell repress NOTCH activity (63, 64). The disruption of *cis/trans* NOTCH signaling in the presence of excess soluble ligands may favor noncanonical signaling that regulate transcription-independent dissociation of the VE-cadherin/ $\beta$ -catenin complex and loss of adherens junctions.

Currently, roughly 40% of patients with DME respond poorly to anti-VEGF therapies (65). Moreover, with several anti-VEGF compounds going off patent, there is an interest in elucidating novel druggable therapeutic targets. Overall, our data provide a rationale for targeting the NOTCH1 pathway and its ligands JAG1 and DLL4 for conditions associated with diabetes-induced vascular permeability, such as diabetic macular edema.

## Materials and Methods

For detailed methods, please see *SI Appendix*.

**Human Samples.** The study conforms to the tenets of the Declaration of Helsinki, and approval of the human clinical protocol was obtained from the Maisonneuve-Rosemont Hospital Ethics Committee (Ref. CER:10059). Patients consented to have their vitreous biopsied before receiving their anti-VEGF treatment and protein content analyzed.

**Animals.** Studies were performed according to the Association for Research in Vision and Ophthalmology statement for the Use of Animal in Ophthalmic and Vision Research and were approved by the Animal Care Committee of the University of Montreal in agreement with the guidelines established by the Canadian Council on Animal Care.

**ACKNOWLEDGMENTS.** This work was supported by Canadian Institutes of Health Research Grant 353770 (to P.S.); Heart & Stroke Foundation Canada Grant G-16-00014658 (to P.S.); Foundation Fighting Blindness Canada, the Diabetes Canada Grant DI-3-18-5444 (to P.S.); and Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada Grant 418637 (to P.S.). P.S. holds the Wolfe Professorship in Translational Research and a Canada Research Chair in Retinal Cell Biology. C.M. holds a scholarship from the Fonds de Recherche en Santé du Québec.

- World Health Organisation (2015) Global Report on Diabetes. Available at [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204871/9789241565257\\_eng.pdf;jsessionid=8563331FD5018F74D58858A1960CB8E8?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204871/9789241565257_eng.pdf;jsessionid=8563331FD5018F74D58858A1960CB8E8?sequence=1). Accessed February 6, 2019.
- Kempner JH, et al.; Eye Diseases Prevalence Research Group (2004) The prevalence of diabetic retinopathy among adults in the United States. *Arch Ophthalmol* 122:552–563.
- Duh EJ, Sun JK, Stitt AW (2017) Diabetic retinopathy: Current understanding, mechanisms, and treatment strategies. *JCI Insight* 2:93751.
- Moss SE, Klein R, Klein BE (1998) The 14-year incidence of visual loss in a diabetic population. *Ophthalmology* 105:998–1003.
- Hammes HP, Feng Y, Pfister F, Brownlee M (2011) Diabetic retinopathy: Targeting vasoregression. *Diabetes* 60:9–16.
- Antonetti DA, Lieth E, Barber AJ, Gardner TW (1999) Molecular mechanisms of vascular permeability in diabetic retinopathy. *Semin Ophthalmol* 14:240–248.
- Cerani A, et al. (2013) Neuron-derived semaphorin 3A is an early inducer of vascular permeability in diabetic retinopathy via neuropilin-1. *Cell Metab* 18:505–518.
- Miloudi K, et al. (2016) Truncated netrin-1 contributes to pathological vascular permeability in diabetic retinopathy. *J Clin Invest* 126:3006–3022.
- Hellström M, et al. (2007) Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature* 445:776–780.
- Benedito R, et al. (2009) The notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis. *Cell* 137:1124–1135.



11. Suchting S, et al. (2007) The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:3225–3230.
12. Dou GR, Wang L, Wang YS, Han H (2012) Notch signaling in ocular vasculature development and diseases. *Mol Med* 18:47–55.
13. Zheng M, Zhang Z, Zhao X, Ding Y, Han H (2010) The Notch signaling pathway in retinal dysplasia and retina vascular homeostasis. *J Genet Genomics* 37:573–582.
14. Hofmann JJ, Iruela-Arispe ML (2007) Notch signaling in blood vessels: Who is talking to whom about what? *Circ Res* 100:1556–1568.
15. Dou GR, et al. (2008) RBP-J, the transcription factor downstream of Notch receptors, is essential for the maintenance of vascular homeostasis in adult mice. *FASEB J* 22:1606–1617.
16. Rostama B, et al. (2015) DLL4/Notch1 and BMP9 interdependent signaling induces human endothelial cell quiescence via P27KIP1 and thrombospondin-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35:2626–2637.
17. Nosedá M, et al. (2004) Notch activation induces endothelial cell cycle arrest and participates in contact inhibition: Role of p21Cip1 repression. *Mol Cell Biol* 24:8813–8822.
18. Rostama B, Peterson SM, Vary CP, Liaw L (2014) Notch signal integration in the vasculature during remodeling. *Vascul Pharmacol* 63:97–104.
19. Gridley T (2010) Notch signaling in the vasculature. *Curr Top Dev Biol* 92:277–309.
20. Yoon CH, et al. (2016) Diabetes-induced Jagged1 overexpression in endothelial cells causes retinal capillary regression in a murine model of diabetes mellitus: Insights into diabetic retinopathy. *Circulation* 134:233–247.
21. Yoon CH, et al. (2014) High glucose-induced jagged 1 in endothelial cells disturbs notch signaling for angiogenesis: A novel mechanism of diabetic vasculopathy. *J Mol Cell Cardiol* 69:52–66.
22. Kofler NM, Cuervo H, Uh MK, Murtoimäki A, Kitajewski J (2015) Combined deficiency of Notch1 and Notch3 causes pericyte dysfunction, models CADASIL, and results in arteriovenous malformations. *Sci Rep* 5:16449.
23. Arboleda-Velasquez JF, et al. (2014) Notch signaling functions in retinal pericyte survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 55:5191–5199.
24. Liu ZJ, et al. (2012) Notch activation induces endothelial cell senescence and pro-inflammatory response: Implication of Notch signaling in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 225:296–303.
25. Wieland E, et al. (2017) Endothelial Notch1 activity facilitates metastasis. *Cancer Cell* 31:355–367.
26. Andersen P, Uosaki H, Shenje LT, Kwon C (2012) Non-canonical Notch signaling: Emerging role and mechanism. *Trends Cell Biol* 22:257–265.
27. Kwon C, et al. (2011) Notch post-translationally regulates  $\beta$ -catenin protein in stem and progenitor cells. *Nat Cell Biol* 13:1244–1251.
28. Macosko EZ, et al. (2015) Highly parallel genome-wide expression profiling of individual cells using nanoliter droplets. *Cell* 161:1202–1214.
29. Nobta M, et al. (2005) Critical regulation of bone morphogenetic protein-induced osteoblastic differentiation by Delta1/Jagged1-activated Notch1 signaling. *J Biol Chem* 280:15842–15848.
30. Shimizu K, et al. (1999) Mouse jagged1 physically interacts with notch2 and other notch receptors. Assessment by quantitative methods. *J Biol Chem* 274:32961–32969.
31. Huber AH, Stewart DB, Laurents DV, Nelson WJ, Weis WI (2001) The cadherin cytoplasmic domain is unstructured in the absence of beta-catenin. A possible mechanism for regulating cadherin turnover. *J Biol Chem* 276:12301–12309.
32. Yap AS, Briehner WM, Gumbiner BM (1997) Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13:119–146.
33. Potter MD, Barbero S, Cheresch DA (2005) Tyrosine phosphorylation of VE-cadherin prevents binding of p120- and beta-catenin and maintains the cellular mesenchymal state. *J Biol Chem* 280:31906–31912.
34. Schlaepfer DD, Hanks SK, Hunter T, van der Geer P (1994) Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature* 372:786–791.
35. Schepcke L, et al. (2008) Retinal vascular permeability suppression by topical application of a novel VEGFR2/Src kinase inhibitor in mice and rabbits. *J Clin Invest* 118:2337–2346.
36. Hudson N, et al. (2014) Differential apicobasal VEGF signaling at vascular blood-neural barriers. *Dev Cell* 30:541–552.
37. Li X, et al. (2016) VEGFR2 pY949 signalling regulates adherens junction integrity and metastatic spread. *Nat Commun* 7:11017.
38. Weis SM, Cheresch DA (2005) Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. *Nature* 437:497–504.
39. Eliceiri BP, et al. (1999) Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Mol Cell* 4:915–924.
40. Sun Z, et al. (2012) VEGFR2 induces c-Src signaling and vascular permeability in vivo via the adaptor protein TSA1. *J Exp Med* 209:1363–1377.
41. Lobov IB, et al. (2007) Delta-like ligand 4 (Dll4) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:3219–3224.
42. Dejana E, Giampietro C (2012) Vascular endothelial-cadherin and vascular stability. *Curr Opin Hematol* 19:218–223.
43. Lampugnani MG, et al. (2010) CCM1 regulates vascular-lumen organization by inducing endothelial polarity. *J Cell Sci* 123:1073–1080.
44. Fukumura D, et al. (2001) Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:2604–2609.
45. Dayanir V, Meyer RD, Lashkari K, Rahimi N (2001) Identification of tyrosine residues in vascular endothelial growth factor receptor-2/FLK-1 involved in activation of phosphatidylinositol 3-kinase and cell proliferation. *J Biol Chem* 276:17686–17692.
46. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L (2006) VEGF receptor signalling—In control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:359–371.
47. Blanes MG, Oubaha M, Rautureau Y, Gratton JP (2007) Phosphorylation of tyrosine 801 of vascular endothelial growth factor receptor-2 is necessary for Akt-dependent endothelial nitric-oxide synthase activation and nitric oxide release from endothelial cells. *J Biol Chem* 282:10660–10669.
48. Dimmeler S, et al. (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399:601–605.
49. Oubaha M, Gratton JP (2009) Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase by atypical PKC zeta contributes to angiopoietin-1-dependent inhibition of VEGF-induced endothelial permeability in vitro. *Blood* 114:3343–3351.
50. Fulton D, et al. (1999) Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 399:597–601.
51. Chang AC, et al. (2011) Notch initiates the endothelial-to-mesenchymal transition in the atrioventricular canal through autocrine activation of soluble guanylyl cyclase. *Dev Cell* 21:288–300.
52. Wedge SR, et al. (2002) ZD6474 inhibits vascular endothelial growth factor signaling, angiogenesis, and tumor growth following oral administration. *Cancer Res* 62:4645–4655.
53. Hennequin LF, et al. (2002) Novel 4-anilinoquinazolines with C-7 basic side chains: Design and structure activity relationship of a series of potent, orally active, VEGF receptor tyrosine kinase inhibitors. *J Med Chem* 45:1300–1312.
54. Schepcke L, et al. (2012) Notch promotes vascular maturation by inducing integrin-mediated smooth muscle cell adhesion to the endothelial basement membrane. *Blood* 119:2149–2158.
55. Kubes P, Granger DN (1992) Nitric oxide modulates microvascular permeability. *Am J Physiol* 262:H611–H615.
56. Murohara T, et al. (1998) Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin. *Circulation* 97:99–107.
57. Warren CM, Ziyad S, Briot A, Der A, Iruela-Arispe ML (2014) A ligand-independent VEGFR2 signaling pathway limits angiogenic responses in diabetes. *Sci Signal* 7:ra1.
58. Vieceli Dalla Sega F, et al. (2017) Context-dependent function of ROS in the vascular endothelium: The role of the Notch pathway and shear stress. *Biofactors* 43:475–485.
59. Lampugnani MG, Orsenigo F, Gagliani MC, Tacchetti C, Dejana E (2006) Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments. *J Cell Biol* 174:593–604.
60. Machuca-Parra AI, et al. (2017) Therapeutic antibody targeting of Notch3 signaling prevents mural cell loss in CADASIL. *J Exp Med* 214:2271–2282.
61. Lu J, et al. (2013) Endothelial cells promote the colorectal cancer stem cell phenotype through a soluble form of Jagged-1. *Cancer Cell* 23:171–185.
62. Camelo S, et al. (2012) Delta-like 4 inhibits choroidal neovascularization despite opposing effects on vascular endothelium and macrophages. *Angiogenesis* 15:609–622.
63. Bray SJ (2016) Notch signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17:722–735.
64. Palmer WH, Jia D, Deng WM (2014) Cis-interactions between Notch and its ligands block ligand-independent Notch activity. *eLife* 3.
65. Gonzalez VH, et al. (2016) Early and long-term responses to anti-vascular endothelial growth factor therapy in diabetic macular edema: Analysis of protocol I data. *Am J Ophthalmol* 172:72–79.

## **Annexe 3: Tableau S2 Oncotarget, 2016 (Chapitre 2)**

**Table S3. Gene Set for Phase 3 Analysis (from Ingenuity Pathway Analysis knowledge base, June, 2015)**

hsa-miR-146a-5p Expression

CFH

TLR4

BRCA1

CCL8

FADD

IRF5

STAT1

TNF

ATOH8

BLMH

CAT

CCL2

CCNA2

CDKN3

COL13A1

CXCR4

KIF22

LTB

MCM10

MCPH1

METTL7A

MR1

NFIX

PA2G4

PBLD

PDIK1L

PEX11G

PLEKHA4

POLE2

PRR15

RAD54L

RELA

SDCBP2

TBX21

TIMELESS

TMSB15A

TRIM14

UHRF1

VWCE

hsa-miR-146a-5p Activation

Erk  
Jnk  
FAK  
FGR  
FYN  
HCK  
LCK  
LYN  
MAPK14  
NFkB  
P38 MAPK  
PTK2B  
PXN  
SRC  
YES1

hsa-miR-146a-5p Secretion

CCL2  
CXCL8  
IL6  
MMP9

hsa-miR-146a-5p RNA-RNA (Positive)

CFH  
TLR4  
BRCA1  
CCL8  
FADD  
IRF5  
STAT1  
ATOH8  
BLMH  
CCNA2  
CDKN3  
COL13A1  
CXCR4  
KIF22  
LTB

MCM10  
MCPH1  
METTL7A  
MR1  
NFI  
PA2G4  
PBLD  
PDIK1L  
PEX11G  
PLEKHA4  
POLE2  
PRR15  
RAD54L  
SDCBP2  
TIMELESS  
TMSB15A  
TRIM14  
UHRF1  
VWCE

hsa-miR-106b-5p Expression Regulated by

APP

PNPT1

radiation

5-fluorouracil

AGO2

EPHB6

PASMC cells

TP53

VPR

gamma radiation

hypoxia

SIX1

AGO2

EPHB6

SSB

hepatitis c virus subtype 1b

sirolimus

\*\*\*sirolimus

hsa-miR-106b-5p Affects Regulation of

CDKN1A

ITCH

TGFBR2

E2F1

APP

SMAD6

SMAD7

SMAD2

SMAD3

hsa-miR-106b-5p Phosphorylation of

SMAD2

SMAD3

hsa-miR-106b-5p Affects Translation of

TGFBR2

E2F1

hsa-miR-106b-5p Expression of

CDKN1A

ITCH

TGFBR2

E2F1

APP

hsa-miR-106b-5p Localization Regulated by

RPS15

hsa-miR-106b-5p Process

binding of extracellular matrix

hsa-miR-106b-5p RNA-RNA (Positive)

APP

ZNF512B

hsa-miR-152-3p Affects Expression of

DNMT1

hsa-miR-152-3p Expression Regulated by

TLR3

TMEM8B

Insulin

docetaxel

hsa-miR-152-3p Regulates

NR112

hsa-miR-152-3p Regulated by

TLR3

TAT

VPR

TMEM8B

docetaxel

metribolone

PPARA

Insulin

acetaminophen

hsa-miR-152-3p Binds

RPS6KA5

DNMT3B

NR112

DNMT1

CCKBR

## **Annexe 4: Tableau S3 Oncotarget, 2016 (Chapitre 2)**

AMD-SNP findings for all SNPs present in each NV AMD-related gene



**Table S3. Association Results for Neovascular AMD with sequence Variants in hsa-miR-related genes**

Chr	Chrpos	SNP	Allele		Case	Control	Associated Gene		p-value	q-value	Associated miRNA
			A	B			ENSG Symbol	HGNC Symbol			
1	196685194	rs1061147	A	C	4486	50356	ENSG00000000971	CFH	7,19E-187	4,22E-184	hsa-miR-146a-5p
1	196703343	rs12045503	T	C	4486	50356	ENSG00000000971	CFH	1,09E-186	4,22E-184	hsa-miR-146a-5p
1	196703324	rs12038333	A	G	4486	50357	ENSG00000000971	CFH	1,24E-186	4,22E-184	hsa-miR-146a-5p
1	196699189	rs2860102	A	T	4486	50356	ENSG00000000971	CFH	1,69E-186	4,30E-184	hsa-miR-146a-5p
1	196699157	rs10922102	T	C	4486	50356	ENSG00000000971	CFH	2,17E-186	4,30E-184	hsa-miR-146a-5p
1	196688525	rs10801554	T	C	4486	50367	ENSG00000000971	CFH	3,17E-186	4,30E-184	hsa-miR-146a-5p
1	196692375	rs10922094	C	G	4486	50357	ENSG00000000971	CFH	3,45E-186	4,30E-184	hsa-miR-146a-5p
1	196677131	rs572515	A	G	4486	50356	ENSG00000000971	CFH	3,78E-186	4,30E-184	hsa-miR-146a-5p
1	196686613	rs10801553	A	C	4486	50367	ENSG00000000971	CFH	4,04E-186	4,30E-184	hsa-miR-146a-5p
1	196677046	rs1329424	T	G	4486	50356	ENSG00000000971	CFH	4,53E-186	4,30E-184	hsa-miR-146a-5p
1	196687075	rs1329421	A	T	4486	50356	ENSG00000000971	CFH	4,69E-186	4,30E-184	hsa-miR-146a-5p
1	196689149	rs7529589	T	C	4486	50356	ENSG00000000971	CFH	5,05E-186	4,30E-184	hsa-miR-146a-5p
1	196686150	rs1329422	C	G	4486	50356	ENSG00000000971	CFH	8,36E-186	6,57E-184	hsa-miR-146a-5p
1	196691131	rs10801555	A	G	4486	49871	ENSG00000000971	CFH	1,01E-185	7,37E-184	hsa-miR-146a-5p
1	196686583	rs2300430	T	C	4486	50355	ENSG00000000971	CFH	7,71E-185	5,25E-183	hsa-miR-146a-5p
1	196701627	rs4658046	T	C	4486	50356	ENSG00000000971	CFH	2,93E-184	1,87E-182	hsa-miR-146a-5p
1	196689367	rs482934	T	G	4387	50237	ENSG00000000971	CFH	2,77E-181	1,66E-179	hsa-miR-146a-5p
1	196705140	rs203687	T	C	4486	50366	ENSG00000000971	CFH	4,00E-180	2,27E-178	hsa-miR-146a-5p
1	196704672	rs9970784	T	C	4486	50368	ENSG00000000971	CFH	4,75E-180	2,55E-178	hsa-miR-146a-5p
1	196706049	rs1887973	C	G	4486	50366	ENSG00000000971	CFH	6,48E-180	3,31E-178	hsa-miR-146a-5p
1	196705787	rs2019724	T	C	4486	50359	ENSG00000000971	CFH	7,17E-180	3,49E-178	hsa-miR-146a-5p
1	196706441	rs6428357	A	G	4486	50366	ENSG00000000971	CFH	8,06E-180	3,74E-178	hsa-miR-146a-5p
1	196708815	rs203685	A	C	4486	50366	ENSG00000000971	CFH	9,33E-180	4,14E-178	hsa-miR-146a-5p
1	196708033	rs1410997	A	C	4486	50368	ENSG00000000971	CFH	1,01E-179	4,17E-178	hsa-miR-146a-5p
1	196723340	rs393955	A	C	4486	50366	ENSG00000000971	CFH	1,02E-179	4,17E-178	hsa-miR-146a-5p
1	196715495	rs203674	T	G	4486	50366	ENSG00000000971	CFH	1,07E-179	4,20E-178	hsa-miR-146a-5p
1	196704863	rs1831282	A	C	4486	50366	ENSG00000000971	CFH	1,28E-179	4,84E-178	hsa-miR-146a-5p
1	196723542	rs381974	A	G	4486	50366	ENSG00000000971	CFH	1,49E-179	5,44E-178	hsa-miR-146a-5p
1	196727607	rs403846	T	C	4486	50366	ENSG00000000971	CFH	1,65E-179	5,81E-178	hsa-miR-146a-5p
1	196729142	rs395544	A	G	4486	50366	ENSG00000000971	CFH	2,22E-179	7,56E-178	hsa-miR-146a-5p
1	196707805	rs10733086	A	T	4486	50368	ENSG00000000971	CFH	2,31E-179	7,61E-178	hsa-miR-146a-5p
1	196731921	rs380390	C	G	4486	50366	ENSG00000000971	CFH	5,15E-178	1,64E-176	hsa-miR-146a-5p
1	196710325	rs10737680	A	C	4485	50367	ENSG00000000971	CFH	1,54E-176	4,77E-175	hsa-miR-146a-5p
1	196727803	rs1410996	A	G	4485	50368	ENSG00000000971	CFH	2,01E-175	6,04E-174	hsa-miR-146a-5p
1	196717522	rs3753395	A	T	4485	50368	ENSG00000000971	CFH	1,18E-174	3,44E-173	hsa-miR-146a-5p
1	196722334	rs10922106	A	G	4485	50368	ENSG00000000971	CFH	1,92E-174	5,45E-173	hsa-miR-146a-5p
1	196732154	rs7540032	T	C	4485	50368	ENSG00000000971	CFH	3,06E-174	8,45E-173	hsa-miR-146a-5p

1	196733680	rs1329428	T	C	4485	50337	ENSG00000000971	CFH	4,25E-174	1,14E-172	hsa-miR-146a-5p
1	196690107	rs1061170	T	C	4341	48703	ENSG00000000971	CFH	1,34E-150	3,51E-149	hsa-miR-146a-5p
1	196673103	rs800292	A	G	4486	50358	ENSG00000000971	CFH	4,54E-92	1,16E-90	hsa-miR-146a-5p
1	196693329	rs10922096	T	C	4486	50368	ENSG00000000971	CFH	1,29E-86	3,21E-85	hsa-miR-146a-5p
1	196663340	rs6680396	A	G	4486	50360	ENSG00000000971	CFH	8,13E-82	1,98E-80	hsa-miR-146a-5p
1	196729815	rs12144939	T	G	4415	50285	ENSG00000000971	CFH	1,27E-81	3,02E-80	hsa-miR-146a-5p
1	196729581	rs1576340	T	G	4486	50357	ENSG00000000971	CFH	9,39E-77	2,18E-75	hsa-miR-146a-5p
1	196692408	rs12124794	A	T	4486	50365	ENSG00000000971	CFH	1,36E-75	3,09E-74	hsa-miR-146a-5p
1	196741786	rs16840522	T	C	4316	50172	ENSG00000000971	CFH	1,81E-74	4,02E-73	hsa-miR-146a-5p
1	196717788	rs6677604	A	G	4415	50253	ENSG00000000971	CFH	2,68E-74	5,83E-73	hsa-miR-146a-5p
1	196711684	rs1831281	T	C	4486	50366	ENSG00000000971	CFH	2,94E-74	6,26E-73	hsa-miR-146a-5p
1	196705584	rs2019727	A	T	4415	50291	ENSG00000000971	CFH	1,01E-73	2,11E-72	hsa-miR-146a-5p
1	196745470	rs10801560	A	C	4486	50366	ENSG00000000971	CFH	6,86E-72	1,40E-70	hsa-miR-146a-5p
1	196733395	rs2284664	T	C	4486	50345	ENSG00000000971	CFH	1,27E-71	2,54E-70	hsa-miR-146a-5p
1	196665976	rs529825	A	G	3560	46919	ENSG00000000971	CFH	1,43E-71	2,81E-70	hsa-miR-146a-5p
1	196745540	rs10801561	A	T	4387	50247	ENSG00000000971	CFH	6,04E-71	1,16E-69	hsa-miR-146a-5p
1	196693917	rs12041668	T	C	3559	46924	ENSG00000000971	CFH	5,06E-62	9,57E-61	hsa-miR-146a-5p
1	196706731	rs6695321	A	G	4486	50368	ENSG00000000971	CFH	9,89E-58	1,84E-56	hsa-miR-146a-5p
1	196654207	rs7524776	T	C	3658	47030	ENSG00000000971	CFH	1,24E-57	2,26E-56	hsa-miR-146a-5p
1	196683704	rs16840422	T	C	4415	50286	ENSG00000000971	CFH	2,17E-46	3,89E-45	hsa-miR-146a-5p
1	196682615	rs16840419	A	G	4415	50286	ENSG00000000971	CFH	2,30E-46	4,05E-45	hsa-miR-146a-5p
1	196679483	rs12127759	T	C	4415	50286	ENSG00000000971	CFH	5,27E-46	9,13E-45	hsa-miR-146a-5p
1	196682702	rs3766404	T	C	4414	50125	ENSG00000000971	CFH	1,26E-45	2,15E-44	hsa-miR-146a-5p
1	196749084	rs402032	C	G	3560	46920	ENSG00000000971	CFH	6,38E-45	1,07E-43	hsa-miR-146a-5p
1	196740093	rs424535	A	T	4486	50368	ENSG00000000971	CFH	9,58E-37	1,58E-35	hsa-miR-146a-5p
1	196727745	rs419137	T	G	3415	45273	ENSG00000000971	CFH	6,86E-18	1,11E-16	hsa-miR-146a-5p
1	196677257	rs1329423	T	C	4486	50362	ENSG00000000971	CFH	1,44E-05	0,00021909	hsa-miR-146a-5p
1	196692483	rs12405238	T	G	4486	50362	ENSG00000000971	CFH	0,00054732	0,00745564	hsa-miR-146a-5p
1	196653771	rs487114	A	C	2385	6271	ENSG00000000971	CFH	0,00418	0,0361909	hsa-miR-146a-5p
1	196653234	rs512900	T	C	2385	6271	ENSG00000000971	CFH	0,0089035	0,06184727	hsa-miR-146a-5p
1	196694799	rs12993529	A	C	4387	50237	ENSG00000000971	CFH	0,013276	0,0797854	hsa-miR-146a-5p
1	196718385	rs10489456	A	G	3557	46922	ENSG00000000971	CFH	0,042801	0,2102305	hsa-miR-146a-5p
1	196651787	rs3753394	T	C	4485	50363	ENSG00000000971	CFH	0,0813	0,3391819	hsa-miR-146a-5p
1	196723018	rs11801630	T	C	4486	50364	ENSG00000000971	CFH	0,10048	0,3826846	hsa-miR-146a-5p
1	196731192	rs11799595	C	G	4486	50367	ENSG00000000971	CFH	0,12765	0,4256904	hsa-miR-146a-5p
1	196695082	rs12517492	T	C	4486	50368	ENSG00000000971	CFH	0,16177	0,4747631	hsa-miR-146a-5p
1	196741027	rs11582939	T	C	4486	50348	ENSG00000000971	CFH	0,16431	0,4761558	hsa-miR-146a-5p
1	196740644	rs1065489	T	G	4483	50333	ENSG00000000971	CFH	0,16513	0,4765712	hsa-miR-146a-5p
1	196739325	rs11799380	A	G	4486	50368	ENSG00000000971	CFH	0,22338	0,5417929	hsa-miR-146a-5p
1	196736390	rs742855	T	C	4483	50364	ENSG00000000971	CFH	0,23144	0,5511708	hsa-miR-146a-5p
1	196735867	rs70620	A	G	4483	50364	ENSG00000000971	CFH	0,2854	0,5823242	hsa-miR-146a-5p
1	196726612	rs3753396	A	G	4483	50363	ENSG00000000971	CFH	0,37177	0,6251936	hsa-miR-146a-5p
4	102522412	rs1599961	A	G	4486	50366	ENSG00000109320	NFKB1	0,00053348	0,00736532	hsa-miR-146a-5p

