

Université de Montréal

Impact de Nogo-A sur les propriétés vasculogéniques des cellules endothéliales progénitrices  
lors de la rétinopathie induite par l'oxygène

*Par*

Pakiza Ruknudin

Faculté de médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès sciences (M.Sc)  
en sciences biomédicales, option médecine expérimentale

Septembre 2021

© Pakiza Ruknudin, 2021

Université de Montréal

Pharmacologie et physiologie/Faculté de Médecine

---

*Ce mémoire intitulé*

**Impact de Nogo-A sur les propriétés vasculogéniques des cellules endothéliales progénitrices  
lors de la rétinopathie induite par l'oxygène**

*Présenté par*

**Pakiza Ruknudin**

*A été évalué par un jury composé des personnes suivantes*

**Martin G. Sirois**

Président-rapporteur

**Sylvain Chemtob**

Directeur de recherche

**Michel Desjarlais**

Codirecteur

**Bruno Larrivée**

Membre du jury

## Résumé

La dégénérescence vasculaire et l'incapacité l'organisme à produire des vaisseaux sanguins de façon adéquate lors d'une condition ischémique est un fait saillant des rétinopathies ischémiques telles que la rétinopathie du prématuré (ROP). La ROP demeure la principale cause de défaillance visuelle et dans les cas extrêmes, de cécité chez les nourrissons prématurés. Elle présente deux phases distinctes soit une phase initiale clef de vasooblitération (VO) rétinienne et choroïdale qui entraînent la deuxième phase de néovascularisation (NV) rétinienne désorganisée et excessive. Au cours du développement normal, la NV oculaire a recours au phénomène d'angiogenèse qui consiste en la formation de nouveaux capillaires à partir de vaisseaux préexistants et de vasculogénèse qui consiste en la formation de nouveaux capillaires à partir de cellules endothéliales progénitrices dérivées de la moelle osseuse (BM-EPCs). Cette vasculogénèse implique la mobilisation des EPCs de la moelle osseuse vers la circulation afin d'être recrutées au site de NV pour contribuer de façon directe, soit en intégrant directement les structures vasculaires pour former des néovaisseaux, ou bien de façon indirecte par leur activité paracrine en libérant différents facteurs de croissance vasculaires. Toutefois, les mécanismes moléculaires impliqués dans la dysfonction des EPCs lors de la ROP sont encore mal compris. Au cours de mon mémoire, mes travaux ont ciblé la première phase de VO rétinienne afin de promouvoir la revascularisation par une thérapie basée sur une supplémentation d'EPCs natives ou reprogrammées. Compte tenu du rôle capital des EPCs dans la NV, mon mémoire s'est d'abord intéressé au rôle de Nogo-A (une protéine de la famille de réticulon), connue pour son action anti-angiogénique, sur l'activité fonctionnelle des EPCs en condition de ROP. Pour ce faire, nous avons utilisé un modèle de rétinopathie induite par l'oxygène (OIR) simulant la ROP. L'objectif global de ce projet consiste à évaluer l'interrelation entre l'effet de l'hyperoxie (une condition clef de la ROP) sur la voie de signalisation Nogo-A et de son récepteur NgR1 sur la fonction des EPCs. Premièrement, les résultats obtenus montrent une augmentation de l'expression de Nogo-A et NgR1 chez les BM-EPCs soumis *ex vivo* à l'hyperoxie, mais aussi dans les EPCs extraites des rats OIR. En addition, l'augmentation de l'expression de Nogo-A/NgR1 par l'hyperoxie corrèle avec la dysfonction angiogénique des EPCs caractérisées par une diminution de leurs capacités de migration et de tubulogénèse. De façon intéressante, l'inhibition de Nogo-A (par un peptide neutralisant) améliore la capacité migratoire et tubulogénique des EPCs, et protège leur fonction contre l'hyperoxie. Également, l'inhibition de Nogo-A induit l'expression du facteur angiogénique et mobilisateur d'EPCs, SDF-1, suggérant que NgR1 régule négativement l'expression de SDF-1. Par ailleurs, nous avons également pour objectif final d'évaluer l'efficacité protectrice d'une supplémentation d'EPCs natives ou reprogrammées (Nogo-/-) pour améliorer la revascularisation rétinienne dans un modèle de rat OIR. Les résultats montrent qu'une supplémentation intrapéritonéale d'EPCs natives diminue significativement la VO rétinienne, mais que cet effet pro-angiogénique devient plus prononcé par le traitement d'EPCs préconditionnées (reprogrammées par l'inhibition de Nogo-A) chez les rats OIR. Collectivement, nos résultats démontrent que : 1) l'hyperoxie cause une dysfonction angiogénique des BM-EPCs en induisant Nogo-A ce qui contribue à la VO rétinienne chez les rats OIR, et que 2) une supplémentation d'EPCs conditionnées (reprogrammées par l'inhibition de Nogo-A) est plus efficace qu'une

supplémentation d'EPCs natives pour améliorer la réparation vasculaire rétinienne. Pour conclure, nous mettons donc en évidence une cible potentielle qui est la protéine Nogo-A afin de préserver l'activité biologique des EPCs et ultimement, l'intégrité vasculaire chez les rats OIR.

**Mots-clés** : Cellule endothéliale progénitrice (EPC), angiogenèse, revascularisation, rétinopathie induite par l'oxygène (OIR), Nogo-A, NgR1.

## Abstract

Vascular degeneration and the inability of the body to produce adequate blood vessels during an ischemic condition is a salient feature of ischemic retinopathies such as retinopathy of prematurity (ROP). ROP remains the leading cause of visual impairment and in extreme cases, blindness in premature infants. It presents two distinct phases: a key initial phase of retinal and choroidal vasoobliteration (VO) which leads to the second phase of disorganized and excessive retinal neovascularization (NV). During normal development, ocular NV uses the phenomenon of angiogenesis which consists of the formation of new capillaries from pre-existing vessels and vasculogenesis which consists of the formation of new capillaries from progenitor endothelial cells derived from the marrow bone (BM-EPCs). This vasculogenesis involves the mobilization of EPCs from the bone marrow to the circulation in order to be recruited at the NV site to contribute directly, either by directly integrating the vascular structures to form new vessels, or indirectly by their paracrine activity by releasing different vascular growth factors. However, the molecular mechanisms involved in the dysfunction of EPCs during ROP are still poorly understood. During my thesis, my work targeted the first phase of retinal VO in order to promote revascularization by therapy based on supplementation of native or reprogrammed EPCs. Given the capital role of EPCs in NV, my thesis was first interested in the role of Nogo-A (a protein of the reticulon family), known for its anti-angiogenic action, on the functional activity of EPCs in ROP condition. To do this, we used an oxygen-induced retinopathy (OIR) model simulating ROP. The overall objective of this project is to assess the interrelationship between the effect of hyperoxia (a key condition of ROP) on the Nogo-A signaling pathway and its NgR1 receptor on the function of EPCs. First, the results obtained show an increase in the expression of Nogo-A and NgR1 in BM-EPCs subjected to hyperoxia *ex vivo*, but also in EPCs extracted from OIR rats. In addition, the increase in the expression of Nogo-A / NgR1 by hyperoxia correlates with the angiogenic dysfunction of EPCs characterized by a decrease in their capacity for migration and tubulogenesis. Interestingly, inhibition of Nogo-A (by a neutralizing peptide) improves the migratory and tubulogenic capacity of EPCs, and protects their function against hyperoxia. Also, inhibition of Nogo-A induces expression of the angiogenic and mobilizing factor of EPCs, SDF-1, suggesting that NgR1 negatively regulates the expression of SDF-1. In addition, our final objective was also to evaluate the protective efficacy of supplementation of native or reprogrammed EPCs (Nogo - / -) to improve retinal revascularization in an OIR rat model. The results show that intraperitoneal supplementation of native EPCs significantly decreases retinal VO, but that this pro-angiogenic effect becomes more pronounced by treatment of preconditioned EPCs (reprogrammed by inhibition of Nogo-A) in OIR rats. Collectively, our results demonstrate that: 1) hyperoxia causes angiogenic dysfunction of BM-EPCs by inducing Nogo-A which contributes to retinal VO in OIR rats, and that 2) supplementation of conditioned (reprogrammed by inhibition of Nogo-A) is more effective than supplementation of native EPCs in improving retinal vascular repairs. To conclude, we therefore highlight a potential target which is the Nogo-A protein in order to preserve the biological activity of EPCs and ultimately, vascular integrity in OIR rats.

**Keywords:** Endothelial progenitor cell (EPC), angiogenesis, revascularization, oxygen-induced retinopathy (OIR), Nogo-A, NgR1.

## Table des matières

<b>Résumé .....</b>	<b>5</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>7</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>11</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>13</b>
<b>Liste des sigles et abréviations.....</b>	<b>15</b>
<b>Remerciements .....</b>	<b>21</b>
<b>Chapitre 1 – Introduction .....</b>	<b>23</b>
<b>1.1 Rétinopathie du prématuré.....</b>	<b>23</b>
1.1.1 Description, statistique et pronostique .....	23
1.1.2 Mécanismes physiopathologiques de la ROP et rôle de l’hyperoxie .....	25
1.1.3 Rôle pathologique du stress oxydatif et de l’inflammation dans la ROP .....	28
1.1.4 Les traitements classiques dans la ROP .....	32
<b>1.2 Le développement vasculaire .....</b>	<b>34</b>
1.2.1 La néovascularisation et revascularisation post-ischémique : processus impliqués : angiogenèse et vasculogenèse .....	34
1.2.2 Les étapes du processus angiogénique : définition et mécanisme.....	36
1.2.3 Les principaux facteurs pro- et anti-angiogéniques .....	39
1.2.4 La voie de signalisation du VEGF .....	42
<b>1.3 Les cellules endothéliales progénitrices.....</b>	<b>45</b>
1.3.1 Définition et description .....	45
1.3.2 Fonctions des EPCs .....	48
1.3.3 La mobilisation des EPCs de la moelle osseuse vers les sites ischémiques : mécanismes et facteurs mobilisateurs impliqués.....	50
1.3.4 Importance de la voie SDF-1/CXCR4 pour la fonction des EPCs .....	53
1.3.5 Facteurs impliqués dans la dysfonction des EPCs et impact sur la dégénérescence vasculaire	
54	
<b>1.4 La famille des protéines Nogo et leurs récepteurs .....</b>	<b>56</b>
1.4.1 Description et rôle biologique général .....	56

1.4.2	Les fonctions de Nogo-A et les implications de NgR1 dans la modulation angiogénique .....	60
<b>Chapitre 2 –</b>	<b>Projet de recherche .....</b>	<b>63</b>
2.1	Mise en contexte .....	63
2.2	Hypothèses de recherche .....	64
2.3	Objectifs de recherche .....	65
<b>Chapitre 3 –</b>	<b>Nogo-A Is a Negative Regulator of Endothelial Progenitor Cells Angiogenic</b>	
<b>Activity:</b>	<b>Impact in Oxygen-Induced Retinopathy .....</b>	<b>67</b>
3.1	Abstract .....	67
3.2	Introduction.....	69
3.3	Materials and methods .....	72
3.4	Results .....	76
3.5	Discussion .....	78
3.6	Acknowledgements.....	81
3.7	Figures .....	82
<b>Chapitre 4 –</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>89</b>
4.1	Impact thérapeutique des EPCs dans la revascularisation rétinienne pathologique des bébés prématurés .....	89
4.2	Les voies de signalisation Nogo dépendantes et sous-jacentes : un rôle potentiel dans l’inhibition angiogénique .....	90
4.3	Potentiel et perspective de la thérapie basée sur des EPCs conditionnées .....	92
<b>Chapitre 5 –</b>	<b>Conclusions et perspectives .....</b>	<b>95</b>
	<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>97</b>

## Liste des tableaux

Tableau 1. – Caractéristiques des deux sous-types cellulaires impliqués dans la néovascularisation post-ischémiques. ....	47
---	----

## Liste des figures

Figure 1. –	Les deux différentes phases de la ROP. ....	27
Figure 2. –	Le stress oxydatif lors de la ROP. ....	31
Figure 3. –	Distinction entre l'angiogenèse et la vasculogenèse. ....	35
Figure 4. –	Les différentes étapes de l'angiogenèse. ....	38
Figure 5. –	Les voies de signalisation du VEGF et de ses récepteurs. ....	44
Figure 6. –	Les différentes étapes de la mobilisation des EPCs de la moelle osseuse vers les sites ischémiques. ....	52
Figure 7. –	La structure et les voies de signalisation connues des différentes isoformes de la protéine Nogo. ....	59

## Liste des sigles et abréviations

Ac	<i>Acetylated</i>
AKT	<i>Akt Protein Kinase B</i>
ANG	<i>Angiopoietin</i>
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
BM	<i>Bone marrow</i>
CAC	<i>Circulating angiogenic cells</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
c-Kit	<i>Proto-Oncogene Receptor Tyrosine Kinase KIT</i>
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
CREB	<i>C-AMP Response Element-binding protein</i>
CRP	<i>C-reactive protein</i>
CSF	<i>Colony Stimulating Factor</i>
CXCR	<i>Motif Chemokine Receptor</i>
EC	<i>Endothelial cell</i>
ECFC	<i>Endothelial colony forming cell</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
eNOS	<i>Endothelial Nitric Oxide Synthase</i>
EPC	<i>Endothelial progenitor cell</i>
EPR	Épithélium pigmentaire rétinien
ERK	<i>Extracellular signal-Regulated Kinase</i>
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor</i>
GPI	<i>Glycosylphosphatidylinositol</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
HIF-1	<i>Hypoxia-Inducible Factor-1</i>

HO <sub>2</sub> -	Radical hydroperoxyde
ICAM-1	<i>Inter-Cellular Adhesion Molecule-1</i>
IGF-1	<i>Insulin-like Growth Factor-1</i>
IL	<i>Interleukin</i>
INF	<i>Interferon</i>
iNOS	<i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>
I-TAC	<i>Interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant</i>
L-	Radical lipidique
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LINGO1	<i>Leucine-rich repeat and immunoglobulin-containing Nogo receptor protein-1</i>
LRR	<i>Leucine-rich Repeat</i>
MAG	<i>Myelin-associated Glycoprotein</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MCP-1	<i>Monocyte Chemotactic Protein-1</i>
MEC	Matrice extracellulaire
MMP	<i>Matrix Metallo Proteinases</i>
mTOR	<i>Mechanistic Target of Rapamycin</i>
NF-κB	<i>Nuclear Factor-kappa B</i>
NGBR	<i>Nogo-B receptor</i>
NgR1	<i>Nogo-66 receptor 1</i>
nNOS	<i>Neuronal Nitric Oxide Synthase</i>
NO	Oxyde nitrique
Nogo	<i>Reticulon 4A</i>
NV	Néovascularisation
O <sub>2</sub> -	Anion superoxyde
OH-	Radical hydroxyle
OIR	<i>Oxygen-induced Retinopathy</i>
OMGP	<i>Oligodendrocyte Myelin Glycoprotein</i>
ONOO-	Anion peroxydinitrite

PAC	<i>Proangiogenic cell</i>
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PF4	<i>Platelet Factor 4</i>
PGD <sub>2</sub>	<i>Prostaglandin D2</i>
PGE <sub>2</sub>	<i>Prostaglandin E2</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-Kinase</i>
PIGF	<i>Placental growth factor</i>
PIRB	<i>Paired Immunoglobulin-like Receptor B</i>
PSGL-1	<i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i>
RANTES	<i>C-C Motif Chemokine Ligand 5</i>
RAS	<i>Proto-oncogene RAS</i>
RhoA	<i>Ras homolog family member A</i>
ROCK	<i>Rho-associated protein kinase</i>
ROP	<i>Retinopathy of prematurity</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RTN	<i>Reticulon</i>
RV	<i>Revascularisation</i>
S1PR2	<i>Sphingosine-1-phosphate receptor 2</i>
SAPK	<i>Stress-activated protein kinases</i>
Sca-1	<i>Stem cells antigen-1</i>
SDF	<i>Stromal cell-Derived Factor</i>
SH2	<i>Src Homology 2</i>
SOD	<i>Superoxyde Dismutase</i>
SP-1	<i>Transcription factor Sp1</i>
Src	<i>Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src</i>
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TGFBR1	<i>Transforming growth factor beta receptor I</i>
Tie	<i>Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>

TSP	Thrombospondine
TXA <sub>2</sub>	Thromboxane A <sub>2</sub>
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>
VO	Vasooblitération
TROY	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 19</i>

*À mes très chers parents qui ont sacrifié beaucoup et qui n'ont jamais  
cessé de formuler des prières à mon égard  
afin que je puisse vivre ce jour.*

## Remerciements

Je souhaiterais, tout d'abord, remercier mon directeur de laboratoire le Dr Sylvain Chemtob de m'avoir accueillie chaleureusement au sein de son équipe. Il me fut un honneur d'avoir pu entamer ma maîtrise au sein de son impressionnante équipe de recherche et d'avoir eu un tel mentor avec une expérience autant riche. Je tiens surtout à remercier mon superviseur le Dr Michel Desjarlais qui m'a accompagné et guidé tout au long de ce projet. Son expertise dans le domaine et son savoir impressionnant m'a montré l'univers de la recherche et m'a donné goût à celle-ci. Je le remercie énormément de m'avoir fait participer dans plusieurs de ses travaux. Grâce à lui, j'ai pu m'enrichir de ces plusieurs projets et donc avoir une formation assez diversifiée de la recherche. De plus, il s'est toujours montré disponible ce qui a rendu mon parcours davantage captivant. Je remercie, ensuite, tous les membres du laboratoire qui ont aidé à mon intégration et qui ont su se montrer toujours disponibles à mon égard. L'expérience dans leur laboratoire a été enrichissante et je retiens que du positif de cette expérience.

J'aimerais, bien évidemment, remercier ma merveilleuse famille qui a toujours été présente à mes côtés, que ce soit dans les moments les plus difficiles ou les bons moments de mon parcours et qui ont toujours été une grande source de motivation au cours de mon cheminement académique. J'ai pu compléter cette maîtrise non seulement par mon travail, mais également par l'amour, le support et les encouragements reçus de mes parents, de mes grand-mères, de mes sœurs et de mon frère. Un grand merci à mes cousines et amies qui leurs conseils et encouragements m'ont été très précieux, je vous porte dans mon cœur. Une mention spéciale à un être spécial qui me donne la force chaque jour de me rapprocher davantage de mes rêves et m'inspire à devenir la meilleure version de moi-même.

Pour finir, j'aimerais non du moins remercier les membres du jury, Dr Martin G. Sirois et Dr Bruno Larrivée qui ont eu la gentillesse d'avoir pris le temps de lire et d'évaluer ce mémoire. Je remercie aussi le centre CRHMR pour avoir contribué à ma formation à la maîtrise.

# Chapitre 1 – Introduction

## 1.1 Rétinopathie du prématuré

### 1.1.1 Description, statistique et pronostique

La rétinopathie du prématuré (ROP) est un trouble prolifératif qui touche les vaisseaux sanguins de la rétine et de la choroïde en développement chez les nourrissons prématurés pesant environ 2,75 livres ou moins et qui sont nés avant 31 semaines d'âge gestationnel (1). La ROP peut mener à un retard de croissance vasculaire, causant des défaillances visuelles, et ultimement, dans les cas les plus sévères, au décollement total de la rétine et à la cécité (2). Les vaisseaux sanguins formés sont qualifiés d'anormaux puisqu'ils sont fragiles et peuvent se perforer facilement (1). Il y a cinq stades possibles. Le premier et le deuxième consistent, respectivement, à une croissance légèrement et modérément anormale des vaisseaux sanguins. La pathologie se résout elle-même sans traitement. Cependant, c'est à partir du troisième que la croissance est gravement anormale et que le traitement sera envisageable afin de prévenir le décollement de la rétine. Au quatrième stade, la rétine est partiellement décollée et au cinquième, elle est complètement décollée (1). La ROP est l'une des principales causes de défaillance visuelle et de cécité chez les nourrissons prématurés au monde entier (3). En effet, elle est la deuxième cause de cécité dans les pays industrialisés tels que les États-Unis avec des statistiques de 6% à 18% (4). Selon le Réseau néonatal canadien, approximativement 57% des bébés dont l'âge gestationnel était inférieur à 24 semaines présentaient une ROP de type sévère, c'est-à-dire des bébés au stade 3, 4 ou 5 ou bien ayant reçu un traitement au laser ou une injection intraoculaire (5). Les statistiques montrent que moins le bébé est né tôt, plus faibles seront les chances de présenter une ROP de type sévère. En effet, 41% des bébés présentent une ROP sévère à 24 semaines, 20% à 25 semaines, 10% à 26 semaines, 5% à 27 semaines et 1% à 28, 29 et 31 semaines (5). Ceci concorde avec le poids du bébé, plus le bébé est petit et pèse moins, plus il a des risques de développer une ROP (6). De plus, selon *National Eye Institute*, des 3.9 millions de nouveau-nés aux États-Unis, 28 000 pesaient 2,75 livres

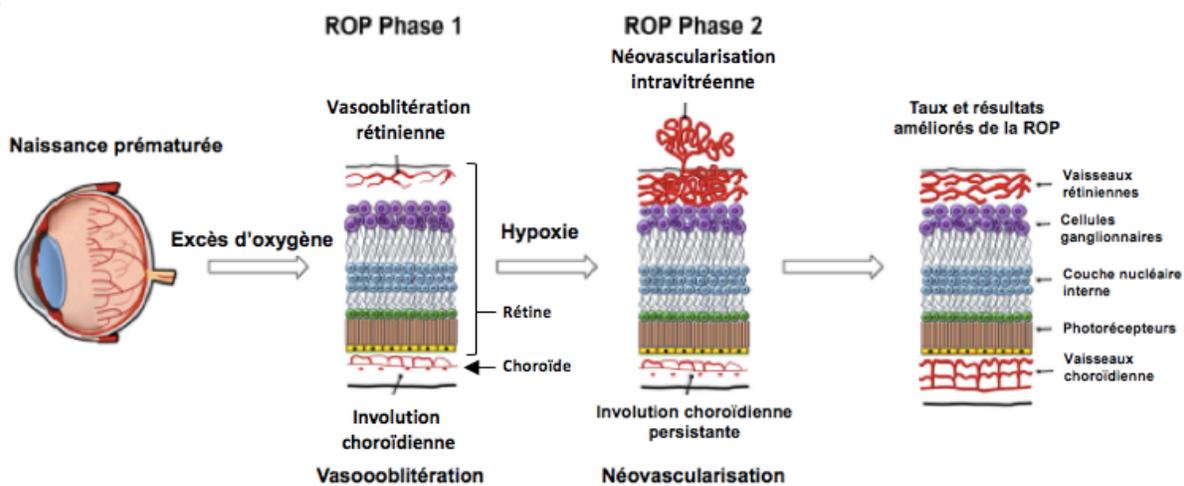
ou moins et parmi ces derniers, 14 000 à 16 000 étaient atteints d'un des stades de la ROP (1). Cependant, ce n'est qu'une minorité qui présentera des stades avancés de la ROP. En effet, de tous les bébés atteints de ROP, 90% seraient à un stade non avancé et donc ne nécessiteraient pas de traitements. Environ 1 100 à 1 500 bébés se rendent à un stade de ROP qui nécessite un traitement et 400 à 600 perdent la vision complète (1). Les principaux traitements utilisés seulement à des stades avancés de la ROP sont le traitement au laser et la cryothérapie qui tous les deux visent à éliminer la partie périphérique de la rétine qui présente des vaisseaux sanguins anormaux (1, 7) . Ceci occasionne une perte de la vision latérale, mais maintient la vision centrale qui est la plus importante (1). Cette pathologie oculaire demande davantage à être étudiée afin de pouvoir contrôler plus précisément les causes.

### 1.1.2 Mécanismes physiopathologiques de la ROP et rôle de l'hyperoxie

La ROP, décrite pour la première fois par Terry en 1942, comporte deux phases distinctes, la vasooblitération (VO) et la néovascularisation (NV) (**figure 1**) (8). La vasculature rétinienne humaine commence habituellement à la 16<sup>e</sup> semaine de gestation et se termine au terme, donc à la 40<sup>e</sup> semaine (9). Autour de la 34<sup>e</sup> semaine, la croissance vasculaire intrarétinienne se conçoit de mieux en mieux. Le réseau capillaire se crée du centre vers la périphérie de la rétine. À la 36<sup>e</sup> semaine, la vasculature se complète du côté nasal et du côté temporal à la 40<sup>e</sup> semaine. Ainsi, lors de la naissance, la vasculature rétinienne est complètement développée (10, 11). Cependant, un bébé né prématurément aura une vasculature immature et sera hautement vulnérable à la détérioration de celle-ci (12). C'est ainsi que se présente la phase initiale de la ROP qui est l'arrêt de la croissance vasculaire et la dégénérescence vasculaire des microvaisseaux de la rétine. Ce phénomène initial est appelé la vasooblitération (VO). Elle est associée à un arrêt de la croissance des vaisseaux sanguins vers la périphérie de la rétine (13). Cette dégénérescence vasculaire va créer un environnement hypoxique en raison du manque d'oxygène et de nutriments apportés aux tissus (14). Ce qui mène éventuellement à l'ischémie de la rétine. Afin de compenser aux dégâts de cette première phase, l'organisme va engendrer une angiogenèse désorganisée (néovascularisation) qui consiste à la deuxième phase de la maladie (**figure 1**). Cette NV se qualifie comme étant pathologique puisqu'elle est anarchique et, si non traitée, mène ultérieurement à une perte de vision partielle ou complète (15). Par ailleurs, le développement de la ROP est aussi associé à une dégénérescence vasculaire choroïdienne. La ROP crée un environnement sous-rétinien hypoxique qui mène à une involution de la choroïde. Sachant que la choroïde est la source principale d'oxygène et de nutriments aux photorécepteurs et à l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR), il a été montré qu'il y a une perte de l'intégrité de l'EPR et une dégénérescence des photorécepteurs. Contrairement à la rétine, la choroïde ne procède pas à une NV. Alors, elle reste donc légèrement plus mince que la normale (16, 17).

