

Université de Montréal

Rôle de la CuZn superoxyde dismutase dans la néovascularisation en réponse à
l'ischémie

par

Jessika Groleau

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Ph.D.
en Sciences Biomédicales

Mai, 2011

Copyright, Jessika Groleau, 2011

Université de Montréal

Faculté de Médecine

Cette thèse intitulée:

Rôle de la CuZn superoxyde dismutase dans la néovascularisation en réponse à
l'ischémie

présentée par :

Jessika Groleau

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Dr. Gaétan Thibault
président-rapporteur

Dr. Alain Rivard
directeur de recherche

Dr. Jean-François Cailhier
membre du jury

Dr. Yves Caumartin
examineur externe

Dr. Eugenio Rasio
représentant du doyen

Résumé

L'athérosclérose est à l'origine d'importantes obstructions vasculaires. La sévérité de l'ischémie tissulaire provoquée par l'athérosclérose dépend en partie de la capacité de l'organisme à former de nouveaux vaisseaux (néovascularisation). Les mécanismes de néovascularisation sont modulés par la balance oxydo-réductive. Une exacerbation du stress oxydant est retrouvée dans tous les facteurs de risque cardiovasculaire, et en particulier lors du vieillissement. Au niveau vasculaire, la CuZnSOD est la principale enzyme antioxydante. Cependant, son rôle spécifique dans le vieillissement vasculaire et dans le développement de nouveaux vaisseaux en réponse à l'ischémie n'est pas connu. Nos hypothèses de recherche sont: 1) qu'une absence de CuZnSOD diminue la néovascularisation réparatrice en réponse à l'ischémie 2) que cette diminution de la néovascularisation est due au vieillissement de la vasculature affectant à la fois les cellules endothéliales matures et les cellules progénitrices endothéliales.

Nous avons démontré qu'une déficience en CuZnSOD diminue significativement la néovascularisation en réponse à l'ischémie. Cette diminution de néovascularisation est associée à une augmentation du stress oxydant et une réduction de la biodisponibilité du NO. La déficience en CuZnSOD réduit significativement le nombre de EPCs (moelle, rate). De plus, ces EPCs présentent une augmentation significative des niveaux de stress oxydant, une diminution de la production de NO et une capacité réduite à migrer et à s'intégrer à un réseau tubulaire. Fait important, il

est possible d'améliorer la néovascularisation des souris déficientes en CuZnSOD par une supplémentation en EPCs provenant de souris contrôles.

Nous avons également démontré que la récupération du flot sanguin suivant l'ischémie est significativement réduite par l'âge. À la fois chez les jeunes et les vieilles souris, la déficience en CuZnSOD mène à une réduction additionnelle de la néovascularisation. Fait intéressant, le potentiel néovasculaire des jeunes souris déficiente en CuZnSOD est similaire à celui des vieilles souris contrôles. Les niveaux de stress oxydant sont également augmentés de façon similaire dans ces deux groupes de souris. L'âge et la déficience en CuZnSOD sont tous deux associés à une réduction du nombre d'EPCs isolées de la moelle et de la rate. L'effet de l'âge seul sur la fonction des EPCs est modeste. Par contre, la déficience en CuZnSOD en condition de vieillissement est associée à d'importants effets délétères sur l'activité fonctionnelle des EPCs.

En résumé, nos résultats suggèrent que la protection contre le stress oxydant par la CuZnSOD est essentielle pour préserver la fonction des EPCs et la néovascularisation réparatrice en réponse à l'ischémie. Le défaut de néovascularisation observé en absence de CuZnSOD est associé à un vieillissement vasculaire accéléré. Nos résultats suggèrent que dans le contexte du vieillissement, la CuZnSOD a un rôle encore plus important pour limiter les niveaux de stress oxydant, préserver la fonction des EPCs et maintenir l'intégrité des tissus ischémiques.

Mots clés : Angiogenèse, Cellules progénitrices endothéliales (EPCs), Stress oxydant, Superoxyde dismutase, Vasculogenèse, Vieillessement vasculaire.

Abstract

When atherosclerotic vascular obstructions are so extensive that direct revascularization techniques cannot be undertaken successfully, the severity of residual tissue ischemia will depend in large part on the ability of the organism to spontaneously develop new blood vessels (neovascularization). The mechanisms involved in neovascularization depend on the oxidative stress balance. Increased oxidative stress is a common feature of all cardiovascular risk factors and particularly aging. In the vascular wall, CuZnSOD is the predominant antioxidant enzyme. Nevertheless, its specific role in vascular aging and new blood vessels formation is currently unknown. Accordingly, we hypothesize that 1) CuZnSOD deficiency reduces neovascularization in response to ischemia 2) this reduction is partly due to vascular aging affecting mature endothelial cells and endothelial progenitor cells.

We have demonstrated that CuZnSOD deficiency significantly reduces neovascularization in response to ischemia. This reduction is associated with increased oxidative stress and reduced NO bioavailability. CuZnSOD deficiency significantly decreases EPCs number (bone marrow, spleen). Moreover, these EPCs present significant increased oxidative stress levels, reduced NO production and decreased migration and incorporation into tubular-like structures capacities. Importantly, neovascularization in CuZnSOD deficient-mice can be rescued by an EPCs supplementation from control mice.

We have also demonstrated that the blood flow recovery following ischemia was significantly reduced with aging. Both in old and young mice, CuZnSOD deficiency led to a further reduction of neovascularization. Interestingly, the resulting neovascularization potential in young CuZnSOD-deficient mouse was similar to that of an older wild type mouse. Oxidative stress levels were also increased to similar levels in these two groups. Both aging and CuZnSOD deficiency were associated with reduced number of bone marrow and peripheral EPCs. The effect of moderate aging alone on specific functional activities of EPCs was modest. However, CuZnSOD deficiency was associated with severe age-dependent defect in EPC functional activities.

In summary, our results suggest that CuZnSOD protection against oxidative stress is essential for EPC functional activities and neovascularization in response to ischemia. The defective neovascularization observed in CuZnSOD-deficient mice is associated with accelerated vascular aging. Our results suggest that in aging context, CuZnSOD has a critical role limiting increased oxidative stress and protecting both EPC functional activities and ischemic tissues integrity.

Key words: Angiogenesis, Endothelial progenitor cells (EPCs), Oxidative stress, Superoxide dismutase, Vascular aging, Vasculogenesis.

Table des matières

1. La problématique	22
1.1. Définition de la maladie cardiovasculaire.	22
1.2. Étendue des maladies cardiovasculaires en Amérique du Nord.	22
1.3 L'athérosclérose: importante cause de mortalité au Canada.	23
1.3.1. Les maladies athérosclérotiques: la maladie coronarienne et la maladie artérielle périphérique	23
1.3.2. Les facteurs de risque à l'origine du développement des maladies cardiovasculaires athérosclérotiques	24
1.4. Le stress oxydant comme dénominateur commun	25
1.5. La néovascularisation; mécanisme physiologique en réponse à l'ischémie	25
1.6. L'absence de consensus nuit à l'évolution du savoir.	26
2. Le système vasculaire.	28
2.1. Le vaisseau sanguin	28
2.1.1. Les vaisseaux de grands calibres; les artères	28
2.1.2. Les vaisseaux de calibres intermédiaires; les artéioles.	30
2.1.3. Les vaisseaux de petits calibres; les capillaires	31
2.2 L'endothélium: rôle de barrière physiologique	31
2.3. L'altération de l'endothélium: origine de plusieurs maladies cardiovasculaires	33
3. Les facteurs de risque cardiovasculaire	34

3.1. Les facteurs de risque modifiables	34
3.1.1. Le tabagisme: un risque évitable	34
3.1.2. L'hypertension artérielle	36
3.1.3. La dyslipidémie et l'hypercholestérolémie	37
3.1.4. Le diabète: les deux types de diabète augmentent le risque cardiovasculaire	38
3.1.5. L'obésité: le surplus de poids est mauvais pour le coeur	40
3.2. Les facteurs de risque non-modifiables	41
3.2.1. Les antécédents familiaux	41
3.2.2. Le sexe: les femmes sont naturellement protégées contre les maladies cardiovasculaires	42
3.2.3. Le vieillissement	42
3.2.3.1. La sénescence cellulaire	44
4. L'athérosclérose	47
4.1. L'évolution de l'athérosclérose	48
4.1.1. L'athérome: premier stade visible	49
4.1.2. La sténose: progression de l'obstruction vasculaire	49
4.1.3. La thrombose: complication sévère et aiguë de la plaque athérosclérotique	50
4.2. Évolution de l'athérosclérose d'hier à aujourd'hui.	51
4.2.1. L'hypothèse de la réponse à l'injure	53
4.2.2. L'hypothèse de la réponse à l'oxydation et la rétention des LDL	53
4.2.3. L'hypothèse de la réponse à l'inflammation.	55

4.3. Évidences supportant l'hypothèse de l'oxydation des LDL	59
5. À l'origine de l'athérosclérose; la dysfonction endothéliale	63
5.1. L'endothélium, gardien de l'homéostasie vasculaire	63
5.2. Définition de la dysfonction endothéliale	63
5.3. Le NO, stabilisateur de l'homéostasie endothéliale	63
5.3.1. Les facteurs de risque cardiovasculaire diminuent la biodisponibilité du NO	66
5.4. La dysfonction endothéliale comme facteur prédictif des événements cardiovasculaires	68
6. La néovascularisation	70
6.1. L'angiogenèse	70
6.1.1. Processus nécessaire à la réparation vasculaire	70
6.1.2. La phase d'activation et la phase de résolution	71
6.1.3. VEGF: principal facteur de croissance pro-angiogénique (phase d'activation)	73
6.1.3.1. VEGF: 6 gènes et 3 récepteurs au service de l'angiogenèse	74
6.1.3.2. Le VEGFR2, principal transmetteur des voies pro-angiogéniques chez la cellule endothéliale	76
6.1.4. Les autres facteurs de croissance pro-angiogéniques d'importance	77
6.1.5. Le macrophage: cellule pro-angiogénique	79
6.1.6. La consolidation du vaisseau sanguin: la phase de résolution	80
6.2. L'artériogenèse	81

6.3. La vasculogénèse: Régénération vasculaire par les cellules souches . . .	83
6.3.1. La vasculogénèse embryonnaire	83
6.3.2. La vasculogénèse post-natale	85
6.3.2.1. L'origine des EPCs: la niche vasculaire	85
6.3.2.2. Importance de la voie endogène du NO dans la vasculogénèse post-natale	87
6.3.2.3. Potentiel thérapeutique de la transplantation et de l'infusion d'EPCs	88
6.3.3. Définition d'une cellule progénitrice endothéliale	89
6.3.3.1. <i>Early outgrowth</i> EPCs	91
6.3.3.2. <i>Late outgrowth</i> EPCs.	94
6.3.3.3. Le choix de la méthode appropriée	95
6.3.4. Modification des EPCs par la thérapie génique.	97
6.4. Les facteurs de risque nuisent à la néovascularisation.	98
7. Le stress oxydant	101
7.1. Acteur important de la réponse vasculaire	101
7.2. Les types d'oxydants	102
7.2.1. L'anion superoxyde: l'espèce radicalaire oxygénée la plus importante	103
7.2.2. Le peroxyde d'hydrogène	104
7.2.3. Les peroxy-nitrites	105
7.3. Les sources d'oxydants	105
7.3.1. La NAD(P)H oxydase : source majeure de superoxydes dans la vasculature	106

7.3.2. La xanthine oxydase	107
7.3.3. Les lipoxygénases et les cyclooxygénases	107
7.3.4. Les métaux de transition.	109
7.4. Les antioxydants.	109
7.4.1. Protecteurs des dommages oxydatifs.	109
7.4.2. Le système de protection endogène	110
7.4.2.1. Les enzymes antioxydantes	110
7.4.2.1.1. Les superoxydes dismutases	111
7.4.2.1.1.1. La CuZnSOD:	
la forme la plus abondante	111
7.4.2.1.1.2. La MnSOD: régulation du stress	
mitochondrial	113
7.4.2.1.1.3. La ecSOD	113
7.4.2.1.2. Effets protecteurs de la SOD sur le système	
vasculaire	114
7.4.2.1.3. Le peroxyde d'hydrogène régule l'activité de	
la SOD.	114
7.4.2.1.4. La glutathione peroxydase (GPx)	115
7.4.2.1.5. La catalase: efficace à de fortes concentrations	
de stress oxydant	116
7.4.2.2. Les molécules antioxydantes.	117
7.5. Tout est une question d'équilibre	118
7.5.1. Les ROS dans la pathogenèse de l'athérosclérose	119

7.5.1.1. Le stress oxydant est impliqué dans la dysfonction endothéliale	120
7.5.1.2. Le stress oxydant dans le processus du vieillissement	121
7.5.2. Contrôle de la néovascularisation par le stress oxydant.	122
7.5.2.1. Des concentrations faibles à modérés de ROS: effets pro-angiogéniques.	122
7.5.2.2. Rôle de la CuZnSOD dans la fonction vasculaire	124
8. Hypothèses de recherche.	127
8.1. Objectifs spécifiques.	128
8.1.1. Étude #1.	128
8.1.2. Étude #2	129
9. Premier article	130
10. Deuxième article	180
11. Discussion	215
12. Conclusion	243
13. Figure récapitulative	245
14. Bibliographie	246

Légende des figures

Figure 1. Structure de l'artère	30
Figure 2. Stades précoces de l'athérosclérose	48
Figure 3. Hypothèse de la réponse à la rétention des LDL	54
Figure 4. Hypothèse de la modification oxydative des LDL	55
Figure 5. Conversion de L-arginine en L-citrulline et libération de NO	64
Figure 6. Angiogenèse	72
Figure 7. Différents isoformes de VEGF et ses récepteurs	75
Figure 8. Artériogenèse	82
Figure 9. Vasculogenèse post-natale	84
Figure 10. Méthodes d'isolation des EPCs en culture	90
Figure 11. Localisation des isoformes SOD.	111
Figure récapitulative	245

Liste des abréviations

ACE	<i>Angiotensin-Converting Enzyme</i>
ADMA	<i>Asymmetric Dimethylarginine</i>
AGE	<i>Advanced Glycation End Products</i>
Ang-1 à 4	Angiopoïétines
Ang-II	Angiotensine-II
BH ₄	Tétrahydrobioptérine
CAC	<i>Circulating Angiogenic Cells</i>
CFU-EC	<i>Colony Forming Unit-Endothelial Cells</i>
cGMP	<i>Cyclic Guanosine MonoPhosphate</i>
COPD	Maladies pulmonaires congestives chroniques
COX (1,2 ou 3)	Cyclooxygénase
ECFC	<i>Endothelial Colony Forming Cells</i>
EDHF	<i>Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor</i>
eNOS	<i>Endothelial Nitric Oxide Synthase</i>
EPCs	Cellules progénitrices endothéliales
ET-1	Endothéline-1
FACS	Cytofluorométrie de flux
FGF	Facteur de croissance des fibroblastes
FN	Fibronectine
GH	<i>Growth Hormone</i>
G-CSF	<i>Granulocyte-Colony Stimulating Factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor</i>

GPx	Gluthatione peroxidase
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HDL(c)	<i>High Density Lipoprotein (cholesterol)</i>
HGF	Facteur de croissance des hépatocytes
HIF-1 α	<i>Hypoxia Inducible Factor-1α</i>
HOCl	Acide hypochloridrique
HSCs	<i>Hematopoetic Stem Cells</i>
ICAM-1	<i>Inter-Cellular Adhesion Molecule-1</i>
IGF-1	<i>Insuline-like Growth Factor-1</i>
IL (1,6,8)	Interleukine
INF- γ	Interféron- γ
iNOS	<i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>
LDL(c)	<i>Low Density Lipoprotein(cholesterol)</i>
LOOH	Peroxyde lipidique
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
MMPs	Métalloprotéinases
nNOS	<i>Neuronal Nitric Oxide Synthase</i>
NO	Oxyde nitrique
NO ₂ ⁻	Nitrite
NO ₃ ⁻	Nitrate
NOS	<i>Nitric Oxide Synthase</i>
Nox (1à 5)	Sous-unité de la NADPH oxydase
NRP	Neuropiline
oxLDL	<i>Oxidysed Low Density Lipoprotein</i>

O_2^-	Anion superoxyde
OH^\cdot	Radical hydroxyl
$ONOO^-$	Peroxynitrite
PAECs	Cellules endothéliales d'artères pulmonaires
PB-MNC	Cellules mononucléées du sang périphérique
PDGF	<i>Platelet Derived-Growth Factor</i>
PGF	<i>Placenta Growth Factor</i>
PKC	<i>Protein kinase C</i>
RAGE	<i>Receptor of Advanced Glycation End Products</i>
RNS	<i>Reactive Nitrogen Species</i>
RO	Radical oxyl
ROO^\cdot	Radical peroxy
ROOH	Radical peroxyde
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SOD	Superoxyde Dismutase
SDF-1	Facteur dérivé des cellules stromales-1
TF	Facteur tissulaire
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor-α</i>
tPA	<i>Tissue Plasminogen Activator</i>
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VSMCs	Cellules musculaires lisses vasculaires

À tous ceux et celles qui ont cru en moi jusqu'au bout

Remerciements

L'écriture de ma thèse scelle l'accomplissement de mon doctorat. Bien que ce parcours se fasse souvent seul, je n'aurais pas réussi sans votre soutien, votre support, vos encouragements et votre confiance en moi. À tous, merci!

Un grand merci à mes parents, Louise et Sylvain, qui ont cru en mes capacités à me réaliser et à me dépasser. Merci pour tous vos mots d'encouragement et votre amour qui m'ont permis de garder courage. Merci à Mémé de qui j'ai certainement hérité ma grande curiosité et ma passion du savoir. Merci à mes soeurs Karine et Marie-Eve, de m'avoir parfois permis de remplacer les moments difficiles pour de meilleurs. Un énorme merci à l'amour de ma vie, Sébastien, de m'avoir soutenu (et parfois enduré) durant toutes ces années. Merci d'avoir été mon phare dans les moments de doute, mon pilier dans mes moments de faiblesse et surtout la raison de mon bonheur et de ma bonne humeur au quotidien.

Merci à vous que j'aime!

Merci à Claude, Pierrette et Anne-Marie qui, tour à tour, m'ont écouté lorsque j'en avais de besoin, conseillé lorsque je n'y voyais plus clair et surtout encouragé lorsque j'étais à bout de force. Plus particulièrement, merci à Anne-Marie dont les conseils d'écriture et de «pensé critique» m'ont permis d'améliorer mon argumentation.

Merci à vous que je porte dans mon coeur!

Merci à Sylvie, Gemma et Paola qui m'ont permis de passer de très belles années au laboratoire en leur compagnie. Bien que l'on pense souvent que la recherche s'exécute en solo, sans vous, je n'aurais pu récolter tous ces beaux résultats dont je suis fière. Un merci particulier à ma grande amie Julie qui a toujours été là pour moi tant au labo que dans la vie quotidienne. Merci pour toutes ces discussions animées, tous ces fous rires, tout ton support et merci de ton amitié.

Merci à vous que je n'oublierai jamais!

Merci à ceux qui ont cru en moi. Merci à Dr. Rivard de m'avoir permis d'acquérir tout ce bagage de connaissances. Merci de m'avoir fait grandir et réfléchir au fil des années, des congrès, des projets et maintenant au travers de cette thèse. Merci de m'avoir fait confiance. Merci à Dr. Lajeunesse dont les bons mots m'ont aidé à décrocher plusieurs prix et bourses. Merci de votre grand soutien et de votre grande compréhension. Merci à Dre Hébert qui, depuis mon prédoc, suit ma carrière avec beaucoup d'intérêt. Merci de m'avoir offert de poursuivre mes études

postdoctorales dans votre laboratoire. Cette belle opportunité me permettra, j'en suis certaine, de devenir une chercheuse plus critique et plus autonome.

Merci à vous qui avez influencé ma carrière!

Enfin, merci à vous, chers lecteurs, de prendre le temps de lire cette thèse en partie ou en entier. En espérant qu'elle vous apportera ce que vous êtes venu y chercher.

Bonne lecture

1. La problématique

1.1. Définition de la maladie cardiovasculaire

Le terme «maladie cardiovasculaire» regroupe plusieurs maladies de l'appareil circulatoire, lui-même constitué du muscle cardiaque et du système vasculaire irrigant l'ensemble du corps (Lloyd-Jones, Adams et al. 2009). On y retrouve, entre-autres, la cardiopathie ischémique (angine, infarctus du myocarde), la maladie cérébrovasculaire (accident vasculaire-cérébral), la maladie vasculaire périphérique, l'insuffisance cardiaque, les valvulopathies et la cardiopathie congénitale (anomalie structurelle du coeur) (Lloyd-Jones, Adams et al. 2009).

1.2. Étendue des maladies cardiovasculaires en Amérique du Nord

En 2006 aux États-Unis, les maladies cardiovasculaires touchaient plus d'une personne adulte sur trois et étaient responsables du décès de près de 400 000 personnes soit environ 100 000 de plus que le cancer cette même année (Lloyd-Jones, Adams et al. 2009). Au Canada, une personne meurt d'un infarctus du myocarde ou d'une maladie cardiovasculaire toutes les 7 minutes (Canada 2010). De plus, les maladies cardiovasculaires engendrent des coûts de plus de 22 milliards de dollars

chaque année en frais médicaux divers, pertes de salaires et diminution de productivité (Canada 2010).

1.3. L'athérosclérose: importante cause de mortalité au Canada

L'athérosclérose est une maladie chronique se développant tout au long de l'existence. Elle est une des principales cause de mortalité dans les pays industrialisés car elle est à l'origine d'une grande partie des maladies cardiovasculaires. En 2007, les maladies cardio- et cérébrovasculaires étaient deux des trois causes majeures de décès au Canada, responsables de plus de 64 000 décès soit plus de 27% des décès toutes causes confondues au Canada (Canada 2010).

1.3.1 Les maladies cardiovasculaires athérosclérotiques: la maladie coronarienne et la maladie artérielle périphérique

Au niveau du coeur, la maladie coronarienne athérosclérotique est caractérisée par une obstruction des artères coronariennes par des stries lipidiques. Cette obstruction empêche l'irrigation normale du coeur en diminuant l'apport en oxygène des tissus cardiaques. Le manque d'apport en nutriments et en oxygène au coeur, résultant d'une obstruction partielle des vaisseaux, cause des douleurs

thoraciques appelées angine. Éventuellement, l'obstruction totale du vaisseau par un thrombus cause un infarctus du myocarde aussi connu sous le terme de «crise cardiaque» (Garg 2011).

La maladie qui réfère aux vaisseaux sanguins extérieurs au cerveau et au coeur est la maladie artérielle périphérique. La maladie artérielle périphérique occlusive entraîne une perte de fonctionnalité des membres qui peut se diviser en 4 stades décrit par le Dr. Fontaine en 1954 allant de la claudication (douleur modérée à la marche) à la gangrène (perte de tissu) (Fontaine, Kim et al. 1954).

1.3.2. Les facteurs de risque à l'origine du développement des maladies cardiovasculaires athérosclérotiques

Les facteurs de risque associés au développement de l'athérosclérose sont nombreux. Le tabagisme, l'hypercholestérolémie, le diabète, l'âge, le sexe et l'obésité en sont quelques exemples (Rivard, Silver et al. 1999; Rivard, Berthou-Soulie et al. 2000; Michaud, Dussault et al. 2006; Packard and Libby 2008; Perez-Lopez, Larrad-Mur et al. 2010). De plus, le vieillissement de la population nécessite une nouvelle perspective sur les maladies chroniques reliées à l'âge. Malheureusement, les mécanismes reliant les facteurs de risque au développement de ces maladies sont encore peu connus.

1.4. Le stress oxydant comme dénominateur commun

Un point commun à tous les facteurs de risque cardiovasculaire est l'augmentation du stress oxydant. Le stress oxydant est associé à une augmentation des espèces radicalaires oxygénées ou ROS (*Reactive Oxygen Species*). La plus importante espèce radicalaire oxygénée est l'anion superoxyde (O_2^-). La concentration de superoxydes dépend de la balance entre sa production (NADPH oxydase, xanthine oxydase, chaîne de respiration mitochondriale) et son élimination par différentes enzymes incluant la superoxyde dismutase (SOD). Au niveau de la paroi vasculaire, l'isoenzyme prédominante de la superoxyde dismutase est la CuZnSOD ou SOD-1.

1.5. La néovascularisation: mécanisme physiologique en réponse à l'ischémie

L'athérosclérose peut causer d'importantes obstructions au flot sanguin, ce qui empêche l'irrigation normale des tissus et provoque une ischémie tissulaire. Les maladies athérosclérotiques sont d'ailleurs à l'origine de plusieurs complications cliniques dont l'accident vasculaire-cérébral et l'infarctus du myocarde. Lorsque l'athérosclérose est tellement diffuse que les techniques de revascularisation

chirurgicales ne peuvent être effectuées, la sévérité de l'ischémie dépendra alors de la capacité de l'organisme à former de nouveaux vaisseaux sanguins (néovascularisation). Les mécanismes qui modulent la néovascularisation en réponse à l'ischémie et le rôle du stress oxydant dans cette physiopathologie ne sont pas bien définis.

1.6. L'absence de consensus nuit à l'évolution du savoir

Le stress oxydant est inévitable car les être humains ont besoin d'oxygène pour vivre. Cependant, le rôle précis du stress oxydant dans la néovascularisation en réponse à l'ischémie n'est pas bien défini. D'une part, le stress oxydant est nécessaire à la formation de néovaisseaux. D'autre part, des niveaux exacerbés de stress oxydant nuisent à la néovascularisation. C'est donc la balance entre la production et l'élimination du stress oxydant qui permet la régulation de la néovascularisation. La compréhension de l'impact du stress oxydant et des mécanismes de défense antioxydante de l'organisme est nécessaire à l'élaboration de futurs traitements de la maladie cardiovasculaire athérosclérotique.

Dans cette thèse, nous aborderons le rôle et l'importance de la balance oxydants/antioxydants dans la néovascularisation en réponse à l'ischémie. L'augmentation du stress oxydant (et plus particulièrement des anions superoxydes)

est ici proposée comme étant responsable de l'inhibition de la néovascularisation post-ischémique associée à différents facteurs de risque cardiovasculaire.

Dans un premier temps, nous discuterons brièvement des maladies cardiovasculaires. Ensuite, les différents facteurs de risque cardiovasculaires seront abordés. Puis, l'athérosclérose et les différentes structures vasculaires atteintes seront mieux définies. Nous aborderons la première manifestation de l'athérosclérose, la dysfonction endothéliale. Par la suite, les mécanismes physiologiques impliqués dans la réponse à l'ischémie incluant l'angiogenèse, l'artériogenèse et la vasculogenèse post-natale seront discutés. La vasculogenèse post-natale fait intervenir les cellules progénitrices endothéliales (EPCs). Ce mécanisme récemment découvert sera abordé en profondeur car l'auteur du présent ouvrage le considère important pour la récupération néovasculaire.

Nous ferons ensuite un résumé des principaux mécanismes oxydo-réducteurs de l'organisme afin de mieux comprendre l'importance du stress oxydant dans le développement des maladies cardiovasculaires athérosclérotiques. Puisque l'enzyme CuZnSOD est une des plus importantes enzymes antioxydantes au niveau de la vasculature, cette thèse fera également état de son rôle fondamental dans le maintien de l'homéostasie vasculaire et permettra ainsi de mieux définir son rôle dans la néovascularisation en réponse à l'ischémie.

2. Le système vasculaire

2.1. Le vaisseau sanguin

Le coeur et les vaisseaux sanguins sont à la base du système cardiovasculaire. Ils sont en effet la pompe et la tuyauterie responsables de la distribution du sang dans l'organisme. Cette tuyauterie se compose de vaisseaux de divers calibres permettant d'irriguer l'ensemble de l'organisme (artères) et d'en éliminer les déchets (veines et vaisseaux lymphatiques). Puisque les maladies cardiovasculaires athérosclérotiques affectent principalement le système artériel, le présent document se concentrera sur ce système en particulier.

2.1.1. Les vaisseaux de grands calibres; les artères

Une artère est constituée de trois (3) couches concentriques bien définies autour de sa lumière (*Figure 1 p.30*). Chaque couche est composée de cellules et de matrices extracellulaires distinctes.

La couche adjacente à la lumière du vaisseau est l'intima qui est composée principalement de cellules endothéliales formant la barrière entre le sang et le stroma (mésenchyme tissulaire). Suit une mince couche, la limitante élastique interne, qui sépare la seconde couche, la média, de l'intima.

La média est principalement constituée de cellules musculaires lisses organisées en couches concentriques. Le nombre de couches varie selon le calibre de l'artère. La matrice extracellulaire est principalement composée de fibres élastiques et de collagène avec un contenu moins important de protéoglycans. Une augmentation du contenu élastique est typique des grandes artères qui doivent pouvoir répondre aux changements de pression. Une autre couche, la limitante élastique externe, sépare la média de la couche extérieure, l'adventice.

L'adventice est une couche normalement constituée d'une matrice élastique lâche, de cellules musculaires lisses, de fibroblastes et de collagène. L'alimentation de l'artère en vaisseaux sanguins (*vasa vasorum*) et en terminaisons nerveuses se fait par l'adventice (Stocker and Keaney 2004). Bien que l'adventice ait déjà été considérée comme une couche neutre et inactive, elle joue un rôle important dans le contrôle du remodelage vasculaire et de la bioactivité du NO, via la production d'espèces radicalaires oxygénées (Rey and Pagano 2002).

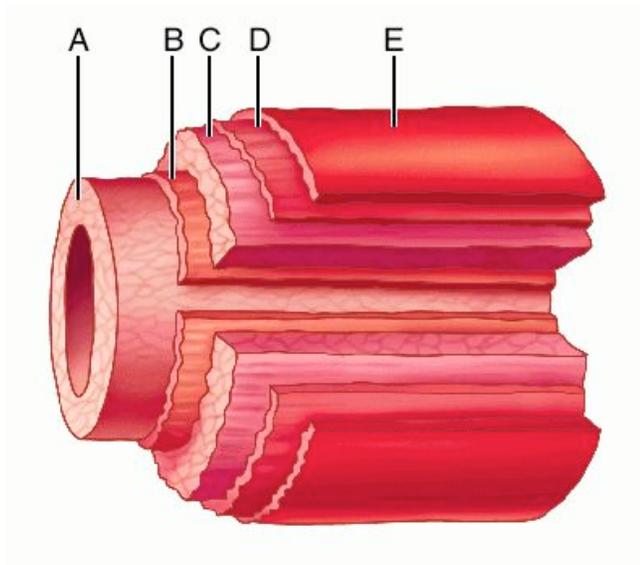


Figure 1. Structure de l'artère: A) *Intima* B) *Limitante élastique interne* C) *Média* D) *Limitante élastique externe* E) *Adventice* (Newman 2007).

2.1.2. Les vaisseaux de calibres intermédiaires: les artérioles

Une artériole est une artère de moindre calibre (diamètre moyen d'environ 30 micromètres) rattachant une artère au réseau capillaire (Kurbel, Gros et al. 2009). L'artériole est petite mais sa couche musculaire lui permet une grande capacité de contraction. En se contractant, l'artériole peut complètement supprimer l'irrigation d'un tissu. C'est aussi cette capacité de contraction qui régule la pression sanguine et la résistance vasculaire périphérique de l'organisme.

2.1.3. Les vaisseaux de petits calibres: les capillaires

Les capillaires font partie du réseau de la microcirculation (diamètre moyen d'environ 5 micromètres) (Aird 2007; Kurbel, Gros et al. 2009). Les capillaires sont de petits vaisseaux formés uniquement de cellules endothéliales entourées de membrane basale (sans couche musculaire). N'ayant qu'une cellule d'épaisseur, ces vaisseaux permettent l'échange de nutriments, d'oxygène et de déchets entre le tissu et la circulation sanguine (Moore and Ruska 1957).

2.2. L'endothélium: rôle de barrière physiologique

La monocouche cellulaire tapissant la lumière vasculaire et le cœur se nomme endothélium. Cette mince couche de cellules endothéliales constitue le plus grand « organe » de tout le corps humain (Stocker and Keaney 2004). Les cellules endothéliales sont ancrées dans une membrane basale composée de matrice extracellulaire et de protéoglycans eux-mêmes bordés par la limitante élastique interne. Des cellules musculaires lisses peuvent se retrouver à l'occasion dans l'intima, mais les cellules endothéliales sont la principale composante de cette couche anatomique et forment une barrière physique et fonctionnelle entre le sang et le stroma du mur artériel.

En plus de faire la jonction entre le flot sanguin et la paroi vasculaire, l'endothélium permet de maintenir une perméabilité sélective entre les éléments circulants du sang et les tissus sous-jacents (Stocker and Keaney 2004). L'endothélium permet le maintien de l'intégrité vasculaire en prenant part dans des activités anticoagulantes, antiplaquettaires et fibrinolytiques (Alom-Ruiz, Anilkumar et al. 2008). De par son contact étroit avec les cellules sanguines, l'endothélium est également impliqué dans la réponse immune innée et adaptative du système immunitaire. L'endothélium est aussi responsable de la conservation de l'état quiescent des cellules musculaires lisses vasculaires (Alom-Ruiz, Anilkumar et al. 2008).

Enfin, l'endothélium a un rôle important dans l'activité vasomotrice du vaisseau sanguin (vasodilatation/vasoconstriction) en réponse à divers stimuli (Behrendt and Ganz 2002). En effet, l'activité de l'endothélium est coordonnée par une multitude de facteurs vasodilatateurs (oxyde nitrique (NO), prostacycline, EDHF (*Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor*)) et vasoconstricteurs (endothéline, angiotensine-II, thromboxane). Son activité est aussi régulée par des enzymes comme ACE (*Angiotensin-Converting Enzyme*), tPA (*tissue Plasmigen Activator*) et eNOS (*endothelial Nitric Oxide Synthase*) ainsi que par certains marqueurs de surface spécifiques comme les molécules d'adhésion cellulaires (ICAM-1 (*Inter-Cellular Adhesion Molecule-1*), VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*), E-sélectine).

2.3. L'altération de l'endothélium: origine de plusieurs maladies cardiovasculaires

Puisque l'endothélium est régi par une multitude de facteurs, celui-ci a une grande capacité d'altération phénotypique à divers stimuli (Alom-Ruiz, Anilkumar et al. 2008). Cette capacité d'adaptation est essentielle pour la préservation de l'homéostasie vasculaire. Des altérations dans l'expression ou la concentration de certains médiateurs peuvent engendrer une dysfonction de l'endothélium. La dysfonction endothéliale est elle-même à l'origine de plusieurs maladies cardiovasculaires comme l'athérosclérose, les valvulopathies, l'insuffisance cardiaque et l'hypertension (Cai and Harrison 2000). Les causes de la dysfonction endothéliale seront abordées dans la section 4.

3. Les facteurs de risque cardiovasculaire

De larges études épidémiologiques ont identifié plusieurs facteurs de risque associés au développement de la maladie coronarienne (Labarthe 1998). Les facteurs de risque cardiovasculaire se divisent en deux catégories: les facteurs de risque modifiables qui sont souvent liés aux habitudes de vie, et les facteurs de risque non-modifiables qui sont reliés à la constitution physique et génétique de l'individu.

Les facteurs de risque traditionnels établis sont l'âge, l'histoire familiale et les risques dits modifiables c'est-à-dire des niveaux élevés de lipides, le tabagisme, l'hypertension artérielle et le diabète. D'autres facteurs de risque incluant une vie de type sédentaire, des facteurs psychosociaux (ex. le stress) et l'obésité ont récemment été rapportés comme prédisposant au développement de maladies cardiovasculaires athérosclérotiques. Fait alarmant, 9 Canadiens sur 10 possèdent au moins un facteur de risque cardiovasculaire (Canada 2009).

3.1. Les facteurs de risque modifiables

3.1.1. Le tabagisme: un risque évitable

Le tabagisme est le facteur de risque modifiable qui est responsable du plus important nombre de morts prématurées aux États-Unis (Lloyd-Jones, Adams et al.

2009). Au Canada, le tabagisme cause plus de 37 000 décès par année, dont le tiers est relié aux maladies cardiovasculaires et/ou infarctus du myocarde (Canada 2010). L'association entre le tabagisme et la morbidité/mortalité cardiovasculaire est bien établie (Health. 2004). Cependant, les mécanismes impliqués dans la modulation du risque cardiovasculaire par le tabagisme sont complexes. Le tabagisme est associé à la dysfonction endothéliale et l'épaississement de la paroi vasculaire (Thomas, Chook et al. 2008; Jiang, Lao et al. 2009). De plus, l'accélération de la progression de l'athérosclérose par le tabagisme a été démontrée dans plusieurs études (Diana 1990). Les effets athérogéniques du tabagisme sont induits par différents médiateurs contribuant au développement de l'athérosclérose. Le tabagisme induit, entre autre, l'élévation sérique des niveaux de cholestérol total et des LDL (*Low Density Lipoprotein*), une augmentation de la pression artérielle et une diminution des niveaux de HDL (*High Density Lipoprotein*) (Weitzman, Cook et al. 2005).

De façon intéressante, le fait de fumer des cigarettes à faible teneur en nicotine et en goudron ne diminue pas le risque d'infarctus du myocarde. C'est l'exposition prolongée de la paroi vasculaire aux composés de la fumée de cigarette qui favorise le développement des maladies cardiovasculaires (Baldassarre, Castelnuovo et al. 2009). Les fumeurs ont deux fois plus de risque de présenter un infarctus et deux à quatre fois plus de risque de morts soudaines comparés aux non-fumeurs. Cependant, les patients qui cessent de fumer pendant 5 ans ont le même risque de maladies cardiovasculaires que les non-fumeurs (Teo 2005). L'abandon du tabagisme est donc essentielle pour prévenir le développement des maladies cardiovasculaires athérosclérotiques.

3.1.2. L'hypertension artérielle

L'hypertension artérielle est le facteur de risque qui affecte le plus grand nombre d'Américains (Lloyd-Jones, Adams et al. 2009). Au Canada, 5 millions d'adultes ont une pression sanguine élevée, soit environ 19% de la population adulte. Une autre tranche de 20% de Canadiens adultes présente des signes de pré-hypertension (Wilkins 2010).

Des études ont démontré que l'hypertension artérielle systolique et diastolique augmente le risque individuel de développer des maladies coronariennes, des infarctus du myocarde, des défaillances cardiaques, des maladies vasculaires périphériques et des problèmes rénaux (Black 1992). L'hypertension est souvent associée à d'autres facteurs de risque cardiovasculaire, en particulier l'obésité, des niveaux élevés de cholestérol et de triglycérides sanguins, et le diabète (Lloyd-Jones, Adams et al. 2009). Par ailleurs, le risque d'événements cardiovasculaires est directement proportionnel au niveau de pression artérielle (Black 1992).

La prise d'hypertenseurs permet d'abaisser la pression artérielle en améliorant la compliance des vaisseaux sanguins. Des études ont d'ailleurs démontré que la prise d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) retarde la progression de la plaque athérosclérotique (Curzen and Fox 1997).

3.1.3. La dyslipidémie et l'hypercholestérolémie

L'hypercholestérolémie et la dyslipidémie sont deux désordres du métabolisme des lipides. La dyslipidémie est caractérisée par une quantité anormale de lipides en circulation sanguine. Les paramètres mesurables de cette anomalie sont une augmentation des niveaux de LDL-c (*Low Density Lipoprotein-cholesterol*), des triglycérides ou une diminution des niveaux de HDL-c (*High Density Lipoprotein-cholesterol*). Ces phénomènes sont grandement attribuables à l'augmentation des niveaux de lipides dans l'organisme par une diète riche en gras et, moins fréquemment, à une dysfonction des transporteurs des lipides (lipoprotéines, chylomicrons).

L'hypercholestérolémie est une forme de dyslipidémie caractérisée par une élévation des niveaux de cholestérol sanguin. Le cholestérol est une substance souple et cireuse de la famille des lipides qui se retrouve dans la circulation sanguine et dans la composition de la membrane cellulaire. Les LDL sont les transporteurs majoritaires du cholestérol dans le sang. Lorsqu'il y a trop de LDL, le cholestérol se retrouvera en circulation sanguine et celui-ci s'accumulera progressivement dans la paroi artérielle (Steinberg 2005).

Au Canada, environ 40% de la population adulte présentent un taux de cholestérol sanguin élevé (Canada 2009). Plusieurs études cliniques ont démontré que le contrôle de l'hypercholestérolémie réduit le risque de maladies

cardiovasculaires (Bilheimer 1988). Les statines sont couramment utilisées comme hypolipidémiant. Ceux-ci permettent de régulariser la quantité de lipides en circulation sanguine et de diminuer le dépôt potentiel de stries lipidiques au niveau de la paroi vasculaire, processus à l'origine du développement de plaques athérosclérotiques (Bilheimer 1988). De récentes études ont démontré que les statines peuvent aussi avoir un effet hypotenseur (Strazzullo, Kerry et al. 2007). En effet, les statines augmentent la production endothéliale de NO (oxyde nitrique) en favorisant l'expression de la eNOS (*endothelial Nitric Oxide Synthase*) (Kalinowski, Dobrucki et al. 2002; Kalinowski, Dobrucki et al. 2002). Récemment, des équipes ont observé que les statines avaient aussi un rôle à jouer dans la diminution des niveaux de stress oxydant et d'inflammation dans la vasculature (Walter, Fichtlscherer et al. 2001; Cangemi, Loffredo et al. 2008; Bloom, Shukrullah et al. 2010). De futurs travaux sont cependant nécessaires à la compréhension de tous les effets des statines sur la vasculature.

3.1.4. Diabète : les 2 types de diabète augmentent le risque cardiovasculaire

Le diabète mellitus est une maladie caractérisée par une diminution de la sécrétion d'insuline (type 1) ou une résistance à l'action de l'insuline (type 2). Dans les deux cas, ceci cause une augmentation du taux glycémique sanguin. Qu'il soit de type 1 ou de type 2, le diabète augmente le risque de mortalité/morbidité cardiovasculaire (Beckman, Creager et al. 2002). Ce risque est potentialisé

lorsqu'additionné à un ou plusieurs autres facteurs de risque cardiovasculaire. De plus, les individus avec un indice glycémique élevé sans diabète détectable présentent aussi un risque de maladies cardiovasculaires plus élevé que des individus normoglycémiques.

Alors que le diabète de type 1 se développe généralement tôt (enfance adolescence), le diabète de type 2 s'acquiert avec l'âge et est associé à un surplus de poids et une résistance à l'insuline. Selon le système national de surveillance du diabète, un diabète de type 2 a été diagnostiqué chez 6.6% de la population âgée de plus de 20 ans (Canada 2009). L'association canadienne du diabète mentionne qu'environ 90% des cas de diabètes sont de type 2. Les études projettent d'ailleurs que 2,4 millions de Canadiens seront atteints de diabète d'ici 2016 (Association 2008).

En plus des complications microvasculaires établies du diabète (néphropathies, rétinopathies), le diabète est aussi associé avec de nombreuses complications macrovasculaires incluant les maladies coronariennes et les maladies artérielles périphériques (Beckman, Creager et al. 2002). En effet, des niveaux élevés d'insulinémie (diabète de type 2) favorisent l'augmentation de la pression artérielle et la déposition de stries lipidiques au niveau de la paroi vasculaire. De plus, les patients diabétiques ont un risque 2-4 fois plus élevé de développer des maladies coronariennes, cérébrales et périphériques par rapport à une population non-diabétique. Plusieurs études suggèrent d'ailleurs que le diabète et le tabagisme sont

les deux facteurs de risque prédominants pour le développement des maladies cardiovasculaires périphériques (Black 1992).

Alors que le diabète de type 2 est au moins partiellement évitable au moyen d'une bonne alimentation et de saines habitudes de vie, le diabète de type 1 est de nature auto-immune ce qui rend sa prévention impossible à ce jour. Les moyens de contrer le développement de l'athérosclérose causé par le diabète sont donc le traitement rapide et adéquat du débalancement glycémique ainsi que le contrôle serré des autres facteurs de risque associés.

3.1.5. Obésité : le surplus de poids est mauvais pour le coeur

L'obésité est maintenant reconnue comme un facteur de risque majeur pour les maladies cardiovasculaires. L'obésité existe sous deux formes:

- les graisses sont principalement retrouvées à la ceinture abdominale (forme pomme)
- les graisses sont principalement déposées au niveau des hanches, des cuisses et du postérieur (forme poire).

L'obésité androïde (forme pomme) est celle qui semble le plus étroitement liée non seulement aux risques cardiovasculaires mais également aux développements d'autres facteurs de risque tels l'hypertension, l'augmentation des triglycérides, la diminution des HDL, l'hyperglycémie et le diabète mellitus (Black 1992). Bien que

l'athérosclérose et l'obésité soient deux maladies distinctes, elles ont néanmoins une évolution pathophysiologiques similaires. En effet, ces deux maladies furent à l'origine décrites comme des désordres lipidiques (Ross and Harker 1976). Plus récemment, la composante inflammatoire de ces deux maladies permit d'établir un lien causal (Rocha and Libby 2009). Les études conduites chez l'humain et l'animal ont démontré que l'obésité favorise l'infiltration de macrophages dans les tissus adipeux (Hotamisligil, Shargill et al. 1993; Steinberg 2005; Steinberg 2006). Ces cellules peuvent alors sécréter d'importantes quantités de molécules inflammatoires qui pourraient contribuer au développement de l'athérosclérose (Rocha and Libby 2009). Cependant, d'autres études sont nécessaires à la meilleure définition de ces mécanismes.