4	102554287	rs4648011	T	G	4486	50332	ENSG00000109320	NFKB1	0,00061623	0,00828389	hsa-miR-146a-5p
4	102517282	rs3774938	A	G	4486	50366	ENSG00000109320	NFKB1	0,00069616	0,00923684	hsa-miR-146a-5p
4	102523541	rs1585213	T	C	4486	50366	ENSG00000109320	NFKB1	0,00071214	0,00932773	hsa-miR-146a-5p
4	102589354	rs1020759	T	C	4486	50363	ENSG00000109320	NFKB1	0,00077405	0,0100103	hsa-miR-146a-5p
4	102583148	rs1005819	T	C	4486	50361	ENSG00000109320	NFKB1	0,00097735	0,01248146	hsa-miR-146a-5p
4	102582667	rs4699030	C	G	4486	50364	ENSG00000109320	NFKB1	0,0010113	0,01275558	hsa-miR-146a-5p
4	102505182	rs3774933	T	C	4486	50366	ENSG00000109320	NFKB1	0,0010388	0,01278671	hsa-miR-146a-5p
4	102593288	rs1020760	C	G	4486	50360	ENSG00000109320	NFKB1	0,0010943	0,01329476	hsa-miR-146a-5p
4	102587369	rs3774956	T	C	4486	50360	ENSG00000109320	NFKB1	0,0011061	0,01329476	hsa-miR-146a-5p
4	102560194	rs230505	T	G	4486	50364	ENSG00000109320	NFKB1	0,0011591	0,01343479	hsa-miR-146a-5p
4	102566143	rs230495	A	G	4486	50363	ENSG00000109320	NFKB1	0,0011596	0,01343479	hsa-miR-146a-5p
4	102567334	rs230496	A	G	4486	50363	ENSG00000109320	NFKB1	0,0011724	0,01343479	hsa-miR-146a-5p
4	102497800	rs980455	T	C	4486	50365	ENSG00000109320	NFKB1	0,0011835	0,01343479	hsa-miR-146a-5p
4	102524958	rs1598856	A	G	4486	50364	ENSG00000109320	NFKB1	0,0011835	0,01343479	hsa-miR-146a-5p
4	102587667	rs3821958	A	G	4486	50363	ENSG00000109320	NFKB1	0,0012032	0,01350833	hsa-miR-146a-5p
4	102576628	rs230541	A	G	4486	50361	ENSG00000109320	NFKB1	0,0012171	0,01351586	hsa-miR-146a-5p
4	102542171	rs230521	C	G	4486	50365	ENSG00000109320	NFKB1	0,0014748	0,01602915	hsa-miR-146a-5p
4	102537668	rs230526	A	G	4486	50355	ENSG00000109320	NFKB1	0,0017612	0,01860996	hsa-miR-146a-5p
4	102536428	rs230528	T	G	4486	50365	ENSG00000109320	NFKB1	0,0017669	0,01860996	hsa-miR-146a-5p
4	102536261	rs230529	T	C	4486	50365	ENSG00000109320	NFKB1	0,0018164	0,01874483	hsa-miR-146a-5p
4	102503036	rs3774932	A	G	4387	50244	ENSG00000109320	NFKB1	0,0019096	0,01950956	hsa-miR-146a-5p
4	102547361	rs93059	A	G	4486	50364	ENSG00000109320	NFKB1	0,0021699	0,02152324	hsa-miR-146a-5p
4	102555009	rs230510	A	T	4486	50366	ENSG00000109320	NFKB1	0,0027935	0,02663025	hsa-miR-146a-5p
4	102532823	rs230530	A	G	4486	50355	ENSG00000109320	NFKB1	0,0032413	0,03010452	hsa-miR-146a-5p
4	102609955	rs3774968	A	G	4486	50362	ENSG00000109320	NFKB1	0,0033815	0,03112372	hsa-miR-146a-5p
4	102523376	rs1585214	T	C	4486	50365	ENSG00000109320	NFKB1	0,0040114	0,03535195	hsa-miR-146a-5p
4	102563458	rs230491	T	C	4486	50366	ENSG00000109320	NFKB1	0,0040238	0,03535195	hsa-miR-146a-5p
4	102565059	rs230493	A	T	4486	50366	ENSG00000109320	NFKB1	0,0040429	0,03535195	hsa-miR-146a-5p
4	102560404	rs230504	T	C	4486	50366	ENSG00000109320	NFKB1	0,0040485	0,03535195	hsa-miR-146a-5p
4	102589957	rs3774959	A	G	4472	50347	ENSG00000109320	NFKB1	0,0044032	0,03780303	hsa-miR-146a-5p
4	102581394	rs11723120	A	G	4472	50347	ENSG00000109320	NFKB1	0,0046172	0,03930996	hsa-miR-146a-5p
4	102585287	rs1598859	T	C	4472	50347	ENSG00000109320	NFKB1	0,0052821	0,04317195	hsa-miR-146a-5p
4	102545592	rs230519	T	C	4486	50367	ENSG00000109320	NFKB1	0,0062021	0,04836961	hsa-miR-146a-5p
4	102579897	rs1801	C	G	4472	50347	ENSG00000109320	NFKB1	0,0066342	0,04908597	hsa-miR-146a-5p
4	102575510	rs230540	T	C	4486	50363	ENSG00000109320	NFKB1	0,0064185	0,04930455	hsa-miR-146a-5p
4	102557108	rs230509	A	G	4486	50366	ENSG00000109320	NFKB1	0,0065659	0,05006043	hsa-miR-146a-5p
4	102550094	rs230516	A	G	4486	50367	ENSG00000109320	NFKB1	0,006855	0,05112014	hsa-miR-146a-5p
4	102564623	rs230492	A	G	4486	50352	ENSG00000109320	NFKB1	0,0070077	0,05188019	hsa-miR-146a-5p
4	102574375	rs230539	A	G	4486	50363	ENSG00000109320	NFKB1	0,0076661	0,05634622	hsa-miR-146a-5p
4	102541850	rs118882	T	C	4486	50366	ENSG00000109320	NFKB1	0,0081974	0,05837114	hsa-miR-146a-5p
4	102527425	rs230535	A	C	4486	50367	ENSG00000109320	NFKB1	0,0082535	0,05837114	hsa-miR-146a-5p
4	102550782	rs230514	A	G	4486	50366	ENSG00000109320	NFKB1	0,0082579	0,05837114	hsa-miR-146a-5p
4	102577298	rs230542	T	C	4486	50361	ENSG00000109320	NFKB1	0,0082844	0,05837114	hsa-miR-146a-5p

4	102537720	rs230525	A	G	4486	50367	ENSG00000109320	NFKB1	0,0088035	0,06160382	hsa-miR-146a-5p
4	102544455	rs230520	A	G	4486	50367	ENSG00000109320	NFKB1	0,0090023	0,06184727	hsa-miR-146a-5p
4	102550277	rs230515	A	G	4486	50356	ENSG00000109320	NFKB1	0,0095882	0,06428728	hsa-miR-146a-5p
4	102527746	rs170731	A	T	4486	50367	ENSG00000109320	NFKB1	0,009597	0,06428728	hsa-miR-146a-5p
4	102512980	rs3774936	A	T	4387	50248	ENSG00000109320	NFKB1	0,0096288	0,06428728	hsa-miR-146a-5p
4	102527884	rs230534	T	C	4486	50367	ENSG00000109320	NFKB1	0,0097526	0,06428728	hsa-miR-146a-5p
4	102529220	rs230531	A	G	4486	50366	ENSG00000109320	NFKB1	0,0099038	0,06428728	hsa-miR-146a-5p
4	102568446	rs230498	A	G	4486	50365	ENSG00000109320	NFKB1	0,0099213	0,06428728	hsa-miR-146a-5p
4	102529010	rs230532	A	T	4486	50367	ENSG00000109320	NFKB1	0,009975	0,06428728	hsa-miR-146a-5p
4	102513096	rs3774937	T	C	4486	50320	ENSG00000109320	NFKB1	0,010582	0,06652052	hsa-miR-146a-5p
4	102523317	rs1585215	T	C	4486	50367	ENSG00000109320	NFKB1	0,010592	0,06652052	hsa-miR-146a-5p
4	102570567	rs230500	A	G	4486	50365	ENSG00000109320	NFKB1	0,010613	0,06652052	hsa-miR-146a-5p
4	102518908	rs4235404	C	G	4486	50367	ENSG00000109320	NFKB1	0,011655	0,0717314	hsa-miR-146a-5p
4	102528926	rs230533	A	G	4486	50364	ENSG00000109320	NFKB1	0,012646	0,07736452	hsa-miR-146a-5p
4	102598330	rs3774964	A	G	4486	50360	ENSG00000109320	NFKB1	0,014253	0,08417154	hsa-miR-146a-5p
4	102614867	rs4648128	A	G	2896	44651	ENSG00000109320	NFKB1	0,014968	0,08788599	hsa-miR-146a-5p
4	102553611	rs230511	T	C	3560	46924	ENSG00000109320	NFKB1	0,026449	0,1441239	hsa-miR-146a-5p
4	102537261	rs7679591	A	G	2363	38752	ENSG00000109320	NFKB1	0,034842	0,17726	hsa-miR-146a-5p
4	102537792	rs4648002	T	C	2363	38752	ENSG00000109320	NFKB1	0,048929	0,2335918	hsa-miR-146a-5p
4	102567781	rs4648015	C	G	2363	38753	ENSG00000109320	NFKB1	0,053763	0,246311	hsa-miR-146a-5p
4	102619623	rs7674640	T	C	4486	50368	ENSG00000109320	NFKB1	0,055643	0,2515401	hsa-miR-146a-5p
4	102545093	rs17032779	T	C	2363	38752	ENSG00000109320	NFKB1	0,068436	0,3000778	hsa-miR-146a-5p
4	102594156	rs4648055	A	G	4486	50363	ENSG00000109320	NFKB1	0,069941	0,3027784	hsa-miR-146a-5p
4	102603472	rs11722146	A	G	4486	50361	ENSG00000109320	NFKB1	0,07356	0,3157693	hsa-miR-146a-5p
4	102605517	rs3755867	A	G	4486	50361	ENSG00000109320	NFKB1	0,074544	0,3186544	hsa-miR-146a-5p
4	102598208	rs3774963	C	G	4486	50362	ENSG00000109320	NFKB1	0,076594	0,3260533	hsa-miR-146a-5p
4	102597148	rs4648068	A	G	4486	50361	ENSG00000109320	NFKB1	0,082199	0,3391819	hsa-miR-146a-5p
4	102608806	rs9790601	A	G	4486	50362	ENSG00000109320	NFKB1	0,082334	0,3391819	hsa-miR-146a-5p
4	102540402	rs4648006	T	C	4415	50292	ENSG00000109320	NFKB1	0,085545	0,3427359	hsa-miR-146a-5p
4	102604351	rs12509517	C	G	4486	50363	ENSG00000109320	NFKB1	0,089547	0,3541245	hsa-miR-146a-5p
4	102568513	rs4648016	T	C	2527	40397	ENSG00000109320	NFKB1	0,093051	0,3628481	hsa-miR-146a-5p
4	102615513	rs4648135	A	G	4415	50291	ENSG00000109320	NFKB1	0,098752	0,3792882	hsa-miR-146a-5p
4	102604193	rs12509403	T	C	3560	46920	ENSG00000109320	NFKB1	0,12786	0,4256904	hsa-miR-146a-5p
4	102583622	rs4648037	T	C	4415	50291	ENSG00000109320	NFKB1	0,12796	0,4256904	hsa-miR-146a-5p
4	102592744	rs9996972	A	T	4415	50291	ENSG00000109320	NFKB1	0,12888	0,4256904	hsa-miR-146a-5p
4	102606719	rs4648095	T	C	4415	50291	ENSG00000109320	NFKB1	0,135	0,4326398	hsa-miR-146a-5p
4	102566825	rs2293970	A	T	4415	50292	ENSG00000109320	NFKB1	0,13735	0,4357906	hsa-miR-146a-5p
4	102621044	rs10489113	T	C	4341	48723	ENSG00000109320	NFKB1	0,14978	0,4567874	hsa-miR-146a-5p
4	102615256	rs4648133	T	C	4486	50347	ENSG00000109320	NFKB1	0,15436	0,4652005	hsa-miR-146a-5p
4	102509377	rs4647972	T	C	4307	49689	ENSG00000109320	NFKB1	0,15588	0,4683997	hsa-miR-146a-5p
4	102603778	rs3774965	A	C	2915	44657	ENSG00000109320	NFKB1	0,1632	0,4750268	hsa-miR-146a-5p
4	102534190	rs4647992	T	C	4415	50280	ENSG00000109320	NFKB1	0,24493	0,5641741	hsa-miR-146a-5p
4	102576718	rs909332	A	T	4415	50291	ENSG00000109320	NFKB1	0,24594	0,5641741	hsa-miR-146a-5p

4	102576410	rs4648024	T	C	4415	50292	ENSG00000109320	NFKB1	0,24624	0,5641741	hsa-miR-146a-5p
4	102585217	rs1610152	C	G	4415	50291	ENSG00000109320	NFKB1	0,25458	0,5702724	hsa-miR-146a-5p
4	102616285	rs1609798	T	C	4486	50337	ENSG00000109320	NFKB1	0,28039	0,5823242	hsa-miR-146a-5p
4	102605911	rs4648090	A	G	4341	48727	ENSG00000109320	NFKB1	0,31854	0,5938661	hsa-miR-146a-5p
4	102620848	rs997476	T	G	4166	48421	ENSG00000109320	NFKB1	0,33064	0,6025602	hsa-miR-146a-5p
4	102612664	rs4648110	A	T	4341	48729	ENSG00000109320	NFKB1	0,34782	0,6074689	hsa-miR-146a-5p
4	102559293	rs230506	A	G	2681	43525	ENSG00000109320	NFKB1	0,60444	0,7016267	hsa-miR-146a-5p
4	102615104	rs230547	T	C	3508	46849	ENSG00000109320	NFKB1	0,64831	0,7127187	hsa-miR-146a-5p
4	102575280	rs4648022	T	C	3344	45213	ENSG00000109320	NFKB1	0,65039	0,7127187	hsa-miR-146a-5p
4	102506319	rs3774934	A	G	4171	48528	ENSG00000109320	NFKB1	0,69807	0,7253664	hsa-miR-146a-5p
4	102614748	rs4648127	T	C	4166	48535	ENSG00000109320	NFKB1	0,73644	0,7290182	hsa-miR-146a-5p
4	102597322	rs4648069	A	C	2751	43014	ENSG00000109320	NFKB1	0,85262	0,7708274	hsa-miR-146a-5p
4	102557546	rs13117745	T	C	4341	48732	ENSG00000109320	NFKB1	0,8795	0,770984	hsa-miR-146a-5p
4	102569043	rs4648018	C	G	2751	43015	ENSG00000109320	NFKB1	0,96181	0,776137	hsa-miR-146a-5p
4	102615744	rs4648141	A	G	4341	48728	ENSG00000109320	NFKB1	0,97913	0,7830653	hsa-miR-146a-5p
4	102590231	rs10489114	T	C	2751	43014	ENSG00000109320	NFKB1	0,99252	7,90E-01	hsa-miR-146a-5p
6	31587353	rs2256965	A	G	4484	50335	ENSG00000227507	LTB	3,17E-05	4,76E-04	hsa-miR-146a-5p
6	31579834	rs769177	T	C	3723	47973	ENSG00000227507	LTB	3,44E-05	0,00050976	hsa-miR-146a-5p
6	31579737	rs769178	T	G	4316	50171	ENSG00000227507	LTB	0,0012637	0,01388245	hsa-miR-146a-5p
6	31585417	rs9267502	A	G	4486	50366	ENSG00000227507	LTB	0,0017934	0,01869632	hsa-miR-146a-5p
6	31581779	rs3093553	T	G	4486	50367	ENSG00000227507	LTB	0,0049472	0,04142903	hsa-miR-146a-5p
6	31576412	rs3093662	A	G	4486	50366	ENSG00000227507	LTB	0,0067476	0,05068921	hsa-miR-146a-5p
6	31583760	rs3093562	C	G	3560	46921	ENSG00000227507	LTB	0,023707	0,1330792	hsa-miR-146a-5p
6	31579012	rs3093726	T	C	2896	44651	ENSG00000227507	LTB	0,048238	0,2313741	hsa-miR-146a-5p
6	31575981	rs3093661	A	G	3723	47974	ENSG00000227507	LTB	0,10282	0,3876265	hsa-miR-146a-5p
6	31578718	rs3093668	C	G	3723	47974	ENSG00000227507	LTB	0,13337	0,4311974	hsa-miR-146a-5p
6	31586830	rs7769073	A	T	3822	48092	ENSG00000227507	LTB	0,17172	0,4831296	hsa-miR-146a-5p
6	31579203	rs3093671	A	G	3822	48093	ENSG00000227507	LTB	0,33674	0,6045483	hsa-miR-146a-5p
6	31577614	rs3093665	A	C	2896	44651	ENSG00000227507	LTB	0,58348	0,6947744	hsa-miR-146a-5p
6	31580015	rs3093559	T	C	2896	44651	ENSG00000227507	LTB	0,59544	0,6968333	hsa-miR-146a-5p
6	31583570	rs7766988	C	G	2896	44651	ENSG00000227507	LTB	0,60503	0,7016267	hsa-miR-146a-5p
6	31579643	rs3093672	T	C	2683	41125	ENSG00000227507	LTB	0,64742	0,7127187	hsa-miR-146a-5p
8	6588279	rs3020245	C	G	4486	50335	ENSG00000147316	MCPH1	0,0010296	0,01278671	hsa-miR-146a-5p
8	6595500	rs2922855	T	C	4486	50336	ENSG00000147316	MCPH1	0,0020347	0,02058184	hsa-miR-146a-5p
8	6588306	rs3020246	T	C	4486	50333	ENSG00000147316	MCPH1	0,0020863	0,02089689	hsa-miR-146a-5p
8	6580721	rs2515521	T	C	4334	48684	ENSG00000147316	MCPH1	0,0022831	0,02242832	hsa-miR-146a-5p
8	6580817	rs13280127	T	C	4334	48685	ENSG00000147316	MCPH1	0,002781	0,02663025	hsa-miR-146a-5p
8	6604281	rs17077658	A	G	2861	9853	ENSG00000147316	MCPH1	0,0028151	0,02663025	hsa-miR-146a-5p
8	6597038	rs2442572	A	C	4486	50347	ENSG00000147316	MCPH1	0,0056241	0,04524332	hsa-miR-146a-5p
8	6544845	rs4478599	T	C	2865	46161	ENSG00000147316	MCPH1	0,0067288	0,05068921	hsa-miR-146a-5p
8	6566457	rs7817104	A	G	3893	48157	ENSG00000147316	MCPH1	0,0077301	0,05636213	hsa-miR-146a-5p
8	6598180	rs2922851	T	G	4486	50312	ENSG00000147316	MCPH1	0,010179	0,06499654	hsa-miR-146a-5p
8	6567579	rs17553964	T	G	3893	48158	ENSG00000147316	MCPH1	0,013135	0,07940511	hsa-miR-146a-5p

8	6566813	rs12549365	T	G	3893	48157	ENSG00000147316	MCPH1	0,013559	0,08100963	hsa-miR-146a-5p
8	6600229	rs2515540	A	G	3009	11489	ENSG00000147316	MCPH1	0,017592	0,1027028	hsa-miR-146a-5p
8	6567426	rs17553929	C	G	3893	48158	ENSG00000147316	MCPH1	0,017883	0,1038085	hsa-miR-146a-5p
8	6586852	rs17077619	A	G	4485	50332	ENSG00000147316	MCPH1	0,020141	0,1162553	hsa-miR-146a-5p
8	6409436	rs1550696	A	G	3748	46532	ENSG00000147316	MCPH1	0,020259	0,1162795	hsa-miR-146a-5p
8	6595954	rs2442576	A	C	4486	50356	ENSG00000147316	MCPH1	0,021492	0,1226673	hsa-miR-146a-5p
8	6586361	rs10086965	C	G	4485	50327	ENSG00000147316	MCPH1	0,021835	0,1239327	hsa-miR-146a-5p
8	6600560	rs2959788	C	G	3009	11489	ENSG00000147316	MCPH1	0,023322	0,1316413	hsa-miR-146a-5p
8	6587046	rs17077621	T	C	4486	50335	ENSG00000147316	MCPH1	0,024059	0,1343172	hsa-miR-146a-5p
8	6573056	rs17077573	A	G	3794	48038	ENSG00000147316	MCPH1	0,02422	0,1344812	hsa-miR-146a-5p
8	6572659	rs7820827	A	G	3794	48037	ENSG00000147316	MCPH1	0,026183	0,1441239	hsa-miR-146a-5p
8	6595850	rs11777882	T	C	4387	50223	ENSG00000147316	MCPH1	0,026641	0,1441239	hsa-miR-146a-5p
8	6598909	rs2442569	T	G	4387	50207	ENSG00000147316	MCPH1	0,026662	0,1441239	hsa-miR-146a-5p
8	6562969	rs3739390	C	G	3893	48160	ENSG00000147316	MCPH1	0,027386	0,1464874	hsa-miR-146a-5p
8	6589756	rs13255093	A	T	4242	48562	ENSG00000147316	MCPH1	0,027929	0,1486138	hsa-miR-146a-5p
8	6573382	rs17624865	A	G	3794	48039	ENSG00000147316	MCPH1	0,028099	0,1487437	hsa-miR-146a-5p
8	6603356	rs11785507	T	C	3009	11489	ENSG00000147316	MCPH1	0,029087	0,1523945	hsa-miR-146a-5p
8	6570283	rs2922842	A	G	3794	48038	ENSG00000147316	MCPH1	0,032408	0,1689279	hsa-miR-146a-5p
8	6570428	rs2922843	T	G	3794	48038	ENSG00000147316	MCPH1	0,032842	0,1703211	hsa-miR-146a-5p
8	6583427	rs2442584	A	G	4486	50327	ENSG00000147316	MCPH1	0,033202	0,1704576	hsa-miR-146a-5p
8	6598019	rs2922853	T	C	4486	50334	ENSG00000147316	MCPH1	0,034874	0,17726	hsa-miR-146a-5p
8	6534138	rs2922882	C	G	4340	48727	ENSG00000147316	MCPH1	0,039159	0,1970791	hsa-miR-146a-5p
8	6533661	rs2959813	C	G	4340	48728	ENSG00000147316	MCPH1	0,039739	0,1987296	hsa-miR-146a-5p
8	6532641	rs1031304	T	C	4340	48728	ENSG00000147316	MCPH1	0,040107	0,1987296	hsa-miR-146a-5p
8	6407582	rs2440450	C	G	2647	41506	ENSG00000147316	MCPH1	0,040265	0,1987296	hsa-miR-146a-5p
8	6539584	rs1823376	A	C	4387	50247	ENSG00000147316	MCPH1	0,043348	0,2118985	hsa-miR-146a-5p
8	6569875	rs2922841	T	C	3794	48038	ENSG00000147316	MCPH1	0,044892	0,2184011	hsa-miR-146a-5p
8	6589625	rs7825703	T	C	4485	50334	ENSG00000147316	MCPH1	0,047693	0,2309284	hsa-miR-146a-5p
8	6578354	rs2922861	T	C	4340	48705	ENSG00000147316	MCPH1	0,048227	0,2313741	hsa-miR-146a-5p
8	6583995	rs17077606	A	G	4486	50328	ENSG00000147316	MCPH1	0,049317	0,2337664	hsa-miR-146a-5p
8	6588425	rs10109489	A	G	4485	50332	ENSG00000147316	MCPH1	0,049537	0,2337664	hsa-miR-146a-5p
8	6515129	rs7838691	A	T	4486	50367	ENSG00000147316	MCPH1	0,050113	0,2337822	hsa-miR-146a-5p
8	6583857	rs2922859	T	G	4486	50328	ENSG00000147316	MCPH1	0,050636	0,2351483	hsa-miR-146a-5p
8	6542927	rs2515487	A	C	4242	48580	ENSG00000147316	MCPH1	0,05346	0,246026	hsa-miR-146a-5p
8	6578155	rs2922862	T	G	4341	48701	ENSG00000147316	MCPH1	0,054128	0,2468761	hsa-miR-146a-5p
8	6563952	rs2922826	T	C	3893	48159	ENSG00000147316	MCPH1	0,061949	0,2775905	hsa-miR-146a-5p
8	6614584	rs2959801	A	G	4341	48708	ENSG00000147316	MCPH1	0,062438	0,2785599	hsa-miR-146a-5p
8	6592598	rs6993124	C	G	4486	50342	ENSG00000147316	MCPH1	0,06403	0,2844204	hsa-miR-146a-5p
8	6513028	rs7013006	C	G	4486	50368	ENSG00000147316	MCPH1	0,066888	0,2945543	hsa-miR-146a-5p
8	6412070	rs11985850	A	C	3748	46533	ENSG00000147316	MCPH1	0,069007	0,3012884	hsa-miR-146a-5p
8	6636389	rs2042670	A	C	4341	48716	ENSG00000147316	MCPH1	0,069443	0,3019018	hsa-miR-146a-5p
8	6583702	rs2515526	A	G	4486	50320	ENSG00000147316	MCPH1	0,072461	0,3123641	hsa-miR-146a-5p
8	6633514	rs2911974	T	C	4341	48727	ENSG00000147316	MCPH1	0,079574	0,3345569	hsa-miR-146a-5p