Les principaux facteurs contribuant au développement de la ROP sont, entre autres, associés à un faible poids à la naissance, un bas âge gestationnel et l'administration élevée d'oxygène (hyperoxie) donné aux bébés prématurés (3). Ce dernier constitue l'un des facteurs les plus importants dans la pathogenèse de la ROP (18). En effet, afin d'assurer la survie du prématuré, ce dernier est exposé à un excès d'oxygène après la naissance. D'une part, même en air ambiant, l'environnement extra-utérin est hyperoxique comparé à l'environnement intra-utérin. Ceci s'explique par la saturation de l'hémoglobine qui est d'environ 70% *in utero*, alors qu'elle est de 100% pour un bébé normal respirant l'air ambiant (19). D'autre part, en raison de la naissance prématurée du bébé, ce dernier peut présenter une insuffisance respiratoire et d'autres comorbidités qui nécessitent en plus l'administration d'oxygène (20). Donc la saturation élevée en oxygène, une condition appelée hyperoxie, corrèle avec un risque plus élevé de rétinopathie. Toutefois, il a été démontré qu'en limitant la saturation d'hémoglobine avec l'oxygène, donc en réduisant le taux d'oxygène donné au bébé, les taux de ROP diminuent (19). Sachant que le surplus d'oxygène a un grand rôle à jouer dans la ROP, il est, avant tout, important de comprendre le flux sanguin au niveau de la rétine interne. Cette circulation est modulée par divers facteurs systémiques tels que des hormones circulantes et des innervations autonomes et par des facteurs régulant la circulation locale tels que la variation de la pression de perfusion, le pH et la pression artérielle partielle de l'oxygène et du dioxyde de carbone (21). Le flux sanguin de la rétine est surtout médié par les facteurs locaux puisqu'elle manque d'autonomie pour l'innervation vasculaire. Sa capacité d'autorégulation du flux sanguin est limitée (21, 22). De plus, chez les nourrissons prématurés, l'autorégulation du flux sanguin de la choroïde qui est la principale couche vasculaire qui fournit de l'oxygène à la rétine externe est absente en raison de sa vasculature non terminée (22). En condition hyperoxique, il a été démontré que le réseau vasculaire de la rétine se contracte de façon semblable chez le bébé et l'adulte. Cependant, contrairement aux adultes, le réseau vasculaire de la choroïde chez le nouveau-né ne se contracte pas en hyperoxie. Quand la pression partielle de l'oxygène ou la pression de perfusion augmentent, il est difficile de garder le flux sanguin de la rétine et de la choroïde constantes, ce qui peut expliquer l'apport exagéré d'oxygène apporté à la rétine (23). Le prématuré présente des concentrations élevées de prostaglandines (PGD<sub>2</sub> et PGE<sub>2</sub>) et de monoxyde d'azote (NO) qui influencent grandement le tonus vasomoteur et

la réponse autorégulatrice (24, 25). C'est pourquoi le bébé prématuré est incapable de gérer l'apport d'oxygène fourni à la rétine. Par ailleurs, l'augmentation de la pression partielle du dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ) (hypercapnie) chez les nourrissons qui sont ventilés et qui présentent des lésions pulmonaires est un autre facteur jouant un rôle important dans la dérégulation du flux sanguin de la rétine et de la choroïde. En effet, l'hypercapnie aiguë augmente le débit sanguin oculaire chez les prématurés et cela est dépendant de la  $\text{PGE}_2$  (25, 26). Autrement dit, si l'hypercapnie est soutenue, alors  $\text{PGE}_2$  induit l'expression de l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS) qui à son tour libère NO. Ce dernier va médier l'augmentation de l'hémodynamique oculaire induite par le  $\text{CO}_2$  et va réduire de plus belle l'autorégulation du flux sanguin oculaire. De façon intéressante, des études ont montré que l'hypercapnie est associée à la ROP chez l'homme et les animaux de laboratoire (25-27).



**Figure 1. – Les deux différentes phases de la ROP.**

La première est la vasooblitération (VO) qui est caractérisée par une dégénérescence des vaisseaux sanguins au niveau de la rétine et de la choroïde causée par un excès d'oxygène administré au bébé prématuré. La deuxième phase est la NV qui se caractérise par la formation de nouveaux vaisseaux sanguins anarchiques et pathologiques. Figure adaptée de : (Rivera and al 2017)

### 1.1.3 Rôle pathologique du stress oxydatif et de l'inflammation dans la ROP

L'excès d'oxygène donné aux nourrissons prématurés, ainsi que l'environnement extra-utérin hyperoxique cause un stress oxydatif. Ce stress se produit lors d'un déséquilibre entre la production de radicaux libres oxygénés en condition d'hyperoxie et les défenses antioxydantes (28). Il faut prendre note que le système de défense antioxydant est en faible quantité chez les bébés prématurés. Alors, ils sont très à risque de subir une attaque radicalaire. On parle, entre autres, des antioxydants comme le superoxyde dismutase (SOD), la catalase, les vitamines E et C, le glutathion peroxydase et l'hème-oxygénase-1 (28). Les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) sont des radicaux libres dérivés de l'oxygène et d'autres molécules réactives non radicalaires. Ce sont des molécules de signalisation possédant une grande réactivité. Un radical libre est un atome ou une molécule possédant un électron non paillé qui le rend moins stable (29). On compte, entre autres, l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ), le radical hydroperoxyde ( $HO_2^-$ ), le radical hydroxyle ( $OH^-$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et les radicaux lipidiques (L-) (30). Produites en quantité normale dans une cellule saine, ces molécules exercent des fonctions telles que la prolifération, la migration, et participent à la guérison de plaies et à la réponse inflammatoire contre des pathogènes. Lorsqu'elles sont produites de façon excessive, elles vont exercer des effets cytotoxiques (**figure 2**) qui peuvent mener à l'apoptose ou la nécrose (31). Les dommages dont on parle sont surtout des altérations au niveau des protéines, des acides nucléiques et des lipides membranaires. Une des actions néfastes des radicaux libres à laquelle la rétine est vulnérable est la peroxydation des lipides étant donné que la rétine est riche en acides gras polyinsaturés (28). Chez le prématuré, les peroxydes vont activer la cyclo-oxygénase et vont engendrer la production de thromboxane  $A_2$  ( $TXA_2$ ) (32). Des facteurs pro-inflammatoires sont produits en même temps, dont le facteur d'activation plaquettaire (33). Ces derniers jouent un rôle dans la première phase de VO de la ROP par la vasoconstriction et en exerçant une toxicité sur les cellules endothéliales (ECs) (32, 33). Par ailleurs, les isoprostanes, qui sont des médiateurs lipidiques médiés par l'augmentation de la  $TXA_2$ , jouent aussi un rôle dans la VO rétinienne (34). Dans la ROP, l'hyperoxie de la première phase enclenche la production de ROS, car l'oxygène est le substrat pour la synthèse de plusieurs ROS (**figure 2**) (35). À la deuxième phase, qui est la NV, un stress oxydatif et nitrosatif est produit. En effet,

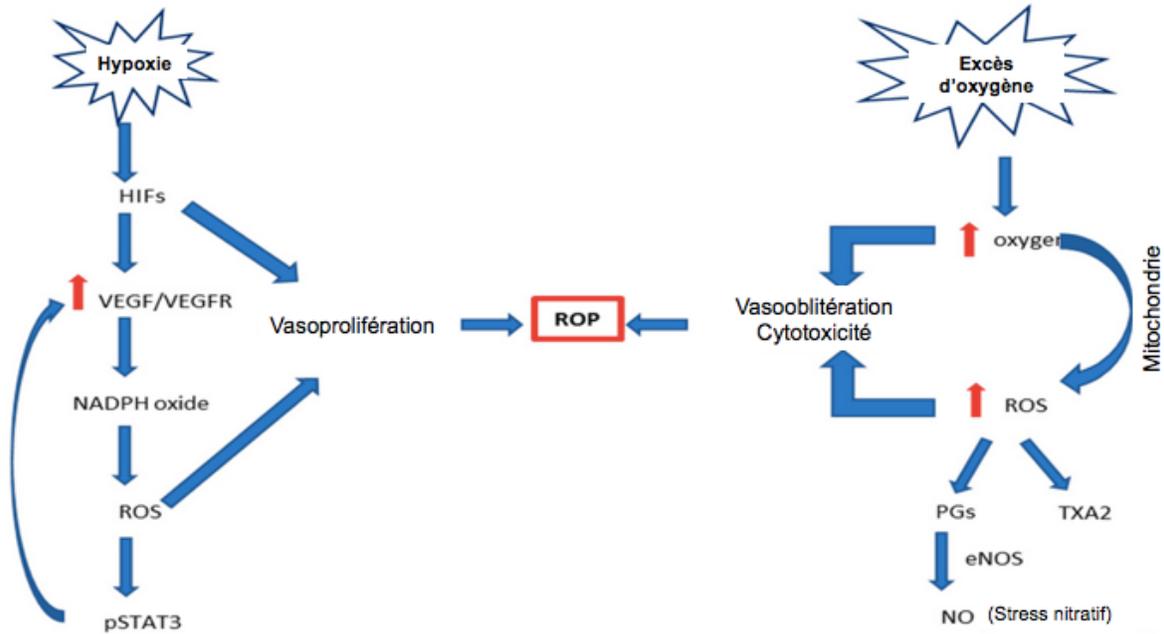
l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS), neuronale (nNOS) et inducible (iNOS) et NO sont activés en condition hypoxique (36). Donc, lorsque l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ) réagit avec NO, le produit formé est ONOO<sup>-</sup> (anion peroxydinitrite). Ce dernier est un dérivé réactif de l'azote qui fait de la nitrosylation et qui possède des caractéristiques similaires aux ROS. Il cause des dommages semblables aux ROS. Alors, en hypoxie, la nitrosylation est augmentée et les produits de la nitration bouleversent la viabilité des cellules endothéliales et la NV rétinienne (25, 37). D'où la NV anarchique de la ROP.

L'inflammation joue un rôle clef dans la progression de la ROP. Il a été montré que l'inflammation prénatale, périnatale et postnatale sont associées à une augmentation du risque de développer la ROP (38). Autres que les cellules immunitaires, les principaux acteurs de l'inflammation sont les cytokines et les chimiokines. Ces petites protéines sont sécrétées par les cellules immunitaires et remplissent des fonctions centrales dans l'inflammation distincte comme dans l'évolution de la ROP (39). Contrairement à la réponse au stress oxydatif, le fœtus et le bébé né avant terme ont la capacité de donner une réponse inflammatoire significative. Ceci est souvent observé lors d'une infection maternelle transmise au nourrisson (40, 41). Les processus inflammatoires sont finement régulés et les concentrations des cytokines sont en homéostasie (42). Par exemple, une augmentation de la concentration d'une cytokine est souvent associée à une augmentation d'autres cytokines, amplifiant la boucle inflammatoire et l'inflamasôme.

Les cytokines interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), le *tumor necrosis factor* (TNF- $\alpha$ ) et l'interleukine-6 (IL-6), agissent en première ligne comme déclencheurs de l'inflammation lors d'infection ou de dommages tissulaires (43). De plus, ils ont la capacité de réguler l'activation des récepteurs de cytokines qui mène à une régulation à la hausse des effecteurs tels que les chimiokines et les molécules d'adhésions (ex. VCAM et ICAM) pour les monocytes et macrophages (44). Des études ont montré que l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  produits par les cellules microgliales rétiniennes exposées en hypoxie produisent des dommages au niveau de la rétine (45). Par ailleurs, IL-1 $\beta$  est associé à la dégénération du réseau vasculaire rétinien dans le modèle de la rétinopathie induite par l'oxygène (OIR) (46). Dans la choroïde, il occasionne la régression des vaisseaux sanguins de la choroïde (involution choroïdale), entraînant une rétine externe hypoxique et donc une perte de l'intégrité de l'EPR et des photorécepteurs (16). D'autres cytokines exercent un rôle anti-inflammatoire tel

que IL-10 et IL-4, qui sont en mesure de protéger le développement du cerveau et de la rétine lors d'une inflammation (47). Cependant, des effets inverses de l'IL-10 ont pu être observés dans le modèle OIR chez la souris en participant à une angiogenèse pathologique (48). Collectivement, selon les résultats, IL-10 réduit tout de même la prévalence des ROP sévère (49). Pour ce qui est du IL-4, aucune différence de concentration n'a pu être observée chez les bébés contrôles et les bébés avec ROP (50).

D'autre part, les chimiokines participent au processus d'inflammation par leur capacité de chimiotaxie et de réguler le mouvement des cellules immunitaires au site d'inflammation (51). Plusieurs se démarquent dans la ROP tels que IL-6, IL-7, IL-8, RANTES (*C-C Motif Chemokine Ligand 5*), protéine chimiotactique des monocytes 1 (MCP-1) et l'interféron-inducible T-cell  $\alpha$  chemoattractant (I-TAC) (52). Premièrement, IL-8 participe à l'inflammation et la néovascularisation pathologique dans les yeux (53). Sa haute concentration dans le sérum d'un nouveau-né humain est associée au développement de la ROP ultérieurement (54). D'autres observations ont montré l'association d'une haute concentration d'IL-8 lors du pic de néovascularisation pathologique chez le modèle de rat ROP (55). Deuxièmement, MCP-1 est surtout connu par son pouvoir de recrutement des monocytes afin d'amplifier l'inflammation, mais il possède aussi la capacité de perturber la barrière hématoencéphalique et il participe à des maladies neurodégénératives (56, 57). D'autres études ont démontré que les nourrissons prématurés développant la ROP présentent une concentration de MCP-1 élevée dans le sérum du cordon comparé aux bébés prématurés en santé et aux bébés nés à terme (58). Aussi, une concentration élevée de MCP-1 dans l'humeur vitrée des patients atteints de rétinopathie et des modèles d'animaux est associée à l'induction de la néovascularisation rétinienne en attirant les macrophages et les cellules microgliales durant la phase de dégénérescence vasculaire de la rétinopathie (59, 60). Finalement, le rôle de RANTE, le ligand de chimiokine 5, qui a un grand rôle dans l'immunité innée, n'est pas très connu dans la ROP, mais des études ont tout de même montré qu'il jouerait un rôle protecteur lors de la ROP (61, 62).



**Figure 2. – Le stress oxydatif lors de la ROP.**

Lors de la phase hyperoxique, il y a une augmentation de la synthèse des ROS qui favorise la VO. Lors de la phase hypoxique causée par la dégénérescence des vaisseaux, il y a aussi des ROS produits qui vont participer à la NV pathologique. Figure adaptée de : (Graziosi and al 2020)

### 1.1.4 Les traitements classiques dans la ROP

La ROP, comme mentionnée plutôt, comporte cinq phases définissant l'évolution de la maladie qu'on peut classer de léger à sévère. Les phases un et deux ne requièrent pas de traitements, car la croissance de vaisseaux sanguins anormaux est légère à modérée et donc le bébé développe une vision normale ultérieurement. À la phase trois, la croissance anormale de la vasculature est sévère. L'état de certains arrive à s'améliorer sans traitement, mais habituellement des traitements sont utilisés à ce stade afin de prévenir le décollement de la rétine (1). On parle du traitement au laser et de la cryothérapie qui sont des chirurgies invasives des yeux. Le premier consiste à brûler la périphérie de la rétine qui contient des vaisseaux sanguins anormaux (63). La cryothérapie a le même objectif, mais elle y arrive grâce à un instrument générant une température glaciale qui touche sèchement certaines parties de la surface de l'œil recouvrant la périphérie. Cette ablation de la périphérie de la rétine a pour but de ralentir ou bien d'inverser la croissance microvasculaire anormale. Comme tout traitement, cela est accompagné d'effets secondaires tels qu'une certaine perte de la vision périphérique. Ceci se fait en raison de maintenir la vision centrale qui demeure la plus importante (64). En ce qui concerne les deux dernières phases de la ROP, la quatrième indique un décollement partiel de la rétine et la cinquième, un décollement complet de la rétine. Dans ces cas-là, deux options sont possibles, le flambement scléral ou la vitrectomie (65). Le flambement scléral consiste à placer une bande de silicone autour des yeux et de serrer celle-ci afin d'empêcher le corps vitré de tirer davantage le tissu rétinien et de permettre l'aplatissement de la rétine, donc son rattachement sur l'arrière de l'œil pour retrouver sa position initiale. Étant donné que la croissance des yeux continue après la naissance, le nourrisson doit garder cette bande pendant des mois voire des années (65, 66). La vitrectomie, comme son nom l'indique, consiste à enlever le corps vitré et à le remplacer par une solution saline. Ceci permettra d'avoir accès à la rétine afin de soit replacer ou couper le tissu rétinien décollé. Cette intervention se fait qu'à la phase cinq (65).

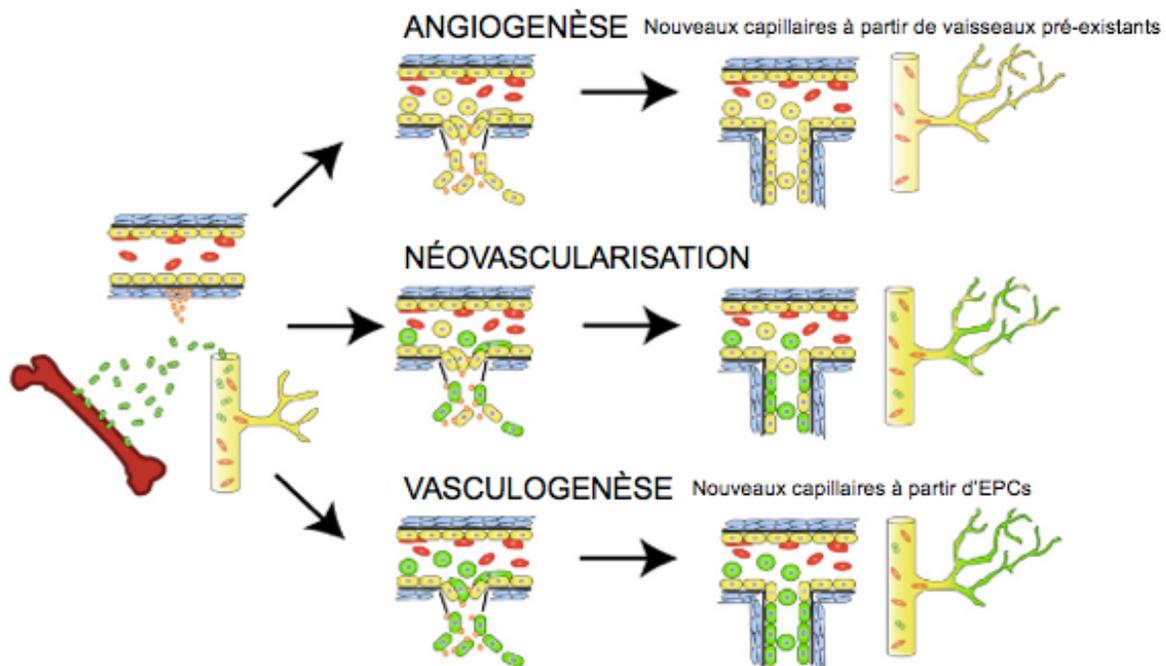
Il existe également un traitement prometteur qui montre des résultats favorables. Il s'agit d'un traitement par injection intravitréenne de deux anticorps monoclonaux, le bevacizumab ou le ranibizumad, qui s'opposent au facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGF). Ces anti-VEGF traitent certaines maladies rétinienne proliférantes, dont la ROP. Ils se sont avérés plus efficaces que le traitement au laser en ce qui a trait aux anomalies structurales dans la zone centrale de la rétine (67). Toutefois, cette stratégie requiert davantage d'études puisque certaines études ont montré que cela menait malgré tout au décollement complet de la rétine (68). Ce traitement exige d'amples études. En bref, ces traitements visent la deuxième phase de la maladie, c'est-à-dire, lorsque les dommages vasculaires ont déjà apparus. Cependant, mon étude ciblera la première phase de la ROP afin de protéger la vasculature et donc d'éviter la deuxième phase.

## 1.2 Le développement vasculaire

### 1.2.1 La néovascularisation et revascularisation post-ischémique : processus impliqués : angiogenèse et vasculogenèse

Dans un environnement hypoxique où le tissu est en manque de nutriments et d'oxygène allant jusqu'à l'ischémie, l'organisme va réduire les dommages tissulaires en ayant recours à une néovascularisation (NV)/revascularisation (RV) post-ischémique. La NV est la création d'un nouveau réseau vasculaire (**figure 3**) qui permet une circulation sanguine fonctionnelle (69). À la naissance, le système circulatoire est déjà développé et l'humain n'a recours à la NV, dans sa vie, que pour des cas précis tels que la réparation tissulaire, la cicatrisation et le cycle menstruel. C'est surtout en condition pathologique que l'organisme va générer une NV. Dans différentes maladies, elle peut causer des problèmes en étant excessive (ex. angiogenèse tumorale, rétinopathie) ou insuffisante (ex. maladie cardiovasculaire ischémique) (70). C'est le cas de la deuxième phase de la ROP où la NV est excessive et anarchique. La NV se fait à l'aide de deux processus complémentaires et importants, l'angiogenèse et la vasculogenèse (**figure 3**). Ceux-ci sont les principaux mécanismes pour la formation de nouveaux capillaires. Il faut tout d'abord faire la distinction entre ces deux phénomènes vasculaires. Comme illustrée à la **figure 3**, l'angiogenèse est la formation de nouveaux capillaires à partir de vaisseaux sanguins préexistants et la vasculogenèse consiste en la formation de nouveaux capillaires (de novo) à partir des cellules progénitrices, en particulier les cellules endothéliales progénitrices (EPCs) (71). Tout d'abord, l'angiogenèse comporte trois grandes étapes qui commencent par l'activation, l'élongation et la résolution. Le processus commence par le bourgeonnement du vaisseau pour ensuite s'allonger afin de former le tubule et la lumière du vaisseau. Il se termine, finalement, par un remodelage des nouveaux vaisseaux tout en assurant sa maturation et sa stabilisation. Des facteurs pro-angiogéniques (ex : ANG2, VEGF, FGF, etc.) sont impliqués dans ces étapes afin d'assurer différents rôles tout au long de la formation des vaisseaux (72). Ensuite, la vasculogenèse, comme mentionnée, a recours aux EPCs. Ces cellules peuvent développer le phénotype des cellules endothéliales et donc posséder un rôle angiogénique. En effet, elles sont capables de prolifération, migration et différenciation et sont

positives pour différents marqueurs hématopoïétiques tels que le CD34, CD117, CD133 et pour des marqueurs endothéliaux, dont le CD31, la lectine et le VEGFR2 (73). Plusieurs études ont confirmé leur potentiel angiogénique en montrant qu'ils peuvent se différencier en cellules endothéliales, migrer jusqu'au site d'angiogenèse active et s'incorporer aux vaisseaux pour participer directement à la formation de néovaisseaux (74).



**Figure 3. – Distinction entre l'angiogenèse et la vasculogenèse.**

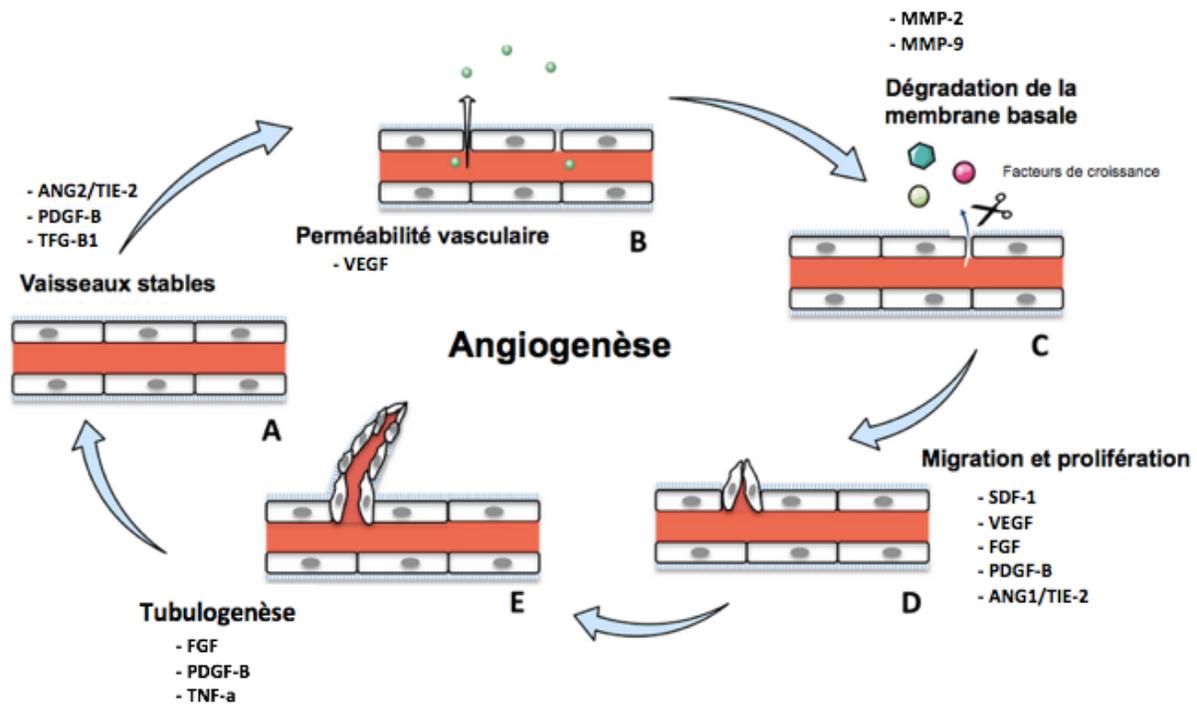
L'angiogenèse et la vasculogenèse sont impliquées dans la néovascularisation et sont les deux principaux processus formant de nouveaux capillaires. L'angiogenèse correspond à la formation de capillaires à partir de vaisseaux déjà existants, alors que la vasculogenèse est médiée par les EPCs provenant de la moelle osseuse. Figure adaptée de : (Afzal and al 2007)

### 1.2.2 Les étapes du processus angiogénique : définition et mécanisme

La dérégulation de l'angiogenèse est déclenchée par un déséquilibre physiologique des facteurs pro- et anti-angiogéniques, un phénomène appelé rupture de la *switch* angiogénique, menant à une activation excessive du processus ou bien une inhibition (75). Afin de ramener l'organisme dans son état physiologique normal, celui-ci essaiera d'inhiber l'angiogenèse abusive qui a lieu par exemple dans une tumeur et de l'activer en situation ischémique comme présentée dans la ROP (76). Le mécanisme de l'angiogenèse comprend trois grandes phases : la phase d'activation, la phase de maturation et la phase de résolution. Ces phases peuvent être décrites en résumé par un épisode d'activation et d'hyperperméabilité, de dégradation de la membrane basale, de prolifération et de migration des ECs et de formation et stabilisation des tubules illustrés à la **figure 4** (72). En condition physiologique, les vaisseaux sanguins possèdent une perméabilité sélective grâce aux jonctions cellulaires serrées de leur endothélium. La stabilité des vaisseaux quiescents est assurée par leur membrane basale qui les entoure et par diverses cellules murales (77). En premier lieu, l'angiogenèse s'active par une libération de facteurs pro-angiogéniques (ex : VEGF, FGF, IGF, ANG, etc.) des tissus en condition hypoxique ou bien dans une autre condition pathologique. Ces facteurs ont pour rôle principal d'aller activer différents récepteurs à la surface des ECs, entre autres le plus important, le récepteur de VEGF, VEGFR2, afin d'enclencher une cascade de signalisation intracellulaire qui va mener à activer les mécanismes impliqués dans l'angiogenèse. VEGF qui est un facteur pro-angiogénique agit dans cette phase d'activation en dilatant les vaisseaux en même temps d'augmenter leur perméabilité membranaire permettant la sortie des protéines plasmatiques. Plus précisément, lorsque VEGF stimule ses récepteurs, entre autres VEGFR2, une panoplie de voies de signalisation s'activent à leur tour promouvant la vasodilatation, l'hyperperméabilité, la migration, la prolifération et la survie des ECs (78). La production de NO stimulé par VEGF permet la vasodilatation et l'hyperperméabilité membranaire des vaisseaux (79). L'augmentation de la perméabilité permet l'extravasation des protéines plasmatiques servant de niche pour la migration initiale. S'ensuivent une perte des jonctions cellulaires des ECs par internalisation des protéines d'adhésion intercellulaire et un détachement des péricytes, les cellules murales des capillaires, de la paroi des vaisseaux. Dans le

but de faire migrer les ECs et de permettre leur prolifération par la suite, les métalloprotéinases matricielles (MMP) doivent obligatoirement dégrader la membrane basale et la matrice extracellulaire. La dégradation de cette dernière va en plus permettre la libération de plusieurs molécules pro-angiogéniques. Le tout permet enfin le bourgeonnement du vaisseau sanguin (72, 78). Cependant, le bourgeonnement requiert une migration et une prolifération organisées, d'où la phase de maturation du bourgeon angiogénique qui s'entame. Donc, en deuxième lieu, la phase de maturation est assurée par deux types d'ECs qui possèdent des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles différentes. Il y a les *tips cells* qui se chargent de guider la migration dans un sens précis grâce à leur forte capacité migratoire. Ils se servent d'un gradient de facteurs chimiotactiques pour migrer dans le bon sens. Et il y a les *stalks cells* qui suivent les *tips cells* et qui eux ont un plus grand pouvoir prolifératif. De plus, ils ont la capacité d'ajouter des jonctions cellulaires entre les cellules et de produire des composantes de la membrane basale (80). Ils permettent donc une bonne élévation du bourgeon. En dernier lieu, après le bourgeonnement et la création de la lumière du nouveau vaisseau, il est nécessaire que ce dernier subisse une maturation qui implique le remodelage du vaisseau, la formation de la barrière endothéliale, l'appel aux péricytes et la formation de la matrice extracellulaire (72). L'objectif est aussi de stabiliser les néovaisseaux et ceci se fait par la voie du facteur de croissance vasculaire, l'angiopoïétine 2 (ANG2) et de son récepteur endothélial TIE-2 (*tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains*). Effectivement, leur liaison va inhiber les rôles pro-angiogéniques du VEGF. Ceci permettra de maintenir les jonctions cellulaires et d'instaurer l'état de quiescence. D'autres facteurs de croissance tels que le PDGF-B (*platelet-derived growth factor-B*) et le TGF- $\beta$ 1 (*transforming growth factor-b1*) sécrétés par les ECs vont permettre la stabilisation du néovaisseau. PDGF-B, par sa capacité chimiotactique, permet le recrutement des péricytes en se liant à son récepteur positionné sur ces mêmes cellules, alors que TGF- $\beta$ 1 différencie les cellules souches en péricytes et encourage la migration et la prolifération de ces cellules murales. Par ailleurs, TGF- $\beta$ 1 contribue également à la production de la matrice extracellulaire et empêche sa dégradation à l'aide de la voie activée par son récepteur TGFBR1. Il a aussi la capacité d'inhiber la prolifération des ECs lorsque ceux-ci sont en contact direct avec les péricytes maintenant donc la quiescence des ECs

(81-83). Enfin, c'est dans cet ordre précis d'étapes qu'il est possible d'obtenir des néovaisseaux stables et fonctionnels.