3.2. Les facteurs de risque non-modifiables

3.2.1. Les antécédents familiaux

Des études ont démontré que les antécédents familiaux, c'est-à-dire l'héritage génétique d'un individu, font partie des facteurs de risque cardiovasculaire (Lusis, Fogelman et al. 2004; Lusis, Fogelman et al. 2004). L'hypertension, l'hyperlipidémie, le diabète de type II et l'hypercholestérolémie sont des facteurs de risque cardiovasculaire dont l'incidence est augmentée chez des individus ayant une histoire familiale positive pour ces facteurs (Broeckel, Hengstenberg et al. 2002; Genest J 2007; Force 2008). De plus, si un ou plusieurs membres de la famille a souffert d'un

infarctus du myocarde avant l'âge de 55 ans, les risques de présenter un infarctus du myocarde sont augmentées de 50% comparativement à la population générale (Broeckel, Hengstenberg et al. 2002).

3.2.2. Le sexe : les femmes sont naturellement protégées contre les maladies cardiovasculaires

Que ce soit parce que les hommes possèdent des androgènes ou parce que les femmes possèdent des œstrogènes, les hommes sont plus à risque de développer des maladies cardiovasculaires. L'effet protecteur des oestrogènes semble déterminant et contribue à expliquer le fait que les femmes deviennent de plus en plus à risque après la ménopause (Black 1992). Néanmoins, des études ont démontré que la thérapie par hormones de remplacement serait favorable à la prévention primaire des maladies cardiovasculaires (c'est-à-dire en absence d'événements cardiovasculaires antérieurs) chez la femme ménopausée (Mosca et al. 2001). Les effets cardioprotecteurs des œstrogènes incluent l'augmentation des niveaux de HDL, la diminution des niveaux de LDL et l'augmentation de vasodilatateurs (NO, PGI2 (prostacycline)) (Perez-Lopez, Larrad-Mur et al. 2010).

3.2.3. Le vieillissement

L'âge est un facteur de risque cardiovasculaire important puisqu'il altère la structure et la fonction cardiovasculaire chez des individus sains (Lakatta and Levy

2003). Cependant, les changements morphologiques causés par le vieillissement (physiologique) sont difficiles à départager des changements pathologiques induits par les maladies.

Dans un organisme sain, le processus de vieillissement est associé à des changements hémodynamiques et métaboliques qui accélèrent le développement de maladies cardiovasculaire (Lakatta 2003). Ces changements physiologiques associés à l'âge sont l'épaississement de la paroi artérielle, la dilatation luminale et une réduction de la compliance des vaisseaux sanguins (Lakatta 2003). Plus spécifiquement, les artères coronariennes deviennent plus tortueuses et dilatées. Une rigidité progressive s'installe au niveau de l'intima causée, d'une part, par le déclin de la compliance ou de la distensibilité tissulaire, et, d'autre part, par une augmentation des dépôts de calcium, de phospholipides et de cholestérol (Ribera-Casado 1999). Les cellules endothéliales deviennent hétérogènes en terme de grosseur, de forme et d'orientation axiale. De plus, la fonction endothéliale diminue avec l'âge, ce qui augmente la rigidité artérielle (Lakatta 2003). La dysfonction endothéliale associée au vieillissement est partiellement causée par une diminution de la production de vasodilatateurs tels que le NO et les prostacyclines, et une réduction de la réponse des cellules musculaires lisses à ces vasodilatateurs (Minamino and Komuro 2008). Enfin, dans la média, les principaux changements sont la fragmentation des fibres élastiques et l'augmentation de la calcification (Ribera-Casado 1999).

Dans un contexte pathologique, le vieillissement augmente l'incidence d'autres facteurs de risque cardiovasculaire tels que le diabète de type 2 et

l'hypertension (Driver, Djousse et al. 2008). De plus, le processus de vieillissement augmente le temps d'exposition aux autres facteurs de risque cardiovasculaire (chronicité), et augmente aussi le taux de mortalité suite à un événement cardiovasculaire (Driver, Djousse et al. 2008; Versari, Daghini et al. 2009). Le vieillissement a donc été proposé comme l'un des facteurs de risque des maladies athérosclérotiques les plus importants: 1) parce qu'il augmente l'incidence d'autres facteurs de risque cardiovasculaire et 2) parce que les changements artériels associés à l'âge (dysfonction endothéliale, hyperplasie néointimale, augmentation de l'adhésion des monocytes/macrophages à la paroi vasculaire) prédisposent les vaisseaux sanguins au développement accéléré de l'athérosclérose (Lakatta and Levy 2003; Minamino and Komuro 2007).

3.2.3.1. La sénescence cellulaire

Le vieillissement du corps est associé au vieillissement cellulaire (sénescence). La sénescence cellulaire peut être définie comme l'arrêt du cycle cellulaire et l'épuisement du potentiel répliatif de la cellule. Contrairement à la quiescence, la sénescence est irréversible et les cellules ne peuvent plus initier leur cycle cellulaire en réponse à des mitogènes (Costopoulos, Liew et al. 2008). La sénescence est accompagnée de changements dans la morphologie, dans l'expression génique et dans la fonction de la cellule (Costopoulos, Liew et al. 2008). Les cellules endothéliales sénescents sont plus grosses et plus longues, ont une diminution de l'expression de eNOS et une augmentation de l'expression de molécules pro-inflammatoires (Minamino, Yoshida et al. 2003). La sénescence vasculaire *in vivo*

contribue donc à la pathogenèse du vieillissement vasculaire. Le vieillissement diminue également les propriétés antithrombotiques de l'endothélium. L'interaction entre les monocytes et les cellules endothéliales senescentes favorise ainsi l'athérogenèse (Maier, Statuto et al. 1993).

Les cellules en arrêt répliatif ont des télomères courts. Les télomères sont des complexes protéiques localisés à la fin des chromosomes. Ils servent à protéger l'ADN lors de la répliation semi-conservative, c'est-à-dire lors de la synthèse d'un nouveau fragment d'ADN à partir d'un fragment provenant de la double hélice «originale» (Meselson and Stahl 1958; Minamino, Yoshida et al. 2003). La télomérase est la protéine ribonucléaire qui ajoute les télomères aux extrémités chromosomiques (Minamino, Yoshida et al. 2003). Puisque les extrémités des chromosomes ne sont pas complètement dupliquées, les télomères raccourcissent après chaque répliation cellulaire. Ce mécanisme permet de garder l'intégrité de l'ADN. Des évidences indiquent que le rétrécissement des télomères dans la vasculature humaine pourrait être relié aux maladies vasculaires causées par le vieillissement (Minamino and Komuro 2002). Des études ont par ailleurs démontré que les cellules endothéliales de la plaque athérosclérotique possèdent un phénotype de sénescence, ce qui pourrait contribuer à l'athérogenèse (Samani, Boulby et al. 2001; Minamino, Miyauchi et al. 2002).

D'autres signaux indépendants des télomères peuvent aussi provoquer un phénotype de sénescence cellulaire. La sénescence cellulaire activée par des stimuli mitogéniques comme Ras ou E2F est indépendante de l'âge répliatif et est associée à

une accumulation de protéines p53 et p16 (Minamino, Yoshida et al. 2003). Ce phénomène est souvent qualifié de pré-sénescence et est associé à un dommage oxydant initial (Minamino, Miyauchi et al. 2004; Erusalimsky 2009). Brièvement, le stress oxydant s'accumule dans le corps causant des dommages cellulaires et à l'ADN. Plus les cellules d'un tissu sont endommagées, plus elles devront être remplacées. Puisque l'âge est caractérisé par un ralentissement général de la prolifération cellulaire (sénescence), l'incapacité à régénérer les cellules abîmées engendrera une perte de fonction tissulaire et une diminution de l'activité de l'organe atteint.

Enfin, toutes les caractéristiques du vieillissement et de la sénescence cellulaire peuvent être retrouvées dans les cellules de la plaque athérosclérotique (Minamino, Miyauchi et al. 2002). Cependant, les mécanismes précis responsables du de vieillissement vasculaire restent encore à définir.

En résumé, la maladie athérosclérotique est gouvernée par un nombre de facteurs génétiques et environnementaux qui peuvent exercer des effets divers sur l'arbre artériel (Verma 2005). Afin de mieux comprendre l'expression finale de cette maladie, la compréhension de son origine et de son développement est une étape cruciale.

4. L'athérosclérose

L'athérosclérose se définit comme une atteinte des grosses et des moyennes artères par une accumulation de stries lipidiques dans la paroi vasculaire (Steinberg 2005). Ce désordre systémique de l'arbre vasculaire se développe lentement et progressivement tout au long de l'existence. L'athérosclérose touche préférentiellement les bifurcations et les courbures; là où les forces de cisaillement sont les plus grandes (Libby 2002). La plaque d'athérosclérose est associée à une dysfonction endothéliale, une activation des molécules d'adhésion et une dysfonction de la vasorelaxation et des propriétés antiplaquettaires/anticoagulantes de l'endothélium (Libby, Ridker et al. 2002).

4.1. L'évolution de l'athérosclérose

L'évolution de l'athérosclérose se fait en 3 stades (Paul 2009):

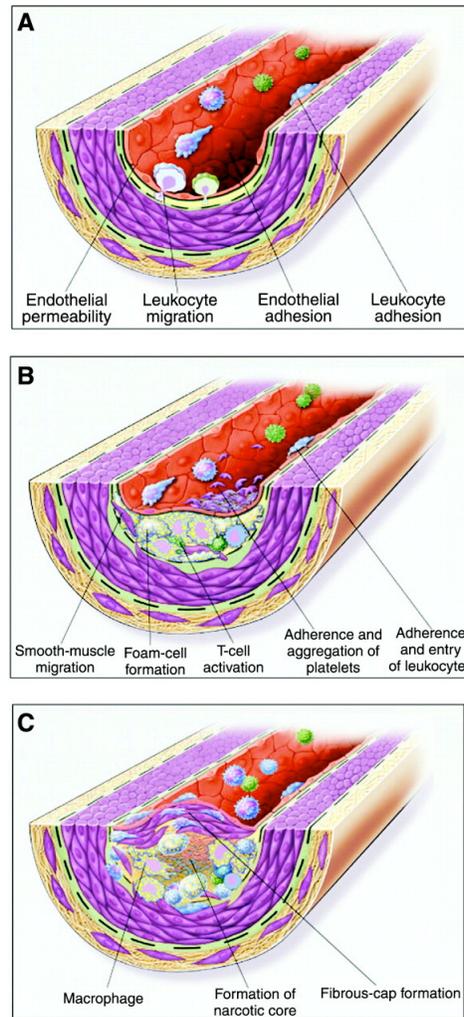


Figure 2. Stades précoces de l'athérosclérose:

A) Vaisseau normal. B) Athérome. C) Sténose (Stocker and Keaney 2004).

4.1.1. L'athérome: premier stade visible

La plaque d'athérome est caractérisée par une accumulation de lipides et de tissus fibreux dans la paroi vasculaire (*Figure 2 p.48*). Tout d'abord, une injure cause une brèche dans l'uniformité de la monocouche endothéliale. Cette brèche crée une rugosité qui favorise le contact avec les lipides et leur dépôt sur la paroi vasculaire. La dysfonction endothéliale subséquente à cette injure diminue la sécrétion de NO, ce qui favorise l'adhésion des leucocytes et des plaquettes à l'endothélium ainsi que la migration des cellules musculaires lisses de la média vers l'intima. Les lipides oxydés se retrouvant dans la paroi vasculaire favorisent le recrutement et le passage des leucocytes vers la couche sous-endothéliale. Ce dépôt sous-endothélial engendre une saillie à l'intérieur de l'artère, causant des turbulences et un obstacle au flux sanguin.

4.1.2. La sténose: progression de l'obstruction vasculaire

Lorsque le développement de la plaque d'athérome obstrue de plus en plus la lumière artérielle, on parle de sténose (*Figure 2, p.48*). L'appel de cellules inflammatoires dans la paroi vasculaire causée par l'injure à l'endothélium engendre une boucle d'amplification positive favorisant un recrutement toujours plus grand de leucocytes dans l'espace sous-endothélial. Les cellules musculaires lisses maintenant contenues dans l'intima se mettent à proliférer de manière anarchique. La surcharge

cellulaire dans ce petit espace engendre des processus de mort cellulaire. Les organes et tissus desservis par l'artère affectée deviennent ischémiques, c'est-à-dire en manque d'oxygène et de nutriments (ex: angine de poitrine, claudication des membres inférieurs).

La composition de la matrice extracellulaire a également un rôle à jouer dans la progression de l'athérosclérose (Nakashima, Wight et al. 2008). Les protéoglycans, une composante importante de la matrice extracellulaire, contribuent à la rétention de lipides athérogènes dans l'intima (Williams and Tabas 1995; Tabas, Williams et al. 2007). La liaison LDL-protéoglycans forme des agrégats et des structures vésiculaires susceptibles à l'oxydation (Camejo, Fager et al. 1993; Tabas, Li et al. 1993). Ces complexes oxydés favorisent la chémoattraction des monocytes-macrophages qui exacerbent l'état sténosant (Williams and Tabas 1995).

4.1.3. La thrombose: complication sévère et aigue de la plaque athérosclérotique

La complication la plus sévère de l'athérosclérose dérive de l'occlusion artérielle thrombotique consécutive à l'érosion et la rupture de la plaque athérosclérotique. Ce phénomène est dû à la formation d'un caillot qui obstrue complètement l'artère et entraîne la mort des tissus en aval (infarctus du myocarde, infarctus cérébral, atteinte d'un membre).

L'incidence de la rupture de la plaque et des événements thrombotiques est corrélée aux aspects morphologiques et histologiques de la plaque instable. Les plaques d'athérome qui progressent rapidement ont une large capsule lipidique, une grande concentration de cellules inflammatoires et un mince cap fibreux. On les appelle les "*soft plaques*". Les plaques plus stables avec une progression plus lente ont une capsule lipidique plus petite et une activité inflammatoire plus faible. Leur cap fibreux est souvent plus calcifié (Verma 2005; Shanmugam, Roman-Rego et al. 2010). Dans environ 60% des cas, c'est le cap fibreux de la plaque athérosclérotique qui rompt alors que l'autre 40% est attribuable à l'instabilité du corps lipidique (van der Wal and Becker 1999).

4.2. Évolution de la compréhension de l'athérosclérose d'hier à aujourd'hui

Traditionnellement, la compréhension de l'athérosclérose se basait sur l'hypothèse du cholestérol. En effet, mis à part l'âge, la concentration de LDL et de cholestérol a une valeur indubitable comme facteur de risque de futurs événements cardiovasculaires. Les médecins et biologistes considéraient alors l'athérosclérose comme un problème de tuyauterie (Packard et Libby 2008). Le degré de sténose sur un angiogramme et les symptômes et signes d'ischémie étaient les principaux outils attestant de l'athérosclérose. Malgré l'important rôle du cholestérol dans l'athérosclérose, plusieurs individus ayant eu un infarctus du myocarde ont des concentrations de cholestérol normales ou sous la barre de celle proposée par le

National Cholesterol Education Program. L'hypothèse du cholestérol n'explique donc que partiellement le développement de l'athérosclérose.

Dans les dernières décennies, la compréhension de la pathogenèse de l'athérosclérose a beaucoup évolué. Les nouvelles avancées en biologie ont démontré que les complications thrombotiques ne résultent pas nécessairement de sténoses. En effet, toutes les formes de dénudations endothéliales activent le système de coagulation via l'exposition de composés hautement thrombogéniques de la plaque (facteur tissulaire (TF), collagène, lipides) (van der Wal and Becker 1999). Des études ont également démontré une perte endothéliale associée à un thrombus plaquettaire à la surface de plusieurs plaques athérosclérotiques (Davies, Woolf et al. 1988). De plus, certains facteurs extérieurs à la plaque comme une pression artérielle élevée ou des facteurs thrombotiques systémiques peuvent précipiter l'occlusion vasculaire (Fuster, Badimon et al. 1992; Falk, Shah et al. 1995).

Dans ce contexte, les nouvelles hypothèses de la physiopathologie de l'athérosclérose incluent la dysfonction endothéliale, la réponse inflammatoire, la modification de la réponse vasculaire par le stress oxydant et l'interaction plaquettes/endothélium (Libby 2002). Au fil des années, trois (3) concepts majeurs ont été proposés pour décrire la pathogenèse de l'athérosclérose soient: 1) la réponse à l'injure; 2) la réponse à l'oxydation/rétention des lipides et 3) la réponse à l'inflammation.

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

En 1973, Ross et Glomset ont émis l'hypothèse de la réponse à l'injure (Ross and Glomset 1973). Dans ce concept, la dénudation endothéliale est le facteur déclencheur de l'augmentation de la réponse adhésive des plaquettes et des lymphocytes, faisant passer le microenvironnement d'anti- à pro-coagulant. Les cellules thrombocytaires et lymphocytaires adhérentes relâchent des molécules actives favorisant 1) la migration des cellules musculaires lisses vasculaires (VSMCs) et 2) le recrutement des monocytes/macrophages à la paroi vasculaire (Paul 2009). L'ingestion de grandes quantités de LDL par les macrophages les transforment peu à peu en cellules spumeuses, ce qui marque le début des lésions artérielles athérosclérotiques. Ce concept fut partiellement mis en doute par l'observation de lésions athérosclérotiques en présence d'un endothélium intact (Schleicher and Friess 2007).

4.2.2. L'hypothèse de la réponse à l'oxydation et la rétention des

LDL

L'observation du dépôt de cholestérol et de LDL fut, plus tard, associée à la localisation au niveau de l'artère plutôt qu'à la dénudation endothéliale. En effet, les bifurcations, c'est-à-dire là où les forces de cisaillement sont augmentées, sont plus susceptibles de développer des plaques d'athérosclérose (Gibson, Diaz et al. 1993). Ces constatations menèrent à la formulation d'une deuxième hypothèse: la réponse à

la rétention des LDL (Figure 3, p.54). Ce concept propose que l'entrée des LDL dans l'espace sous-endothélial est l'événement déclencheur de l'athérosclérose. Suite à leur entrée dans l'espace sous-endothélial, les LDL sont modifiés par des enzymes lipolytiques et protéolytiques. Ces modifications incitent leur rétention par les VSMCs et les macrophages, macrophages qui deviendront éventuellement cellules spumeuses (Schleicher and Friess 2007).

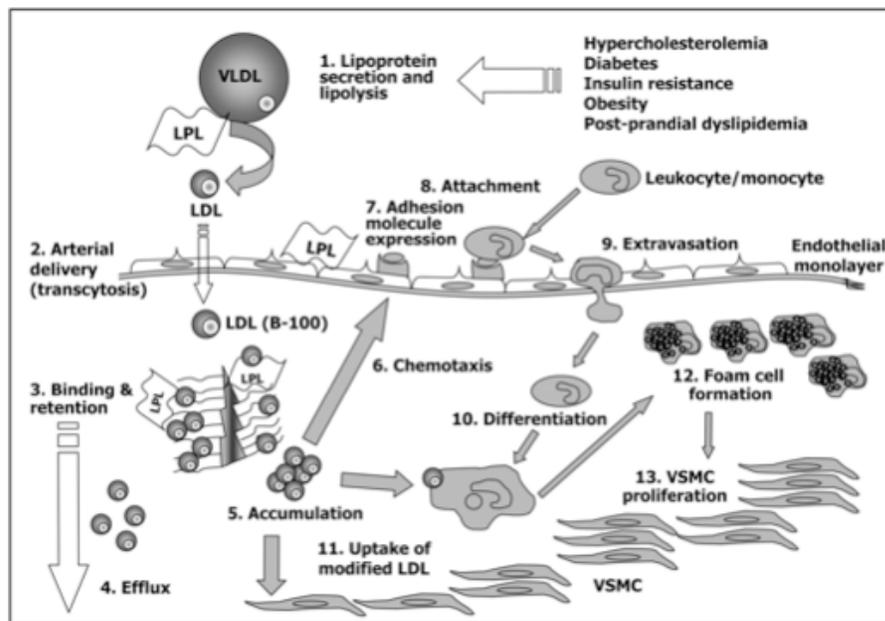


Figure 3. Hypothèse de la réponse à la rétention des LDL (Stocker and Keaney 2004).

L'équipe de Steinberg observa ultérieurement que la modification oxydative des LDL est une étape clé dans le processus athérogénique car les LDL oxydées dans l'espace sous-endothélial induisent l'activation de l'endothélium, c'est-à-dire l'augmentation de l'expression de certaines molécules d'adhésion. Cette activation

endothéliale favorise le recrutement des monocytes circulants vers l'espace sous-endothélial (*Figure 4, p.55*) (Steinberg et al. 2002). Cette invasion monocytaire, toxique pour les cellules endothéliales, cause en partie la dénudation endothéliale et la blessure à la paroi vasculaire. Enfin, les monocytes-macrophages deviennent cellules spumeuses puis nécrotiques par l'internalisation de grandes quantités de LDL oxydés ce qui peut également exacerber la dysfonction endothéliale (Stocker et Keaney 2004).

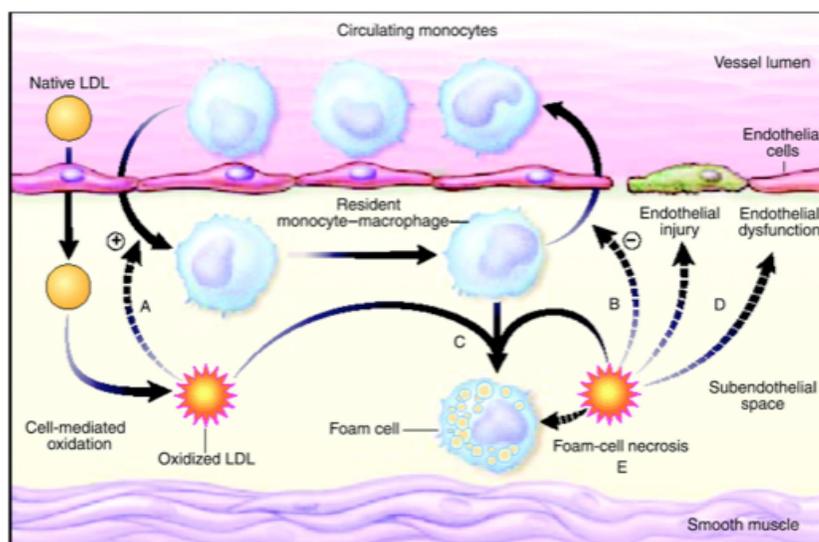


Figure 4. *Hypothèse de la modification oxydative des LDL* (Stocker and Keaney 2004).

4.2.3. L'hypothèse de la réponse à l'inflammation

Récemment, des équipes ont proposée l'inflammation comme principe pathogénique de l'athérosclérose (Libby 2002). En effet, les stries lipidiques, à elles

seules, ne causent pas de symptômes (Libby 2002). Celles-ci peuvent soit évoluer vers des formes plus complexes ou arrêter leur progression. C'est la rétention de lipoprotéines dans l'intima et plus spécifiquement leurs modifications oxydatives qui favorisent une réponse inflammatoire locale (Libby 2002). Cette réponse inflammatoire locale favorise l'appel et la rétention de macrophages dans l'espace sous-endothélial. De plus, les voies de l'inflammation semblent impliquées dans les réponses immunitaires acquises et innées de plusieurs facteurs de risque cardiovasculaire (Packard and Libby 2008).

En condition normale, les cellules endothéliales sont résistantes à l'adhésion leucocytaire. Des stimuli pro-inflammatoires incluant une diète riche en gras, l'hypercholestérolémie, l'obésité, l'hyperglycémie, la résistance à l'insuline, l'hypertension et le tabagisme favorisent l'expression endothéliale de molécules d'adhésion tel que les P-sélectines et VCAM-1. Ceci favorise le recrutement des monocytes circulants et des lymphocytes au niveau de la paroi vasculaire (Cybulsky and Gimbrone 1991; Cybulsky, Iiyama et al. 2001). De plus, des facteurs chimioattractants, comme le MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*) sont sécrétés par les cellules de la paroi vasculaire en réponse aux lipoprotéines modifiées, ce qui favorise la migration et la diapédèse des monocytes adhérents (Boring, Gosling et al. 1998; Gu, Okada et al. 1998).

Une fois adhérents, les monocytes pénètrent dans l'intima selon le gradient de MCP-1, via l'interaction avec le récepteur des monocytes CCR2 (Clinton, Underwood et al. 1992). Puis, à l'intérieur de l'intima, les monocytes se transforment

en macrophages et le facteur MCP-1 favorise l'expression de récepteurs macrophagiens tel que LOX-1, ce qui permet l'endocytose des lipoprotéines modifiées (Packard and Libby 2008). L'accumulation d'esters de cholestérol dans le cytoplasme transforme les macrophages en cellules spumeuses, des cellules caractéristiques des stades précoces de l'athérosclérose (Packard and Libby 2008).

Avec le développement de l'athérome, les cellules spumeuses commencent à sécréter des cytokines pro-inflammatoires qui maintiennent le stimulus de chimioattraction pour les cellules leucocytaires, augmentent le nombre de récepteurs et favorisent la réplication des macrophages.

Le maintien du stimulus inflammatoire est une composante importante de la progression de l'athérosclérose vers des lésions plus complexes. En réponse au facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) produit par les macrophages et les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses migrent de la média vers l'intima. La dégradation de la matrice extracellulaire par les métalloprotéinases (MMPs) et autres protéases produites par les macrophages favorisent cette migration (Mason, Kenagy et al. 1999). Dans l'intima, les cellules musculaires lisses prolifèrent sous l'influence de divers facteurs de croissance (*Transforming Growth Factor- β* (TGF- β) et PDGF) et sécrètent des protéines de la matrice extracellulaire incluant le collagène interstitiel (Packard and Libby 2008). Ce processus riche en lipides transforme la plaque athérosclérotique en une plaque fibreuse ultimement calcifiée et sténosante.

Les processus inflammatoires favorisent ensuite les complications thrombotiques aiguës de l'athérome. Les macrophages activés, abondants dans la plaque athéromateuse, peuvent produire des enzymes protéolytiques (MMPs) capables de dégrader le collagène qui retient fermement le cap fibreux. Le cap devient alors mince, faible et susceptible à la rupture (Libby 2002). La rupture du cap crée un thrombus par hémorragie locale. Ce thrombus bloque la circulation sanguine et induit une ischémie qui nuit aux fonctionnements des tissus en aval du caillot.

Notons que les macrophages ne sont pas les seuls à contribuer à la formation d'athérome. Les cellules T et les mastocytes sont également recrutés dans la plaque athérosclérotique (Libby 2002). Une fois dans l'intima, les cellules T s'activent au contact d'antigènes comme les oxLDL et commencent à sécréter des cytokines pouvant influencer l'activité des macrophages (Libby 2002). De la liaison CD40/CD40L entre la cellule T et le macrophage résulte l'expression du facteur tissulaire, de MMPs et de cytokines pro-inflammatoires perpétuant le signal d'inflammation en une boucle d'amplification (Libby 2002). Cette boucle favorise la progression de la plaque athérosclérotique vers des formes plus complexes (Libby 2002).

4.3. Évidences supportant l'hypothèse de l'oxydation des LDL

Même si les macrophages sont le type cellulaire prédominant dans la formation de cellules spumeuses, des études sur l'athérosclérose ont démontré que les particules de LDL ne semblent pas athérogéniques *in vitro*. En effet, les macrophages incubés avec des LDL ne sont pas capable d'internaliser l'excès de lipoprotéines/cholestérol car le récepteur d'internalisation des macrophages ne reconnaît pas les LDL natifs (Berliner, Territo et al. 1990; Stocker and Keaney 2004). Cependant, les macrophages internalisent les LDL oxydés *in vitro* (Aviram 1991). C'est donc la modification chimique des LDL en LDL oxydées qui est athérogénique.

La particule de LDL est composée d'un cœur apolaire d'esters de cholestérol et de triglycérides entouré d'une monocouche de phospholipides, de cholestérol non-estérifié et d'une molécule d'apolipoprotéine B-100 (Rubbo and O'Donnell 2005). Environ la moitié des acides gras contenu dans le LDL sont polyinsaturés (principalement l'acide linoléique et un peu d'acide arachidonique et d'acide docohéaenoïque) (Mertens et Holvoet, 2001). Ces acides gras polyinsaturés sont normalement protégés contre les radicaux libres par des antioxydants tel que l'alpha-tocophérol (Ramos, Gieseg et al. 1995). En absence d'une protection antioxydante adéquate, les LDL peuvent être oxydés de plusieurs manières différentes. Tout d'abord, les LDL peuvent se modifier en l'absence de changement dans l'apolipoprotéine B-100, appelé « LDL minimalement modifiés ». Cette modification

résulte de la 15-lipooxygénase, produite par les cellules endothéliales et les monocytes/macrophages, qui convertit les acides gras polyinsaturés en lipides hydroperoxydes (LOOH) (Mertens et Holvoet, 2001). Ces LDL minimalement modifiés ont un rôle à jouer dans l'induction de la sécrétion de MCP-1 ce qui accroît le recrutement des cellules inflammatoires à la paroi vasculaire (Stocker and Keaney 2005). Les LDL plus lourdement oxydés ou oxLDL, sont directement chémotactiques pour les monocytes et les lymphocytes T et limitent l'activité du NO produit par l'endothélium (Stocker and Keaney 2005). Ces LDL plus lourdement oxydés peuvent provenir d'une part, de la transformation des hydroperoxydes en aldéhydes. Les aldéhydes réagissent avec les résidues lysines de l'apolipoprotéine B-100 pour former les oxLDL (Mertens et Holvoet, 2001). D'autre part, la myéloperoxydase sécrétée par les phagocytes est une enzyme favorisant l'oxydation lourde des LDL via la libération de plusieurs oxydants lipidiques dont l'acide hypochloridrique, les radicaux tyrosyl et le dioxyde d'azote (Mertens et Holvoet, 2001). Le caractère hydrophobique des LDL les rend cependant physiquement non-disponibles pour les anions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$). Néanmoins, l'anion superoxyde peut entraîner la formation d'autres espèces radicalaires oxygénées (ROS) possédant une plus grande diffusabilité comme le peroxynitrite et le peroxyde d'hydrogène (White, Brock et al. 1994). Les superoxydes sont donc également impliqués dans les processus métaboliques menant à l'oxydation des LDL *in vivo* (White, Brock et al. 1994).

Dans tous les cas, l'oxydation des LDL diminue leur affinité pour les récepteurs aux LDL natifs et augmente leur affinité pour les récepteurs « trappeurs »

situés sur les cellules endothéliales, les macrophages et les cellules musculaires lisses (Goldstein, Ho et al. 1979 ; Mertens et Holvoet, 2001). L'interaction des LDL modifiés avec les récepteurs trappeurs induit une internalisation rapide et non-régulée des LDL menant à une accumulation massive de cholestérol (Goldstein, Ho et al. 1979). Tel que mentionné précédemment, les LDL natifs ne sont pas athérogènes; c'est leur modification en oxLDL qui modifie leur fonction de simple transporteur de cholestérol. En effet, les LDL oxydés favorisent non seulement la formation de cellules spumeuses mais également une dysfonction endothéliale en initiant l'apoptose endothéliale, une diminution de la production de NO, l'aggrégation plaquettaire, une augmentation de la production de prostacyclines et la stimulation de la synthèse de prostaglandines (Thorin, Hamilton et al. 1994 ; Holvoet et Collen, 1997 ; Knockx, 1998 ; Li, Chen et al. 1998). De plus, l'oxydation des LDL initie une cascade d'amplification oxydante en activant les cellules endothéliales et les leucocytes, ce qui provoque l'assemblage de la NADPH oxydase, l'augmentation de l'activité de la xanthine oxydase, une dysfonction mitochondriale et un découplage de la eNOS (Cai and Harrison 2000).

Ainsi, les oxLDL contribuent à l'athérogenèse en 1) favorisant le recrutement des monocytes circulants dans l'espace sous-intimal; 2) en empêchant les macrophages résidents de quitter l'intima; 3) en augmentant l'internalisation de lipoprotéines et la formation de cellules spumeuses; 4) en favorisant une boucle d'amplification positive du stress oxydant local; 5) en étant cytotoxiques pour les cellules endothéliales et en favorisant la perte de leur intégrité (Steinberg, Parthasarathy et al. 1989).

Bref, l'hyperlipidémie est un facteur de risque important pour le développement de l'athérosclérose. Lors d'une injure endothéliale, les lipides en circulation peuvent circuler du sang vers l'espace sous-endothélial. Ensuite, la modification oxydative de ces lipides permet leur rétention dans l'espace sous-endothélial, ce qui favorise le recrutement de cellules inflammatoires telles que les macrophages. La réponse inflammatoire au site d'injure exacerbe la rétention d'oxLDL par les macrophages qui deviendront cellules spumeuses; cellules caractéristiques de la plaque athérosclérotique.

À ce jour, aucune hypothèse sur le développement de l'athérosclérose n'adresse complètement toute la physiopathologie de cette maladie complexe. Néanmoins, de fortes évidences suggèrent qu'à son origine se trouve la dysfonction endothéliale. Ces évidences seront discutées dans la section suivante.

5. À l'origine de l'athérosclérose: la dysfonction endothéliale

5.1. L'endothélium, gardien de l'homéostasie vasculaire

L'endothélium vasculaire, localisé à l'interface du sang et du tissu, réagit aux changements de forces hémodynamiques en synthétisant et en relâchant des molécules vasoactives. L'homéostasie vasculaire est maintenue par la balance entre la relaxation dérivée de l'endothélium et les facteurs constricteurs (Verma 2005). Si cette balance est modifiée, par des facteurs inflammatoires ou des facteurs de risque cardiovasculaire traditionnels, la vasculature devient susceptible au développement d'athérome.

5.2 Définition de la dysfonction endothéliale

Bien que le terme «dysfonction endothéliale» englobe plusieurs aspects, cette expression est couramment utilisée en référence au déséquilibre observé dans la balance vasodilatation/vasoconstriction causée par une diminution de la biodisponibilité du NO. Cette définition de la dysfonction endothéliale est supportée par des études cliniques démontrant qu'une altération de la relaxation dépendante de

l'endothélium peut être un facteur prédictif de la morbidité/mortalité cardiovasculaire (Schachinger, Britten et al. 2000; Fichtlscherer, Breuer et al. 2004).

5.3. *Le NO, stabilisateur de l'homéostasie endothéliale*

La dysfonction endothéliale est causée par la diminution de la disponibilité du NO et/ou par un déséquilibre entre la relaxation dérivée de l'endothélium et les facteurs contractiles tels que l'endothéline-1 (ET-1), l'angiotensine et les oxydants. Le NO est généré par la conversion de l'acide aminé L-arginine en NO et L-citrulline par l'enzyme NOS (*Nitric Oxide Synthase*) (Figure 5, p.64) (Verma 2005). Dans l'organisme, la NOS se retrouve sous 3 formes : la iNOS, la nNOS et la eNOS (respectivement: *inducible Nitric Oxide Synthase*, *neuronal NOS* et *endothelial NOS*).

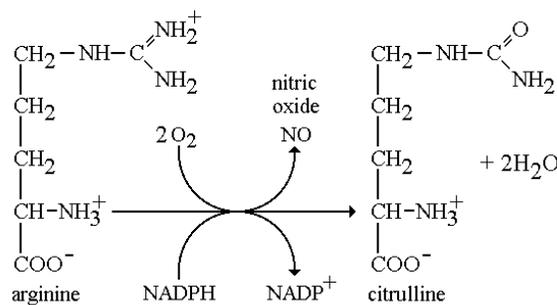


Figure 5. Conversion de la L-arginine en L-citrulline et libération du NO

(Illingworth 2007).

La eNOS est la forme constitutive prédominante exprimée par la cellule endothéliale (Schini-Kerth and Vanhoutte 1995). Cette enzyme représente la majeure source de NO dans le système vasculaire sain. En condition pathologique, c'est-à-dire lorsque le vaisseau sanguin est exposé à certains facteurs inflammatoires (Interleukine-1 β (IL-1 β), *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α), Interféron- γ (INF- γ), endotoxine) ou que l'endothélium est partiellement dénudé, il y a une perte de la régulation du tonus vasculaire par l'endothélium (Beasley, Cohen et al. 1989; Beasley 1990; Beasley, Cohen et al. 1990; Julou-Schaeffer, Gray et al. 1990; Schini-Kerth and Vanhoutte 1995). La réponse de relaxation vasculaire est alors possible par la synthèse de NO via la iNOS des cellules musculaires lisses (Beasley and McGuiggin 1994).

La nNOS est normalement retrouvée au niveau du muscle squelettique et du tissu nerveux (Silvagno, Xia et al. 1996). De récentes études ont démontré que la nNOS pourrait avoir une implication dans la régulation du NO au niveau du coeur puisque cette enzyme est exprimée par le cardiomyocyte. D'autres études ont démontré une augmentation de l'activité de la nNOS après des injures d'ischémie-reperfusion (Jones, Girod et al. 2000). Cependant son rôle exact dans le système cardiovasculaire reste à définir (Danson, Choate et al. 2005).

Le BH₄ (tétrahydrobioptérine) est un cofacteur essentiel dans la synthèse de NO par les NOS chez la cellule endothéliale, le fibroblaste, la cellule musculaire lisse vasculaire et le cardiomyocyte (Gross, Jaffe et al. 1991; Mayer, John et al. 1991; Gross and Levi 1992; Hattori, Hattori et al. 1997). La déplétion en BH₄

provoque une diminution sévère de la synthèse de NO par les NOS alors que sa réplétion restaure la synthèse de NO à des niveaux normaux *in vitro* (Gross and Levi 1992; Kinoshita, Tsutsui et al. 1997). Ces observations impliquent donc que les niveaux de BH₄ limitent la production de NO. De plus, le BH₄ a un rôle unique dans le maintien de l'intégrité enzymatique des NOS et leur production de NO (Pou, Pou et al. 1992; Wever, van Dam et al. 1997). En absence de BH₄, la consommation de NADPH par la NOS peut provoquer son découplage enzymatique (*eNOS uncoupling*) et changer sa synthèse de NO en production de superoxydes et de peroxydes d'hydrogène (Ignarro 2000).

Le NO est le facteur clé de la relaxation dérivée de l'endothélium et joue un rôle primordial dans la régulation du tonus vasculaire et de la fonction vasomotrice. En plus de son effet vasodilatateur, le NO protège contre les injures vasculaires, l'inflammation et la thrombose. Le NO prévient l'adhésion des leucocytes à l'endothélium, maintient les cellules musculaires lisses vasculaires en état non-prolifératif et limite l'agrégation plaquettaire.

5.3.1. Les facteurs de risque cardiovasculaire diminuent la biodisponibilité du NO

En réponse aux facteurs de risque traditionnels, les défenses endogènes de l'endothélium vasculaire commencent à s'éteindre.

L'hypercholestérolémie, par exemple, favorise l'attachement des leucocytes sanguins à l'endothélium, une couche cellulaire normalement résistante à l'adhésion des cellules sanguines. Les oxLDL en circulation causent une activation endothéliale et en changeant les caractéristiques biologiques, réduisant la concentration intracellulaire de NO.

L'angiotensine II, un vasoconstricteur associé à l'hypertension, s'oppose à l'action du NO en favorisant la production de ROS, en augmentant la production de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-6 et MCP-1 et en augmentant l'expression de VCAM-1 sur les cellules endothéliales, ce qui favorise l'attachement des monocytes à la paroi vasculaire.

Plusieurs études ont démontré une diminution de la vasorelaxation dépendante du NO dans la vasculature d'animaux et d'humains vieillissants (Celermajer, Sorensen et al. 1994; Chauhan, More et al. 1996; Barton, Cosentino et al. 1997). Ceci est dû à une diminution de la biodisponibilité du NO avec l'âge. Cette diminution est causée à la fois par une altération de la fonction de la eNOS et par une diminution de l'expression de la superoxyde dismutase-1 qui protège normalement le NO des anions superoxydes (Woodman, Price et al. 2002; Belik, Jerkic et al. 2009).

5.4 La dysfonction endothéliale comme facteur prédictif des événements vasculaires

La dysfonction endothéliale est présente au tout début du développement de l'athérosclérose (Davignon and Ganz 2004). Les expériences des dernières années suggèrent que la dysfonction endothéliale est le stade initial des maladies athérosclérotiques et qu'elle est à l'origine de la formation de plaques. Elle est également la cause de la croissance de la plaque d'athérosclérose et des risques subséquents d'événements vasculaires (Esper, Nordaby et al. 2006).

En plus d'être associée aux facteurs de risque cardiovasculaire comme l'hypercholestérolémie, l'hypertension, le tabagisme et le diabète, la dysfonction endothéliale est également associée à l'ischémie myocardique à l'effort (Vita, Treasure et al. 1990; Zeiher, Krause et al. 1995; John, Schlaich et al. 1998; Schachinger, Britten et al. 1999).

Certaines études ont d'ailleurs corrélié le degré de dysfonction endothéliale aux événements cardiovasculaires (Suwaidi, Hamasaki et al. 2000). Puisque la dysfonction endothéliale se retrouve dans tous les facteurs de risque cardiovasculaires, certaines études proposent le test de dysfonction endothéliale comme un indicateur pronostic des futures complications cardiovasculaires (Verma, Buchanan et al. 2003).

Au delà du développement de l'athérosclérose, la dysfonction endothéliale est également un facteur déterminant dans la réponse à l'ischémie et la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (néovascularisation).

6. La néovascularisation

La néovascularisation se définit comme la formation d'un réseau vasculaire fonctionnel pouvant accueillir une circulation sanguine. Au niveau embryonnaire, la formation de ce réseau vasculaire se fait via des cellules spécialisées: les cellules progénitrices endothéliales (EPCs) (Risau 1995). Chez l'adulte, la néovascularisation est le moyen physiologique de réparation des vaisseaux sanguins endommagés. Ce processus permet également de revasculariser un tissu dont le flot sanguin est compromis par des plaques athérosclérotiques (Moulton 2001). Cependant, la néovascularisation peut également soutenir un état pathologique tel que la rétinopathie diabétique, la vascularisation tumorale et l'arthrite rhumatoïde (Furuya, Nishiyama et al. 2005; Szekanecz and Koch 2008; Zhao, Jin et al. 2009; Weskamp, Mendelson et al. 2010).

Les trois principaux mécanismes de la néovascularisation sont l'angiogenèse, l'artériogenèse et la vasculogenèse.

6.1. L'angiogenèse

6.1.1. Processus nécessaire à la réparation vasculaire

L'angiogenèse est définie comme étant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de la vasculature existante (*Figure 6, p.72*) (Hanahan and Folkman

1996). L'angiogenèse peut être souhaitable ou non selon le contexte dans lequel elle se produit. Elle est par exemple non souhaitable lorsqu'elle contribue au développement de lésions athérosclérotiques ou de cancers. Cependant, l'angiogenèse est nécessaire à la palliation de l'ischémie tissulaire et à la réparation de vaisseaux sanguins endommagés.

6.1.2. La phase d'activation et la phase de résolution

L'angiogenèse est un processus complexe qui s'établit en deux phases. Tout d'abord, une phase d'activation incluant l'augmentation de la perméabilité vasculaire, la dégradation de la membrane basale et la prolifération/migration des cellules endothéliales. Ensuite, une phase de résolution, incluant l'inhibition de la prolifération/migration des cellules endothéliales, une reconstruction de la membrane basale et une stabilisation des vaisseaux par le recrutement et la différenciation des cellules mésenchymateuses en péricytes et en cellules musculaires lisses (Hanahan and Folkman 1996).

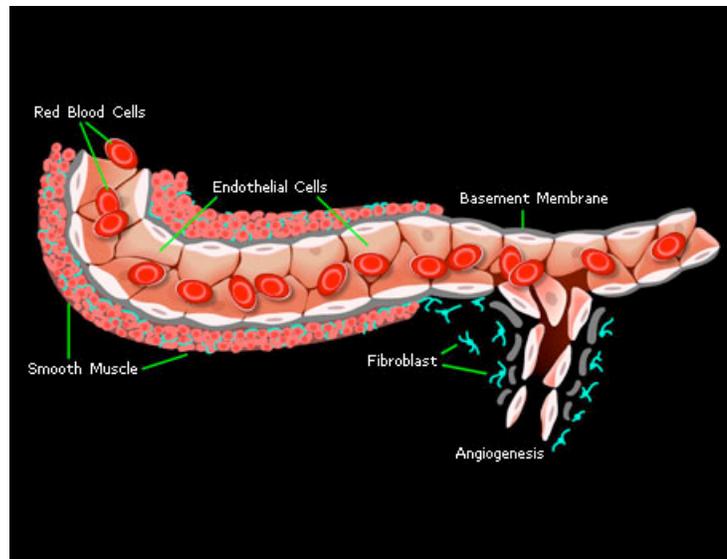


Figure 6. *Angiogenèse* (Genetech 2011).

L'angiogenèse est modulée par son microenvironnement ainsi que par différents facteurs de croissance. Les facteurs de croissance des fibroblastes (FGFa et FGFb), TGF α et TGF β , le facteur de croissance des hépatocytes (HGF), le TNF- α , l'angiogénine, l'interleukine-8 (IL-8) et les angiopoïétines (Ang-1 et Ang-4) et le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) régulent positivement l'angiogenèse (Tsigkos, Koutsilieris et al. 2003; Karamysheva 2008). Les facteurs de croissance Ang-2 et Ang-3, la thrombospondine-1, l'interféron- α et l'endostatine sont des exemples de régulateurs négatifs de l'angiogenèse (Tsigkos, Koutsilieris et al 2003).