8	6633454	rs2515561	A	G	4340	48711	ENSG00000147316	MCPH1	0,083222	0,3408575	hsa-miR-146a-5p
8	6585859	rs2959779	A	G	3852	44138	ENSG00000147316	MCPH1	0,083408	0,3408575	hsa-miR-146a-5p
8	6605482	rs3020252	A	G	3009	11488	ENSG00000147316	MCPH1	0,084399	0,3421097	hsa-miR-146a-5p
8	6565232	rs17624399	T	C	3893	48158	ENSG00000147316	MCPH1	0,084472	0,3421097	hsa-miR-146a-5p
8	6566442	rs7833871	T	C	3893	48158	ENSG00000147316	MCPH1	0,085287	0,3427359	hsa-miR-146a-5p
8	6560768	rs1562715	T	C	3095	8847	ENSG00000147316	MCPH1	0,089352	0,3541245	hsa-miR-146a-5p
8	6412209	rs2440444	A	C	3748	46533	ENSG00000147316	MCPH1	0,091743	0,3604995	hsa-miR-146a-5p
8	6560726	rs1562714	T	G	2432	7168	ENSG00000147316	MCPH1	0,092649	0,3626647	hsa-miR-146a-5p
8	6598035	rs2922852	T	C	4486	50366	ENSG00000147316	MCPH1	0,09511	0,3694669	hsa-miR-146a-5p
8	6559360	rs2922808	C	G	2432	7168	ENSG00000147316	MCPH1	0,097281	0,3750483	hsa-miR-146a-5p
8	6570347	rs2959776	A	C	4279	49635	ENSG00000147316	MCPH1	0,099986	0,3825895	hsa-miR-146a-5p
8	6628512	rs2912063	A	G	4341	48721	ENSG00000147316	MCPH1	0,10464	0,3915978	hsa-miR-146a-5p
8	6451435	rs2515574	C	G	3748	46532	ENSG00000147316	MCPH1	0,10564	0,3938972	hsa-miR-146a-5p
8	6633660	rs1834451	T	C	4242	48605	ENSG00000147316	MCPH1	0,10615	0,3943596	hsa-miR-146a-5p
8	6627774	rs2912062	C	G	4341	48709	ENSG00000147316	MCPH1	0,1082	0,3994421	hsa-miR-146a-5p
8	6556554	rs2922893	A	G	3095	8847	ENSG00000147316	MCPH1	0,1083	0,3994421	hsa-miR-146a-5p
8	6430312	rs2166010	T	C	2792	43142	ENSG00000147316	MCPH1	0,11251	0,4105237	hsa-miR-146a-5p
8	6556570	rs2922894	A	G	3095	8847	ENSG00000147316	MCPH1	0,11394	0,4127929	hsa-miR-146a-5p
8	6558500	rs3020235	A	C	2432	7168	ENSG00000147316	MCPH1	0,11446	0,4132115	hsa-miR-146a-5p
8	6560313	rs12547077	T	C	4486	50365	ENSG00000147316	MCPH1	0,11558	0,4157856	hsa-miR-146a-5p
8	6635679	rs2980654	A	G	4341	48716	ENSG00000147316	MCPH1	0,11599	0,4157965	hsa-miR-146a-5p
8	6421387	rs894888	A	G	4486	50362	ENSG00000147316	MCPH1	0,11722	0,4187365	hsa-miR-146a-5p
8	6556380	rs3020233	C	G	3095	8847	ENSG00000147316	MCPH1	0,11876	0,421275	hsa-miR-146a-5p
8	6569684	rs2922840	T	C	3893	48158	ENSG00000147316	MCPH1	0,12172	0,4256904	hsa-miR-146a-5p
8	6621911	rs2515559	A	G	4341	48725	ENSG00000147316	MCPH1	0,12203	0,4256904	hsa-miR-146a-5p
8	6540806	rs2922873	A	G	4384	50202	ENSG00000147316	MCPH1	0,12346	0,4256904	hsa-miR-146a-5p
8	6554419	rs2959764	C	G	2432	7168	ENSG00000147316	MCPH1	0,12602	0,4256904	hsa-miR-146a-5p
8	6620960	rs2253560	A	G	4341	48722	ENSG00000147316	MCPH1	0,12653	0,4256904	hsa-miR-146a-5p
8	6650977	rs17077763	A	G	4387	50242	ENSG00000147316	MCPH1	0,12714	0,4256904	hsa-miR-146a-5p
8	6631266	rs1974946	A	G	4340	48724	ENSG00000147316	MCPH1	0,12735	0,4256904	hsa-miR-146a-5p
8	6629928	rs3020263	A	G	4340	48722	ENSG00000147316	MCPH1	0,12806	0,4256904	hsa-miR-146a-5p
8	6616237	rs2454517	A	G	4340	48726	ENSG00000147316	MCPH1	0,12827	0,4256904	hsa-miR-146a-5p
8	6579140	rs2515518	T	C	4341	48716	ENSG00000147316	MCPH1	0,12888	0,4256904	hsa-miR-146a-5p
8	6482663	rs17077112	T	C	3251	14111	ENSG00000147316	MCPH1	0,13	0,4256904	hsa-miR-146a-5p
8	6554162	rs6991221	T	C	2432	7168	ENSG00000147316	MCPH1	0,13	0,4256904	hsa-miR-146a-5p
8	6526078	rs2515462	A	G	4486	50347	ENSG00000147316	MCPH1	0,13082	0,4270069	hsa-miR-146a-5p
8	6649925	rs2912003	C	G	4387	50197	ENSG00000147316	MCPH1	0,13255	0,4309122	hsa-miR-146a-5p
8	6553978	rs9314604	T	C	3095	8847	ENSG00000147316	MCPH1	0,13286	0,4309122	hsa-miR-146a-5p
8	6621761	rs11137041	T	G	4339	48719	ENSG00000147316	MCPH1	0,13449	0,4326398	hsa-miR-146a-5p
8	6542560	rs2515486	A	C	4242	48575	ENSG00000147316	MCPH1	0,13551	0,4326398	hsa-miR-146a-5p
8	6596921	rs2442573	T	C	4484	50333	ENSG00000147316	MCPH1	0,13613	0,4332653	hsa-miR-146a-5p
8	6405944	rs2515485	T	G	3415	45281	ENSG00000147316	MCPH1	0,13919	0,4389026	hsa-miR-146a-5p
8	6418031	rs7002509	A	G	4486	50339	ENSG00000147316	MCPH1	0,14112	0,4436192	hsa-miR-146a-5p

8	6596829	rs7844613	T	C	4486	50368	ENSG00000147316	MCPH1	0,14245	0,4456861	hsa-miR-146a-5p
8	6561309	rs11996740	A	G	4486	50357	ENSG00000147316	MCPH1	0,14265	0,4456861	hsa-miR-146a-5p
8	6631056	rs3020264	A	G	4340	48724	ENSG00000147316	MCPH1	0,14367	0,4460616	hsa-miR-146a-5p
8	6643857	rs11994063	A	G	4341	48719	ENSG00000147316	MCPH1	0,14367	0,4460616	hsa-miR-146a-5p
8	6553992	rs7004238	C	G	3095	8847	ENSG00000147316	MCPH1	0,1454	0,4487883	hsa-miR-146a-5p
8	6617968	rs2980662	C	G	4341	48725	ENSG00000147316	MCPH1	0,14784	0,4549451	hsa-miR-146a-5p
8	6553764	rs2959763	T	C	2432	7168	ENSG00000147316	MCPH1	0,14917	0,4562891	hsa-miR-146a-5p
8	6595968	rs2442575	A	T	4486	50344	ENSG00000147316	MCPH1	0,15039	0,4571688	hsa-miR-146a-5p
8	6444025	rs11137028	A	G	3748	46533	ENSG00000147316	MCPH1	0,15202	0,4595038	hsa-miR-146a-5p
8	6445150	rs2920676	T	C	3748	46533	ENSG00000147316	MCPH1	0,15751	0,4719097	hsa-miR-146a-5p
8	6525164	rs2515458	A	G	3560	46921	ENSG00000147316	MCPH1	0,15832	0,4729495	hsa-miR-146a-5p
8	6596265	rs4841333	A	G	4486	50343	ENSG00000147316	MCPH1	0,16086	0,4747631	hsa-miR-146a-5p
8	6528683	rs6990020	T	C	4341	48708	ENSG00000147316	MCPH1	0,16157	0,4747631	hsa-miR-146a-5p
8	6600917	rs2442562	T	C	3009	11488	ENSG00000147316	MCPH1	0,16665	0,478662	hsa-miR-146a-5p
8	6526726	rs2442611	C	G	3560	46915	ENSG00000147316	MCPH1	0,16726	0,478662	hsa-miR-146a-5p
8	6528318	rs2515464	T	G	4486	50351	ENSG00000147316	MCPH1	0,16726	0,478662	hsa-miR-146a-5p
8	6597758	rs4841336	T	C	4486	50350	ENSG00000147316	MCPH1	0,16858	0,481092	hsa-miR-146a-5p
8	6588265	rs2442581	A	C	3560	46878	ENSG00000147316	MCPH1	0,16929	0,4817725	hsa-miR-146a-5p
8	6567067	rs7838154	T	C	3794	48039	ENSG00000147316	MCPH1	0,1705	0,4831296	hsa-miR-146a-5p
8	6579397	rs12549864	T	C	4340	48713	ENSG00000147316	MCPH1	0,17121	0,4831296	hsa-miR-146a-5p
8	6621521	rs1057090	T	C	4339	48693	ENSG00000147316	MCPH1	0,17162	0,4831296	hsa-miR-146a-5p
8	6530692	rs734702	T	C	4486	50362	ENSG00000147316	MCPH1	0,17284	0,4831296	hsa-miR-146a-5p
8	6424431	rs7008037	T	C	4484	50368	ENSG00000147316	MCPH1	0,17345	0,4831296	hsa-miR-146a-5p
8	6529597	rs1868552	T	C	4486	50362	ENSG00000147316	MCPH1	0,17355	0,4831296	hsa-miR-146a-5p
8	6615836	rs1257	A	G	4340	48555	ENSG00000147316	MCPH1	0,17507	0,4852732	hsa-miR-146a-5p
8	6530663	rs746073	A	G	4486	50362	ENSG00000147316	MCPH1	0,17527	0,4852732	hsa-miR-146a-5p
8	6530726	rs734701	A	G	4486	50362	ENSG00000147316	MCPH1	0,1777	0,4893489	hsa-miR-146a-5p
8	6529226	rs1868554	A	T	4486	50360	ENSG00000147316	MCPH1	0,17912	0,4905584	hsa-miR-146a-5p
8	6533230	rs2442602	T	C	4486	50367	ENSG00000147316	MCPH1	0,17993	0,4905584	hsa-miR-146a-5p
8	6530785	rs734704	A	G	4486	50365	ENSG00000147316	MCPH1	0,18014	0,4905584	hsa-miR-146a-5p
8	6570881	rs2442551	A	C	3794	48038	ENSG00000147316	MCPH1	0,18054	0,4905584	hsa-miR-146a-5p
8	6572076	rs17554274	T	G	3794	48040	ENSG00000147316	MCPH1	0,18186	0,4928087	hsa-miR-146a-5p
8	6528962	rs2515468	C	G	3560	46917	ENSG00000147316	MCPH1	0,18368	0,4928087	hsa-miR-146a-5p
8	6422437	rs1966818	A	G	4484	50368	ENSG00000147316	MCPH1	0,1853	0,4955839	hsa-miR-146a-5p
8	6563053	rs3739392	A	G	4486	50350	ENSG00000147316	MCPH1	0,18631	0,4969841	hsa-miR-146a-5p
8	6534246	rs2922881	T	C	4486	50367	ENSG00000147316	MCPH1	0,19137	0,5065142	hsa-miR-146a-5p
8	6634870	rs2980655	A	T	4242	48605	ENSG00000147316	MCPH1	0,19289	0,506899	hsa-miR-146a-5p
8	6513955	rs1982386	T	C	4478	50334	ENSG00000147316	MCPH1	0,19491	0,5092869	hsa-miR-146a-5p
8	6532558	rs2515482	A	G	4486	50364	ENSG00000147316	MCPH1	0,19542	0,5093169	hsa-miR-146a-5p
8	6583204	rs2442585	A	G	4486	50340	ENSG00000147316	MCPH1	0,19875	0,510241	hsa-miR-146a-5p
8	6424594	rs7008227	C	G	4484	50367	ENSG00000147316	MCPH1	0,20057	0,5110068	hsa-miR-146a-5p
8	6581944	rs2922860	T	G	4483	50276	ENSG00000147316	MCPH1	0,20209	0,5113318	hsa-miR-146a-5p
8	6425176	rs2515555	C	G	4484	50368	ENSG00000147316	MCPH1	0,2029	0,5113318	hsa-miR-146a-5p



8	6557161	rs17624022	A	C	4486	50355	ENSG00000147316	MCPH1	0,203	0,5113318	hsa-miR-146a-5p
8	6578929	rs2442587	A	G	4341	48717	ENSG00000147316	MCPH1	0,2032	0,5113318	hsa-miR-146a-5p
8	6579756	rs2515519	C	G	4486	50333	ENSG00000147316	MCPH1	0,20522	0,5138834	hsa-miR-146a-5p
8	6633144	rs2912065	T	G	4339	48543	ENSG00000147316	MCPH1	0,20855	0,5191807	hsa-miR-146a-5p
8	6471086	rs2442495	T	G	2822	43090	ENSG00000147316	MCPH1	0,20886	0,5191807	hsa-miR-146a-5p
8	6597275	rs17625642	T	C	4486	50366	ENSG00000147316	MCPH1	0,21077	0,5224056	hsa-miR-146a-5p
8	6630206	rs2936511	C	G	4341	48726	ENSG00000147316	MCPH1	0,21118	0,5224056	hsa-miR-146a-5p
8	6566390	rs2167072	T	G	4486	50362	ENSG00000147316	MCPH1	0,2131	0,5258819	hsa-miR-146a-5p
8	6536630	rs2442599	A	G	4486	50365	ENSG00000147316	MCPH1	0,21723	0,5329766	hsa-miR-146a-5p
8	6420991	rs7018378	A	G	4486	50320	ENSG00000147316	MCPH1	0,21754	0,5329766	hsa-miR-146a-5p
8	6421858	rs1530408	A	G	4484	50368	ENSG00000147316	MCPH1	0,22379	0,5417929	hsa-miR-146a-5p
8	6515897	rs2515426	T	C	3560	46913	ENSG00000147316	MCPH1	0,22459	0,5424443	hsa-miR-146a-5p
8	6533781	rs2959812	A	G	4486	50361	ENSG00000147316	MCPH1	0,22661	0,5447475	hsa-miR-146a-5p
8	6407358	rs2440452	T	G	4483	50357	ENSG00000147316	MCPH1	0,22721	0,5449077	hsa-miR-146a-5p
8	6577881	rs2442589	T	C	4486	50317	ENSG00000147316	MCPH1	0,22953	0,5491825	hsa-miR-146a-5p
8	6526617	rs2515463	A	T	3560	46924	ENSG00000147316	MCPH1	0,23044	0,5500716	hsa-miR-146a-5p
8	6615082	rs11137038	A	G	4341	48668	ENSG00000147316	MCPH1	0,23275	0,5530015	hsa-miR-146a-5p
8	6563756	rs12546205	C	G	3893	48154	ENSG00000147316	MCPH1	0,23547	0,556874	hsa-miR-146a-5p
8	6540449	rs2922875	T	C	4486	50344	ENSG00000147316	MCPH1	0,23749	0,5603541	hsa-miR-146a-5p
8	6569534	rs2515514	A	T	4486	50348	ENSG00000147316	MCPH1	0,2398	0,5625192	hsa-miR-146a-5p
8	6478395	rs17077077	A	G	3251	14111	ENSG00000147316	MCPH1	0,2402	0,5625192	hsa-miR-146a-5p
8	6482684	rs13267816	C	G	4486	50364	ENSG00000147316	MCPH1	0,24222	0,5641741	hsa-miR-146a-5p
8	6521715	rs1960369	A	G	3560	46924	ENSG00000147316	MCPH1	0,24463	0,5641741	hsa-miR-146a-5p
8	6595238	rs2442577	A	C	4486	50363	ENSG00000147316	MCPH1	0,24463	0,5641741	hsa-miR-146a-5p
8	6516785	rs2442626	T	C	3560	46916	ENSG00000147316	MCPH1	0,24684	0,5641741	hsa-miR-146a-5p
8	6637329	rs2515563	C	G	4341	48717	ENSG00000147316	MCPH1	0,24946	0,5688896	hsa-miR-146a-5p
8	6517627	rs2515436	T	C	3560	46924	ENSG00000147316	MCPH1	0,25167	0,5701118	hsa-miR-146a-5p
8	6429212	rs2440427	A	G	4482	50351	ENSG00000147316	MCPH1	0,25328	0,5702724	hsa-miR-146a-5p
8	6521170	rs963496	A	G	3560	46924	ENSG00000147316	MCPH1	0,25338	0,5702724	hsa-miR-146a-5p
8	6627009	rs2246801	T	C	4340	48723	ENSG00000147316	MCPH1	0,25398	0,5702724	hsa-miR-146a-5p
8	6644631	rs2433150	A	G	4341	48718	ENSG00000147316	MCPH1	0,25448	0,5702724	hsa-miR-146a-5p
8	6621657	rs2912016	A	C	4339	48727	ENSG00000147316	MCPH1	0,25509	0,5702724	hsa-miR-146a-5p
8	6516184	rs4276711	T	G	4482	50365	ENSG00000147316	MCPH1	0,25921	0,576958	hsa-miR-146a-5p
8	6619105	rs7005662	T	C	4341	48723	ENSG00000147316	MCPH1	0,26001	0,5769708	hsa-miR-146a-5p
8	6520803	rs2515442	T	G	3560	46924	ENSG00000147316	MCPH1	0,26061	0,5769708	hsa-miR-146a-5p
8	6621465	rs2912010	T	C	4340	48726	ENSG00000147316	MCPH1	0,26192	0,5779533	hsa-miR-146a-5p
8	6520329	rs2442621	T	C	3560	46924	ENSG00000147316	MCPH1	0,26312	0,5792227	hsa-miR-146a-5p
8	6643230	rs2433149	C	G	4341	48729	ENSG00000147316	MCPH1	0,26363	0,5792227	hsa-miR-146a-5p
8	6525875	rs2442612	A	C	3560	46924	ENSG00000147316	MCPH1	0,26443	0,5792227	hsa-miR-146a-5p
8	6611919	rs2980666	A	G	3579	46919	ENSG00000147316	MCPH1	0,26503	0,5792227	hsa-miR-146a-5p
8	6524893	rs2515456	T	G	3560	46916	ENSG00000147316	MCPH1	0,26533	0,5792227	hsa-miR-146a-5p
8	6590528	rs2442579	T	C	4482	50316	ENSG00000147316	MCPH1	0,26734	0,5809779	hsa-miR-146a-5p
8	6462651	rs2916740	T	C	4486	50367	ENSG00000147316	MCPH1	0,26744	0,5809779	hsa-miR-146a-5p

8	6462817	rs2979652	C	G	4486	50367	ENSG00000147316	MCPH1	0,26865	0,5813509	hsa-miR-146a-5p
8	6515887	rs2515425	T	C	3560	46924	ENSG00000147316	MCPH1	0,26915	0,5813509	hsa-miR-146a-5p
8	6550695	rs2442591	A	T	4485	50331	ENSG00000147316	MCPH1	0,27055	0,5823242	hsa-miR-146a-5p
8	6531759	rs2515480	A	G	4341	48732	ENSG00000147316	MCPH1	0,27216	0,5823242	hsa-miR-146a-5p
8	6538499	rs11989242	A	G	4486	50312	ENSG00000147316	MCPH1	0,27647	0,5823242	hsa-miR-146a-5p
8	6516535	rs2442627	A	T	3560	46924	ENSG00000147316	MCPH1	0,27708	0,5823242	hsa-miR-146a-5p
8	6516794	rs2515430	T	C	3560	46924	ENSG00000147316	MCPH1	0,27908	0,5823242	hsa-miR-146a-5p
8	6517277	rs2515433	A	G	3560	46924	ENSG00000147316	MCPH1	0,27978	0,5823242	hsa-miR-146a-5p
8	6411921	rs6994734	T	G	4486	50341	ENSG00000147316	MCPH1	0,28049	0,5823242	hsa-miR-146a-5p
8	6517372	rs2515434	A	C	3560	46924	ENSG00000147316	MCPH1	0,28049	0,5823242	hsa-miR-146a-5p
8	6516475	rs2515429	T	C	3560	46924	ENSG00000147316	MCPH1	0,28139	0,5823242	hsa-miR-146a-5p
8	6615597	rs11998083	T	C	4341	48703	ENSG00000147316	MCPH1	0,28199	0,5823242	hsa-miR-146a-5p
8	6578585	rs3020243	A	T	4486	50342	ENSG00000147316	MCPH1	0,28309	0,5823242	hsa-miR-146a-5p
8	6434003	rs2442517	A	G	4339	48683	ENSG00000147316	MCPH1	0,28329	0,5823242	hsa-miR-146a-5p
8	6430592	rs2442524	A	G	4486	50367	ENSG00000147316	MCPH1	0,2835	0,5823242	hsa-miR-146a-5p
8	6516106	rs2515428	C	G	3560	46924	ENSG00000147316	MCPH1	0,2837	0,5823242	hsa-miR-146a-5p
8	6529259	rs7825407	C	G	4486	50358	ENSG00000147316	MCPH1	0,2844	0,5823242	hsa-miR-146a-5p
8	6537840	rs17077452	T	C	4484	50307	ENSG00000147316	MCPH1	0,2848	0,5823242	hsa-miR-146a-5p
8	6514980	rs2515423	A	G	3560	46924	ENSG00000147316	MCPH1	0,2854	0,5823242	hsa-miR-146a-5p
8	6426251	rs2440430	A	G	3677	46456	ENSG00000147316	MCPH1	0,2855	0,5823242	hsa-miR-146a-5p
8	6522025	rs2515445	C	G	3560	46924	ENSG00000147316	MCPH1	0,2859	0,5823242	hsa-miR-146a-5p
8	6517860	rs2442625	C	G	3560	46924	ENSG00000147316	MCPH1	0,2861	0,5823242	hsa-miR-146a-5p
8	6518817	rs2442623	A	G	3560	46924	ENSG00000147316	MCPH1	0,2873	0,582385	hsa-miR-146a-5p
8	6594263	rs17077633	A	T	2782	45184	ENSG00000147316	MCPH1	0,28851	0,5825262	hsa-miR-146a-5p
8	6518383	rs2442624	T	C	3560	46924	ENSG00000147316	MCPH1	0,29011	0,5827058	hsa-miR-146a-5p
8	6523411	rs2515449	A	G	3560	46924	ENSG00000147316	MCPH1	0,29151	0,5833602	hsa-miR-146a-5p
8	6409253	rs1550697	A	G	4486	50358	ENSG00000147316	MCPH1	0,29181	0,5833602	hsa-miR-146a-5p
8	6519620	rs2515437	C	G	3560	46924	ENSG00000147316	MCPH1	0,29272	0,5833602	hsa-miR-146a-5p
8	6516066	rs2515427	A	G	3560	46924	ENSG00000147316	MCPH1	0,29292	0,5833602	hsa-miR-146a-5p
8	6498636	rs2442476	T	G	3560	46923	ENSG00000147316	MCPH1	0,29542	0,5859608	hsa-miR-146a-5p
8	6607071	rs10100002	T	C	4387	50246	ENSG00000147316	MCPH1	0,29632	0,5859608	hsa-miR-146a-5p
8	6613605	rs2980664	A	G	4341	48654	ENSG00000147316	MCPH1	0,29652	0,5859608	hsa-miR-146a-5p
8	6521534	rs963495	C	G	3560	46924	ENSG00000147316	MCPH1	0,30003	0,587559	hsa-miR-146a-5p
8	6563630	rs2515507	T	C	4485	50273	ENSG00000147316	MCPH1	0,30113	0,587559	hsa-miR-146a-5p
8	6607721	rs10090111	T	C	4387	50245	ENSG00000147316	MCPH1	0,30203	0,587559	hsa-miR-146a-5p
8	6607296	rs10100291	T	C	4387	50247	ENSG00000147316	MCPH1	0,30253	0,587559	hsa-miR-146a-5p
8	6639934	rs4840522	T	C	3748	46532	ENSG00000147316	MCPH1	0,30263	0,587559	hsa-miR-146a-5p
8	6525785	rs2922889	A	T	4478	50334	ENSG00000147316	MCPH1	0,30343	0,587559	hsa-miR-146a-5p
8	6513782	rs17063434	A	G	3560	46924	ENSG00000147316	MCPH1	0,30353	0,587559	hsa-miR-146a-5p
8	6607456	rs10089770	T	C	4387	50246	ENSG00000147316	MCPH1	0,30403	0,587559	hsa-miR-146a-5p
8	6521935	rs2515444	A	C	3560	46924	ENSG00000147316	MCPH1	0,30423	0,587559	hsa-miR-146a-5p
8	6625961	rs2912057	T	C	4341	48724	ENSG00000147316	MCPH1	0,30594	0,5897467	hsa-miR-146a-5p
8	6643023	rs1057091	T	C	4486	50351	ENSG00000147316	MCPH1	0,30784	0,5922917	hsa-miR-146a-5p