**Figure 4. – Les différentes étapes de l'angiogenèse.**

Les vaisseaux dans un état stable (A) initialement sont déstabilisés et leur perméabilité augmente (B) permettant l'extravasation des protéines plasmatiques. La membrane basale et la matrice extracellulaire sont dégradées à l'aide de MMPs permettant la libération de facteurs de croissance (C). Il y a migration et prolifération des ECs (D) afin de former le néovaisseau (E). Figure adaptée de : (Montemagno and Pagès 2020)

### 1.2.3 Les principaux facteurs pro- et anti-angiogéniques

Les facteurs angiogéniques endogènes, en particulier, leurs concentrations dans le microenvironnement tissulaire permettent de moduler l'angiogenèse. Par exemple, une haute concentration en facteurs pro-angiogénique (VEGF, FGF, PDGF, ANG, IGF et TGF- $\beta$ ) déclenche le processus angiogénique, alors qu'une concentration élevée de facteurs anti-angiogéniques (angiostatine, endostatine, TSP, INF, IL-4, IL-12, IL-18 et PF4) inhibe l'angiogenèse locale (72). Parmi ces différents facteurs, le plus important est le VEGF, qui joue un rôle essentiel dans plusieurs étapes du processus angiogénique en condition physiologique et pathologique (84). Ce facteur pro-angiogénique possédant sept isoformes soit VEGF-A à F et PlGF se lie à trois récepteurs VEGFR1 à VEGFR3 (85). C'est, entre autres, sa liaison au VEGFR2, qui est le principal récepteur angiogénique présent sur les ECs, qui va permettre d'activer plusieurs cascades de signalisation intracellulaire impliquées dans la migration, la prolifération et la tubulogenèse des ECs. De plus, VEGFR2 est aussi exprimé par les cellules hématopoïétiques neuronales et rétiniennes (86, 87). En plus de participer très activement à l'angiogenèse, le VEGF est également impliqué dans la vasculogenèse et la lymphangiogenèse (85). Deuxièmement, les FGF (*fibroblast growth factor*) possèdent des propriétés pro-angiogéniques similaires aux VEGF, mais ne jouent pas un rôle aussi important que ceux-ci. Ils sont une famille de 23 (FGF-1 à 23) qui lient quatre récepteurs (FGFR1 à FGFR4) (88). FGF-1 et FGF-2 sont les plus importants dans l'angiogenèse et sont sécrétés par plusieurs types cellulaires, dont les fibroblastes, essentiellement, mais également par des ECs endommagées et des macrophages. Ils sont normalement localisés dans un réservoir situé au niveau de la membrane basale et en périphérie de la matrice extracellulaire. En ce qui a trait à leur rôle, ils favorisent la prolifération des ECs, des fibroblastes, des macrophages et des cellules musculaires lisses. C'est surtout le FGF-2 qui possède davantage de fonctions pro-angiogénique comme permettant notamment de promouvoir la production de VEGF, le remodelage vasculaire, la perméabilité membranaire, la migration des ECs et l'expression d'intégrines. Le FGF-2 peut aussi induire l'expression de MMPs, la synthèse de fibronectine par les ECs, qui à leur tour vont favoriser la protéolyse et le remodelage de la matrice extracellulaire (MEC) (89). Troisièmement, il y a la famille

des PDGF (*platelet-derived growth factor*) qui comprend cinq isoformes localisées dans les granules de plaquettes et qui lient trois différents récepteurs. Les ECs n'expriment que le récepteur PDGFR-BB et c'est la liaison à ce récepteur qui va enclencher le bourgeonnement des vaisseaux, la formation des tubules et la prolifération des péricytes (cellules murales) et des cellules musculaires lisses. Comme mentionné dans la section précédente, les péricytes sont nécessaires à la maturation et stabilisation des nouveaux vaisseaux formés. Alors, PDGF joue un rôle important dans l'étape de stabilisation des néovaisseaux (72, 90). Quatrièmement, la cytokine TGF- $\beta$ 1 est un autre facteur angiogénique exerçant des effets pro- et anti-angiogéniques selon la concentration locale. C'est à faible concentration (<0,5 ng/mL) qu'il exerce ses fonctions pro-angiogéniques. Parmi ses fonctions, le TGF- $\beta$ 1 favorise également la différenciation et la prolifération des cellules murales et la stabilisation des interactions entre les ECs et les pericytes, mais également, régule l'état de quiescence des ECs. En plus de ces différentes fonctions, TGF- $\beta$ 1 stimule l'angiogenèse en activant des cellules inflammatoires qui peuvent sécréter des facteurs angiogéniques (72, 89). Finalement, il existe quatre angiopoïétines (ANG-1 à 4) liant les récepteurs endothéliaux Tie-1 et Tie-2. ANG-1 et ANG-2 sont les principaux facteurs jouant un rôle dans l'angiogenèse. L'association de l'ANG-1 à Tie-2 va activer la signalisation impliquée dans l'angiogenèse et va favoriser la survie des ECs. L'ANG-1 participe également à la stabilisation vasculaire en inhibant l'expression de l'ANG-2. Contrairement à l'ANG-1 qui active l'angiogenèse, l'ANG-2 va empêcher ANG-1 d'activer Tie-2, ce qui va déstabiliser les vaisseaux sanguins. Des études ont montré qu'en état physiologique, la liaison ANG-2 et Tie-2 maintient la quiescence des vaisseaux, alors qu'en hypoxie, l'ANG-2 est induit afin d'empêcher cette liaison pour promouvoir la déstabilisation des vaisseaux qui, elle, mène à la phase initiale de l'angiogenèse. D'autres études ont montré que la présence et l'absence du VEGF a un grand rôle à jouer dans la fonction de l'ANG-2. En présence de VEGF, l'ANG-2 stimule la migration et la prolifération des ECs, alors qu'en absence de VEGF, l'ANG-2 exerce un effet pro-apoptotique sur les ECs menant à la dégénérescence des vaisseaux (72, 89, 90). En bref, comme le PDGF-B et le TGF- $\beta$ 1, les ANG participent au processus de stabilisation/déstabilisation des vaisseaux sanguins. En ce qui a trait à la régulation négative de l'angiogenèse, elle se fait grâce à différents facteurs anti-angiogéniques, dont l'important inhibiteur endogène de l'angiogenèse et de la croissance tumorale, la thrombospondine 1 (TSP-1). Elle exerce son rôle

anti-angiogénique en inhibant les voies de signalisation de VEGF et FGF-2 et elle induit l'expression du ligand de FAS (protéine de la famille du facteur de nécrose tumorale (TNF)) afin de favoriser le processus apoptotique des ECs (91, 92). L'endostatine est un autre important facteur anti-angiogénique qui possède de nombreuses fonctions, dont l'atténuation des effets pro-angiogéniques du VEGF en antagonisant son récepteur VEGFR2. En plus d'inhiber la prolifération des ECs, elle est capable de réduire l'expression de divers gènes participant à la croissance et la migration des ECs et inhibe de nombreux MMPs (92, 93). Certaines interleukines régulent négativement l'angiogénèse. Par exemple, l'IL-4 bloque l'activité du FGF, l'IL-12 favorise la synthèse d'INF et IL-18 empêchant la NV au niveau de la cornée et de l'embryon (92, 94, 95). Enfin, il y a le PF4 (*platelet factor-4*) sécrété par les granules des plaquettes qui exerce ses fonctions négatives sur l'angiogénèse en liant directement FGF-2 dans le but d'empêcher sa liaison à son récepteur endothélial. Le PF4 peut aussi inhiber l'action du VEGF de plusieurs façons (92, 96).

#### 1.2.4 La voie de signalisation du VEGF

Le VEGF est le plus important facteur angiogénique, car il participe à la majorité des étapes du processus angiogénique. Il active de nombreuses voies de signalisation par ces trois récepteurs, plus particulièrement le VEGFR2, majoritairement présent sur les ECs (85). Tout d'abord, un des puissants inducteurs de l'angiogenèse est l'hypoxie. Il est connu que les tissus hypoxiques vont donc activer l'angiogenèse pour compenser pour répondre aux manques d'oxygénation et de nutriments. C'est, entre autres, par le système HIF (*hypoxia inducible factor*), en condition hypoxique, que l'angiogenèse est régulée. HIF-1 est un facteur de transcription qui gère la libération de facteurs de croissance et de survie des tissus hypoxiques. Il s'agit de l'élément régulateur de l'angiogenèse le plus important grâce à sa sensibilité à l'oxygène. Cette sensibilité lui est procurée par sa sous-unité HIF-1a. Ce facteur de transcription est une protéine hétéromérique située dans le noyau et qui possède deux sous-unités, HIF-1a et HIF-1b. Le gène de HIF-1 est transcrit de manière constitutive. Compte tenu de sa sensibilité à l'oxygène, HIF-1a est très instable en normoxie ce qui le conduit à subir une hydroxylation par des enzymes prolyl-hydroxylases qui le dirige au protéosome pour être dégradé. Inversement, en condition hypoxique, la sous-unité demeure stable et ne subit pas d'hydroxylation. Elle est donc acheminée dans le noyau pour former un complexe actif avec HIF-1b et d'autres cofacteurs afin d'activer la transcription de plusieurs gènes impliqués dans les différentes phases de l'angiogenèse (97, 98). Parmi ces gènes, HIF-1a produit des activateurs de facteurs de croissance qui augmente l'expression de VEGF. Son expression est également augmentée par l'hypoxie et des oncoprotéines. L'expression de VEGF peut aussi être induite par d'autres facteurs de transcription tels que NF- $\kappa$ B (*nuclear factor-kappa B*), AP-1 (*activator protein-1*) et SP1 (*specificity protein 1*) (99). De plus, des médiateurs endogènes peuvent aussi réguler l'expression du VEGF. Le plus puissant est le NO (100). Une fois VEGF exprimé, il va activer ses récepteurs de type tyrosine kinase qui possède un domaine transmembranaire et un domaine tyrosine kinase intracellulaire. Lorsque VEGF se lie à un de ses trois récepteurs une homo ou hétérodimérisation se produit menant à un changement de conformation qui active le récepteur par autophosphorylation des tyrosines. Cette autophosphorylation crée des sites de liaison pour des médiateurs ayant un domaine SH2 (*Src Homology 2*). C'est à la suite de la liaison des

médiateurs que les voies de signalisation intracellulaire vont s'activer (85, 86). La **figure 5** résume ces voies de signalisation. Le récepteur, VEGFR1, n'est pas autant actif que les deux autres récepteurs, donc il n'augmente pas autant la migration et la prolifération des ECs que VEGFR2. Il est utile pour la morphologie normale des vaisseaux et pour la différenciation et la migration des monocytes. Pour ce qui est du VEGFR3, il régule la lymphangiogenèse en activant des MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) par la voie PI3K/AKT (*phosphatidylinositol 3-kinases/protein kinase B*). Alors, il assure surtout la prolifération, la migration et la survie des ECs lymphatiques (85, 87). C'est surtout VEGFR2 qui active des cascades de signalisation clef pour la migration et prolifération des ECs telles que ERK1/2 (*extracellular signaling kinase*) et des MAPK par la voie RAS-dépendante. Il peut aussi stimuler la voie PI3K/AKT afin de favoriser la migration et la survie cellulaire. De plus, par cette voie, le médiateur eNOS est produit et va induire la production du NO qui à son tour va engendrer la vasodilatation et l'hyperperméabilité des vaisseaux. Un autre médiateur, le c-SRC (*proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src*), qui activant aussi la migration et la prolifération des ECs. VEGFR2 active aussi la voie SAPK/p38 (*stress-activated protein kinase/ mitogen-activated protein kinase p38*) et FAK (*focal adhesion kinase*) qui assure la réorganisation du cytosquelette et la migration cellulaire (86, 87).

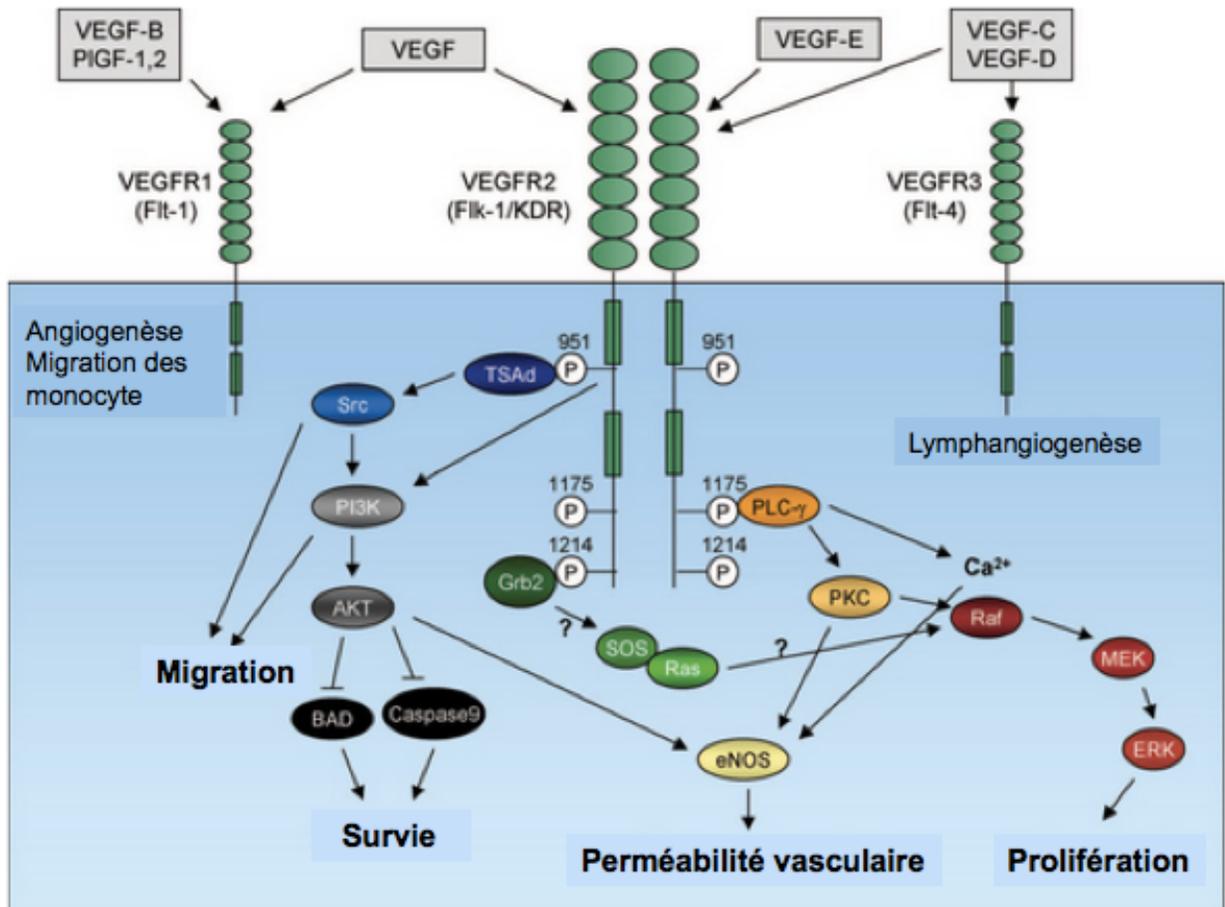


Figure 5. – Les voies de signalisation du VEGF et de ses récepteurs.

Les VEGF se lient au domaine extracellulaire de ses trois principaux récepteurs et les signaux intracellulaires sont transmis par les domaines intracellulaires des récepteurs. Le récepteur VEGFR1 est impliqué dans la formation normale des vaisseaux sanguins ainsi que dans la différenciation et la migration des monocytes. Le récepteur VEGFR3 est connu pour son rôle dans la régulation de la lymphangiogenèse. VEGFR2 est le principal récepteur impliqué dans les différentes étapes de l'angiogenèse, entre autres, la perméabilité vasculaire, la migration, la prolifération et la survie des ECs. Figure adaptée de : (Nilsson and Heymach 2006)

## 1.3 Les cellules endothéliales progénitrices

### 1.3.1 Définition et description

Contrairement à l'angiogenèse, la vasculogenèse requiert la présence des cellules endothéliales progénitrices (EPCs) pour la création de nouveaux vaisseaux sanguins. Ces cellules présentent un phénotype de type endothélial et plusieurs études ont démontré qu'elles possèdent la capacité d'améliorer la microcirculation dans les tissus ischémiques (71). Comme mentionné dans la section précédente, les EPCs jouent un rôle important dans la NV postnatale. Plus précisément, elles possèdent la capacité de se différencier en ECs matures, de proliférer et de participer à l'angiogenèse active en s'incorporant directement aux vaisseaux. Elles sont positives aux marqueurs hématopoïétiques, c-Kit, Sca-1, CD34 et CD133, et endothéliaux tel que VEGFR2, CD31 et lectine. Elles sont aussi capables d'internaliser les LDLs (*low density lipoprotein*) diacétylés (73). Cependant, encore aujourd'hui, il existe un débat sur la définition exacte de ces cellules puisque c'est une population de cellules progénitrices très hétérogènes qui acquiert un phénotype endothélial et des propriétés angiogéniques. Les EPCs sont difficiles à définir précisément à cause du manque de consensus sur la source de ces cellules, la technique d'isolation et de culture, les caractéristiques et le phénotype (101). Alors, plusieurs termes sont utilisés pour nommer les EPCs en fonction de leur origine, leur isolation, leur phénotype et leurs fonctions. Elles sont parfois appelées les CACs (*circulating angiogenic cells*) ou bien PACs (*proangiogenic cells*) pour désigner qu'elles sont des «*early outgrowth cells*». Cependant, il est aujourd'hui clair que les PACs ne sont pas des vraies EPCs, puisqu'elles ne peuvent acquérir le phénotype endothélial et elles sont plus connues pour leur rôle paracrine pro-angiogénique. Les vraies EPCs sont les «*late outgrowth cells*» qui sont souvent désignées sous le nom de ECFC (*endothelial colony forming cells*) (101, 102). L'origine de ces cellules remonte à une cellule souche bipotente, l'hémangioblaste. Les cellules souches sont capables de s'autorenouveler, de se transformer en cellules progénitrices et de produire des cellules différenciées. L'hémangioblaste est à l'origine de l'hématopoïèse, mais aussi de l'angioblaste, donc elle produit des cellules sanguines et des ECs. Ce sont donc des cellules progénitrices hématopoïétiques qui peuvent se transformer en EPCs (74). Il faut savoir que les cellules souches

progénitrices ne se différencient qu'en un seul type cellulaire et ne peuvent s'autorenouveler. De plus, leur rôle principal est au maintien et à la réparation tissulaire (103). Les cellules souches hématopoïétiques résident principalement dans la moelle osseuse. Une principale réserve d'EPCs se retrouve dans la moelle osseuse. Il y a également une très petite partie dans la circulation sanguine et dans le sang du cordon ombilical humain. En cas de stimuli physiologique ou pathologique, elles sont donc mobilisées de la moelle osseuse afin de se rendre au site d'angiogenèse (104). Il est possible d'obtenir des EPCs en les isolant directement du sang provenant du cordon ombilical, du sang périphérique ou de la moelle osseuse en les marquant spécifiquement par des marqueurs tels que CD34, CD133 et VEGFR2. Le sang subit une centrifugation différentielle par gradient de ficoll afin de recueillir les cellules mononuclées. Ces dernières sont incubées sur une matrice de fibronectine, de collagène ou de gélatine en présence de facteurs de croissance angiogéniques. Après 24 à 48 heures, les cellules non adhérentes sont aspirées et celles adhérentes sont gardées en culture jusqu'à 21-28 jours. Toutefois, en raison du faible taux d'EPCs circulantes dans le sang périphérique, cette méthode n'est pas souvent pratiquée. Il est aussi possible d'obtenir des EPCs par différenciation *in vitro* par culture de cellules mononuclées du cordon, du sang périphérique et de la moelle osseuse qui est la méthode préférée. Les cellules obtenues acquièrent une ressemblance et certaines fonctions des ECs. C'est alors que la population d'EPCs peuvent être séparées en deux groupes, les «*early*» et les «*late*» EPCs comme il a été mentionné. Les «*early*» EPCs, d'où le nom, sont les cellules obtenues après trois à sept jours de culture. Elles présentent des marqueurs monocytaires et endothéliaux similaires aux EPCs. Elles sont positives pour la lectine et l'Ac-LDL (*acetylated-LDL*). Elles ne peuvent proliférer et créer un réseau vasculaire *in vitro*. Leur rôle principal se limite à une grande activité paracrine pro-angiogénique. Les «*late*» EPCs sont celles obtenues après trois à quatre semaines de culture. Leur phénotype se rapproche beaucoup plus des ECs matures. Elles sont aussi positives pour la lectine et l'Ac-LCL et présentent aussi des marqueurs endothéliaux. Elles peuvent proliférer après neuf jours de culture, former un réseau vasculaire *in vitro* et s'incorporer dans les nouveaux vaisseaux (74, 102, 105, 106).