6.1.3. VEGF: principal facteur de la croissance pro-angiogénique (phase d'activation)

VEGF est le médiateur central de l'angiogenèse (Karamysheva 2008). *In vitro*, VEGF stimule la croissance des cellules endothéliales provenant des vaisseaux artériels, veineux et lymphatiques (Houck, Ferrara et al. 1991). VEGF est également un puissant inducteur d'angiogenèse dans plusieurs modèles expérimentaux *in vivo* comme par exemple dans l'angiogenèse induite en réponse à l'ischémie (Tischer, Mitchell et al. 1991; Ferrara, Frantz et al. 2003). En effet, les signaux d'hypoxie caractéristiques de l'ischémie jouent un rôle majeur dans la régulation du VEGF. En condition hypoxique, c'est-à-dire lorsqu'il y a une diminution de la quantité d'oxygène disponible, le HIF-1 (*Hypoxia-Inducible Factor-1*) est stabilisé et peut se lier au promoteur de VEGF pour en augmenter la transcription.

HIF-1 est un facteur de transcription hétérodimérique composés de deux sous-unités HIF-1 α et HIF-1 β . HIF-1 α est la clé maîtresse dans la régulation de l'homéostasie de l'oxygène cellulaire. En condition normoxique, HIF-1 α est la cible d'une dégradation rapide. En condition hypoxique, le HIF-1 α est activée via les voies PI3K-Akt et MAPK-Erk (Munoz-Chapuli, Quesada et al. 2004). HIF-1 α est alors transloqué au noyau et se lie, conjointement avec HIF-1 β , aux promoteurs de gènes responsables de l'angiogenèse tel que le gène codant pour VEGF (Munoz-Chapuli, Quesada et al. 2004). L'hypoxie est un des facteurs les plus importants dans l'induction de l'expression de VEGF. Un environnement pauvre en oxygène, retrouvé

dans différents états pathologiques, conduit à l'augmentation de l'expression de l'ARN messager de VEGF par le HIF (Rojas, Figueroa et al. 2006).

En plus de son rôle dans l'angiogenèse, VEGF est un facteur de survie pour la cellule endothéliale *in vivo* et *in vitro* (Gerber, Dixit et al. 1998; Gerber, McMurtrey et al. 1998; Benjamin, Golijanin et al. 1999). Le VEGF prévient l'apoptose des cellules endothéliales lorsqu'il y a un manque de sérum (*in vitro*) et induit l'expression de Bcl-2 et A1, deux protéines anti-apoptotiques dans les cellules endothéliales (*in vivo*) (Gerber, McMurtrey et al. 1998).

6.1.3.1. VEGF: 6 gènes et 3 récepteurs au service de l'angiogenèse

Chez les mammifères, 6 gènes codent pour le VEGF (VEGF-A à VEGF-E et le PGF (*Placenta Growth Factor*)). Le VEGF-A est le facteur de croissance vasculaire clé dans la régulation de l'angiogenèse physiologique et pathologique (Ferrara 2004). Le gène humain codant pour le VEGF-A est constitué de 8 exons séparés de 7 introns (Houck, Ferrara et al. 1991; Gerber, Dixit et al. 1998). Les différents clivages du gène de VEGF-A produisent 4 isoformes différentes – VEGF-A₁₂₁, VEGF-A₁₆₅, VEGF-A₁₈₉ et VEGF-A₂₀₆ (Houck, Ferrara et al. 1991; Gerber, Dixit et al. 1998). Les facteurs de croissance de la famille de VEGF exercent des effets biologiques directs sur les cellules endothéliales grâce aux récepteurs situés à la membrane plasmique de ces cellules (Karamysheva 2008). Les différents isoformes

de VEGF agissent spécifiquement sur les récepteurs VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1/KDR) et VEGFR-3 (Flt-4) (*Figure 7, p.75*). Ces récepteurs font partie de la grande famille des « récepteurs tyrosine kinase », ce qui signifie que leur activation et leurs actions subséquentes nécessitent la phosphorylation des résidus tyrosine.

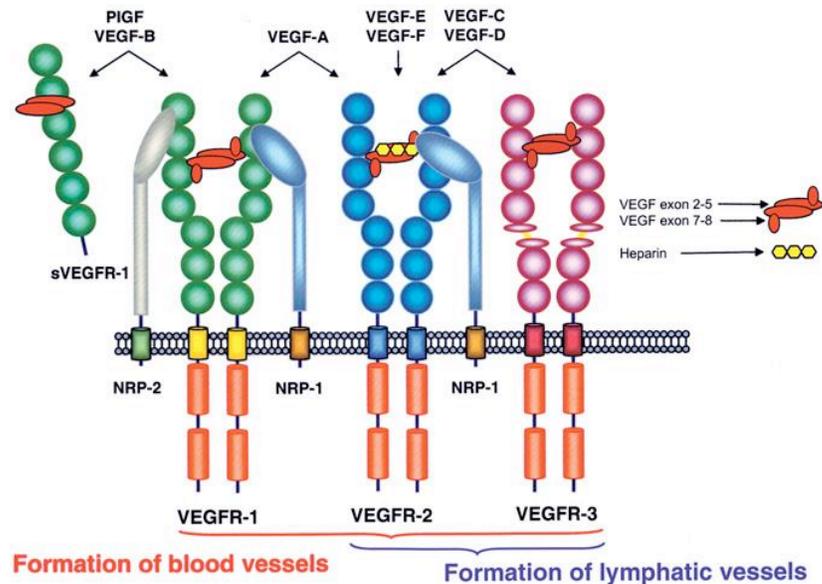


Figure 7. Différentes isoformes du VEGF et ses récepteurs

(Cebe-Suarez, Zehnder-Fjallman et al. 2006)

Le VEGFR-1 se retrouve sur les cellules endothéliales, les monocytes-macrophages, les mégakaryocytes, les cellules musculaires lisses et les ostéoclastes. Ce récepteur est un régulateur de la morphogenèse des vaisseaux sanguins. Celui-ci est nécessaire au développement du système vasculaire embryonnaire (Fong, Rossant et al. 1995). Le VEGFR-3 se retrouve principalement sur les vaisseaux lymphatiques et en plus faibles concentrations sur les monocytes-macrophages et les cellules endothéliales. Ce récepteur est un régulateur de la lymphangiogenèse c'est-à-dire que

son expression est retrouvée dans les veines et les vaisseaux lymphatiques mais pas dans les artères (Jussila and Alitalo 2002). Enfin, le VEGFR-2 se retrouve sur les cellules hématopoïétiques, neuronales, rétinienne et principalement sur les cellules endothéliales (Cebe-Suarez, Zehnder-Fjallman et al. 2006). Ce récepteur est responsable de la signalisation angiogénique. Sur les cellules endothéliales, VEGFR-2 régule la migration, la prolifération, la différenciation, la survie ainsi que la perméabilité et la dilatation vasculaire (Cebe-Suarez, Zehnder-Fjallman et al. 2006).

Des études ont démontré que l'interaction de certains isoformes de VEGF-A avec des protéines telles que les neuropilines (NRP) (*Figure 7, p.75*) et les héparans sulfates semble avoir un effet sur la croissance directionnelle des vaisseaux sanguins (Cebe-Suarez, Zehnder-Fjallman et al. 2006). Cependant, d'autres études sont nécessaires à la compréhension de ces phénomènes.

6.1.3.2. Le VEGFR2, principal transmetteur des voies pro-angiogéniques chez la cellule endothéliale

L'action du VEGF sur les cellules endothéliales par le VEGFR-2 induit la perméabilité vasculaire, la prolifération cellulaire, la migration cellulaire et la formation de tubules (Matsumoto and Claesson-Welsh 2001; Ferrara, Gerber et al. 2003). La dimérisation de ce récepteur provoque une cascade d'activation de la voie RAF/MEK/Erk responsable de la prolifération cellulaire et l'activation de la voie PI3K qui favorise la migration cellulaire (Takahashi and Shibuya 1997; Takahashi, Yamaguchi et al. 2001; Meyer, Latz et al. 2003; Holmqvist, Cross et al. 2004). PI3K

peut à son tour activer la voie Akt qui favorise la survie cellulaire (Datta, Brunet et al. 1999). L'activation de Akt permet la phosphorylation de la eNOS et la production de NO (Dimmeler, Fleming et al. 1999). Enfin, le NO lui-même est un médiateur essentiel dans la migration des cellules endothéliales (Murohara, Witzenbichler et al. 1999).

6.1.4. Les autres facteurs de croissance pro-angiogéniques d'importance

Bien que le VEGF soit un facteur pro-angiogénique important, d'autres facteurs sont également nécessaires à l'angiogenèse. Par exemple, la famille du FGF, qui comprend 9 protéines structurellement homologues, favorise la croissance de plusieurs types cellulaires (Klasgrun 1995). Cette famille est notamment connue pour ses effets mitogéniques sur les cellules endothéliales (Ahrendt 1998). Cependant, ses rôles principaux dans l'angiogenèse sont de favoriser le recrutement de péricytes par la cellule endothéliale et d'activer la mitogenèse des cellules musculaires lisses (Cross and Claesson-Welsh 2001).

Un autre facteur de croissance, le PDGF, est synthétisé par les plaquettes, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses (Ahrendt 1998). Lorsqu'il est exprimé par les cellules endothéliales, le PDGF sert de mitogène pour les cellules musculaires lisses et promouvoit subséquemment l'expression de VEGF par celles-ci ce qui amplifie le signal pro-angiogénique sur les cellules endothéliales (Banai,

Jaklitsch et al. 1994; Goad, Rubin et al. 1996). Enfin, le PDGF sécrété par les cellules endothéliales favorise le recrutement des péricytes et la différenciation des précurseurs endothéliaux en cellules endothéliales matures (Hirschi and D'Amore 1996).

Le facteur de croissance TGF- β existe sous 5 isoformes dont le TGF- β 1 est le mieux caractérisé de par son implication dans plusieurs processus cellulaires (Ahrendt 1998). Bien que le TGF- β 1 possède des propriétés antiprolifératives sur les cellules endothéliales *in vitro*, des études ont démontré qu'il induit l'angiogenèse *in vivo* en favorisant la sécrétion paracrine d'autres facteurs proangiogéniques tels que PDGF, VEGF et bFGF (Flaumenhaft, Abe et al. 1992; Goad, Rubin et al. 1996; Hirschi and D'Amore 1996; Isner 1996). Le TGF- β 1 a également un effet chémotactique sur les monocytes, les macrophages, les cellules musculaires lisses et les fibroblastes (Flaumenhaft and Rifkin 1992). D'autres études sont cependant nécessaire à la compréhension de son rôle précis dans l'angiogenèse.

Enfin, Ang-1 et Ang-2 sont des protéines proangiogéniques ayant des effets antagonistes mais complémentaires sur l'angiogenèse. Tout d'abord, Ang-2 favorise l'hyperperméabilité vasculaire et une élasticité du vaisseau sanguin ce qui permet une meilleure réponse aux signaux proangiogéniques tel que VEGF (Maisonpierre, Suri et al. 1997). Ensuite, Ang-1 permet la prolifération, la migration et la survie des cellules endothéliales (Davis, Aldrich et al. 1996; Witzensbichler, Maisonpierre et al. 1998; Kwak, So et al. 1999). De récentes études ont démontré que Ang-1 joue un rôle dans le recrutement de cellules endothéliales progénitrices et favorise la maturation du néovaisseau sanguin vers un état stable (Metheny-Barlow and Li 2003).

6.1.5. Le macrophage : cellule pro-angiogénique

Le macrophage est une cellule principalement associée aux processus inflammatoires. Les macrophages peuvent cependant être classifiés en deux sous-classes : les macrophages classiques ou M1 bien connu pour leur rôle dans l'inflammation et les macrophages M2 (Leek, Lewis et al. 1996 ; Leek and Harris 2002). Les macrophages de type M2 expriment le récepteur VEGFR-1 ce qui suggère un rôle dans le processus d'angiogenèse (Moldovan and Moldovan 2005). En fait, les études tendent à démontrer que les macrophages sont un point pivot dans l'initiation et le soutien des cellules endothéliales dans la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (Moldovan and Moldovan, 2005 ; Shireman 2007). Afin d'induire l'angiogenèse et la migration des cellules endothéliales, la dissolution de la membrane basale est une étape nécessaire (Shireman, 2007). Les macrophages sont des cellules riches en protéases qui peuvent dégrader la membrane basale et libérer les cellules endothéliales (Moldovan and Moldovan 2005). Les macrophages peuvent ensuite favoriser la prolifération et la migration des cellules endothéliales par la sécrétion de divers facteurs de croissance pro-angiogéniques dont le bFGF, le VEGF, l'IL-8 et le PDGF (Sunderkotter, Steinbrink et al. 1994 ; Moldovan et Moldovan, 2005 ; Shireman, 2007). En fait, la communication cellule endothéliale/macrophage semble bidirectionnelle puisque les cellules endothéliales sécrètent également des facteurs chimiotactiques (VEGF, MCP-1) qui augmentent l'activité pro-angiogénique des macrophages dans un boucle de rétroaction positive (Shireman, 2007). Enfin, de récentes études ont démontré que les macrophages peuvent acquérir des propriétés

similaires aux cellules endothéliales via leur contact avec le sang (Campbell, Efendy et al. 1994 ; Moldovanet and Havemann 2002). Cette transdifférentiation se manifeste chez le macrophage par l'expression de VE-cadherin, PECAM-1 et l'intégrine α_4 et une diminution de l'expression de E-cadherin (Zhou, Fisher al. 1997).

6.1.6. La consolidation du vaisseau sanguin: la phase de résolution

Suite à la formation d'un néovaisseau sanguin, les mécanismes pro-angiogéniques doivent graduellement faire place à la phase de résolution c'est-à-dire la stabilisation du vaisseau sanguin. Le péricytes est la cellule spécialisée dans la stabilisation du vaisseau sanguin (Lu 2008). Nous avons précédemment discuté que lors de la formation de néovaisseaux, les cellules endothéliales migrent en réponse à certains facteurs de croissance dont le VEGF (Ozerdem and Stallcup 2003). Lors de ce processus, les péricytes guident la migration des cellules endothéliales en exprimant VEGF. Les néovaisseaux formés sont cependant très instables. Les péricytes entourent ceux-ci afin de favoriser leur maturation par la déposition de couches de matrices (Lu 2008). Les mécanismes moléculaires par lesquelles les péricytes stabilisent le vaisseau sanguin ne sont pas complètement connus. Néanmoins, des études ont démontré que la sécrétion de PDGF-B par les macrophages est responsable du recrutement des péricytes vers le vaisseau nouvellement formés afin de le stabiliser et d'assurer sa maturation (Hellstrom, Kalen et al. 1999).

6.2. L'artériogenèse

L'artériogenèse se définit comme un développement rapide d'artères collatérales afin de pallier à une occlusion chronique ou aigue d'une artère importante (artère fémorale, artère coronarienne, etc.) (*Figure 8, p.82*) (Buschmann and Schaper 1999). Ce processus est souvent causé par une force de cisaillement (Heil, Eitenmuller et al. 2006). Cette augmentation dans la force de cisaillement induit 1) l'expression de certaines molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1) par les cellules endothéliales; 2) la production et la sécrétion de cytokines telles que MCP-1 et GM-CSF (*Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor*) qui favorisent le recrutement des monocytes circulants à l'endothélium (Bergmann, Hoefler et al. 2006). Les monocytes peuvent alors transmigrer au travers de la paroi vasculaire et se transformer en macrophages (Bergmann, Hoefler et al. 2006). Les macrophages sécrètent alors des protéases (MMPs) qui permettent la digestion de la membrane basale et la migration des cellules endothéliales et musculaires lisses (Schaper 1993). Ceci engendre un remodelage subséquent des artères et anastomes artéro-artériolaires en nouvelles artères fonctionnelles (Heil, Eitenmuller et al. 2006). Ces néovaisseaux de petits calibres sont composés d'une mono-couche de cellules endothéliales, d'une limitante élastique interne et de une ou deux couches de cellules musculaires lisses (Longland 1953).

Des études ont démontré que l'administration de suppléments de cytokines angiogéniques incluant VEGF, bFGF, HGF augmentent le développement des

collatérales lorsque la néovascularisation endogène est insuffisante (Murohara 2003). Bien qu'elle partage certaines caractéristiques avec l'angiogenèse, l'artériogenèse se distingue par sa capacité potentielle à remplacer complètement une artère occluse alors que l'angiogenèse ne peut le faire que partiellement (Cai and Schaper 2008). Une autre caractéristique distinguant ces deux processus est que l'angiogenèse dépend de l'ischémie/hypoxie tissulaire et du HIF alors que l'artériogenèse dépend de forces mécaniques (forces de cisaillement). De plus, le développement de collatérales repose en grande partie sur les cellules monocytes-macrophages.

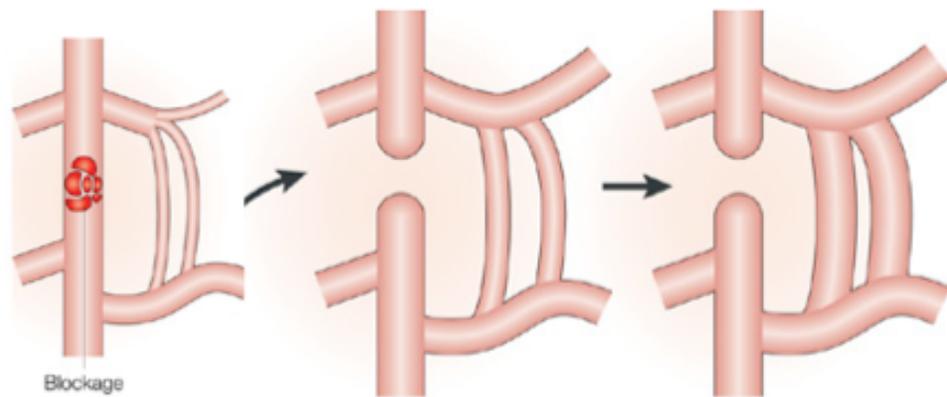


Figure 8. Artériogenèse. Figure adaptée (Simons and Ware 2003).

6.3. La vasculogénèse: Régénération vasculaire par les cellules souches

De récentes avancées dans la biologie vasculaire et développementale ont généré de nouvelles possibilités pour favoriser la néovascularisation thérapeutique: la régénération vasculaire médiée par les cellules (Asahara, Murohara et al. 1997).

6.3.1. La vasculogénèse embryonnaire

La vasculogénèse réfère à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de cellules progénitrices endothéliales (EPCs) et d'angioblastes *in situ* (Risau 1995). Au niveau de l'embryon, la vasculogénèse commence par la formation d'un amas cellulaire, ou îlot sanguin. La croissance et la fusion de multiples îlots sanguins dans l'embryon donne naissance à la structure initiale du réseau capillaire. Après la mise en place de la circulation sanguine, le réseau se différencie en un système vasculaire artérioveineux. Les EPCs sont localisées à la périphérie des îlots sanguins alors que les cellules progénitrices hématopoïétiques sont localisées au centre des îlots. Les EPCs donnent naissance aux cellules endothéliales alors que les HSCs (*Hematopoetic Stem Cells*) se développent en cellules sanguines matures après la fusion d'îlots sanguins (Flamme and Risau 1992; Weiss and Orkin 1996).

En plus de leur organisation spatiale, les EPCs et les HSCs partagent plusieurs caractéristiques angiogéniques ainsi que plusieurs marqueurs de surface cellulaire: Flk1/KDR, VEGFR-2, Tie2/Tek, VE-cadherin et CD34. Ces cellules progénitrices ont conséquemment été considérées comme dérivant d'un précurseur commun, l'hémangioblaste (Weiss and Orkin 1996).

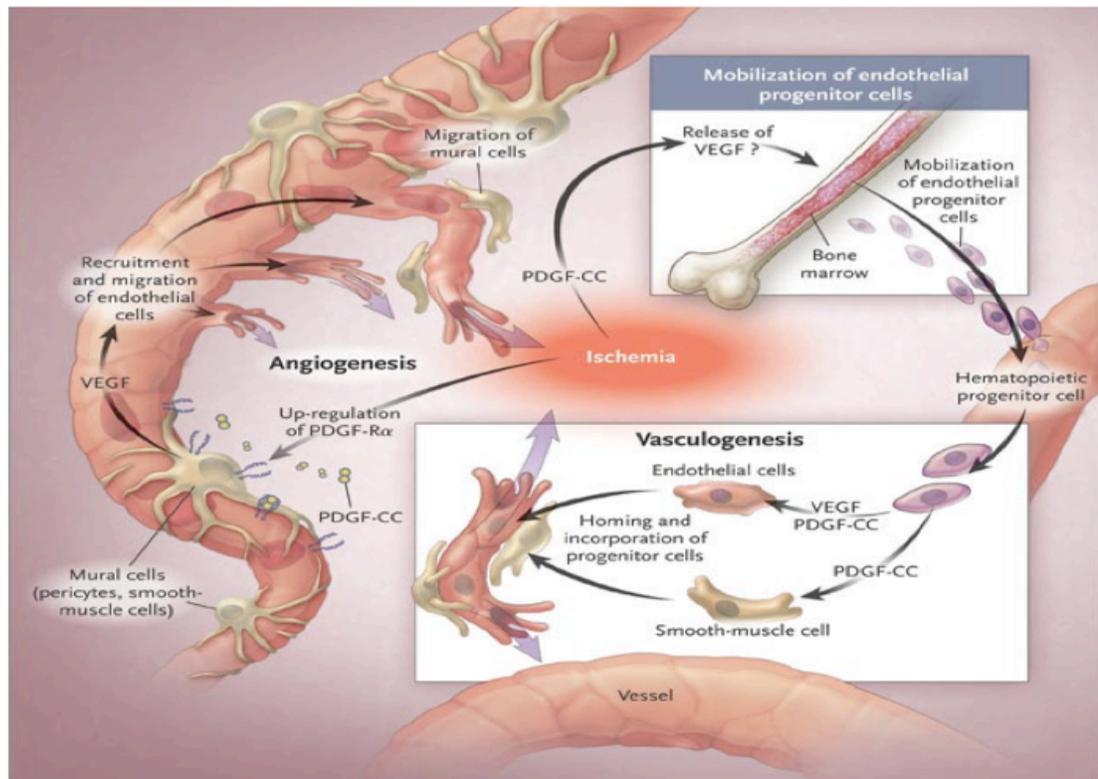


Figure 9. *Vasculogènèse post-natale* (Dimmeler 2005).

6.3.2. La vasculogenèse post-natale

Jusqu'à tout récemment, la vasculogenèse était considérée comme restreinte à l'embryon alors que la formation néovasculaire chez l'adulte était attribuée à l'angiogenèse pure (Risau, Sariola et al. 1988). L'équipe d'Asahara a récemment découvert que le sang périphérique de plusieurs espèces adultes contient des EPCs dérivées principalement de cellules sanguines mononucléées CD34 positives localisées dans la moelle osseuse (Asahara, Murohara et al. 1997). Les EPCs identifiées dans le sang périphérique sont mobilisées de la moelle osseuse en réponse à un stimulus ischémique (*Figure 9, p.84*) (Asahara, Masuda et al. 1999; Takahashi, Kalka et al. 1999). Ces cellules pourraient se différencier en cellules endothéliales matures lorsque mises en culture.

6.3.2.1. L'origine des EPCs: la niche vasculaire

Le concept de niche pour les cellules progénitrices fut proposé par Schofield (Schofield 1978). Une niche est un site spécifique chez l'adulte où les cellules progénitrices résident et où elles peuvent produire un nombre important de progéniteurs (Schofield 1978). Structurellement, la niche est formée de cellules de support qui apportent un microenvironnement pour les cellules progénitrices (Spradling, Drummond-Barbosa et al. 2001; Li 2005). Puisque l'espace interne de la niche est limitée, le contrôle étroit de la prolifération des cellules est capital (Yin and Li 2006). Un rôle important de la niche est donc de maintenir l'équilibre entre les

cellules qui sont mobilisées hors de la niche et celles qui restent sur place (Yin and Li 2006).

En réponse à une injure tissulaire les EPCs peuvent être mobilisées de la niche de la moelle osseuse vers le site d'ischémie, où elles peuvent contribuer à la réparation tissulaire (Orlic, Kajstura et al. 2001; Rankin 2008). La mobilisation des EPCs est un processus complexe qui s'établit en plusieurs étapes. Tout d'abord, l'association EPCs-HSCs dans la niche est rompue par une élévation des niveaux de G-CSF (*Granulocyte Colony-Stimulating Factor*) qui abaisse l'expression de CXCR4 (HSCs) et SDF-1 α (EPCs) (Levesque, Hendy et al. 2003). Ensuite, les EPCs peuvent migrer vers le site d'ischémie en réponse à certains facteurs de croissance comme le VEGF, HIF-1 α et SDF-1 sécrétés par différents types cellulaires au site d'injure (cellules musculaires lisses, cellules endothéliales, neutrophiles, lymphocytes, monocytes) (Koehne, Willam et al. 2000; Goligorsky, Kuo et al. 2009). Enfin, le recrutement et l'incorporation des EPCs au site d'ischémie incluent l'adhésion des cellules à l'endothélium, leur migration transendothéliale, la dégradation de la matrice extracellulaire, l'invasion et finalement la différenciation *in situ* (Chavakis 2008).

Plusieurs études animales ont démontré que les cellules dérivées de la moelle osseuse jouent un rôle important dans la réparation et la régénération vasculaire. Ces cellules peuvent faciliter la réparation du tissu après une injure ischémique induite chirurgicalement (Gupta, Tongers et al. 2009; Moreno, Sanz et al. 2009; Pacilli, Faggioli et al. 2010; Tongers, Roncalli et al. 2010). Des études chez l'humain et

l'animal ont démontré qu'en plus de l'ischémie, l'induction pharmacologique de la mobilisation des EPCs au site d'injure est possible grâce aux statines, VEGF, l'érythropoïétine, les inhibiteurs d'ACE et les oestrogènes. Cependant, chacun de ces médiateurs pharmacologiques a des effets secondaires. La recherche de voies signalétiques endogènes menant à la mobilisation des EPCs est donc importante au développement de cette voie thérapeutique.

6.3.2.2. Importance de la voie endogène du NO dans la vasculogénèse post-natale

Plusieurs études chez des sujets humains présentant des problèmes cardiovasculaires, métaboliques, autoimmuns, ou inflammatoires ont rapporté une diminution de la concentration d'EPCs dans la circulation. Cette diminution corrèle avec la sévérité et/ou le risque de complications de la maladie vasculaire (Werner and Nickenig 2006; Jujo, Ii et al. 2008; Zeoli, Dentelli et al. 2009). La diminution du nombre d'EPCs circulantes pourrait être expliquée en partie par une diminution de l'activité de la eNOS (Thum, Fraccarollo et al. 2007). En effet, une caractéristique commune de tous les sous-types de EPCs humains est l'expression de eNOS (Loomans, Wan et al. 2006). L'expression de la eNOS par les EPCs est régulée par diverses conditions physiologiques. Il a été démontré que l'hormone de croissance (GH) et IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor-1*) régulent l'expression et l'activité de eNOS au niveau de la cellule endothéliale et les EPCs. Ceci mène à une augmentation du potentiel migratoire de ces cellules *in vitro* (Ziche, Morbidelli et al. 1994). Par contraste, l'inhibition fonctionnelle de eNOS dans les EPCs bloque la migration

cellulaire (Guthrie, Curtis et al. 2005). Cependant, les thérapies utilisant la voie de la eNOS pour l'amélioration de la mobilisation des EPCs dans la maladie vasculaire ont donné des résultats mitigés (de Resende, Huw et al. 2007).

6.3.2.3. Potentiel thérapeutique de la transplantation et de l'infusion d'EPCs

Puisque l'administration d'agents pharmacologiques afin de favoriser la mobilisation des EPCs semble associée à plusieurs effets secondaires, la transplantation d'EPCs pourrait être une solution envisageable. En effet, la transplantation d'EPCs mises en culture a été démontrée comme augmentant l'angiogenèse et la formation de vaisseaux collatéraux dans plusieurs modèles animaux expérimentaux (Kalka, Masuda et al. 2000; Murohara, Ikeda et al. 2000). De plus, la transplantation hétérologue, homologue ou autologue d'EPCs dans des modèles animaux d'ischémie tissulaire favorise leur intégration au site d'angiogenèse active (Kalka, Masuda et al. 2000; Kamihata, Matsubara et al. 2001; Shintani, Murohara et al. 2001; Asahara and Kawamoto 2004; Loomans, Wan et al. 2006). Pour ce faire, les EPCs peuvent agir directement en s'incorporant aux néovaisseaux au site d'ischémie, ou indirectement par la sécrétion paracrine de facteurs angiogéniques (Murasawa and Asahara 2005).

Des études ont également démontré que l'infusion d'EPCs humaines permet le rétablissement du flot sanguin dans des expériences précliniques chez la souris ou le rat immunodéficient (Kawamoto, Gwon et al. 2001; Urbich, Heeschen et al. 2003;

Urbich and Dimmeler 2004; Dimmeler and Zeiher 2009). Des études cliniques d'infusions de diverses populations d'EPCs isolées de la moelle osseuse ont donc été initiées chez certains patients ayant des désordres cardiovasculaires et présentant des niveaux d'EPCs circulantes diminués (Martin-Rendon, Brunskill et al. 2008; Dimmeler and Zeiher 2009; George 2010).

Ces résultats suggèrent que les EPCs circulantes et les EPCs exogènes transplantées peuvent contribuer à la formation néovasculaire et au remplacement endothélial dans les régions de dommages vasculaires chez l'adulte (Richardson and Yoder 2010). Cependant, les degrés de récupération observés chez les sujets humains ont été moins impressionnants que ceux obtenus chez les rongeurs (Dimmeler and Zeiher 2009; George 2010). Puisque les études ont utilisés différents types d'EPCs, des controverses sont apparues sur la définition et la caractérisation des diverses sous-populations de cellules sanguines et endothéliales qui sont appelées «EPC» (Yoder and Ingram 2009; Steinmetz, Nickenig et al. 2010).

6.3.3. Définition d'une cellule progénitrice endothéliale

La définition d'une EPC ne fait pas l'unanimité car plusieurs sous-types cellulaires peuvent être impliqués, de l'hémangioblaste à la cellule endothéliale mature. De manière générale, les EPCs peuvent être identifiées par des techniques de culture cellulaire ou de marquage par cytofluorométrie de flux (FACS). La méthode de FACS est surtout utilisée dans la quantification d'EPCs périphériques fraîchement

isolées (Balbarini 2008). Les études utilisant cette méthode se servent de marqueurs reconnus chez l'humain suivant différentes combinaisons ($CD133^+VEGFR2^+$, $CD133^+VEGFR2^+CD34^+$, $CD34^+VEGFR2^+$, $CD34^+CD133^+$) (Balbarini 2008). Bien que l'origine hématopoïétique ou endothéliale de ces cellules (selon les marqueurs choisis) soit encore un sujet de controverse, les études menées jusqu'à aujourd'hui ont démontré que ces cellules ont un rôle important dans la néovascularisation (Hirschi, Ingram et al. 2008). En culture cellulaire, plusieurs méthodes permettent l'isolation des cellules progénitrices endothéliales. Malgré leur qualificatif commun de «progéniteur endothélial », ces cellules possèdent des caractéristiques différentes.

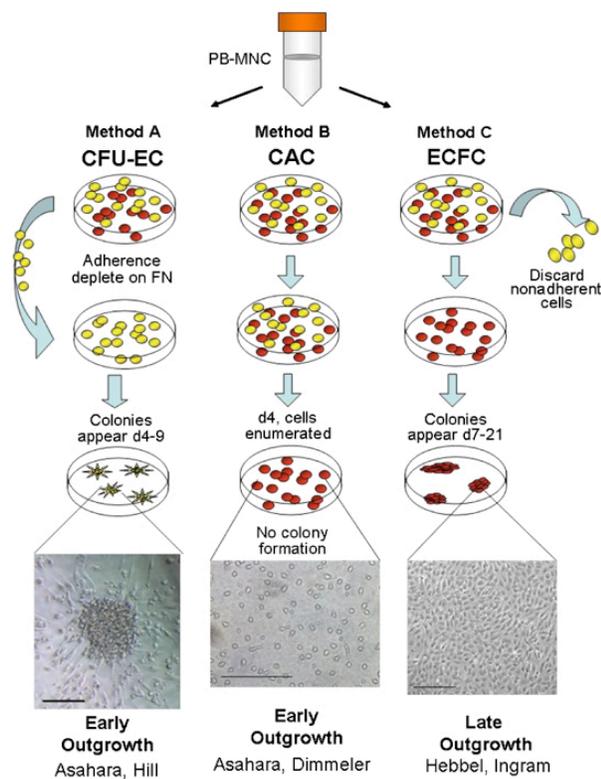


Figure 10. Méthodes d'isolation des cellules progénitrices endothéliales

(Prater, Case et al. 2007)

6.3.3.1. *Early Outgrowth EPCs*

Dans le papier originel sur les EPCs, Ashara et al. ont observé qu'environ 16% des cellules sanguines périphériques chez l'adulte sont positives pour le marqueur CD34, marqueur conservé tout au long de la différenciation vers la cellule endothéliale mature (Asahara, Murohara et al. 1997; Asahara and Kawamoto 2004). Ces cellules, isolées des PB-MNC (cellules mononucléées du sang périphérique) à l'aide de billes magnétiques se nomment aussi CAC (*Circulating Angiogenic Cells*) (*Figure 10, Méthode B, p.90*). Puisque les EPCs isolées du sang originent de la moelle osseuse, elles sont également appelées *bone marrow-derived circulating endothelial progenitor cells* (Urbich and Dimmeler, 2004). Puisque ces cellules sont en faible nombre en circulation, il est possible de les isoler directement de la moelle osseuse et/ou de les expandre *in vitro* (Timmermans, Plum et al. 2009). Qu'elles proviennent de la moelle osseuse ou du sang, au bout de 3 jours de culture sur fibronectine (FN), ces cellules prennent la forme de fuseaux (Asahara, Murohara et al. 1997). Après 7 jours de culture, les cellules attachées expriment les marqueurs CD45 (cellules leucocytaires), CD34 (cellules progénitrices hématopoétiques), CD31 (cellules endothéliales), VEGFR-2 (cellules endothéliales), Tie-2 (cellules hématopoétiques) et/ou E-selectin (cellules endothéliales) à divers niveaux. Puisque ces cellules sont obtenues après un très court laps de temps en culture (3-7 jours) on les nomme également *early outgrowth EPCs*.

Hills et al. ont utilisé une méthode permettant d'isoler les cellules angiogéniques circulantes du sang (*Figure 10, Méthode A, p.90*). Après 48 heures de

culture, les cellules isolées de la circulation et non-adhérées sont mises en culture sur de la fibronectine dans un milieu différentiel endothélial. Après un certain temps, ces cellules forment des CFU-EC (*Colony Forming Unit- Endothelial Cells*) et marquent positivement pour plusieurs antigènes endothéliaux tels que eNOS et VEGFR-2 et pour certains marqueurs hématopoiétiques tel que CD45 (Prater, Case et al. 2007).

Dans d'autres études, les *early outgrowth* EPCs ont démontré leur capacité à colocaliser avec les vaisseaux capillaires dans le tissu ischémique en association avec une amélioration de la récupération du flot sanguin dans le membre ischémique de modèles expérimentaux animaux (Takahashi, Kalka et al. 1999; Kalka, Masuda et al. 2000; Vasa, Fichtlscherer et al. 2001).

Les *early outgrowth* EPCs sont capables de se lier à la lectine et d'internaliser les LDL acétylés; deux caractéristiques des cellules endothéliales matures (Asahara, Murohara et al. 1997). L'internalisation des LDL acétylés n'est cependant pas spécifique aux cellules endothéliales puisque d'autres types cellulaires possédant le récepteur d'extraction cellulaire, comme les macrophages, peuvent internaliser les LDL acétylés. La liaison à la lectine n'est pas non plus exclusive aux cellules endothéliales. Les cellules épithéliales et plusieurs autres types de cellules hématopoiétiques dont les plaquettes, les lymphocytes et les macrophages lient aussi la lectine (Baldus, Thiele et al. 1994; Abdul-Salam, Mansour et al. 2005; Georgiou, Pasmazi et al. 2005; Zhang, Zhang et al. 2006). De plus, Medina et al. ont démontré que les EPCs adhérents présentent un pattern d'ARN messager enrichi pour certaines voies hématopoiétiques, particulièrement celles reliées aux systèmes immunitaires et

inflammatoires (Medina, O'Neill et al. 2010). Une comparaison entre les EPCs et les monocytes montre que 77% des protéines isolées des EPCs sont également exprimées chez les monocytes. Les EPCs identifiées par la méthode de liaison à la lectine et aux LDL acétylées ne peuvent donc pas être départagées des autres cellules mononuclées basé seulement sur ces deux critères.

Tel que décrit pour la première fois par Ashara et al., les marqueurs endothéliaux CD34 et VEGFR-2 (ou Flk-1 chez le rongeur) sont exprimés par les EPCs et peuvent être utilisés pour enrichir ce phénotype (Asahara, Murohara et al. 1997). D'autres équipes ont étendu cette observation en identifiant les *early outgrowth EPCs* comme CD34⁺CD133⁺VEGFR2⁺ chez l'humain ou CD34⁺CD117⁺VEGFR2⁺ chez la souris (Kausar 2007). Les marqueurs CD133⁺ (prominine-1) et CD117⁺(c-kit) permettent de discriminer les EPCs des cellules endothéliales matures qui ne portent pas ce marqueur (Peichev, Naiyer et al. 2000). De plus les cellules possédant l'un ou l'autre de ces marqueurs ne possède pas d'activité hématopoïétique ce qui confirme leurs rôles de progéniteurs endothéliaux (Aird 2007). Les protéines de surface endothéliales CXCR4 et CD31 se retrouvent également chez les EPCs (Peichev, Naiyer et al. 2000). La question demeure cependant ouverte quand à l'expression ou non de CD45 par les EPCs putatives (Bertolini, Mancuso et al. 2009; Yoder 2009).

Les cellules identifiées comme CD34⁺CD133⁺VEGFR2⁺ ne forment pas spontanément de structures de type capillaire *in vitro* ni de vaisseaux sanguins lorsqu'implantées dans un échafaudage de collagène/fibronectine (Case, Mead et al.

2007; Prater, Case et al. 2007; Timmermans, Van Hauwermeiren et al. 2007). Ces cellules hématopoiétiques proangiogéniques favorisent l'angiogenèse via des mécanismes paracrins ; c'est-à-dire la sécrétion de facteurs angiogéniques (Estes, Mund et al. 2010; Medina, O'Neill et al. 2010). Les *early outgrowth* EPCs sécrètent, en effet, une grande variété de facteurs proangiogéniques facilitant les réparations vasculaires (Urbich and Dimmeler 2004; Urbich, Aicher et al. 2005). Par exemple, les facteurs sécrétés tels que VEGF et NO favorisent la migration et la prolifération des cellules endothéliales matures, la différenciation des EPCs en cellules endothéliales matures et mobilisent aussi d'autres types cellulaires pro-angiogéniques (Dimmeler and Zeiher 1999).

6.3.3.2. *Late outgrowth EPCs*

Les *late outgrowth EPCs* sont obtenus par la culture des cellules mononucléées du sang sur du collagène de type 1 pendant 14 à 21 jours (Sieveking, Buckle et al. 2008). On les nomme également les ECFC (*Endothelial Colony Forming Cells*) (Figure 10, Méthode C, p.90). Contrairement aux *early EPCs*, les *late outgrowth EPC* sont hautement prolifératives et ont la capacité de former des structures tubulaires (Fleissner and Thum 2010). Au fil du temps en culture, ces cellules n'expriment plus les marqueurs de la lignée hématopoiétique tels que CD45 et CD14. Les marqueurs endothéliaux les identifiant sont pour la plupart identiques à ceux exprimés par les *early outgrowth EPCs* (VEGFR-2, eNOS). Cependant, les *early outgrowth EPCs* ont tendance à perdre ces marqueurs lorsqu'elles sont mises en culture (Ingram, Mead et al. 2004).

Les *late outgrowth EPCs* représentent ce qu'il y a de plus près d'une cellule endothéliale mature. Néanmoins, comme ces cellules sont produites *in vitro* dans des conditions artificielles, on doit se demander si ces cellules ont une pertinence *in vivo* (Steinmetz, Nickenig et al. 2010). De plus, la transplantation de cellules plus différenciées ou de cellules endothéliales matures dans des régions ischémiques donne des effets proangiogéniques plus faibles que lorsque des *early outgrowth EPCs* sont transplantées (Urbich and Dimmeler 2004; Urbich, Aicher et al. 2005; Zampetaki, Kirton et al. 2008). Ces observations remettent en question la valeur des *late outgrowth EPCs* dans des modèles de thérapie cellulaire. Le rôle des *late outgrowth EPC* dans l'homéostasie vasculaire *in vivo* reste donc encore à définir.

6.3.3.3. Le choix de la méthode appropriée

Le domaine des cellules progénitrices endothéliales reste à ce jour un sujet de controverse et d'apprentissage. Ainsi, le choix du type cellulaire et de la méthode employée pour son isolation et sa culture dépend, en grande partie, de la question à adresser. La méthode d'isolation des cellules angiogéniques circulantes est une méthode non-invasive, souvent employée chez l'humain (Timmermans, Plum et al. 2009). Puisque ces cellules restent des événements rares dans le sang, leur expansion *in vitro* permet de contourner, en partie le problème de leur disponibilité (Timmermans, Plum et al. 2009). Ces cellules sont utilisées notamment dans la corrélation des facteurs de risque cardiovasculaire et la capacité régénérative

vasculaire ainsi que dans certains types de thérapie cellulaire chez l'humain (Urbich and Dimmeler, 2004).

Une autre méthode permettant l'acquisition d'un plus grand nombre de cellules est l'isolation des EPCs dérivées de la moelle osseuse. Cette méthode beaucoup plus invasive est plus fréquemment utilisée chez l'animal comme méthode terminale. Selon leur environnement de culture *in vitro*, les cellules isolées de la moelle osseuse possèdent la capacité de se différencier en plusieurs sous-types cellulaires possédant des caractéristiques communes dont la lignée endothéliale et la lignée monocytique (Urbich and Dimmeler, 2004). En effet, les diverses méthodes de culture des EPCs peuvent favoriser la perte ou le développement de certaines caractéristiques propres à différents types cellulaires (Timmermans, Plus et al. 2009). En fait, ces changements phénotypiques sont également retrouvés chez les cellules endothéliales matures qui peuvent également changer leur profil d'expression de marqueurs de surface lorsque mises en culture (Amtaschek, Kriehuber et al. 2007). Bien que l'utilisation de modèles différents dans des espèces variées limite la comparabilité des études, toutes les réintroductions de ces cellules (soit CD34⁺, CD133⁺, EPCs ou Sca-1⁺) ont mené à une amélioration fonctionnelle vasculaire (Urbich and Dimmeler, 2004). Ces résultats suggèrent que l'activité fonctionnelle de ces cellules à augmenter la néovascularisation est peut-être indépendante du type de progéniteur (endothélial) utilisé. Ainsi, puisque les mécanismes précis de la réparation vasculaire par vasculogénèse sont encore peu connus, l'utilisation de cellules immatures telles que les *early outgrowth* EPCs CD117⁺ pouvant se différencier en plusieurs sous-types cellulaires (cellules endothéliales matures ou

cellules de soutien) reste une méthode exploratoire pertinente. Cette méthode sera, par ailleurs, privilégiée par l'auteure dans la conduite de ses recherches.

Enfin, l'emploi de *late outgrowth* EPCs permet de mieux comprendre les mécanismes de différenciation des progéniteurs vers des phénotypes de cellules matures (endothéliales ou autres) selon les conditions de culture auxquelles elles ont été soumises (Timmermans, Plum et al. 2009). Bien que ces cellules n'existent pas à proprement parlé *in vivo*, leur pertinence dans l'exploration et la compréhension des fonctions des EPCs reste complète.

6.3.4. Modification des EPCs par la thérapie génique

Le nombre et la fonction des EPCs peuvent être diminués dans diverses situations cliniques incluant le vieillissement, le diabète et l'hypercholestérolémie (Everaert, Van Craenenbroeck et al. 2010). De plus, les niveaux plasmatiques de facteurs de croissance tels que VEGF sont atténués chez les patients âgés ayant de l'athérosclérose (Tepper, Galiano et al. 2002). D'autres stratégies doivent donc être envisagées afin d'adresser les possibilités de dysfonction des EPCs dans la vasculogénèse thérapeutique pour les maladies ischémiques chroniques.

Une stratégie potentielle pouvant adresser les limitations de la transplantation des EPCs est la thérapie génique (Iwaguro, Yamaguchi et al. 2002; Murasawa, Llevadot et al. 2002). La modification génétique des EPCs permet la surexpression de

facteurs de croissance angiogéniques. De récentes études ont démontrés que le VEGF est un facteur important dans la cinétique des EPCs (Asahara, Takahashi et al. 1999; Shintani, Murohara et al. 2001). Les EPCs transfectées avec le gène codant pour VEGF-A₁₆₅ ont augmenté la néovascularisation en réponse à l'ischémie suggérant que ces cellules peuvent agir comme vecteur pro-angiogénique (Ikeda, Fukuda et al. 2004). D'autres études ont également démontré que la transfection des EPCs pour SDF-1 favorise leur rétention au site d'ischémie et, subséquemment, la néovascularisation des tissus ischémiques (Kuliszewski, Kobulnik et al. 2011). De futures études sont cependant nécessaires à l'évaluation de l'activité fonctionnelle de ces cellules dans la palliation de maladies cardiovasculaires (Asahara 2007).

6.4. Les facteurs de risque cardiovasculaire compromettent la néovascularisation

Le potentiel de néovascularisation d'un individu est modulé par divers facteurs de risque cardiovasculaire. Par exemple, des études ont démontré que le tabagisme, l'hypercholestérolémie, l'âge et le diabète diminuent la néovascularisation à divers niveaux (Rivard, Silver et al. 1999; Rivard, Berthou-Soulie et al. 2000; Michaud, Dussault et al. 2006).