8	6571442	rs2922845	C	G	4485	50337	ENSG00000147316	MCPH1	0,30974	0,5936645	hsa-miR-146a-5p
8	6564620	rs2515509	T	C	4486	50363	ENSG00000147316	MCPH1	0,31074	0,5936645	hsa-miR-146a-5p
8	6514024	rs2442628	T	C	4486	50366	ENSG00000147316	MCPH1	0,31194	0,5936645	hsa-miR-146a-5p
8	6627447	rs3020261	A	G	4341	48724	ENSG00000147316	MCPH1	0,31204	0,5936645	hsa-miR-146a-5p
8	6522946	rs17077313	C	G	3659	47043	ENSG00000147316	MCPH1	0,31274	0,5938661	hsa-miR-146a-5p
8	6520058	rs2922898	C	G	3560	46924	ENSG00000147316	MCPH1	0,31464	0,5938661	hsa-miR-146a-5p
8	6459644	rs2922820	T	G	4486	50367	ENSG00000147316	MCPH1	0,31544	0,5938661	hsa-miR-146a-5p
8	6462242	rs2916741	T	C	4486	50368	ENSG00000147316	MCPH1	0,31584	0,5938661	hsa-miR-146a-5p
8	6599219	rs2922849	T	C	3190	42076	ENSG00000147316	MCPH1	0,31604	0,5938661	hsa-miR-146a-5p
8	6461816	rs2916742	C	G	4486	50367	ENSG00000147316	MCPH1	0,31724	0,5938661	hsa-miR-146a-5p
8	6461739	rs7824209	T	C	4486	50367	ENSG00000147316	MCPH1	0,31744	0,5938661	hsa-miR-146a-5p
8	6564406	rs2442509	T	C	4486	50363	ENSG00000147316	MCPH1	0,31844	0,5938661	hsa-miR-146a-5p
8	6418522	rs1562712	C	G	2751	43014	ENSG00000147316	MCPH1	0,32054	0,595979	hsa-miR-146a-5p
8	6564477	rs2515508	A	G	4486	50364	ENSG00000147316	MCPH1	0,32084	0,595979	hsa-miR-146a-5p
8	6595036	rs3020248	A	G	3289	42195	ENSG00000147316	MCPH1	0,32244	0,597864	hsa-miR-146a-5p
8	6467921	rs12550299	C	G	4480	50368	ENSG00000147316	MCPH1	0,32344	0,5986318	hsa-miR-146a-5p
8	6540649	rs2922874	A	G	4486	50344	ENSG00000147316	MCPH1	0,32404	0,5986577	hsa-miR-146a-5p
8	6531695	rs12674822	T	G	4486	50350	ENSG00000147316	MCPH1	0,32684	0,6016547	hsa-miR-146a-5p
8	6608174	rs7840804	A	G	4387	50246	ENSG00000147316	MCPH1	0,32984	0,6025602	hsa-miR-146a-5p
8	6539477	rs1823375	C	G	4486	50360	ENSG00000147316	MCPH1	0,33034	0,6025602	hsa-miR-146a-5p
8	6620084	rs1971314	A	G	4341	48695	ENSG00000147316	MCPH1	0,33094	0,6025602	hsa-miR-146a-5p
8	6470872	rs2440397	C	G	4480	50365	ENSG00000147316	MCPH1	0,33214	0,6025602	hsa-miR-146a-5p
8	6540843	rs2922872	A	G	4486	50345	ENSG00000147316	MCPH1	0,33264	0,6025602	hsa-miR-146a-5p
8	6608306	rs7825469	A	T	4387	50246	ENSG00000147316	MCPH1	0,33614	0,6045483	hsa-miR-146a-5p
8	6462001	rs2922818	A	C	4486	50365	ENSG00000147316	MCPH1	0,33853	0,6045483	hsa-miR-146a-5p
8	6538236	rs12549309	T	C	4486	50328	ENSG00000147316	MCPH1	0,33853	0,6045483	hsa-miR-146a-5p
8	6536444	rs2442600	A	G	4341	48726	ENSG00000147316	MCPH1	0,33883	0,6045483	hsa-miR-146a-5p
8	6462126	rs2920660	T	G	4486	50367	ENSG00000147316	MCPH1	0,34023	0,6045483	hsa-miR-146a-5p
8	6542079	rs17077465	A	G	4486	50332	ENSG00000147316	MCPH1	0,34073	0,6045483	hsa-miR-146a-5p
8	6635665	rs2912084	C	G	4341	48729	ENSG00000147316	MCPH1	0,34123	0,6045483	hsa-miR-146a-5p
8	6599380	rs2922848	T	C	3190	42076	ENSG00000147316	MCPH1	0,34143	0,6045483	hsa-miR-146a-5p
8	6590002	rs2442580	T	C	4486	50366	ENSG00000147316	MCPH1	0,34233	0,6050931	hsa-miR-146a-5p
8	6534045	rs2959811	A	C	4341	48732	ENSG00000147316	MCPH1	0,34293	0,6051068	hsa-miR-146a-5p
8	6421917	rs17076812	A	G	4485	50360	ENSG00000147316	MCPH1	0,34513	0,6067098	hsa-miR-146a-5p
8	6539465	rs2897911	T	G	4486	50360	ENSG00000147316	MCPH1	0,34742	0,6074689	hsa-miR-146a-5p
8	6600148	rs2442567	T	C	3190	42039	ENSG00000147316	MCPH1	0,34832	0,6074689	hsa-miR-146a-5p
8	6432707	rs2442522	A	C	4486	50367	ENSG00000147316	MCPH1	0,34952	0,6074689	hsa-miR-146a-5p
8	6469544	rs7833481	A	G	4480	50367	ENSG00000147316	MCPH1	0,34962	0,6074689	hsa-miR-146a-5p
8	6420042	rs2442533	T	C	4486	50366	ENSG00000147316	MCPH1	0,35171	0,6095483	hsa-miR-146a-5p
8	6541156	rs13255574	T	C	2864	9851	ENSG00000147316	MCPH1	0,35201	0,6095483	hsa-miR-146a-5p
8	6595925	rs2922854	T	C	3190	42076	ENSG00000147316	MCPH1	0,35421	0,61232	hsa-miR-146a-5p
8	6548087	rs2442592	T	C	4415	50248	ENSG00000147316	MCPH1	0,35501	0,6126663	hsa-miR-146a-5p
8	6536259	rs2959809	T	G	4339	48524	ENSG00000147316	MCPH1	0,3596	0,6162403	hsa-miR-146a-5p

8	6532506	rs2515481	A	G	4341	48731	ENSG00000147316	MCPH1	0,3605	0,6162403	hsa-miR-146a-5p
8	6600529	rs2980676	A	G	3190	42076	ENSG00000147316	MCPH1	0,3607	0,6162403	hsa-miR-146a-5p
8	6606582	rs2515550	A	G	4387	50217	ENSG00000147316	MCPH1	0,36229	0,6179234	hsa-miR-146a-5p
8	6609161	rs2515554	A	G	4387	50245	ENSG00000147316	MCPH1	0,36439	0,6194369	hsa-miR-146a-5p
8	6608651	rs12541807	A	T	4387	50246	ENSG00000147316	MCPH1	0,36997	0,6251936	hsa-miR-146a-5p
8	6606513	rs2454518	T	C	4387	50214	ENSG00000147316	MCPH1	0,37167	0,6251936	hsa-miR-146a-5p
8	6547426	rs17553089	T	C	4415	50245	ENSG00000147316	MCPH1	0,37336	0,6263479	hsa-miR-146a-5p
8	6429720	rs6559161	T	C	4486	50363	ENSG00000147316	MCPH1	0,37476	0,6276659	hsa-miR-146a-5p
8	6429821	rs963754	T	C	4479	50361	ENSG00000147316	MCPH1	0,37805	0,6294381	hsa-miR-146a-5p
8	6637134	rs2911991	T	C	4341	48721	ENSG00000147316	MCPH1	0,37864	0,6294381	hsa-miR-146a-5p
8	6598689	rs2922850	A	G	3190	42076	ENSG00000147316	MCPH1	0,38004	0,6294381	hsa-miR-146a-5p
8	6534748	rs2515483	C	G	4341	48732	ENSG00000147316	MCPH1	0,38074	0,6294381	hsa-miR-146a-5p
8	6630984	rs2911968	T	C	4341	48727	ENSG00000147316	MCPH1	0,38094	0,6294381	hsa-miR-146a-5p
8	6460826	rs12546890	A	G	4486	50367	ENSG00000147316	MCPH1	0,38303	0,6294381	hsa-miR-146a-5p
8	6470887	rs6989935	T	C	4381	50248	ENSG00000147316	MCPH1	0,38373	0,6294381	hsa-miR-146a-5p
8	6608674	rs2515552	A	G	4387	50246	ENSG00000147316	MCPH1	0,38662	0,6294381	hsa-miR-146a-5p
8	6421724	rs1530409	T	C	4486	50366	ENSG00000147316	MCPH1	0,38761	0,6294381	hsa-miR-146a-5p
8	6523357	rs3020223	T	C	4486	50366	ENSG00000147316	MCPH1	0,3893	0,6294381	hsa-miR-146a-5p
8	6463349	rs2920658	C	G	4486	50367	ENSG00000147316	MCPH1	0,3909	0,6294381	hsa-miR-146a-5p
8	6516832	rs2515431	A	G	4486	50363	ENSG00000147316	MCPH1	0,39189	0,6294381	hsa-miR-146a-5p
8	6531862	rs1984860	A	T	4341	48732	ENSG00000147316	MCPH1	0,39478	0,6294381	hsa-miR-146a-5p
8	6604352	rs2922856	T	G	3578	46337	ENSG00000147316	MCPH1	0,39578	0,6294381	hsa-miR-146a-5p
8	6469227	rs2442497	T	C	4480	50367	ENSG00000147316	MCPH1	0,39638	0,6294381	hsa-miR-146a-5p
8	6463415	rs2916737	T	C	4486	50367	ENSG00000147316	MCPH1	0,39658	0,6294381	hsa-miR-146a-5p
8	6609132	rs13269006	A	T	4387	50246	ENSG00000147316	MCPH1	0,39847	0,6294381	hsa-miR-146a-5p
8	6471783	rs2442493	T	C	4486	50367	ENSG00000147316	MCPH1	0,39926	0,6294381	hsa-miR-146a-5p
8	6531119	rs2515477	T	C	4486	50356	ENSG00000147316	MCPH1	0,40006	0,6294381	hsa-miR-146a-5p
8	6636862	rs2042668	A	C	4341	48717	ENSG00000147316	MCPH1	0,40215	0,6294381	hsa-miR-146a-5p
8	6473657	rs17077056	T	C	4480	50367	ENSG00000147316	MCPH1	0,40235	0,6294381	hsa-miR-146a-5p
8	6529099	rs2442608	T	C	4341	48716	ENSG00000147316	MCPH1	0,40404	0,6294381	hsa-miR-146a-5p
8	6618383	rs2013938	A	G	4341	48724	ENSG00000147316	MCPH1	0,40414	0,6294381	hsa-miR-146a-5p
8	6426291	rs2922833	T	C	4482	50345	ENSG00000147316	MCPH1	0,40504	0,6294381	hsa-miR-146a-5p
8	6473252	rs12675930	T	C	4480	50367	ENSG00000147316	MCPH1	0,40573	0,6294381	hsa-miR-146a-5p
8	6463121	rs2916738	T	C	4486	50367	ENSG00000147316	MCPH1	0,40713	0,6294381	hsa-miR-146a-5p
8	6461642	rs7836207	T	G	2896	44651	ENSG00000147316	MCPH1	0,40842	0,6294381	hsa-miR-146a-5p
8	6532193	rs1984857	T	C	4341	48732	ENSG00000147316	MCPH1	0,40902	0,6294381	hsa-miR-146a-5p
8	6473059	rs12676922	A	G	4480	50367	ENSG00000147316	MCPH1	0,40922	0,6294381	hsa-miR-146a-5p
8	6472926	rs12676907	A	G	4480	50367	ENSG00000147316	MCPH1	0,40942	0,6294381	hsa-miR-146a-5p
8	6530081	rs2515471	A	G	4486	50368	ENSG00000147316	MCPH1	0,41141	0,6294381	hsa-miR-146a-5p
8	6650318	rs2912004	T	C	4387	50199	ENSG00000147316	MCPH1	0,41141	0,6294381	hsa-miR-146a-5p
8	6434952	rs6559162	A	G	4485	50366	ENSG00000147316	MCPH1	0,4128	0,6294381	hsa-miR-146a-5p
8	6472814	rs11137029	A	G	4480	50367	ENSG00000147316	MCPH1	0,4134	0,6294381	hsa-miR-146a-5p
8	6530942	rs2442605	A	T	4486	50368	ENSG00000147316	MCPH1	0,4134	0,6294381	hsa-miR-146a-5p

8	6530918	rs2515475	T	C	4486	50368	ENSG00000147316	MCPH1	0,41519	0,6294618	hsa-miR-146a-5p
8	6529787	rs2442607	T	C	4486	50367	ENSG00000147316	MCPH1	0,41568	0,6294618	hsa-miR-146a-5p
8	6538388	rs11989215	A	G	4486	50296	ENSG00000147316	MCPH1	0,41588	0,6294618	hsa-miR-146a-5p
8	6512375	rs3780088	A	G	4415	50276	ENSG00000147316	MCPH1	0,41757	0,6301526	hsa-miR-146a-5p
8	6477098	rs11137033	T	C	4480	50367	ENSG00000147316	MCPH1	0,41887	0,6301894	hsa-miR-146a-5p
8	6476532	rs17077067	A	G	4480	50367	ENSG00000147316	MCPH1	0,41946	0,6301894	hsa-miR-146a-5p
8	6508099	rs2515413	T	C	4485	50365	ENSG00000147316	MCPH1	0,42225	0,6301894	hsa-miR-146a-5p
8	6539242	rs13269021	T	G	2963	9972	ENSG00000147316	MCPH1	0,42314	0,6301894	hsa-miR-146a-5p
8	6438149	rs894896	C	G	2995	44770	ENSG00000147316	MCPH1	0,42404	0,6301894	hsa-miR-146a-5p
8	6530035	rs1807209	T	C	4341	48732	ENSG00000147316	MCPH1	0,42414	0,6301894	hsa-miR-146a-5p
8	6414878	rs2305022	T	G	4486	50365	ENSG00000147316	MCPH1	0,42503	0,6301894	hsa-miR-146a-5p
8	6471493	rs2440396	T	C	4480	50367	ENSG00000147316	MCPH1	0,42613	0,6301894	hsa-miR-146a-5p
8	6459746	rs2916746	C	G	4486	50366	ENSG00000147316	MCPH1	0,42623	0,6301894	hsa-miR-146a-5p
8	6531903	rs1984859	T	C	4341	48732	ENSG00000147316	MCPH1	0,42792	0,631678	hsa-miR-146a-5p
8	6513770	rs2916747	A	G	3677	46455	ENSG00000147316	MCPH1	0,42851	0,631678	hsa-miR-146a-5p
8	6616952	rs2454516	C	G	4341	48724	ENSG00000147316	MCPH1	0,42921	0,631678	hsa-miR-146a-5p
8	6472058	rs2442491	A	G	4480	50366	ENSG00000147316	MCPH1	0,42971	0,631678	hsa-miR-146a-5p
8	6434813	rs2440420	C	G	3822	48093	ENSG00000147316	MCPH1	0,43229	0,6336472	hsa-miR-146a-5p
8	6461261	rs2442500	T	C	4486	50367	ENSG00000147316	MCPH1	0,43299	0,6337196	hsa-miR-146a-5p
8	6445888	rs2916750	T	G	4486	50363	ENSG00000147316	MCPH1	0,43358	0,6337196	hsa-miR-146a-5p
8	6609293	rs13266352	C	G	4387	50210	ENSG00000147316	MCPH1	0,43627	0,6346045	hsa-miR-146a-5p
8	6614897	rs7017968	C	G	4340	48686	ENSG00000147316	MCPH1	0,43627	0,6346045	hsa-miR-146a-5p
8	6443951	rs2440416	C	G	4486	50363	ENSG00000147316	MCPH1	0,43736	0,6347044	hsa-miR-146a-5p
8	6517201	rs2916724	A	G	3677	46456	ENSG00000147316	MCPH1	0,44054	0,6380608	hsa-miR-146a-5p
8	6443378	rs2442510	T	C	4486	50363	ENSG00000147316	MCPH1	0,44193	0,6380608	hsa-miR-146a-5p
8	6453217	rs2034143	A	G	4485	50361	ENSG00000147316	MCPH1	0,44223	0,6380608	hsa-miR-146a-5p
8	6412575	rs6995735	T	G	4486	50356	ENSG00000147316	MCPH1	0,44342	0,6380608	hsa-miR-146a-5p
8	6616615	rs2936501	A	G	4341	48728	ENSG00000147316	MCPH1	0,44422	0,6383129	hsa-miR-146a-5p
8	6476580	rs3020285	T	C	3893	48167	ENSG00000147316	MCPH1	0,44581	0,6388007	hsa-miR-146a-5p
8	6452897	rs1868551	A	G	4486	50365	ENSG00000147316	MCPH1	0,44829	0,6405575	hsa-miR-146a-5p
8	6539909	rs4455855	A	T	4486	50358	ENSG00000147316	MCPH1	0,45147	0,6419929	hsa-miR-146a-5p
8	6471889	rs2515585	A	C	4486	50367	ENSG00000147316	MCPH1	0,45366	0,6419929	hsa-miR-146a-5p
8	6433656	rs7821173	A	C	4485	50357	ENSG00000147316	MCPH1	0,45485	0,6419929	hsa-miR-146a-5p
8	6539175	rs2922876	T	C	4486	50364	ENSG00000147316	MCPH1	0,45495	0,6419929	hsa-miR-146a-5p
8	6437551	rs3020270	T	C	4485	50366	ENSG00000147316	MCPH1	0,45664	0,6434889	hsa-miR-146a-5p
8	6481143	rs12677501	T	G	4480	50367	ENSG00000147316	MCPH1	0,45862	0,6438965	hsa-miR-146a-5p
8	6614474	rs2959802	A	G	4338	48670	ENSG00000147316	MCPH1	0,45882	0,6438965	hsa-miR-146a-5p
8	6406391	rs2916656	A	T	4486	50362	ENSG00000147316	MCPH1	0,46379	0,6484657	hsa-miR-146a-5p
8	6447293	rs1129706	A	G	4486	50362	ENSG00000147316	MCPH1	0,46488	0,6488359	hsa-miR-146a-5p
8	6482954	rs12679619	A	G	4486	50366	ENSG00000147316	MCPH1	0,46696	0,6508499	hsa-miR-146a-5p
8	6443325	rs2442511	A	G	4485	50366	ENSG00000147316	MCPH1	0,46934	0,651489	hsa-miR-146a-5p
8	6432147	rs2442523	T	G	4482	50350	ENSG00000147316	MCPH1	0,47044	0,651489	hsa-miR-146a-5p
8	6616225	rs2959798	A	G	4341	48730	ENSG00000147316	MCPH1	0,47064	0,651489	hsa-miR-146a-5p

8	6529303	rs1868553	A	C	4485	50367	ENSG00000147316	MCPH1	0,47083	0,651489	hsa-miR-146a-5p
8	6450722	rs2440412	T	G	4485	50368	ENSG00000147316	MCPH1	0,47212	0,651489	hsa-miR-146a-5p
8	6432919	rs2440422	A	T	4482	50350	ENSG00000147316	MCPH1	0,47222	0,651489	hsa-miR-146a-5p
8	6615274	rs3020259	A	C	4341	48694	ENSG00000147316	MCPH1	0,47252	0,651489	hsa-miR-146a-5p
8	6542484	rs1988762	A	G	4485	50264	ENSG00000147316	MCPH1	0,47391	0,6521302	hsa-miR-146a-5p
8	6450274	rs2515572	A	G	4486	50365	ENSG00000147316	MCPH1	0,47451	0,6521302	hsa-miR-146a-5p
8	6575885	rs2442557	C	G	4386	50197	ENSG00000147316	MCPH1	0,4749	0,6521302	hsa-miR-146a-5p
8	6431358	rs2251956	A	T	4482	50351	ENSG00000147316	MCPH1	0,47897	0,6531182	hsa-miR-146a-5p
8	6473996	rs3020283	C	G	4341	48707	ENSG00000147316	MCPH1	0,47986	0,6531182	hsa-miR-146a-5p
8	6521595	rs7834131	T	C	3677	46456	ENSG00000147316	MCPH1	0,47986	0,6531182	hsa-miR-146a-5p
8	6631189	rs2912064	T	C	4341	48728	ENSG00000147316	MCPH1	0,47996	0,6531182	hsa-miR-146a-5p
8	6500090	rs2242005	T	C	3677	46455	ENSG00000147316	MCPH1	0,48026	0,6531182	hsa-miR-146a-5p
8	6418542	rs2442536	A	C	4485	50367	ENSG00000147316	MCPH1	0,48294	0,6531182	hsa-miR-146a-5p
8	6497692	rs2515596	A	G	3560	46922	ENSG00000147316	MCPH1	0,48324	0,6531182	hsa-miR-146a-5p
8	6418008	rs7002495	A	G	4485	50367	ENSG00000147316	MCPH1	0,48393	0,6531182	hsa-miR-146a-5p
8	6432416	rs2440424	T	C	4482	50350	ENSG00000147316	MCPH1	0,48572	0,6538066	hsa-miR-146a-5p
8	6508817	rs2515416	A	G	4486	50364	ENSG00000147316	MCPH1	0,4875	0,655094	hsa-miR-146a-5p
8	6448541	rs1867386	A	T	4485	50368	ENSG00000147316	MCPH1	0,4885	0,655094	hsa-miR-146a-5p
8	6432685	rs2440423	T	C	4482	50350	ENSG00000147316	MCPH1	0,4886	0,655094	hsa-miR-146a-5p
8	6417442	rs6559160	A	C	4485	50366	ENSG00000147316	MCPH1	0,49207	0,6582142	hsa-miR-146a-5p
8	6448640	rs2920671	T	C	4486	50365	ENSG00000147316	MCPH1	0,49286	0,6582142	hsa-miR-146a-5p
8	6598849	rs2442570	A	G	2950	42579	ENSG00000147316	MCPH1	0,49722	0,6631701	hsa-miR-146a-5p
8	6496749	rs2442477	A	G	4341	48668	ENSG00000147316	MCPH1	0,5004	0,6664388	hsa-miR-146a-5p
8	6616194	rs2959799	A	G	4341	48730	ENSG00000147316	MCPH1	0,50169	0,6664388	hsa-miR-146a-5p
8	6447209	rs1129704	A	C	4485	50367	ENSG00000147316	MCPH1	0,50535	0,6673727	hsa-miR-146a-5p
8	6614005	rs13276344	A	G	4341	48713	ENSG00000147316	MCPH1	0,50535	0,6673727	hsa-miR-146a-5p
8	6449812	rs1373307	T	C	4485	50368	ENSG00000147316	MCPH1	0,50595	0,6673727	hsa-miR-146a-5p
8	6456965	rs2442502	T	C	4485	50328	ENSG00000147316	MCPH1	0,50625	0,6673727	hsa-miR-146a-5p
8	6597563	rs17631156	C	G	2271	7654	ENSG00000147316	MCPH1	0,50763	0,6674694	hsa-miR-146a-5p
8	6517523	rs2515435	C	G	4486	50363	ENSG00000147316	MCPH1	0,50952	0,6690934	hsa-miR-146a-5p
8	6458576	rs2920665	T	G	4486	50365	ENSG00000147316	MCPH1	0,51378	0,6729576	hsa-miR-146a-5p
8	6437029	rs2442514	A	T	4383	50224	ENSG00000147316	MCPH1	0,51973	0,6767113	hsa-miR-146a-5p
8	6497800	rs2916718	A	G	4486	50329	ENSG00000147316	MCPH1	0,52052	0,6767113	hsa-miR-146a-5p
8	6629810	rs13256011	T	G	2986	44733	ENSG00000147316	MCPH1	0,52062	0,6767113	hsa-miR-146a-5p
8	6434037	rs2442516	T	C	4482	50351	ENSG00000147316	MCPH1	0,52389	0,6786185	hsa-miR-146a-5p
8	6560355	rs921291	A	C	4486	50352	ENSG00000147316	MCPH1	0,52557	0,6794534	hsa-miR-146a-5p
8	6487878	rs2920681	A	T	4387	50235	ENSG00000147316	MCPH1	0,52735	0,6794534	hsa-miR-146a-5p
8	6537355	rs12541780	T	G	4387	50197	ENSG00000147316	MCPH1	0,52953	0,6799025	hsa-miR-146a-5p
8	6613661	rs3020258	T	C	4242	48550	ENSG00000147316	MCPH1	0,52973	0,6799025	hsa-miR-146a-5p
8	6432882	rs2442521	A	G	4383	50231	ENSG00000147316	MCPH1	0,53112	0,6799456	hsa-miR-146a-5p
8	6414635	rs2442546	A	G	4485	50356	ENSG00000147316	MCPH1	0,53369	0,6799456	hsa-miR-146a-5p
8	6541076	rs2959819	A	G	4486	50342	ENSG00000147316	MCPH1	0,53369	0,6799456	hsa-miR-146a-5p
8	6444662	rs930557	C	G	4482	50350	ENSG00000147316	MCPH1	0,53548	0,6799456	hsa-miR-146a-5p