	CAC ET PAC	ECFC ET EPC
<b>CAPACITÉ PROLIFÉRATIVE</b>	-	+
<b>FORMATION TUBULES IN VITRO</b>	-	+
<b>FORMATION VAISSEAUX DE NOVO IN VIVO</b>	-	+
<b>MOBILISATION SITES ISCHÉMIQUES</b>	+	+
<b>ACTION PARACRINE ANGIOGÉNIQUE</b>	++	+/-
<b>MARQUEURS CELLULAIRES</b>	CD34+/- CD133+ VEGFR2+ CD45+/- acLDL internalisation	CD34+/- CD133- VEGFR2+ CD45- acLDL internalisation

**Tableau 1. – Caractéristiques des deux sous-types cellulaires impliqués dans la néovascularisation post-ischémique. Tableau adapté de : (Desjarlais 2018)**

### 1.3.2 Fonctions des EPCs

Sachant que les EPCs sont des progéniteurs endothéliaux, leurs fonctions sont très similaires à ceux des ECs matures. Comme mentionné, ils ont surtout des propriétés angiogéniques. Dans un premier temps, les EPCs ont pour rôle de participer à la vasculogenèse. Cette dernière implique la participation des EPCs circulantes dans la formation de nouveaux capillaires (107). Les EPCs sont attirées à l'emplacement des tissus ischémiques par des facteurs angiogéniques (ex : VEGF, FGF, CSF, SDF-1, etc.) sécrétés par ces derniers afin de promouvoir la vasculogenèse. C'est ainsi que les EPCs vont être mobilisées de la moelle osseuse pour intégrer directement les structures vasculaires en croissance. Ce recrutement se fait dans une séquence d'étapes ordonnées qui implique la chimioattraction, l'adhésion et la migration (108, 109). Les fonctions des EPCs, dans la vasculogenèse, peuvent se résumer à la capacité de migrer, de proliférer et d'acquérir un phénotype endothélial, donc se différencier en ECs. C'est pourquoi des études ont attribué un rôle important aux EPCs dans la NV en raison de leur capacité à se différencier en cellules qui servent à la croissance du vaisseau (110). Dans un deuxième temps, en plus de participer directement à la formation du vaisseau par intégration, les EPCs ont également une activité paracrine. Elles sécrètent des facteurs de croissance, des chimiokines et des cytokines afin de favoriser la croissance vasculaire. Ces protéines sécrétées inhibent la mort cellulaire, stimulent la prolifération cellulaire, activent les cellules progénitrices déjà présentes au site d'ischémie et recrute davantage des cellules progénitrices à ce site. Dans un dernier temps, les EPCs sont connues pour jouer un rôle important dans la réparation et la santé vasculaire. En effet, leur fonction ne se limite pas qu'à agir dans la formation de nouveaux vaisseaux dans les tissus ischémiques. Elles participent aussi à la réparation et restauration de l'endothélium qui est une couche interne des vaisseaux sanguins (artères, veines et capillaires) et lymphatiques (111). Auparavant, la réparation endothéliale était attribuée à la migration et prolifération des ECs matures au site de la lésion. Toutefois, des études ont montré que des cellules positives au CD34, un des marqueurs des EPCs, favorisaient l'endothélialisation des greffes implantées (112). Des observations ont aussi montré la présence des cellules de la moelle sur la surface luminale des artères carotidiennes lésées chez les souris transplantées avec des cellules de la moelle osseuse (113). Ces résultats suggèrent que les EPCs

et les cellules mononuclées de la moelle osseuse participent à la réparation de l'endothélium et promeuvent la réendothélialisation. Par ailleurs, l'artériosclérose est une pathologie dont son développement implique des dommages endothéliaux et de l'inflammation (114). La dysfonction endothéliale peut donc mener à empirer cette pathologie. Ceci étant dit, les EPCs joueraient un rôle protecteur dans l'artériosclérose en empêchant sa manifestation et sa progression et elles permettent de maintenir une homéostasie vasculaire.

### 1.3.3 La mobilisation des EPCs de la moelle osseuse vers les sites ischémiques : mécanismes et facteurs mobilisateurs impliqués

Étant donné qu'il y a une faible concentration d'EPCs en périphérie, le recrutement d'EPCs se fait majoritairement de la moelle osseuse, leur niche principale. Les EPCs quiescentes sont adhérentes par des intégrines aux cellules stromales de la moelle osseuse. Elles doivent donc être mobilisées de la moelle osseuse vers les tissus ischémiques afin de contribuer à la NV (111). Pour cela, les EPCs subissent une série d'étapes illustrées à la **figure 6** qui oblige la participation de plusieurs molécules. Cette mobilisation s'entame après l'envoi de différents signaux dans la circulation par des facteurs angiogéniques, des cytokines, des chimiokines et des hormones sécrétées par les tissus éloignés. C'est, entre autres, une augmentation de plusieurs facteurs tels que SDF-1, VEGF, FGF et CSF qui initie la mobilisation (108, 109). C'est, ensuite, l'action chimiotactique des chimiokines qui sera mise en place afin d'attirer et de faire migrer les EPCs (111). C'est en créant des gradients de concentration élevés au niveau des sites ischémiques qui vont faire en sorte que les EPCs vont être attirées vers ces sites spécifiques.

Le chimiokine SDF-1 (*stromal cell-derived factor-1*) se démarque de tous en ce qui concerne la migration des EPCs. Ceci est dû par leur concentration élevée dans des tissus ischémiques jouant donc un rôle de signal. Comme le VEGF, le SDF-1 peut activer la voie de signalisation PI3K/AKT/eNOS, produisant du NO agissant comme facteur mobilisateur dans le recrutement des EPCs (115). De plus, la migration des EPCs vers les tissus ischémiques est aussi favorisée par les facteurs de croissance VEGF et G-CSF et par d'autres molécules telles que l'IL-6 et le MCP-1 (116, 117). Après migration, les EPCs doivent s'adhérer à l'unique couche des capillaires, l'endothélium, afin d'y traverser. Pour ce faire, les cellules vont subir un roulement sur l'endothélium afin de finir pas s'y adhérer fermement. Ce sont les sélectines, à la surface des ECs, qui participent au roulement des EPCs. Alors, ce sont les E-sélectines et P-sélectines des ECs qui se lient aux *P-selectin glycoprotein ligand-1* (PSGL-1) exprimées sur les EPCs qui assurent le roulement. Leur liaison est de faible affinité ce qui permet le roulement (111, 118, 119). Ce dernier sera arrêté, en vue de s'adhérer fortement et de pénétrer, par des liaisons de forte affinité entre les intégrines présentes

sur les EPCs et les molécules d'adhésion présentes sur les ECs (VCAM-1 et ICAM-1). La sous-unité d'intégrine  $\beta 2$  des EPCs se lie à ICAM-1 et des observations ont montré que cette sous-unité promeut l'adhésion en condition ischémique (120). Il y a aussi l'intégrine  $\alpha 4\beta 1$  qui, elle, lie VCAM-1 et la fibronectine présente dans les membranes des ECs (121). D'autres interactions se font également, mais ceux-ci sont les principaux. Par la suite, les EPCs transmigrent à travers l'endothélium par diapédèse soit par les jonctions intercellulaires ou soit par les ECs (122). Une fois la couche endothéliale traversée, les EPCs se retrouvent face à la membrane basale et à la matrice extracellulaire. Afin que les EPCs puissent migrer jusqu'à leur destination, des MMPs vont entamer la dégradation et le remodelage de la membrane basale et de la matrice extracellulaire (120). Les principaux agissant dans ce processus sont la MMP-2 et la MMP-9 (122). Enfin, une fois arrivées au site de NV, les EPCs intègrent directement les structures vasculaires formant des néovaisseaux ou bien sécrètent des facteurs pro-angiogéniques amplifiant la NV (120).

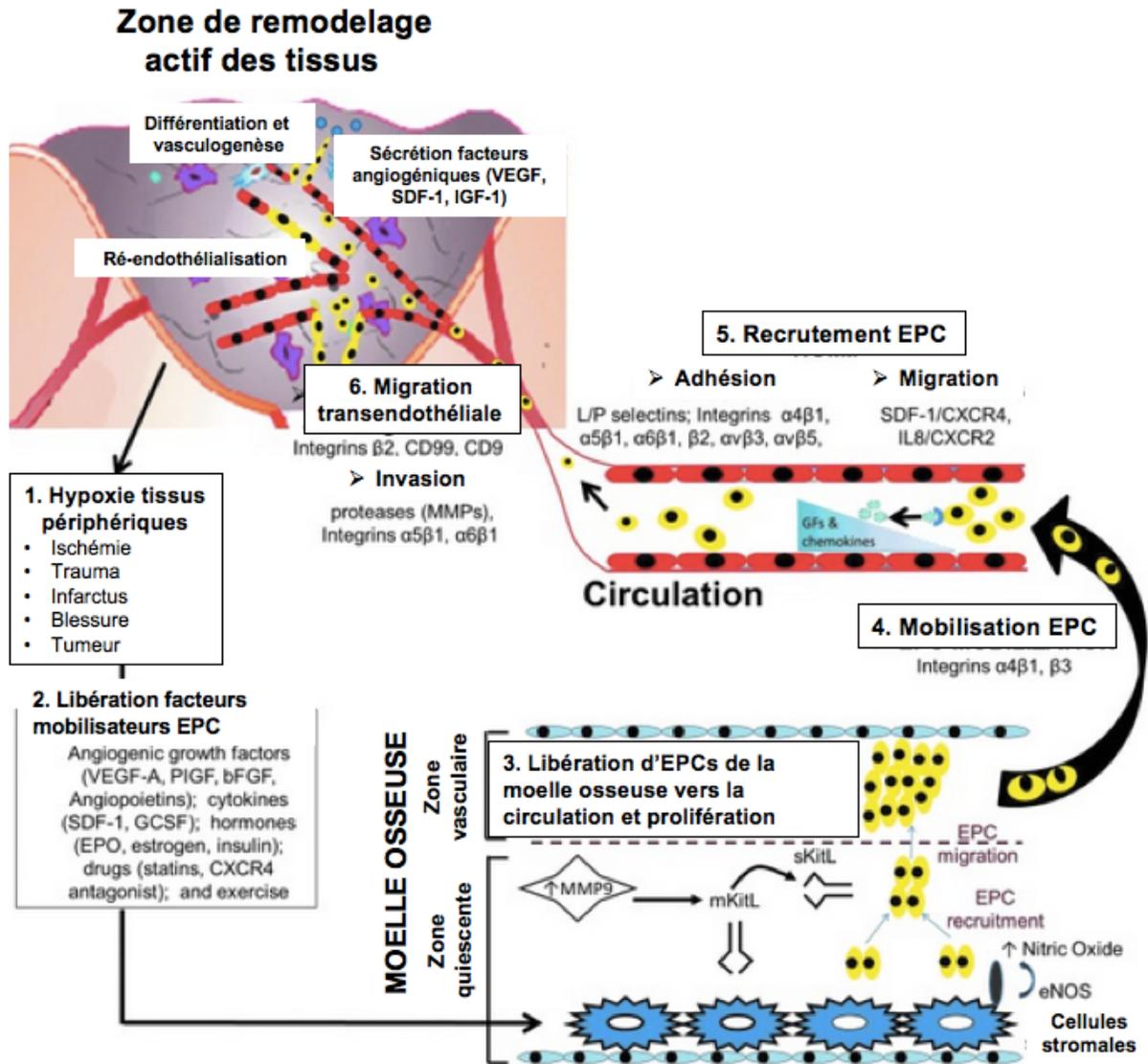


Figure 6. – Les différentes étapes de la mobilisation des EPCs de la moelle osseuse vers les sites ischémiques.

Les tissus hypoxiques libèrent des facteurs mobilisateurs d'EPCs afin de favoriser leur libération de la moelle osseuse. Les EPCs libérées prolifèrent et migrent dans la circulation sanguine. Elles sont ensuite recrutées jusqu'au site grâce à différentes molécules pour ensuite s'adhérer à la paroi vasculaire. Elles migrent à travers la membrane endothéliale pour atteindre la région de néovascularisation par intravasation. Figure adaptée de : (Desjarlais 2018)

### **1.3.4 Importance de la voie SDF-1/CXCR4 pour la fonction des EPCs**

Comme mentionné, le chimiokine SDF-1 est un des principaux acteurs dans la mobilisation des EPCs. Son principal récepteur, le CXCR4, est exprimé à la surface des EPCs. En se liant à son récepteur sur les EPCs, SDF-1 stimule leur libération de la moelle osseuse. Non seulement il permet leur libération, mais il participe également à la migration des EPCs vers les sites ischémiques, et ce en créant un gradient de concentration élevée. Étant donné que SDF-1 est augmenté dans des cas d'ischémie et d'inflammation, cette haute concentration attire les EPCs aux sites de NV. Lorsque SDF-1 se lie à son récepteur CXCR4 sur les EPCs, cela enclenche l'activation de signalisations intracellulaires dont la voie PI3K/AKT/eNOS qui mobilise, recrute et intègre les EPCs au site de NV (115, 123, 124).

### **1.3.5 Facteurs impliqués dans la dysfonction des EPCs et impact sur la dégénérescence vasculaire**

Aujourd'hui, l'importance et la contribution des EPCs dans la NV et la réparation vasculaire sont bien documentées. Toutefois, leur dysfonction entraînerait une perturbation dans la formation et la réparation des vaisseaux. Plusieurs études ont pu associer certains facteurs favorisant la dysfonction des EPCs. Cette section abordera de ce sujet précisément. L'activité biologique des EPCs est affectée par des facteurs de risque cardiovasculaire qui inclut l'hypertension, le diabète, fumer de la cigarette, une inactivité physique, des niveaux élevés d'homocystéine et l'âge (125, 126). Ces facteurs sont aussi associés à une inflammation excessive et un stress oxydatif élevé, tout comme dans la ROP. Aujourd'hui, il est connu que ces deux causes diminuent le nombre d'EPCs circulant et provoquent leur dysfonction. Tout d'abord, il est clair que les EPCs peuvent être mobilisées en réponse à une inflammation transitoire par des facteurs inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , GM-CSF) (104, 127, 128). En revanche, une inflammation persistante et excessive est associée à des effets délétères qui se traduiraient par une diminution du nombre d'EPCs circulantes (129, 130). Des études ont démontré une dysfonction des EPCs dans des conditions d'inflammation systémique chez les humains. De plus, des études cliniques ont pu montrer une association entre la protéine C-réactive (CRP) qui est produite par le foie en réponse à une inflammation aiguë et la sénescence des EPCs chez les patients atteints de prééclampsie (type d'hypertension artérielle) (131). Cela s'explique par le fait que la CRP inhibe la différenciation et la survie des EPCs et lorsque les EPCs sont exposées aux CRPs, leur activité angiogénique est diminuée (132, 133). Par ailleurs, une augmentation du taux de TNF- $\alpha$  et de glucose provoque aussi une diminution du nombre d'EPCs (134, 135). Dans des conditions d'insuffisance cardiaque, il y a une forte stimulation de l'inflammation qui provoquerait aussi un mauvais fonctionnement de l'activité biologique des EPCs (136). Si l'activité fonctionnelle des EPCs est atteinte, alors cela signifie que leur capacité migratoire et proliférative sera également atteinte. En résumé, une faible stimulation inflammatoire est favorable pour la mobilisation des EPCs, mais une forte stimulation inflammatoire systémique diminue le nombre et la bioactivité des EPCs. Ceci pourrait s'expliquer par un

épuisement de la réserve d'EPCs de la moelle osseuse en cas de stimulation pro-inflammatoire persistante. Donc, il y aurait moins d'EPCs fonctionnelles libérées et il y aurait libération d'EPCs immatures ou dysfonctionnelles (130). Cependant, les mécanismes impliqués dans l'atteinte des fonctions des EPCs par l'inflammation ne demeurent encore pas clair et davantage d'études sont requises. Souvent interrelié à l'inflammation, le stress oxydant est un autre facteur impliqué dans la dysfonction des EPCs dans les maladies cardiovasculaires. Comme expliqué dans la première section du chapitre, le stress oxydant génère une grande quantité de dérivés réactifs d'oxygène (ROS) qui eux causent des dommages au niveau de la cellule menant à sa mort. Il faut savoir que les ROS produisent un effet cytotoxique sur l'endothélium (137). Tout ceci amènerait à dire qu'ils auraient sûrement un effet sur l'activité des EPCs. En effet, d'après des études, les ROS ont des effets directs et indirects sur les EPCs qui affectent leur mobilisation et leurs fonctions. Par exemple, une augmentation du superoxyde est associée à une diminution du taux d'EPCs et à leur dysfonction. En effet, il a été démontré que des EPCs incubées avec des niveaux élevés de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) induisent l'apoptose (138, 139). Au niveau clinique, les ROS sont associés à une réduction de mobilisation des EPCs (140). Un niveau élevé de ROS est associé à une diminution du nombre d'EPCs dans le modèle de rat d'infarctus du myocarde (141). D'autre part, le stress oxydatif entraîne la libération d'EPCs dont la fonction est défailante. Autrement dit, leur capacité de mobilisation, de migration et d'incorporation aux vaisseaux sanguins est altérée (126, 142). Il a aussi été montré que lors d'augmentation de ROS, des niveaux élevés d'homocystéine induisent la sénescence et réduit le nombre d'EPCs (143). Collectivement, ces nombreuses études ont montré clairement qu'un fort stress oxydatif mène à une diminution du nombre d'EPCs et à leur dysfonction qui entraîne des effets délétères sur l'homéostasie vasculaire. Pour conclure, il est possible d'affirmer que l'activité fonctionnelle des EPCs est altérée par l'inflammation et le stress oxydatif. Néanmoins, l'effet de l'hyperoxie, une condition liée à la ROP sur les EPCs n'a pas encore été investigué et susciterait l'attention puisqu'elle implique l'inflammation et le stress oxydant dans sa pathologie.

## 1.4 La famille des protéines Nogo et leurs récepteurs

### 1.4.1 Description et rôle biologique général

La protéine Nogo (*reticulon 4*) appartient à la vaste famille des protéines du réticulon (RTN) (144). Ces protéines résident surtout dans le réticulum endoplasmique et à la surface des cellules, d'où l'origine de leur nom. Des études ont montré leur implication dans la formation de complexes vésiculaires, dans les échanges entre le réticulum endoplasmique, dans la morphogenèse membranaire et dans l'inhibition de la croissance des neurites (145-147). Des preuves scientifiques suggèrent aussi leur implication dans les maladies neurodégénératives comme l'Alzheimer et la sclérose latérale amyotrophique. En ce qui concerne la protéine Nogo, elle possède trois isoformes, Nogo-A, Nogo-B et Nogo-C et c'est précisément le gène de réticulon 4 (RTN4) qui les produit (147). Chacune des Nogo partage le même domaine d'homologie du réticulon qui représente les 188 acides aminés à partir de l'extrémité carboxyle (**figure 7**). Le domaine d'homologie possède deux longues parties hydrophobes transmembranaires, laissant un segment extracellulaire de 66 acides aminés qui les relie et qui est appelé Nogo-66 (**figure 7**). La terminaison aminée est différente pour chacune des Nogo. Nogo-A est composé de 1163 acides aminés, Nogo-B en possède 360 et Nogo-C en possède 190. Les isoformes B et C sont des formes épissées (148). Les trois isoformes ne sont pas exprimées de façon égale dans les différents tissus et organes. Nogo-A est exprimé surtout dans le système nerveux et différemment selon les périodes. Elle est exprimée durant les premiers stades du développement embryonnaire dans les neuroblastes migrateurs et neurones immatures situés dans le tube neural (149, 150). Elle est exprimée aussi durant la principale phase de croissance des neurones centraux et périphériques dans plusieurs types de cellules neuronales et cette expression diminue après la naissance (151). Néanmoins, divers types cellulaires conservent un niveau élevé de Nogo-A tel que les oligodendrocytes dans le système nerveux central (147). Par ailleurs, Nogo-A est aussi présent dans la peau en développement, dans les muscles squelettiques lors de la différenciation et dans le cœur. L'expression de Nogo-A a aussi été confirmée dans les tissus du cœur adulte chez les rats, souris et humains et dans quelques types de cellules immunitaires dont les macrophages (151, 152). La protéine Nogo-B est

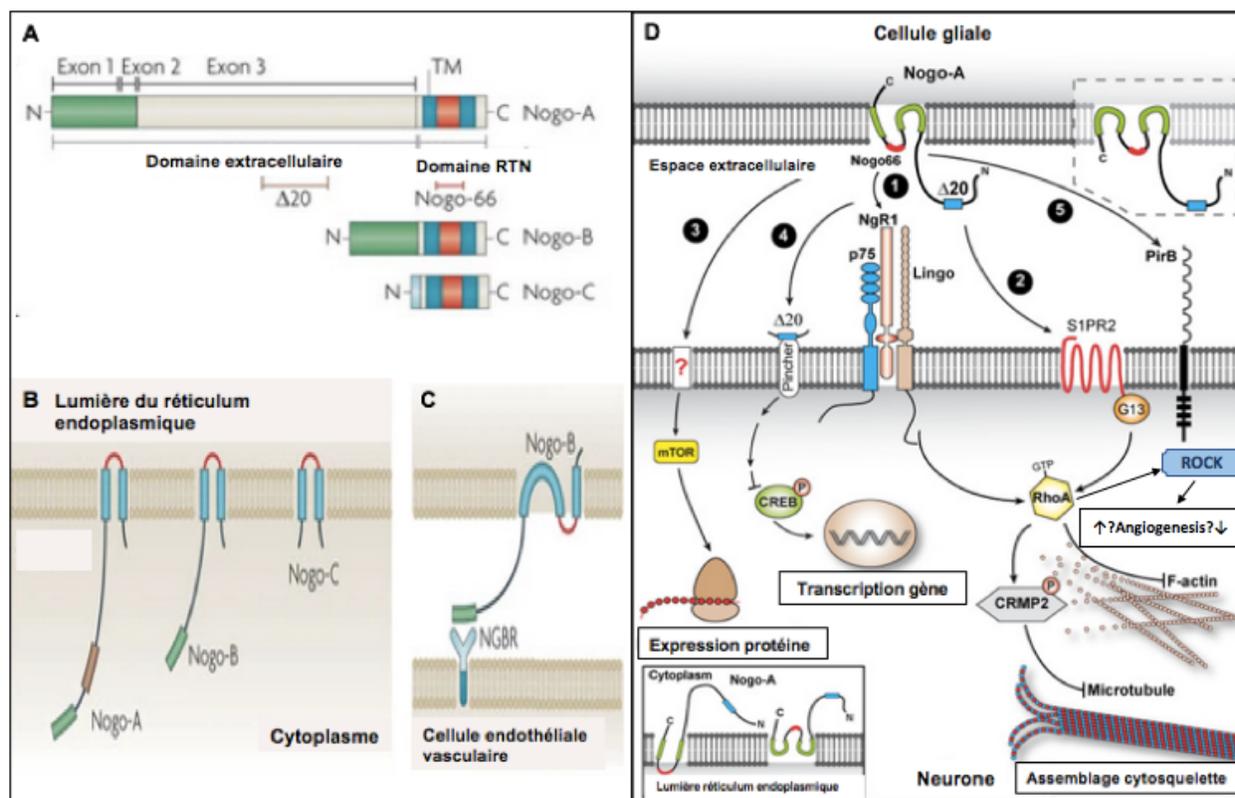
exprimée dans le système nerveux central et périphérique (151). Les données d'aujourd'hui montrent qu'elle est exprimée dans plusieurs tissus, mais son expression cellulaire spécifique n'est pas très connue. Nogo-B et son récepteur NGBR transmembranaires (**figure 7**) sont tout de même exprimés dans les cellules endothéliales vasculaires (153). Pour ce qui est de Nogo-C, son niveau d'expression et sa distribution demeurent peu connus. Toutefois, selon les études, elle est présente dans quelques types de neurones dans le système nerveux central du rat et les muscles striés après maturation (151, 154).

Dans le but de déterminer avec quels récepteurs les Nogo interagissent, des études ont évalué les différents domaines suivants qui pourraient avoir des interactions potentielles : Nogo-66, Nogo- $\Delta$ 20 (acides aminés 544 à 725) et N-terminal (acides aminés 1 à 979) de Nogo-A et N-terminal de Nogo-B (155). L'étude des récepteurs de Nogo n'est pas assez documentée et doit être davantage étudiée. Les plusieurs voies de signalisation activées par la liaison de Nogo-A à différents récepteurs sont illustrées à la **figure 7**. Le premier récepteur à être identifié est le NgR1 qui est aussi connu sous le nom de récepteur de Nogo-66, étant donné sa liaison à cette séquence, et récepteur de réticulon 4. Il s'agit d'un glycosylphosphatidylinositol (GPI) lié à la séquence répétée riche en leucine (LRR). NgR1 forme un complexe avec les protéines transmembranaires LINGO1 et p75 ou TROY (**figure 7**) (156, 157). Ce récepteur est exprimé dans les cellules ganglionnaires de la rétine durant le développement embryonnaire. Il est présent également dans la membrane axonale et à des synapses de neurones d'hippocampes après la naissance. Comme Nogo-A, NgR1 est aussi exprimé dans les tissus du cœur adulte chez les rats, souris et humains et chez les macrophages. Nogo-A possède une forte affinité de liaison à NgR1 grâce à une séquence dans sa terminaison carboxyle (151, 152, 158, 159). En outre, la séquence Nogo-66 des Nogo peut aussi se lier au récepteur B apparié de type immunoglobuline (PIRB) (160). Ces deux récepteurs connus jusqu'aujourd'hui, NgR1 et PIRB peuvent se lier à d'autres ligands aussi tels que la glycoprotéine associée à la myéline (MAG) qui inhibe la croissance de la myéline et la glycoprotéine oligodendrocytaire de la myéline (OMGP) (161). D'autres molécules peuvent également lier NgR1. Des hypothèses suggèrent qu'en raison de l'absence d'un domaine transmembranaire chez NgR1, NgR1 requiert la participation de molécules adaptatrice membranaires afin que la signalisation

ait lieu. Ces protéines adaptatrices membranaires incluent p75 qui est un récepteur de neurotrophine de faible affinité et TROY qui est un des récepteurs de TNF- $\alpha$ . Une protéine LRR extracellulaire fait aussi partie du complexe et il s'agit du LINGO1 (162). Plusieurs récepteurs spécifiques à Nogo-A ont été identifiés aujourd'hui. Sa séquence Nogo- $\Delta$ 20 se lie à un récepteur de la famille des sphingosine 1-phosphate (S1PR2) couplé à la protéine G13 menant à l'activation de la voie RhoA (163). Nogo-A peut aussi être internalisée dans les cellules neuronales et aurait une influence dans la transcription de gènes par CREB (*cAMP response element binding protein*) (164). Finalement, elle peut également moduler la synthèse des protéines en activant la voie mTOR (*mammalian target of rapamycin*) par l'intermédiaire d'un récepteur encore inconnu (165). Dans divers types de cellules neuronales, lorsque Nogo-66 interagit avec NgR1, il y a une augmentation du calcium intracellulaire et une activation de la voie RhoA qui active la Rho kinase, ROCK (*Rho-associated protein kinase*). Plus précisément, cela active la GTPase RhoA et sa protéine effectrice associée à Rho contenant la protéine kinase 1 (ROCK1). Ensuite, ROCK1 phosphoryle la LIM kinase qui mène à l'activation de la cofiline qui est une enzyme déstabilisatrice d'actine. Cela diminue la mobilité de l'actine dans les filopodes des cônes de croissance et dans les épines dendritiques. Le cytosquelette d'actine est déstabilisé menant à l'effondrement du cône de croissance et donc l'arrêt de croissance (155). Par ailleurs, plusieurs études ont montré que cette même voie joue un rôle dans l'angiogenèse en favorisant la perméabilité vasculaire, la migration, la prolifération des ECs et la formation des capillaires (166).

Nogo-A est surtout connu pour son activité inhibitrice de la croissance des neurites et de ses effets inhibiteurs sur la régénération exercée par la myéline. Des études ont montré que le blocage de Nogo-A dans le système nerveux central montre une amélioration de la régénération, de la germination compensatoire des fibres et de la récupération fonctionnelle (155). De plus, Nogo-A joue également un rôle dans le développement du système visuel. Plus précisément dans la myélinogenèse nerveuse optique, la formation et la maturation des axones rétiniens et l'angiogenèse rétinienne (167). Nogo-B exercerait quelques fonctions à partir de sa liaison avec son récepteur NGBR. Ce dernier participe aux actions chimioattractantes et pro-migratoires de Nogo-B sur les cellules endothéliales humaines et murines. De plus, il participe également au remodelage et à la réparation vasculaire après une blessure chez la souris (168, 169). En ce qui concerne la fonction

et les interactions de la protéine Nogo-C, elles demeurent encore en investigation (155). Enfin, plusieurs recherches sont encore nécessaires pour déterminer le rôle des Nogo, surtout de Nogo-B et Nogo-C qui sont plus nombreuses à l'extérieur du système nerveux.