Plusieurs équipes ont démontré que l'angiogenèse, c'est-à-dire la capacité de l'organisme de former de nouveaux vaisseaux, est diminué à un âge avancé (Rivard, Fabre et al. 1999; Rivard, Berthou-Soulie et al. 2000). De plus, les cellules

endothéliales sénescents ont une capacité réduite à former des structures capillaires *in vitro* (Yang, Chang et al. 1999). Les patients âgés présentent des EPCs dont la mobilité est réduite. L'âge diminue également le nombre, la prolifération, la migration, la survie et la résistance au stress oxydant des EPCs (Everaert, Van Craenenbroeck et al. 2010). En parallèle, les EPCs perdent leur pouvoir antioxydant avec l'âge (He, Joyner et al. 2009).

Des études sur le tabagisme ont démontré que l'exposition à la fumée de cigarette diminue la néovascularisation (Michaud, Ménard et al. 2003; Michaud, Dussault et al. 2006; Haddad, Dussault et al. 2009). Le tabagisme est également connu pour diminuer le nombre de cellules progénitrices endothéliales (EPC) et réduire la prolifération, l'adhésion, la migration et leur potentiel vasculogénique (Michaud, Dussault et al. 2006).

L'hypertension est associée à une raréfaction microvasculaire et une altération de l'angiogenèse, en partie via une diminution de la biodisponibilité du NO (Kiefer, Neysari et al. 2003). De plus, l'hypertension augmente la sénescence des EPCs (Everaert, Van Craenenbroeck et al. 2010).

Des études ont démontré que les souris hypercholestérolémiques présentent des niveaux plasmatiques élevés d'ADMA (*Asymmetric Dimethylarginine*), un inhibiteur de NOS (Jang, Ho et al. 2000). Cette inhibition est associée à une diminution de l'angiogenèse basale et celle induite par bFGF chez ces souris (Jang, Ho et al. 2000). Chez le lapin Watanabe et la souris déficiente en ApoE,

l'hypercholestérolémie est associée à une diminution de l'angiogenèse et une augmentation des dommages tissulaires suivant l'ischémie (Van Belle, Rivard et al. 1997; Couffinhal, Silver et al. 1999). De plus l'élévation du cholestérol et des LDL oxydés diminue la migration et la survie des EPCs et diminue leur potentiel vasculogénique (Everaert, Van Craenenbroeck et al. 2010).

Le diabète est associé à des anomalies dans la fonction néovasculaire. D'une part, des études ont démontré une augmentation dysproportionnée de l'angiogenèse au niveau de la rétine (rétinopathie diabétique) et d'autre part, une angiogenèse insuffisante à la réparation de plaies (ulcères de peau) et après une ischémie (Rivard, Silver et al. 1999; Galiano, Tepper et al. 2004; Wilkinson-Berka 2004). Une artériogenèse altérée a également été observée chez des patients diabétiques (Abaci, Oguzhan et al. 1999). Enfin, le diabète diminue le nombre, la prolifération et la migration des EPCs. Il diminue également le potentiel vasculogénique et la résistance au stress oxydant des EPCs (Everaert, Van Craenenbroeck et al. 2010).

Bref, les facteurs de risque cardiovasculaire sont associés à une diminution de la néovascularisation. Bien que les mécanismes précis soient encore à découvrir, une caractéristique commune à tous les facteurs de risque cardiovasculaire est l'augmentation du stress oxydant. Cependant, le rôle du stress oxydant dans la néovascularisation et les mécanismes sous-jacents permettant de mieux comprendre leurs relations restent à mieux définir.

7. Le stress oxydant

7.1. Acteur important dans la réponse vasculaire

L'oxygène est essentiel à la vie humaine. Afin de pallier à l'atmosphère oxydante, les cellules du corps humain ont développé des mécanismes de gestion oxydoréducteurs. Ces mécanismes de gestion influencent grandement l'activité cellulaire, que ce soit au niveau des signaux de transduction, du métabolisme, de la croissance et même de l'apoptose cellulaire (Kamata and Hirata 1999). Dans la balance oxydo-réductive nous retrouvons, comme son nom l'indique, les oxydants et les réducteurs (Goldstein, Czapski et al. 2000; Jourd'heuil, Jourd'heuil et al. 2001).

La notion de stress oxydant dans les systèmes biologiques est apparue avec la recherche sur l'activation de l'oxygène, avec un focus initial sur sa toxicité et les irradiations-X (Stocker and Keaney 2004). Le concept de stress oxydant fut développé davantage en 1985 par Sies, qui décrit le stress oxydant comme une anomalie dans la balance pro-oxydant/antioxydant en faveur de la formation des pro-oxydants.

Une nouvelle définition du stress oxydant fait la distinction conceptuelle entre le stress oxydant et le dommage oxydant. Il est important de constater que selon cette définition, une diminution des antioxydants ne constitue pas un stress oxydant à proprement parler. En effet, même un assaut sévère d'oxydants et une perte

d'antioxydants ne résultent pas nécessairement en un dommage oxydant (Alom-Ruiz, Anilkumar et al. 2008).

Le stress oxydant réfère donc à une condition particulière où les cellules sont exposées à une quantité excessive de molécules d'oxygène ou de ses dérivés. Ces dérivés sont des molécules faisant partie de la grande famille des espèces radicalaires oxygénées aussi connues sous le nom de ROS (*Reactive Oxygen Species*) (Jones 2008).

7.2. Les types d'oxydants

Dans la famille des oxydants, on retrouve plus particulièrement des molécules hautement réactives comme les anions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$) et les radicaux hydroxyl (OH^{\cdot}). Ces molécules font partie de la grande famille des radicaux libres. Un radical libre (oxydant primaire) est une entité chimique capable d'une existence indépendante, et qui contient un ou plusieurs électrons non-pairés (Halliwell 1999). Lorsque deux radicaux libres se rencontrent, ils peuvent se réunir autour de leurs électrons non-pairés pour former un lien covalent. Cette réaction est généralement très rapide et génère des produits non-radicalaires. C'est le cas par exemple de la formation des peroxydes et de ses sous-dérivés (H_2O_2 , $ROOH$, ROO , RO , $HOCl$). Un radical peut être un agent oxydant en acceptant un électron d'un non-radical ou un agent réducteur en donnant un électron à un non-radical (Stocker and Keaney 2004).

Les espèces radicalaires nitrées ou RNS (*Reactive Nitrogen Species*) sont aussi des molécules à pouvoir oxydant. Cette famille qui regroupe l'oxyde nitrique (NO) et ses dérivés oxygénés (peroxynitrites (ONOO⁻), NO₂⁻, NO₃⁻, thiols) provient de l'espèce radicalaire primaire, l'anion superoxyde (O₂⁻.) (Valko, Leibfritz et al. 2007; Bonomini, Tengattini et al. 2008).

Au niveau cardiovasculaire, trois (3) oxydants sont particulièrement importants. Tout d'abord l'anion superoxyde qui est une molécule hautement réactive et deux de ses sous-produits: le peroxyde d'hydrogène et les peroxynitrites.

7.2.1. L'anion superoxyde : l'espèce radicalaire oxygénée la plus importante

La mitochondrie est considérée comme la source majeure de superoxyde *in vivo* (Boveris and Chance 1973). Ainsi, toutes les cellules des mammifères produisent des anions superoxydes (O₂⁻.) Plus particulièrement, la cellule endothéliale produit normalement de l'énergie en réduisant une molécule d'oxygène en eau durant la respiration aérobie (Rojas, Figueroa et al. 2006). Cette réaction effectuée par la chaîne respiratoire mitochondriale n'est malheureusement pas parfaite, ce qui génère environ 1-2% de pertes d'électrons (coenzyme Q et ces complexes) et engendre des anions superoxydes (Forman 1982). Le réticulum endoplasmique, un autre site de transport d'électrons, peut également générer des superoxydes par la perte d'électrons de l'enzyme NADPH cytochrome P450 réductase (Cross and Jones 1991). Les autres

sources importantes d'anions superoxydes sont la xanthine oxydase, la lipooxygénase, la cyclooxygénase et la NADPH oxydase. Au niveau cardiovasculaire, la diminution de la vasorelaxation endothélium-dépendante et l'augmentation de la vasoconstriction dépendante de l'endothélium sont deux phénomènes associés à l'augmentation de la production des anions superoxydes (Katusic 1996). Les anions superoxydes ont également des effets délétères indirects sur le système vasculaire via la formation de peroxyde d'hydrogène et de peroxy-nitrites.

7.2.2. Le peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène généré par la SOD est plus stable que l'anion superoxyde, mais il est hautement diffusible et biologiquement actif. Le peroxyde d'hydrogène est une molécule de signalisation, un régulateur de l'expression de certains gènes et un médiateur potentiel de l'hypertrophie du muscle vasculaire en réponse à des stimuli tel que l'angiotensine II (Griendling, Sorescu et al. 2000; Blanc, Pandey et al. 2003). Le peroxyde d'hydrogène peut également jouer le rôle d'*Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor* (EDHF) dans certains vaisseaux sanguins, ce qui mène à une relaxation du muscle vasculaire et à une vasodilatation. Enfin, le peroxyde d'hydrogène peut également réagir avec des métaux de transition et former des radicaux hydroxyl dommageables via une réaction de Fenton.

7.2.3. Les peroxynitrites

Les peroxynitrites sont des médiateurs importants des dommages vasculaires oxydatifs. Une fois formé, les peroxynitrites peuvent modifier chimiquement les acides aminés, les acides nucléiques ainsi que les groupes thiols contenus dans les protéines et les peptides (Koppenol, Moreno et al. 1992).

Les peroxynitrites peuvent également oxyder le complexe zinc-thiolate de la eNOS et son cofacteur la tétrahydrobioptérine (BH₄) (Kohnen, Mouithys-Mickalad et al. 2001; Laursen, Somers et al. 2001; Zou, Shi et al. 2002). Lorsqu'oxydés, ces deux éléments favorisent le passage de la eNOS productrice de NO vers une eNOS productrice de superoxydes; phénomène appelé découplage de eNOS (Xu, Xie et al. 2006). La diminution de la concentration de l'oxyde nitrique et la formation de peroxynitrites semblent à la base de la pathologie de plusieurs maladies cardiovasculaires telles que l'hypertension, le diabète et l'athérosclérose. En effet, une augmentation de protéines 3-nitrotyrosines a été observée dans les tissus athérosclérotiques (Botti, Trostchansky et al. 2005).

7.3 Les sources d'oxydants

Les oxydants sont générés par des sources qui peuvent être internes ou externes à l'organisme. Les sources externes d'oxydants les plus connues sont les

polluants environnementaux, la fumée de cigarette, les radiations, l'ozone, les rayons ultraviolets et certains types de pesticides et de solvants (Langseth 1996). Puisque les sources externes d'oxydants et l'exposition à celles-ci peuvent varier énormément d'un individu à l'autre, le présent document se concentrera sur les sources internes d'oxydants, plus spécifiquement sur les systèmes enzymatiques oxydants.

7.3.1. La NAD(P)H oxydase: source majeure de superoxydes dans la vasculature

La NAD(P)H oxydase est une source majeure d'anions superoxydes (Rojas, Figueroa et al. 2006). Cette enzyme multicompartimentée est composée d'une sous-unité catalytique membranaire, la Nox, qui existe sous plusieurs isoformes (Nox1-5, Duox 1/2) (Bedard and Krause 2007). Chez les phagocytes (neutrophiles, monocytes, macrophages) où elle a originellement été découverte, la NAD(P)H oxydase possède la sous-unité gp91phox (Nox2) qui doit être activée pour produire des anions superoxydes (Babior 2002). La NAD(P)H oxydase utilise le NADH ou le NADPH comme donneur d'électrons afin de réduire la molécule d'oxygène en O_2^- .

En analogie aux phagocytes, les fibroblastes adventiciels (Nox4), les cellules musculaires lisses vasculaires (Nox1,2,4) et les cellules endothéliales (Nox2,4) contiennent la NAD(P)H oxydase associée à la membrane plasmique (Cathcart 2004; Bedard and Krause 2007). De façon similaire aux phagocytes, les NAD(P)H oxydases des cellules vasculaires peuvent être activées par des stimuli comme AngII, la

thrombine, PDGF, TNF- α , IL-1, VEGF et les fibres de stress afin de répondre à un besoin physiologique de production d'anions superoxydes (Bedard and Krause 2007). Cependant, contrairement aux phagocytes, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les fibroblastes ont une activité basale de production de O_2^- . très basse qui pourrait par contre être activée lors de situations pathologiques comme l'athérosclérose (Bedard and Krause 2007).

7.3.2. La xanthine oxydase

La xanthine oxydase est libérée en circulation sanguine lors d'événements inflammatoires (Houston, Estevez et al. 1999). Cette enzyme possède une très forte affinité de liaison à l'endothélium. La liaison aux cellules endothéliales augmente des milliers de fois la concentration de la xanthine oxydase à la surface cellulaire (Houston, Estevez et al. 1999). L'augmentation d'oxydants à la surface de l'endothélium favorise la perte d'intégrité vasculaire et une dysfonction endothéliale (Houston, Estevez et al. 1999). La formation de xanthine oxydase dans l'endothélium est causée par des forces de cisaillement, une condition présente lors de la formation de lésions athérosclérotiques (McCord 1985)

7.3.3. Les lipoxgénases et les cyclooxygénases

Les lipoxgénases se retrouvent sous plusieurs formes (5,12,15-lipoxgénases) dans divers types cellulaires tels que les monocytes/macrophages, les

cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses (Huo, Zhao et al. 2004). Ces enzymes catalysent l'insertion de molécules d'oxygène dans les acides gras poly-insaturés, donnant naissance à des molécules telles que les prostaglandines, les thromboxanes et les leukotriènes (Upston, Neuzil et al. 1996; Upston, Neuzil et al. 1997). L'oxydation des LDL par ces enzymes favorisent l'activation endothéliale et la progression des lésions athérosclérotiques (Huo, Zhao et al. 2004).

Les cyclooxygénases convertissent l'acide arachidonique en prostaglandines en y insérant des molécules d'oxygène (Stocker and Keaney 2004). Cette enzyme existe sous 3 isoformes: COX-1, COX-2 et COX-3. La COX-1 est exprimée constitutivement par les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses (Belton and Fitzgerald 2003). Cette isoforme est induite dans les cellules musculaires lisses de la plaque athérosclérotique (Smith, Morrow et al. 1997). La COX-2 est la principale source de prostaglandines chez l'humain (Belton and Fitzgerald 2003). Elle est exprimée par les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les macrophages dans les lésions athérosclérotiques (Schonbeck, Sukhova et al. 1999; Cipollone, Prontera et al. 2001). Enfin, la COX-3 est une isoforme nouvellement découverte dont les propriétés semblent similaires à celle de la COX-1 (Botting 2003).

7.3.4. Les métaux de transition

Les métaux de transition libres comme le fer et le cuivre sont de forts catalyseurs de réactions d'oxydation en présence d'hydroperoxydes comme le peroxyde lipidique (LOOH). Cependant, la concentration de métaux de transition est très faible *in vivo* et leur rôle dans l'athérosclérose n'est pas défini (Stocker and Keaney 2004).

7.4. Les antioxydants

7.4.1. Protecteurs des dommages oxydatifs

Les antioxydants sont essentiels pour le maintien de l'équilibre oxydo-réducteur. Les antioxydants peuvent être classifiés en deux grandes catégories: les antioxydants exogènes et endogènes (Santrucek and Krepelka 1988). Les antioxydants exogènes sont aussi connus sous le nom d'antioxydants naturels puisqu'ils sont principalement dérivés de l'alimentation. De plus en plus d'articles vantent les mérites d'une alimentation saine enrichie d'antioxydants sous forme de suppléments vitaminiques (vitamine C, E) ou par l'apport de certains aliments comme le thé vert, les bleuets, les canneberges et le vin rouge (Lefevre, Michaud et al. 2007; Loft, Moller et al. 2008).

Des études conduites chez l'animal ont démontré qu'une supplémentation en vitamines C et E améliore la néovascularisation en réponse à l'ischémie et inhibe le

développement de certains carcinomes (Chen, Boissonneault et al. 1988; Turgeon, Dussault et al. 2010). Chez l'humain, ces mêmes vitamines ont des effets controversés (Dutta and Dutta 2003). D'une part, des études ont démontré que la vitamine E a des effets anti-athérogéniques dans la maladie coronarienne (Stephens, Parsons et al. 1996; Boaz, Smetana et al. 2000). D'autre part, des études ont démontré que la vitamine E peut également être pro-oxydante et pro-athérogénique en combinaison avec certains facteurs de risque cardiovasculaire dont le tabagisme et l'hypercholestérolémie (Cheung, Zhao et al. 2001; Weinberg, VanderWerken et al. 2001). L'efficacité des antioxydants naturels est donc mitigée. Ceci est partiellement dû au fait que l'activité des antioxydants naturels est efficace avant l'apparition des facteurs de risque cardiovasculaire et du développement d'une pathologie vasculaire (Loft, Moller et al. 2008).

7.4.2. Le système de protection endogène

7.4.2.1. Les enzymes antioxydantes

Les trois (3) enzymes antioxydantes les plus importantes au niveau de la cellule endothéliale sont les superoxydes dismutases (SOD), qui catalysent la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène ainsi que la glutathione peroxydase et la catalase qui sont toutes deux responsables de la conversion du peroxyde d'hydrogène en eau (Bonomini, Tengattini et al. 2008). Ces trois (3) enzymes sont toutes impliquées dans la réduction de l'anion superoxyde.

7.4.2.1.1. Les superoxydes dismutases

Les superoxydes dismutases se présentent sous 3 isoformes: la SOD-1 (CuZnSOD), la SOD-2 (MnSOD) et la SOD-3 (ecSOD) (Figure 11, p.111) (Stocker and Keaney 2004).

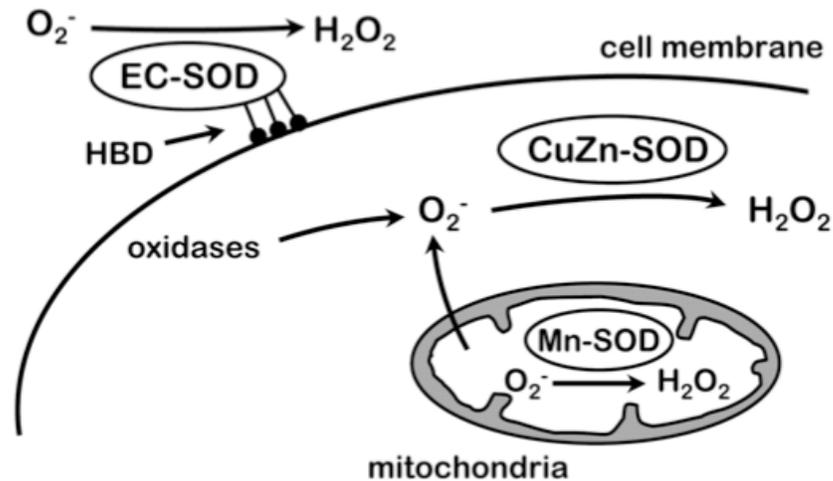


Figure 11. Localisation des isoformes SOD (Faraci and Didion 2004).

7.4.2.1.1.1. La CuZnSOD: la forme la plus abondante

La CuZnSOD ou SOD-1 (alors appelée hémocupreine) fut initialement isolée d'érythrocytes bovins par Mann et Keilin à la fin des années 1930 (Bannister 1988). Il fallut cependant attendre 1969 afin de comprendre le rôle de cette enzyme alors rebaptisée superoxyde dismutase par Fridovich et McCord pour sa capacité à catalyser la conversion des anions superoxydes en peroxydes d'hydrogène et en oxygène (Bannister 1988). La CuZnSOD est une forme cytoplasmique homodimérique. C'est la forme la plus abondante dans les tissus et les cellules de l'organisme et elle est présente dans tous les types de cellules. On la retrouve

principalement au niveau du cytosol avec une activité démontrée dans les lysosomes, les peroxysomes, le noyau cellulaire et l'espace entre la membrane mitochondriale interne et externe (Stocker 1991; Halliwell 1999). L'ion cuivre participe à la réaction de dismutation en alternant les réactions d'oxydation et de réduction (base de l'habilité des agents chélateurs) (Heikkila and Cohen 1973).

La transcription du gène SOD-1 est régulée en réponse à divers stimuli incluant le stress, les cytokines pro-inflammatoires et certains facteurs de croissance selon le type cellulaire. Par exemple, de récentes études ont démontré que l'activation de la voie PI3K-Akt, un axe de survie cellulaire, augmente la capacité antioxydante cellulaire au moins en partie via l'augmentation de l'expression de CuZnSOD (Rojo, Salinas et al. 2004). En effet, les cellules tumorales neuronales qui ont une activité Akt kinase démontrent des niveaux de ROS moins élevés et une augmentation des niveaux d'ARN messenger et de protéines de CuZnSOD (Rojo, Salinas et al. 2004). D'autres études ont démontré que des molécules inflammatoires telles que le TNF-alpha et l'interleukine-1 favorise la production de NO par la iNOS ce qui génère une augmentation de l'ARN messenger de CuZnSOD chez la cellule mésangiale glomérulaire (Frank, Zacharowski et al. 1999). Enfin, les niveaux d'ARN messenger de la CuZnSOD sont également augmentés en présence de progestérone et d'estradiol chez la cellule stromale de l'endomètre (Sugino, Karube-Harada et al. (2002). Bref, les études tendent à démontrer que peu importe le type cellulaire, la transcription du gène SOD-1 favorise la survie et le maintien de la fonction cellulaire en condition de stress augmenté.

7.4.2.1.1.2. La MnSOD: régulation du stress mitochondrial

La SOD-2 ou MnSOD est une forme intramitochondriale homotétramérique permettant la régulation du stress oxydant généré par la chaîne respiratoire mitochondriale. Elle contribue à environ 10% de l'activité cellulaire totale de la SOD (Stocker and Keaney 2004).

7.4.2.1.1.3. La ecSOD

Enfin, la SOD-3 (ou SOD extracellulaire) est également homotétramérique et exprimée dans certains tissus spécifiques tels les reins, les poumons, le muscle squelettique et le tissu adipeux (Marklund, Holme et al. 1982; Marklund 1984). La ecSOD contient également le cuivre/zinc et se retrouve, en condition normale, à l'extérieur des cellules de la paroi vasculaire (Stralin, Karlsson et al. 1995). Cette enzyme est liée à l'héparan sulfate protéoglycan dans le glycocalyx de diverses cellules incluant les cellules endothéliales et dans la matrice du tissu conjonctif. Dans l'aorte, cette enzyme se retrouve dans le tissu conjonctif matriciel et est produite par les cellules musculaires lisses (Antonyuk, Strange et al. 2009). Cette synthèse est modulée par des cytokines, des facteurs de croissance, des facteurs vasoactifs et des oxydants suggérant que des changements dans l'activité de cette enzyme peuvent survenir lors de maladie vasculaire (Jung, Marklund et al. 2003; Stocker and Keaney 2004).

7.4.2.1.2. Effets protecteurs de la SOD sur le système vasculaire

La surexpression de la SOD a été utilisée dans plusieurs études pour investiguer son rôle dans la fonction vasculaire. La surexpression de SOD a des effets anti-inflammatoires, empêchant l'activation des cellules endothéliales par les anions superoxydes et subséquentement l'infiltration des neutrophiles (Salvemini, Riley et al. 1999; Ghio, Suliman et al. 2002; Masini, Cuzzocrea et al. 2002). Des effets protecteurs ont également été observés au niveau de l'ischémie myocardique, les injures de reperfusion chez la souris, les maladies pulmonaires et l'arthrose (Chen, Oberley et al. 2000)(Corvo, Boerman et al. 1999; Salminen, Harjula et al. 2001; Barnes 2005).

7.4.2.1.3. Le peroxyde d'hydrogène régule l'activité de la SOD

La dismutation des anions superoxydes par la SOD diminue globalement les niveaux de stress oxydant. La SOD possède l'avantage de se retrouver au tout début de la chaîne, c'est-à-dire qu'elle est responsable de la dismutation de l'anion superoxyde (l'espèce radicalaire primaire) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et oxygène (O_2). Son action ne dépend donc pas (et n'est pas limitée) par d'autres réactions enzymatiques. Par contre l'activité de la SOD est régie par la loi de Michaelis-Menton, c'est-à-dire qu'en l'absence d'une élimination efficace du H_2O_2 , l'activité de la SOD diminuera progressivement.

La régulation de la quantité de peroxyde d'hydrogène par les enzymes glutathione peroxydase et catalase est, par conséquent, importante dans le maintien de l'équilibre vasculaire.

7.4.2.1.4. La glutathione peroxydase (GPx)

Le rôle principal de la GPx est de catalyser le peroxyde d'hydrogène. C'est donc une enzyme importante pour diminuer les niveaux de stress oxydant. La GPx existe sous 6 isoformes (1-6). Bien que toutes les isoformes de la GPx catalysent la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et des hydroperoxydes lipidiques en leurs alcools correspondants, l'isoforme GPx-1 est celle qui est la plus abondamment exprimée dans les tissus (Flohe, Gunzler et al. 1973; Rotruck, Pope et al. 1973; Cheng, Ho et al. 1997; Cheng, Combs et al. 1998). C'est donc cette isoforme qui a été la plus étudiée.

Au niveau cardiovasculaire, la surexpression de la glutathione peroxydase permet de diminuer les injures causées par l'ischémie/reperfusion myocardique (Yoshida, Watanabe et al. 1996). Cependant, de récentes études ont démontré que la GPx-1 pouvait promouvoir la mort cellulaire par les peroxynitrites (Fu, Sies et al. 2001). De plus, la surexpression de la GPx-1 a été associée au développement de l'hyperglycémie, de l'hyperinsulinémie, de la résistance à l'insuline et de l'obésité (Lei, Cheng et al. 2007). Un contrôle étroit sur la quantité et l'activité de la GPx-1 semble donc nécessaire afin de conserver un équilibre physiologique.

La GPx-1, contrairement à la SOD, est régulée par une grande quantité de molécules pouvant altérer ses fonctions; particulièrement la concentration de peroxyde d'hydrogène. En effet, la GPx-1 semble surtout efficace à de faibles niveaux de stress oxydant (Cheng, Combs et al. 1998; Wassmann, Wassmann et al. 2004).

7.4.2.1.5. La catalase: efficace à de fortes concentrations de stress oxydant

La catalase a pour principal rôle la protection de l'inactivation de la superoxyde dismutase par un surplus de H_2O_2 . Puisqu'elle n'est pas régie par les lois de Michaelis-Menten, son action catalytique est proportionnelle à la quantité de peroxyde d'hydrogène (Nicholls 2000). La catalase est donc particulièrement importante lorsqu'il y a une réduction de l'activité de la glutathione peroxydase. À noter qu'en absence ou à de faibles concentrations de H_2O_2 , la catalase se transforme en oxydase ce qui favorise la production de ROS (Burdon, Alliangana et al. 1995). La catalase a donc une activité antioxydante efficace à de fortes concentrations de stress oxydant. L'équipe du Dr. Schriener a récemment observé que la surexpression de la catalase mitochondriale chez la souris augmente la survie cellulaire de 20%, diminue la délétion mitochondriale et retarde l'apparition de pathologies cardiovasculaires (Galasso, Schiekofer et al. 2006). L'un des inconvénients de la catalase est son inactivation par divers composés dont le NO et les peroxy-nitrites (Ghosh, Janocha et al. 2006; Goyal and Basak 2010). De plus, le composé NADPH joue le rôle de cofacteur dans la transformation du H_2O_2 en H_2O+O_2 par la catalase (Kisucka, Chauhan et al. 2008). Le NADPH est donc un facteur limitant de l'activité

antioxydante de la catalase. Enfin, les fonctions de la catalase sont grandement influencées par l'activité de la SOD, c'est-à-dire la production de H₂O₂.

7.2.2.2. Les molécules antioxydantes

Bien que les enzymes telles que les superoxydes dismutases, la glutathione peroxydase et la catalase soient de puissants antioxydants, de récentes études tendent à démontrer que le bon fonctionnement de ces systèmes enzymatiques est dépendant de molécules antioxydantes endogènes dont certaines seront discutées ici. La glutathione est un important tampon redox intracellulaire fonctionnant à titre de co-substrat de la glutathione peroxydase (Meister, Anderson et al. 1983 ; Maritim, Sanders et al. 2003). En effet, la glutathione peroxydase métabolise le peroxyde d'hydrogène en eau en utilisant la glutathione réduite comme donneur d'hydrogène (Maritim, Sanders et al. 2003). Les niveaux de glutathione sont normalisés par plusieurs composés dont la L-arginine et le nitroprusside ; deux composés favorisant la biodisponibilité du NO (Mohan et Das, 1998). L'induction de la glutathione est également régit positivement par l'acide alpha-lipoïque (Wang, Yu et al. 2011). L'acide alpha-lipoïque a le potentiel de détoxifier les ROS de manière directe ou indirectement en protégeant la diminution des superoxydes dismutases et de la catalase normalement observées lors d'un stress ischémique tel que l'ischémie-reperfusion myocardique (Suzuki, Tsuchiya et al. 1991 ; Scott, Aruomo et al, 1994, Wang, Yu et al. 2011). Ceci suggère donc un rôle de protection des mécanismes de défenses antioxydantes par l'acide alpha-lipoïque. Cependant, les mécanismes précis restent à mieux définir.

L'acétyl-L-carnitine est une autre molécule aux propriétés antioxydantes particulièrement importante au niveau des désordres neurodégénératifs (Calabrese, Ravagna et al. 2005). L'acétyl-L-carnitine est un composé facilitant le transport d'acides gras dans la mitochondrie pour la bêta-oxydation (Tastekin, Gepdiremen et al. 2006). L'acétyl-L-carnitine est également impliquée dans la stabilisation et la réparation membranaire (Calabrese, Rizza et al. 1999). Plus récemment, des études ont démontré que l'acétyl-L-carnitine induit l'expression de l'hème oxygénase-1, une protéine de stress impliquée dans la défense contre les injures oxydatives (endotoxines, cytokines, hèmes) (Foresti, Hoque et al. 2003 ; Chen et Regan, 2004). En effet, l'expression de l'hème oxygénase-1 est rapidement augmentée par les ROS et les RNS ainsi que par une déplétion en glutathione (Calabrese, Ravagna et al. 2005). Ceci suggère donc que la voie acétyl-L-carnitine/hème oxygénase-1 pourrait pallier partiellement à une perte d'activité de la glutathione peroxydase lors d'une déplétion en glutathione. Ainsi, des molécules telles que la glutathione ou l'acétyl-L-carnitine permettent le maintien de l'équilibre redox soit en étant elles-mêmes antioxydantes soit en favorisant l'expression d'enzymes antioxydantes.

7.5. Tout est une question d'équilibre

Afin de limiter les niveaux de stress oxydant, la notion d'équilibre entre les oxydants et les antioxydants est primordiale. La quantité mesurable de stress oxydant est la clé physiologique d'une grande partie des fonctions cellulaires. Certaines études

ont démontré qu'un niveau faible à modéré de stress oxydant est nécessaire à l'initiation de voies de survie, de réparation vasculaire (angiogenèse) et du système immunitaire (respiration oxydative des macrophages, monocytes et neutrophiles) (Yasui and Baba 2006; Bonomini, Tengattini et al. 2008; Urao, Inomata et al. 2008).

Toutefois, plusieurs maladies comme l'athérosclérose, le diabète, l'Alzheimer et l'arthrite sont reliées à une augmentation du stress oxydant (Lambeth 2007). Des études ont démontré en parallèle qu'un stress oxydant excessif est à la base de dysfonctions endothéliales, arthritiques, neuronales ainsi que d'autres types de mort cellulaire (Lennon, Martin et al. 1991; Michaud, Dussault et al. 2006; Kalpakcioglu and Senel 2008). La surproduction d'espèces radicalaires hautement réactives cause des dommages aux macromolécules comme les lipides cellulaires, les protéines et l'ADN en modifiant ou inhibant leur fonction normale (Apel and Hirt 2004).

7.5.1. Les ROS dans la pathogenèse de l'athérosclérose

L'évolution de la plaque athérosclérotique est au moins en partie reliée au stress oxydant. C'est l'oxydation hautement athérogénique des LDL en oxLDL qui initie les premiers stades de l'athérosclérose (Cai and Harrison 2000). De plus, une déficience en peroxyredoxine, une autre enzyme antioxydante, favorise l'adhésion monocyttaire à l'endothélium et la propagation de l'athérosclérose (Kisucka, Chauhan et al. 2008).

7.5.1.1. Le stress oxydant est impliqué dans la dysfonction endothéliale

Plusieurs évidences suggèrent que l'activation des cellules endothéliales se fait directement ou indirectement par les ROS. En effet, au contact des ROS, l'expression de molécules d'adhésion et des chémokines est augmentée, l'activité des MMP-2 et MMP-9 (métalloprotéinases) est augmentée, le cytosquelette est réorganisé, des jonctions « gap » intercellulaires sont formées, la perméabilité endothéliale est augmentée, ainsi que la transmigration leucocytaire (Alom-Ruiz, Anilkumar et al. 2008).

D'autres études ont démontré qu'une grande quantité d'espèces radicalaires oxygénées au niveau des cellules endothéliales provoque l'arrêt temporaire ou permanent de la croissance cellulaire, la sénescence, l'apoptose voir même la nécrose cellulaire (Burdon, Gill et al. 1989; Burdon 1995). L'apoptose causée par les ROS crée une perte de cellules endothéliales à la paroi vasculaire provoquant un état pro-athérogénique et pro-coagulant (Dimmeler and Zeiher 2000). La perte de cellules endothéliales diminue également la fonction de vasorelaxation endothélium-dépendante (Vallance 1992). Enfin, tel que discuté précédemment, le stress oxydant excessif peut diminuer la biodisponibilité du NO via la formation de peroxy-nitrites (Faraci 2005). La réduction de la biodisponibilité du NO additionnée à la perte de cellules endothéliales exacerbent la rigidité vasculaire, état retrouvé dans le vieillissement vasculaire (Lakatta 2003).

7.5.1.2. Le stress oxydant dans le processus du vieillissement

Depuis de nombreuses années, les chercheurs ont observé que les espèces ayant des taux métaboliques plus élevés ont un potentiel de longévité diminué (Beckman and Ames 1998). Des équipes de recherche ont par la suite démontré que c'est la consommation d'énergie qui est responsable de la sénescence *per se* (Beckman and Ames 1998). Puisque la consommation d'énergie par la mitochondrie résulte en production de superoxydes, ces observations suggérant une application potentielle aux mécanismes du vieillissement. Ainsi, une respiration plus rapide, associée à une plus grande production de superoxydes accélèrent le vieillissement. La théorie du vieillissement par les radicaux libres propose que le stress oxydant est la cause de la dégénérescence cellulaire. Le stress oxydant provoque l'accumulation de dommages oxydants, la modification des structures existantes et la déplétion de certains systèmes, dont la perte d'activités enzymatiques (Harman 1992).

L'accumulation du stress oxydant et de ses dommages au fil des années ainsi que la diminution des barrières antioxydantes avec l'âge fait du vieillissement populationnel un facteur de risque de haute importance. On peut facilement s'imaginer qu'une quantité importante de ROS favorise la mort cellulaire par toxicité. Mais dans les faits, son rôle est un peu plus complexe. De récentes études ont impliqué le dommage à l'ADN dans le processus de l'athérosclérose (Mahmoudi, Mercer et al. 2006). Le stress oxydant est une des causes majeures des dommages à l'ADN (Cooke, Evans et al. 2003). Le dommage à l'ADN est associé à une activation rapide de p53 qui favorise subséquemment l'apoptose cellulaire, en partie via les

ROS (Mercer, Mahmoudi et al. 2007). La surexpression de p53 a pour résultat l'augmentation de la génération de ROS et de l'apoptose cellulaire. De récentes études ont démontré que des souris présentant une suractivation de la voie p53 ont un phénotype de vieillissement accéléré (Varela, Cadinanos et al. 2005). Le gène p53 est un important médiateur de la réponse au stress et a récemment été reconnu comme un modificateur de la réponse angiogénique (North, Moenner et al. 2005). En effet, p53 peut interagir avec la voie du HIF et interférer avec les mécanismes de translation des facteurs angiogéniques (North, Moenner et al. 2005). D'autres études sont cependant nécessaires à une meilleure compréhension du rôle potentiel du stress oxydant dans la régulation de la diminution de l'angiogénèse par p53 dans un contexte de vieillissement vasculaire.

7.5.2. Contrôle de la néovascularisation par le stress oxydant

7.5.2.1. Des concentrations faibles à modérés de ROS: effets pro-angiogéniques

Chez l'adulte, la prolifération des cellules endothéliales permet l'élongation de vaisseaux existants vers des tissus/organes sous-vascularisés. Les ROS sont impliqués dans les voies de signalisation de plusieurs facteurs de croissance. Par exemple, PDGF et EGF induisent la production de H₂O₂ (Maulik and Das 2002). De manière similaire, le VEGF semble favoriser la prolifération et la migration des cellules endothéliales via la production de ROS (Maulik and Das 2002). Enfin, il a été

démontré que le peroxyde d'hydrogène induit l'ARNm de VEGF d'une manière dose-dépendante par la voie de PKC (Maulik and Das 2002).

Les ROS sont également impliqués dans l'induction par VEGF de l'autophosphorylation du récepteur VEGFR-2 des cellules endothéliales (Gering, Rodaway et al. 1998; Ushio-Fukai, Tang et al. 2002; Lin, Yen et al. 2003; Ikeda, Ushio-Fukai et al. 2005). Les espèces radicalaires oxygénées et le VEGF forment une boucle d'amplification positive dans l'angiogenèse. D'une part, les ROS exogènes stimulent l'induction de VEGF par divers types cellulaires et favorisent la migration, la prolifération, la réorganisation du cytosquelette et la morphogenèse tubulaire des cellules endothéliales matures (Chua, Hamdy et al. 1998; Vepa, Scribner et al. 1999; Yasuda, Ohzeki et al. 1999; Stone and Collins 2002; Luczak, Balcerzyk et al. 2004). D'autre part, la stimulation de VEGF augmente la production de ROS via l'activation Rac-1 dépendante de la NAD(P)H oxydase dans les cellules endothéliales (Lin, Yen et al. 2003; Yamaoka-Tojo, Ushio-Fukai et al. 2004; Ikeda, Ushio-Fukai et al. 2005).

Au niveau de la cellule endothéliale, c'est l'activité de la NAD(P)H oxydase, grande productrice d'anions superoxydes, qui est requise pour la prolifération et la survie cellulaire (Burdon, Gill et al. 1989). L'expression de la Nox4 favorise la prolifération et la migration des cellules endothéliales via la voie ERK. L'expression de la Nox2 semble également nécessaire à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (Tojo, Ushio-Fukai et al. 2005). De plus, l'anion superoxyde a également démontré sa capacité à stimuler la croissance cellulaire à faibles doses dans plusieurs

types cellulaires dont le fibroblaste humain et murin, la cellule épithéliale et la cellule musculaire lisse (Galasso, Schiekofer et al. 2006).

Des études ont démontré que de faibles doses de H₂O₂ (10⁻⁶ à 10⁻⁸M) stimulent la croissance des fibroblastes en culture (Datta, Brunet et al. 1999). D'autres équipes ont par la suite démontré que cet effet est également visible chez d'autres types cellulaires notamment les cellules musculaires lisses, les cultures primaires de cellules endothéliales d'artères pulmonaires (PAECs), les cultures primaires de cellules endothéliales microvasculaires et les cellules épithéliales de poumons immortalisées (Datta, Brunet et al. 1999; Meyer, Latz et al. 2003). En angiogenèse, l'exposition de cellules endothéliales à de faibles doses de H₂O₂ favorise l'expansion néovasculaire (Yamaoka-Tojo, Ushio-Fukai et al. 2004).

Bref, les superoxydes sont un point crucial du système cardiovasculaire car ils sont impliqués dans 1) la progression de l'athérosclérose via l'oxydation des lipides; 2) l'activation et la dysfonction des cellules endothéliales; et 3) l'augmentation de la réponse inflammatoire. Néanmoins, ce sont également les superoxydes qui régulent les mécanismes pro-angiogéniques en favorisant ou en inhibant la fonction (prolifération, migration, adhésion, formation de tubules) des cellules endothéliales.

7.5.2.2. Rôle de la CuZnSOD dans la fonction vasculaire

Tel que discuté précédemment, la CuZnSOD est l'enzyme responsable de la régulation des superoxydes dans l'ensemble de l'organisme et plus particulièrement au niveau de la cellule endothéliale. Des études ont démontré que des vaisseaux isolés

de souris déficientes en CuZnSOD ont une diminution de la réponse vasodilatatrice à l'acétylcholine (Didion, Ryan et al. 2002). En fait, la réduction partielle de l'expression de la CuZnSOD dans un modèle hétérozygote est suffisante pour induire une hypertrophie artériolaire et une augmentation de la rigidité vasculaire (Baumbach, Didion et al. 2006). De plus, l'absence de CuZnSOD potentialise la dysfonction endothéliale induite par l'angiotensine-II (Didion, Kinzenbaw et al. 2005). Cette enzyme a donc un rôle important dans le maintien de l'homéostasie vasculaire.

Les effets protecteurs de la CuZnSOD au niveau de la fonction vasculaire et endothéliale peut-être partiellement expliqués par la conservation de l'oxyde nitrique (NO). Nous avons précédemment discuté que la cellule endothéliale produit et sécrète du NO. Ce facteur régule l'aggrégation plaquettaire et a des effets fibrinolytiques (Cooke and Dzau 1997). Il est également responsable de la relaxation endothélium-dépendante des vaisseaux sanguins et par le fait même du contrôle de la pression artérielle (Huang, Huang et al. 1995). La réaction NO-anion superoxyde est approximativement six (6) fois plus rapide que la dismutation du $O_2^{\cdot-}$ par la SOD (Beckman, Creager et al. 2002). Au niveau endothélial, la CuZnSOD permet de diminuer les niveaux de superoxydes. Une concentration suffisante de CuZnSOD est donc essentielle car si les niveaux de superoxydes cellulaires augmentent de façon disproportionnée, le NO s'associera préférentiellement à l'anion superoxyde pour former du peroxynitrite (ONOO⁻). La concentration de CuZnSOD est donc un point déterminant dans la biodisponibilité et la bioactivité du NO. Puisqu'une augmentation

des niveaux de stress oxydant et une diminution de la biodisponibilité du NO sont associées à l'athérogenèse et à la dysfonction endothéliale, une des fonctions clé de la CuZnSOD semble être la protection de l'inactivation du NO dérivé des cellules endothéliales par les anions superoxydes ainsi que la diminution des niveaux de stress oxydant vasculaire.

Le rôle des ROS dans la néovascularisation c'est-à-dire dans l'angiogenèse et la vasculogenèse reste encore à préciser. Un débalancement physiologique complet en faveur des antioxydants éliminerait les espèces radicalaires oxygénées et diminuerait inévitablement la croissance cellulaire et l'angiogenèse (Day 2005). Afin de maintenir un équilibre, une augmentation significative de ROS entrainera automatiquement une augmentation significative d'enzymes antioxydantes pour maintenir l'équilibre physiologique (Burdon, Gill et al. 1989). Tel que mentionné précédemment, certaines études ont démontré une inhibition complète de la croissance cellulaire et de l'angiogenèse en absence de ROS (Burdon, Gill et al. 1989; Tojo, Ushio-Fukai et al. 2005). D'autres études font état, au contraire, d'une abondante apoptose et nécrose cellulaires ainsi qu'une diminution de l'angiogenèse en réponse à des niveaux excessifs de ROS (Kamata and Hirata 1999) (Galasso, Schiekofer et al. 2006). La CuZnSOD semble réguler l'abondance d'anions superoxydes au niveau de la cellule endothéliale. Néanmoins son rôle dans la gestion des ROS lors de la néovascularisation en réponse à l'ischémie n'est pas défini. Mes travaux de recherche se pencheront donc sur cette question.

8. Hypothèses de recherche

L'athérosclérose est une maladie chronique qui cause des obstructions au flot sanguin. Lorsque les obstructions vasculaires athérosclérotiques sont si importantes que les techniques directes de revascularisation ne peuvent pallier à la situation de manière efficace, la sévérité de l'ischémie tissulaire résiduelle dépendra en grande partie de l'habilité de l'organisme à former spontanément de nouveaux vaisseaux sanguins (néovascularisation). De manière intéressante, les mêmes facteurs de risque cardiovasculaire menant au développement des maladies cardiovasculaires athérosclérotiques tels que le vieillissement, le diabète, le tabagisme, l'hypertension et l'hypercholestérolémie sont associés à une diminution de la néovascularisation en réponse à l'ischémie. Les mécanismes précis restent cependant à déterminer.

Un point commun à tous les facteurs de risque cardiovasculaire est l'augmentation du stress oxydant. L'anion superoxyde est le principal oxydant retrouvé dans les maladies cardiovasculaires athérosclérotiques et dans la dégénérescence cellulaire vasculaire associée à l'âge. La CuZnSOD est la principale enzyme antioxydante responsable de la détoxification de l'anion superoxyde dans le système vasculaire. Cependant, le rôle de la CuZnSOD dans la récupération de la néovascularisation en réponse à l'ischémie n'est pas défini.

Le vieillissement est un facteur de risque cardiovasculaire incontrôlable et inévitable. Ce facteur de risque est d'autant plus important qu'il augmente à la fois

l'incidence des maladies cardiovasculaires chez des individus sains et le risque de développer d'autres facteurs de risque cardiovasculaire tel que le diabète. Le stress oxydant est à la base du processus du vieillissement. En effet, le vieillissement est caractérisé par une accumulation de dommages oxydants qui favorise la sénescence cellulaire. De plus, les défenses antioxydantes sont déplétées avec l'âge. La diminution des défenses antioxydantes avec l'âge pourrait en partie expliquer l'exacerbation des effets cumulés du stress oxydant. Puisque la CuZnSOD est la principale enzyme antioxydante au niveau vasculaire, son rôle dans le vieillissement devra être mieux défini.