8	6595618	rs2959787	A	G	3190	42076	ENSG00000147316	MCPH1	0,53597	0,6799456	hsa-miR-146a-5p
8	6464404	rs3020281	A	G	4486	50367	ENSG00000147316	MCPH1	0,53667	0,6799456	hsa-miR-146a-5p
8	6506429	rs2442468	C	G	4486	50366	ENSG00000147316	MCPH1	0,53775	0,6799456	hsa-miR-146a-5p
8	6637795	rs2433146	A	G	4486	50363	ENSG00000147316	MCPH1	0,53954	0,680109	hsa-miR-146a-5p
8	6539384	rs1989321	A	G	4486	50319	ENSG00000147316	MCPH1	0,54023	0,680109	hsa-miR-146a-5p
8	6471989	rs2920656	T	C	4387	50238	ENSG00000147316	MCPH1	0,5433	0,680109	hsa-miR-146a-5p
8	6538820	rs17623313	T	C	4485	50311	ENSG00000147316	MCPH1	0,5434	0,680109	hsa-miR-146a-5p
8	6465757	rs2916733	A	G	4486	50367	ENSG00000147316	MCPH1	0,54587	0,680109	hsa-miR-146a-5p
8	6431900	rs2254903	T	C	4482	50351	ENSG00000147316	MCPH1	0,54914	0,680109	hsa-miR-146a-5p
8	6489599	rs2920674	C	G	4486	50338	ENSG00000147316	MCPH1	0,55251	0,680109	hsa-miR-146a-5p
8	6507401	rs2515409	T	C	4486	50367	ENSG00000147316	MCPH1	0,55251	0,680109	hsa-miR-146a-5p
8	6465182	rs2916734	A	G	4486	50367	ENSG00000147316	MCPH1	0,5534	0,680109	hsa-miR-146a-5p
8	6445990	rs1054073	A	T	4482	50351	ENSG00000147316	MCPH1	0,5535	0,680109	hsa-miR-146a-5p
8	6433964	rs2442518	T	C	4482	50350	ENSG00000147316	MCPH1	0,5537	0,680109	hsa-miR-146a-5p
8	6613290	rs10110387	A	T	4340	48618	ENSG00000147316	MCPH1	0,55508	0,680109	hsa-miR-146a-5p
8	6531261	rs10503371	C	G	4486	50357	ENSG00000147316	MCPH1	0,55548	0,680109	hsa-miR-146a-5p
8	6488872	rs2920677	A	G	4486	50334	ENSG00000147316	MCPH1	0,55637	0,680109	hsa-miR-146a-5p
8	6464344	rs2515583	C	G	4486	50367	ENSG00000147316	MCPH1	0,55746	0,680109	hsa-miR-146a-5p
8	6448503	rs1867385	A	G	4482	50353	ENSG00000147316	MCPH1	0,55756	0,680109	hsa-miR-146a-5p
8	6479710	rs2440392	A	G	3560	46925	ENSG00000147316	MCPH1	0,55785	0,680109	hsa-miR-146a-5p
8	6611458	rs2959806	A	T	2986	44728	ENSG00000147316	MCPH1	0,56072	0,6827932	hsa-miR-146a-5p
8	6463579	rs2440401	T	C	4486	50367	ENSG00000147316	MCPH1	0,5629	0,6846318	hsa-miR-146a-5p
8	6466987	rs11990038	C	G	3014	44778	ENSG00000147316	MCPH1	0,57012	0,6909455	hsa-miR-146a-5p
8	6412662	rs7009134	A	G	4485	50368	ENSG00000147316	MCPH1	0,57408	0,6924591	hsa-miR-146a-5p
8	6447173	rs1129703	A	G	4478	50198	ENSG00000147316	MCPH1	0,57596	0,6934647	hsa-miR-146a-5p
8	6470150	rs2979654	A	G	3893	48168	ENSG00000147316	MCPH1	0,57636	0,6934647	hsa-miR-146a-5p
8	6499124	rs2916717	A	C	4483	50326	ENSG00000147316	MCPH1	0,57695	0,6934647	hsa-miR-146a-5p
8	6490414	rs3020288	A	G	3014	44777	ENSG00000147316	MCPH1	0,57804	0,6939584	hsa-miR-146a-5p
8	6538661	rs11137037	A	C	4486	50303	ENSG00000147316	MCPH1	0,58012	0,6947744	hsa-miR-146a-5p
8	6487557	rs2440428	T	C	4486	50351	ENSG00000147316	MCPH1	0,5815	0,6947744	hsa-miR-146a-5p
8	6489537	rs13282022	C	G	4387	50225	ENSG00000147316	MCPH1	0,5817	0,6947744	hsa-miR-146a-5p
8	6489486	rs13281967	C	G	4486	50343	ENSG00000147316	MCPH1	0,58714	0,6965704	hsa-miR-146a-5p
8	6480785	rs12674488	A	C	4486	50324	ENSG00000147316	MCPH1	0,58783	0,6965704	hsa-miR-146a-5p
8	6481576	rs2922815	T	C	4486	50366	ENSG00000147316	MCPH1	0,58951	0,6965704	hsa-miR-146a-5p
8	6438036	rs894895	A	T	4482	50350	ENSG00000147316	MCPH1	0,5902	0,6965704	hsa-miR-146a-5p
8	6464293	rs2515582	C	G	4486	50367	ENSG00000147316	MCPH1	0,59099	0,6965704	hsa-miR-146a-5p
8	6611331	rs2959804	A	G	2986	44731	ENSG00000147316	MCPH1	0,59218	0,6965704	hsa-miR-146a-5p
8	6539349	rs1375668	A	G	4486	50318	ENSG00000147316	MCPH1	0,59287	0,6965704	hsa-miR-146a-5p
8	6640653	rs2433147	T	C	3560	46922	ENSG00000147316	MCPH1	0,59515	0,6968333	hsa-miR-146a-5p
8	6490683	rs2440406	A	G	4486	50319	ENSG00000147316	MCPH1	0,5992	0,6996307	hsa-miR-146a-5p
8	6480478	rs13248420	A	G	4486	50365	ENSG00000147316	MCPH1	0,59989	0,6996368	hsa-miR-146a-5p
8	6512526	rs3020214	C	G	4485	50368	ENSG00000147316	MCPH1	0,60286	0,7007009	hsa-miR-146a-5p
8	6531599	rs2515479	T	G	4341	48729	ENSG00000147316	MCPH1	0,60632	0,7023255	hsa-miR-146a-5p

8	6510571	rs2442634	C	G	4486	50363	ENSG00000147316	MCPH1	0,61205	0,7060061	hsa-miR-146a-5p
8	6481432	rs17613024	A	G	4486	50365	ENSG00000147316	MCPH1	0,61482	0,7060061	hsa-miR-146a-5p
8	6516544	rs10102851	A	G	4063	47933	ENSG00000147316	MCPH1	0,6162	0,7060061	hsa-miR-146a-5p
8	6481416	rs1550690	C	G	4486	50366	ENSG00000147316	MCPH1	0,6163	0,7060061	hsa-miR-146a-5p
8	6439029	rs2442513	T	G	3014	44775	ENSG00000147316	MCPH1	0,61739	0,7060061	hsa-miR-146a-5p
8	6538720	rs10092206	A	G	4486	50305	ENSG00000147316	MCPH1	0,61779	0,7060061	hsa-miR-146a-5p
8	6489539	rs2920675	T	C	2915	44658	ENSG00000147316	MCPH1	0,62203	0,7084816	hsa-miR-146a-5p
8	6481778	rs2922813	T	C	4486	50366	ENSG00000147316	MCPH1	0,62243	0,7084816	hsa-miR-146a-5p
8	6648428	rs1055752	A	C	3560	46919	ENSG00000147316	MCPH1	0,62273	0,7084816	hsa-miR-146a-5p
8	6486974	rs17077123	C	G	3677	46456	ENSG00000147316	MCPH1	0,62757	0,7102433	hsa-miR-146a-5p
8	6534777	rs17623064	A	T	4341	48715	ENSG00000147316	MCPH1	0,62846	0,7102433	hsa-miR-146a-5p
8	6496650	rs2442478	C	G	4341	48718	ENSG00000147316	MCPH1	0,62945	0,7102433	hsa-miR-146a-5p
8	6478799	rs17077083	A	G	4486	50365	ENSG00000147316	MCPH1	0,63113	0,7104567	hsa-miR-146a-5p
8	6534429	rs12550255	C	G	4341	48717	ENSG00000147316	MCPH1	0,63142	0,7104567	hsa-miR-146a-5p
8	6549051	rs2515493	A	C	4485	50366	ENSG00000147316	MCPH1	0,63221	0,710563	hsa-miR-146a-5p
8	6610465	rs17556107	T	C	2864	9853	ENSG00000147316	MCPH1	0,63488	0,7110979	hsa-miR-146a-5p
8	6477687	rs2277136	T	C	4486	50364	ENSG00000147316	MCPH1	0,63626	0,7112029	hsa-miR-146a-5p
8	6450535	rs2440413	A	C	4485	50367	ENSG00000147316	MCPH1	0,63952	0,7127187	hsa-miR-146a-5p
8	6640232	rs2515566	C	G	3560	46921	ENSG00000147316	MCPH1	0,64031	0,7127187	hsa-miR-146a-5p
8	6477857	rs1550691	C	G	3014	44778	ENSG00000147316	MCPH1	0,64357	0,7127187	hsa-miR-146a-5p
8	6480005	rs17077094	T	G	4486	50365	ENSG00000147316	MCPH1	0,64416	0,7127187	hsa-miR-146a-5p
8	6486956	rs17077121	T	G	3014	44778	ENSG00000147316	MCPH1	0,64436	0,7127187	hsa-miR-146a-5p
8	6613578	rs2980665	A	G	3649	46411	ENSG00000147316	MCPH1	0,64525	0,7127187	hsa-miR-146a-5p
8	6511863	rs2922905	T	C	4481	50356	ENSG00000147316	MCPH1	0,64723	0,7127187	hsa-miR-146a-5p
8	6503708	rs2979666	A	C	4486	50366	ENSG00000147316	MCPH1	0,64891	0,7127187	hsa-miR-146a-5p
8	6510793	rs2442633	T	C	4481	50356	ENSG00000147316	MCPH1	0,65098	0,7127187	hsa-miR-146a-5p
8	6425958	rs17536777	A	G	4486	50366	ENSG00000147316	MCPH1	0,65157	0,7127187	hsa-miR-146a-5p
8	6522411	rs2922895	C	G	4486	50356	ENSG00000147316	MCPH1	0,65582	0,7127187	hsa-miR-146a-5p
8	6591847	rs9657427	A	G	4241	48575	ENSG00000147316	MCPH1	0,66066	0,7127187	hsa-miR-146a-5p
8	6509781	rs2442635	A	G	4486	50363	ENSG00000147316	MCPH1	0,66095	0,7127187	hsa-miR-146a-5p
8	6478027	rs2515591	T	C	3560	46924	ENSG00000147316	MCPH1	0,66164	0,7127187	hsa-miR-146a-5p
8	6515787	rs2979673	C	G	4385	50246	ENSG00000147316	MCPH1	0,66253	0,7127187	hsa-miR-146a-5p
8	6487607	rs2442485	C	G	4486	50353	ENSG00000147316	MCPH1	0,6654	0,714058	hsa-miR-146a-5p
8	6511459	rs3020212	T	C	4486	50367	ENSG00000147316	MCPH1	0,66688	0,714058	hsa-miR-146a-5p
8	6468454	rs2440399	T	G	4486	50363	ENSG00000147316	MCPH1	0,66954	0,7148823	hsa-miR-146a-5p
8	6648184	rs1055749	A	T	4486	50331	ENSG00000147316	MCPH1	0,67369	0,7152448	hsa-miR-146a-5p
8	6517579	rs2922900	T	C	4387	50248	ENSG00000147316	MCPH1	0,67408	0,7152448	hsa-miR-146a-5p
8	6471107	rs3020282	C	G	3893	48168	ENSG00000147316	MCPH1	0,67961	0,7188577	hsa-miR-146a-5p
8	6536973	rs12550622	A	G	4486	50291	ENSG00000147316	MCPH1	0,68297	0,7208275	hsa-miR-146a-5p
8	6406418	rs2243755	T	C	4242	48600	ENSG00000147316	MCPH1	0,68455	0,7217495	hsa-miR-146a-5p
8	6528920	rs3824312	A	G	4341	48728	ENSG00000147316	MCPH1	0,68839	0,7238345	hsa-miR-146a-5p
8	6528765	rs2515466	A	G	4341	48730	ENSG00000147316	MCPH1	0,68869	0,7238345	hsa-miR-146a-5p
8	6500252	rs1870	T	G	4486	50338	ENSG00000147316	MCPH1	0,69007	0,7238345	hsa-miR-146a-5p



8	6489698	rs13282577	A	G	4486	50340	ENSG00000147316	MCPH1	0,69165	0,7238811	hsa-miR-146a-5p
8	6405562	rs1057187	T	G	4242	48609	ENSG00000147316	MCPH1	0,69688	0,7253664	hsa-miR-146a-5p
8	6499714	rs2916716	A	T	4242	48566	ENSG00000147316	MCPH1	0,70073	0,7253664	hsa-miR-146a-5p
8	6512409	rs3020213	T	C	4485	50366	ENSG00000147316	MCPH1	0,70132	0,7253664	hsa-miR-146a-5p
8	6639234	rs17633045	T	C	3560	46923	ENSG00000147316	MCPH1	0,70556	0,7253664	hsa-miR-146a-5p
8	6519912	rs1961222	T	C	4484	50345	ENSG00000147316	MCPH1	0,70833	0,7253664	hsa-miR-146a-5p
8	6529521	rs13268979	T	C	4237	48609	ENSG00000147316	MCPH1	0,70872	0,7253664	hsa-miR-146a-5p
8	6501959	rs2167071	T	C	4485	50339	ENSG00000147316	MCPH1	0,70892	0,7253664	hsa-miR-146a-5p
8	6443653	rs7843094	C	G	2751	43015	ENSG00000147316	MCPH1	0,71089	0,7253664	hsa-miR-146a-5p
8	6502038	rs7835591	A	T	3560	46926	ENSG00000147316	MCPH1	0,71247	0,7253664	hsa-miR-146a-5p
8	6528341	rs2515465	C	G	4242	48609	ENSG00000147316	MCPH1	0,71286	0,7253664	hsa-miR-146a-5p
8	6467530	rs7011385	T	C	3893	48169	ENSG00000147316	MCPH1	0,71681	0,7253664	hsa-miR-146a-5p
8	6528729	rs3824310	T	C	4332	48687	ENSG00000147316	MCPH1	0,71908	0,7253664	hsa-miR-146a-5p
8	6644838	rs17570753	A	T	2967	44722	ENSG00000147316	MCPH1	0,71967	0,7253664	hsa-miR-146a-5p
8	6537300	rs2442598	T	C	3545	47530	ENSG00000147316	MCPH1	0,71977	0,7253664	hsa-miR-146a-5p
8	6637922	rs2454525	C	G	4486	50365	ENSG00000147316	MCPH1	0,72056	0,7253664	hsa-miR-146a-5p
8	6646795	rs11774231	T	C	2967	44721	ENSG00000147316	MCPH1	0,72125	0,7253664	hsa-miR-146a-5p
8	6511829	rs2916755	A	G	4486	50367	ENSG00000147316	MCPH1	0,72135	0,7253664	hsa-miR-146a-5p
8	6510891	rs2442632	T	C	4480	50046	ENSG00000147316	MCPH1	0,72766	0,7290182	hsa-miR-146a-5p
8	6482902	rs2922812	A	G	3748	46533	ENSG00000147316	MCPH1	0,73003	0,7290182	hsa-miR-146a-5p
8	6551791	rs2922867	A	G	2751	43012	ENSG00000147316	MCPH1	0,73279	0,7290182	hsa-miR-146a-5p
8	6485787	rs2922811	C	G	4486	50367	ENSG00000147316	MCPH1	0,73723	0,7290182	hsa-miR-146a-5p
8	6506102	rs17077194	C	G	4486	50364	ENSG00000147316	MCPH1	0,73723	0,7290182	hsa-miR-146a-5p
8	6535026	rs4841224	T	C	4335	48258	ENSG00000147316	MCPH1	0,73742	0,7290182	hsa-miR-146a-5p
8	6500772	rs2442473	T	C	3560	46917	ENSG00000147316	MCPH1	0,739	0,7290182	hsa-miR-146a-5p
8	6612958	rs3020256	C	G	4340	48656	ENSG00000147316	MCPH1	0,73939	0,7290182	hsa-miR-146a-5p
8	6510317	rs6559166	C	G	4415	50292	ENSG00000147316	MCPH1	0,74068	0,7290182	hsa-miR-146a-5p
8	6485602	rs6559164	T	C	4486	50365	ENSG00000147316	MCPH1	0,74363	0,7305142	hsa-miR-146a-5p
8	6498013	rs1975618	A	T	4486	50326	ENSG00000147316	MCPH1	0,74689	0,7323084	hsa-miR-146a-5p
8	6485978	rs2920689	A	C	4486	50342	ENSG00000147316	MCPH1	0,75172	0,7330704	hsa-miR-146a-5p
8	6487253	rs2440432	T	G	4486	50355	ENSG00000147316	MCPH1	0,75497	0,7330704	hsa-miR-146a-5p
8	6635608	rs12681675	A	T	3649	46412	ENSG00000147316	MCPH1	0,75556	0,7330704	hsa-miR-146a-5p
8	6418232	rs7003911	T	C	2751	43015	ENSG00000147316	MCPH1	0,75852	0,7340451	hsa-miR-146a-5p
8	6536658	rs17552444	A	G	3415	45280	ENSG00000147316	MCPH1	0,76099	0,7348495	hsa-miR-146a-5p
8	6500118	rs2515597	T	C	3560	46926	ENSG00000147316	MCPH1	0,76256	0,7350726	hsa-miR-146a-5p
8	6469753	rs2442496	C	G	4486	50367	ENSG00000147316	MCPH1	0,76375	0,735112	hsa-miR-146a-5p
8	6509440	rs2442636	A	G	4486	50363	ENSG00000147316	MCPH1	0,76996	0,7386244	hsa-miR-146a-5p
8	6577374	rs2442590	A	G	4486	50353	ENSG00000147316	MCPH1	0,7739	0,74051	hsa-miR-146a-5p
8	6642723	rs2433148	T	C	3560	46923	ENSG00000147316	MCPH1	0,77528	0,740945	hsa-miR-146a-5p
8	6538837	rs11775442	A	G	3157	43286	ENSG00000147316	MCPH1	0,77745	0,7414066	hsa-miR-146a-5p
8	6501466	rs2959794	C	G	4242	48565	ENSG00000147316	MCPH1	0,77794	0,7414066	hsa-miR-146a-5p
8	6494837	rs1031309	A	C	4486	50333	ENSG00000147316	MCPH1	0,78188	0,7437739	hsa-miR-146a-5p
8	6620246	rs2515558	A	G	3649	46412	ENSG00000147316	MCPH1	0,78513	0,7447851	hsa-miR-146a-5p

8	6498718	rs1975616	T	C	4340	48678	ENSG00000147316	MCPH1	0,78632	0,7448636	hsa-miR-146a-5p
8	6414617	rs17076773	T	C	2751	43015	ENSG00000147316	MCPH1	0,7872	0,7448636	hsa-miR-146a-5p
8	6511514	rs2922906	A	T	4486	50367	ENSG00000147316	MCPH1	0,79065	0,7462616	hsa-miR-146a-5p
8	6534665	rs12676103	A	G	4237	48611	ENSG00000147316	MCPH1	0,79243	0,7462616	hsa-miR-146a-5p
8	6542272	rs2922869	T	C	3446	47415	ENSG00000147316	MCPH1	0,79706	0,749836	hsa-miR-146a-5p
8	6474237	rs2979656	A	G	4486	50364	ENSG00000147316	MCPH1	0,79804	0,7500673	hsa-miR-146a-5p
8	6585618	rs17077609	T	G	2881	45298	ENSG00000147316	MCPH1	0,80139	0,7518326	hsa-miR-146a-5p
8	6533009	rs17077419	A	G	4341	48729	ENSG00000147316	MCPH1	0,80307	0,7527175	hsa-miR-146a-5p
8	6517252	rs2515432	T	C	4486	50363	ENSG00000147316	MCPH1	0,80573	0,7532313	hsa-miR-146a-5p
8	6501503	rs2922804	A	G	4486	50339	ENSG00000147316	MCPH1	0,80583	0,7532313	hsa-miR-146a-5p
8	6425085	rs2440431	A	G	2751	43015	ENSG00000147316	MCPH1	0,80888	0,7540127	hsa-miR-146a-5p
8	6445504	rs2584	A	G	4341	48690	ENSG00000147316	MCPH1	0,81263	0,7555242	hsa-miR-146a-5p
8	6514591	rs2916735	A	G	4385	50246	ENSG00000147316	MCPH1	0,8144	0,7557107	hsa-miR-146a-5p
8	6510114	rs6559165	T	C	4415	50291	ENSG00000147316	MCPH1	0,82208	0,7587026	hsa-miR-146a-5p
8	6492943	rs2922809	A	T	3748	46531	ENSG00000147316	MCPH1	0,82435	0,7601109	hsa-miR-146a-5p
8	6479367	rs11987805	A	T	3014	44778	ENSG00000147316	MCPH1	0,83075	0,7632568	hsa-miR-146a-5p
8	6624827	rs12679292	T	C	3649	46412	ENSG00000147316	MCPH1	0,83203	0,7636015	hsa-miR-146a-5p
8	6434849	rs17609194	A	G	4486	50366	ENSG00000147316	MCPH1	0,83262	0,7636015	hsa-miR-146a-5p
8	6449801	rs1373306	T	G	4485	50363	ENSG00000147316	MCPH1	0,83371	0,7639154	hsa-miR-146a-5p
8	6444633	rs2083914	T	G	4485	50358	ENSG00000147316	MCPH1	0,83913	0,7678054	hsa-miR-146a-5p
8	6472108	rs2515586	A	G	2751	43015	ENSG00000147316	MCPH1	0,84198	0,7687352	hsa-miR-146a-5p
8	6563013	rs3739391	A	G	4485	50352	ENSG00000147316	MCPH1	0,84543	0,7708274	hsa-miR-146a-5p
8	6496638	rs2922806	T	C	4486	50353	ENSG00000147316	MCPH1	0,8471	0,7708274	hsa-miR-146a-5p
8	6564509	rs10108504	T	C	3560	46925	ENSG00000147316	MCPH1	0,84917	0,7708274	hsa-miR-146a-5p
8	6503960	rs11776519	T	G	4385	50245	ENSG00000147316	MCPH1	0,85094	0,7708274	hsa-miR-146a-5p
8	6499786	rs2916715	T	C	4242	48563	ENSG00000147316	MCPH1	0,85252	0,7708274	hsa-miR-146a-5p
8	6499416	rs2442475	A	G	4340	48679	ENSG00000147316	MCPH1	0,8541	0,7708274	hsa-miR-146a-5p
8	6479866	rs17540702	A	G	3415	45263	ENSG00000147316	MCPH1	0,8604	0,7708274	hsa-miR-146a-5p
8	6511255	rs2442631	T	C	4486	50367	ENSG00000147316	MCPH1	0,86375	0,7708274	hsa-miR-146a-5p
8	6622816	rs11780088	A	C	4387	50246	ENSG00000147316	MCPH1	0,86562	0,7708274	hsa-miR-146a-5p
8	6415442	rs12115169	T	C	4486	50359	ENSG00000147316	MCPH1	0,8668	0,7708274	hsa-miR-146a-5p
8	6416121	rs13264652	T	C	4242	48548	ENSG00000147316	MCPH1	0,86867	0,7708274	hsa-miR-146a-5p
8	6497939	rs2122279	A	G	4241	48554	ENSG00000147316	MCPH1	0,86916	0,7708274	hsa-miR-146a-5p
8	6576273	rs3020242	A	G	3659	47028	ENSG00000147316	MCPH1	0,87064	0,7708274	hsa-miR-146a-5p
8	6650382	rs11784671	T	G	3560	46908	ENSG00000147316	MCPH1	0,87497	0,7708274	hsa-miR-146a-5p
8	6620789	rs13256443	C	G	3649	46413	ENSG00000147316	MCPH1	0,87596	0,7708274	hsa-miR-146a-5p
8	6407475	rs17076757	T	C	4486	50358	ENSG00000147316	MCPH1	0,87684	0,7709378	hsa-miR-146a-5p
8	6446664	rs2916749	T	G	4486	50366	ENSG00000147316	MCPH1	0,87842	0,770984	hsa-miR-146a-5p
8	6574145	rs7833581	T	C	3560	46925	ENSG00000147316	MCPH1	0,88512	0,770984	hsa-miR-146a-5p
8	6515535	rs2959791	T	G	4387	50245	ENSG00000147316	MCPH1	0,88669	0,770984	hsa-miR-146a-5p
8	6421990	rs1968586	T	C	4241	48593	ENSG00000147316	MCPH1	0,89181	0,770984	hsa-miR-146a-5p
8	6493731	rs17077154	T	C	3748	46531	ENSG00000147316	MCPH1	0,89181	0,770984	hsa-miR-146a-5p
8	6405310	rs725438	A	T	4242	48594	ENSG00000147316	MCPH1	0,89211	0,770984	hsa-miR-146a-5p