**Figure 7. – La structure et les voies de signalisation connues des différentes isoformes de la protéine Nogo.**

A) La structure des trois isoformes montre les différents domaines, dont le domaine hautement conservé du réticulon (RTN) qui inclut le domaine extracellulaire Nogo-66 et le domaine extracellulaire Δ20 de Nogo-A. B) La structure des trois Nogo est représentée dans la membrane du réticulum endoplasmique. C) La terminaison aminée de Nogo-B se lie à son récepteur spécifique NGBR se situant sur la surface des cellules endothéliales vasculaires. D) Les nombreuses voies de signalisation de Nogo-A avec différents récepteurs sont illustrées. Détails expliqués dans le texte. Figure adaptée de : (Schwab 2010; Pernet 2017)

### 1.4.2 Les fonctions de Nogo-A et les implications de NgR1 dans la modulation angiogénique

Parmi les importants rôles que Nogo-A joue dans le système nerveux central, il a été démontré qu'elle joue également un rôle dans l'angiogenèse au niveau du cerveau et de la rétine (167). Une fonction d'intérêt pour les maladies oculaires, telles que la ROP. Tout d'abord, la croissance des vaisseaux sanguins est médiée par des ECs spécialisées qu'on nomme les *tips cells* se situant au front de migration des ECs du vaisseau en croissance. Les tips cells possèdent des filopodes pour détecter les molécules chimioattractantes afin de diriger la croissance. Ceci étant dit, il a été montré que Nogo-A possède un pouvoir de répulsion sur les ECs en culture et un pouvoir de rétraction de leurs filopodes. C'est entre autres le fragment  $\Delta 20$  qui possède ces pouvoirs. Il inhibe non seulement la rétraction des ECs, mais aussi leur adhésion et leur migration (170). Nogo- $\Delta 20$  possède une grande affinité de liaison au récepteur S1PR2 qui est présent en grande quantité sur les ECs qui en se liant au récepteur que Nogo- $\Delta 20$  provoque cette répulsion (171, 172). Leur interaction provoque aussi l'inhibition de la prolifération cellulaire et de la croissance des neurones primaires (172). De façon très intéressante, la liaison de Nogo- $\Delta 20$  et S1PR2 aurait aussi un rôle dans l'angiogenèse pathologique, comme celle qui se présente dans la ROP. En effet, des études ont confirmé dans le modèle de rétinopathie induite par l'oxygène (OIR) que la suppression du gène de S1PR2 promeut une vascularisation de la rétine centrale accélérée (173). Ceci signifie donc que Nogo-A est potentiellement un régulateur négatif de l'angiogenèse. Une autre étude montre que la neutralisation de Nogo-A améliore la densité vasculaire dans le plexus vasculaire profond chez les bébés souris. En revanche, chez l'adulte, la neutralisation en Nogo-A ne montre pas d'effets sur la densité vasculaire (170). Par ailleurs, toujours en utilisant le modèle OIR, la neutralisation du domaine  $\Delta 20$  de Nogo-A favorise la régénération vasculaire et diminue l'angiogenèse pathologique au niveau de la rétine. En inhibant Nogo-A, la fonction rétinienne est restaurée et la réparation des vaisseaux sanguins est accélérée dans le système nerveux central (174). Globalement, les résultats de plusieurs études précliniques récentes montrent un potentiel thérapeutique basé sur l'inhibition de la protéine Nogo-A qui pourrait potentiellement être

exploité comme traitement de la ROP. Cependant, le rôle de la signalisation de Nogo-A et de son récepteur NgR1 n'a pas été étudié sur la fonction des EPCs dans le modèle OIR.

## Chapitre 2 – Projet de recherche

### 2.1 Mise en contexte

La ROP est l'une des principales causes de cécité chez les nourrissons dans le monde entier (3). Elle est caractérisée par une phase initiale clef de dégénérescence vasculaire et d'incapacité de former de nouveaux vaisseaux sanguins fonctionnels. Une défaillance de l'organisme à former de nouveaux vaisseaux sanguins (néovascularisation) post-ischémiques contribue à accentuer les dommages tissulaires oculaires (175). La NV est médiée non seulement par l'angiogenèse, mais aussi par la vasculogénèse qui, elle, implique la mobilisation et la participation des cellules endothéliales progénitrices (EPC) recrutées aux sites ischémiques pour promouvoir la NV (71). Toutefois, les mécanismes moléculaires impliqués dans la défaillance fonctionnelle des EPCs mobilisées de la moelle osseuse observés lors de la rétinopathie induite par l'oxygène (OIR) demeurent mal compris.

## 2.2 Hypothèses de recherche

Sachant que les EPCs sont impliquées activement dans la NV, nous émettons la première hypothèse suivante :

*Hypothèse 1 : Les EPCs pourraient améliorer la revascularisation rétinale dans le modèle de rat OIR.*

Sachant que Nogo-A est un régulateur négatif de l'angiogenèse, nous émettons la deuxième hypothèse suivante :

*Hypothèse 2 : La protéine Nogo-A pourrait inhiber l'activité biologique des EPCs dans le modèle de rat OIR et l'inhibition de Nogo-A pourrait les protéger en condition hyperoxique et améliorer leur efficacité angiogénique.*

## 2.3 Objectifs de recherche

Objectif spécifique 1. Évaluer l'effet de l'hyperoxie sur la fonction des EPCs dérivées de la moelle osseuse *in vitro*.

Objectif spécifique 2. Évaluer l'effet de l'hyperoxie sur la voie de signalisation Nogo-A/NgR1 chez les EPCs dérivées de la moelle osseuse *in vitro* et son impact sur l'angiogenèse.

Objectif spécifique 3. Évaluer l'efficacité thérapeutique d'une supplémentation d'EPCs natives ou Nogo-/- sur l'atténuation de la vasooblitération rétinienne dans un modèle de rat OIR.

# Chapitre 3 – Nogo-A Is a Negative Regulator of Endothelial Progenitor Cells Angiogenic Activity: Impact in Oxygen-Induced Retinopathy

## 3.1 Abstract

**Background & Aim.** Over the past decade, it has been shown that Endothelial Progenitor Cells (EPCs) can actively participate to revascularization process in ischemic retinopathy including retinopathy of prematurity (ROP). However, the mechanisms involved in the dysfunction of EPCs, particularly in oxygen-induced retinopathy (OIR) condition remain poorly understood. Recently, Nogo-A-dependant signaling as been reported acting as a negative regulator of angiogenesis in several pathological conditions including OIR. However, the potential deleterious impact of Nogo-A in EPCs functional activity is currently unknown. This study aims to investigate the interrelation between EPCs function and Nogo-signaling in OIR condition. **Methods & Results.** Using qRT-PCR and western blot, the results show that the expression of Nogo-A and its receptor NgR1 are significantly increased in EPCs subjected to hyperoxia or in EPCs isolated from OIR rats compared to their respective control (normoxic healthy EPCs). The role of Nogo-A signaling on the angiogenic activity of EPCs was analyzed respectively by migration and tubulogenesis assay in the presence or absence of a Nogo inhibitor (Nogo-66 neutralizing antagonism peptide) in normoxic or hyperoxic condition. The results show that EPCs subjected to hyperoxia displayed a significant reduction of their migratory and tubulogenic capacity. Interestingly, inhibition of Nogo-A protect the function of EPCs against hyperoxia, as attested by a physiological migratory and the tubulogenic capacity rescued. In addition, the inhibition of Nogo-A is associated with an increased intracellular level of SDF-1 in EPCs. In vivo, intraperitoneal injections of native EPCs or reprogrammed EPCs (Nogo pre-inhibited) in OIR rats at P5 (before hyperoxic exposure) was performed to investigate the therapeutical effects to improve retinal revascularisation. The results show that OIR rats supplemented EPCs reprogrammed (Nogo-A inhibited) are more efficient than native EPCs

to reduce retinal vasoobliteration at P10 (the peak of vasoobliteration), and this is associated with an increased retinal expression of key angiogenic factors VEGF, SDF-1, PDGF and EPO. **Conclusions.** The results of this study suggest that hyperoxia alters the angiogenic functions of BM-EPCs by inducing the Nogo-A signaling which may contribute in impaired revascularization during OIR. Collectively, the results of this study suggest that targeting of Nogo-A protect the angiogenic activity of EPCs against hyperoxia in OIR and could be a potential new target for vascular integrity in ischemic retinopathies.

Keys words: Endothelial progenitor cell (EPC), angiogenesis, revascularization (RV), oxygen-induced retinopathy (OIR), Nogo-A, NgR1.

## 3.2 Introduction

Retinopathy of prematurity (ROP) remains one of the main conditions leading to visual impairment and blindness in premature infants (3). It is characterized by two distinct phases which follow one another, vascular degeneration and pathological neovascularization (NV) (12). So, it begins with incomplete vascularization of the peripheral retina which creates a hypoxic environment due to the lack of oxygen and nutrients supplied to the tissues. The body therefore attempts to compensate for the losses by responding with excessive NV which leads to vision problems (12, 19). The key factor associated with ROP is the excess oxygen (hyperoxia) given to infants for survival. This hyperoxic condition is toxic to the immature retina of infants which leads to degeneration of the microvasculature (14). In addition, it causes a decrease in pro-angiogenic factors such as VEGF, SDF-1, IGF-1, PDGF and FGF-2. The growth factor VEGF is known today to be the most important factor involved in the development of the retinal microvasculature (176). Aside from laser treatments and cryotherapy which are invasive eye operations, studies have focused more on developing anti-angiogenic therapy to alleviate pathologic NV. Anti-angiogenic therapy involves the use of anti-growth factors, such as an anti-VEGF (63, 64, 67). However, therapy aimed at improving revascularization during the initial phase of ischemia has been poorly documented and appears to limit the excessive compensatory response of subsequent NV. Similarly, studies have shown that angiogenic therapies using stem cells promote vascular repairs in ischemic animal models (177, 178).

Many studies have shown that it is primarily the involvement of endothelial cells (ECs) in angiogenic stimulation and vascular repair. However, several other cell types possess angiogenic restorative properties in ischemic tissues, among others, hematopoietic progenitors (177, 178). These include progenitor endothelial cells (EPCs) derived from bone marrow (BM) (110). They have two subtypes, early outgrowth EPCs which are also called circulating angiogenic cells (CACs) and pro-angiogenic cells (PACs) and late outgrowth EPCs which are also called endothelial colony forming cells (ECFCs). They differ depending on the expression of different hematopoietic and endothelial markers and their actions. In this study, late EPCs were discussed. The ECFCs have the

ability to directly integrate the NV site in order to participate directly, that is to say, to participate in the formation of new vessels, and indirectly, through its paracrine activity, either by secreting pro-angiogenic factors (101, 102). Studies have shown that administration of EPCs has shown increased NV in different models of ischemic animals (179-182).

Observations have shown that under pathological conditions, the number of EPCs is reduced as well as their functions are impaired (125, 129). The two main causes that cause their decrease and dysfunction are marked inflammation and oxidative stress that can be seen in ROP (130). Knowing that hyperoxia increases oxidative stress, several studies have shown that hyperoxia reduces the number of EPCs and causes their dysfunction. Decreased and dysfunctional EPCs involve insufficient post-ischemic NV which has been observed in various studies (183-185). However, the exact mechanisms associated with vascular degeneration and in particular the role of EPCs remain to be explored during ROP.

Nogo-A belongs to the reticulon protein family (RTN4) (144). There are three isoforms, Nogo-A, Nogo-B and Nogo-C. These transmembrane proteins all have a domain of reticulon homology that contains an extracellular segment of 66 amino acids called Nogo-66 (148). It is Nogo-66 which binds with high affinity to the Nogo receptor (NgR1) and activates the RhoA signaling pathway (159). This pathway ultimately leads to the destabilization of the actin cytoskeleton as well as the collapse of the growth cone. Nogo-A is mostly expressed in the central nervous system (CNS) in oligodendrocytes. The Nogo-A protein is the most documented to date, among other things, for its important role in inhibiting neurite growth and myelin regeneration in the central nervous system (CNS) (155). However, studies have shown its involvement in angiogenesis in the retina. Indeed, Nogo-A possesses repellency on ECs by its segment  $\Delta 20$  (Nogo- $\Delta 20$ ) which binds to the sphingosine 1-phosphate receptor (S1PR2) leading to the activation of the same RhoA pathway. Their interaction shows a role in pathological angiogenesis like in the ROP and this was confirmed using the model of oxygen-induced retinopathy (OIR). Suppression of S1PR2 showed accelerated vascularization of the central retina (170). Various studies have shown that Nogo-A acts as a negative regulator of angiogenesis and has potential for treating ROP (171, 173, 174). On the other hand, its role has not yet been investigated in EPCs in the OIR model. This study aims to investigate

the interrelation between EPCs function and Nogo-signaling in OIR condition. Altogether, the results shown that hyperoxia alters BM-EPCs angiogenic functions by inducing the Nogo-A signaling which may contribute in impaired revascularization during OIR, and that targeting of Nogo-A could be a potential new target to protect EPCs biological activities, and in turn, vascular integrity in ischemic retinopathies.

### **3.3 Materials and methods**

#### **Animal Care**

All animal experimental procedures were performed with strict adherence to the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research and approved by the Animal Care Committee of the Hospital Maisonneuve-Rosemont in accordance with guidelines established by the Canadian Council on Animal Care.

#### **Identification of Endothelial Progenitor Cells (EPCs)/Morphological Characteristics**

Bone marrow-derived endothelial progenitor cells (BM-EPCs), also known as « late outgrowth EPCs » or « endothelial colony forming cells » (ECFC) express hematopoietic stem cell myeloid markers such as CD34 and CD117 and endothelial markers such as lectin, VEGFR2 and CD31 (102, 105, 106). Also, EPCs acquire endothelial cells (ECs) morphology and are capable of forming tubes in vitro. In our experiments, the vast majority of adherent cells bind FITC-labeled lectin, had ECs morphology and were forming tubes in vitro. We also found that they can migrate in vitro. According to previous studies, the morphological and functional characteristics that these cells present confirm that they are EPCs (102, 186). Therefore, these cells were characterized and referred to as EPCs in this study.

#### **EPCs Isolation From Rat Bone Marrow**

The mononuclear cells were isolated from the femur's and tibiae's bone marrow of Sprague Dawley postnatal day 10 rats. The bone marrow's cavities were flushed with medium 200 (Life technologies) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Wisent, St-Jean-Baptiste, QC, Canada), 100 IU/ml penicillin/0.1 mg/ml streptomycin (Wisent) and low serum growth supplements (LSGS; 2% FBS, 3 ng/ml bFGF, 10 mg/ml heparin, 1 mg/ml hydrocortisone, and 10 ng/ml EGF; Life Technologies) to harvest the cells. The cells were kept 7 days in culture on fibronectin-precoated plates (Sigma, St. Louis, MO) and non-adherent cells were removed by washing with PBS. The fibronectin adherent cells are considered as « early outgrowth EPCs » or « proangiogenic cells » (PACs). These cells were kept an additional three weeks in culture so they can acquire EPCs phenotype and

characteristics. After four weeks of culture, the adherent cells were considered EPCs or ECFCs and were positive for FITC-labeled lectin BS-1 (*Bandeiraea simplicifolia*, Sigma) and able to form tubules on matrigel tube.

### **Oxygen-Induced Retinopathy (OIR)/Vaso-Obliteration Model**

The angiogenic properties of EPCs and reprogrammed EPCs (Nogo-66-treated-EPCs) were studied during vascular degeneration in oxygen-induced retinopathy (OIR) model. This model induces retinal vaso-obliteration (VO) in Sprague Dawley newborn rats by exposing them to a constant hyperoxia (80% O<sub>2</sub>) environment from P5 to P10. The chambers were controlled by a computer-assisted Oxycycler (BioSpherix, Ltd.). Three groups of rat pups were anesthetized 30 minutes before hyperoxia exposure at P5 and were intraperitoneally injected with 50 µl of 200 000 native EPCs or reprogrammed EPCs (Nogo-66-treated-EPCs) or PBS used as a control. Some of the rat pups of each group were euthanized at P8 and their retinas were collected for molecular analysis. The rest of them were euthanized at P10 and their retinas were collected for vessels immunostaining (retinal flat mounts) and for molecular analysis.

### **Immunohistochemistry of Retinal Vessels**

In order to study the retinal vasculature, enucleated eyes were fixed for one hour in 4% paraformaldehyde at room temperature and kept in PBS until performing the retinal flat mount dissection. The retinas were incubated overnight in 1% Triton X100, 1 mM CaCl<sub>2</sub>/PBS with the tetramethylrhodamine isothiocyanate-conjugated lectin endothelial cell marker *Bandeiraea simplicifolia* (1:100; Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA). Before preparing microscope slides, PBS was used to wash retinas. They were mounted on microscope slides (Bio Nuclear Diagnostics, Inc., Toronto, ON, Canada) under coverslips with mounting media (Fluoro-Gel; Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA). Then, an epifluorescence microscope was used to take pictures of retinas (Zeiss AxioObserver; Carl Zeiss Canada, Toronto, ON, Canada) and the MosaiX option in the AxioVision 4.6.5 software (Zeiss) was used to merge the images into a single file.

### **Migration Wound Healing Assay**

Cell migration and motility were analyzed by a scratch wound assay on confluent EPCs. The cells were grown to near confluence in 24-well plates and were treated or not with different doses of Nogo-66 antagonist peptide (Sigma-Aldrich Corp., N7161) to obtain different concentrations such as 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M and 10  $\mu$ M. Right after treating the cells, the monolayer scratch was performed mechanically by a pipette tip and they were exposed or not to hyperoxia (80% O<sub>2</sub>). The cell migration was evaluated 24 hours after the disruption with an inverted microscope at a magnification of 100x. Then the cell density was quantified. Five fields per well were evaluated and all experiments were performed in duplicate.

### **EPCs Capillary-Like Tubulogenesis On Matrigel**

The angiogenic activity such as the capacity of forming capillary-like tubes was evaluated using a Matrigel tube assay. EPCs extracted from OIR and non-OIR rats treated or not with Nogo-66 antagonist peptide (10  $\mu$ M) were plated at a density of 30 000 cells/well in 96-well plates precoated with 50  $\mu$ l of growth factors reduced Matrigel Matrix (Fisher Scientific, New Hampshire, USA) and cultured at 37°C for 6h in normoxia or hyperoxia in complete endothelial growth medium (see EPCs isolation from rats bone marrow section). A light microscope at a magnification of 10x was used to take pictures of the capillary-like tubes and they were quantified by counting branches and branching points.

### **qRT-PCR Analyses**

In order to quantify the mRNA levels of Nogo-A, NgR1 and other angiogenic factors in EPCs and in rat retinas, RNeasy mini kit (Qiagen) was used to extract total RNA with the manufacturer's protocol. Then to generate cDNA, iScript-II RT kit (Qiagen) was used for the reverse transcription with the manufacturer's protocol as well. After, 25 ng of cDNA samples, 2  $\mu$ M of specific primers (Alpha DNA, Montreal, Canada) for the selected mRNAs and Universal SYBR Green Supermix (BioRad) were needed to do a quantitative real-time PCR reaction. The instrument detection system ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) allowed to calculate the relative expression ( $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$ ) and normalize it to b-Actin and GAPDH.

## **Western Blot Analysis**

To quantify protein levels of Nogo-A, NgR1 and SDF-1 in EPCs and in rat retinas, Western blot analysis was performed. The retinas were washed in PBS, snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until total protein extraction. The retinas were homogenized in ice cold RIPA buffer (pH=8) containing 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton 100x, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS with a cocktail of proteases and phosphatases inhibitors (MiniComplete, PhosphoStop and PMSF, Roche, Bâle, Switzerland) to extract the whole-cell proteins. EPCs were lysed with 100 µl of RIPA lysis buffer per well in 6-well plates, harvested and sonicated. On a SDS-polyacrylamide gel, 50 µg of protein per retina homogenate sample and 20 µg of protein per cell lysate sample were separated and electroblotted on nitrocellulose membranes. Membranes were kept for one hour in a blocking solution of TBS-T with 5% milk so their non-specific binding sites could be blocked and were probed overnight at 4°C with the following antibodies: rabbit antibody Nogo (1:1000, ab47085; ABCAM), rabbit antibody NgR1 (1:1000, ab184556, ABCAM), rabbit antibody SDF-1 (1:1000, ab9797; ABCAM) or mouse antibody b-Actin (1:2000, ab8227; ABCAM). The membranes were washed five times for five minutes with TBS-T and incubated with secondary antibodies for one hour with 1:2500 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse or 1:2000 HRP-conjugated anti-rabbit secondary antibodies (Millipore). They were then exposed on LAS-3000 imager using the chemiluminescent reaction (GE Healthcare, Piscataway, NJ) to detect specific proteins. Quantification of protein expressions was analyzed using ImageJ and the results are expressed as density values normalized to the loading control (b-Actin).

## **Statistical Analysis**

All results are presented as mean  $\pm$  SEM. Statistical significance was evaluated by a one or two-way ANOVA followed by a Bonferroni post hoc test. A value of  $P < 0.05$  was interpreted to denote statistical significance.

## 3.4 Results

### Phenotypical Validation and Angiogenic Activities of Rat BM-EPCs Cultured Ex-Vivo

To confirm the phenotype and characterization of EPCs extracted from rat's bone marrow, we used a classic method of culture illustrated in **Figure 1A**, which consist of culturing total mononuclear cells extracted from bone marrow with endothelial growth medium on a fibronectin matrix. After four weeks of culture, we validate the phenotype of adhered cells by evaluating their morphology, their endothelial markers (lectin) and their angiogenic activities. As shown in **Figure 1B**, the cells display ECs morphology, bind FITC-labeled lectin and induce tubulogenesis. Accordingly to these characteristics, we can consider this cell population as EPCs.

### Hyperoxia Induces Nogo-A/NgR1 Expression in EPCs

The expression of Nogo-A and its receptor NgR1 were evaluated in EPCs exposed or not to hyperoxia (80% O<sub>2</sub>). We evaluate the effect of *in vitro* hyperoxia at different time points on Nogo and NgR1 expression in EPCs. Cells were collected after two, six and 24 hours of hyperoxia exposure. We can see upregulation of Nogo and NgR1 expression with a peak at 24 hours (**Figure 2**).

### Neutralization of Nogo-A Rescued the Angiogenic Activity of EPCs in Hyperoxic Condition

In order to determine the best dose of Nogo peptide antagonism, EPCs were treated *ex vivo* with 1 μM, 5 μM and 10 μM. The scratch migration assay (**Figure 3A**) shows that EPCs treated with a Nogo neutralizing peptide display a better migratory capacity dose dependently in hyperoxic conditions. From these observations, we chose 10 μM for the next experiments. EPCs from healthy normoxic rats were used for tube formation assay. For this test, EPCs were subjected or not to hyperoxia *ex-vivo* and treated or not with Nogo antagonist. **Figure 3B** shows that hyperoxia exposure lead to tubulogenesis impairment, and that can be rescued by the use of a neutralizing peptide against Nogo. In addition, the same test was done on EPCs extracted from OIR rats at P10 (**Figure 3C**) and the results show an increase of vasculogenesis when Nogo is inhibited. This result suggests that NOGO can potentially play an anti-angiogenic role on the functions of the EPCs.

### **Nogo-A Inhibition Promotes SDF-1 Expression in EPCs**

We next analyse the expression of different angiogenic factors in EPCs subjected to hyperoxia and treated or not with Nogo antagonism. Between VEGF, SDF-1, EPO, FGF-2, PDGF, TSP-1 and TNF- $\alpha$ , only the mobilizing factor SDF-1 showed a significant increase of its expression in EPCs treated with Nogo inhibitor and exposed in both normoxic and hyperoxic condition (**Figure 4**).

### **Supplementation of Nogo-A Signaling Promotes Retinal Revascularization of OIR Rats**

In order to analyse the impact of EPCs treated with Nogo peptide antagonism on retinal vasculature, we injected intraperitoneally in rat pups at P5 PBS in the first group, EPCs in the second and Nogo-treated EPCs in the third group and exposed rats to 80% oxygen up to P10. We sacrificed the rats at two-time points, either P8 and P10 and harvested their retinas. From there, the effects of treatments could be compared. The expression of EPCs markers such as CD34, CXCR4 and c-Kit was analysed in the retina by qRT-PCR (**Figure 5A**). The results show an increase of their expression in the Nogo-treated EPCs rats group suggesting possibly that the treatment led to an increase in the amount of EPCs in the retina. The effect of treatments was analyzed directly on retinal vasoobliteration by performing flat mount dissections on retinas of P10 OIR rats (**Figure 5B**). As can be seen, the central and peripheral avascularized regions decrease with EPCs treatment, but it is a little more marked by Nogo-treated EPCs treatment. Therefore, there is a therapeutic effect by injecting native EPCs or EPCs treated with Nogo inhibitor which could be seen by the improvement of retinal revascularization of OIR rats. Moreover, the expression of different pro-angiogenic factors such as VEGF, SDF-1, PDGF and EPO has been evaluated in the retinas of rats treated with EPCs reprogrammed or not (**Figure 6A**). It can be seen that Nogo-treated EPCs group shows a significant increase in the expression of these factors at P10. The expression of SDF-1 and VEGF is increased and can be confirmed again in **Figure 6B**. The results show that the supplementation of EPCs in the OIR rats generates an increase of pro-angiogenic factors.

### 3.5 Discussion

Neovascularization (NV) is a biological process requiring the participation of several cells types including endothelial cells, proangiogenic cells and endothelial progenitor cells. Several studies have shown the involvement of mobilized bone marrow cells, among others, endothelial progenitor cells (EPCs) which are also known as "late outgrowth EPC" and "endothelial colony forming cell". EPCs are now known to be mobilized to the site of ischemia where they can participate in vascular repair and NV. They participate mostly by directly integrating the blood vessel in order to participate in its formation but they also have secondary paracrine role which is secreting pro-angiogenic factors at the NV site. The main secreted angiogenic factors are VEGF, SDF, FGF, IGF, EPO, PDGF and Ang (106, 187). Despite their importance in NV, many studies have shown a decrease in the rate and function of EPCs in insufficient NV after ischemia. For example, studies have confirmed this phenomenon in ischemic diseases in presence of cardiovascular risk factors such as diabetes, dyslipidemia and aging (125, 129, 181, 188-190). The changes in number and functions of EPCs are correlated to enhanced oxidative stress which is possibly a result of systemic and localised inflammation. Therefore, it is especially diseases presenting oxidative stress and inflammation that show a reduction in the number of EPCs and their dysfunction (125, 130). Very interestingly, oxidative stress and inflammation are found in the pathophysiology of ROP as well, which is, as mentioned before, a proliferative disorder causing vascular degeneration in premature babies exposed to an excess of oxygen. However, the role of EPCs and the mechanisms involved in vascular degeneration during ROP are still poorly understood.