Afin de mieux comprendre le rôle protecteur de la CuZnSOD dans la vasculature, les hypothèses de mes études étaient 1) qu'une absence de CuZnSOD diminue la néovascularisation réparatrice en réponse à l'ischémie. 2) que cette diminution de la néovascularisation est due au vieillissement prématurée de la vasculature affectant à la fois les cellules endothéliales matures et les cellules progénitrices endothéliales (EPCs).

8.1 Objectifs spécifiques

8.1.1. Étude #1

L'objectif spécifique de cette étude consiste à caractériser l'effet d'une absence en enzyme CuZnSOD sur la néovascularisation dans un modèle murin d'ischémie de la patte. Cette étude permet de faire la corrélation entre des niveaux de

stress oxydant exacerbés et la capacité néovasculaire de l'organisme. Plus spécifiquement, l'effet d'une déficience en CuZnSOD sur la fonction des EPCs sera étudié. Les résultats de ce travail de recherche permettront aussi d'évaluer l'importance du NO dans cette physiopathologie. Finalement, ce projet de recherche évaluera la possibilité d'améliorer la néovascularisation au moyen de la thérapie cellulaire des souris déficientes en CuZnSOD.

8.1.2. Étude #2

L'objectif spécifique de cette étude consiste à caractériser l'effet cumulé du vieillissement et de l'absence de CuZnSOD sur l'angiogenèse et la vasculogenèse dans un modèle murin d'ischémie de la patte. Les degrés de néovascularisation seront corrélés aux niveaux de stress oxydants locaux et systémiques. Plus précisément, l'impact de l'âge et d'un stress oxydant exacerbé sur le nombre et la fonction des cellules progénitrices endothéliales (EPCs) sera évalué. Les résultats de ce projet de recherche permettront de mieux définir les effets reliés à l'âge et à l'augmentation du stress oxydant sur la fonction néovasculaire.

9. Premier article

Publié dans Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular

Biology (ATVB)

**Essential Role of CuZnSOD for Ischemia-Induced Neovascularization via
Modulation of Bone Marrow-Derived Endothelial Progenitor Cells**

Groleau et al: CuZnSOD and ischemia-induced neovascularization

Jessika Groleau, Sylvie Dussault, Paola Haddad, Julie Turgeon, Catherine
Ménard and Alain Rivard

Word count: 5929

Abstract: 198

Number of Figures: 6 + 4 supplementals

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

Address for correspondence:

Alain Rivard, MD

Centre Hospitalier de l'Université de Montréal
1560 Sherbrooke Est

Montreal, Que, H2L 4M1

Tel (514) 890-8000 ext:25776

Fax (514) 412-7624

ABSTRACT

Objective: To investigate the effect of oxidative stress on ischemia-induced neovascularization in copper-zinc (CuZn) superoxide dismutase (SOD)-deficient mice

Methods and results: In the vascular wall, CuZnSOD is essential for protecting against excessive oxidative stress and maintaining endothelial function. After surgically-induced hindlimb ischemia, CuZnSOD-deficient mice showed impaired neovascularization as assessed by blood flow recuperation (Laser Doppler) and capillary density in ischemic muscles. This was associated with increased levels of oxidative stress in ischemic tissues and peripheral blood together with reduced plasmatic NO production. CuZnSOD-deficient mice demonstrated an important reduction in the number of endothelial progenitor cells (EPCs) in the bone marrow and the spleen. Moreover, EPCs isolated from CuZnSOD-deficient mice showed increased oxidative stress levels, decreased NO production and a reduced ability to migrate and integrate into capillary-like networks. Importantly, the functional activities of CuZnSOD-deficient EPCs were rescued after treatment with the SOD-mimetic Tempol (a membrane-permeable radical scavenger) or the NO donor sodium nitroprusside (SNP). Moreover, the neovascularization defect in CuZnSOD-deficient mice could be rescued by wild type (but not CuZnSOD-deficient) EPC supplementation.

Conclusions: Protection against oxidative stress by CuZnSOD may be essential for EPC function and reparative neovascularization after ischemia.

CONDENSED ABSTRACT

CuZnSOD-deficient mice exhibit impaired neovascularization following hindlimb ischemia. The mechanisms involved include increased ROS formation, reduced NO production and a defect in the number and the functional activities of bone marrow-derived EPCs. Our data suggest that protection against oxidative stress by CuZnSOD is essential for EPC function and reparative neovascularization after ischemia.

Key words: CuZnSOD, neovascularization, oxidative stress, endothelial progenitor cells.

In patients with cardiovascular diseases, the capacity of the organism to develop new blood vessels (neovascularization) constitutes an important adaptive mechanism against ischemia¹. Interestingly, several risk factors that promote the development of atherosclerotic vascular diseases such as aging, hypercholesterolemia, diabetes, cigarette smoking and hypertension are also associated with reduced neovascularization in response to ischemia²⁻⁵. A common feature of all these cardiovascular risk factors is increased production of reactive oxygen species (ROS)⁶. Although low levels of ROS can serve as signaling agents promoting vascular integrity⁷, higher levels have been associated with endothelial dysfunction and impaired angiogenesis in different models^{8, 9}. Excessive oxidative stress also leads to a reduced bioactivity of nitric oxide (NO)⁶, an essential mediator of endothelial cell migration and ischemia-induced neovascularization^{10, 11}. Oxidative stress level in the vascular endothelium is the result of a balance between the rate of ROS formation and the rate of ROS removal by endogenous antioxidant enzymes such as superoxide dismutases (SODs). The predominant isoform of SOD within blood vessels is copper-zinc SOD (CuZnSOD; SOD1), accounting for 50% to 80% of total SOD activity¹². CuZnSOD is located within the cytosol as well as in the nucleus, and is thought to be expressed in all mammalian cells. The functional importance of CuZnSOD within blood vessels has been demonstrated in homozygous CuZnSOD-deficient mice, which present increased superoxide levels and altered responsiveness in both large arteries and microvessels¹². In addition, heterozygous CuZnSOD deficiency produces increases in superoxide levels and marked impairment of endothelial function with aging¹³. However, the specific role of CuZnSOD for the reparative development of new vessels in response to ischemia is currently unknown.

Recent studies suggest that postnatal neovascularization relies not exclusively on the sprouting of mature endothelial cells in pre-existing vessels (angiogenesis), but also involves the contribution of bone marrow-derived circulating endothelial progenitor cells (EPCs)^{14,15}. It has been demonstrated that circulating EPCs in adults can home to ischemic tissues and contribute to the formation of new blood vessels¹⁶. EPCs have been shown to express higher levels of anti-oxidative enzymes and enhanced protection against oxidative stress compared to mature endothelial cells^{17, 18}. However, cardiovascular risk factors involving increased oxidative stress are associated with impaired number of EPCs in patients with coronary artery disease (CAD)¹⁹. Moreover, the functional activities of EPCs are impaired in conditions of increased oxidative stress^{20,21}.

Because CuZnSOD has an essential role for the protection of the vasculature from oxidative stress, here we investigated the effect of CuZnSOD deficiency on oxidative stress levels and ischemia-induced neovascularization in a murine model of hindlimb ischemia. Our data indicate that CuZnSOD deficiency is associated with impaired neovascularization following ischemia. We also demonstrate that CuZnSOD-deficient mice have a reduced number of EPCs, and that these EPCs exhibit increased oxidative stress and impaired functional activities.

METHODS

An expanded version of the methods is available in the supplemental data (available online at <http://atvb.ahajournals.org>)

Experimental Animals

Male and female mice, aged 6 to 8 weeks, were derived from breeding pairs of heterozygous CuZnSOD-deficient (B6 ;129S-SOD1^{tm1Leb}/J) mice obtained from Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine). Two groups of mice were studied: homozygous CuZnSOD-deficient (CuZnSOD^{-/-}) mice and wild-type (CuZnSOD^{+/+}) littermates. No difference was observed between male and female mice for the different parameters investigated. The genotyping of each mouse was assessed by PCR of DNA isolated from tail biopsy samples, as described on the Jackson Laboratory web site (supplemental Figure IA). The expression of other antioxidant and pro-oxidant enzymes in hindlimb muscles was similar in both groups of mice (supplemental Figure II).

Murine ischemic hindlimb model

The protocol was approved by the Comité Institutionnel de Protection des Animaux (CIPA) of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM). Unilateral hindlimb ischemia was surgically induced as previously described⁵. Hindlimb perfusion was measured with a Laser Doppler Perfusion Imager (LDPI) system (Moor Instruments Ltd., Axminster, England). To account for variables such as ambient light and temperature, the results are expressed as the ratio of perfusion in the left (ischemic) vs. right (non-ischemic) hindlimb. Hind limb ischemic damage was evaluated clinically using

grade scale ranging from 0 to 4. Blood pressure was monitored with tail cuff pressure instrument (model BP-2000 ; Visitech Systems, Apex, NC).

Tissue preparation and immunochemistry

For immunohistochemistry, whole ischemic hindlimbs were immediately fixed in tissue-fix overnight (Chaptec, Montreal, Qc, Canada). Endothelial cells were identified by immunostaining for platelet endothelial cells adhesion molecule-1 (PECAM-1 or CD31) with a rat monoclonal antibody directed against mouse CD31 (Pharmigen, San Diego, CA). Arterioles were identified using a commercially available kit (modified Verhoeff-Van Gieson elastic stain kit ; Sigma, St Louis, Mo). To evaluate local oxidative stress levels in ischemic muscles, an antibody against nitrotyrosine (Upstate, Lake Placid, NY) was used. The specificity of the test was confirmed by pre-incubating the antibody with 10 mmol/L nitrotyrosine (data not shown). To evaluate superoxide production in ischemic muscles, dihydroethidium (DHE) fluorescence labeling was performed. The specificity of the test was confirmed by pre-incubating the section with polyethyleneglycol-SOD (PEG-SOD) 500U/ml for 1 hour (data not shown). The intensities of fluorescence were measured and analyzed using computer-based software (Metamorph, Silicon Valley, CA) with the same threshold for all sections.

Western blot analysis

Proteins were extracted from hindlimb muscles, and the following antibodies were used for Western blots : catalase (1 :500 ; Calbiochem, Merck KgaA, Darmstadt, Germany), maganese SOD (1 :1000 ; Cell Signalling Technology, Boston, Mass). gp91phox (1 :500 ; Transduction Laboratories, Franklin Lakes, NJ), NOX4 (1 :200 ; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), and α -tubulin (1 :200 ; Santa Cruz Biotechnology).

Plasma nitric oxide and total 8-isoprostane

NO production in mice plasma samples was determined indirectly by measuring the concentration of the stable end products, nitrate and nitrite, using a commercial kit (R&D systems Inc., Minneapolis, MN) based on the Griess reaction. Total (free and esterified) 8-isoprostane was quantified in samples and standards using a commercially available enzyme immunoassay kit (Cayman Chemical Co., Ann Harbor, MI). Values are expressed as picograms of 8-isoprostane per milliliter of total plasma protein.

Fluorescence-Activated Cell Sorter analysis of Circulating Progenitor Cells

The percentages of progenitor cells contained in the total viable cell population derived from the spleen were measured and analyzed by FACS (FACSCalibur flow cytometer, Becton Dickenson, Oakville, Ontario, Canada) using the following fluorescence-coupled cell markers: CD34-fluorescein isothiocyanate (FITC), VEGFR2 (Flk1)-phycoerythrin (PE) and CD117 (c-kit)-allophycocyanin (APC) (eBioscience, San Diego, CA). Cell phenotypes were determined by the analysis of 300 000 events.

Endothelial Progenitor Cells isolation and characterization

Mononuclear cells were mechanically isolated from the spleen or from the femorae, tibiae and humeri by flushing the bone marrow cavities using culture medium. After red blood cell lysis and washing, mononuclear cells were plated on 0.05% fibronectin (Sigma) and cultured in complete medium 200 containing 20% FBS. After 4 days in culture, non-adherent cells were removed by thorough washing with PBS. Adherent cells were stained with 1,1'-di(4-dimethylaminophenyl)-4,4'-methylenediphenylmethane-3,3',3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate-acetylated low-

density lipoprotein (DiI-acLDL, 2.5 µg/ml for 1 hour, Invitrogen, OR) and FITC-labeled lectin BS-1 (*Bandeiraea simplicifolia*, 10µg/ml for 1 h, Sigma). Spindle-shaped cells were observed, and the vast majority of adherent cells (95%) were found to be double-positive for the uptake of DiI-acLDL and binding of FITC-labeled lectin. These cells were shown to migrate in response to VEGF stimulation and were also capable of incorporating into a network of tubularlike structures when cocultured with mature endothelial cells. On the basis of these morphological and functional characteristics, these cells were defined as EPCs.

Detection of intracellular Reactive Oxygen Species (ROS) and nitric oxide (NO) in EPCs

Intracellular ROS generation was assessed using 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA, Sigma). The specificity of the test was confirmed using Tiron, 5 mmol/L. Dihydroethidium (DHE) was used to evaluate the presence of superoxide anion oxygen radicals. The specificity of the test was confirmed using superoxide inhibitor PEG-SOD, 500U/ml. The measurement of free NO and NO synthase (NOS) activity in EPC was assessed with Diaminofluorescein-2 Diacetate (DAF-2DA) a nonfluorescent cell-permeable reagent (Cell Technology inc., Mountain View, CA).

Cell migration assay

Cell migration was assessed using a modified Boyden chamber assay. Inserts were placed in a 24-well plate containing M200 with 50 ng/ml VEGF. EPCs (15 000) were added to the upper chamber of the inserts in DMEM, 0.1% fetal bovine serum, in the presence or absence of the SOD-mimetic Tempol (a membrane-permeable radical scavenger), 0.1mmol/L, or the NO donor sodium nitroprusside (SNP), 0.1 mmol/L.

EPCs adhesion to endothelial cells

A monolayer of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) was prepared 48 hours before the assay by plating 2×10^5 cells (passage 2-5) in each well of 24 wells plate. HUVECs were pretreated for 12 hours with tumor necrosis factor- α (BD Biosciences, San Diego, CA) (1ng/mL). Cells were stained with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and fixed with 2% paraformaldehyde. EPCs were labeled with DiI-acLDL and 11 000 EPCs were added to each well and incubated for 3 hours at 37°C in the presence or absence of the SODmimetic Tempol (0.1mmol/L). Non-attached cells were gently removed with PBS and adherent EPCs were fixed with 2% paraformaldehyde and counted in three random fields. The data are presented as a ratio of the number of adherent EPCs/HUVECs per field (\pm SEM).

Tubular-like formation on Matrigel

A total of 4000 EPCs, labeled 1 hour with DiI-acLDL, were co-plated with 14 000 HUVECs in 96-well plates that had been precoated with 50 μ l of growth factor reduced Matrigel matrix (BD Biosciences) and cultured at 37°C for 6 h with 50 ng/ml of VEGF in the presence or absence of the SOD-mimetic Tempol (0.1mmol/L). Tubular-like structures were photographed and the number of incorporated EPCs was determined in 6 random fields. A tube was defined as a straight cellular segment connecting two cell masses (nodes). No difference in the total number of tubes or in tube length was observed between the different groups (data not shown). The data are presented as number (\pm SEM) of incorporated EPCs per tube.

CD117+ cell therapy

Bone marrow mononuclear cells were isolated from the femorae, tibiae and humeri of CuZnSOD^{+/+} or CuZnSOD^{-/-} donors by flushing the bone marrow cavities using culture medium. Bone marrow cells reacting to anti-CD117 (rat anti-mouse, eBioscience) were sorted using immunomagnetic beads (Dynabeads M-450 coupled to sheep anti-rat IgG, DYNAL, Oslo, Norway). 24 hours after the surgical induction of hindlimb ischemia, 5x10⁵ freshly isolated CD117+ cells were introduced into CuZnSOD-deficient mice by tail-vein injection. The control group consisted of CuZnSOD-deficient mice that were injected with saline only.

Statistical Analysis

All results are expressed as the mean \pm SEM. Statistical significance was evaluated using an unpaired *t* test or a one-way ANOVA, followed by the Newman-Keuls post-hoc test for multiple group comparisons. $P < 0.05$ indicated statistical significance.

RESULTS

Impaired Ischemia-Induced Neovascularization in CuZnSOD-Deficient Mice

Blood flow perfusion was evaluated by serial LDPI studies after the induction of hindlimb ischemia (Figure 1A). Immediately after the surgery (day 0), Doppler flow ratios (DFR) were reduced to 0.14 ± 0.03 in wild type (WT) and 0.12 ± 0.02 in CuZnSOD KO mice, indicating that the severity of the induced ischemia was similar in both groups. However, the recuperation of blood flow after ischemia was significantly impaired in CuZnSOD-deficient mice. At day 7 after surgery DFR were significantly reduced in CuZnSOD KO compared to WT mice (0.56 ± 0.04 vs. 0.68 ± 0.02 ; $p < 0.05$), and the difference in blood flow recuperation between the 2 groups was even more apparent at day 21 after surgery (0.67 ± 0.04 vs. 0.84 ± 0.01 ; $p < 0.01$). Systolic blood pressure was similar in the 2 groups at baseline and 1, 2, and 3 weeks after surgery (supplemental Figure IV). Figure 1B shows representative results of CD31 immunostaining in ischemic muscles at day 21 after surgery (left). Quantification of CD31-positive cells (right) demonstrates that the capillary density in ischemic muscles is significantly reduced in CuZnSOD KO compared to WT mice (0.64 ± 0.02 vs. 0.90 ± 0.03 capillaries per fiber, $p < 0.05$). Similarly, arteriolar density was also significantly reduced in the ischemic muscle of CuZnSOD KO mice (supplemental Figure IIIC). In the non-ischemic hind limb, capillary and arteriolar densities remained unchanged over time and were not different between groups (data not shown). Clinically, the reduced blood flow recuperation in CuZnSOD KO mice was associated with an important increase in hindlimb ischemic damage at day 21 after ischemia (supplemental Figure IVA).

Oxidative Stress Levels and NO Production in CuZnSOD-Deficient Mice

Because excessive oxidative stress has been associated with impaired angiogenesis in different situations, we compared oxidative stress levels in ischemic muscles of CuZnSOD KO and WT mice. Figure 2A shows representative results of nitrotyrosine immunostaining (left), an indicator of protein nitration by ROS. Figure 2B shows results for DHE, an indicator of superoxide levels. Quantification of relative fluorescences (right) demonstrates that both markers of oxidative stress were significantly increased in the ischemic muscles of CuZnSOD KO compared to WT mice. Systemically, we also demonstrate that CuZnSOD deficiency is associated with a significant increase of plasmatic concentration of isoprostanes (Supplemental Figure I), an *in vivo* marker of oxidative stress. Increased oxidative stress has also been associated with reduced bioactivity of nitric oxide (NO), an important angiogenic factor. Herein, we demonstrate that CuZnSOD-deficient mice have a significant reduction of NO production in the serum, as evaluated by the concentration of the stable end products nitrate and nitrite based on the Griess reaction (Supplemental Figure I).

EPC Levels in CuZnSOD-Deficient Mice

To identify potential mechanisms involved in the detrimental effect of CuZnSOD deficiency on ischemia-induced neovascularization, we quantified the number of EPCs in the different animal groups at baseline (day 0) and at day 7 after hindlimb ischemia. Bone marrow and spleen EPCs were isolated in culture and shown to endocytose acLDL and bind BS-1 lectin (Figure 3A). We found that the number of bone marrow EPCs is consistently reduced in CuZnSOD KO compared to WT mice, both at baseline and after ischemia (Figure 3B). On the other hand, spleen EPCs were only reduced after ischemia in CuZnSOD KO compared to WT mice, suggesting a potential defect in EPC

mobilization in KO mice (Figure 3C). The percentage of circulating progenitor cells contained in the total viable cell population derived from the spleen was also measured by FACS analysis at day 7 after ischemia using the cell markers CD34, VEGFR2 and CD117 (Figure 3D). Similarly to EPCs isolated in culture, the number of peripheral circulating progenitor cells was also significantly reduced in CuZnSOD-deficient mice.

Oxidative Stress, NO and Angiogenic Activities of CuZnSOD-Deficient EPCs.

ROS and superoxide generation were measured in EPCs isolated from the bone marrow using DCFH-DA and DHE, respectively. We found that CuZnSOD deficiency is associated with a significant increased generation of ROS (Figure 4A) and superoxide (Figure 4B) in bone marrow EPCs. We also demonstrate that this increased oxidative stress is associated with decreased NO production (Figure 4C) together with an important impairment of EPC functional activities (Figure 5). CuZnSOD-deficient EPCs exhibited significant reduction in VEGF-induced migration (Figure 5A). Moreover, we found that CuZnSOD-deficient EPCs are significantly impaired in their ability to adhere to a HUVEC monolayer activated with TNF- α (Figure 5B and 5D). Finally, in coculture of EPCs and HUVECs on matrigel, CuZnSOD deficiency was associated with a significant reduction in the capacity of EPCs to integrate into tubular-like structures (Figure 5C and 5E). Importantly, the functional activities of CuZnSOD-deficient EPCs were rescued after treatment with the SOD-mimetic Tempol (Figure 5A-E). Moreover, impaired migratory activity of CuZnSOD^{-/-} EPCs could be significantly improved after treatment with the NO donor SNP (supplemental Figure III).

Wild Type EPC Supplementation Rescues Neovascularization in CuZnSOD-Deficient Mice

To further evaluate the potential role of EPC dysfunction in the impairment of neovascularization associated with CuZnSOD deficiency, we performed rescue experiments using CD117⁺ stem cell fraction isolated from the bone marrow of wild type (WT) or CuZnSOD-deficient mice. CD117⁺ cells have been shown to have a high endothelial differentiation potential in vitro and are thought to play a key role in neovascularization induced by bone marrow cell therapy²². Herein we show that WT CD117⁺ cell therapy can rescue blood flow recuperation after hindlimb ischemia in CuZnSOD-deficient mice (Figure 6A). Moreover, at the microvascular level, capillary density was also significantly improved in CuZnSOD-deficient mice treated with WT CD117⁺ cells compared to CuZnSOD-deficient mice treated with saline only (Figure 6B). Interestingly, treatment with CuZnSOD-deficient CD117⁺ cells failed to improve neovascularization in CuZnSOD-deficient mice (Figure 6A-B).

DISCUSSION

To our knowledge, the present study provides the first evidence of the essential function of CuZnSOD for the reparative neovascularization process in response to ischemia. CuZnSOD has an important role to limit increases in superoxide levels in different tissues. Accordingly, a reduction in CuZnSOD activity leads to increased oxidative stress and has been shown to have a detrimental effect in different clinical situations. For example, neuronal cell injury and edema formation after transient focal cerebral ischemia are increased in CuZnSOD-deficient mice^{23,24}. Similarly, renal injury in the context of ischemia/reperfusion²⁵ or diabetes²⁶ is significantly increased in CuZnSOD-deficient mice. CuZnSOD deficiency has also been associated with ovarian²⁷, retinal²⁸ and hepatic²⁹ dysfunction. However, in the cardiovascular system, a previous study did not show any significant alteration of postischemic myocardial contractile function in heterozygous CuZnSOD-deficient mice³⁰. Here we studied homozygous CuZnSOD-deficient mice to precisely define the role of CuZnSOD for the modulation of neovascularization in a well-described model of hindlimb ischemia³¹.

Oxidative stress is thought to have a double-edge effect on the modulation of neovascularization in response to ischemia. On one hand, a minimal level of ROS seems to be needed for the promotion of angiogenesis in physiological conditions and healthy animals. For instance, NADPH oxidase activity is required for hypoxia-stimulated increase in VEGF expression and retinal neovascularization³². In addition, Nox2-containing NADPH oxidase was shown to play an important role in VEGF-induced angiogenesis³³ and in neovascularization following hindlimb ischemia³⁴. On the other hand, excessive production of ROS in pathological conditions leads to cellular toxicity

and has been associated with impaired angiogenesis in different models^{8, 9, 35}. Moreover, cardiovascular risk factors with increased oxidative stress levels such as aging², diabetes³, hypercholesterolemia⁴ and cigarette smoking⁵ have consistently been associated with impaired neovascularization in response to ischemia. The results of the present study confirm the detrimental effect of excessive oxidative stress for the modulation of neovascularization in response to ischemia. We show that CuZnSOD deficiency is associated with increased oxidative stress and a significant impairment of ischemia-induced neovascularization, as demonstrated by a slower rate of blood flow recovery after ischemia and a reduced capillary and arteriole densities in ischemic muscles.

The mechanisms by which CuZnSOD deficiency leads to impaired ischemia-induced neovascularization are potentially diverse. Ischemic tissues are characterized by high levels of inflammatory cytokines, which activate ROS production³⁶. In this context, CuZnSOD activity can act as a defense mechanism against excessive oxidative stress. Consistent with this, we found that superoxide and ROS production were significantly increased in ischemic tissues of CuZnSOD-deficient mice compared to controls. It is conceivable that high levels of ROS in CuZnSOD-deficient mice negatively modulate the function of endothelial cells in ischemic tissues, which would in turn contribute to impair angiogenesis. In fact, endothelial dysfunction in both large arteries and microvessels has previously been described in CuZnSOD-deficient mice¹². It is also possible that excessive ROS production in ischemic tissues interfere with the activity of pro-angiogenic factors such as VEGF^{8,9}.

In the current study, we propose that a major factor involved in the neovascularization defect of CuZnSOD-deficient mice is endothelial progenitor cells

(EPCs) dysfunction. The importance of EPCs for the development of neovessels in different physiological and pathological situations has recently been recognized¹⁴⁻¹⁶. Herein we demonstrate that the number of EPCs is significantly reduced in CuZnSOD-deficient mice, both in the bone marrow and in the spleen. We also found that, compared to wild-type EPCs, CuZnSOD-deficient EPCs exhibit reduced angiogenic activities including cellular migration, adhesion to mature endothelial cells and integration into vascular structures. Finally, we show that wild-type (but not CuZnSOD-deficient) EPC supplementation can rescue the impaired ischemia-induced neovascularization in CuZnSOD-deficient mice. Although the precise mechanisms involved in the modulation of neovascularization by EPCs are still not fully elucidated, the paracrine or vascular supportive effects of EPCs could play a more important role than true vascular incorporation.¹⁵ In the current study, the reduced production of the angiogenic factor NO that we documented in CuZnSOD-deficient EPCs could have contributed to impair neovascularization in response to ischemia.

EPCs are thought to exhibit increased resistance to oxidative stress compared to mature endothelial cells. It has been proposed that EPCs are enriched for the expression of genes encoding antioxidant proteins such as catalase, glutathione peroxidase (GPx) and manganese superoxide dismutase (MnSOD). This in turn results in low baseline ROS levels and a reduced sensitivity toward ROS-induced cell death^{17, 18}. In the present study, we demonstrate for the first time the critical role of CuZnSOD for the modulation of oxidative stress in EPCs. Although CuZnSOD was not found to be increased in EPCs compared to mature endothelial cells in previous reports^{17, 18}, our results suggest that CuZnSOD expression is nevertheless essential to protect against excessive ROS generation in EPCs and to preserve their angiogenic properties. Moreover, the fact that

CuZnSOD-deficient EPCs exhibit increased basal levels of ROS compared to wild-type EPCs indicates that other antioxidant enzymes such as GPx and MnSOD cannot fully compensate for the absence of CuZnSOD.

The precise mechanisms by which CuZnSOD deficiency negatively modulates the number and the functional activities of EPCs remain to be determined. However, previous studies have demonstrated that clinical situations that lead to increased oxidative stress levels are also associated with an impairment of EPC number and functions^{21, 37}. Moreover, inhibition of antioxidant enzymes in EPCs has previously been shown to increase ROS levels and impair EPC survival and migration¹⁷. Therefore, it is plausible that increased levels of ROS in CuZnSOD-deficient EPCs, as demonstrated by DCFH-DA and DHE staining, contribute to the decreased number and functional activity of EPCs. SODs are also involved in the modulation of nitric oxide (NO) bioactivity. It has been suggested that the release of NO from the endothelium is dependent on CuZnSOD, whereas ecSOD activity is thought to be required for the protection of NO as it diffuses through the vascular wall¹². Herein we found that NO production was significantly reduced in the serum and in EPCs of CuZnSOD-deficient mice. We also demonstrated that the impaired migratory activity of CuZnSOD-deficient EPCs can be rescued after treatment with the NO donor SNP. Interestingly, NO has been shown to be an essential mediator of endothelial cell migration and VEGF-induced angiogenesis^{10, 11}. Moreover, recent reports indicate that NO is an essential mediator of EPC mobilization and EPC functional activity³⁸. Therefore, the decreased NO production that we documented in CuZnSOD-deficient mice could constitute a conceptual link between CuZnSOD deficiency, EPC dysfunction and impaired ischemia-induced neovascularization.

In summary, our study demonstrates that CuZnSOD deficiency impairs postnatal neovascularization and blood flow recuperation after ischemia. We propose that this defect is at least partly due to increased levels of ROS, reduced NO production and impairment of EPC number and functional activities. The findings that CuZnSOD is essential for EPC functions might have important clinical implications. It has been shown that diabetic patients and patients with chronic heart failure exhibit defective levels of antioxidant enzymes, including CuZnSOD³⁹⁻⁴¹. Therefore, CuZnSOD deficiency could contribute to explain reduced EPC numbers and impairment of EPC functional activities in patients with diabetes⁴², coronary artery disease¹⁹ and congestive heart failure⁴³. In patients with these conditions, CuZnSOD modulation might represent a novel therapeutic avenue to restore EPC functions and neovascularization in patients with severe ischemic vascular diseases.

Sources of Funding

This study was supported by a grant 74687 from the Canadian Institute of Health Research (Dr. Rivard). Dr Rivard is a scholar from the Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ). J Groleau and P Haddad are doctoral research awardees from the CIHR. J Turgeon is a doctoral research awardee from the FRSQ.

Disclosures

None.

REFERENCES

1. Losordo DW, Dimmeler S. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease. Part I: angiogenic cytokines. *Circulation*. 2004;109:2487-2491.
2. Rivard A, Fabre JE, Silver M, Chen D, Murohara T, Kearney M, Magner M, Asahara T, Isner JM. Age-dependent impairment of angiogenesis. *Circulation*. 1999;99:111-120.
3. Rivard A, Silver M, Chen D, Kearney M, Magner M, Annex B, Peters K, Isner JM. Rescue of diabetes-related impairment of angiogenesis by intramuscular gene therapy with adeno-VEGF. *Am J Pathol*. 1999;154:355-363.
4. Couffinhal T, Silver M, Kearney M, Sullivan A, Witzenbichler B, Magner M, Annex B, Peters K, Isner JM. Impaired collateral vessel development associated with reduced expression of vascular endothelial growth factor in ApoE^{-/-} mice. *Circulation*. 1999;99:3188-3198.
5. Michaud SE, Menard C, Guy LG, Gennaro G, Rivard A. Inhibition of hypoxia-induced angiogenesis by cigarette smoke exposure: impairment of the HIF-1 α /VEGF pathway. *Faseb J*. 2003;17:1150-1152.
6. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115-126.
7. Ushio-Fukai M, Alexander RW. Reactive oxygen species as mediators of angiogenesis signaling: role of NAD(P)H oxidase. *Mol Cell Biochem*. 2004;264:85-97.
8. Urbich C, Dernbach E, Aicher A, Zeiher AM, Dimmeler S. CD40 ligand inhibits endothelial cell migration by increasing production of endothelial reactive oxygen species. *Circulation*. 2002;106:981-986.
9. Michaud SE, Dussault S, Groleau J, Haddad P, Rivard A. Cigarette smoke exposure impairs VEGF-induced endothelial cell migration: role of NO and reactive oxygen species. *J Mol Cell Cardiol*. 2006;41:275-284.

10. Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Madri JA, Sessa WC. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest.* 1997;100:3131-3139.
11. Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, Kalka C, Kearney M, Chen D, Symes JF, Fishman MC, Huang PL, Isner JM. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest.* 1998;101:2567-2578.
12. Didion SP, Ryan MJ, Didion LA, Fegan PE, Sigmund CD, Faraci FM. Increased superoxide and vascular dysfunction in CuZnSOD-deficient mice. *Circ Res.* 2002;91:938-944.
13. Didion SP, Kinzenbaw DA, Schrader LI, Faraci FM. Heterozygous CuZn superoxide dismutase deficiency produces a vascular phenotype with aging. *Hypertension.* 2006;48:1072-1079.
14. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997;275:964-967.
15. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res.* 2004;95:343-353.
16. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM. Bone Marrow Origin of Endothelial Progenitor Cells Responsible for Postnatal Vasculogenesis in Physiological and Pathological Neovascularization. *Circ Res.* 1999;85:221-228.
17. Dernbach E, Urbich C, Brandes RP, Hofmann WK, Zeiher AM, Dimmeler S. Antioxidative stress-associated genes in circulating progenitor cells: evidence for enhanced resistance against oxidative stress. *Blood.* 2004;104:3591-3597.
18. He T, Peterson TE, Holmuhamedov EL, Terzic A, Caplice NM, Oberley LW, Katusic

ZS. Human endothelial progenitor cells tolerate oxidative stress due to intrinsically high expression of manganese superoxide dismutase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:2021-2027.

19. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res.* 2001;89:E1-7.

20. Thum T, Fraccarollo D, Thum S, Schultheiss M, Daiber A, Wenzel P, Munzel T, Ertl G, Bauersachs J. Differential effects of organic nitrates on endothelial progenitor cells are determined by oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:748-754.

21. Michaud SE, Dussault S, Haddad P, Groleau J, Rivard A. Circulating endothelial progenitor cells from healthy smokers exhibit impaired functional activities. *Atherosclerosis.* 2006;187:423-432.

22. Li TS, Hamano K, Nishida M, Hayashi M, Ito H, Mikamo A, Matsuzaki M. CD117+ stem cells play a key role in therapeutic angiogenesis induced by bone marrow cell implantation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285:H931-937.

23. Kondo T, Reaume AG, Huang TT, Carlson E, Murakami K, Chen SF, Hoffman EK, Scott RW, Epstein CJ, Chan PH. Reduction of CuZn-superoxide dismutase activity exacerbates neuronal cell injury and edema formation after transient focal cerebral ischemia. *J Neurosci.* 1997;17:4180-4189.

24. Kawase M, Murakami K, Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Gasche Y, Kondo T, Scott RW, Chan PH. Exacerbation of delayed cell injury after transient global ischemia in mutant mice with CuZn superoxide dismutase deficiency. *Stroke.* 1999;30:1962-1968.

25. Yamanobe T, Okada F, Iuchi Y, Onuma K, Tomita Y, Fujii J. Deterioration of ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in SOD1-deficient mice. *Free Radic Res.* 2007;41:200-207.

26. DeRubertis FR, Craven PA, Melhem MF. Acceleration of diabetic renal injury in the superoxide dismutase knockout mouse: effects of tempol. *Metabolism*. 2007;56:1256-1264.
27. Matzuk MM, Dionne L, Guo Q, Kumar TR, Lebovitz RM. Ovarian function in superoxide dismutase 1 and 2 knockout mice. *Endocrinology*. 1998;139:4008-4011.
28. Hashizume K, Hirasawa M, Imamura Y, Noda S, Shimizu T, Shinoda K, Kurihara T, Noda K, Ozawa Y, Ishida S, Miyake Y, Shirasawa T, Tsubota K. Retinal dysfunction and progressive retinal cell death in SOD1-deficient mice. *Am J Pathol*. 2008;172:1325-1331.
29. Uchiyama S, Shimizu T, Shirasawa T. CuZn-SOD deficiency causes ApoB degradation and induces hepatic lipid accumulation by impaired lipoprotein secretion in mice. *J Biol Chem*. 2006;281:31713-31719.
30. Asimakis GK, Lick S, Patterson C. Postischemic recovery of contractile function is impaired in SOD2(+/-) but not SOD1(+/-) mouse hearts. *Circulation*. 2002;105:981-986.
31. Couffinhal T, Silver M, Zheng LP, Kearney M, Witzenbichler B, Isner JM. Mouse model of angiogenesis. *Am J Pathol*. 1998;152:1667-1679.
32. Al-Shabrawey M, Bartoli M, El-Remessy AB, Platt DH, Matragoon S, Behzadian MA, Caldwell RW, Caldwell RB. Inhibition of NAD(P)H oxidase activity blocks vascular endothelial growth factor overexpression and neovascularization during ischemic retinopathy. *Am J Pathol*. 2005;167:599-607.
33. Ushio-Fukai M, Tang Y, Fukai T, Dikalov SI, Ma Y, Fujimoto M, Quinn MT, Pagano PJ, Johnson C, Alexander RW. Novel role of gp91(phox)-containing NAD(P)H oxidase in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis. *Circ Res*. 2002;91:1160-1167.
34. Tojo T, Ushio-Fukai M, Yamaoka-Tojo M, Ikeda S, Patrushev N, Alexander RW. Role of gp91phox (Nox2)-containing NAD(P)H oxidase in angiogenesis in response to

- hindlimb ischemia. *Circulation*. 2005;111:2347-2355.
35. Ebrahimian TG, Heymes C, You D, Blanc-Brude O, Mees B, Waeckel L, Duriez M, Vilar J, Brandes RP, Levy BI, Shah AM, Silvestre JS. NADPH oxidase-derived overproduction of reactive oxygen species impairs postischemic neovascularization in mice with type 1 diabetes. *Am J Pathol*. 2006;169:719-728.
36. Cramer T, Yamanishi Y, Clausen BE, Forster I, Pawlinski R, Mackman N, Haase VH, Jaenisch R, Corr M, Nizet V, Firestein GS, Gerber HP, Ferrara N, Johnson RS. HIF-1 α is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell*. 2003;112:645-657.
37. Ingram DA, Krier TR, Mead LE, McGuire C, Prater DN, Bhavsar J, Saadatzaheh MR, Bijangi-Vishehsaraei K, Li F, Yoder MC, Haneline LS. Clonogenic endothelial progenitor cells are sensitive to oxidative stress. *Stem Cells*. 2007;25:297-304.
38. Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ihling C, Technau-Ihling K, Zeiher AM, Dimmeler S. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med*. 2003;9:1370-1376.
39. Linke A, Adams V, Schulze PC, Erbs S, Gielen S, Fiehn E, Mobius-Winkler S, Schubert A, Schuler G, Hambrecht R. Antioxidative effects of exercise training in patients with chronic heart failure: increase in radical scavenger enzyme activity in skeletal muscle. *Circulation*. 2005;111:1763-1770.
40. Colak E, Majkic-Singh N, Stankovic S, Sreckovic-Dimitrijevic V, Djordjevic PB, Lalic K, Lalic N. Parameters of antioxidative defense in type 2 diabetic patients with cardiovascular complications. *Ann Med*. 2005;37:613-620.
41. Hodgkinson AD, Bartlett T, Oates PJ, Millward BA, Demaine AG. The response of antioxidant genes to hyperglycemia is abnormal in patients with type 1 diabetes and diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2003;52:846-851.
42. Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, Kalka C, Gagne PJ, Jacobowitz GR, Levine JP,

Gurtner GC. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation*. 2002;106:2781-2786.

43. Valgimigli M, Rigolin GM, Fucili A, Porta MD, Soukhomovskaia O, Malagutti P, Bugli AM, Bragotti LZ, Francolini G, Mauro E, Castoldi G, Ferrari R. CD34+ and endothelial progenitor cells in patients with various degrees of congestive heart failure. *Circulation*. 2004;110:1209-1212.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Effect of CuZnSOD deficiency on ischemia-induced neovascularization. A.

Left: representative results of laser Doppler measurements 21 days after hindlimb ischemia in wild-type (WT) and CuZnSOD^{-/-} mice. A color scale illustrates blood flow variations from minimal (dark blue) to maximal (red) values. Arrows indicate ischemic (left) hindlimb. Right: quantification of Laser Doppler perfusion ratios. **B.** CD31 immunostaining and quantification of capillary density in ischemic muscles harvested at day 21 in WT and CuZnSOD^{-/-} mice. Arrows indicate positive staining. Data are given as mean \pm SEM capillary per muscle fiber (n=12 to 15 per group). *P<0.05 vs. WT control mice.

Figure 2. ROS levels in ischemic tissues.

Nitrotyrosine (**A**) and dihydroethidium (**B**) immunostaining of ischemic muscles in WT and CuZnSOD^{-/-} mice (n=10/group). Quantification is presented as arbitrary fluorescent units. Data are mean \pm SEM. *P<0.01 vs. WT control mice.

Figure 3. Effect of CuZnSOD deficiency on EPC number. A.

Bone marrow EPCs were identified using DiI-acLDL, lectin-FITC and DAPI stains. Cells positive for all 3 dyes were counted as EPCs. Quantification was performed for EPCs isolated from the bone marrow (**B**) or the spleen (**C**) at baseline (day 0) and at day 7 after hind limb ischemia. *P<0.05 vs. WT mice at baseline. #P<0.05 vs. WT mice after ischemia. **D.** The percentage of circulating progenitor cells derived from the spleen was measured by FACS analysis (300 000 events) using the surface markers CD34, VEGFR2 and CD117. After appropriate gating (R1) to exclude granulocytes, we gated for CD34⁺ cells (R2)

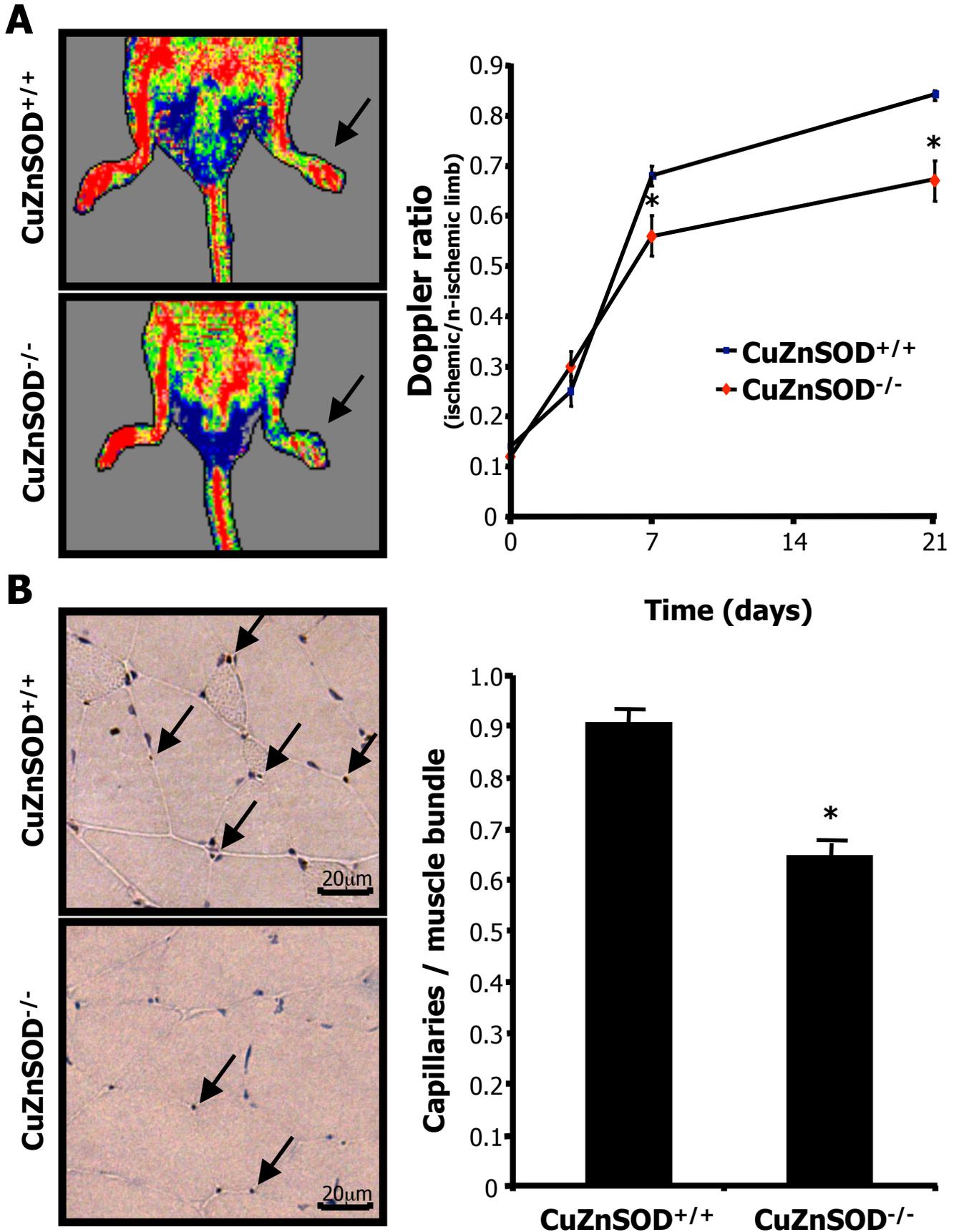
and then examined the resulting population for co-expression of CD117 and VEGFR2 (right panels). Representative examples are shown for WT and CuZnSOD KO mice. Numbers in blue and bar graph indicate the resulting percentage of triple-marked cells from the initial cell population (n=8 mice/group). Data are mean \pm SEM. *P<0.05 vs. WT control mice. SSC indicates side scatter ; FSC, forward scatter.