8	6519356	rs13281117	A	G	4486	50364	ENSG00000147316	MCPH1	0,89289	0,770984	hsa-miR-146a-5p
8	6567663	rs2442548	C	G	4386	50229	ENSG00000147316	MCPH1	0,89516	0,770984	hsa-miR-146a-5p
8	6628002	rs2059535	C	G	3649	46412	ENSG00000147316	MCPH1	0,89801	0,770984	hsa-miR-146a-5p
8	6551161	rs4840457	T	C	3559	46906	ENSG00000147316	MCPH1	0,8991	0,770984	hsa-miR-146a-5p
8	6453935	rs4841082	T	C	4242	48569	ENSG00000147316	MCPH1	0,89959	0,770984	hsa-miR-146a-5p
8	6614034	rs2980663	T	C	3649	46414	ENSG00000147316	MCPH1	0,90077	0,770984	hsa-miR-146a-5p
8	6625412	rs2959797	A	C	4486	50365	ENSG00000147316	MCPH1	0,9052	0,770984	hsa-miR-146a-5p
8	6472040	rs2442492	A	G	4486	50366	ENSG00000147316	MCPH1	0,9056	0,770984	hsa-miR-146a-5p
8	6471949	rs2979655	T	G	4486	50366	ENSG00000147316	MCPH1	0,90628	0,770984	hsa-miR-146a-5p
8	6581621	rs2515524	C	G	4485	50338	ENSG00000147316	MCPH1	0,90688	0,770984	hsa-miR-146a-5p
8	6573249	rs2442553	A	T	4485	50346	ENSG00000147316	MCPH1	0,90747	0,770984	hsa-miR-146a-5p
8	6578422	rs11785293	T	C	2487	10187	ENSG00000147316	MCPH1	0,90776	0,770984	hsa-miR-146a-5p
8	6572819	rs2515516	C	G	4486	50339	ENSG00000147316	MCPH1	0,90806	0,770984	hsa-miR-146a-5p
8	6402938	rs10103862	T	G	4242	48569	ENSG00000147316	MCPH1	0,91367	0,770984	hsa-miR-146a-5p
8	6473285	rs2442490	A	T	4486	50365	ENSG00000147316	MCPH1	0,91377	0,770984	hsa-miR-146a-5p
8	6615767	rs2959800	T	C	4341	48725	ENSG00000147316	MCPH1	0,91387	0,770984	hsa-miR-146a-5p
8	6402909	rs10104726	T	C	4242	48568	ENSG00000147316	MCPH1	0,91997	0,7713929	hsa-miR-146a-5p
8	6516735	rs2916725	T	C	4486	50365	ENSG00000147316	MCPH1	0,92105	0,7713929	hsa-miR-146a-5p
8	6612079	rs1077701	A	C	4236	48554	ENSG00000147316	MCPH1	0,9309	0,7722467	hsa-miR-146a-5p
8	6511777	rs2916756	A	G	4387	50246	ENSG00000147316	MCPH1	0,93316	0,7722467	hsa-miR-146a-5p
8	6510701	rs2515418	A	G	4486	50365	ENSG00000147316	MCPH1	0,93326	0,7722467	hsa-miR-146a-5p
8	6515454	rs3020219	T	C	4486	50364	ENSG00000147316	MCPH1	0,93385	0,7722467	hsa-miR-146a-5p
8	6611988	rs1077702	C	G	4242	48558	ENSG00000147316	MCPH1	0,93592	0,7722467	hsa-miR-146a-5p
8	6519809	rs2442622	A	T	4486	50365	ENSG00000147316	MCPH1	0,93779	0,7722467	hsa-miR-146a-5p
8	6487395	rs2442487	C	G	4486	50352	ENSG00000147316	MCPH1	0,94153	0,7722467	hsa-miR-146a-5p
8	6514512	rs2916736	T	G	4486	50364	ENSG00000147316	MCPH1	0,94153	0,7722467	hsa-miR-146a-5p
8	6624176	rs17077721	A	G	4387	50246	ENSG00000147316	MCPH1	0,94242	0,7722467	hsa-miR-146a-5p
8	6518183	rs2959790	T	C	4485	50365	ENSG00000147316	MCPH1	0,94251	0,7722467	hsa-miR-146a-5p
8	6576414	rs2959777	A	G	4238	48541	ENSG00000147316	MCPH1	0,94271	0,7722467	hsa-miR-146a-5p
8	6493535	rs1443964	A	G	3748	46531	ENSG00000147316	MCPH1	0,94409	0,7722467	hsa-miR-146a-5p
8	6514651	rs2979671	T	C	4486	50364	ENSG00000147316	MCPH1	0,94773	0,7727494	hsa-miR-146a-5p
8	6570080	rs11997149	A	G	3560	46921	ENSG00000147316	MCPH1	0,94773	0,7727494	hsa-miR-146a-5p
8	6485998	rs2440445	T	C	4484	50346	ENSG00000147316	MCPH1	0,9497	0,7737381	hsa-miR-146a-5p
8	6503659	rs2916702	A	G	4486	50368	ENSG00000147316	MCPH1	0,95305	0,7739052	hsa-miR-146a-5p
8	6434068	rs6993448	A	G	4486	50366	ENSG00000147316	MCPH1	0,95502	0,7739052	hsa-miR-146a-5p
8	6566471	rs2442528	A	G	4386	50218	ENSG00000147316	MCPH1	0,96328	0,776137	hsa-miR-146a-5p
8	6521242	rs3020221	T	C	4486	50364	ENSG00000147316	MCPH1	0,97972	0,7830653	hsa-miR-146a-5p
8	6429154	rs2442525	A	C	2751	43015	ENSG00000147316	MCPH1	0,98021	0,7830653	hsa-miR-146a-5p
8	6506463	rs3020210	A	C	4385	50245	ENSG00000147316	MCPH1	0,98031	0,7830653	hsa-miR-146a-5p
10	69832418	rs3852445	C	G	4387	50207	ENSG00000197467	COL13A1	0,0017335	0,01860996	hsa-miR-146a-5p
10	69850293	rs7096311	A	C	3794	48040	ENSG00000197467	COL13A1	0,0028049	0,02663025	hsa-miR-146a-5p
10	69833781	rs3847353	C	G	4486	50355	ENSG00000197467	COL13A1	0,0029978	0,02809838	hsa-miR-146a-5p
10	69874365	rs2683556	T	C	4383	50176	ENSG00000197467	COL13A1	0,0052107	0,04293184	hsa-miR-146a-5p

10	69842008	rs3886687	T	G	4241	48557	ENSG00000197467	COL13A1	0,0060656	0,04766894	hsa-miR-146a-5p
10	69950289	rs10999047	T	G	3723	47974	ENSG00000197467	COL13A1	0,0077786	0,05636213	hsa-miR-146a-5p
10	69950630	rs10999049	T	C	3723	47974	ENSG00000197467	COL13A1	0,010698	0,06664443	hsa-miR-146a-5p
10	69958073	rs10999055	T	C	3723	47974	ENSG00000197467	COL13A1	0,026651	0,1441239	hsa-miR-146a-5p
10	69874351	rs2683555	T	C	4387	50243	ENSG00000197467	COL13A1	0,036511	0,184662	hsa-miR-146a-5p
10	69874337	rs2704522	T	C	4387	50212	ENSG00000197467	COL13A1	0,052163	0,2411434	hsa-miR-146a-5p
10	69828182	rs1227755	T	C	2896	44646	ENSG00000197467	COL13A1	0,060731	0,2733315	hsa-miR-146a-5p
10	69823756	rs16926931	A	G	3794	48044	ENSG00000197467	COL13A1	0,06612	0,2924327	hsa-miR-146a-5p
10	69874452	rs2683557	A	C	4387	50238	ENSG00000197467	COL13A1	0,077484	0,3284733	hsa-miR-146a-5p
10	69874755	rs2704521	T	C	4387	50211	ENSG00000197467	COL13A1	0,078208	0,3301725	hsa-miR-146a-5p
10	69872654	rs4746009	T	C	4387	50237	ENSG00000197467	COL13A1	0,081404	0,3391819	hsa-miR-146a-5p
10	69946984	rs12360410	T	G	4316	50173	ENSG00000197467	COL13A1	0,082075	0,3391819	hsa-miR-146a-5p
10	69926659	rs17591282	T	C	4316	50166	ENSG00000197467	COL13A1	0,084719	0,3421097	hsa-miR-146a-5p
10	69839286	rs11593153	A	C	4485	50342	ENSG00000197467	COL13A1	0,089774	0,3541245	hsa-miR-146a-5p
10	69833501	rs1227763	A	C	4485	50229	ENSG00000197467	COL13A1	0,096716	0,3742825	hsa-miR-146a-5p
10	69854000	rs12415993	C	G	3366	13578	ENSG00000197467	COL13A1	0,10076	0,3826846	hsa-miR-146a-5p
10	69955451	rs10999054	A	C	4386	50248	ENSG00000197467	COL13A1	0,10126	0,3831592	hsa-miR-146a-5p
10	69841394	rs12259054	T	C	4485	50328	ENSG00000197467	COL13A1	0,10892	0,4002837	hsa-miR-146a-5p
10	69838871	rs7914023	A	C	4485	50361	ENSG00000197467	COL13A1	0,11036	0,4041221	hsa-miR-146a-5p
10	69951215	rs10999052	A	G	4315	50173	ENSG00000197467	COL13A1	0,11333	0,4120441	hsa-miR-146a-5p
10	69910528	rs3793833	A	C	4387	50239	ENSG00000197467	COL13A1	0,11804	0,4201965	hsa-miR-146a-5p
10	69837150	rs11595112	C	G	4485	50353	ENSG00000197467	COL13A1	0,11937	0,421275	hsa-miR-146a-5p
10	69868351	rs10999004	A	G	2568	12426	ENSG00000197467	COL13A1	0,11958	0,421275	hsa-miR-146a-5p
10	69956322	rs3750776	A	G	4387	50228	ENSG00000197467	COL13A1	0,12346	0,4256904	hsa-miR-146a-5p
10	69933687	rs16927087	A	T	4316	50172	ENSG00000197467	COL13A1	0,12356	0,4256904	hsa-miR-146a-5p
10	69841165	rs12258864	T	C	4485	50331	ENSG00000197467	COL13A1	0,12377	0,4256904	hsa-miR-146a-5p
10	69877471	rs2894300	A	G	3794	48036	ENSG00000197467	COL13A1	0,13521	0,4326398	hsa-miR-146a-5p
10	69873203	rs11595524	T	C	3560	46901	ENSG00000197467	COL13A1	0,13796	0,4363709	hsa-miR-146a-5p
10	69840004	rs12355979	A	G	4387	50221	ENSG00000197467	COL13A1	0,14408	0,4460616	hsa-miR-146a-5p
10	69889044	rs2763364	T	C	3452	46282	ENSG00000197467	COL13A1	0,14835	0,4551436	hsa-miR-146a-5p
10	69888670	rs10999013	T	C	2271	7654	ENSG00000197467	COL13A1	0,1508	0,4571688	hsa-miR-146a-5p
10	69881111	rs999705	A	G	2416	9290	ENSG00000197467	COL13A1	0,16218	0,4747631	hsa-miR-146a-5p
10	69846242	rs1227751	A	G	4241	48562	ENSG00000197467	COL13A1	0,18358	0,4928087	hsa-miR-146a-5p
10	69913123	rs3793832	T	C	4387	50241	ENSG00000197467	COL13A1	0,19056	0,5065142	hsa-miR-146a-5p
10	69947659	rs10999042	T	C	4315	50164	ENSG00000197467	COL13A1	0,19127	0,5065142	hsa-miR-146a-5p
10	69892824	rs7089663	T	C	4242	48579	ENSG00000197467	COL13A1	0,19249	0,506899	hsa-miR-146a-5p
10	69873500	rs3998148	A	G	2570	12428	ENSG00000197467	COL13A1	0,19966	0,510241	hsa-miR-146a-5p
10	69799992	rs2247427	A	C	4387	50245	ENSG00000197467	COL13A1	0,19977	0,510241	hsa-miR-146a-5p
10	69956777	rs4096394	C	G	4486	50354	ENSG00000197467	COL13A1	0,20492	0,5138834	hsa-miR-146a-5p
10	69953415	rs10823450	A	G	4387	50242	ENSG00000197467	COL13A1	0,20785	0,5191807	hsa-miR-146a-5p
10	69868585	rs12357738	C	G	2570	12428	ENSG00000197467	COL13A1	0,22167	0,5405029	hsa-miR-146a-5p
10	69850493	rs11592327	A	G	4387	50210	ENSG00000197467	COL13A1	0,23386	0,5543497	hsa-miR-146a-5p
10	69860632	rs10762320	A	G	3415	45217	ENSG00000197467	COL13A1	0,2404	0,5625192	hsa-miR-146a-5p

10	69948516	rs10999043	T	C	3794	48049	ENSG00000197467	COL13A1	0,24523	0,5641741	hsa-miR-146a-5p
10	69811839	rs2763352	A	G	4385	50209	ENSG00000197467	COL13A1	0,25097	0,5697894	hsa-miR-146a-5p
10	69818146	rs1227771	T	C	4484	50309	ENSG00000197467	COL13A1	0,25911	0,576958	hsa-miR-146a-5p
10	69874236	rs2763359	A	G	4387	50236	ENSG00000197467	COL13A1	0,26091	0,5769708	hsa-miR-146a-5p
10	69886466	rs17584162	A	C	4387	50211	ENSG00000197467	COL13A1	0,26784	0,5809779	hsa-miR-146a-5p
10	69798188	rs2704507	A	G	4387	50238	ENSG00000197467	COL13A1	0,27196	0,5823242	hsa-miR-146a-5p
10	69881484	rs1227785	T	C	3560	46894	ENSG00000197467	COL13A1	0,27978	0,5823242	hsa-miR-146a-5p
10	69889290	rs10999015	A	G	4382	50206	ENSG00000197467	COL13A1	0,2838	0,5823242	hsa-miR-146a-5p
10	69859998	rs4468240	T	G	4242	48596	ENSG00000197467	COL13A1	0,2854	0,5823242	hsa-miR-146a-5p
10	69860356	rs4746922	T	C	4242	48567	ENSG00000197467	COL13A1	0,2867	0,5823242	hsa-miR-146a-5p
10	69887542	rs10999011	A	G	4387	50208	ENSG00000197467	COL13A1	0,28811	0,5825262	hsa-miR-146a-5p
10	69868846	rs2763356	T	G	3344	45212	ENSG00000197467	COL13A1	0,28981	0,5827058	hsa-miR-146a-5p
10	69859410	rs2395280	A	G	4242	48584	ENSG00000197467	COL13A1	0,29031	0,5827058	hsa-miR-146a-5p
10	69937875	rs12415220	T	G	4387	50248	ENSG00000197467	COL13A1	0,29372	0,5838153	hsa-miR-146a-5p
10	69945786	rs10999037	T	C	4316	50173	ENSG00000197467	COL13A1	0,30003	0,587559	hsa-miR-146a-5p
10	69868198	rs2704526	T	C	3344	45214	ENSG00000197467	COL13A1	0,30063	0,587559	hsa-miR-146a-5p
10	69868214	rs2704525	T	C	3344	45214	ENSG00000197467	COL13A1	0,30934	0,5936645	hsa-miR-146a-5p
10	69888666	rs10999012	T	C	4242	48566	ENSG00000197467	COL13A1	0,31184	0,5936645	hsa-miR-146a-5p
10	69956396	rs1149692	C	G	4486	50333	ENSG00000197467	COL13A1	0,31374	0,5938661	hsa-miR-146a-5p
10	69861298	rs4746925	A	T	4341	48684	ENSG00000197467	COL13A1	0,31624	0,5938661	hsa-miR-146a-5p
10	69894846	rs10999018	A	G	3649	46408	ENSG00000197467	COL13A1	0,32864	0,6025602	hsa-miR-146a-5p
10	69849557	rs12357925	C	G	4387	50208	ENSG00000197467	COL13A1	0,33214	0,6025602	hsa-miR-146a-5p
10	69918302	rs2274181	C	G	4387	50221	ENSG00000197467	COL13A1	0,33674	0,6045483	hsa-miR-146a-5p
10	69817563	rs10998983	A	G	4387	50218	ENSG00000197467	COL13A1	0,33903	0,6045483	hsa-miR-146a-5p
10	69936657	rs12571041	T	C	4387	50248	ENSG00000197467	COL13A1	0,34543	0,6067098	hsa-miR-146a-5p
10	69944476	rs7091714	T	C	3794	48049	ENSG00000197467	COL13A1	0,34892	0,6074689	hsa-miR-146a-5p
10	69835331	rs7900421	C	G	4486	50319	ENSG00000197467	COL13A1	0,35581	0,6130114	hsa-miR-146a-5p
10	69829817	rs11599139	C	G	4387	50236	ENSG00000197467	COL13A1	0,3582	0,6150547	hsa-miR-146a-5p
10	69813398	rs7088833	A	G	3559	46913	ENSG00000197467	COL13A1	0,36349	0,6189368	hsa-miR-146a-5p
10	69938636	rs3793822	A	G	4387	50248	ENSG00000197467	COL13A1	0,36668	0,6217706	hsa-miR-146a-5p
10	69841557	rs3998144	T	C	4242	48563	ENSG00000197467	COL13A1	0,36698	0,6217706	hsa-miR-146a-5p
10	69810607	rs2763346	A	G	4484	50366	ENSG00000197467	COL13A1	0,37177	0,6251936	hsa-miR-146a-5p
10	69957664	rs4096393	A	G	4386	50229	ENSG00000197467	COL13A1	0,37206	0,6251936	hsa-miR-146a-5p
10	69940828	rs17500311	C	G	3723	47973	ENSG00000197467	COL13A1	0,38293	0,6294381	hsa-miR-146a-5p
10	69931829	rs12241163	A	G	4316	50166	ENSG00000197467	COL13A1	0,38612	0,6294381	hsa-miR-146a-5p
10	69811242	rs17497293	A	C	3559	46922	ENSG00000197467	COL13A1	0,38721	0,6294381	hsa-miR-146a-5p
10	69807210	rs10998978	T	C	4316	50172	ENSG00000197467	COL13A1	0,3908	0,6294381	hsa-miR-146a-5p
10	69892654	rs7071338	C	G	4387	50184	ENSG00000197467	COL13A1	0,39239	0,6294381	hsa-miR-146a-5p
10	69956434	rs10823451	C	G	4486	50332	ENSG00000197467	COL13A1	0,39349	0,6294381	hsa-miR-146a-5p
10	69817785	rs12573027	A	G	3723	47972	ENSG00000197467	COL13A1	0,39628	0,6294381	hsa-miR-146a-5p
10	69903027	rs942576	T	G	4242	48595	ENSG00000197467	COL13A1	0,39658	0,6294381	hsa-miR-146a-5p
10	69931938	rs12241227	C	G	4316	50166	ENSG00000197467	COL13A1	0,39916	0,6294381	hsa-miR-146a-5p
10	69939637	rs4746936	A	G	4387	50231	ENSG00000197467	COL13A1	0,40265	0,6294381	hsa-miR-146a-5p

10	69888560	rs7100913	T	C	4242	48588	ENSG00000197467	COL13A1	0,40812	0,6294381	hsa-miR-146a-5p
10	69817666	rs2763335	T	C	4387	50245	ENSG00000197467	COL13A1	0,4122	0,6294381	hsa-miR-146a-5p
10	69843760	rs2763345	C	G	4242	48572	ENSG00000197467	COL13A1	0,4134	0,6294381	hsa-miR-146a-5p
10	69923268	rs3793829	T	C	4386	50185	ENSG00000197467	COL13A1	0,41529	0,6294618	hsa-miR-146a-5p
10	69801200	rs3108965	A	C	4486	50363	ENSG00000197467	COL13A1	0,42036	0,6301894	hsa-miR-146a-5p
10	69892637	rs12220380	T	C	4242	48594	ENSG00000197467	COL13A1	0,42185	0,6301894	hsa-miR-146a-5p
10	69941808	rs3793819	C	G	4486	50364	ENSG00000197467	COL13A1	0,42245	0,6301894	hsa-miR-146a-5p
10	69833384	rs1227762	T	C	4387	50214	ENSG00000197467	COL13A1	0,4308	0,6323704	hsa-miR-146a-5p
10	69854254	rs2704479	C	G	4387	50248	ENSG00000197467	COL13A1	0,43607	0,6346045	hsa-miR-146a-5p
10	69888699	rs12780907	T	C	4387	50201	ENSG00000197467	COL13A1	0,43667	0,6346045	hsa-miR-146a-5p
10	69860776	rs12573749	A	G	4341	48683	ENSG00000197467	COL13A1	0,44332	0,6380608	hsa-miR-146a-5p
10	69956242	rs3750777	A	C	4484	50352	ENSG00000197467	COL13A1	0,44342	0,6380608	hsa-miR-146a-5p
10	69934788	rs17500242	T	G	2896	44650	ENSG00000197467	COL13A1	0,44581	0,6388007	hsa-miR-146a-5p
10	69897125	rs3812702	A	G	4242	48598	ENSG00000197467	COL13A1	0,4475	0,6403242	hsa-miR-146a-5p
10	69854581	rs2683562	T	C	4387	50248	ENSG00000197467	COL13A1	0,45306	0,6419929	hsa-miR-146a-5p
10	69890650	rs10999017	A	T	3560	46874	ENSG00000197467	COL13A1	0,45386	0,6419929	hsa-miR-146a-5p
10	69950113	rs11816683	A	G	4486	50359	ENSG00000197467	COL13A1	0,45783	0,6438965	hsa-miR-146a-5p
10	69819591	rs1227773	A	C	4482	50362	ENSG00000197467	COL13A1	0,46309	0,6484657	hsa-miR-146a-5p
10	69855368	rs2683560	A	G	4387	50247	ENSG00000197467	COL13A1	0,46398	0,6484657	hsa-miR-146a-5p
10	69818827	rs10998985	A	G	4387	50248	ENSG00000197467	COL13A1	0,46786	0,6512159	hsa-miR-146a-5p
10	69919323	rs7090294	T	C	3560	46910	ENSG00000197467	COL13A1	0,48205	0,6531182	hsa-miR-146a-5p
10	69941755	rs3793821	A	G	4387	50244	ENSG00000197467	COL13A1	0,48205	0,6531182	hsa-miR-146a-5p
10	69955603	rs3750778	A	G	4486	50365	ENSG00000197467	COL13A1	0,48383	0,6531182	hsa-miR-146a-5p
10	69843905	rs2704484	A	T	4242	48566	ENSG00000197467	COL13A1	0,49256	0,6582142	hsa-miR-146a-5p
10	69927610	rs1227780	T	C	4387	50239	ENSG00000197467	COL13A1	0,50188	0,6664388	hsa-miR-146a-5p
10	69858631	rs2395286	T	C	4387	50241	ENSG00000197467	COL13A1	0,50228	0,6664388	hsa-miR-146a-5p
10	69828593	rs7101190	T	C	4387	50222	ENSG00000197467	COL13A1	0,50525	0,6673727	hsa-miR-146a-5p
10	69830967	rs11595284	A	G	4387	50225	ENSG00000197467	COL13A1	0,50724	0,6674694	hsa-miR-146a-5p
10	69853848	rs4746921	T	C	3415	45272	ENSG00000197467	COL13A1	0,51318	0,6729576	hsa-miR-146a-5p
10	69826540	rs1227769	T	C	4386	50242	ENSG00000197467	COL13A1	0,51735	0,6767113	hsa-miR-146a-5p
10	69897847	rs942569	A	G	3560	46924	ENSG00000197467	COL13A1	0,51933	0,6767113	hsa-miR-146a-5p
10	69823442	rs7077164	T	C	4485	50306	ENSG00000197467	COL13A1	0,52052	0,6767113	hsa-miR-146a-5p
10	69846660	rs10998997	A	G	3579	46880	ENSG00000197467	COL13A1	0,52399	0,6786185	hsa-miR-146a-5p
10	69818523	rs10998984	A	C	4387	50248	ENSG00000197467	COL13A1	0,52785	0,6794534	hsa-miR-146a-5p
10	69822880	rs10509315	A	T	4387	50249	ENSG00000197467	COL13A1	0,52785	0,6794534	hsa-miR-146a-5p
10	69860065	rs2395279	A	G	4387	50233	ENSG00000197467	COL13A1	0,52805	0,6794534	hsa-miR-146a-5p
10	69956753	rs4096395	T	C	4387	50243	ENSG00000197467	COL13A1	0,53082	0,6799456	hsa-miR-146a-5p
10	69831222	rs10823436	A	G	4387	50185	ENSG00000197467	COL13A1	0,53597	0,6799456	hsa-miR-146a-5p
10	69891081	rs2763366	T	G	4385	50199	ENSG00000197467	COL13A1	0,53637	0,6799456	hsa-miR-146a-5p
10	69954168	rs2394615	T	C	4484	50355	ENSG00000197467	COL13A1	0,53775	0,6799456	hsa-miR-146a-5p
10	69857350	rs2763353	A	G	4387	50248	ENSG00000197467	COL13A1	0,54033	0,680109	hsa-miR-146a-5p
10	69822027	rs3847351	A	G	4386	50248	ENSG00000197467	COL13A1	0,54152	0,680109	hsa-miR-146a-5p
10	69880735	rs1227783	T	C	3560	46885	ENSG00000197467	COL13A1	0,5438	0,680109	hsa-miR-146a-5p