Knowing that EPCs have important functions in the angiogenic process, they could be a potential candidate for cell therapy to reduce the extent of ischemia and promote NV in the initial step of ROP. Indeed, treatments based on naïve or reprogrammed EPCs supplementation have reported many positive results to promote NV in diabetic retinopathy, cardiovascular disease, stroke and of hindlimb ischemia (179-182). In this study, we aimed to promote NV in the initial phase of ROP which is the vascular degeneration in order to attenuate the subsequent phase which is the excessive and pathological NV. Our results show that the dysfunction of EPCs subjected to hyperoxia

is associated with an increase of the expression of the Nogo-A protein. More specifically, our results show that EPCs subjected to hyperoxia lose their angiogenic functions, but they regain them when Nogo-A is inhibited. Nogo-A is a potential player in angiogenesis. According to studies, it acts mostly as a negative regulator of angiogenesis through RhoA pathway modulation by the interaction of Nogo- $\Delta$ 20 with S1PR2. As described before, their interaction shows a role in pathological angiogenesis like the one seen in ROP in the OIR model (163, 170, 191-193). We can notice that for the first time the role of Nogo-A has been investigated in EPCs, showing that a reduction in the expression of Nogo-A in EPCs leads to an improvement of their angiogenic activities *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo*. This can be seen by a decrease in retinal vasoobliteration in baby OIR rats.

Our results confirm the effectiveness of a treatment based on native-EPCs supplementation in OIR model to promote healthy retinal vascular development, but also a higher efficiency of a treatment of reprogrammed EPCs (Nogo-A suppressed). This agrees with numerous studies carried out on EPCs and the Nogo-A protein in the angiogenic process. In this study, we showed the unknown aspect of the role of Nogo-A in EPCs. In addition, inhibition shows an increase in the expression of factor SDF-1 in EPCs exposed to hyperoxia *in vitro*. This mobilizing factor has been widely documented for its important role in recruiting EPCs to injury sites so that they can participate in vascular repair. SDF-1 also promotes vascular permeability, activation, migration and proliferation of ECs leading to the formation of capillaries (115, 123, 124, 194). Moreover, our results show that the expression of SDF-1 is in part associated with the inhibition of Nogo-A. Nogo-A negatively regulates angiogenesis and according to our results, this protein decreases the expression of SDF-1 thus confirming its negative role in angiogenesis. The specific mechanisms involved in angiogenesis by Nogo-A require further study, but it has still been shown that it is through the RhoA pathway that Nogo-A exerts its role in angiogenesis. It is, among other things, the sequence of Nogo-A that binds to its specific receptor S1PR2 that causes the activation of this signaling pathway (170). The effector protein of the small GTPase RhoA is ROCK which, through the MYPT-1, LIMK and ERK1/2 pathways, causes vascular permeability, the migration and proliferation of ECs and the formation of capillaries (166, 170). Studies indicate that the RhoA pathway promotes angiogenesis, while others confirm the opposite (170, 180-182). In regard to Nogo, we do know that the Nogo-66 fragment binds to NgR1 and it is through activation of the RhoA pathway that

the actin cytoskeleton is destabilized. However, knowing that this same pathway is involved positively or negatively in angiogenesis, it represents a possible signaling to explain the downregulation of Nogo-A in angiogenesis (163, 170, 191-193). In conclusion, this study showed the efficacy of EPCs as cell therapy and improved efficacy of EPCs treatment in which Nogo-A is suppressed in OIR rats. This confirms the angiogenic power of EPCs and the involvement of Nogo-A in OIR model.

## 3.6 Acknowledgements

### Author Contributions

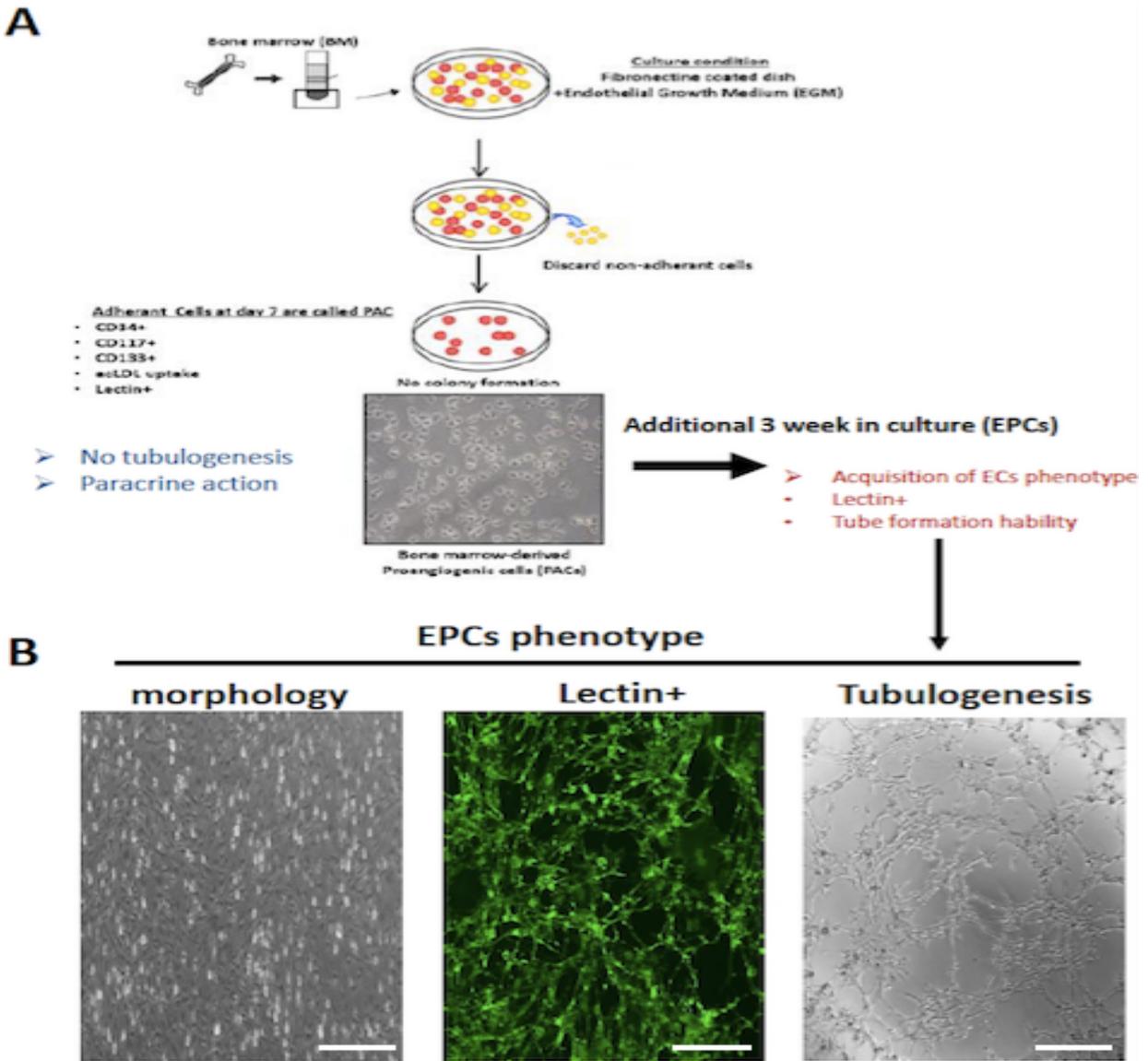
Conceived and designed the study: MD and SC. Wrote the initial draft of the manuscript and figures: PR. Revised the manuscript: MD and SC. Directed and planned the experiments: MD. Performed all the experiments: PR. Analysed the data: MD and PR. Provide expert advice: MD and SC.

### Authors

Ruknudin P, Desjarlais M and Chemtob S.

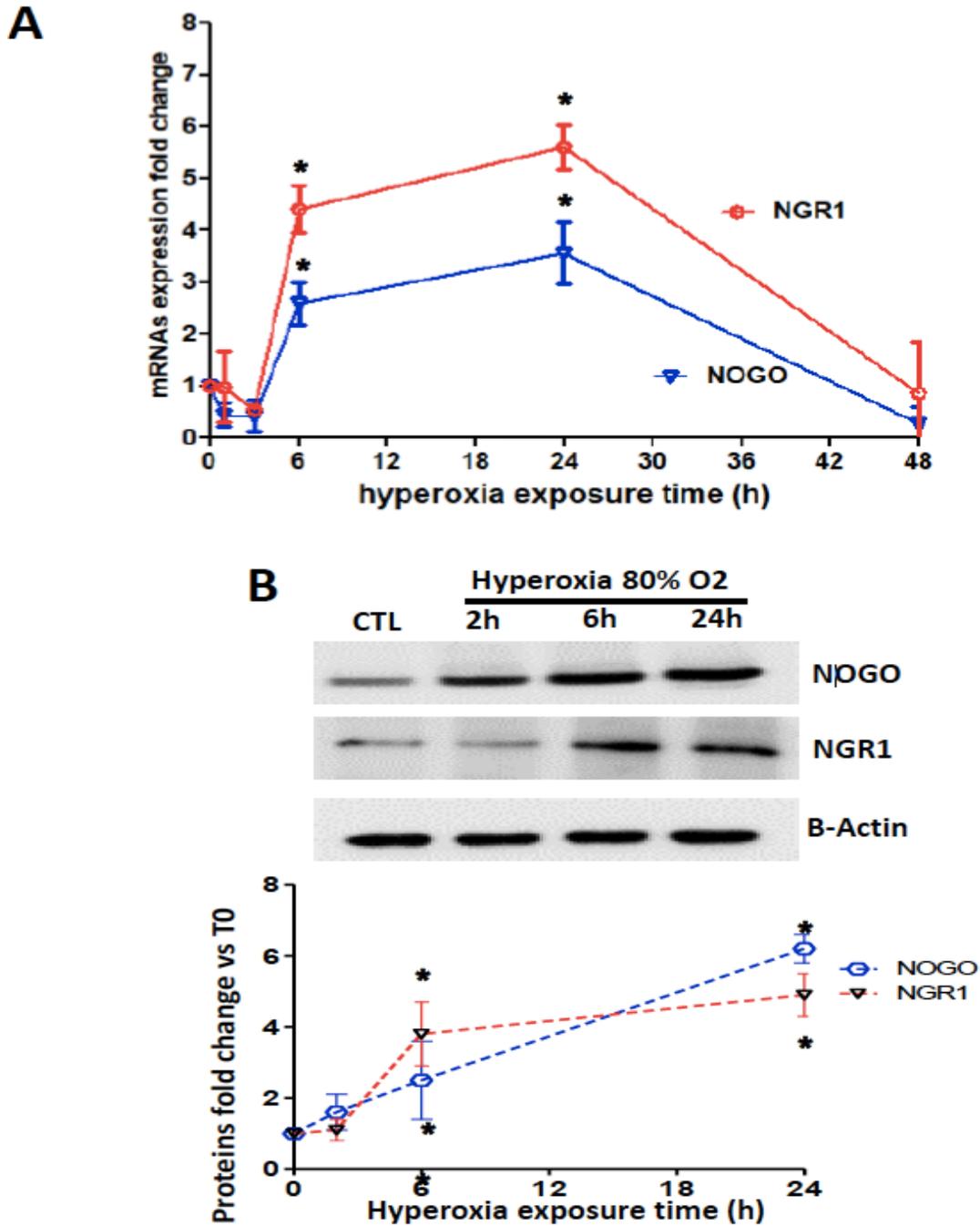
### 3.7 Figures

Figure 1



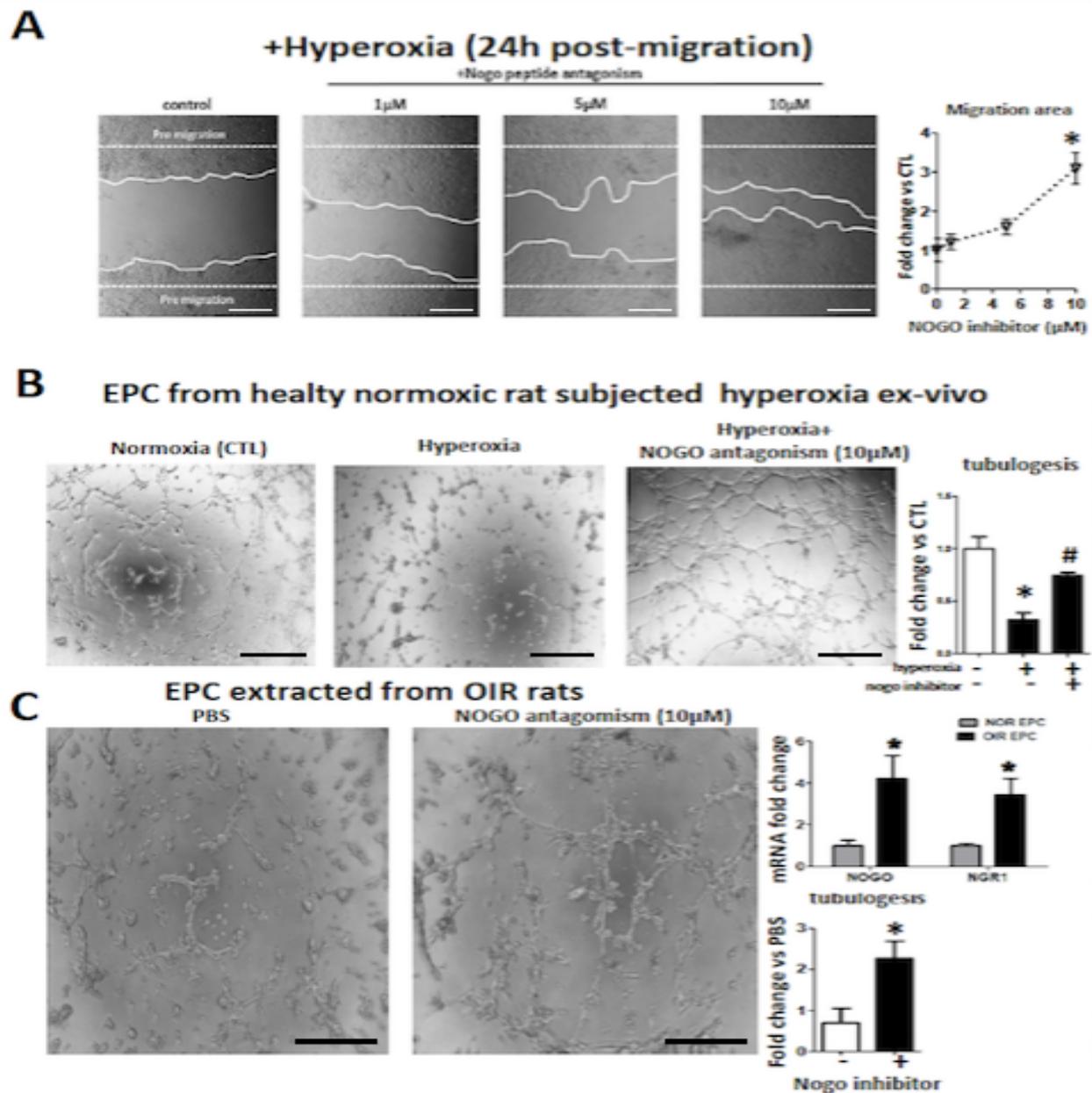
**Figure 1. Phenotype validation of BM-isolated EPC.** **A.** Illustration of EPCs isolation method from bone marrow. Mononuclear cells extracted from bone marrow were coated on a fibronectin matrix and after 3 weeks in culture, the adhered cells were EPCs. **B.** EPCs morphology is shown in the first picture. EPCs were stained with FITC-labeled lectin BS-1 (green). EPCs ability to promote angiogenesis in vitro (Matrigel assay) was evaluated in the last picture. Scale bars, 50  $\mu$ m. N=3-4 experiments.

Figure 2



**Figure 2. Hyperoxia-induced Nogo/NgR1 expression in EPCs. A and B.** mRNA and protein expression levels of Nogo and its receptor NgR1 in EPCs exposed to 80% oxygen at different time point (0h, 2h, 3h, 6h, 24h and 48h). Data are mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  vs normoxia (control). N=3-4 experiments.

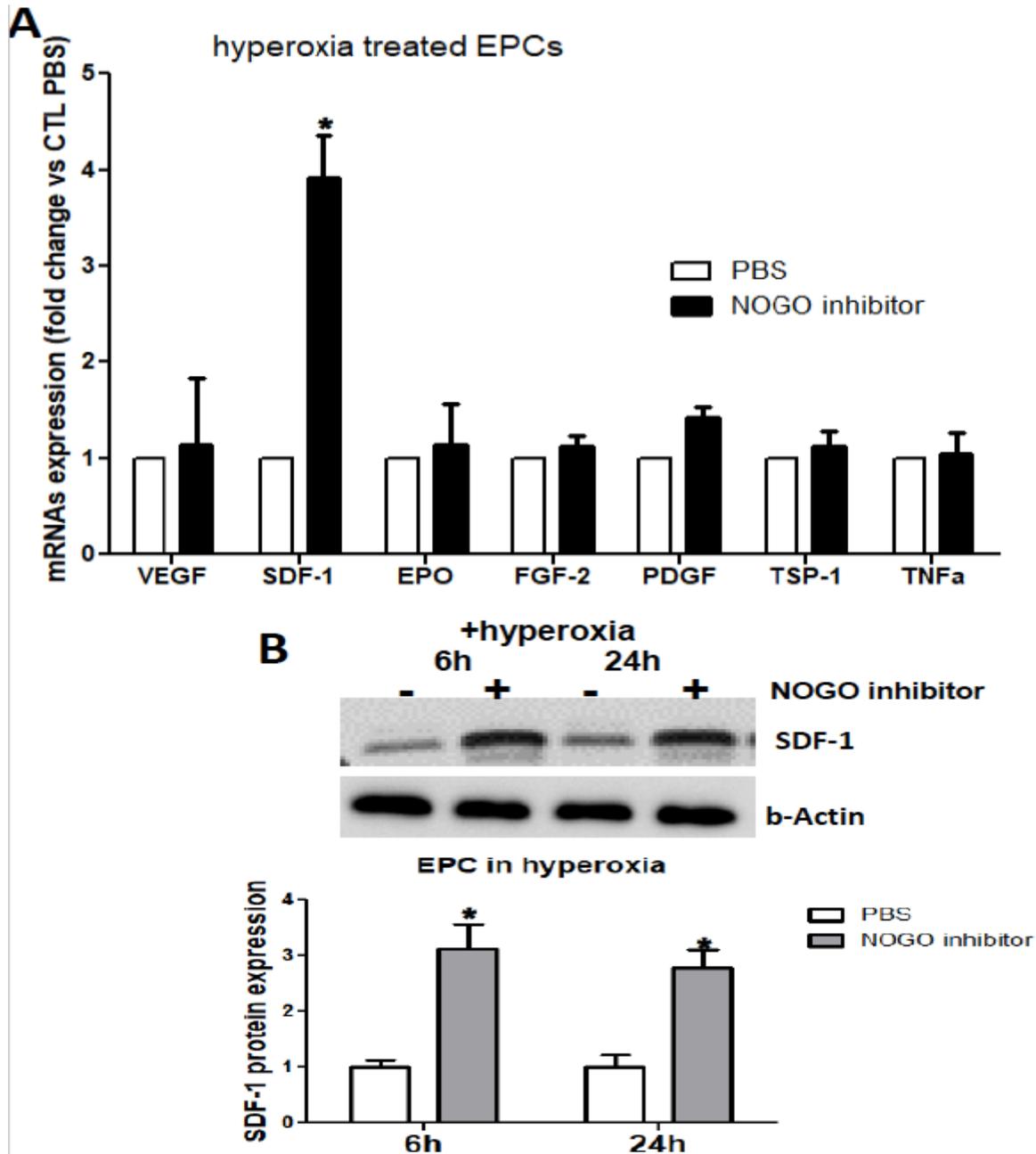
Figure 3



**Figure 3. Neutralization of Nogo rescued the angiogenic activity of EPC in hyperoxic condition.**

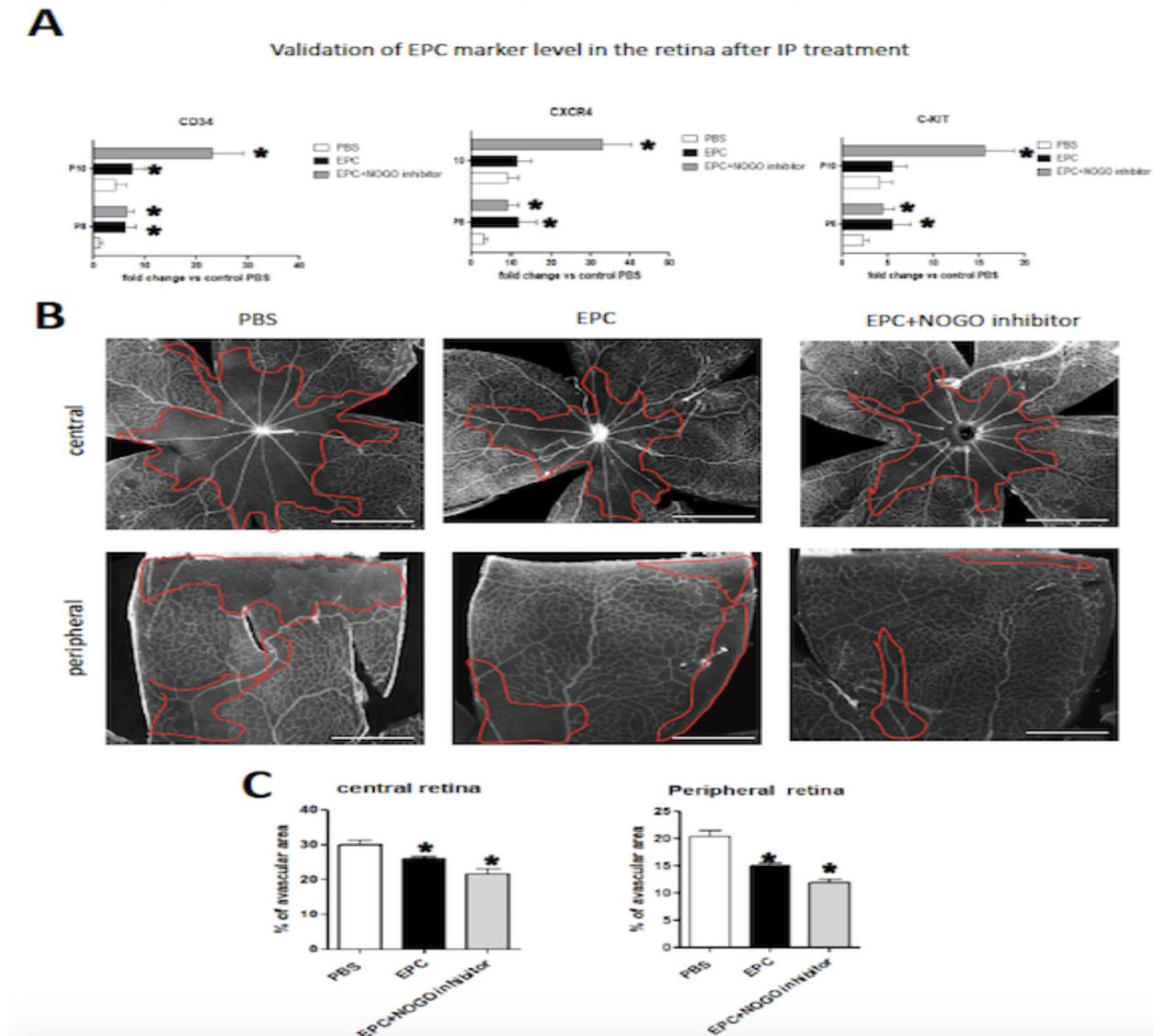
**A.** Scratch migration assays were performed on EPCs treated with different doses of Nogo neutralizing peptides exposed in hyperoxia for 24h. **B and C.** Angiogenesis tubules formation (Matrigel assay) of EPCs from healthy normoxic and OIR rats subjected or not to hyperoxia and treated with Nogo antagonism. Scale bars, 50  $\mu$ m. Data are mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  vs normoxia (control). # $p < 0.05$  vs hyperoxia. N=3-4 experiments.

Figure 4



**Figure 4. Nogo inhibition promotes SDF-1 expression in EPCs.** **A.** qRT-PCR analyses of angiogenic factors expression in EPCs treated or not with Nogo antagonism exposed to hyperoxia for 24h. **B.** Protein analyses of SDF-1 mobilisator factor in EPCs treated or not with Nogo antagonism and exposed to hyperoxia for 6h and 24h. Data are mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  vs PBS (control). N=3-4 experiments.