Figure 4. ROS and NO levels in EPCs. Total ROS (A) and superoxides (B) were detected using DCFH-DA and DHE, respectively. The specificity of the tests was confirmed using ROS scavenger Tiron and superoxide inhibitor PEG-SOD, respectively. (C) NO production was assessed using diaminofluorescein-2 diacetate (DAF-2DA) staining. The analyses were performed on EPCs harvested from the bone marrow of WT and CuZnSOD^{-/-} mice at day 7 after hind limb ischemia (n=5/group). Data are given as mean \pm SEM. *P<0.05 vs. WT control EPCs and #P<0.01 vs CuZnSOD^{-/-} EPCs.

Figure 5. Effect of CuZnSOD deficiency on EPC angiogenic activities. EPCs were isolated from the bone marrow of CuZnSOD^{-/-} or WT mice. VEGF-induced migration (A) was assessed using a modified Boyden chamber assay. To assess EPC adhesion (B-D), EPCs were labeled with a DiI fluorescent marker (red) and allowed to adhere to a monolayer of TNF- α -stimulated HUVECs (blue, nuclear stain DAPI). To assess integration into tubular-like structures (C-E), fluorescent-labeled EPCs (red) were coplated with HUVECs (transparent) to form tubular-like structures on Matrigel. Rescue experiments were performed with the SOD-mimetic Tempol (0.1mmol/L). EPCs from 5-7 different mice per group were tested. Data are mean \pm SEM. *P<0.01 vs. WT control EPCs. @P<0.01 vs. CuZnSOD^{-/-} EPCs.

Figure 6. EPC supplementation in CuZnSOD-deficient mice. 24 hours after the surgical induction of hind limb ischemia, 5×10^5 CD117⁺ cells freshly isolated from the bone marrow of WT or CuZnSOD KO mice were introduced into CuZnSOD-deficient mice by tail-vein injection. The control group consisted of CuZnSOD-deficient mice that were injected with saline only (S). Recuperation of blood flow perfusion (**A**) and capillary density in ischemic muscles (**B**) were assessed at day 21 using laser Doppler measurements and CD31 immunostaining, respectively. Data are given as mean \pm SEM (n=7-12 per group). TH indicates therapy with CD117⁺ cells isolated from WT mice (TH⁺) or from CuZnSOD KO mice (TH⁻). *P<0.05 vs. control group (S). #P<0.05 vs. TH.

Figure 1.



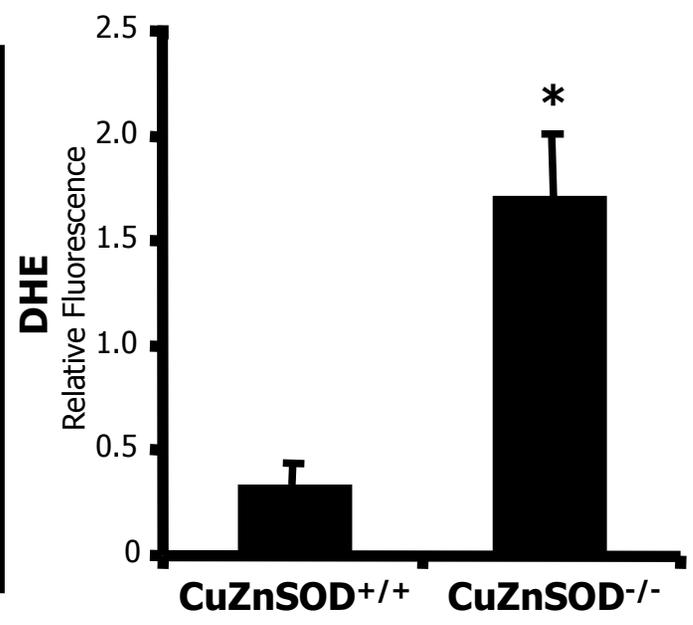
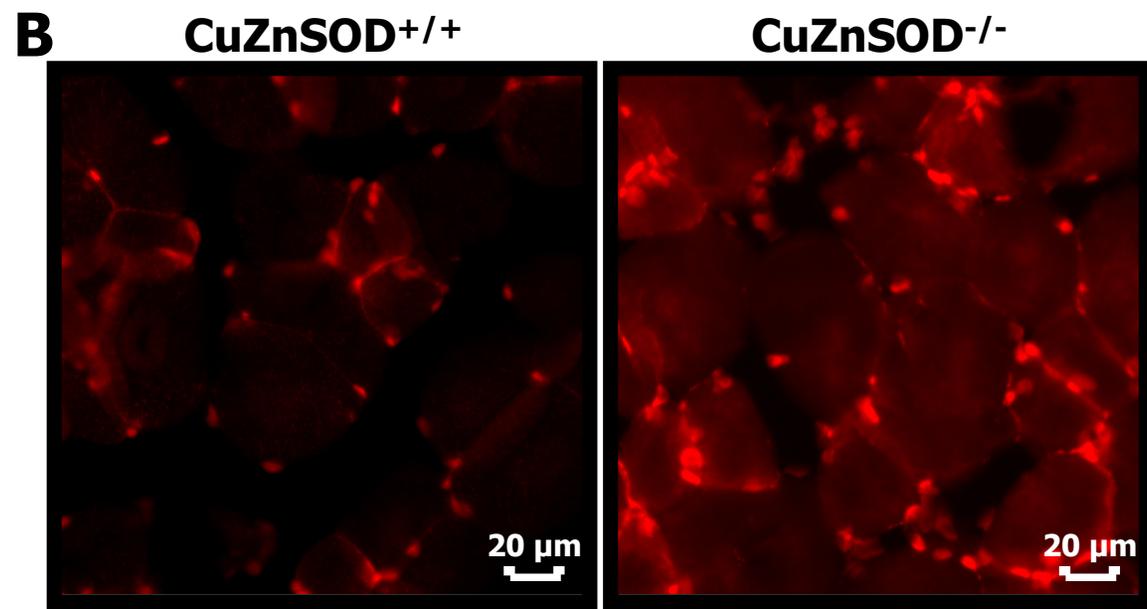
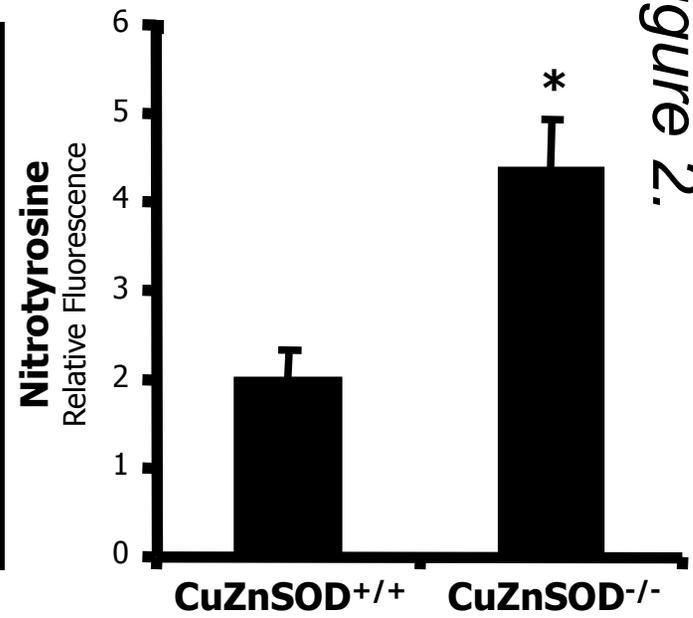
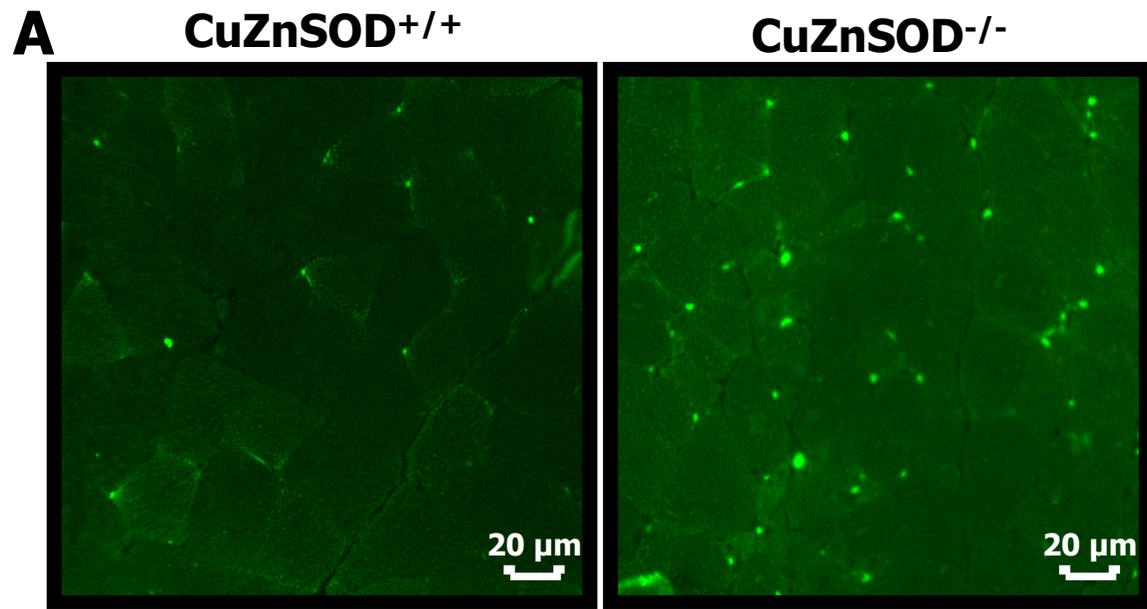


Figure 2.

Figure 3.

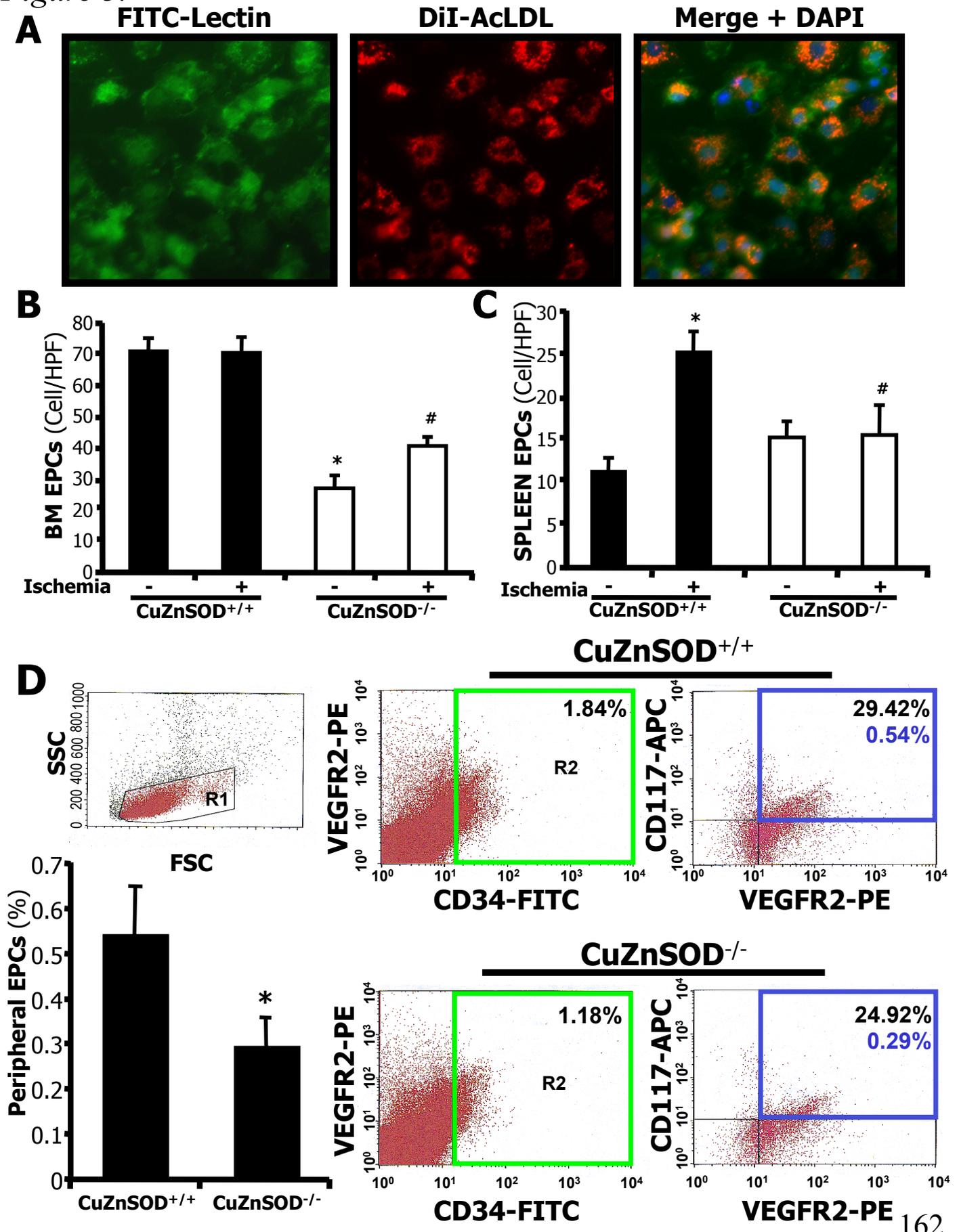


Figure 4.

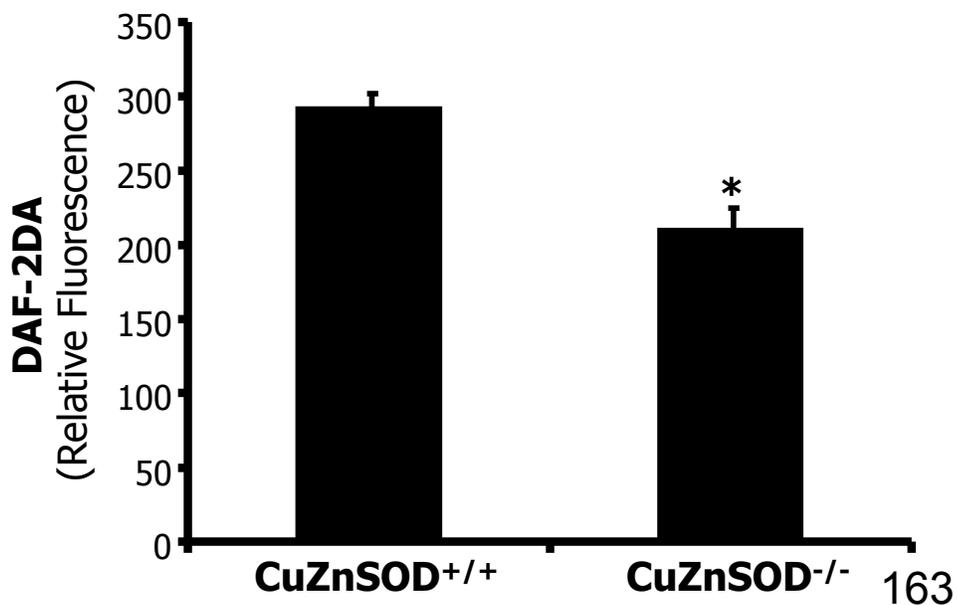
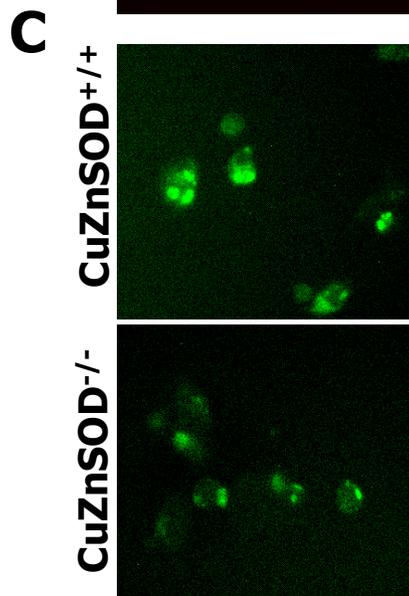
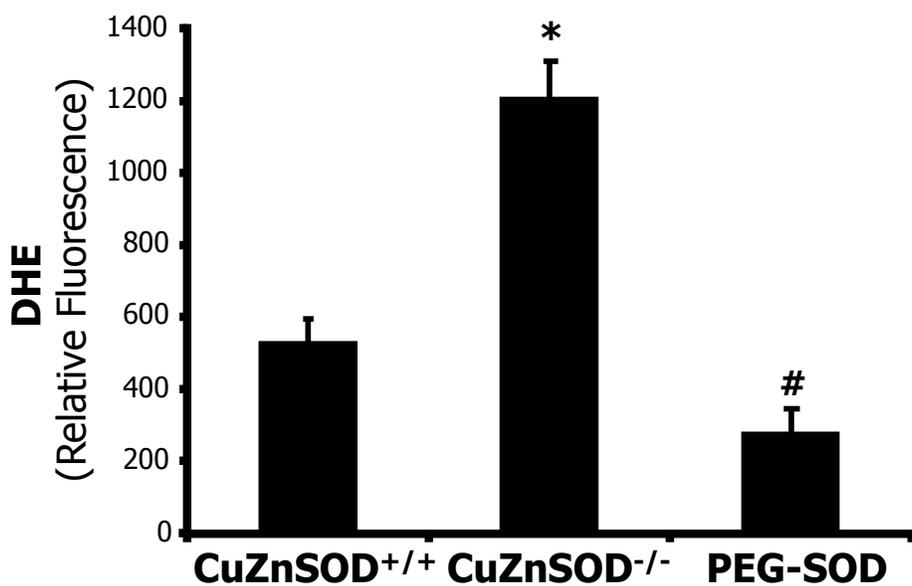
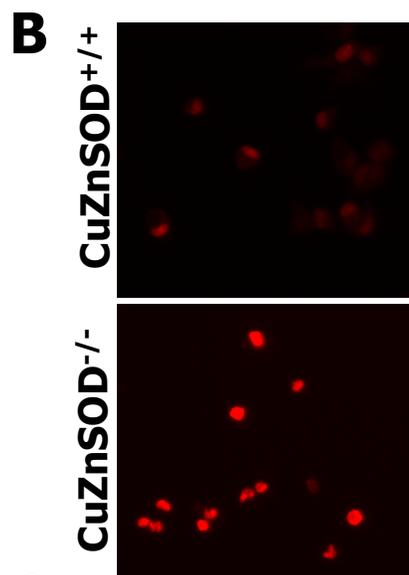
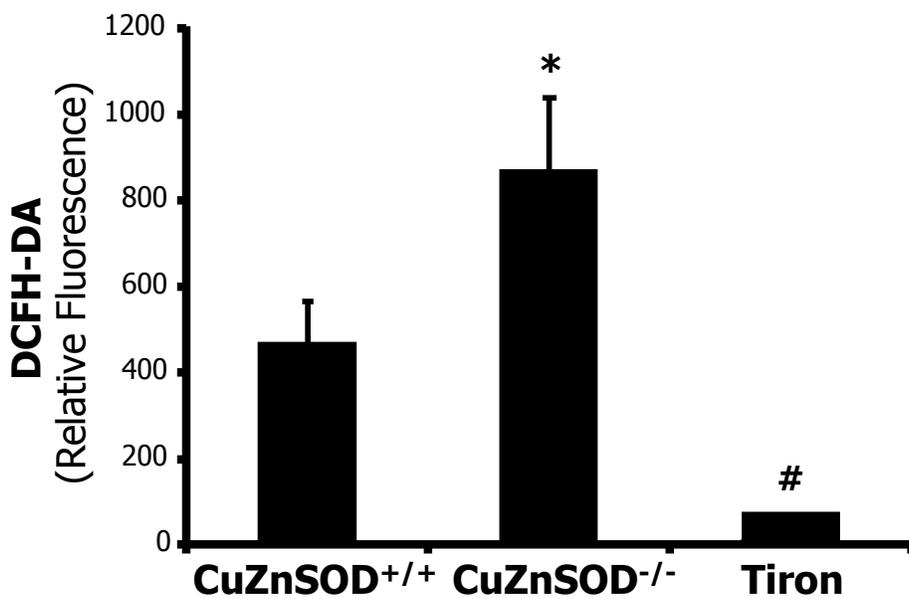
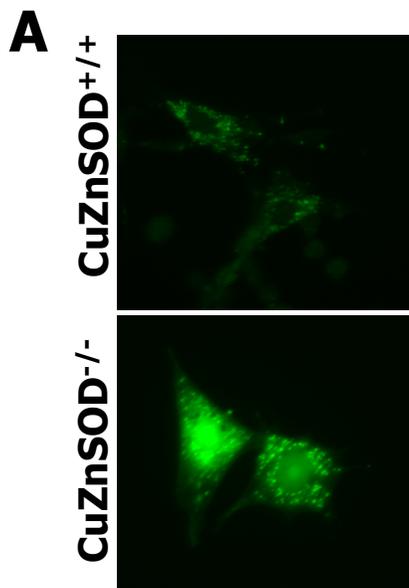


Figure 5.

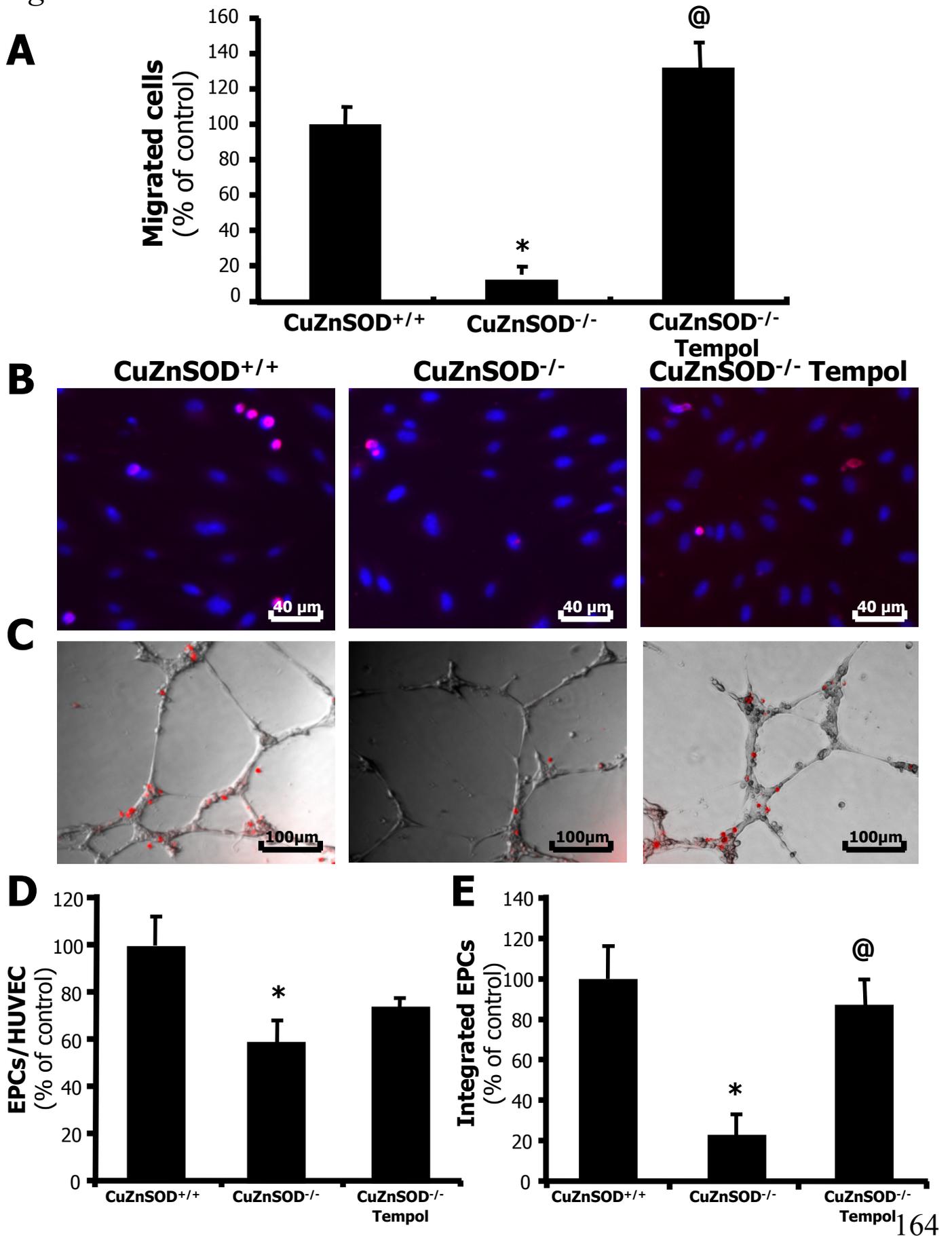
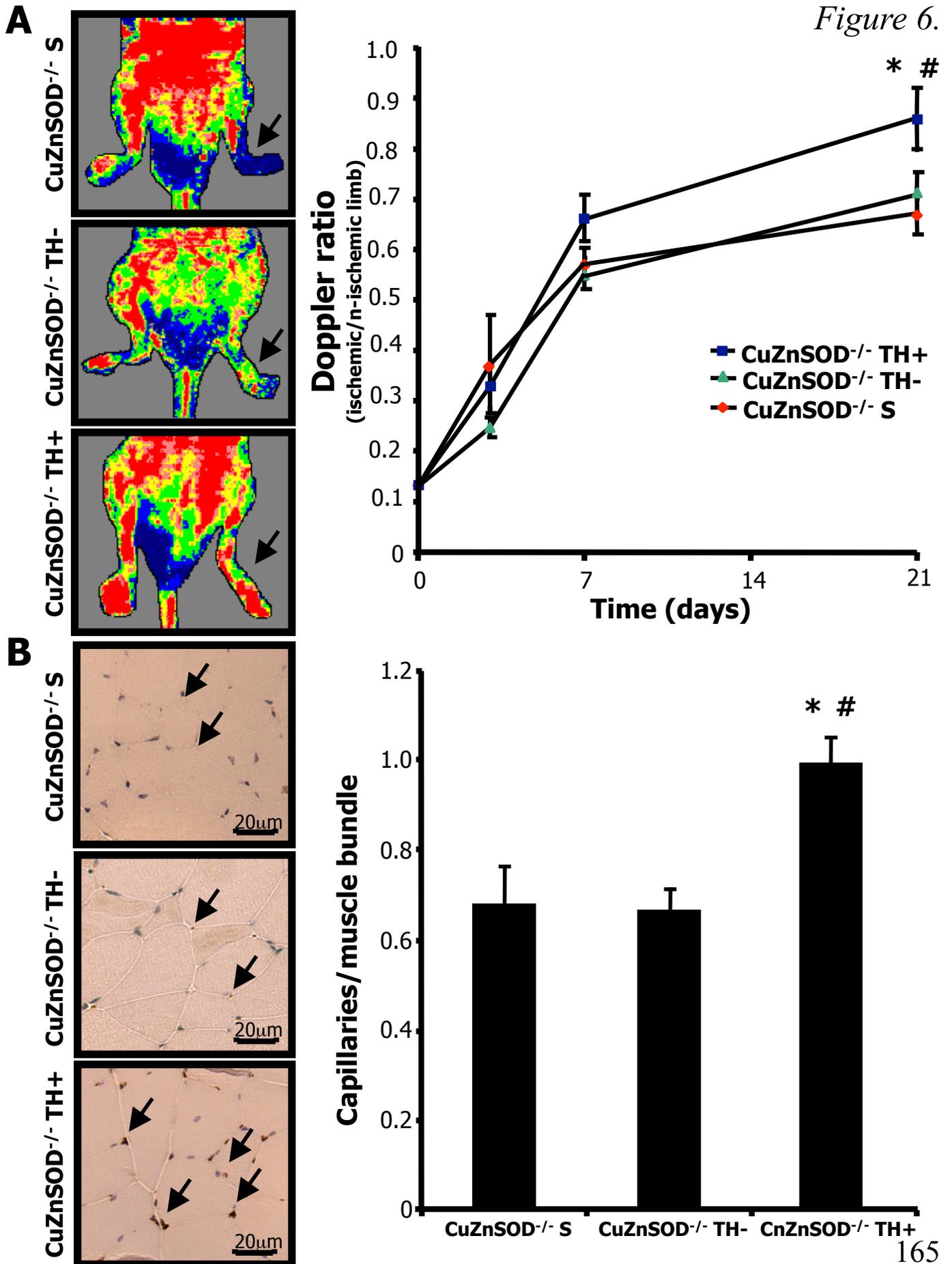


Figure 6.



SUPPLEMENTAL MATERIAL

EXPANDED MATERIALS AND METHODS

Experimental Animals

Six- to 8-weeks old male and female mice were derived from breeding pairs of heterozygous CuZnSOD-deficient (B6;129S-SOD1^{tm1Leb/J}) mice obtained from Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine). Two groups of mice were studied: homozygous CuZnSOD-deficient (CuZnSOD^{-/-}) mice and wild-type (CuZnSOD^{+/+}) littermates. Mice were maintained in 12 hours light-dark cycle and fed ad libitum. No difference was observed between male and female for the different parameters investigated. Genotyping of each mouse was assessed by polymerase chain reaction of DNA isolated from tail biopsy samples as described on the Jackson laboratory Web site (supplemental Figure IA). The expression of other antioxidant and pro-oxidant enzymes in hindlimb muscles was similar in both groups of mice (supplemental Figure IB).

Murine ischemic hindlimb model

The protocol was approved by the Comité Institutionnel de Protection des Animaux (CIPA) of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM). Unilateral hindlimb ischemia was surgically induced as previously described.¹ Briefly, the animals were anesthetized with 2% isoflurane, after which an incision was performed in the skin overlying the middle portion of the left hindlimb. After ligation of the proximal end of the femoral artery, the distal portion of the saphenous artery was

ligated, and the artery and all side branches were dissected free and excised. The skin was closed with a prolene monofilament (6-0) (Johnson & Johnson, ON, Canada). Hindlimb ischemic damage was evaluated clinically as previously described using a grading scale ranging from 0 (no difference compared to the nonischemic hindlimb) to 4 (tissue amputation).²

Monitoring of hindlimb blood flow

Hindlimb perfusion was measured with a Laser Doppler Perfusion Imager (LDPI) system (Moor Instruments Ltd., Axminster, UK). After anesthesia with a ketamine-midazolam solution (100 mg/kg-5mg/kg, intraperitoneally), consecutive measurements were obtained after scanning of the same region of interest (leg and foot) with the LDPI. The perfusion signal was split into six different intervals, each displayed in a separate color. Low and/or no perfusion were displayed in dark blue, whereas the highest perfusion interval was displayed in red. Color photographs were recorded and analyses were performed by calculating the average perfusion of the ischemic and non-ischemic hindlimb. To account for variables such as ambient light and temperature, the results are expressed as the ratio of perfusion in the left (ischemic) vs. right (non-ischemic) hindlimb. The mice were killed at predetermined arbitrary time points after surgery with an overdose of sodium pentobarbital.

Monitoring of blood pressure

Systolic blood pressure was monitored with a BP-2000 tailcuff pressure instrument (Visitech Systems, Apex, NC). Mice were trained for a least 5 consecutive days (30–60 minutes of blood pressure measurements) before the beginning of the study.

Measurements were performed before the induction of hindlimb ischemia and at least 3 times per week for a total of 3 weeks following surgery (n=6 per group).

Tissue preparation and immunochemistry

For immunohistochemistry, whole ischemic hindlimbs were immediately fixed in tissuefix overnight. After bones had been carefully removed, 3- μ m thick tissue transverse sections of the hindlimbs were cut at the level of the gastrocnemius muscle and paraffine embedded so that the whole leg could be analyzed on each section. Identification of endothelial cells was performed by immunostaining for platelet endothelial cells adhesion molecule-1 (PECAM-1 or CD31) with a rat monoclonal antibody directed against mouse CD31 (Pharmigen, San Diego, CA). Capillaries, identified by positive staining of CD31 and appropriate morphology, were counted by a single observer blinded to the treatment regimen under a 200x magnification to determine the capillary density (number of capillaries per muscle fiber). Serial sections were cut at three different levels, and representative fields were analyzed by counting the number of capillaries in each field. Arterioles were identified using a Modified Verhoeff Van Gieson Elastic Stain Kit (Sigma, St. Louis, MO). Serial sections were cut at three different levels, and positive vessels identified by the presence of a continuous internal elastic laminae and muscle spindle were analyzed for the entire section under a 100X magnification. To evaluate local oxidative stress levels in ischemic muscles, an antibody against nitrotyrosine (Upstate, Lake Placid, NY) was used. Intensities of fluorescence were measured and analyzed using computer-based analysis (Metamorph) with the same threshold for all sections under a 200x magnification. The specificity of the test was confirmed by preincubating the

antibody with 10 mmol/L nitrotyrosine (data not shown). To evaluate superoxide production in ischemic muscles, dihydroethidium (DHE) fluorescence labeling was performed. After bones had been carefully removed at the level of the gastrocnemius muscle, ischemic muscles were put in 25% sucrose solution for 10 minutes. Muscles were frozen in eppendorf tubes at -80°C for 24 hours, mold in OCT and kept at -20°C. 3µm frozen sections were made at three different levels in the ischemic muscles. Sections were labeled with 10µM DHE (Calbiochem, San Diego, CA) for 30 minutes. Intensities of fluorescence were measured and analyzed using a computer-based software (Metamorph) with the same threshold for all sections under a 100x magnification. The specificity of the test was confirmed by incubating the section with superoxide dismutase polyethyleneglycol (PEG-SOD) 500U/mL for 1 hour (data not shown).

Western blot analysis

Cell protein extracts were obtained after homogenization of muscles from whole hindlimbs of control or CuZnSOD-deficient mice in a lysis buffer containing 50mmol/L HEPES pH7.6, 150mmol/L NaCl, 1mmol/L EDTA, 25mM β-glycerophosphate, 1mmol/L sodium orthovanadate, 1mmol/L NaF, 0.1% tween 20, 10% glycerol, 1mmol/L DTT, 1mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, 1µg/mL leupeptin, 1µg/mL aprotinin. A total of 40 µg of protein per sample was separated in nonreducing 12% polyacrylamide gel and electroblotted on nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the following antibodies : Catalase (1:500, Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), MnSOD (1:1000 Cell Signaling Technology, Boston, MA), gp91phox (1:500, Transduction Laboratories,

NJ, USA), NOX4 (1:200 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), α -tubulin (1:200; Santa Cruz Biotechnology). Specific proteins were detected by chemiluminescent reaction (GE Healthcare Bio-sciences, Piscataway, NJ) followed by exposure to Hyperfilm ECL (GE Healthcare Bio-sciences). Protein expression was quantified by high-resolution optical densitometry (Alpha Imager 2000; Packard Instruments, Perkin Elmer, Boston, MA). Results are expressed as density values normalized to α -tubulin.

Plasma nitric oxide and total 8-isoprostane

Nitric oxide (NO) production in mice plasma samples was determined indirectly by measuring the concentration of the stable end products nitrate and nitrite using a commercial kit (R&D systems Inc., Minneapolis, MN) based on the Griess reaction. Total (free and esterified) 8-isoprostane was quantified in samples and standards using a commercially available enzyme immunoassay kit (Cayman Chemical Co., Ann Harbor, MI). Values are expressed as picograms of 8- isoprostane per milliliter of total plasma protein.

FACS analysis of Circulating Progenitor Cells

Progenitor cells contained in the total viable cell population derived from the spleen were analyzed by FACS (FACSCalibur flow cytometer, Becton Dickenson, Oakville, Ontario, Canada) using fluorescence-coupled antibodies against the following surface markers: CD34-FITC, VEGFR2 (Flk1)-PE and CD117 (c-kit)-APC (eBioscience, CA, USA). The percentage of CD34+/CD117+/VEGFR2+ cells was determined by two-step two-dimensional analysis after appropriate gating (R1) to exclude

granulocytes. We first gated for CD34⁺ cells (R2) and then examined the resulting population for co-expression of CD117 and VEGFR2. Corresponding isotype-matched immunoglobulins for the three antibodies gave similar low levels of fluorescence compared to unstained cells confirming that the primary antibody binding is specific and not a result of non-specific Fc receptor binding or other protein interactions. The results are expressed as the percentage of triple-marked cells from the initial cell population. Cell phenotypes were determined by the analysis of 300 000 events.

Endothelial Progenitor Cells isolation and characterization

At baseline (day 0) and at day 7 after ischemia, mononuclear cells were mechanically isolated from the spleen or from the femorae, tibiae and humeri by flushing the bone marrow cavities using culture medium. After red blood cell lysis and washing, mononuclear cells were plated on 0.05% fibronectin (Sigma) and cultured in complete medium 200 containing 20% FBS. After 4 days in culture, non-adherent cells were removed by thorough washing with PBS. Adherent cells were stained with 1,1'-diiodo-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate-acetylated low-density lipoprotein (DiI-acLDL, 2.5 µg/mL for 1 hour, Invitrogen, OR, USA) and FITC-labeled lectin BS-1 (*Bandeiraea simplicifolia*, 10µg/mL for 1 h, Sigma). Spindle-shaped cells were observed, and the vast majority of adherent cells (95%) were found to be double positive for the uptake of DiI-acLDL and binding of FITC-labeled lectin. These cells were shown to migrate in response to VEGF stimulation and were capable of incorporating into a network of tubular-like structures when cocultured with mature endothelial cells. On the basis of these morphological and

functional characteristics, these cells were defined as EPCs.

Detection of intracellular Reactive Oxygen Species (ROS) and nitric oxide (NO) in EPCs

Intracellular ROS generation was assessed using 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA, Sigma). ROS in the cells oxidize DCFH-DA, yielding the fluorescent compound 2',7'-dichlorofluorescein (DCF). EPCs were plated at a density of 15000/well in a 96-well plate in complete Medium 200, 20% FBS for 24 hours. Cells were washed with PBS and DCFH-DA (10 $\mu\text{mol/L}$) was added for 5 minutes. The media was removed and cells were washed and quickly analyzed for fluorescence (excitation at 498 nm and emission at 522 nm) with a fluorometer (Fluostar OPTIMA, BMG Labtechnologies, Offenburg, Germany). The specificity of the test was confirmed using the ROS scavenger Tiron (5 mmol/L). Dihydroethidium (DHE) was used to evaluate the presence of superoxide anion oxygen radicals. In the presence of O_2^- , DHE is oxidized to ethidium bromide, which binds to DNA. The fluorescence reaction was carried out by incubating EPCs with DHE (2 $\mu\text{mol/L}$) for 30 minutes. DHE fluorescence was detected with a 585 nm filter. The specificity of the test was confirmed using the superoxide inhibitor PEG-SOD (500U/mL). Measurement of free Nitric Oxide (NO) and nitric oxide synthase (NOS) activity in EPC was assessed with Diaminofluorescein-2 Diacetate (DAF-2DA) a nonfluorescent cell permeable reagent (Cell Technology inc., Mountain View, CA). Once inside the cell the diacetate groups on the DFA-2DA reagent are hydrolyzed by cytosolic esterases thus releasing FAD-2 and sequestering the reagent inside the cell. Production of nitric oxide converts the non-fluorescent dye, DAF-2, to its fluorescent

triale derivative, DAF-2T. The fluorescence reaction was carried out by incubating EPCs with DAF-2DA (0,1 μ mol/L) for 15 min. The media was removed and cells were washed and quickly analyzed for fluorescence (excitation at 488 nm and emission at 515 nm) using a computer-based software (Metamorph) with the same threshold for all sections under a 200x magnification. The specificity of the test was confirmed using the NO inhibitor L-NAME (1mmol/L).

Cell migration assay

Cell migration was assessed using a modified Boyden chamber assay. Polyvinylpyrrolidone-free polycarbonate filter Transwell inserts (6.4mm diameter, 8 μ m pores; Costar, Cambridge, MA) were coated with 0.1% gelatin. Inserts were placed in a 24-well plate containing M200 with 50 ng/mL of VEGF. EPCs (15 000) were added to the upper chamber of the inserts in M200, 0.1% fetal bovine serum, in the presence or absence of the SOD-mimetic Tempol (0.1mmol/L) or the NO donor SNP (0.1mmol/L). Cells were allowed to migrate from the upper to the lower chamber for 6 h at 37 °C. Non-migratory cells were removed from the upper chamber by wiping the upper surface with an absorbent tip. Cells that had migrated to the lower side of the transwell insert were fixed for 10 min with 3.7% formaldehyde and stained with hematoxilin. The number of cells that had migrated was counted in six different representative high power (200x) fields per insert (2 inserts/condition). The data are presented as number of migrated cells \pm standard error from the mean.

EPCs adhesion to endothelial cells

A monolayer of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) was prepared 48

hours before the assay by plating 2×10^5 cells (passage 2-5) in each well of 24 wells plate. HUVECs were pretreated for 12 hours with tumor necrosis factor- α (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) (1ng/mL). Cells were stained with DAPI and fixed with 2% paraformaldehyde. EPCs were labeled with DiI-acLDL and 11 000 EPCs were added to each well and incubated for 3 hours at 37°C in the presence or absence of the SOD mimetic Tempol (0.1mmol/L). Non-attached cells were gently removed with PBS and adherent EPCs were fixed with 2% paraformaldehyde and counted in three random fields. The data are presented as a ratio of the number of adherent EPCs/HUVECs per field \pm standard error of the mean.

Capillary-like tube formation on Matrigel

EPC (4000) labeled 1 hour with DiI-acLDL were co-plated with HUVECs (14 000) in 96-well plates that had been precoated with 50 μ L of growth factor reduced Matrigel Matrix (BD Biosciences) and cultured at 37°C for 6 h with 50 ng/mL of VEGF in the presence or absence of the SOD-mimetic Tempol (0.1mmol/L). Tubular-like structures were photographed and the number of incorporated EPCs was determined in 6 random fields. A tube was defined as a straight cellular segment connecting two cell masses (nodes). No difference in the total number of tubes or in tube length was observed between the different groups (data not shown). The data are presented as number of incorporated EPCs/tube \pm standard error of the mean.

CD117+ cell therapy

Bone marrow mononuclear cells were isolated from the femorae, tibiae and humeri of CuZnSOD^{+/+} or CuZnSOD^{-/-} donors by flushing the bone marrow cavities using

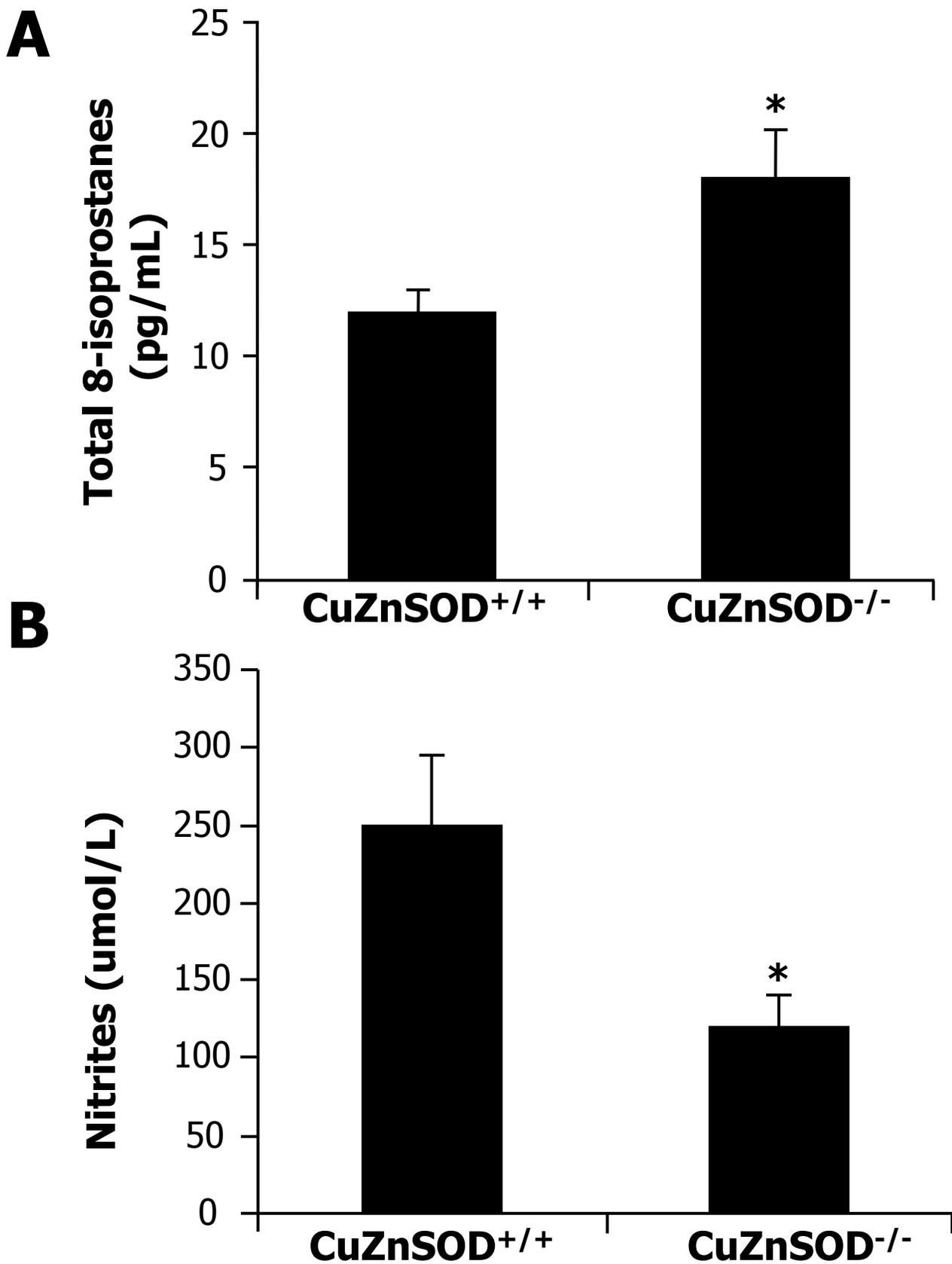
culture medium. Bone marrow cells reacting to anti-CD117 (rat anti-mouse, eBioscience) were sorted using immunomagnetic beads (Dynabeads M-450 coupled to sheep anti-rat IgG, DYNAL, Oslo, Norway). 24 hours after the surgical induction of hindlimb ischemia, 5×10^5 freshly isolated CD117+ cells were introduced into CuZnSOD-deficient mice by tail-vein injection. The control group consisted of CuZnSOD-deficient mice that were injected with saline only.