10	69820812	rs17582395	A	C	4387	50249	ENSG00000197467	COL13A1	0,54488	0,680109	hsa-miR-146a-5p
10	69846720	rs12146341	C	G	4169	48506	ENSG00000197467	COL13A1	0,54716	0,680109	hsa-miR-146a-5p
10	69834545	rs2704486	A	C	4486	50356	ENSG00000197467	COL13A1	0,54746	0,680109	hsa-miR-146a-5p
10	69942221	rs16927103	A	G	4387	50247	ENSG00000197467	COL13A1	0,55043	0,680109	hsa-miR-146a-5p
10	69808822	rs2763342	A	G	4484	50282	ENSG00000197467	COL13A1	0,55389	0,680109	hsa-miR-146a-5p
10	69890030	rs1125133	A	C	3578	46326	ENSG00000197467	COL13A1	0,55469	0,680109	hsa-miR-146a-5p
10	69820364	rs17497526	T	C	4387	50244	ENSG00000197467	COL13A1	0,55716	0,680109	hsa-miR-146a-5p
10	69929392	rs2637229	A	G	4387	50223	ENSG00000197467	COL13A1	0,55765	0,680109	hsa-miR-146a-5p
10	69798474	rs4746004	A	G	4387	50230	ENSG00000197467	COL13A1	0,56755	0,6893637	hsa-miR-146a-5p
10	69958968	rs1061966	C	G	4486	50343	ENSG00000197467	COL13A1	0,56814	0,6893637	hsa-miR-146a-5p
10	69927455	rs1227779	T	C	4387	50234	ENSG00000197467	COL13A1	0,57299	0,6924591	hsa-miR-146a-5p
10	69952273	rs4746014	A	G	4387	50243	ENSG00000197467	COL13A1	0,57309	0,6924591	hsa-miR-146a-5p
10	69823467	rs1227764	A	G	4485	50364	ENSG00000197467	COL13A1	0,57359	0,6924591	hsa-miR-146a-5p
10	69950717	rs10999050	A	G	4387	50240	ENSG00000197467	COL13A1	0,5819	0,6947744	hsa-miR-146a-5p
10	69916120	rs1227613	C	G	4387	50224	ENSG00000197467	COL13A1	0,58239	0,6947744	hsa-miR-146a-5p
10	69903794	rs16927034	A	G	3560	46925	ENSG00000197467	COL13A1	0,58298	0,6947744	hsa-miR-146a-5p
10	69902333	rs10999020	A	G	4242	48597	ENSG00000197467	COL13A1	0,58615	0,6965704	hsa-miR-146a-5p
10	69905298	rs10999021	T	C	3560	46922	ENSG00000197467	COL13A1	0,58793	0,6965704	hsa-miR-146a-5p
10	69907488	rs1149701	A	G	3560	46920	ENSG00000197467	COL13A1	0,59159	0,6965704	hsa-miR-146a-5p
10	69903469	rs942575	A	G	3560	46924	ENSG00000197467	COL13A1	0,59287	0,6965704	hsa-miR-146a-5p
10	69937760	rs3750781	C	G	4387	50245	ENSG00000197467	COL13A1	0,59317	0,6965704	hsa-miR-146a-5p
10	69819759	rs10998986	A	G	3649	46411	ENSG00000197467	COL13A1	0,59683	0,6976608	hsa-miR-146a-5p
10	69823240	rs7076867	T	C	4341	48727	ENSG00000197467	COL13A1	0,60138	0,7005748	hsa-miR-146a-5p
10	69797990	rs16926886	T	C	4486	50363	ENSG00000197467	COL13A1	0,61275	0,7060061	hsa-miR-146a-5p
10	69896277	rs2395235	T	C	3560	46917	ENSG00000197467	COL13A1	0,61304	0,7060061	hsa-miR-146a-5p
10	69915529	rs16927048	A	C	4387	50220	ENSG00000197467	COL13A1	0,61531	0,7060061	hsa-miR-146a-5p
10	69838303	rs3858154	T	G	4485	50355	ENSG00000197467	COL13A1	0,61561	0,7060061	hsa-miR-146a-5p
10	69950506	rs10762324	A	G	4484	50343	ENSG00000197467	COL13A1	0,6169	0,7060061	hsa-miR-146a-5p
10	69880976	rs999706	A	G	4385	50189	ENSG00000197467	COL13A1	0,62065	0,7084816	hsa-miR-146a-5p
10	69907739	rs1149698	T	C	4386	50139	ENSG00000197467	COL13A1	0,62757	0,7102433	hsa-miR-146a-5p
10	69954781	rs4746937	A	G	4485	50357	ENSG00000197467	COL13A1	0,62984	0,7102433	hsa-miR-146a-5p
10	69821137	rs1227776	A	G	4386	50245	ENSG00000197467	COL13A1	0,63379	0,7110979	hsa-miR-146a-5p
10	69956883	rs4746939	T	C	4387	50243	ENSG00000197467	COL13A1	0,63448	0,7110979	hsa-miR-146a-5p
10	69878230	rs2683548	A	G	4386	50154	ENSG00000197467	COL13A1	0,63547	0,7110979	hsa-miR-146a-5p
10	69840312	rs10998993	A	G	4193	16901	ENSG00000197467	COL13A1	0,63774	0,7120782	hsa-miR-146a-5p
10	69812036	rs2683553	T	C	4387	50240	ENSG00000197467	COL13A1	0,64347	0,7127187	hsa-miR-146a-5p
10	69838552	rs7913732	C	G	4485	50365	ENSG00000197467	COL13A1	0,65128	0,7127187	hsa-miR-146a-5p
10	69949858	rs10823449	A	G	4485	50346	ENSG00000197467	COL13A1	0,65602	0,7127187	hsa-miR-146a-5p
10	69965264	rs3847355	A	G	4486	50363	ENSG00000197467	COL13A1	0,6571	0,7127187	hsa-miR-146a-5p
10	69838241	rs12357700	T	C	4193	16901	ENSG00000197467	COL13A1	0,65898	0,7127187	hsa-miR-146a-5p
10	69887902	rs12252215	T	C	4383	50205	ENSG00000197467	COL13A1	0,65997	0,7127187	hsa-miR-146a-5p
10	69888022	rs12259074	A	G	4383	50204	ENSG00000197467	COL13A1	0,66194	0,7127187	hsa-miR-146a-5p
10	69916994	rs7068393	A	G	4387	50220	ENSG00000197467	COL13A1	0,66668	0,714058	hsa-miR-146a-5p

10	69821375	rs1227777	T	C	4386	50246	ENSG00000197467	COL13A1	0,66747	0,714058	hsa-miR-146a-5p
10	69944900	rs4082516	C	G	4387	50246	ENSG00000197467	COL13A1	0,66964	0,7148823	hsa-miR-146a-5p
10	69812209	rs2683551	C	G	4387	50239	ENSG00000197467	COL13A1	0,67152	0,7152448	hsa-miR-146a-5p
10	69894250	rs11599021	C	G	4387	50203	ENSG00000197467	COL13A1	0,67152	0,7152448	hsa-miR-146a-5p
10	69911806	rs2894280	T	C	4387	50241	ENSG00000197467	COL13A1	0,67961	0,7188577	hsa-miR-146a-5p
10	69950386	rs4746013	A	G	4484	50342	ENSG00000197467	COL13A1	0,6804	0,7188577	hsa-miR-146a-5p
10	69903087	rs12243266	T	C	3578	46336	ENSG00000197467	COL13A1	0,68948	0,7238345	hsa-miR-146a-5p
10	69952746	rs3750779	T	C	4387	50243	ENSG00000197467	COL13A1	0,68997	0,7238345	hsa-miR-146a-5p
10	69944995	rs3843585	T	C	4486	50346	ENSG00000197467	COL13A1	0,69116	0,7238811	hsa-miR-146a-5p
10	69914172	rs7091292	A	G	3560	46917	ENSG00000197467	COL13A1	0,69382	0,7241555	hsa-miR-146a-5p
10	69940444	rs16927097	A	C	4387	50245	ENSG00000197467	COL13A1	0,69392	0,7241555	hsa-miR-146a-5p
10	69937270	rs4746935	T	C	4386	50248	ENSG00000197467	COL13A1	0,70418	0,7253664	hsa-miR-146a-5p
10	69950827	rs3793814	A	G	4484	50345	ENSG00000197467	COL13A1	0,70862	0,7253664	hsa-miR-146a-5p
10	69916644	rs3793830	T	C	4386	50159	ENSG00000197467	COL13A1	0,71237	0,7253664	hsa-miR-146a-5p
10	69937076	rs4746933	T	C	4387	50249	ENSG00000197467	COL13A1	0,71346	0,7253664	hsa-miR-146a-5p
10	69831131	rs1227759	A	G	4341	48713	ENSG00000197467	COL13A1	0,71375	0,7253664	hsa-miR-146a-5p
10	69910999	rs12765629	A	G	3560	46915	ENSG00000197467	COL13A1	0,71582	0,7253664	hsa-miR-146a-5p
10	69836634	rs7080527	T	C	4242	48564	ENSG00000197467	COL13A1	0,71789	0,7253664	hsa-miR-146a-5p
10	69798941	rs3108966	A	C	4486	50367	ENSG00000197467	COL13A1	0,71829	0,7253664	hsa-miR-146a-5p
10	69818880	rs1227772	T	C	4387	50221	ENSG00000197467	COL13A1	0,71898	0,7253664	hsa-miR-146a-5p
10	69892372	rs7070915	T	C	4385	49906	ENSG00000197467	COL13A1	0,72095	0,7253664	hsa-miR-146a-5p
10	69879238	rs4746010	A	G	2281	8285	ENSG00000197467	COL13A1	0,72115	0,7253664	hsa-miR-146a-5p
10	69821106	rs1227775	C	G	4387	50225	ENSG00000197467	COL13A1	0,7251	0,7284203	hsa-miR-146a-5p
10	69941828	rs3793818	A	G	4377	50164	ENSG00000197467	COL13A1	0,72904	0,7290182	hsa-miR-146a-5p
10	69953140	rs4746015	A	G	4486	50366	ENSG00000197467	COL13A1	0,73476	0,7290182	hsa-miR-146a-5p
10	69812607	rs4746005	A	G	4387	50244	ENSG00000197467	COL13A1	0,73486	0,7290182	hsa-miR-146a-5p
10	69948078	rs12766101	A	T	2967	44718	ENSG00000197467	COL13A1	0,73673	0,7290182	hsa-miR-146a-5p
10	69817340	rs11598108	T	C	4486	50366	ENSG00000197467	COL13A1	0,73762	0,7290182	hsa-miR-146a-5p
10	69835305	rs10998990	T	C	4387	50230	ENSG00000197467	COL13A1	0,74442	0,7305878	hsa-miR-146a-5p
10	69892745	rs7071359	A	G	4387	50214	ENSG00000197467	COL13A1	0,74847	0,7328334	hsa-miR-146a-5p
10	69937473	rs3750782	A	G	4386	50233	ENSG00000197467	COL13A1	0,75142	0,7330704	hsa-miR-146a-5p
10	69799333	rs2642609	A	G	4486	50368	ENSG00000197467	COL13A1	0,7531	0,7330704	hsa-miR-146a-5p
10	69858555	rs1227739	C	G	4242	48579	ENSG00000197467	COL13A1	0,75507	0,7330704	hsa-miR-146a-5p
10	69833899	rs10823437	A	T	4387	50228	ENSG00000197467	COL13A1	0,75517	0,7330704	hsa-miR-146a-5p
10	69811765	rs2763350	A	G	4387	50245	ENSG00000197467	COL13A1	0,75783	0,7340451	hsa-miR-146a-5p
10	69904565	rs2683576	T	C	4486	50363	ENSG00000197467	COL13A1	0,75872	0,7340451	hsa-miR-146a-5p
10	69938548	rs3793823	A	C	4386	50249	ENSG00000197467	COL13A1	0,76266	0,7350726	hsa-miR-146a-5p
10	69900382	rs3858160	A	G	4387	50240	ENSG00000197467	COL13A1	0,7673	0,7374576	hsa-miR-146a-5p
10	69861415	rs10823444	C	G	4292	17020	ENSG00000197467	COL13A1	0,76848	0,7378975	hsa-miR-146a-5p
10	69816779	rs10998982	A	C	4486	50366	ENSG00000197467	COL13A1	0,7736	0,74051	hsa-miR-146a-5p
10	69835738	rs10823439	C	G	4387	50199	ENSG00000197467	COL13A1	0,7741	0,74051	hsa-miR-146a-5p
10	69798760	rs3104052	A	G	4486	50367	ENSG00000197467	COL13A1	0,77705	0,7414066	hsa-miR-146a-5p
10	69931921	rs2637230	C	G	4387	50230	ENSG00000197467	COL13A1	0,78316	0,7442985	hsa-miR-146a-5p



10	69818544	rs1234901	T	C	4385	50248	ENSG00000197467	COL13A1	0,78454	0,7447851	hsa-miR-146a-5p
10	69900272	rs1227737	A	C	3578	46335	ENSG00000197467	COL13A1	0,7874	0,7448636	hsa-miR-146a-5p
10	69838258	rs3858153	A	G	4485	50366	ENSG00000197467	COL13A1	0,78829	0,7450157	hsa-miR-146a-5p
10	69929889	rs2763339	T	G	4387	50233	ENSG00000197467	COL13A1	0,8013	0,7518326	hsa-miR-146a-5p
10	69834302	rs1228670	A	G	4486	50358	ENSG00000197467	COL13A1	0,80435	0,7532262	hsa-miR-146a-5p
10	69944810	rs4082517	A	G	3560	46921	ENSG00000197467	COL13A1	0,80671	0,7533646	hsa-miR-146a-5p
10	69947931	rs3793815	T	C	4486	50344	ENSG00000197467	COL13A1	0,8079	0,7537869	hsa-miR-146a-5p
10	69829621	rs16926941	T	C	3649	46411	ENSG00000197467	COL13A1	0,81253	0,7555242	hsa-miR-146a-5p
10	69814189	rs12768901	T	C	4486	50366	ENSG00000197467	COL13A1	0,81272	0,7555242	hsa-miR-146a-5p
10	69813509	rs10998980	C	G	4486	50366	ENSG00000197467	COL13A1	0,8207	0,7587026	hsa-miR-146a-5p
10	69916055	rs3793831	A	G	4387	50243	ENSG00000197467	COL13A1	0,821	0,7587026	hsa-miR-146a-5p
10	69844942	rs10998995	A	G	4171	48513	ENSG00000197467	COL13A1	0,82169	0,7587026	hsa-miR-146a-5p
10	69905920	rs2683575	C	G	4486	50361	ENSG00000197467	COL13A1	0,82652	0,7614246	hsa-miR-146a-5p
10	69828748	rs1227756	A	G	4387	50239	ENSG00000197467	COL13A1	0,8279	0,7618655	hsa-miR-146a-5p
10	69908640	rs1149697	A	G	4486	50351	ENSG00000197467	COL13A1	0,82849	0,7618655	hsa-miR-146a-5p
10	69889553	rs2683572	A	G	3415	45247	ENSG00000197467	COL13A1	0,84021	0,7678054	hsa-miR-146a-5p
10	69933942	rs2683546	A	C	4387	50247	ENSG00000197467	COL13A1	0,85124	0,7708274	hsa-miR-146a-5p
10	69838479	rs3858155	T	C	4485	50366	ENSG00000197467	COL13A1	0,85656	0,7708274	hsa-miR-146a-5p
10	69923477	rs3793828	T	C	3794	48048	ENSG00000197467	COL13A1	0,85991	0,7708274	hsa-miR-146a-5p
10	69828131	rs1227753	A	G	4387	50245	ENSG00000197467	COL13A1	0,86119	0,7708274	hsa-miR-146a-5p
10	69801243	rs3104051	A	G	4486	50363	ENSG00000197467	COL13A1	0,86178	0,7708274	hsa-miR-146a-5p
10	69897865	rs942568	T	G	4486	50364	ENSG00000197467	COL13A1	0,86503	0,7708274	hsa-miR-146a-5p
10	69888766	rs10999014	T	C	4242	48561	ENSG00000197467	COL13A1	0,86513	0,7708274	hsa-miR-146a-5p
10	69857828	rs4076957	A	G	4486	50347	ENSG00000197467	COL13A1	0,87143	0,7708274	hsa-miR-146a-5p
10	69857631	rs3858156	T	C	4486	50347	ENSG00000197467	COL13A1	0,87547	0,7708274	hsa-miR-146a-5p
10	69843636	rs11597960	T	C	2930	43673	ENSG00000197467	COL13A1	0,88187	0,770984	hsa-miR-146a-5p
10	69820221	rs3847350	A	G	4486	50367	ENSG00000197467	COL13A1	0,89053	0,770984	hsa-miR-146a-5p
10	69948649	rs10823448	A	G	4387	50235	ENSG00000197467	COL13A1	0,89063	0,770984	hsa-miR-146a-5p
10	69927736	rs3793825	A	G	4387	50221	ENSG00000197467	COL13A1	0,89339	0,770984	hsa-miR-146a-5p
10	69822699	rs2763341	A	G	4486	50362	ENSG00000197467	COL13A1	0,89723	0,770984	hsa-miR-146a-5p
10	69897733	rs10762322	A	G	4486	50330	ENSG00000197467	COL13A1	0,89792	0,770984	hsa-miR-146a-5p
10	69822615	rs8181302	A	G	4387	50218	ENSG00000197467	COL13A1	0,90117	0,770984	hsa-miR-146a-5p
10	69887413	rs11813062	T	C	4387	50207	ENSG00000197467	COL13A1	0,90756	0,770984	hsa-miR-146a-5p
10	69840538	rs10998994	A	G	2773	11379	ENSG00000197467	COL13A1	0,90865	0,770984	hsa-miR-146a-5p
10	69816056	rs2704494	A	G	4387	50231	ENSG00000197467	COL13A1	0,90894	0,770984	hsa-miR-146a-5p
10	69828976	rs10998988	A	G	4486	50354	ENSG00000197467	COL13A1	0,91032	0,770984	hsa-miR-146a-5p
10	69808005	rs2763336	A	G	4486	50359	ENSG00000197467	COL13A1	0,9117	0,770984	hsa-miR-146a-5p
10	69825071	rs1227768	T	C	4486	50366	ENSG00000197467	COL13A1	0,91268	0,770984	hsa-miR-146a-5p
10	69836158	rs10823440	A	C	4170	48508	ENSG00000197467	COL13A1	0,91623	0,7713929	hsa-miR-146a-5p
10	69819925	rs10823435	A	G	4387	50211	ENSG00000197467	COL13A1	0,91839	0,7713929	hsa-miR-146a-5p
10	69952243	rs10466015	A	T	4387	50244	ENSG00000197467	COL13A1	0,91859	0,7713929	hsa-miR-146a-5p
10	69895687	rs1227744	A	G	3560	46910	ENSG00000197467	COL13A1	0,91997	0,7713929	hsa-miR-146a-5p
10	69813124	rs2704495	A	G	4486	50352	ENSG00000197467	COL13A1	0,92115	0,7713929	hsa-miR-146a-5p

10	69831353	rs1227761	T	C	4387	50185	ENSG00000197467	COL13A1	0,92273	0,7720832	hsa-miR-146a-5p
10	69901120	rs3886895	T	C	2967	44724	ENSG00000197467	COL13A1	0,92706	0,7722467	hsa-miR-146a-5p
10	69868891	rs12146165	A	G	3397	15751	ENSG00000197467	COL13A1	0,92824	0,7722467	hsa-miR-146a-5p
10	69926105	rs2274179	A	C	4387	50227	ENSG00000197467	COL13A1	0,93119	0,7722467	hsa-miR-146a-5p
10	69824706	rs1227766	T	G	4486	50367	ENSG00000197467	COL13A1	0,93208	0,7722467	hsa-miR-146a-5p
10	69800277	rs2704506	T	C	4486	50355	ENSG00000197467	COL13A1	0,93769	0,7722467	hsa-miR-146a-5p
10	69839040	rs10762314	C	G	4242	48584	ENSG00000197467	COL13A1	0,93976	0,7722467	hsa-miR-146a-5p
10	69824393	rs12777790	A	G	3560	46905	ENSG00000197467	COL13A1	0,94104	0,7722467	hsa-miR-146a-5p
10	69928411	rs2763337	A	G	4387	50246	ENSG00000197467	COL13A1	0,94202	0,7722467	hsa-miR-146a-5p
10	69824001	rs11598684	T	C	4387	50218	ENSG00000197467	COL13A1	0,94557	0,7727494	hsa-miR-146a-5p
10	69853733	rs2683563	T	G	4486	50334	ENSG00000197467	COL13A1	0,94704	0,7727494	hsa-miR-146a-5p
10	69813460	rs10998979	C	G	4387	50248	ENSG00000197467	COL13A1	0,95167	0,7739052	hsa-miR-146a-5p
10	69955242	rs4746938	A	G	4486	50366	ENSG00000197467	COL13A1	0,95285	0,7739052	hsa-miR-146a-5p
10	69885684	rs11814083	T	C	4242	48588	ENSG00000197467	COL13A1	0,95561	0,7739052	hsa-miR-146a-5p
10	69919521	rs3855625	A	G	4385	50229	ENSG00000197467	COL13A1	0,95669	0,7739052	hsa-miR-146a-5p
10	69815795	rs2763367	A	G	4387	50236	ENSG00000197467	COL13A1	0,95748	0,7739052	hsa-miR-146a-5p
10	69930719	rs2683571	C	G	4387	50238	ENSG00000197467	COL13A1	0,96328	0,776137	hsa-miR-146a-5p
10	69830232	rs1227758	T	C	4387	50188	ENSG00000197467	COL13A1	0,9686	0,7791944	hsa-miR-146a-5p
10	69812106	rs10762311	T	C	3560	46917	ENSG00000197467	COL13A1	0,96988	0,7796103	hsa-miR-146a-5p
10	69799967	rs2642608	T	C	4486	50364	ENSG00000197467	COL13A1	0,97844	0,7830653	hsa-miR-146a-5p
10	69887115	rs11813044	A	G	4387	50207	ENSG00000197467	COL13A1	0,97923	0,7830653	hsa-miR-146a-5p
10	69804744	rs2704503	T	C	4486	50359	ENSG00000197467	COL13A1	0,98455	0,7853759	hsa-miR-146a-5p
10	69931813	rs2683570	A	C	4387	50240	ENSG00000197467	COL13A1	0,98474	0,7853759	hsa-miR-146a-5p
10	69839215	rs4746007	T	C	3649	46394	ENSG00000197467	COL13A1	0,99665	0,7916493	hsa-miR-146a-5p
10	69805240	rs4746912	T	G	4383	50195	ENSG00000197467	COL13A1	0,99803	0,7916493	hsa-miR-146a-5p
15	67078030	rs12901081	C	G	4387	50190	ENSG00000166949	SMAD3	0,0034798	0,03174252	hsa-miR-152-3p
15	67078107	rs12901499	A	G	4387	50187	ENSG00000166949	SMAD3	0,0038101	0,03444792	hsa-miR-152-3p
15	67074495	rs7177795	A	T	4387	50247	ENSG00000166949	SMAD3	0,0090199	0,06184727	hsa-miR-152-3p
15	67073284	rs10518707	A	G	4386	50085	ENSG00000166949	SMAD3	0,0095279	0,06428728	hsa-miR-152-3p
15	67077783	rs11635145	A	G	4387	50245	ENSG00000166949	SMAD3	0,0099159	0,06428728	hsa-miR-152-3p
15	67075296	rs1498506	A	C	4387	50245	ENSG00000166949	SMAD3	0,010005	0,06428728	hsa-miR-152-3p
15	67070945	rs10518705	T	G	4387	50245	ENSG00000166949	SMAD3	0,012798	0,07782837	hsa-miR-152-3p
15	67067545	rs4776338	T	C	4387	50243	ENSG00000166949	SMAD3	0,013895	0,08253444	hsa-miR-152-3p
15	67071235	rs11632964	T	C	4387	50244	ENSG00000166949	SMAD3	0,026843	0,1443386	hsa-miR-152-3p
15	67102046	rs12916733	T	C	3560	46888	ENSG00000166949	SMAD3	0,033128	0,1704576	hsa-miR-152-3p
15	67078051	rs12901071	A	G	4387	50203	ENSG00000166949	SMAD3	0,040086	0,1987296	hsa-miR-152-3p
15	67119711	rs11637581	T	C	3559	46906	ENSG00000166949	SMAD3	0,049652	0,2337664	hsa-miR-152-3p
15	67119700	rs11637580	C	G	3560	46925	ENSG00000166949	SMAD3	0,049893	0,2337822	hsa-miR-152-3p
15	67109408	rs11071933	C	G	4486	50342	ENSG00000166949	SMAD3	0,055246	0,2508554	hsa-miR-152-3p
15	67100707	rs4776890	T	G	4486	50329	ENSG00000166949	SMAD3	0,086526	0,3453121	hsa-miR-152-3p
15	67140338	rs2414937	C	G	4486	50344	ENSG00000166949	SMAD3	0,10427	0,3915978	hsa-miR-152-3p
15	67069447	rs16950553	A	G	4486	50367	ENSG00000166949	SMAD3	0,12643	0,4256904	hsa-miR-152-3p
15	67194252	rs12900401	T	C	4387	50246	ENSG00000166949	SMAD3	0,12837	0,4256904	hsa-miR-152-3p