Figure 5

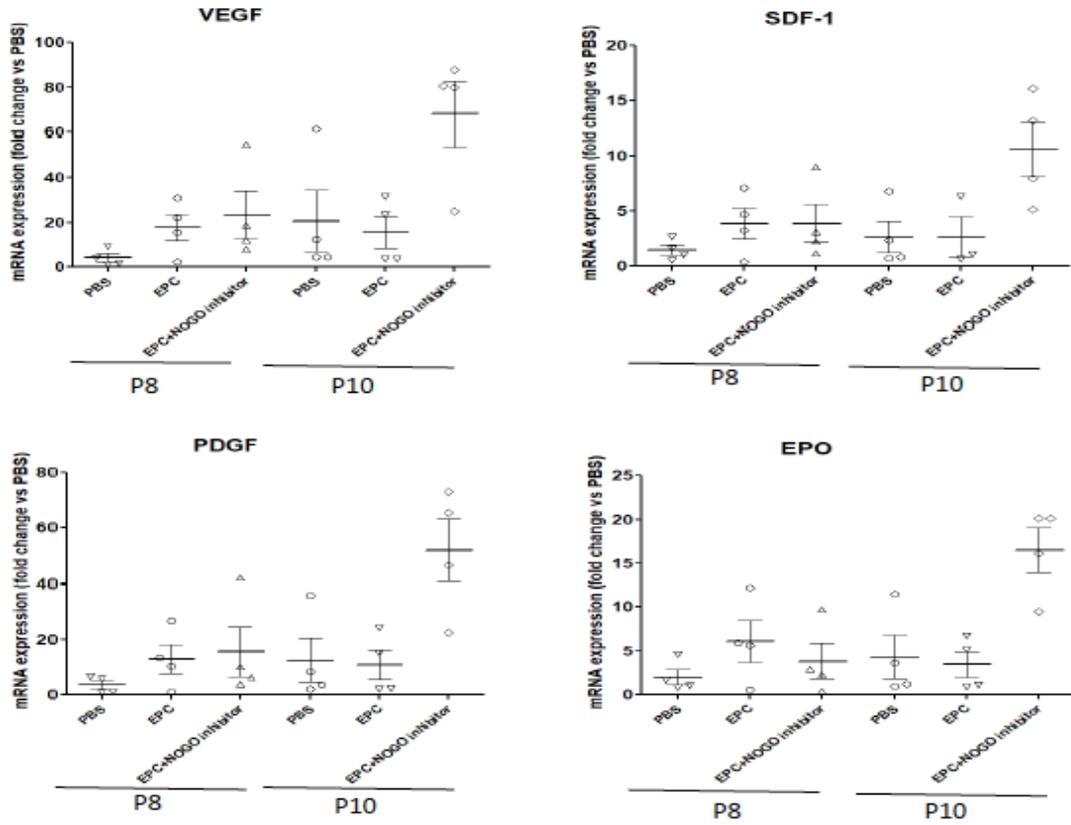


**Figure 5. Effects of supplementation of native or Nogo-/- EPC in retinal vasculature of OIR rats.**

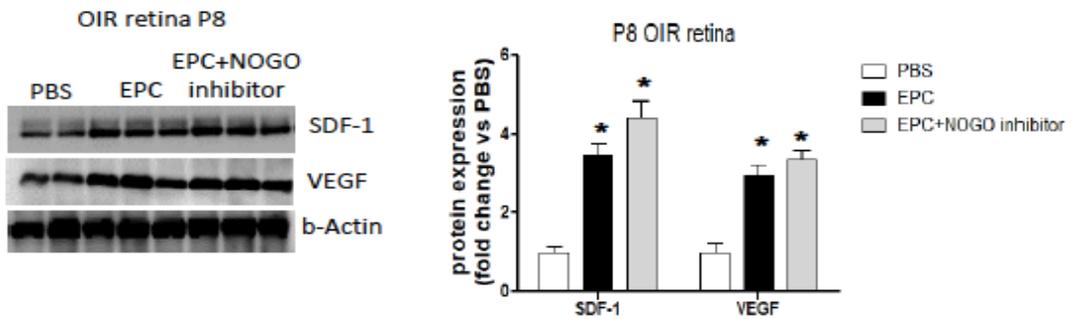
**A.** qRT-PCR analyses of EPCs marker levels in the retina of OIR rats treated with an intraperitoneally injection of 50  $\mu$ l of 200 000 native EPCs or Nogo-treated EPCs at P5. PBS was injected in control rats. The marker's expressions are compared at P8 and P10. **B and C.** Representative flat mount pictures and quantitative analysis of central and peripheral retinal vasoobliteration in OIR rats treated or not with native or reprogrammed EPCs. Scale bars, 500  $\mu$ m. Data were mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  vs PBS (control). N=4 retinas/group for qRT-PCR and 6 retinas for flat mounts.

Figure 6

**A**



**B**



**Figure 6. Retinal level of angiogenic factor in OIR rats treated with native or Nogo<sup>-/-</sup> EPCs. A.** qRT-PCR analyses of angiogenic factors in OIR rats treated intraperitoneally with PBS or native EPCs or reprogrammed EPCs at P8 and P10. **B.** Protein analyses of SDF-1 and VEGF angiogenic factors in OIR retinas at P8 in the three groups of rats. Data were mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  vs PBS (control). N=4 retinas/group for qRT-PCR and western blot.

## Chapitre 4 – Discussion

L'objectif global de ce mémoire était d'évaluer l'interrelation entre les fonctions des EPC et la signalisation Nogo/NgR1 en condition OIR dans le but de trouver de nouvelles pistes thérapeutiques pour améliorer la réparation vasculaire. Pour se faire, nous avons évalué l'effet de l'hyperoxie sur la fonction des EPCs dérivées de la moelle osseuse *in vitro* et aussi sur la voie de signalisation Nogo-A/NgR1 chez ces mêmes cellules et nous avons fini par évaluer l'efficacité thérapeutique d'un traitement d'EPCs natives ou Nogo -/- sur l'atténuation de la VO dans le modèle OIR. Dans l'ensemble, les résultats de cette étude suggèrent que le ciblage de Nogo-A protège l'activité angiogénique des EPCs contre l'hyperoxie dans l'OIR et pourrait être une nouvelle cible potentielle pour l'intégrité vasculaire dans les rétinopathies ischémiques. Nous pouvons en faire l'analyse détaillée dans les sections suivantes.

### 4.1 Impact thérapeutique des EPCs dans la revascularisation rétinienne pathologique des bébés prématurés

Nous avons d'abord caractérisé le phénotype des EPCs afin de confirmer leur identité pour le reste des expériences. Les EPCs ont plusieurs marqueurs cellulaires spécifiques soit hématopoïétiques ou endothéliaux. Elles sont positives pour les marqueurs hématopoïétiques tels que c-Kit, Sca-1, CD34 et CD133, et endothéliaux tels que VEGFR2, CD31 et la lectine. Les EPCs ont une capacité de proliférer, de former des tubules *in vitro*, de participer à la formation de vaisseaux *in vivo* et de favoriser la mobilisation au site ischémique. Elles sont aussi capables d'une activité paracrine pro-angiogénique, mais elle n'est pas aussi prononcée que les « early » EPCs, aussi connues sous le nom de PACs. De plus, elles peuvent adhérer à la fibronectine et internaliser les LDL diacétylés. Dans le but d'identifier et de caractériser les EPCs, nous les avons d'abord extraites de la moelle osseuse de rats et les avons cultivés *ex vivo*. Nos résultats de la **Figure 1** démontrent que les cellules mononuclées récoltées de la moelle osseuse possèdent les caractéristiques des

EPCs, car elles sont positives pour la lectine, sont capables de tubulogénèse et ont une morphologie similaire aux ECs. Nous avons ensuite évalué l'impact thérapeutique de ces cellules dans la revascularisation rétinienne chez les bébés rats P10 contrôles et OIR *in vivo*. Nous avons d'abord injecté des EPCs par deux voies d'administration, soit la voie intrapéritonéale et intravitréenne. Cela nous a permis de comparer les effets de chaque type d'injection et de choisir celui qui procure le meilleur effet. C'est alors que les résultats révélés par une injection péritonéale montraient un effet supérieur en général chez le modèle OIR. Cela pourrait peut-être s'expliquer par une meilleure distribution uniforme du traitement à la rétine, alors qu'il se pourrait que par voie intravitréenne, les cellules ne puissent pas se distribuer uniformément. Nous avons donc, par la suite, traité nos trois groupes (contrôle, EPCs natives, EPCs reprogrammées) par voie intrapéritonéale. Les résultats suggèrent qu'il y a bel et bien un impact positif sur la vasculature rétinienne lorsqu'elles sont injectées par voie intrapéritonéale. En effet, les montages à plat rétiniens des bébés rats P10 de la **Figure 5** montrent que la région vasooblitérée est significativement diminuée confirmant donc le rôle pro-angiogénique des EPCs. De plus, les résultats montrent, également, une augmentation de l'expression des marqueurs retrouvés chez les EPCs tels que CD34, CXCR4 et c-KIT. Plusieurs études confirment les effets positifs sur la NV et l'ischémie tissulaire des EPCs par une thérapie cellulaire. Entre autres, sur la rétinopathie diabétique, les accidents vasculaires cérébraux et l'ischémie des membres postérieurs (179-182). Le rôle des EPCs reste davantage à être investigué en recherche clinique, mais notre étude et les nombreuses précédentes suggèrent tout de même un certain potentiel d'une utilisation future de ces cellules comme une thérapie cellulaire pour la ROP.

## **4.2 Les voies de signalisation Nogo dépendantes et sous-jacentes : un rôle potentiel dans l'inhibition angiogénique**

La protéine Nogo-A a été la plus étudiée parmi ses isoformes (Nogo-B et Nogo-C). Elle est surtout connue pour son rôle inhibiteur dans la croissance des neurites et dans la régénération exercée

par la myéline (155). De plus, Nogo-A joue également un rôle dans le développement du système visuel. Plus précisément dans la myélinogenèse nerveuse optique, la formation et la maturation des axones rétiniens et l'angiogenèse rétinienne (167). Aujourd'hui, nombreuses sont les études à avoir montré ses propriétés anti-angiogéniques et c'est donc pour cela que nous avons évalué son rôle anti-angiogénique chez les EPCs *in vitro* et *in vivo* (170-172). Nos résultats montrent une augmentation de l'expression de Nogo-A et NgR1 chez les EPCs extraites de la moelle osseuse soumises à l'hyperoxie *ex vivo* et chez les EPCs extraites des rats OIR. Nous pouvons également observer que cette augmentation de l'expression corrèle avec la dysfonction angiogénique des EPCs, c'est-à-dire leur capacité migratoire et de tubulogenèse. Cela suggère possiblement que Nogo-A a un effet négatif sur la fonction des EPCs. C'est ainsi que nous avons voulu investiguer le rôle anti-angiogénique de Nogo-A sur la fonction des EPCs. Nous avons utilisé un peptide neutralisant afin d'inhiber le fragment Nogo-66 de Nogo-A chez les EPCs *in vivo*. Les résultats montrent que l'inhibition de l'interaction de la protéine avec son récepteur NgR1 permet aux EPCs de récupérer leurs capacités angiogéniques soit celles de migrer et de former des tubules. Par ailleurs, nous observons que les fonctions des EPCs sont récupérées en condition hyperoxique lorsque Nogo-A est inhibée, suggérant donc un effet protecteur des fonctions des EPCs contre l'hyperoxie. Une étude montre que la neutralisation de Nogo-A augmente la densité des vaisseaux sanguins et le nombre de tip cells qui sont des ECs spécialisées dans le cerveau postnatal et elle montre aussi une inhibition de l'adhésion et de la propagation des ECs vasculaires cérébrales (170). Les études rapportent le fragment  $\Delta 20$  de la protéine Nogo-A pour les actions inhibitrices dans le processus angiogénique, et ce en liant le récepteur S1PR2. Leur liaison active la voie de signalisation RhoA qui est impliquée dans l'angiogenèse. Des études stipulent que la voie RhoA favorise l'angiogenèse, alors que d'autres confirment l'inverse (170, 195-197). Ceci étant dit, nous savons que le fragment Nogo-66 se lie à NgR1 et c'est par l'activation de la voie RhoA que le cytosquelette d'actine est déstabilisé. Cependant, sachant que cette même voie est impliquée de manière positive ou négative dans l'angiogenèse, elle représente une signalisation possible pour expliquer la régulation négative de Nogo-A dans l'angiogenèse. Nos résultats confirment son impact négatif sur l'angiogenèse chez les EPCs (163, 170, 191-193). De façon intéressante, l'inhibition de Nogo-A est associée à une induction de l'expression du facteur angiogénique et mobilisateur d'EPCs qui

est SDF-1. Ceci suggère que NgR1 régule négativement l'expression de SDF-1. Cette chimiokine est connue pour jouer un rôle important dans la mobilisation des EPCs de la moelle osseuse et dans leur migration jusqu'aux sites ischémiques. Grâce à leur haute concentration en cas d'ischémie et d'inflammation, SDF-1 attire les EPCs aux sites de NV en créant un gradient de concentration. Ceci se fait en activant la voie PI3K/AKT/eNos (115, 123, 124). De plus, une hypothèse pourrait possiblement expliquer l'augmentation de la concentration de SDF-1, afin d'attirer les EPCs et ce serait par un mécanisme autocrine exercé par les EPCs. Alors, en plus de sécréter SDF-1, ce dernier pourrait activer ses récepteurs à la surface des EPCs. Ceci enclencherait leur activation et leur production. Sachant que SDF-1 joue un rôle crucial dans l'activité angiogénique des EPCs, l'augmentation de son expression lorsque Nogo-A est inhibée concorde avec la récupération des fonctions angiogéniques des EPCs lorsque cette même protéine est inhibée. Les résultats suggèrent donc que la signalisation de Nogo-A et de son récepteur NgR1 est interreliée à l'augmentation de l'expression de SDF-1. Toutefois, cette relation entre Nogo-A et SDF-1 n'a pas encore fait l'objet des études, mais serait une piste intéressante à prendre afin de connaître davantage les rôles de Nogo-A dans la NV comme celle rencontrée dans la ROP.

### **4.3 Potentiel et perspective de la thérapie basée sur des EPCs conditionnées**

Finalement, nous avons voulu évaluer l'effet d'une thérapie cellulaire basée sur des EPCs conditionnées (Nogo neutralisée). Les EPCs extraites de la moelle osseuse ont été traitées avec un peptide neutralisant de Nogo-A pour ensuite être injectées par voie péritonéale chez les bébés rats OIR à P5. Nous avons injecté une seule dose de 50  $\mu$ l contenant 200 000 EPCs natives ou reprogrammés à P5 pour traiter lors de la dégénération vasculaire qui constitue la phase initiale de la ROP. L'analyse immunohistochimique de la rétine montre une diminution significative de la VO rétinienne centrale et périphérique comparée aux rats contrôles OIR. L'effet est plus prononcé que celle engendrée par le traitement d'EPCs natives. Ceci suggère que le traitement avec des

EPCs reprogrammées est plus efficace que celui avec des EPCs natives confirmant donc, encore une fois, l'important rôle de Nogo-A dans la régulation négative de l'angiogenèse. En outre, on observe encore une augmentation de l'expression du facteur SDF-1 chez les rats OIR traités avec des EPCs conditionnées. Cette même observation *in vivo* confirme nos résultats précédents *in vitro*. En plus du SDF-1, on observe, dans la rétine des rats de ce même groupe, une augmentation de l'expression d'autres facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF, PDGF et EPO. Ceci peut être simplement dû au contenu intracellulaire des EPCs se rendant à la rétine qui inclut les facteurs pro-angiogéniques. Sachant que les EPCs sécrètent des facteurs pro-angiogéniques grâce à leur activité paracrine, il est aussi possible que ce soit le résultat des sécrétions des EPCs injectées qui se rendent à la rétine chez les rats. Nos résultats pourraient peut-être suggérer une possible activité paracrine pro-angiogénique des EPCs.

## Chapitre 5 – Conclusions et perspectives

L'importance des EPCs dans la réparation vasculaire et la NV est aujourd'hui évidente. C'est pourquoi il est fort intéressant de les étudier dans une condition de ROP. Notre première hypothèse qui suggérait une amélioration des EPCs dans la RV rétinienne chez le rat OIR a pu être validée par nos résultats. De même que la deuxième hypothèse qui suggérait une inhibition de l'activité biologique des EPCs par Nogo-A chez le rat OIR et qu'une inhibition de Nogo-A protégerait et améliorerait l'efficacité angiogénique des EPCs a pu être validée. Sommairement, nous pouvons conclure que l'hyperoxie cause une dysfonction angiogénique des EPCs extraites de la moelle osseuse, et ce en induisant Nogo-A ce qui contribue à la VO rétinienne chez les bébés rats prématurés OIR et qu'une supplémentation d'EPCs conditionnées (Nogo-A inhibée ou non) est plus efficace qu'une supplémentation d'EPCs natives pour améliorer la réparation vasculaire rétinienne. À la lumière de nos résultats et des études précédentes, le rôle de régulateur négatif de l'angiogenèse de Nogo-A a encore été confirmé et cette protéine représente une cible potentielle pour la préservation de l'activité biologique des EPCs et de l'intégrité vasculaire chez les rats OIR. Davantage de recherches sont requises afin d'utiliser non seulement les EPCs comme thérapie cellulaire, mais également une thérapie d'EPCs reprogrammées par l'inhibition de Nogo-A chez les nourrissons prématurés atteints de ROP.

## Références bibliographiques

1. Institute NE. Retinopathy of Prematurity 2019, July 10 [Available from: <https://www.nei.nih.gov/learn-about-eye-health/eye-conditions-and-diseases/retinopathy-prematurity>].
2. Hellstrom A, Smith LE, Dammann O. Retinopathy of prematurity. *Lancet*. 2013;382(9902):1445-57.
3. Zin A, Gole GA. Retinopathy of prematurity-incidence today. *Clin Perinatol*. 2013;40(2):185-200.
4. Lad EM, Hernandez-Boussard T, Morton JM, Moshfeghi DM. Incidence of retinopathy of prematurity in the United States: 1997 through 2005. *Am J Ophthalmol*. 2009;148(3):451-8.
5. Network TCN. Annual Report 2019 2019 [Available from: [http://www.canadianneonatalnetwork.org/portal/Portals/0/Annual Reports/2019 CNN report final links.pdf](http://www.canadianneonatalnetwork.org/portal/Portals/0/Annual%20Reports/2019%20CNN%20report%20final%20links.pdf)].
6. Gonski S, Hupp SR, Cotten CM, Clark RH, Laughon M, Watt K, et al. Risk of development of treated retinopathy of prematurity in very low birth weight infants. *J Perinatol*. 2019;39(11):1562-8.
7. Mantagos IS, Vanderveen DK, Smith LE. Emerging treatments for retinopathy of prematurity. *Semin Ophthalmol*. 2009;24(2):82-6.
8. Shah PK, Prabhu V, Karandikar SS, Ranjan R, Narendran V, Kalpana N. Retinopathy of prematurity: Past, present and future. *World J Clin Pediatr*. 2016;5(1):35-46.
9. Sun Y, Smith LEH. Retinal Vasculature in Development and Diseases. *Annu Rev Vis Sci*. 2018;4:101-22.
10. Stahl A, Connor KM, Sapielha P, Chen J, Dennison RJ, Krah NM, et al. The mouse retina as an angiogenesis model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51(6):2813-26.
11. Gariano RF. Cellular mechanisms in retinal vascular development. *Prog Retin Eye Res*. 2003;22(3):295-306.
12. Hartnett ME. Pathophysiology and mechanisms of severe retinopathy of prematurity. *Ophthalmology*. 2015;122(1):200-10.
13. Smith LE. Pathogenesis of retinopathy of prematurity. *Semin Neonatol*. 2003;8(6):469-73.
14. Hartnett ME, Lane RH. Effects of oxygen on the development and severity of retinopathy of prematurity. *J AAPOS*. 2013;17(3):229-34.
15. Cavallaro G, Filippi L, Bagnoli P, La Marca G, Cristofori G, Raffaeli G, et al. The pathophysiology of retinopathy of prematurity: an update of previous and recent knowledge. *Acta Ophthalmol*. 2014;92(1):2-20.
16. Zhou TE, Rivera JC, Bhosle VK, Lahaie I, Shao Z, Tahiri H, et al. Choroidal Involution Is Associated with a Progressive Degeneration of the Outer Retinal Function in a Model of Retinopathy of Prematurity: Early Role for IL-1 $\beta$ . *Am J Pathol*. 2016;186(12):3100-16.
17. Anderson MF, Ramasamy B, Lythgoe DT, Clark D. Choroidal thickness in regressed retinopathy of prematurity. *Eye (Lond)*. 2014;28(12):1461-8.
18. Romagnoli C. Risk factors and growth factors in ROP. *Early Hum Dev*. 2009;85(10 Suppl):S79-82.

19. Chen J, Smith LE. Retinopathy of prematurity. *Angiogenesis*. 2007;10(2):133-40.
20. Ajayi OA, Raval D, Lucheese N, Pildes RS. Ophthalmological morbidity in very-low-birthweight infants with bronchopulmonary dysplasia. *J Natl Med Assoc*. 1997;89(10):679-83.
21. Pournaras CJ, Rungger-Brandle E, Riva CE, Hardarson SH, Stefansson E. Regulation of retinal blood flow in health and disease. *Prog Retin Eye Res*. 2008;27(3):284-330.
22. Riva CE, Grunwald JE, Petrig BL. Autoregulation of human retinal blood flow. An investigation with laser Doppler velocimetry. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1986;27(12):1706-12.
23. Hardy P, Nuyt AM, Abran D, St-Louis J, Varma DR, Chemtob S. Nitric oxide in retinal and choroidal blood flow autoregulation in newborn pigs: interactions with prostaglandins. *Pediatr Res*. 1996;39(3):487-93.
24. Hardy P, Dumont I, Bhattacharya M, Hou X, Lachapelle P, Varma DR, et al. Oxidants, nitric oxide and prostanoids in the developing ocular vasculature: a basis for ischemic retinopathy. *Cardiovasc Res*. 2000;47(3):489-509.
25. Leduc M, Kermorvant-Duchemin E, Checchin D, Sennlaub F, Chemtob S. [Hypercapnia- and trans-arachidonic acid-induced retinal microvascular degeneration: implications in the genesis of retinopathy of prematurity]. *Med Sci (Paris)*. 2007;23(11):939-43.
26. Checchin D, Hou X, Hardy P, Abran D, Najarian T, Beauchamp MH, et al. PGE(2)-mediated eNOS induction in prolonged hypercapnia. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43(5):1558-66.
27. Ogawa N, Mori A, Hasebe M, Hoshino M, Saito M, Sakamoto K, et al. Nitric oxide dilates rat retinal blood vessels by cyclooxygenase-dependent mechanisms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009;297(4):R968-77.
28. Kermorvant-Duchemin E, Sennlaub F, Behar-Cohen F, Chemtob S. [Epidemiology and pathophysiology of retinopathy of prematurity]. *Arch Pediatr*. 2011;18 Suppl 2:S79-85.
29. Schippers JH, Nguyen HM, Lu D, Schmidt R, Mueller-Roeber B. ROS homeostasis during development: an evolutionary conserved strategy. *Cell Mol Life Sci*. 2012;69(19):3245-57.
30. Osborne NN, Casson RJ, Wood JP, Chidlow G, Graham M, Melena J. Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Prog Retin Eye Res*. 2004;23(1):91-147.
31. Muliylil S, Narasimha M. Mitochondrial ROS regulates cytoskeletal and mitochondrial remodeling to tune cell and tissue dynamics in a model for wound healing. *Dev Cell*. 2014;28(3):239-52.
32. Chemtob S, Hardy P, Abran D, Li DY, Peri K, Cuzzani O, et al. Peroxide-cyclooxygenase interactions in postasphyxial changes in retinal and choroidal hemodynamics. *J Appl Physiol (1985)*. 1995;78(6):2039-46.
33. Beauchamp MH, Marrache AM, Hou X, Gobeil F, Jr., Bernier SG, Lachapelle P, et al. Platelet-activating factor in vasoobliteration of oxygen-induced retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43(10):3327-37.
34. Beauchamp MH, Martinez-Bermudez AK, Gobeil F, Jr., Marrache AM, Hou X, Speranza G, et al. Role of thromboxane in retinal microvascular degeneration in oxygen-induced retinopathy. *J Appl Physiol (1985)*. 2001;90(6):2279-88.
35. Wang H, Zhang SX, Hartnett ME. Signaling pathways triggered by oxidative stress that mediate features of severe retinopathy of prematurity. *JAMA Ophthalmol*. 2013;131(1):80-5.

36. Kaur C, Sivakumar V, Foulds WS, Luu CD, Ling EA. Cellular and vascular changes in the retina of neonatal rats after an acute exposure to hypoxia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50(11):5364-74.
37. Shibuki H, Katai N, Yodoi J, Uchida K, Yoshimura N. Lipid peroxidation and peroxynitrite in retinal ischemia-reperfusion injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41(11):3607-14.
38. Lee J, Dammann O. Perinatal infection, inflammation, and retinopathy of prematurity. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2012;17(1):26-9.
39. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature.* 2008;454(7203):428-35.
40. Malaeb S, Dammann O. Fetal inflammatory response and brain injury in the preterm newborn. *J Child Neurol.* 2009;24(9):1119-26.
41. Fichorova RN, Beatty N, Sassi RR, Yamamoto HS, Allred EN, Leviton A, et al. Systemic inflammation in the extremely low gestational age newborn following maternal genitourinary infections. *Am J Reprod Immunol.* 2015;73(2):162-74.
42. Tolsma KW, Allred EN, Chen ML, Duker J, Leviton A, Dammann O. Neonatal bacteremia and retinopathy of prematurity: the ELGAN study. *Arch Ophthalmol.* 2011;129(12):1555-63.
43. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med.* 1999;340(6):448-54.
44. Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med.* 2006;354(6):610-21.
45. Sivakumar V, Foulds WS, Luu CD, Ling EA, Kaur C. Retinal ganglion cell death is induced by microglia derived pro-inflammatory cytokines in the hypoxic neonatal retina. *J Pathol.* 2011;224(2):245-60.
46. Rivera JC, Sitaras N, Noueihed B, Hamel D, Madaan A, Zhou T, et al. Microglia and interleukin-1 $\beta$  in ischemic retinopathy elicit microvascular degeneration through neuronal semaphorin-3A. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(8):1881-91.
47. Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest.* 2000;117(4):1162-72.
48. Dace DS, Khan AA, Kelly J, Apte RS. Interleukin-10 promotes pathological angiogenesis by regulating macrophage response to hypoxia during development. *PLoS One.* 2008;3(10):e3381.
49. Dördelmann M, Kerk J, Dressler F, Brinkhaus MJ, Bartels DB, Dammann CE, et al. Interleukin-10 high producer allele and ultrasound-defined periventricular white matter abnormalities in preterm infants: a preliminary study. *Neuropediatrics.* 2006;37(3):130-6.
50. Woo SJ, Park KH, Lee SY, Ahn SJ, Ahn J, Park KH, et al. The relationship between cord blood cytokine levels and perinatal factors and retinopathy of prematurity: a gestational age-matched case-control study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54(5):3434-9.
51. Raman D, Sobolik-Delmaire T, Richmond A. Chemokines in health and disease. *Exp Cell Res.* 2011;317(5):575-89.
52. Sood BG, Madan A, Saha S, Schendel D, Thorsen P, Skogstrand K, et al. Perinatal systemic inflammatory response syndrome and retinopathy of prematurity. *Pediatr Res.* 2010;67(4):394-400.
53. Ghasemi H, Ghazanfari T, Yaraee R, Faghihzadeh S, Hassan ZM. Roles of IL-8 in ocular inflammations: a review. *Ocul Immunol Inflamm.* 2011;19(6):401-12.