Statistical Analysis

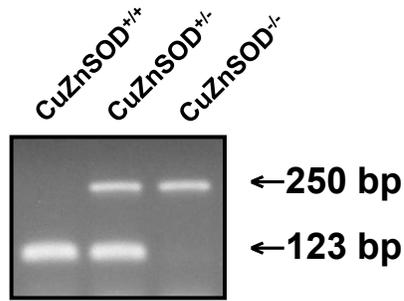
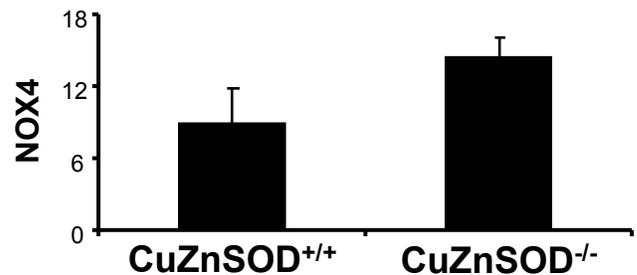
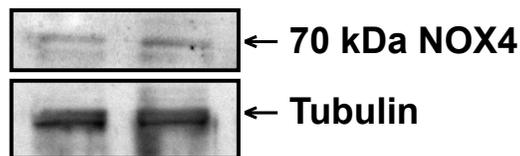
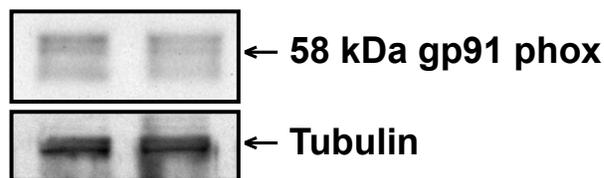
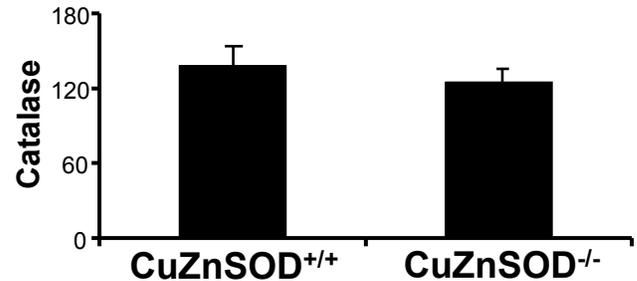
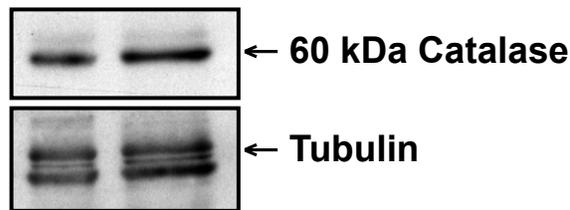
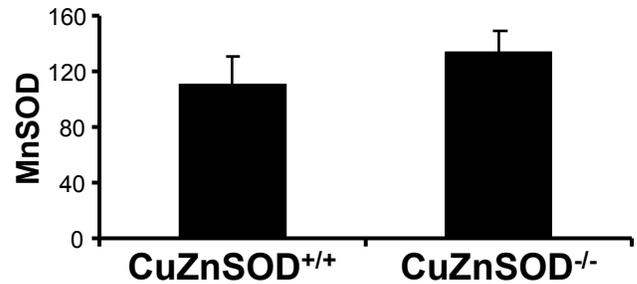
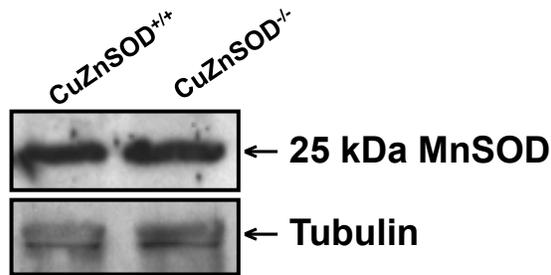
All results are expressed as mean \pm SEM. Statistical significance was evaluated using an unpaired student t test, or one-way ANOVA followed by Newman-Keuls post-hoc test for multiple group comparison. A value of $p < 0.05$ was interpreted to denote statistical significance.

REFERENCES

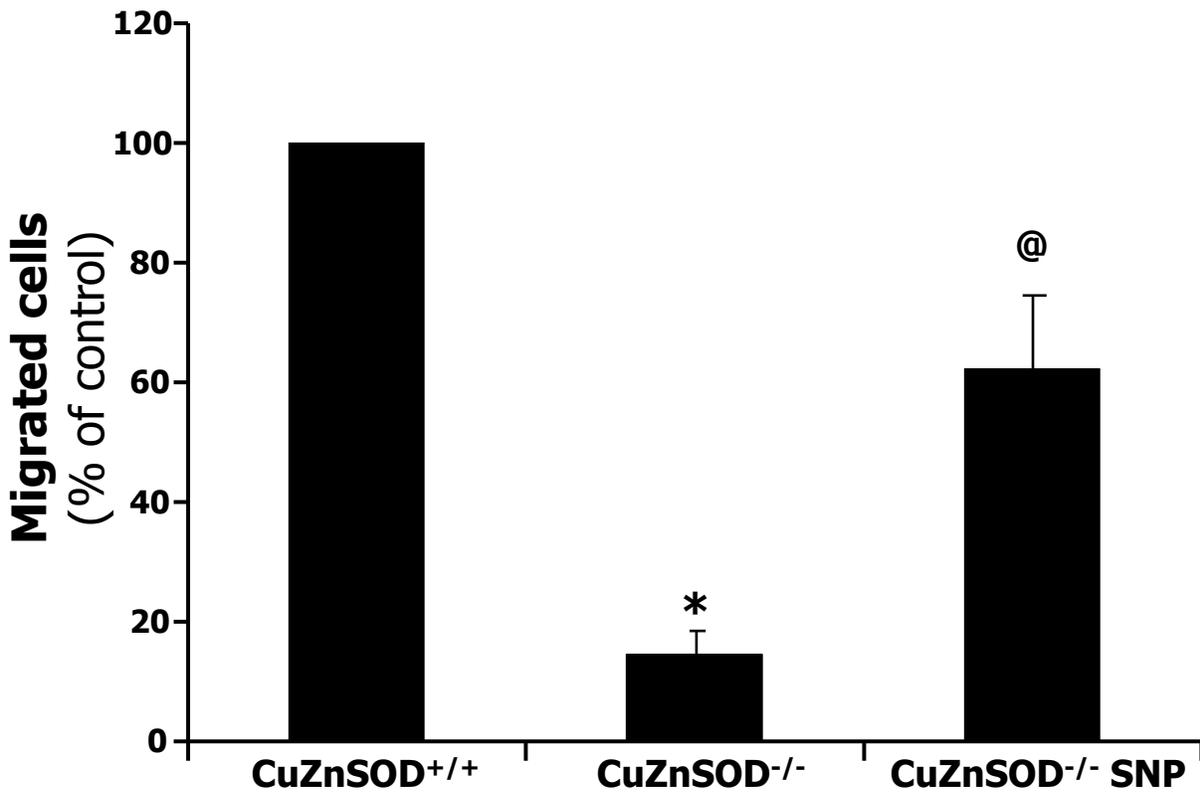
1. Michaud SE, Menard C, Guy LG, Gennaro G, Rivard A. Inhibition of hypoxia-induced angiogenesis by cigarette smoke exposure: impairment of the HIF-1 α /VEGF pathway. *FASEB J*. 2003;17:1150-1152.
2. Willmann JK, Chen K, Wang H, Paulmurugan R, Rollins M, Cai W, Wang DS, Chen IY, Gheysens O, Rodriguez-Porcel M, Chen X, Gambhir SS. Monitoring of the biological response to murine hindlimb ischemia with ^{64}Cu -labeled vascular endothelial growth factor-121 positron emission tomography. *Circulation*. 2008;117:915-922.



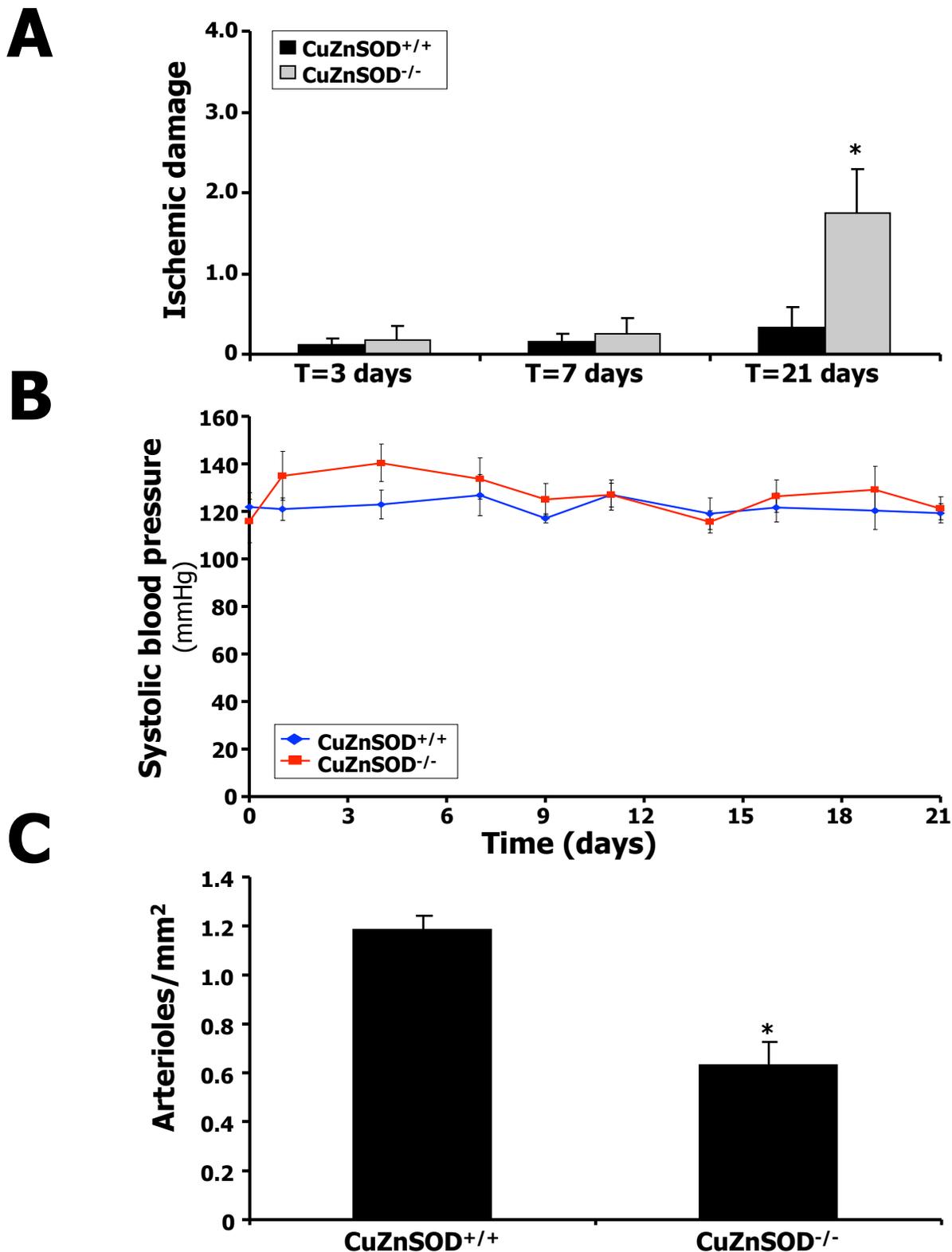
Supplemental Figure I. Total 8-isoprostane (A) and nitrite concentration (B) from plasma samples of CuZnSOD^{+/+} and CuZnSOD^{-/-} mice (n=5/group). Data are mean \pm SEM. * P <0.05 vs. CuZnSOD^{+/+} mice.

A**B**

Supplemental Figure II. PCR product showing expression of CuZnSOD. (A) and Western Blot (B) from non-ischemic muscle of CuZnSOD^{+/+} and CuZnSOD^{-/-} mice (n=2-4/group). Normalized staining intensities obtained by densitometry are displayed right of each lane. Data are mean ± SEM.



Supplemental Figure III. Rescue of CuZnSOD^{-/-} EPCs migration in a modified Boyden chamber assay by NO donor SNP (n=5/group). Data are mean ± SEM. **P*<0.001 vs. CuZnSOD^{+/+} control mice. @ *P* < 0.05 vs CuZnSOD^{-/-} mice.



Supplemental Figure IV. Tissue damage score following ischemia (A). Longitudinal changes in tail-cuff SBP of CuZnSOD^{-/-} vs control mice at baseline (day 0) and following surgery (day 1 to 21) (B). Arterioles density in ischemic hindlimb harvested at day 21 after surgery (C). Data are mean \pm SEM. * $P < 0.05$ vs. CuZnSOD^{+/+} control mice.

10. Deuxième article

Publié dans PloS One

Accelerated Vascular Aging in CuZnSOD-Deficient Mice: Impact on EPC Function and Reparative Neovascularization.

Jessika Groleau, Sylvie Dussault, Julie Turgeon, Paola Haddad and Alain Rivard

Word count: 5808

Abstract: 254

Number of Figures: 5

Supplemental Figures: 2

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

Address for correspondence:

Alain Rivard, MD
Centre Hospitalier de l'Université de Montréal
1560 Sherbrooke Est
Montreal, Que, H2L 4M1
Tel (514) 890-8000 ext:25776
Fax (514) 412-7624

ABSTRACT

Objective: Aging is associated with increased oxidative stress levels and impaired neovascularization following ischemia. CuZnSOD has an important role to limit oxidative stress in the vasculature. Here we investigated the role of CuZnSOD for the modulation of ischemia-induced neovascularisation during aging.

Methods and Results: Hindlimb ischemia was surgically induced in young (2-month-old) or older (8-month-old) wild type (WT) and CuZnSOD^{-/-} mice. We found that blood flow recovery after ischemia and vascular density in ischemic muscles were significantly reduced in older compared to young WT mice. Both in young and older mice, CuZnSOD deficiency led to a further reduction of neovascularization. Accordingly, the resulting neovascularisation potential in a young CuZnSOD^{-/-} mouse was similar to that of an older WT mouse. Oxidative stress levels were also increased to similar levels in the ischemic muscles of young CuZnSOD^{-/-} and older WT mice. To identify potential mechanisms involved, we investigated the effect of aging and CuZnSOD deficiency on the number and the function of endothelial progenitor cells (EPCs). Both aging and CuZnSOD deficiency were associated with reduced number of bone marrow and peripheral EPCs. The effect of moderate aging alone on specific functional activities of EPCs (migration, integration into tubules) was modest. However, CuZnSOD deficiency was associated with severe age-dependent defects in EPC functional activities.

Conclusions: CuZnSOD deficiency is associated with accelerated vascular aging and impaired ischemia-induced neovascularization. Our results suggest that in the context of aging, CuZnSOD has an essential role to protect against excessive oxidative stress in ischemic tissues and preserve the function of EPCs.

INTRODUCTION

In patients with cardiovascular diseases, the capacity of the organism to develop new blood vessels (neovascularization) constitutes an important adaptive mechanism against ischemia[1]. Recent studies suggest that postnatal neovascularization relies not exclusively on the sprouting of mature endothelial cells in pre-existing vessels (angiogenesis), but also involves the contribution of bone marrow-derived circulating endothelial progenitor cells (EPCs)[2,3]. It has been demonstrated that circulating EPCs in adults can home to ischemic tissues and contribute to the formation of new blood vessels[4].

Advanced age is a major risk factor for coronary and peripheral artery disease. In addition, one of the consequences of aging is a decline in the ability of the organism to respond to different stresses, including ischemia. For instance, advanced age is associated with a defect in neovessel formation following arterial occlusion in different animal models[5,6]. Moreover, the number and/or the functional activities of EPCs have been shown to be impaired by aging both in animals and in humans[7,8,9,10]. However, the precise mechanisms involved in the modulation of neovascularisation and EPC function by aging remain to be determined.

A loss of the adaptive response to oxidative stress with the passage of time is one of the major characteristic of aging[11,12,13]. Oxidative stress level in the vasculature is the result of a balance between the rate of ROS formation and the rate of ROS removal by endogenous antioxidant enzymes such as superoxide

dismutases (SODs). The predominant isoform of SOD within blood vessels is copper-zinc SOD (CuZnSOD; SOD1), accounting for 50% to 80% of total SOD activity[14]. CuZnSOD is located within the cytosol as well as in the nucleus, and is thought to be expressed in all mammalian cells. In heterozygous CuZnSOD-deficient mice, increases in superoxide levels and impaired vasodilatation have been documented in old but not in young animals[15]. However, the effect of aging on vascular function has not been investigated in homozygous CuZnSOD-deficient (CuZnSOD^{-/-}) mice. Moreover, the functional importance of CuZnSOD for the age-dependent modulation of ischemia-induced neovascularization is currently unknown.

Here we used a mouse model of hindlimb ischemia to study the effect of CuZnSOD deficiency on oxidative stress levels and reparative ischemia-induced neovascularization in the context of aging. We found that CuZnSOD-deficient mice exhibit accelerated vascular aging and impaired neovascularization in response to ischemia. We also demonstrate that CuZnSOD has an essential role to maintain the functional activities of EPCs in older animals.

METHODS

Experimental Animals

Mice used for this study were derived from breeding pairs of heterozygous CuZnSOD-deficient (B6;129S7-SOD1^{tm1Leb}/J) mice obtained from Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine). Four groups of mice were studied: young (2-month-old) and older (8-month-old) homozygous CuZnSOD-deficient (CuZnSOD^{-/-}) mice were compared to young and older wild-type (CuZnSOD^{+/+}) littermates. Mice were maintained in 12 hours light-dark cycle and fed *ad libitum*. Genotyping of each mouse was assessed by polymerase chain reaction of DNA isolated from tail biopsy samples as described on the Jackson laboratory Web site.

Murine ischemic hindlimb model

The protocol (N10011ARs) was approved by the Comité Institutionnel de Protection des Animaux (CIPA) of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM). Unilateral hindlimb ischemia was surgically induced in mice as previously described[16]. Briefly, the animals were anesthetized with 2% isoflurane, after which an incision was performed in the skin overlying the middle portion of the left hindlimb. After ligation of the proximal end of the femoral artery, the distal portion of the saphenous artery was ligated, and the artery and all side branches were dissected free and excised. The skin was closed with a prolene monofilament (6-0) (Johnson & Johnson, ON, Canada).

Monitoring of hindlimb blood flow

Hindlimb perfusion was measured with a Laser Doppler Perfusion Imager (LDPI) system (Moor Instruments Ltd., Axminster, UK). After anesthesia with a

ketamine-midazolam solution (100mg/kg-5mg/kg, intraperitoneally), consecutive measurements were obtained after scanning of the same region of interest (leg and foot) with the LDPI. The perfusion signal was split into six different intervals, each displayed in a separate color. Low or no perfusion was displayed in dark blue, whereas the highest perfusion interval was displayed in red. Color photographs were recorded and analyses were performed by calculating the average perfusion of the ischemic and non-ischemic hindlimb. To account for variables such as ambient light and temperature, the results are expressed as the ratio of perfusion in the left (ischemic) vs. right (non-ischemic) hindlimb. The mice were killed at predetermined arbitrary time points after surgery with an overdose of sodium pentobarbital.

Tissue preparation and immunochemistry

For immunohistochemistry, whole ischemic hindlimbs were immediately fixed in tissue-fix overnight. After bones had been carefully removed, 3- μ m thick tissue transverse sections of the hindlimbs were cut at the level of the gastrocnemius muscle and paraffin-embedded so that the whole leg could be analyzed on each section. Identification of endothelial cells was performed by immunostaining for platelet endothelial cells adhesion molecule-1 (PECAM-1 or CD31) with a rat monoclonal antibody directed against mouse CD31 (Pharmigen, San Diego, CA). Capillaries, identified by positive staining of CD31 and appropriate morphology, were counted by a single observer blinded to the treatment regimen under a 200x magnification to determine the capillary density (number of capillaries per mm²). Serial sections were cut at three different levels, and representative fields were analyzed by counting the number of capillaries in each field. Arterioles were

identified using a Modified Verhoeff Van Gieson Elastic Stain Kit (Sigma, St. Louis, MO). Serial sections were cut at three different levels, and positive vessels identified by the presence of a continuous internal elastic laminae and muscle spindle were analysed for the entire section under a 100X magnification. To characterize premature vascular senescence, goat polyclonal antibodies against mouse p16 and p53 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) were used. To investigate local oxidative stress levels in ischemic muscles, an antibody against nitrotyrosine (Upstate, Lake Placid, NY) was used. Nitrotyrosine immunostaining is a reflection of peroxynitrite produced locally in tissues. Intensities of fluorescence were measured and analyzed using computer-based analysis (Metamorph) with the same threshold for all sections under a 200X magnification. The specificity of the test was confirmed by pre-incubating the antibody with 10 mmol/L nitrotyrosine (data not shown). To evaluate superoxide production in ischemic muscles, dihydroethidium (DHE) fluorescence labeling was performed. After bones had been carefully removed at the level of the gastrocnemius muscle, ischemic muscles were put in 25% sucrose solution for 10 minutes. Muscles were frozen in eppendorf tubes at -80°C for 24 hours, mold in OCT and kept at -20°C. 3µm frozen sections were made at three different levels in the ischemic muscles. Sections were labeled with 10µmol/L DHE (Calbiochem, San Diego, CA) for 30 minutes. Intensities of fluorescence were measured and analyzed using a computer-based software (Metamorph) with the same threshold for all sections under a 100X magnification. The specificity of the test was confirmed by pre-incubating the section with superoxide dismutase polyethyleneglycol (PEG-SOD) 500U/mL for 1 hour (data not shown).

Western blot analysis

Whole-cell protein extracts were obtained after homogenization of muscles from hindlimbs of young and older control mice in a lysis buffer containing 50mmol/L HEPES pH7.6, 150mmol/L NaCl, 1mmol/L EDTA, 25mmol/L β -glycerophosphate, 1mmol/L sodium orthovanadate, 1mmol/L NaF, 0.1% tween 20, 10% glycerol, 1mmol/L DTT, 1mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 μ g/mL leupeptin, 1 μ g/mL aprotinin. Protein concentrations were measured according to the Bradford method and equal amount (100 μ g) of protein extract was separated in nonreducing 15% polyacrylamide gel and electroblotted on nitrocellulose membranes. The membranes were probed with 1:500 CuZnSOD antibody (Chemicon, Billerica, MA). Specific proteins were detected by chemiluminescent reaction (GE Healthcare Bio-sciences, Piscataway, NJ). Results are expressed as density values normalized to Ponceau red staining.

FACS analysis of Circulating Progenitor Cells

Progenitor cells contained in the total viable population derived from the spleen were analysed by FACS (FACSCalibur flow cytometer, Becton Dickenson, Oakville, Ontario, Canada), using fluorescence-coupled antibodies against the following markers: CD34-FITC, VEGFR2 (Flk-1)-PE and CD117 (c-kit)-APC (eBioscience, CA, USA). Corresponding isotype-matched immunoglobulins for the three antibodies gave similar low levels of fluorescence compared to unstained cells confirming that the primary antibody binding is specific and not a result of non-specific Fc receptor binding or other protein interactions. The results are expressed as the percentage of triple-marked cells from the initial population. Cell phenotypes were determined by the analysis of 300 000 events.

Endothelial Progenitor Cells isolation and characterization (early outgrowth EPCs)

7 days following ischemia, mononuclear cells were mechanically isolated from the femora, tibiae and humeri by flushing the bone marrow cavities using culture medium. After red blood cell lysis and washing, mononuclear cells were plated on 0.05% fibronectin (Sigma) and cultured in complete Medium 200 containing 20% FBS. After 4 days in culture, non-adherent cells were removed by thorough washing with PBS. Adherent cells were stained with 1,1'-di(1,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate)-acetylated low-density lipoprotein (DiI-acLDL, 2.5 µg/mL for 1 hour, Invitrogen, OR, USA) and FITC-labeled lectin BS-1 (*Bandeiraea simplicifolia*, 10µg/mL for 1 hour, Sigma). Spindle-shaped cells were observed, and the vast majority of adherent cells (95%) were found to be double-positive for the uptake of DiI-acLDL and binding of FITC-labeled lectin. FACS analyses revealed that 83% of adherent cells express CD45, 57% CD14, 18% CXCR4, 9% CD31 and 8% Sca-1. These cells were shown to migrate in response to VEGF stimulation and were capable of incorporation into a network of tubular-like structures when cocultured with mature endothelial cells. On the basis of these morphological and functional characteristics, these cells were defined as early outgrowth EPCs.

Detection of intracellular superoxide oxygen radicals in EPCs

Dihydroethidium (DHE) was used to evaluate the presence of superoxide anion oxygen radicals. In the presence of O_2^- , DHE is oxidized to ethidium bromide, which binds to DNA. EPCs were plated at a density of 15000/well in a 96-well plate in complete Medium 200, 20% FBS for 24 hours. The fluorescence reaction

was carried out by incubating EPCs with DHE (2 $\mu\text{mol/L}$) for 30 minutes. DHE fluorescence was detected with a fluorometer (Fluostar OPTIMA, BMG Labtechnologies, Offenburg, Germany) using a 585 nm filter. The specificity of the test was confirmed using 50 ng/mL TNF-alpha and 500 U/mL PEG-SOD as positive and negative controls, respectively (data not shown).

Cell migration assay

Cell migration was assessed using a modified Boyden chamber assay. Polyvinylpyrrolidone-free polycarbonate filter Transwell inserts (6.4mm diameter, 8 μm pores; Costar, Cambridge, MA) were coated with 0.1% gelatin. Inserts were placed in a 24-well plate containing DMEM with 50 ng/mL of VEGF. EPCs (15 000) were added to the upper chamber of the inserts in DMEM, 0.1% fetal bovine serum. Cells were allowed to migrate from the upper to the lower chamber for 6 h at 37 °C. Non-migratory cells were removed from the upper chamber by wiping the upper surface with an absorbent tip. Cells that had migrated to the lower side of the transwell insert were fixed for 10 min with 3.7% formaldehyde and stained with hematoxylin. The number of cells that had migrated was counted in six different representative high power (200x) fields per insert (2 inserts/condition). The data are presented as number of migrated cells \pm standard error from the mean.

EPCs adhesion to endothelial cells

A monolayer of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) was prepared 48 hours before the assay by plating 2×10^5 cells (passage 2-5) in each well of 24 wells plate. HUVECs were pretreated for 12 hours with tumor necrosis factor- α

(BD Biosciences, San Diego, CA) (1ng/mL). Cells were stained with DAPI and fixed with 2% paraformaldehyde. EPCs were labeled with DiI-acLDL and 11 000 EPCs were added to each well and incubated for 3 hours at 37°C. Non-attached cells were gently removed with PBS and adherent EPCs were fixed with 2% paraformaldehyde and counted in three random fields. The data are presented as a ratio of the number of adherent EPCs/HUVECs per field \pm standard error of the mean.

Capillary-like tube formation on Matrigel

EPC (4000) labeled 1 hour with DiI-acLDL were co-plated with HUVECs (14 000) in 96-well plates that had been precoated with 50 μ L of growth factor reduced Matrigel Matrix (BD Biosciences) and cultured at 37°C for 6 h with 50 ng/mL of VEGF. Tubular-like structures were photographed and the number of incorporated EPCs in tubules was determined in 6 random fields. A tube was defined as a straight cellular segment connecting two cell masses (nodes). The data are presented as number of incorporated EPCs/tube \pm standard error of the mean.

Statistical Analysis

All results are expressed as mean \pm SEM. Statistical significance was evaluated using a one-way ANOVA followed by Newman-Keuls post-hoc test for multiple group comparison. A value of $p < 0.05$ was interpreted to denote statistical significance.

RESULTS

Effect of CuZnSOD-Deficiency and Aging on Neovascularization after Ischemia

In control wild type (WT) mice, we found that aging is associated with a significant decrease of CuZnSOD expression in hindlimb muscles (**Figure S1**). To characterize the role of CuZnSOD-deficiency and aging on neovascularization, blood flow perfusion was evaluated by serial LDPI studies after the induction of mouse hindlimb ischemia (**Figure 1A**). Immediately after the surgery (day 0), Doppler flow ratios (DFR) between the ischemic and normal hindlimbs were reduced to similar low levels, indicating that the severity of the induced ischemia was similar in all groups (**Figure 1B**). However, older wild type (WT) mice had a significantly slower rate of blood flow recovery when compared to young mice at day 7 after surgery (0.52 ± 0.03 vs. 0.72 ± 0.03 ; $p < 0.01$). Both in young and older mice, CuZnSOD deficiency was associated with a further reduction of blood flow recovery. Accordingly, the resulting blood flow perfusion in young CuZnSOD^{-/-} mice was similar to that of older WT mice (DFR 0.57 ± 0.05 vs. 0.52 ± 0.03 ; $p = 0.42$). At the microvascular level, capillary density was significantly reduced in CuZnSOD-deficient mice (**Figure 1C**). Moreover, total arteriolar perimeter in ischemic tissues was reduced both by aging and CuZnSOD deficiency, resulting in values in young CuZnSOD^{-/-} mice that were similar to that of older WT mice (**Figure 1D**).

Oxidative Stress Levels and Vascular Aging in Ischemic Tissues

Because excessive oxidative stress has been associated with impaired angiogenesis in different situations, we compared oxidative stress levels in ischemic muscles of young and older CuZnSOD^{-/-} and WT mice. **Figure 2A** shows representative results of nitrotyrosine immunostaining, a reflection of peroxynitrite produced locally in tissues. **Figure 2B** shows results for DHE, an indicator of superoxide levels. Quantification of relative fluorescences (**2C and 2D**) demonstrates that both markers of oxidative stress were significantly increased by aging and CuZnSOD deficiency. Young CuZnSOD-deficient mice had oxidative stress levels in ischemic tissues that were similar to that of older WT mice, and the highest oxidative stress levels were seen in old CuZnSOD-deficient mice. Interestingly, increased oxidative stress levels in ischemic tissues of CuZnSOD-deficient mice were associated with accelerated vascular aging, as demonstrated by higher expression of stress-induced senescence markers p53 and p16 in capillaries (**Figure S2**).

Effect of CuZnSOD-Deficiency and Aging on EPC Levels

To identify potential mechanisms involved in the detrimental effect of aging and CuZnSOD deficiency on ischemia-induced neovascularization, we quantified the number of EPCs in the different animal groups at day 7 after hindlimb ischemia. Early outgrowth bone marrow EPCs were isolated in culture and shown to endocytose acLDL and bind BS-1 lectin (**Figure 3A**). We found that the number of bone marrow EPCs is reduced both by aging and CuZnSOD deficiency (**Figure 3B**). Young CuZnSOD-deficient mice had bone marrow EPC levels that were similar to that of older WT mice, and the lowest EPC levels were found in old

CuZnSOD-deficient mice. The percentage of circulating progenitor cells contained in the total viable cell population derived from the spleen was also measured by FACS analysis at day 7 after ischemia using the cell markers CD34, VEGFR2 and CD117 (**Figure 3C**). Similarly to EPCs isolated in culture, the number of peripheral circulating progenitor cells was significantly reduced by aging and CuZnSOD deficiency (**Figure 3D**). The level of EPCs in young CuZnSOD-deficient mice was similar to that of older WT mice.

Oxidative Stress and Functional Activities of EPCs.

Superoxide generation was measured in EPCs isolated from the bone marrow using DHE immunostaining. A small non-significant increase of superoxide generation was seen in EPCs isolated from older vs. young wild-type animals. However, CuZnSOD deficiency was associated with a very important increase of EPC superoxide levels in older animals (**Figure 4A and 4B**). We also demonstrate that this increased oxidative stress is associated with an important impairment of EPC functional activities (**Figure 5**). CuZnSOD-deficiency in EPCs was associated with several characteristics of aging including reduction in VEGF-induced migration (**Figure 5A**), impairment in the ability to adhere to a HUVEC monolayer activated with TNF- α (**Figure 5B and 5D**), and reduction in the capacity of EPCs to integrate into tubular-like structures in coculture with HUVECs (**Figure 5C and 5E**). Although the effect of aging alone on EPC function was often modest, CuZnSOD deficiency was associated with severe age-dependent defects.

DISCUSSION

To our knowledge, the present study is the first one to investigate the role of CuZnSOD for postnatal ischemia-induced neovascularization in the context of aging. Since oxidative stress is thought to contribute to the pathophysiology of aging[12], and because of the important role of CuZnSOD to limit increases in superoxide levels in different tissues, we hypothesized that CuZnSOD deficiency would accelerate vascular aging and compromise neovascularization in response to ischemia. Previous studies have indicated that CuZnSOD deficiency leads to physiological defects that resemble aging. For example, CuZnSOD^{-/-} mice have been shown to exhibit acceleration of several age-related diseases including skeletal muscle atrophy[17], hepatocarcinogenesis[18], retinal degeneration[19,20] and hearing loss[21]. In the cardiovascular system, young heterozygous CuZnSOD-deficient mice do not show any significant alteration of endothelial function[15] or postischemic myocardial contractile function[22]. However, impaired endothelial-dependant vasodilatation has been demonstrated in older heterozygous CuZnSOD^{+/-} mice[15], and in young homozygous CuZnSOD^{-/-} mice[14]. Moreover, we have recently shown that homozygous CuZnSOD deficiency in young mice leads to increased oxidative stress levels and impaired neovascularization in response to ischemia[23]. However, the defects in endothelial function and postnatal neovascularization in young CuZnSOD^{-/-} mice are relatively modest, and the effect of aging in these conditions is unknown. Here we studied the response to ischemia in both young and older homozygous CuZnSOD-deficient mice in order to specifically define the role of CuZnSOD and aging for the modulation of neovascularization.

Our results indicate that CuZnSOD expression in hindlimb muscles is decreased with aging. We also demonstrate that CuZnSOD deficiency accelerates vascular aging in the context of tissue ischemia. In fact, young CuZnSOD^{-/-} mice exhibit neovascularisation levels that are similar to that of older control mice, both at the macrovascular (Laser Doppler) and microvascular (vascular density) levels. In older CuZnSOD^{-/-} mice, surgically-induced hindlimb ischemia resulted in severe necrosis and auto-amputation in the second week after surgery (data not shown) and the current study was therefore limited to a one-week follow-up. Although impaired ischemia-induced neovascularisation has previously been shown with aging[5,6], the current study demonstrates that CuZnSOD deficiency is associated with an important further reduction of blood flow recovery in older animals. At the microvascular level, the negative effect of CuZnSOD deficiency in older animals was mainly seen in arteriolar vessels. Globally, these results suggest that CuZnSOD has an important role in the context of aging to prevent an excessive reduction of neovascularization in response to ischemia.

The mechanisms by which CuZnSOD modulates neovascularization in the context of aging are potentially diverse. Ischemic tissues are characterized by high levels of inflammatory cytokines that can activate ROS production[24]. Excessive production of ROS in pathological conditions leads to cellular toxicity and has been associated with impaired angiogenesis in different animal models[23,25,26,27]. CuZnSOD activity could therefore act as a defense mechanism against excessive oxidative stress accumulation and tissue damage in older animals. Consistent with this, we found that superoxide and ROS

production in ischemic tissues were significantly increased by aging and that the highest levels of oxidative stress were found in old CuZnSOD-deficient mice. Increased oxidative stress level in older and CuZnSOD-deficient mice was also associated with higher expression of the stress-induced senescence markers p53 and p16. It is conceivable that high levels of ROS in old CuZnSOD-deficient mice promote endothelial cell dysfunction in ischemic tissues, which would in turn contribute to impair angiogenesis. In addition, excessive ROS production in ischemic tissues could also interfere with the activity of pro-angiogenic factors such as VEGF[25,26].

In the current study, we propose that another important factor involved in the accelerated vascular aging of CuZnSOD-deficient mice is endothelial progenitor cells (EPCs) dysfunction. The importance of EPCs for the development of neovessels in different physiological and pathological situations has recently been recognized[2,3,4]. In healthy individuals or in patients with cardiovascular diseases, aging has been associated with a reduction in the number and/or the functional activities of EPCs[8,9,10]. In vivo, young bone marrow-derived EPCs have been shown to restore aging-impaired cardiac angiogenic function[7]. Here we demonstrate that the number of EPCs is significantly and similarly reduced by aging and CuZnSOD deficiency. Our results suggest that CuZnSOD deficiency leads to an age-dependant depletion of EPC reserve in the bone marrow. This could at least in part explain the important reduction of peripheral (spleen) EPCs that we documented in these animals. Future studies are needed to determine whether CuZnSOD deficiency can also impair the mobilization of EPCs from the bone marrow in the context of aging.

Age-dependent endothelial dysfunction has been shown to correlate with impairment in the functional activity of EPCs[28]. Here we found that the functional activities of EPCs are impaired both by aging and CuZnSOD deficiency. However, the effect of aging alone on EPC function (e.g. migration/integration into tubules) was often modest, whereas CuZnSOD deficiency was associated with severe age-dependent defects. This suggests that CuZnSOD could have an important role to limit excessive oxidative stress and preserve EPC angiogenic activities in the context of aging. In fact, EPCs have previously been shown to express higher levels of anti-oxidative enzymes and enhanced protection against oxidative stress compared to mature endothelial cells[29]. Here we found that superoxide levels in EPCs were not significantly increased in older compared to young wild-type animals. However, CuZnSOD deficiency led to an important increase of EPC superoxide levels in older animals. Globally, our results are consistent with a protective role of CuZnSOD against age-dependent increase of oxidative stress levels and impairment of EPC angiogenic activities.

In summary, our study demonstrates that CuZnSOD deficiency leads to accelerated vascular aging and impaired post-natal neovascularization after ischemia. We propose that in the context of aging, CuZnSOD has an essential role to protect against excessive oxidative stress in ischemic tissues and preserve the number and the functional activities of EPCs. The finding that CuZnSOD is essential to maintain EPC functions might have important clinical implications. In ‘healthy’ aging, stable CuZnSOD expression could limit oxidative stress

accumulation and help maintaining EPC function and vascular integrity. However, it has been shown that clinical conditions such as diabetes and chronic heart failure are associated with defective levels of antioxidant enzymes, including CuZnSOD[30,31,32]. In these patients, aging could lead to accelerated accumulation of ROS, impaired EPC function and defective neovascularization in response to ischemia. CuZnSOD modulation might therefore represent a novel therapeutic avenue to restore EPC functions and neovascularization in aging patients with severe ischemic vascular diseases presenting different cardiovascular risk factors.

REFERENCES

1. Losordo DW, Dimmeler S (2004) Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease. Part I: angiogenic cytokines. *Circulation* 109: 2487-2491.
2. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, et al. (1997) Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275: 964-967.
3. Urbich C, Dimmeler S (2004) Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res* 95: 343-353.
4. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, et al. (1999) Bone Marrow Origin of Endothelial Progenitor Cells Responsible for Postnatal Vasculogenesis in Physiological and Pathological Neovascularization. *Circ Res* 85: 221-228.
5. Rivard A, Fabre JE, Silver M, Chen D, Murohara T, et al. (1999) Age-dependent impairment of angiogenesis. *Circulation* 99: 111-120.
6. Edelberg JM, Lee SH, Kaur M, Tang L, Feirt NM, et al. (2002) Platelet-derived growth factor-AB limits the extent of myocardial infarction in a rat model: feasibility of restoring impaired angiogenic capacity in the aging heart. *Circulation* 105: 608-613.
7. Edelberg JM, Tang L, Hattori K, Lyden D, Rafii S (2002) Young adult bone marrow-derived endothelial precursor cells restore aging-impaired cardiac angiogenic function. *Circ Res* 90: E89-93.
8. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, et al. (2001) Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells

inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 89: E1-7.

9. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, et al. (2003) Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 348: 593-600.
10. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, et al. (2005) Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 353: 999-1007.
11. Harman D (2003) The free radical theory of aging. *Antioxid Redox Signal* 5: 557-561.
12. Finkel T, Holbrook NJ (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408: 239-247.
13. Yu BP, Chung HY (2006) Adaptive mechanisms to oxidative stress during aging. *Mech Ageing Dev* 127: 436-443.
14. Didion SP, Ryan MJ, Didion LA, Fegan PE, Sigmund CD, et al. (2002) Increased superoxide and vascular dysfunction in CuZnSOD-deficient mice. *Circ Res* 91: 938-944.
15. Didion SP, Kinzenbaw DA, Schrader LI, Faraci FM (2006) Heterozygous CuZn superoxide dismutase deficiency produces a vascular phenotype with aging. *Hypertension* 48: 1072-1079.
16. Michaud SE, Menard C, Guy LG, Gennaro G, Rivard A (2003) Inhibition of hypoxia-induced angiogenesis by cigarette smoke exposure: impairment of the HIF-1 α /VEGF pathway. *Faseb J* 17: 1150-1152.
17. Muller FL, Song W, Liu Y, Chaudhuri A, Pieke-Dahl S, et al. (2006) Absence of CuZn superoxide dismutase leads to elevated oxidative stress

and acceleration of age-dependent skeletal muscle atrophy. *Free Radic Biol Med* 40: 1993-2004.

18. Elchuri S, Oberley TD, Qi W, Eisenstein RS, Jackson Roberts L, et al. (2005) CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. *Oncogene* 24: 367-380.
19. Imamura Y, Noda S, Hashizume K, Shinoda K, Yamaguchi M, et al. (2006) Drusen, choroidal neovascularization, and retinal pigment epithelium dysfunction in SOD1-deficient mice: a model of age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 11282-11287.
20. Hashizume K, Hirasawa M, Imamura Y, Noda S, Shimizu T, et al. (2008) Retinal dysfunction and progressive retinal cell death in SOD1-deficient mice. *Am J Pathol* 172: 1325-1331.
21. McFadden SL, Ding D, Burkard RF, Jiang H, Reaume AG, et al. (1999) Cu/Zn SOD deficiency potentiates hearing loss and cochlear pathology in aged 129,CD-1 mice. *J Comp Neurol* 413: 101-112.
22. Asimakis GK, Lick S, Patterson C (2002) Postischemic recovery of contractile function is impaired in SOD2(+/-) but not SOD1(+/-) mouse hearts. *Circulation* 105: 981-986.
23. Groleau J, Dussault S, Haddad P, Turgeon J, Menard C, et al. (2010) Essential role of copper-zinc superoxide dismutase for ischemia-induced neovascularization via modulation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30: 2173-2181.
24. Cramer T, Yamanishi Y, Clausen BE, Forster I, Pawlinski R, et al. (2003) HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell* 112: 645-657.

25. Urbich C, Dernbach E, Aicher A, Zeiher AM, Dimmeler S (2002) CD40 ligand inhibits endothelial cell migration by increasing production of endothelial reactive oxygen species. *Circulation* 106: 981-986.
26. Michaud SE, Dussault S, Groleau J, Haddad P, Rivard A (2006) Cigarette smoke exposure impairs VEGF-induced endothelial cell migration: role of NO and reactive oxygen species. *J Mol Cell Cardiol* 41: 275-284.
27. Ebrahimian TG, Heymes C, You D, Blanc-Brude O, Mees B, et al. (2006) NADPH oxidase-derived overproduction of reactive oxygen species impairs postischemic neovascularization in mice with type 1 diabetes. *Am J Pathol* 169: 719-728.
28. Heiss C, Keymel S, Niesler U, Ziemann J, Kelm M, et al. (2005) Impaired progenitor cell activity in age-related endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 45: 1441-1448.
29. Dernbach E, Urbich C, Brandes RP, Hofmann WK, Zeiher AM, et al. (2004) Antioxidative stress-associated genes in circulating progenitor cells: evidence for enhanced resistance against oxidative stress. *Blood* 104: 3591-3597.
30. Linke A, Adams V, Schulze PC, Erbs S, Gielen S, et al. (2005) Antioxidative effects of exercise training in patients with chronic heart failure: increase in radical scavenger enzyme activity in skeletal muscle. *Circulation* 111: 1763-1770.
31. Colak E, Majkic-Singh N, Stankovic S, Sreckovic-Dimitrijevic V, Djordjevic PB, et al. (2005) Parameters of antioxidative defense in type 2 diabetic patients with cardiovascular complications. *Ann Med* 37: 613-620.

32. Hodgkinson AD, Bartlett T, Oates PJ, Millward BA, Demaine AG (2003)
The response of antioxidant genes to hyperglycemia is abnormal in patients with type 1 diabetes and diabetic nephropathy. *Diabetes* 52: 846-851.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Effect of CuZnSOD deficiency and aging on ischemia-induced neovascularization. **A.** Representative results of laser Doppler measurements 7 days after hindlimb ischemia in young (Y) and older (O) wild-type (CuZnSOD^{+/+}) and CuZnSOD^{-/-} mice. A color scale illustrates blood flow variations from minimal (dark blue) to maximal (red) values. Arrows indicate ischemic (left) hindlimb. **B.** Quantification of Laser Doppler perfusion ratios. **C-D.** Quantification of capillary (**C**) and arteriolar (**D**) densities in ischemic muscles harvested at day 7 in the different groups. Data are mean vessels/mm² ± SEM (n=7-10/group). **P*<0.05 vs. young wild type mice. @*P*<0.05 vs. old wild type mice. #*P*<0.05 vs. young CuZnSOD^{-/-} mice.