15	67198148	rs10163040	A	C	4486	50352	ENSG00000166949	SMAD3	0,1297	0,4256904	hsa-miR-152-3p
15	67121226	rs7180412	A	G	4341	48731	ENSG00000166949	SMAD3	0,15954	0,4747631	hsa-miR-152-3p
15	67190938	rs8025774	T	C	4486	50367	ENSG00000166949	SMAD3	0,16137	0,4747631	hsa-miR-152-3p
15	67198936	rs12917612	A	C	4486	50352	ENSG00000166949	SMAD3	0,16198	0,4747631	hsa-miR-152-3p
15	67109128	rs2118611	T	C	4485	50363	ENSG00000166949	SMAD3	0,16289	0,4750268	hsa-miR-152-3p
15	67120258	rs718663	A	G	4341	48702	ENSG00000166949	SMAD3	0,16452	0,4761558	hsa-miR-152-3p
15	67108152	rs2118612	T	C	4483	50326	ENSG00000166949	SMAD3	0,17284	0,4831296	hsa-miR-152-3p
15	67193329	rs3743342	T	C	4486	50367	ENSG00000166949	SMAD3	0,17669	0,4878826	hsa-miR-152-3p
15	67145753	rs893473	A	G	4385	50209	ENSG00000166949	SMAD3	0,17841	0,4899834	hsa-miR-152-3p
15	67142010	rs12915039	A	C	4386	50219	ENSG00000166949	SMAD3	0,18338	0,4928087	hsa-miR-152-3p
15	67195211	rs10438355	C	G	4486	50367	ENSG00000166949	SMAD3	0,18378	0,4928087	hsa-miR-152-3p
15	67115903	rs7168228	A	T	4233	48123	ENSG00000166949	SMAD3	0,19319	0,506899	hsa-miR-152-3p
15	67173228	rs12593904	T	G	3677	46456	ENSG00000166949	SMAD3	0,1935	0,506899	hsa-miR-152-3p
15	67184430	rs7181556	T	C	4486	50355	ENSG00000166949	SMAD3	0,19613	0,5098666	hsa-miR-152-3p
15	67166675	rs7179893	T	C	3014	44777	ENSG00000166949	SMAD3	0,19754	0,510241	hsa-miR-152-3p
15	67188910	rs3825977	T	C	4486	50354	ENSG00000166949	SMAD3	0,19795	0,510241	hsa-miR-152-3p
15	67192818	rs12595334	T	C	4486	50352	ENSG00000166949	SMAD3	0,19815	0,510241	hsa-miR-152-3p
15	67175491	rs12324906	A	G	3677	46456	ENSG00000166949	SMAD3	0,19926	0,510241	hsa-miR-152-3p
15	67174264	rs2278546	A	G	3677	46456	ENSG00000166949	SMAD3	0,20108	0,5110318	hsa-miR-152-3p
15	67173025	rs4776344	A	G	4386	50240	ENSG00000166949	SMAD3	0,214	0,5268303	hsa-miR-152-3p
15	67191641	rs8031440	A	G	4486	50352	ENSG00000166949	SMAD3	0,22137	0,5405029	hsa-miR-152-3p
15	67121717	rs7163381	A	G	4486	50349	ENSG00000166949	SMAD3	0,22278	0,5417929	hsa-miR-152-3p
15	67175203	rs12708492	T	C	4485	50303	ENSG00000166949	SMAD3	0,2256	0,5435986	hsa-miR-152-3p
15	67126675	rs991157	T	C	3560	46917	ENSG00000166949	SMAD3	0,24061	0,5625192	hsa-miR-152-3p
15	67165512	rs2289259	A	G	3014	44777	ENSG00000166949	SMAD3	0,24544	0,5641741	hsa-miR-152-3p
15	67191781	rs8031627	A	G	4486	50352	ENSG00000166949	SMAD3	0,24664	0,5641741	hsa-miR-152-3p
15	67139823	rs10518714	A	C	3560	46900	ENSG00000166949	SMAD3	0,25076	5,70E-01	hsa-miR-152-3p
15	67199963	rs7166081	A	G	4482	50054	ENSG00000166949	SMAD3	0,27206	5,82E-01	hsa-miR-152-3p
15	67141603	rs12443188	A	T	4387	50227	ENSG00000166949	SMAD3	0,28119	5,82E-01	hsa-miR-152-3p
15	67161551	rs16950679	A	G	3578	46337	ENSG00000166949	SMAD3	0,2867	5,82E-01	hsa-miR-152-3p
15	67068970	rs7162912	T	G	4384	50191	ENSG00000166949	SMAD3	0,30353	0,587559	hsa-miR-152-3p
15	67145047	rs12439792	A	T	4242	48601	ENSG00000166949	SMAD3	0,32654	0,6016547	hsa-miR-152-3p
15	67069436	rs12904944	A	G	4384	50248	ENSG00000166949	SMAD3	0,33064	0,6025602	hsa-miR-152-3p
15	67149659	rs1866316	T	C	4486	50357	ENSG00000166949	SMAD3	0,33324	0,6025787	hsa-miR-152-3p
15	67115561	rs1438386	A	G	4486	50323	ENSG00000166949	SMAD3	0,33993	0,6045483	hsa-miR-152-3p
15	67121899	rs4776892	A	T	4486	50350	ENSG00000166949	SMAD3	0,34562	0,6067098	hsa-miR-152-3p
15	67152055	rs8026358	T	C	2751	43013	ENSG00000166949	SMAD3	0,3565	0,6131662	hsa-miR-152-3p
15	67154447	rs744910	A	G	4485	50364	ENSG00000166949	SMAD3	0,37765	0,6294381	hsa-miR-152-3p
15	67157322	rs2033784	A	G	4486	50364	ENSG00000166949	SMAD3	0,37775	0,6294381	hsa-miR-152-3p
15	67152160	rs10152307	T	C	3560	46925	ENSG00000166949	SMAD3	0,38701	0,6294381	hsa-miR-152-3p
15	67152409	rs10152544	T	C	4486	50367	ENSG00000166949	SMAD3	0,38891	0,6294381	hsa-miR-152-3p
15	67154493	rs731874	A	G	3559	46919	ENSG00000166949	SMAD3	0,3904	0,6294381	hsa-miR-152-3p
15	67155114	rs11634793	T	C	4486	50367	ENSG00000166949	SMAD3	0,39229	0,6294381	hsa-miR-152-3p

15	67166301	rs17228212	T	C	3560	46925	ENSG00000166949	SMAD3	0,39249	0,6294381	hsa-miR-152-3p
15	67158877	rs7174445	C	G	4486	50365	ENSG00000166949	SMAD3	0,39996	0,6294381	hsa-miR-152-3p
15	67165814	rs4562997	A	G	4486	50364	ENSG00000166949	SMAD3	0,40096	0,6294381	hsa-miR-152-3p
15	67159383	rs10152987	A	G	3560	46927	ENSG00000166949	SMAD3	0,40145	0,6294381	hsa-miR-152-3p
15	67146225	rs17227716	T	G	2967	44719	ENSG00000166949	SMAD3	0,40354	0,6294381	hsa-miR-152-3p
15	67145525	rs17293443	T	C	4387	50225	ENSG00000166949	SMAD3	0,40434	0,6294381	hsa-miR-152-3p
15	67175492	rs11634560	T	G	3659	46989	ENSG00000166949	SMAD3	0,41757	0,6301526	hsa-miR-152-3p
15	67151626	rs11630297	C	G	3560	46916	ENSG00000166949	SMAD3	0,42265	0,6301894	hsa-miR-152-3p
15	67186713	rs7173811	T	C	4486	50336	ENSG00000166949	SMAD3	0,42533	0,6301894	hsa-miR-152-3p
15	67183980	rs6494636	C	G	4486	50334	ENSG00000166949	SMAD3	0,44929	0,6410363	hsa-miR-152-3p
15	67156561	rs8032739	A	G	4486	50364	ENSG00000166949	SMAD3	0,44988	0,6410363	hsa-miR-152-3p
15	67158555	rs7173698	A	G	4486	50365	ENSG00000166949	SMAD3	0,45306	0,6419929	hsa-miR-152-3p
15	67085470	rs16950559	A	T	4387	50240	ENSG00000166949	SMAD3	0,48006	0,6531182	hsa-miR-152-3p
15	67195726	rs746978	T	G	4486	50365	ENSG00000166949	SMAD3	0,48304	0,6531182	hsa-miR-152-3p
15	67175169	rs12913547	T	C	4485	50336	ENSG00000166949	SMAD3	0,48522	0,6538066	hsa-miR-152-3p
15	67141720	rs17293408	A	G	3415	45275	ENSG00000166949	SMAD3	0,52408	0,6786185	hsa-miR-152-3p
15	67142737	rs745103	A	G	4386	50239	ENSG00000166949	SMAD3	0,5326	0,6799456	hsa-miR-152-3p
15	67188631	rs11632754	T	C	4485	50348	ENSG00000166949	SMAD3	0,54785	0,680109	hsa-miR-152-3p
15	67136689	rs12916244	C	G	4242	48600	ENSG00000166949	SMAD3	0,55429	0,680109	hsa-miR-152-3p
15	67138214	rs12914140	T	C	4242	48600	ENSG00000166949	SMAD3	0,59455	0,6968333	hsa-miR-152-3p
15	67171675	rs16950687	A	G	4485	50368	ENSG00000166949	SMAD3	0,60217	0,7006961	hsa-miR-152-3p
15	67081040	rs16950556	C	G	3723	47968	ENSG00000166949	SMAD3	0,61284	0,7060061	hsa-miR-152-3p
15	67146248	rs750766	T	C	4476	50337	ENSG00000166949	SMAD3	0,62589	0,7102433	hsa-miR-152-3p
15	67168973	rs7183244	T	C	4485	50363	ENSG00000166949	SMAD3	0,62885	0,7102433	hsa-miR-152-3p
15	67093359	rs881862	C	G	4483	50299	ENSG00000166949	SMAD3	0,62905	0,7102433	hsa-miR-152-3p
15	67085695	rs11856909	A	G	4486	50306	ENSG00000166949	SMAD3	0,64891	0,7127187	hsa-miR-152-3p
15	67093637	rs881861	A	G	4483	50308	ENSG00000166949	SMAD3	0,64979	0,7127187	hsa-miR-152-3p
15	67092995	rs1465842	T	C	4483	50307	ENSG00000166949	SMAD3	0,65019	0,7127187	hsa-miR-152-3p
15	67190030	rs11629568	T	G	3659	47030	ENSG00000166949	SMAD3	0,65147	0,7127187	hsa-miR-152-3p
15	67093153	rs1465840	T	C	4483	50308	ENSG00000166949	SMAD3	0,657	0,7127187	hsa-miR-152-3p
15	67166592	rs7179840	T	C	4486	50366	ENSG00000166949	SMAD3	0,65819	0,7127187	hsa-miR-152-3p
15	67086069	rs2118613	C	G	4485	50304	ENSG00000166949	SMAD3	0,65888	0,7127187	hsa-miR-152-3p
15	67168419	rs11639295	T	C	4486	50368	ENSG00000166949	SMAD3	0,65937	0,7127187	hsa-miR-152-3p
15	67146869	rs2289263	T	G	4474	50102	ENSG00000166949	SMAD3	0,66046	0,7127187	hsa-miR-152-3p
15	67177230	rs1470002	A	G	4486	50364	ENSG00000166949	SMAD3	0,66273	0,7127187	hsa-miR-152-3p
15	67087808	rs11631839	A	G	4485	50304	ENSG00000166949	SMAD3	0,66678	0,714058	hsa-miR-152-3p
15	67167671	rs11638064	A	G	4485	50355	ENSG00000166949	SMAD3	0,67211	0,7152448	hsa-miR-152-3p
15	67122087	rs920293	A	G	4486	50355	ENSG00000166949	SMAD3	0,67418	0,7152448	hsa-miR-152-3p
15	67086884	rs12911469	A	G	4485	50304	ENSG00000166949	SMAD3	0,6803	0,7188577	hsa-miR-152-3p
15	67092113	rs12442353	A	G	4483	50291	ENSG00000166949	SMAD3	0,69224	0,7238811	hsa-miR-152-3p
15	67179847	rs3784681	C	G	4486	50343	ENSG00000166949	SMAD3	0,69501	0,7245529	hsa-miR-152-3p
15	67096215	rs7176870	A	G	4486	50313	ENSG00000166949	SMAD3	0,69856	0,7253664	hsa-miR-152-3p
15	67094975	rs7169630	T	C	4483	50308	ENSG00000166949	SMAD3	0,7029	0,7253664	hsa-miR-152-3p

15	67091921	rs4776888	T	C	4483	50292	ENSG00000166949	SMAD3	0,70507	0,7253664	hsa-miR-152-3p
15	67094523	rs7169183	C	G	4483	50307	ENSG00000166949	SMAD3	0,70547	0,7253664	hsa-miR-152-3p
15	67093131	rs1465841	C	G	4483	50308	ENSG00000166949	SMAD3	0,70813	0,7253664	hsa-miR-152-3p
15	67099467	rs9972423	A	T	4486	50322	ENSG00000166949	SMAD3	0,71898	0,7253664	hsa-miR-152-3p
15	67064436	rs3809572	A	G	4387	50243	ENSG00000166949	SMAD3	0,71937	0,7253664	hsa-miR-152-3p
15	67125895	rs8028147	A	G	4386	50249	ENSG00000166949	SMAD3	0,7319	0,7290182	hsa-miR-152-3p
15	67126053	rs4776342	A	G	4386	50249	ENSG00000166949	SMAD3	0,7321	0,7290182	hsa-miR-152-3p
15	67159616	rs4601989	T	C	4485	50358	ENSG00000166949	SMAD3	0,73535	0,7290182	hsa-miR-152-3p
15	67135676	rs4147358	A	C	4386	50246	ENSG00000166949	SMAD3	0,73703	0,7290182	hsa-miR-152-3p
15	67133236	rs10163132	A	T	4386	50249	ENSG00000166949	SMAD3	0,7393	0,7290182	hsa-miR-152-3p
15	67125462	rs11631254	T	C	4387	50221	ENSG00000166949	SMAD3	0,74038	0,7290182	hsa-miR-152-3p
15	67125867	rs16950635	A	G	4486	50366	ENSG00000166949	SMAD3	0,74176	0,7293785	hsa-miR-152-3p
15	67124414	rs16950615	C	G	4486	50365	ENSG00000166949	SMAD3	0,74886	0,7328334	hsa-miR-152-3p
15	67090949	rs12904824	A	G	4483	50291	ENSG00000166949	SMAD3	0,75448	0,7330704	hsa-miR-152-3p
15	67088271	rs12907997	T	C	4485	50306	ENSG00000166949	SMAD3	0,75507	0,7330704	hsa-miR-152-3p
15	67106746	rs2053294	A	G	4484	50217	ENSG00000166949	SMAD3	0,7599	0,7344911	hsa-miR-152-3p
15	67130968	rs6494633	T	C	4382	50168	ENSG00000166949	SMAD3	0,76414	0,735112	hsa-miR-152-3p
15	67128342	rs1545161	A	G	4386	50243	ENSG00000166949	SMAD3	0,77932	0,7420296	hsa-miR-152-3p
15	67082011	rs12903831	A	G	4486	50305	ENSG00000166949	SMAD3	0,79144	0,7462616	hsa-miR-152-3p
15	67135996	rs2118610	T	C	4386	50246	ENSG00000166949	SMAD3	0,79253	0,7462616	hsa-miR-152-3p
15	67149426	rs1866317	C	G	4486	50361	ENSG00000166949	SMAD3	0,81401	0,7557107	hsa-miR-152-3p
15	67081773	rs6494629	T	C	4486	50307	ENSG00000166949	SMAD3	0,81607	0,7565732	hsa-miR-152-3p
15	67150217	rs11637816	A	G	4486	50355	ENSG00000166949	SMAD3	0,82011	0,7587026	hsa-miR-152-3p
15	67149528	rs2033785	C	G	4485	50353	ENSG00000166949	SMAD3	0,84011	0,7678054	hsa-miR-152-3p
15	67125270	rs11071937	T	G	4387	50229	ENSG00000166949	SMAD3	0,85173	0,7708274	hsa-miR-152-3p
15	67124107	rs4776894	T	C	4387	50207	ENSG00000166949	SMAD3	0,85912	0,7708274	hsa-miR-152-3p
15	67156332	rs8032802	T	G	4486	50366	ENSG00000166949	SMAD3	0,85922	0,7708274	hsa-miR-152-3p
15	67140177	rs12438366	A	G	4387	50227	ENSG00000166949	SMAD3	0,86001	0,7708274	hsa-miR-152-3p
15	67133118	rs7178117	C	G	4387	50249	ENSG00000166949	SMAD3	0,86178	0,7708274	hsa-miR-152-3p
15	67129739	rs2414936	A	G	4387	50249	ENSG00000166949	SMAD3	0,86375	0,7708274	hsa-miR-152-3p
15	67155557	rs12441344	A	G	4486	50366	ENSG00000166949	SMAD3	0,86424	0,7708274	hsa-miR-152-3p
15	67128380	rs1545160	A	G	4387	50249	ENSG00000166949	SMAD3	0,86562	0,7708274	hsa-miR-152-3p
15	67130364	rs8025083	C	G	4387	50249	ENSG00000166949	SMAD3	0,86631	0,7708274	hsa-miR-152-3p
15	67130998	rs6494634	T	C	4387	50249	ENSG00000166949	SMAD3	0,8668	0,7708274	hsa-miR-152-3p
15	67130322	rs8026261	T	C	4387	50249	ENSG00000166949	SMAD3	0,867	0,7708274	hsa-miR-152-3p
15	67128982	rs12439500	T	C	4387	50249	ENSG00000166949	SMAD3	0,86867	0,7708274	hsa-miR-152-3p
15	67096823	rs7181878	A	G	4485	50349	ENSG00000166949	SMAD3	0,87172	0,7708274	hsa-miR-152-3p
15	67089713	rs11634686	A	G	4486	50293	ENSG00000166949	SMAD3	0,87448	0,7708274	hsa-miR-152-3p
15	67099401	rs2053295	A	G	4486	50364	ENSG00000166949	SMAD3	0,87497	0,7708274	hsa-miR-152-3p
15	67132695	rs12102171	T	C	4484	50361	ENSG00000166949	SMAD3	0,87497	0,7708274	hsa-miR-152-3p
15	67126599	rs1992215	A	G	4386	50244	ENSG00000166949	SMAD3	0,87566	0,7708274	hsa-miR-152-3p
15	67174541	rs2278545	T	G	4483	50218	ENSG00000166949	SMAD3	0,88157	0,770984	hsa-miR-152-3p
15	67150048	rs11637659	A	G	4486	50357	ENSG00000166949	SMAD3	0,88462	0,770984	hsa-miR-152-3p

15	67089373	rs4776887	A	G	4486	50293	ENSG00000166949	SMAD3	0,88866	0,770984	hsa-miR-152-3p
15	67158571	rs1470004	A	G	4486	50366	ENSG00000166949	SMAD3	0,89024	0,770984	hsa-miR-152-3p
15	67091812	rs4776339	T	C	4486	50295	ENSG00000166949	SMAD3	0,8923	0,770984	hsa-miR-152-3p
15	67175947	rs17294280	A	G	3659	46997	ENSG00000166949	SMAD3	0,89329	0,770984	hsa-miR-152-3p
15	67137184	rs2033787	A	C	4486	50361	ENSG00000166949	SMAD3	0,89417	0,770984	hsa-miR-152-3p
15	67194509	rs1052488	T	C	4485	50364	ENSG00000166949	SMAD3	0,89949	0,770984	hsa-miR-152-3p
15	67158136	rs4776900	T	C	4486	50367	ENSG00000166949	SMAD3	0,90274	0,770984	hsa-miR-152-3p
15	67121499	rs7359174	A	G	4486	50355	ENSG00000166949	SMAD3	0,90353	0,770984	hsa-miR-152-3p
15	67172982	rs1866320	T	G	4486	50350	ENSG00000166949	SMAD3	0,90491	0,770984	hsa-miR-152-3p
15	67101681	rs17213990	A	G	4485	50367	ENSG00000166949	SMAD3	0,90924	0,770984	hsa-miR-152-3p
15	67167472	rs4776343	A	G	4387	50249	ENSG00000166949	SMAD3	0,90983	0,770984	hsa-miR-152-3p
15	67189665	rs2028762	T	C	4486	50344	ENSG00000166949	SMAD3	0,91603	0,7713929	hsa-miR-152-3p
15	67154535	rs7181794	A	G	4387	50248	ENSG00000166949	SMAD3	0,91908	0,7713929	hsa-miR-152-3p
15	67159436	rs7180244	C	G	4387	50248	ENSG00000166949	SMAD3	0,92401	0,7722467	hsa-miR-152-3p
15	67194437	rs3743343	T	C	4486	50367	ENSG00000166949	SMAD3	0,92558	0,7722467	hsa-miR-152-3p
15	67097074	rs9302242	A	G	4486	50365	ENSG00000166949	SMAD3	0,92637	0,7722467	hsa-miR-152-3p
15	67125766	rs11636161	A	G	4387	50249	ENSG00000166949	SMAD3	0,92676	0,7722467	hsa-miR-152-3p
15	67164997	rs1065080	A	G	4486	50367	ENSG00000166949	SMAD3	0,9307	0,7722467	hsa-miR-152-3p
15	67089220	rs4776886	A	G	4486	50302	ENSG00000166949	SMAD3	0,93139	0,7722467	hsa-miR-152-3p
15	67168288	rs17228313	A	G	4387	50248	ENSG00000166949	SMAD3	0,94301	0,7722467	hsa-miR-152-3p
15	67086254	rs4776883	A	G	4486	50303	ENSG00000166949	SMAD3	0,9435	0,7722467	hsa-miR-152-3p
15	67100318	rs1530061	A	G	4485	50367	ENSG00000166949	SMAD3	0,95324	0,7739052	hsa-miR-152-3p
15	67127274	rs12442452	C	G	4387	50249	ENSG00000166949	SMAD3	0,95462	0,7739052	hsa-miR-152-3p
15	67083206	rs12910698	T	G	4486	50300	ENSG00000166949	SMAD3	0,95708	0,7739052	hsa-miR-152-3p
15	67127649	rs11071938	T	C	4387	50249	ENSG00000166949	SMAD3	0,9624	0,776137	hsa-miR-152-3p
15	67083662	rs4776881	T	C	4486	50302	ENSG00000166949	SMAD3	0,9685	0,7791944	hsa-miR-152-3p
15	67085152	rs12324036	T	C	4486	50302	ENSG00000166949	SMAD3	0,97204	0,7807323	hsa-miR-152-3p
15	67150258	rs17293632	T	C	4486	50358	ENSG00000166949	SMAD3	0,97716	0,7830653	hsa-miR-152-3p
15	67087306	rs2083194	T	C	4486	50300	ENSG00000166949	SMAD3	0,98573	0,7855522	hsa-miR-152-3p
15	67171053	rs11071939	T	C	4386	50245	ENSG00000166949	SMAD3	0,98701	0,7859592	hsa-miR-152-3p
15	67157967	rs17228058	A	G	4486	50363	ENSG00000166949	SMAD3	0,99685	0,7916493	hsa-miR-152-3p
15	67176997	rs1470003	C	G	3659	46989	ENSG00000166949	SMAD3	0,99783	0,7916493	hsa-miR-152-3p
15	67087642	rs11631785	T	C	4486	50302	ENSG00000166949	SMAD3	0,99951	0,7922082	hsa-miR-152-3p
20	46005911	rs4810482	T	C	4486	50358	ENSG00000100985	MMP9	1,55E-06	2,47E-05	hsa-miR-146a-5p
20	46011586	rs17576	A	G	4486	50367	ENSG00000100985	MMP9	1,99E-06	3,13E-05	hsa-miR-146a-5p
20	46009497	rs3918249	T	C	4486	50366	ENSG00000100985	MMP9	3,97E-06	6,15E-05	hsa-miR-146a-5p
20	46004472	rs13040272	T	C	4486	50367	ENSG00000100985	MMP9	7,84E-05	0,00114466	hsa-miR-146a-5p
20	46012320	rs3918256	A	G	3560	46918	ENSG00000100985	MMP9	0,00012301	0,00177006	hsa-miR-146a-5p
20	46010872	rs3918253	T	C	3560	46919	ENSG00000100985	MMP9	0,0001249	0,00177229	hsa-miR-146a-5p
20	46006406	rs8113877	T	G	4486	50367	ENSG00000100985	MMP9	0,00012771	0,00178734	hsa-miR-146a-5p
20	46007096	rs3918241	A	T	4485	50360	ENSG00000100985	MMP9	0,0048354	0,04082744	hsa-miR-146a-5p
20	46016700	rs3918270	A	G	4485	50361	ENSG00000100985	MMP9	0,0050108	0,04162048	hsa-miR-146a-5p
20	46011936	rs2236416	A	G	4486	50366	ENSG00000100985	MMP9	0,0054303	0,04403098	hsa-miR-146a-5p

20	46014953	rs3918261	A	G	4486	50348	ENSG00000100985	MMP9	0,0057209	0,04566248	hsa-miR-146a-5p
20	46011053	rs2274755	T	G	4486	50367	ENSG00000100985	MMP9	0,0058366	0,04622483	hsa-miR-146a-5p
20	46013092	rs3787268	A	G	4484	50347	ENSG00000100985	MMP9	0,011557	0,07155933	hsa-miR-146a-5p
20	46013767	rs2250889	C	G	4386	50248	ENSG00000100985	MMP9	0,029087	0,1523945	hsa-miR-146a-5p
20	46007015	rs3918278	A	G	3415	45289	ENSG00000100985	MMP9	0,40275	0,6294381	hsa-miR-146a-5p