54. Silveira RC, Fortes Filho JB, Procianoy RS. Assessment of the contribution of cytokine plasma levels to detect retinopathy of prematurity in very low birth weight infants. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(3):1297-301.
55. Powers MR, Davies MH, Eubanks JP. Increased expression of chemokine KC, an interleukin-8 homologue, in a model of oxygen-induced retinopathy. *Curr Eye Res.* 2005;30(4):299-307.
56. Harrington JR. The role of MCP-1 in atherosclerosis. *Stem Cells.* 2000;18(1):65-6.
57. Yao Y, Tsirka SE. Monocyte chemoattractant protein-1 and the blood-brain barrier. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71(4):683-97.
58. Yu H, Yuan L, Zou Y, Peng L, Wang Y, Li T, et al. Serum concentrations of cytokines in infants with retinopathy of prematurity. *APMIS.* 2014;122(9):818-23.
59. Yoshimura T, Sonoda KH, Sugahara M, Mochizuki Y, Enaida H, Oshima Y, et al. Comprehensive analysis of inflammatory immune mediators in vitreoretinal diseases. *PLoS One.* 2009;4(12):e8158.
60. Yoshida S, Yoshida A, Ishibashi T, Elnor SG, Elnor VM. Role of MCP-1 and MIP-1alpha in retinal neovascularization during postischemic inflammation in a mouse model of retinal neovascularization. *J Leukoc Biol.* 2003;73(1):137-44.
61. Sato T, Kusaka S, Shimojo H, Fujikado T. Simultaneous analyses of vitreous levels of 27 cytokines in eyes with retinopathy of prematurity. *Ophthalmology.* 2009;116(11):2165-9.
62. Mikolajczyk TP, Nosalski R, Szczepaniak P, Budzyn K, Osmenda G, Skiba D, et al. Role of chemokine RANTES in the regulation of perivascular inflammation, T-cell accumulation, and vascular dysfunction in hypertension. *FASEB J.* 2016;30(5):1987-99.
63. Nicoara SD, Cristian C, Irimescu I, Stefanut AC, Zaharie G. Diode laser photocoagulation for retinopathy of prematurity: outcomes after 7 years of treatment. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus.* 2014;51(1):39-45.
64. Multicenter trial of cryotherapy for retinopathy of prematurity: preliminary results. Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group. *Pediatrics.* 1988;81(5):697-706.
65. Roohipoor R, Karkhaneh R, Riazi-Esfahani M, Ghasemi F, Nili-Ahmadabadi M. Surgical management in advanced stages of retinopathy of prematurity; our experience. *J Ophthalmic Vis Res.* 2009;4(3):185-90.
66. Trese MT. Scleral buckling for retinopathy of prematurity. *Ophthalmology.* 1994;101(1):23-6.
67. Mintz-Hittner HA, Kennedy KA, Chuang AZ, Group B-RC. Efficacy of intravitreal bevacizumab for stage 3+ retinopathy of prematurity. *N Engl J Med.* 2011;364(7):603-15.
68. Hu J, Blair MP, Shapiro MJ, Lichtenstein SJ, Galasso JM, Kapur R. Reactivation of retinopathy of prematurity after bevacizumab injection. *Arch Ophthalmol.* 2012;130(8):1000-6.
69. Cao Y, Hong A, Schulten H, Post MJ. Update on therapeutic neovascularization. *Cardiovasc Res.* 2005;65(3):639-48.
70. Furuya M, Nishiyama M, Kasuya Y, Kimura S, Ishikura H. Pathophysiology of tumor neovascularization. *Vasc Health Risk Manag.* 2005;1(4):277-90.
71. Silvestre JS, Smadja DM, Levy BI. Postischemic revascularization: from cellular and molecular mechanisms to clinical applications. *Physiol Rev.* 2013;93(4):1743-802.
72. Papetti M, Herman IM. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002;282(5):C947-70.

73. Tongers J, Roncalli JG, Losordo DW. Role of endothelial progenitor cells during ischemia-induced vasculogenesis and collateral formation. *Microvasc Res.* 2010;79(3):200-6.
74. Asahara T, Kawamoto A. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;287(3):C572-9.
75. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(6):401-10.
76. Deveza L, Choi J, Yang F. Therapeutic angiogenesis for treating cardiovascular diseases. *Theranostics.* 2012;2(8):801-14.
77. Ribatti D, Crivellato E. "Sprouting angiogenesis", a reappraisal. *Dev Biol.* 2012;372(2):157-65.
78. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature.* 2011;473(7347):298-307.
79. Cooke JP, Losordo DW. Nitric oxide and angiogenesis. *Circulation.* 2002;105(18):2133-5.
80. Betz C, Lenard A, Belting HG, Affolter M. Cell behaviors and dynamics during angiogenesis. *Development.* 2016;143(13):2249-60.
81. Wietecha MS, Cerny WL, DiPietro LA. Mechanisms of vessel regression: toward an understanding of the resolution of angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2013;367:3-32.
82. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell.* 2011;146(6):873-87.
83. Treppe L, Gavard J. [Tumor angiogenesis: when the Tree of Life turns bad]. *Med Sci (Paris).* 2015;31(11):989-95.
84. Massimo Mariotti JAM. *Angiogenesis: An Overview* 2006.
85. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev.* 2004;56(4):549-80.
86. Koch S, Claesson-Welsh L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(7):a006502.
87. Cebe-Suarez S, Zehnder-Fjallman A, Ballmer-Hofer K. The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. *Cell Mol Life Sci.* 2006;63(5):601-15.
88. Beenken A, Mohammadi M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2009;8(3):235-53.
89. Ucuşian AA, Gassman AA, East AT, Greisler HP. Molecular mediators of angiogenesis. *J Burn Care Res.* 2010;31(1):158-75.
90. Sterzynska Karolina PS-K, Wojciech Witkiewicz. The Most Important Angiogenic Growth Factors Influencing the Development and Function of Blood Vessels in the Context of Coronary Artery Bypass Grafting (CABG). In *Advances in Cell Biology.* 2011.
91. Lawler J. Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J Cell Mol Med.* 2002;6(1):1-12.
92. Nyberg P, Xie L, Kalluri R. Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cancer Res.* 2005;65(10):3967-79.
93. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell.* 1997;88(2):277-85.
94. Kim J, Cheon IS, Won YJ, Na HJ, Kim YM, Choe J. IL-4 inhibits cell cycle progression of human umbilical vein endothelial cells by affecting p53, p21(Waf1), cyclin D1, and cyclin E expression. *Mol Cells.* 2003;16(1):92-6.

95. Morini M, Albini A, Lorusso G, Moelling K, Lu B, Cilli M, et al. Prevention of angiogenesis by naked DNA IL-12 gene transfer: angioprevention by immunogene therapy. *Gene Ther.* 2004;11(3):284-91.
96. Gengrinovitch S, Greenberg SM, Cohen T, Gitay-Goren H, Rockwell P, Maione TE, et al. Platelet factor-4 inhibits the mitogenic activity of VEGF121 and VEGF165 using several concurrent mechanisms. *J Biol Chem.* 1995;270(25):15059-65.
97. Zimna A, Kurpisz M. Hypoxia-Inducible Factor-1 in Physiological and Pathophysiological Angiogenesis: Applications and Therapies. *Biomed Res Int.* 2015;2015:549412.
98. Krock BL, Skuli N, Simon MC. Hypoxia-induced angiogenesis: good and evil. *Genes Cancer.* 2011;2(12):1117-33.
99. Joško J, Mazurek M. Transcription factors having impact on vascular endothelial growth factor (VEGF) gene expression in angiogenesis. *Med Sci Monit.* 2004;10(4):Ra89-98.
100. Dulak J, Józkwicz A, Dembinska-Kiec A, Guevara I, Zdzenicka A, Zmudzinska-Grochot D, et al. Nitric oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(3):659-66.
101. Haider KH, Aziz S, Al-Reshidi MA. Endothelial progenitor cells for cellular angiogenesis and repair: lessons learned from experimental animal models. *Regen Med.* 2017;12(8):969-82.
102. Basile DP, Yoder MC. Circulating and tissue resident endothelial progenitor cells. *J Cell Physiol.* 2014;229(1):10-6.
103. Kørbling M, Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? *N Engl J Med.* 2003;349(6):570-82.
104. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med.* 1999;5(4):434-8.
105. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997;275(5302):964-7.
106. Rose JA, Erzurum S, Asosingh K. Biology and flow cytometry of proangiogenic hematopoietic progenitors cells. *Cytometry A.* 2015;87(1):5-19.
107. Asahara T, Kawamoto A, Masuda H. Concise review: Circulating endothelial progenitor cells for vascular medicine. *Stem Cells.* 2011;29(11):1650-5.
108. De Falco E, Porcelli D, Torella AR, Straino S, Iachininoto MG, Orlandi A, et al. SDF-1 involvement in endothelial phenotype and ischemia-induced recruitment of bone marrow progenitor cells. *Blood.* 2004;104(12):3472-82.
109. Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ihling C, Technau-Ihling K, et al. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med.* 2003;9(11):1370-6.
110. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res.* 1999;85(3):221-8.
111. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res.* 2004;95(4):343-53.
112. Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, et al. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood.* 1998;92(2):362-7.

113. Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, Kirchmair R, Silver M, Murayama T, et al. Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation*. 2002;105(25):3017-24.
114. Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? *Circulation*. 2004;109(21 Suppl 1):II27-33.
115. Zheng H, Fu G, Dai T, Huang H. Migration of endothelial progenitor cells mediated by stromal cell-derived factor-1alpha/CXCR4 via PI3K/Akt/eNOS signal transduction pathway. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2007;50(3):274-80.
116. Rennert RC, Sorkin M, Garg RK, Gurtner GC. Stem cell recruitment after injury: lessons for regenerative medicine. *Regen Med*. 2012;7(6):833-50.
117. Fan Y, Ye J, Shen F, Zhu Y, Yeghiazarians Y, Zhu W, et al. Interleukin-6 stimulates circulating blood-derived endothelial progenitor cell angiogenesis in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2008;28(1):90-8.
118. Nishiwaki Y, Yoshida M, Iwaguro H, Masuda H, Nitta N, Asahara T, et al. Endothelial E-selectin potentiates neovascularization via endothelial progenitor cell-dependent and -independent mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(3):512-8.
119. Oh IY, Yoon CH, Hur J, Kim JH, Kim TY, Lee CS, et al. Involvement of E-selectin in recruitment of endothelial progenitor cells and angiogenesis in ischemic muscle. *Blood*. 2007;110(12):3891-9.
120. Caiado F, Dias S. Endothelial progenitor cells and integrins: adhesive needs. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2012;5:4.
121. Jin H, Aiyer A, Su J, Borgstrom P, Stupack D, Friedlander M, et al. A homing mechanism for bone marrow-derived progenitor cell recruitment to the neovasculature. *J Clin Invest*. 2006;116(3):652-62.
122. Muller WA. The regulation of transendothelial migration: new knowledge and new questions. *Cardiovasc Res*. 2015;107(3):310-20.
123. Askari AT, Unzek S, Popovic ZB, Goldman CK, Forudi F, Kiedrowski M, et al. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet*. 2003;362(9385):697-703.
124. Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med*. 2004;10(8):858-64.
125. Lin CP, Lin FY, Huang PH, Chen YL, Chen WC, Chen HY, et al. Endothelial progenitor cell dysfunction in cardiovascular diseases: role of reactive oxygen species and inflammation. *Biomed Res Int*. 2013;2013:845037.
126. Huang PH, Chen JW, Lin SJ. Effects of Cardiovascular Risk Factors on Endothelial Progenitor Cell. *Acta Cardiol Sin*. 2014;30(5):375-81.
127. Zhang H, Park Y, Wu J, Chen X, Lee S, Yang J, et al. Role of TNF-alpha in vascular dysfunction. *Clin Sci (Lond)*. 2009;116(3):219-30.
128. Rosell A, Arai K, Lok J, He T, Guo S, Navarro M, et al. Interleukin-1beta augments angiogenic responses of murine endothelial progenitor cells in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2009;29(5):933-43.
129. Andreou I, Tousoulis D, Tentolouris C, Antoniadis C, Stefanadis C. Potential role of endothelial progenitor cells in the pathophysiology of heart failure: clinical implications and perspectives. *Atherosclerosis*. 2006;189(2):247-54.

130. Tousoulis D, Andreou I, Antoniadis C, Tentolouris C, Stefanadis C. Role of inflammation and oxidative stress in endothelial progenitor cell function and mobilization: therapeutic implications for cardiovascular diseases. *Atherosclerosis*. 2008;201(2):236-47.
131. Sugawara J, Mitsui-Saito M, Hayashi C, Hoshiai T, Senoo M, Chisaka H, et al. Decrease and senescence of endothelial progenitor cells in patients with preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(9):5329-32.
132. Suh W, Kim KL, Choi JH, Lee YS, Lee JY, Kim JM, et al. C-reactive protein impairs angiogenic functions and decreases the secretion of arteriogenic chemo-cytokines in human endothelial progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;321(1):65-71.
133. Verma S, Kuliszewski MA, Li SH, Szmitko PE, Zucco L, Wang CH, et al. C-reactive protein attenuates endothelial progenitor cell survival, differentiation, and function: further evidence of a mechanistic link between C-reactive protein and cardiovascular disease. *Circulation*. 2004;109(17):2058-67.
134. Seeger FH, Haendeler J, Walter DH, Rochwalsky U, Reinhold J, Urbich C, et al. p38 mitogen-activated protein kinase downregulates endothelial progenitor cells. *Circulation*. 2005;111(9):1184-91.
135. Chen YH, Lin SJ, Lin FY, Wu TC, Tsao CR, Huang PH, et al. High glucose impairs early and late endothelial progenitor cells by modifying nitric oxide-related but not oxidative stress-mediated mechanisms. *Diabetes*. 2007;56(6):1559-68.
136. Heeschen C, Lehmann R, Honold J, Assmus B, Aicher A, Walter DH, et al. Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease. *Circulation*. 2004;109(13):1615-22.
137. Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: animal and human studies. *Circulation*. 2003;108(17):2034-40.
138. Thum T, Fraccarollo D, Schultheiss M, Froese S, Galuppo P, Widder JD, et al. Endothelial nitric oxide synthase uncoupling impairs endothelial progenitor cell mobilization and function in diabetes. *Diabetes*. 2007;56(3):666-74.
139. Kao ST, Yeh CC, Hsieh CC, Yang MD, Lee MR, Liu HS, et al. The Chinese medicine Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang inhibited proliferation of hepatoma cell lines by inducing apoptosis via G0/G1 arrest. *Life Sci*. 2001;69(13):1485-96.
140. Watson T, Goon PK, Lip GY. Endothelial progenitor cells, endothelial dysfunction, inflammation, and oxidative stress in hypertension. *Antioxid Redox Signal*. 2008;10(6):1079-88.
141. Thum T, Fraccarollo D, Galuppo P, Tsikas D, Frantz S, Ertl G, et al. Bone marrow molecular alterations after myocardial infarction: Impact on endothelial progenitor cells. *Cardiovasc Res*. 2006;70(1):50-60.
142. Schatteman GC, Hanlon HD, Jiao C, Dodds SG, Christy BA. Blood-derived angioblasts accelerate blood-flow restoration in diabetic mice. *J Clin Invest*. 2000;106(4):571-8.
143. Lin CP, Chen YH, Leu HB, Lin SJ, Chen YL, Huang SL, et al. Anti-inflammatory strategies for homocysteine-related cardiovascular disease. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2009;14:3836-45.
144. GrandPré T, Nakamura F, Vartanian T, Strittmatter SM. Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. *Nature*. 2000;403(6768):439-44.
145. Oertle T, van der Haar ME, Bandtlow CE, Robeva A, Burfeind P, Buss A, et al. Nogo-A inhibits neurite outgrowth and cell spreading with three discrete regions. *J Neurosci*. 2003;23(13):5393-406.

146. Dodd DA, Niederoest B, Bloechlinger S, Dupuis L, Loeffler JP, Schwab ME. Nogo-A, -B, and -C are found on the cell surface and interact together in many different cell types. *J Biol Chem.* 2005;280(13):12494-502.
147. Yang YS, Strittmatter SM. The reticulons: a family of proteins with diverse functions. *Genome Biol.* 2007;8(12):234.
148. Gao Y, Wang B, Xiao Z, Chen B, Han J, Wang X, et al. Nogo-66 regulates nanog expression through stat3 pathway in murine embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* 2010;19(1):53-60.
149. Caltharp SA, Pira CU, Mishima N, Youngdale EN, McNeill DS, Liwnicz BH, et al. NOGO-A induction and localization during chick brain development indicate a role disparate from neurite outgrowth inhibition. *BMC Dev Biol.* 2007;7:32.
150. Mingorance-Le Meur A, Zheng B, Soriano E, del Rio JA. Involvement of the myelin-associated inhibitor Nogo-A in early cortical development and neuronal maturation. *Cereb Cortex.* 2007;17(10):2375-86.
151. Huber AB, Weinmann O, Brosamle C, Oertle T, Schwab ME. Patterns of Nogo mRNA and protein expression in the developing and adult rat and after CNS lesions. *J Neurosci.* 2002;22(9):3553-67.
152. Fry EJ, Ho C, David S. A role for Nogo receptor in macrophage clearance from injured peripheral nerve. *Neuron.* 2007;53(5):649-62.
153. Miao RQ, Gao Y, Harrison KD, Prendergast J, Acevedo LM, Yu J, et al. Identification of a receptor necessary for Nogo-B stimulated chemotaxis and morphogenesis of endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(29):10997-1002.
154. Magnusson C, Svensson A, Christerson U, Tagerud S. Denervation-induced alterations in gene expression in mouse skeletal muscle. *Eur J Neurosci.* 2005;21(2):577-80.
155. Schwab ME. Functions of Nogo proteins and their receptors in the nervous system. *Nat Rev Neurosci.* 2010;11(12):799-811.
156. Fournier AE, GrandPre T, Strittmatter SM. Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. *Nature.* 2001;409(6818):341-6.
157. Wang T, Xiong JQ, Ren XB, Sun W. The role of Nogo-A in neuroregeneration: a review. *Brain Res Bull.* 2012;87(6):499-503.
158. David S, Fry EJ, Lopez-Vales R. Novel roles for Nogo receptor in inflammation and disease. *Trends Neurosci.* 2008;31(5):221-6.
159. Solomon AM, Westbrook T, Field GD, McGee AW. Nogo receptor 1 is expressed by nearly all retinal ganglion cells. *PLoS One.* 2018;13(5):e0196565.
160. Atwal JK, Pinkston-Gosse J, Syken J, Stawicki S, Wu Y, Shatz C, et al. PirB is a functional receptor for myelin inhibitors of axonal regeneration. *Science.* 2008;322(5903):967-70.
161. Domeniconi M, Cao Z, Spencer T, Sivasankaran R, Wang K, Nikulina E, et al. Myelin-associated glycoprotein interacts with the Nogo66 receptor to inhibit neurite outgrowth. *Neuron.* 2002;35(2):283-90.
162. Saha N, Kolev M, Nikolov DB. Structural features of the Nogo receptor signaling complexes at the neuron/myelin interface. *Neurosci Res.* 2014;87:1-7.
163. Tang H, Xu Y, Liu L, He L, Huang J, Pan J, et al. Nogo-A/S1PR2 Signaling Pathway Inactivation Decreases Microvascular Damage and Enhances Microvascular Regeneration in PDMCI Mice. *Neuroscience.* 2020;449:21-34.

164. Joset A, Dodd DA, Haleboua S, Schwab ME. Pincher-generated Nogo-A endosomes mediate growth cone collapse and retrograde signaling. *J Cell Biol.* 2010;188(2):271-85.
165. Wang B, Xiao Z, Chen B, Han J, Gao Y, Zhang J, et al. Nogo-66 promotes the differentiation of neural progenitors into astroglial lineage cells through mTOR-STAT3 pathway. *PLoS One.* 2008;3(3):e1856.
166. Chen W, Mao K, Liu Z, Dinh-Xuan AT. The role of the RhoA/Rho kinase pathway in angiogenesis and its potential value in prostate cancer (Review). *Oncol Lett.* 2014;8(5):1907-11.
167. Pernet V. Nogo-A in the visual system development and in ocular diseases. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2017;1863(6):1300-11.
168. Acevedo L, Yu J, Erdjument-Bromage H, Miao RQ, Kim JE, Fulton D, et al. A new role for Nogo as a regulator of vascular remodeling. *Nat Med.* 2004;10(4):382-8.
169. Yu J, Fernández-Hernando C, Suarez Y, Schleicher M, Hao Z, Wright PL, et al. Reticulon 4B (Nogo-B) is necessary for macrophage infiltration and tissue repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(41):17511-6.
170. Wälchli T, Pernet V, Weinmann O, Shiu JY, Guzik-Kornacka A, Decrey G, et al. Nogo-A is a negative regulator of CNS angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(21):E1943-52.
171. Kono M, Mi Y, Liu Y, Sasaki T, Allende ML, Wu YP, et al. The sphingosine-1-phosphate receptors S1P1, S1P2, and S1P3 function coordinately during embryonic angiogenesis. *J Biol Chem.* 2004;279(28):29367-73.
172. Kempf A, Tews B, Arzt ME, Weinmann O, Obermair FJ, Pernet V, et al. The sphingolipid receptor S1PR2 is a receptor for Nogo-a repressing synaptic plasticity. *PLoS Biol.* 2014;12(1):e1001763.
173. Skoura A, Sanchez T, Claffey K, Mandala SM, Proia RL, Hla T. Essential role of sphingosine 1-phosphate receptor 2 in pathological angiogenesis of the mouse retina. *J Clin Invest.* 2007;117(9):2506-16.
174. Joly S, Dejda A, Rodriguez L, Sapiéha P, Pernet V. Nogo-A inhibits vascular regeneration in ischemic retinopathy. *Glia.* 2018;66(10):2079-93.
175. Sapiéha P, Joyal JS, Rivera JC, Kermorvant-Duchemin E, Sennlaub F, Hardy P, et al. Retinopathy of prematurity: understanding ischemic retinal vasculopathies at an extreme of life. *J Clin Invest.* 2010;120(9):3022-32.
176. Rivera JC, Madaan A, Zhou TE, Chemtob S. Review of the mechanisms and therapeutic avenues for retinal and choroidal vascular dysfunctions in retinopathy of prematurity. *Acta Paediatr.* 2016;105(12):1421-33.
177. Leeper NJ, Hunter AL, Cooke JP. Stem cell therapy for vascular regeneration: adult, embryonic, and induced pluripotent stem cells. *Circulation.* 2010;122(5):517-26.
178. Bian X, Ma K, Zhang C, Fu X. Therapeutic angiogenesis using stem cell-derived extracellular vesicles: an emerging approach for treatment of ischemic diseases. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10(1):158.
179. Lois N, McCarter RV, O'Neill C, Medina RJ, Stitt AW. Endothelial progenitor cells in diabetic retinopathy. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2014;5:44.
180. Fan Y, Shen F, Frenzel T, Zhu W, Ye J, Liu J, et al. Endothelial progenitor cell transplantation improves long-term stroke outcome in mice. *Ann Neurol.* 2010;67(4):488-97.

181. Ranghino A, Cantaluppi V, Grange C, Vitillo L, Fop F, Biancone L, et al. Endothelial progenitor cell-derived microvesicles improve neovascularization in a murine model of hindlimb ischemia. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2012;25(1):75-85.
182. Thum T, Hoerber S, Froese S, Klink I, Stichtenoth DO, Galuppo P, et al. Age-dependent impairment of endothelial progenitor cells is corrected by growth-hormone-mediated increase of insulin-like growth-factor-1. *Circ Res*. 2007;100(3):434-43.
183. Porto ML, Rodrigues BP, Menezes TN, Ceschim SL, Casarini DE, Gava AL, et al. Reactive oxygen species contribute to dysfunction of bone marrow hematopoietic stem cells in aged C57BL/6 J mice. *J Biomed Sci*. 2015;22:97.
184. Yao EH, Yu Y, Fukuda N. Oxidative stress on progenitor and stem cells in cardiovascular diseases. *Curr Pharm Biotechnol*. 2006;7(2):101-8.
185. Case J, Ingram DA, Haneline LS. Oxidative stress impairs endothelial progenitor cell function. *Antioxid Redox Signal*. 2008;10(11):1895-907.
186. Murasawa S, Asahara T. Endothelial progenitor cells for vasculogenesis. *Physiology (Bethesda)*. 2005;20:36-42.
187. Keighron C, Lyons CJ, Creane M, O'Brien T, Liew A. Recent Advances in Endothelial Progenitor Cells Toward Their Use in Clinical Translation. *Front Med (Lausanne)*. 2018;5:354.
188. Schuh A, Liehn EA, Sasse A, Hristov M, Sobota R, Kelm M, et al. Transplantation of endothelial progenitor cells improves neovascularization and left ventricular function after myocardial infarction in a rat model. *Basic Res Cardiol*. 2008;103(1):69-77.
189. Imanishi T, Tsujioka H, Akasaka T. Endothelial progenitor cells dysfunction and senescence: contribution to oxidative stress. *Curr Cardiol Rev*. 2008;4(4):275-86.
190. Loomans CJ, de Koning EJ, Staal FJ, Rookmaaker MB, Verseyden C, de Boer HC, et al. Endothelial progenitor cell dysfunction: a novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type 1 diabetes. *Diabetes*. 2004;53(1):195-9.
191. Walchli T, Ulmann-Schuler A, Hintermuller C, Meyer E, Stampanoni M, Carmeliet P, et al. Nogo-A regulates vascular network architecture in the postnatal brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2017;37(2):614-31.
192. Rust R, Gronnert L, Gantner C, Enzler A, Mulders G, Weber RZ, et al. Nogo-A targeted therapy promotes vascular repair and functional recovery following stroke. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(28):14270-9.
193. Rust R, Weber RZ, Grönnert L, Mulders G, Maurer MA, Hofer AS, et al. Anti-Nogo-A antibodies prevent vascular leakage and act as pro-angiogenic factors following stroke. *Sci Rep*. 2019;9(1):20040.
194. Deshane J, Chen S, Caballero S, Grochot-Przeczek A, Was H, Li Calzi S, et al. Stromal cell-derived factor 1 promotes angiogenesis via a heme oxygenase 1-dependent mechanism. *J Exp Med*. 2007;204(3):605-18.
195. Kroll J, Epting D, Kern K, Dietz CT, Feng Y, Hammes HP, et al. Inhibition of Rho-dependent kinases ROCK I/II activates VEGF-driven retinal neovascularization and sprouting angiogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;296(3):H893-9.
196. Bryan BA, Dennstedt E, Mitchell DC, Walshe TE, Noma K, Loureiro R, et al. RhoA/ROCK signaling is essential for multiple aspects of VEGF-mediated angiogenesis. *Faseb j*. 2010;24(9):3186-95.

197. Nohria A, Grunert ME, Rikitake Y, Noma K, Prsic A, Ganz P, et al. Rho kinase inhibition improves endothelial function in human subjects with coronary artery disease. *Circ Res.* 2006;99(12):1426-32.