Figure 2. ROS levels in ischemic tissues. Nitrotyrosine. (**A**) and Dihydroethidium (**B**) immunostaining of ischemic muscles harvested at day 7 after ischemia in young (Y) and older (O) wild-type (CuZnSOD^{+/+}) and CuZnSOD^{-/-} mice (n=10/group). Nitrotyrosine (**C**) and Dihydroethidium (**D**) quantification in the different groups is presented as arbitrary fluorescent units. Data are mean ± SEM. **P*<0.05 vs. young wild type mice.

Figure 3. Effect of CuZnSOD deficiency and aging on EPC number. **A.** EPCs were identified using DiI-acLDL, lectin-FITC and DAPI stains. Cells positive for all 3 dyes were counted as EPCs. **B.** EPCs isolated from the bone marrow were quantified at day 7 after hindlimb ischemia. **C.** Circulating endothelial progenitor cells derived from the spleen were analyzed by FACS (300 000 events) using the surface markers CD34 (FL1-H axis), VEGFR2 (FL2-H axis) and CD117 (FL4-H

axis). Triple-marked cells are indicated in the black oval and representative examples are shown in the different groups. **D.** The percentage of triple-marked cells from the initial cell population was quantified (n=8 mice/group). Data are mean \pm SEM. * P <0.05 vs. young wild type mice. @ P <0.05 vs. old wild type mice.

Figure 4. Superoxide levels in EPCs. **A.** Superoxides were detected using dihydroethidium (DHE) immunostaining. The analyses were performed on EPCs harvested from the bone marrow of young or older wild type (CuZnSOD^{+/+}) and CuZnSOD^{-/-} mice at day 7 after hindlimb ischemia (n=5/group). **B.** Quantification was performed with a fluorometer and is presented as arbitrary fluorescent units. Data are mean \pm SEM. * P <0.05 vs. young wild type EPCs. @ P <0.05 vs. old wild type EPCs. # P <0.05 vs. young CuZnSOD^{-/-} EPCs.

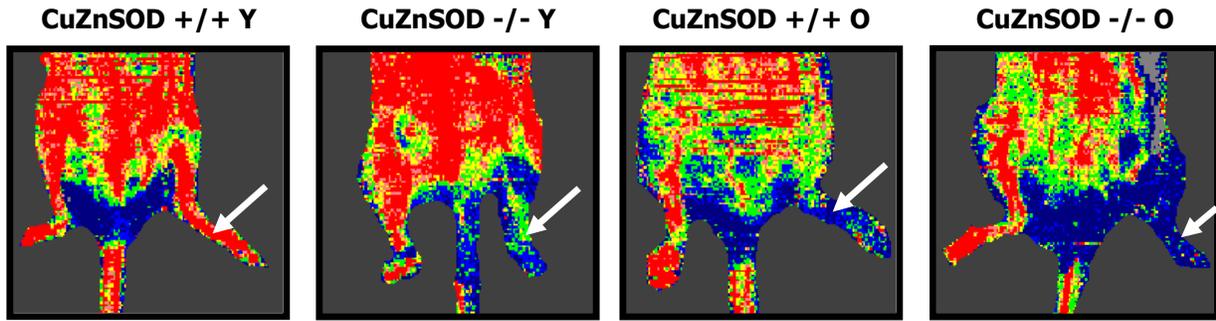
Figure 5. Effect of CuZnSOD deficiency and aging on EPC angiogenic activities. EPCs were isolated from the bone marrow of young or older wild type (CuZnSOD^{+/+}) and CuZnSOD^{-/-} mice. VEGF-induced migration (**A**) was assessed using a modified Boyden chamber assay. To assess EPC adhesion (**B-D**), EPCs were labeled with a DiI fluorescent marker (red) and allowed to adhere to a monolayer of TNF- α -stimulated HUVECs (blue, nuclear stain DAPI). To assess integration into tubular-like structures (**C-E**), fluorescent-labeled EPCs (red) were coplated with HUVECs (transparent) to form tubular-like structures on Matrigel. EPCs from 5-7 different mice/group were tested. Data are mean \pm SEM. * P <0.05 vs. young wild type EPCs. @ P <0.05 vs. old wild type EPCs. # P <0.05 vs. young CuZnSOD^{-/-} EPCs.

Figure S1. CuZnSOD expression in hindlimb muscles of young (Y) and older (O) wild type (CuZnSOD^{+/+}) mice (n=2-4/group). Results are expressed as density values normalized to Ponceau red staining. Data are mean \pm SEM. * $P < 0.05$ vs CuZnSOD^{+/+} Y.

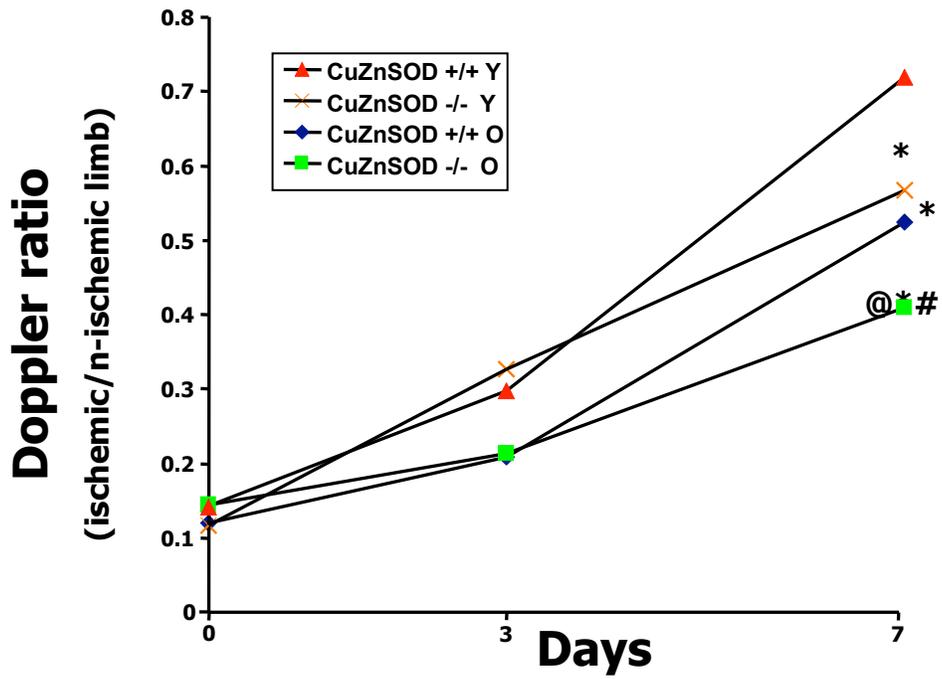
Figure S2. Histo-immunostaining showing expression of p53 (A) and p16 (B) in ischemic hindlimb muscles of young (Y) and older (O) CuZnSOD^{+/+} and CuZnSOD^{-/-} mice. Representative results are shown.

Figure 1

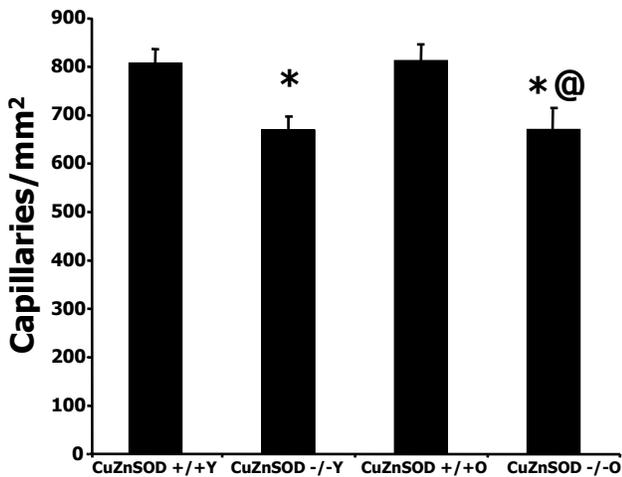
A



B



C



D

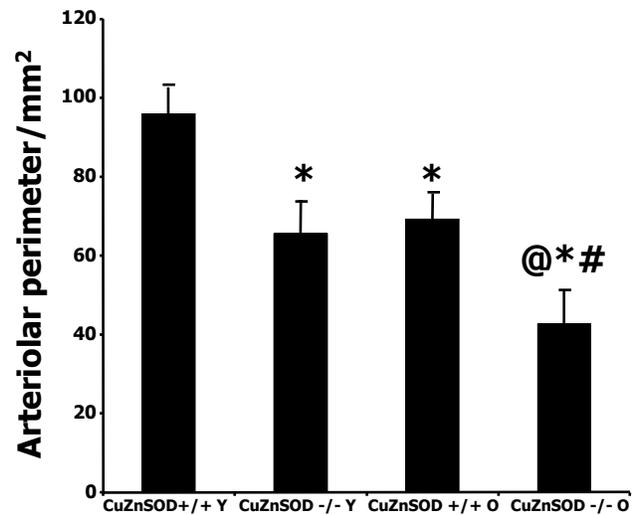
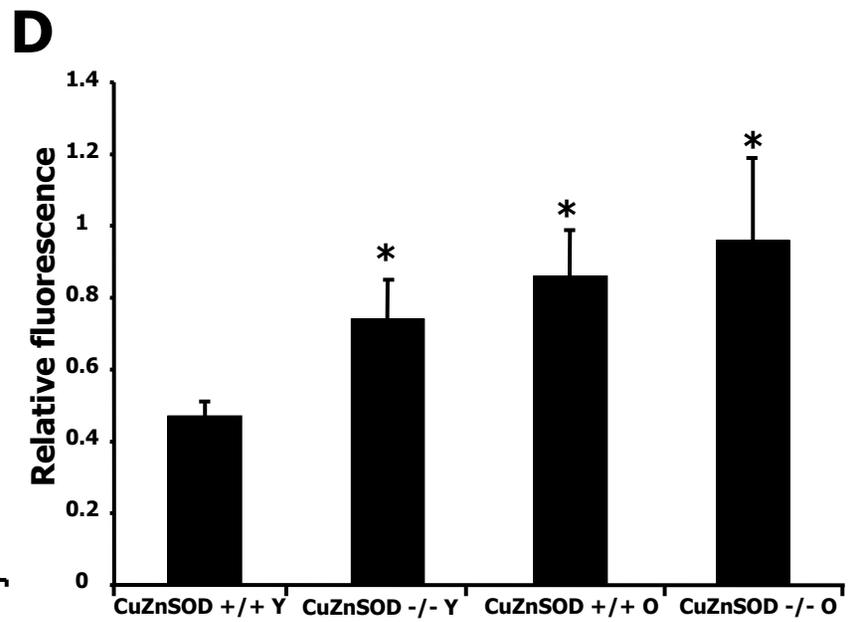
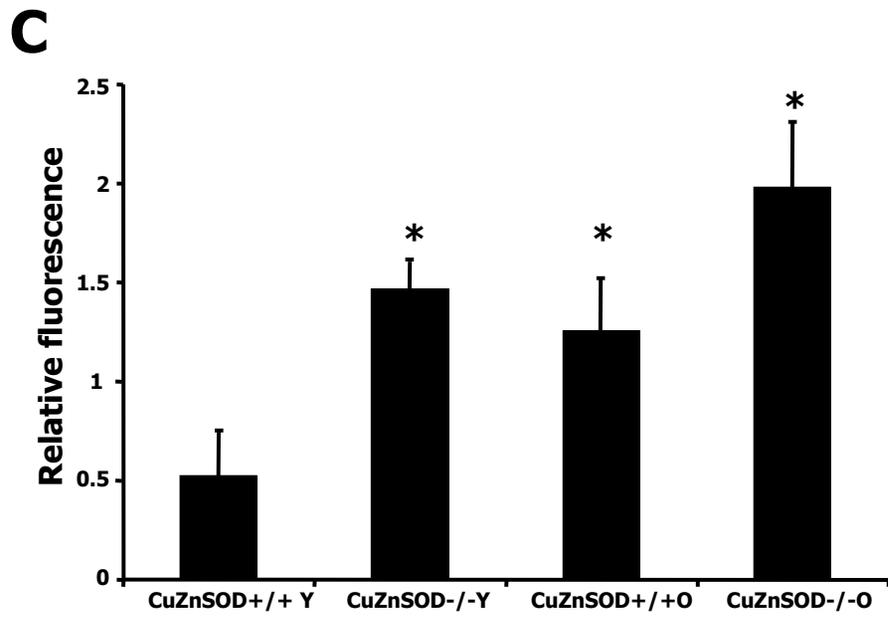
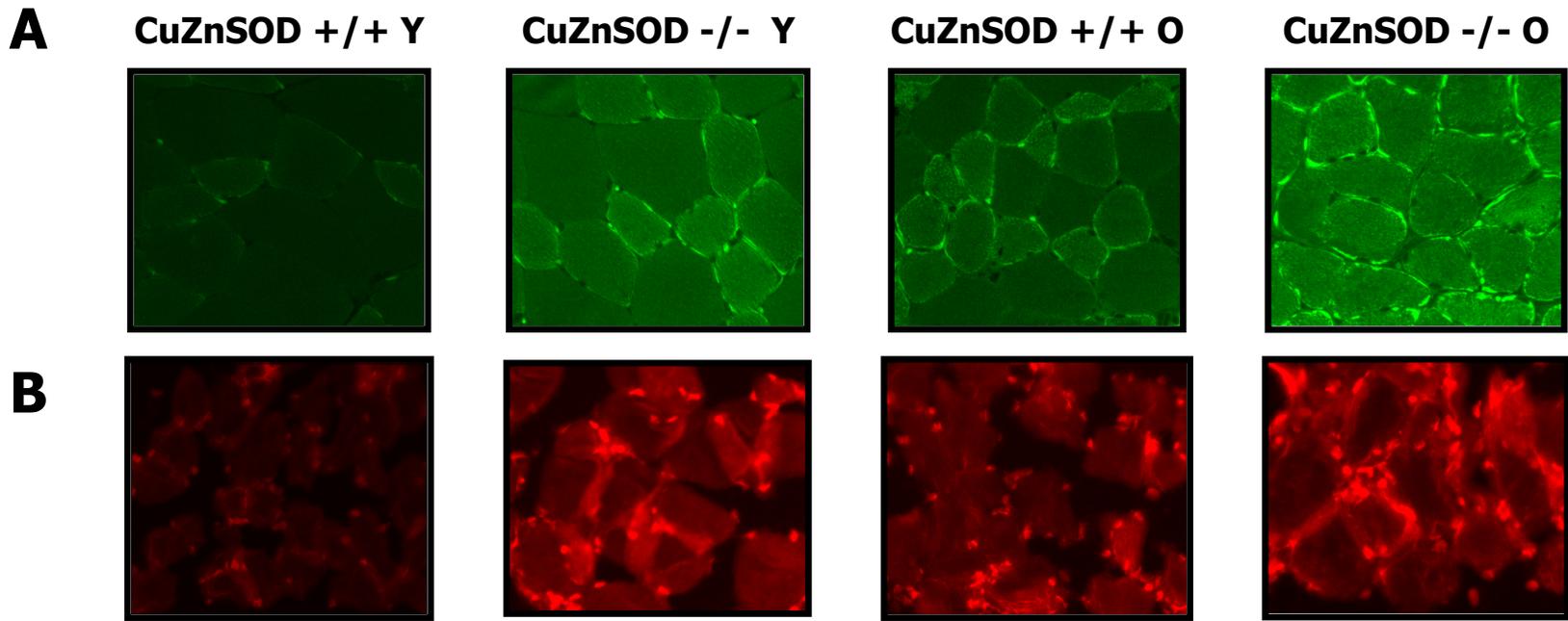


Figure 2



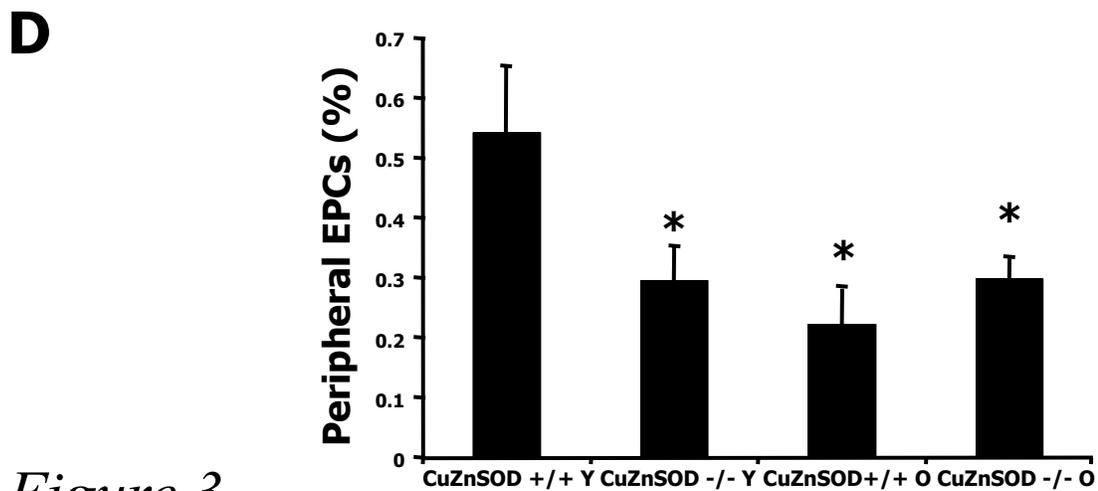
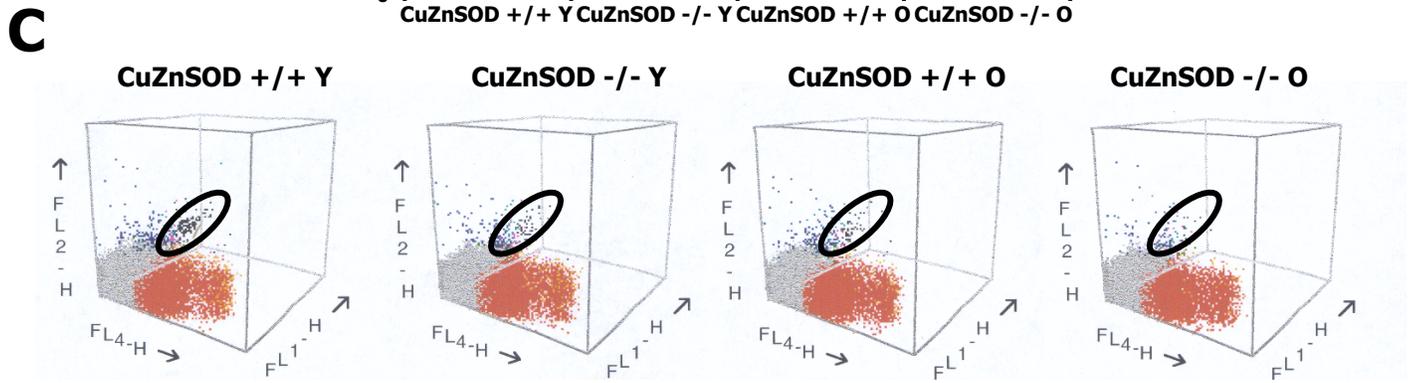
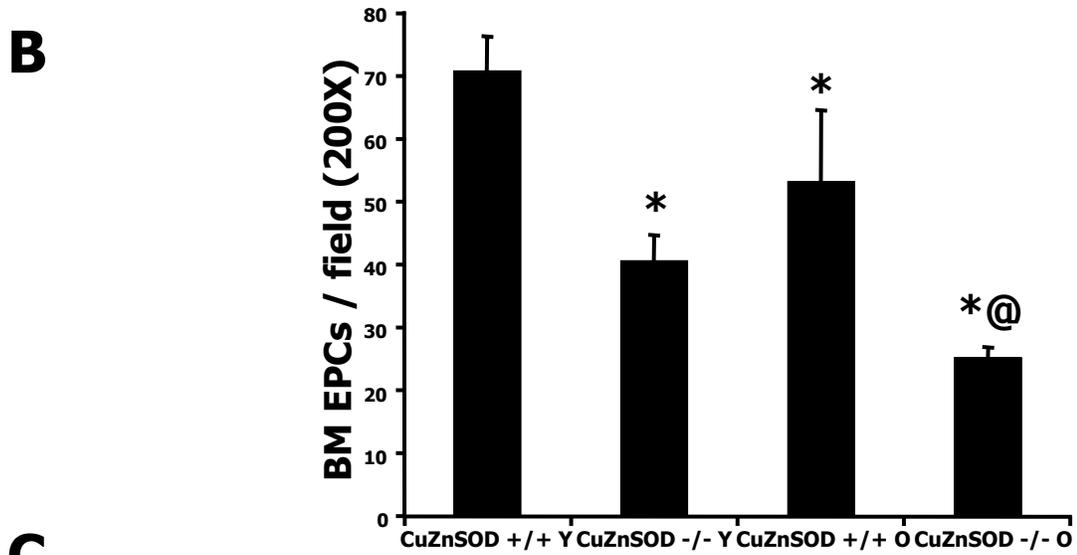
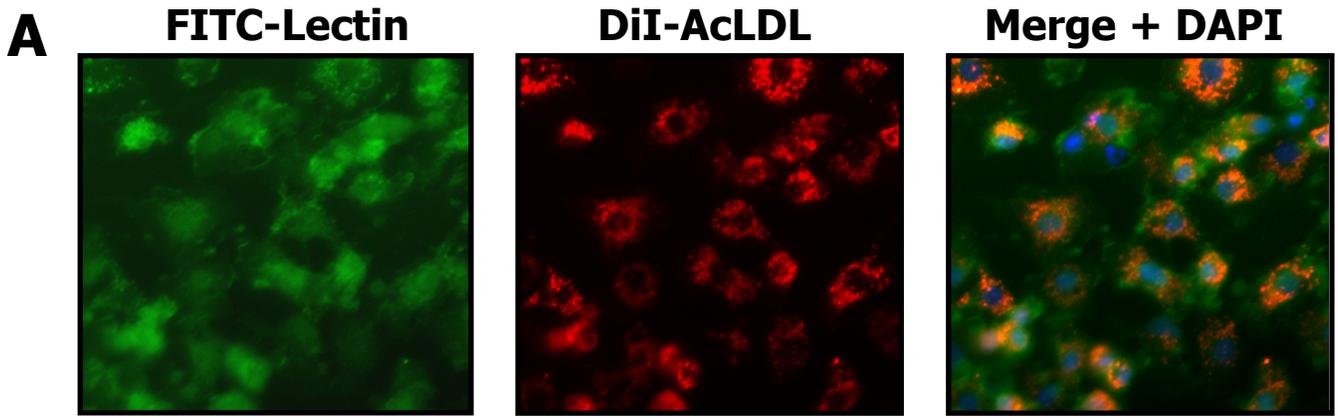


Figure 3

Figure 4

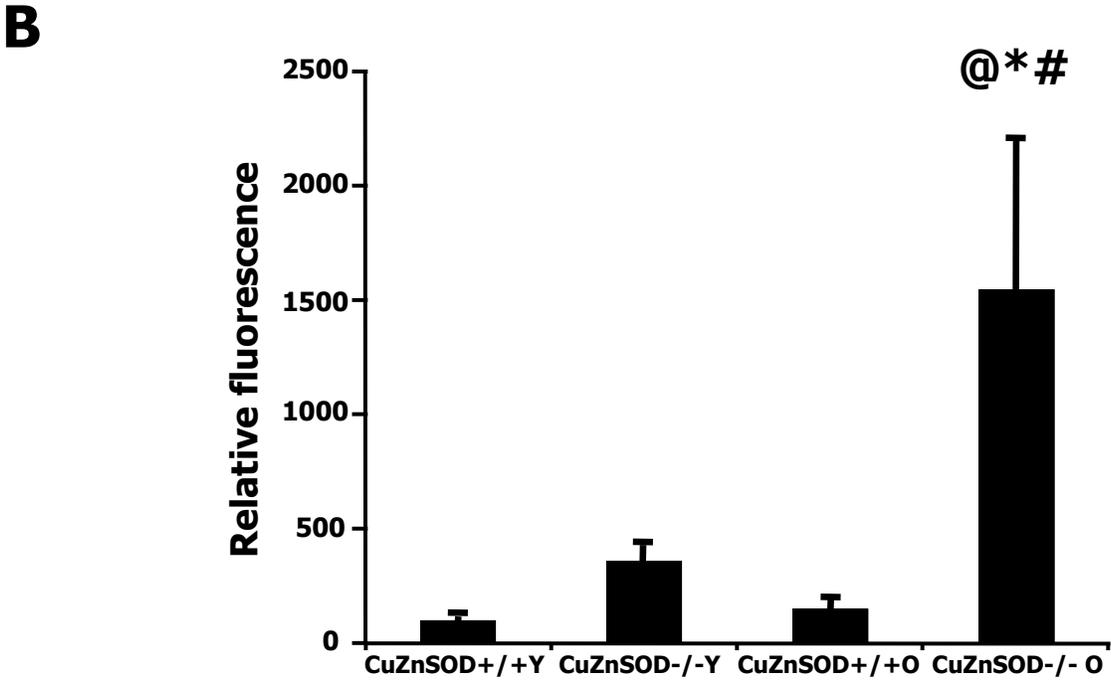
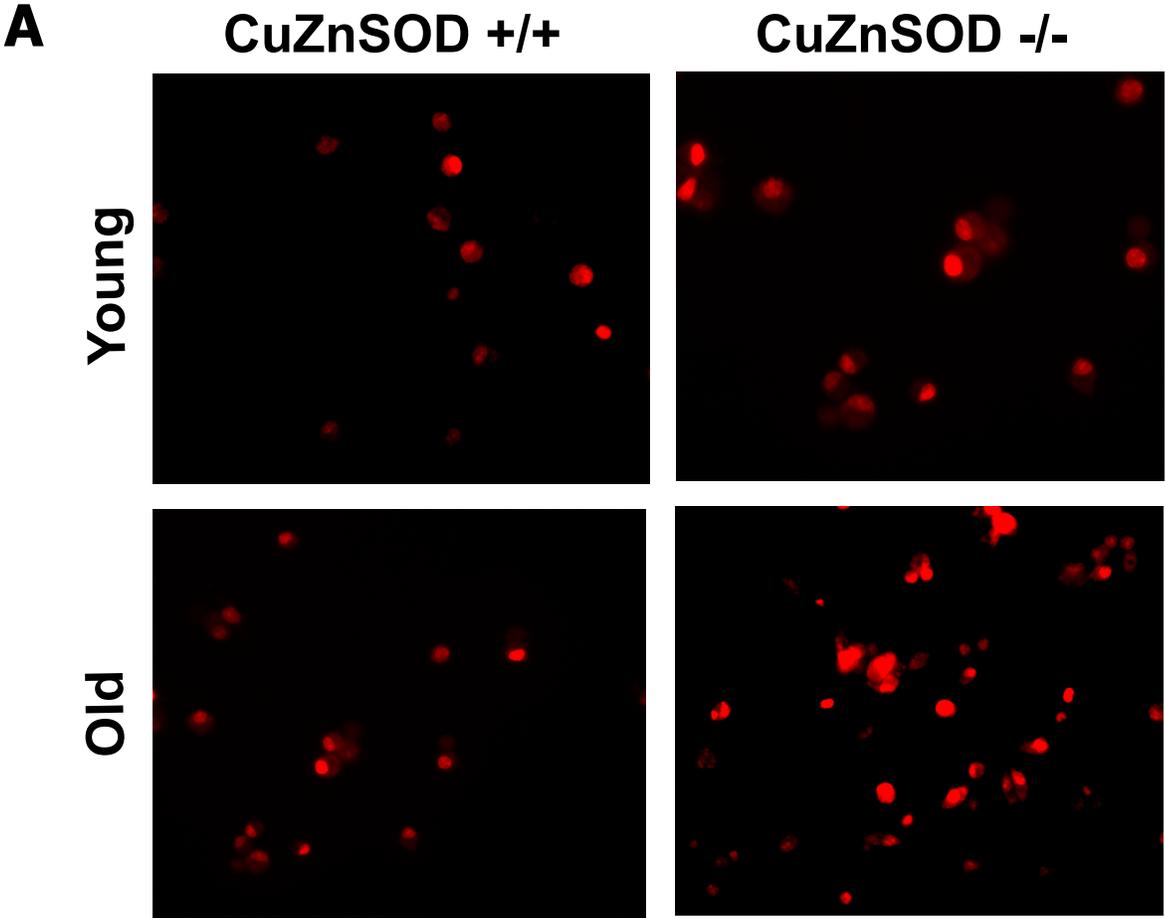
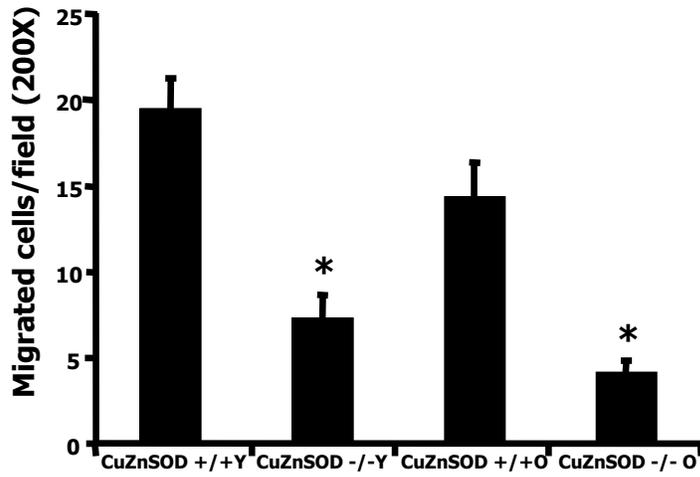
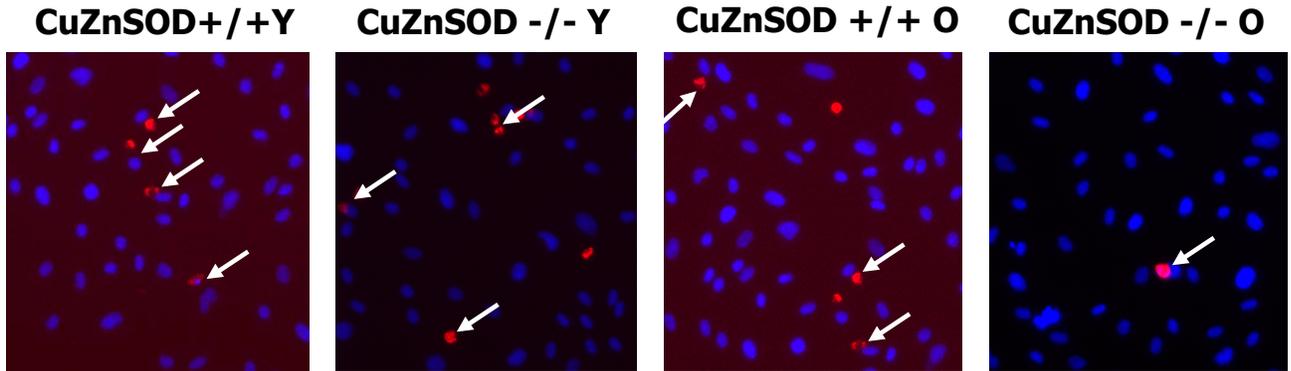


Figure 5

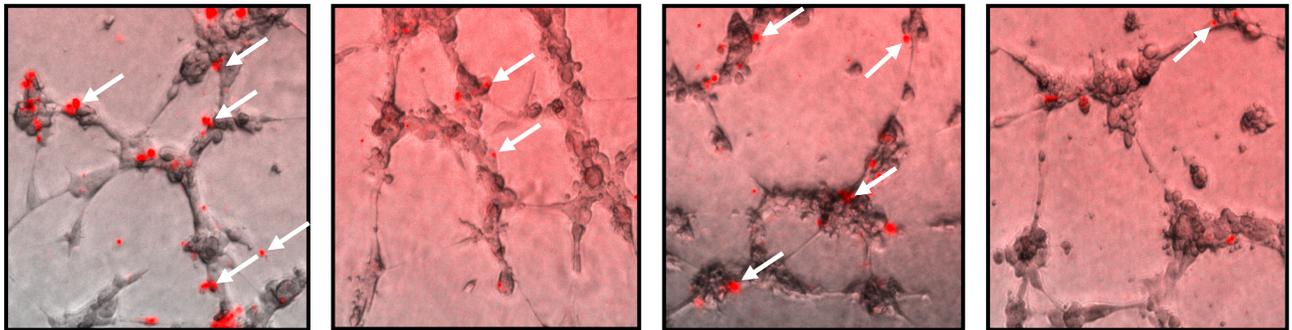
A



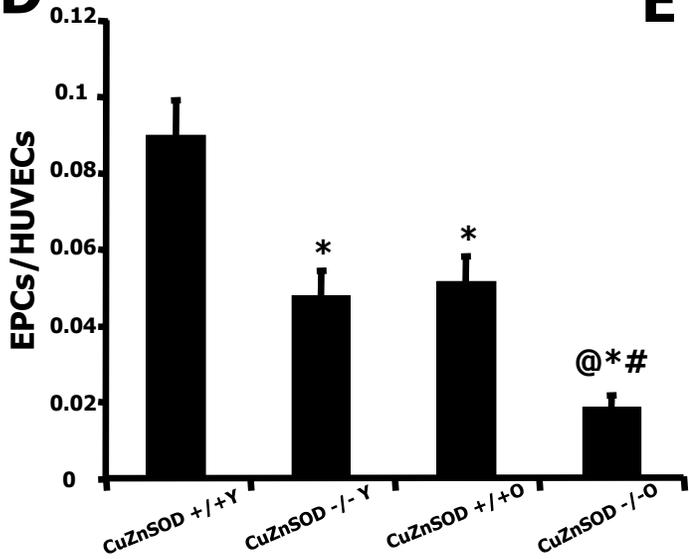
B



C



D



E

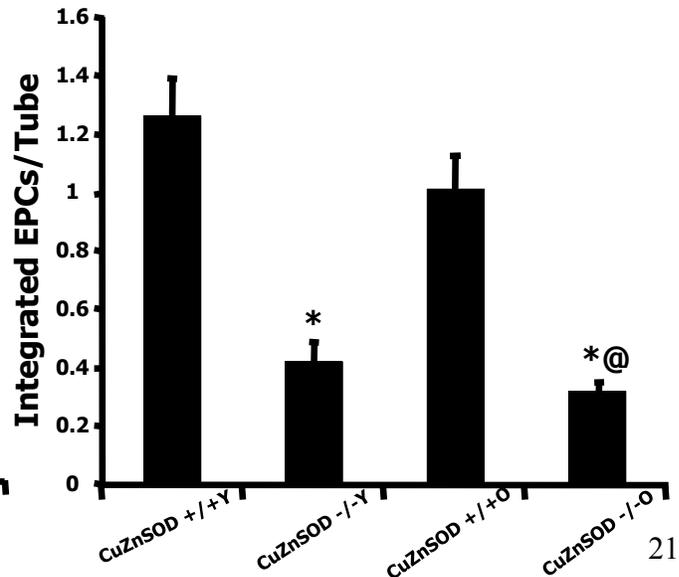


Figure S1.

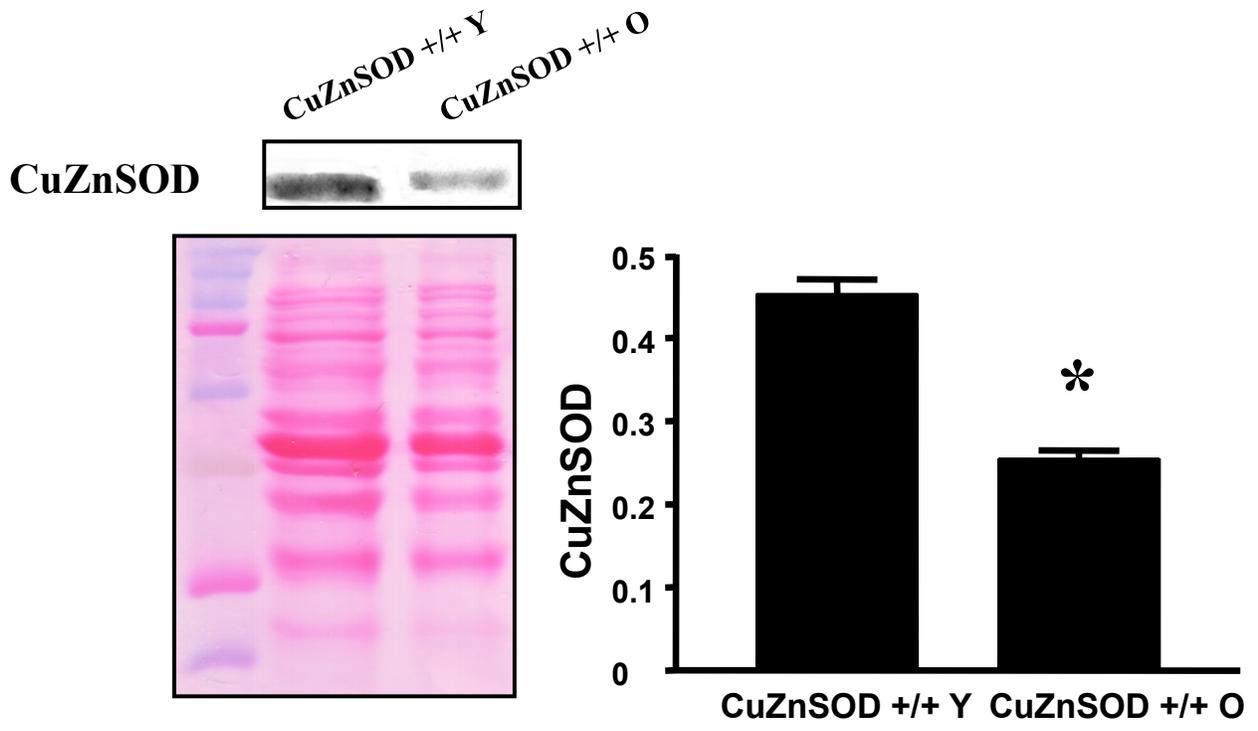
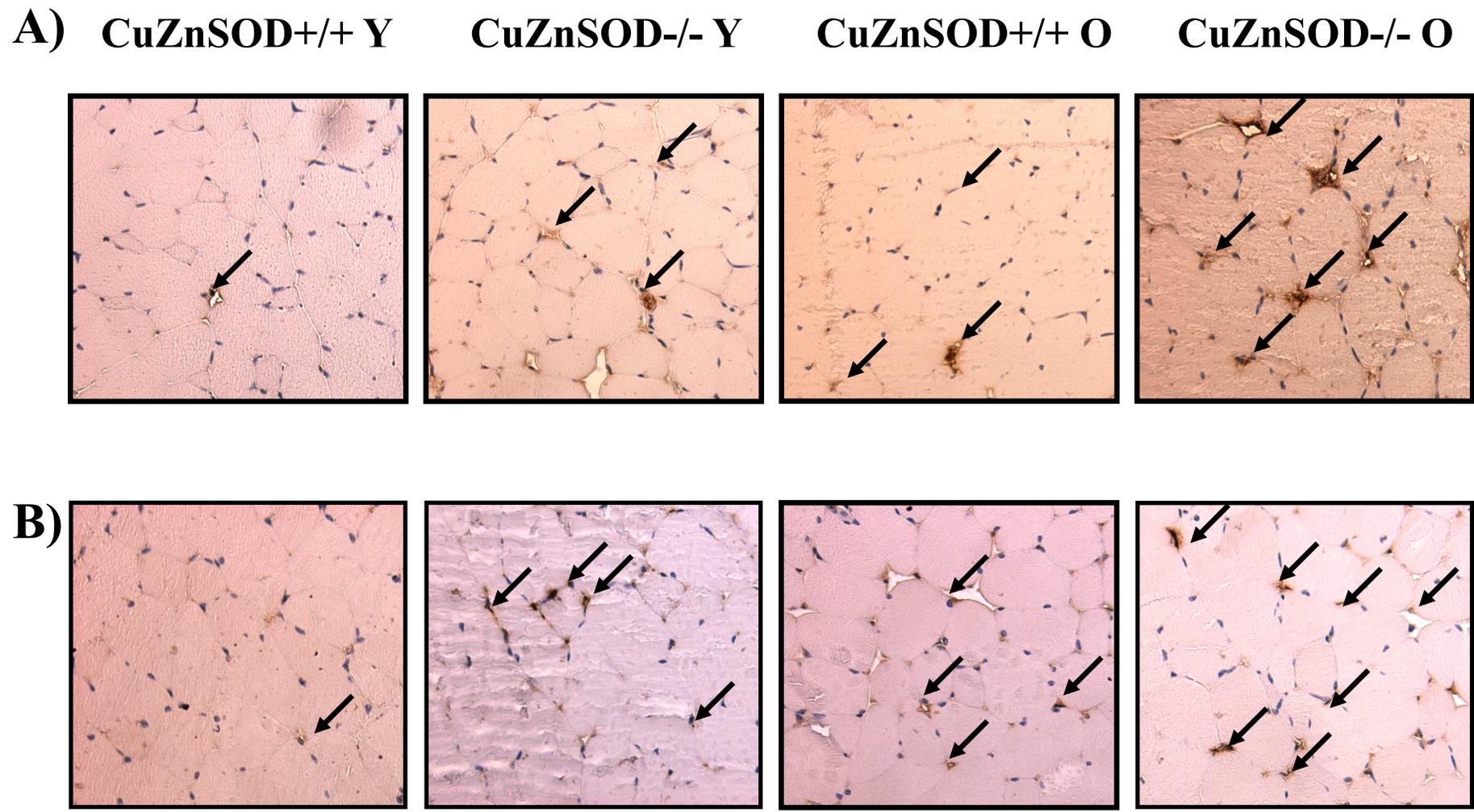


Figure S2.



11. Discussion

Le rôle du stress oxydant dans la néovascularisation est un sujet de controverse depuis plusieurs années. D'une part, des études ont démontré que les ROS augmentent l'angiogenèse. En effet, les ROS favorisent la migration, la prolifération, la réorganisation cytostructurale et la morphogenèse tubulaire des cellules endothéliales (Yasuda, Ohzeki et al. 1999; Stone and Collins 2002; Luczak, Balcerzyk et al. 2004). De plus, les facteurs angiogéniques tels que VEGF et Ang-1 induisent la migration et la prolifération des cellules endothéliales via une augmentation des ROS (Ushio-Fukai, Tang et al. 2002; Harfouche, Malak et al. 2005; Ikeda, Ushio-Fukai et al. 2005). D'autres études ont également démontré que l'absence de ROS diminue l'angiogenèse (Tojo, Ushio-Fukai et al. 2005).

D'autre part, plusieurs études ont démontré que des niveaux excessifs de ROS diminuent la néovascularisation. *In vitro*, l'administration de stress oxydant externe comme la fumée de cigarette ou de fortes concentrations de glucose diminue la capacité des cellules endothéliales à former un réseau tubulaire sur Matrigel (Michaud, Dussault et al. 2006; Chen, Lin et al. 2007). De même, des études *in vivo* ont démontré que la réduction de l'activité d'enzymes oxydantes telles que la NADPH oxydase et la xanthine oxydase a des effets bénéfiques sur les mécanismes pro-angiogéniques (Nijveldt, van Nood et al. 2001; Haddad, Dussault et al. 2009). En outre, l'administration d'antioxydants tels que les vitamines C et E, le probucol et le resvératrol favorise la néovascularisation en réponse à l'ischémie *in vivo* et augmente

la capacité angiogénique des cellules endothéliales *in vitro* (Lefevre, Michaud et al. 2007; Turgeon, Dussault et al. 2010). Dans ce contexte, l'éclaircissement du rôle des ROS dans la néovascularisation est nécessaire à une meilleure compréhension et, subséquemment, à l'élaboration de meilleurs traitements des maladies cardiovasculaires athérosclérotiques.

Les maladies cardiovasculaires athérosclérotiques et les facteurs de risque associés ont pour dénominateur commun l'augmentation des niveaux de stress oxydant. Cette augmentation de stress oxydant est corrélée à une diminution de la néovascularisation en réponse à l'ischémie. L'anion superoxyde est le principal oxydant retrouvé dans l'organisme, et c'est aussi le plus dommageable car il est hautement réactif avec l'ensemble des composantes cellulaires (protéines, lipides, ADN, etc.). Différentes études ont démontré que des niveaux élevés de superoxydes sont associés au développement de maladies chroniques comme l'Alzheimer, le lymphome de Hodgkin, les maladies pulmonaires congestives chroniques (COPD), l'hypertension et l'athérosclérose (Perez-Soler, Lopez-Berestein et al. 1985; McIntyre, Bohr et al. 1999; Collin, Busseuil et al. 2007; Marin-Corral, Minguella et al. 2009; Wu, Zhao et al. 2010).

L'enzyme CuZnSOD est essentielle pour la détoxification des anions superoxydes. L'importance de la CuZnSOD a été démontrée dans plusieurs situations cliniques où la diminution de l'activité antioxydante de cette enzyme est associée à une augmentation du stress oxydant global. Par exemple, l'exacerbation du stress oxydant causée par une déficience en CuZnSOD chez la souris se manifeste par une

augmentation des injures rénales dans le contexte d'une ischémie-reperfusion ou du diabète (DeRubertis, Craven et al. 2007; Yamanobe, Okada et al. 2007). De plus, la déficience en CuZnSOD est associée à des dysfonctions ovariennes, rétiniennes et hépatiques (Matzuk, Dionne et al. 1998; Uchiyama, Shimizu et al. 2006; Hashizume, Hirasawa et al. 2008). Enfin, les injures neuronales et la formation d'oedème post-ischémie cérébrale transitoire sont augmentées dans le modèle murin déficient en CuZnSOD (Kondo, Reaume et al. 1997; Kawase, Murakami et al. 1999). Néanmoins, au niveau du système cardiovasculaire, de précédentes études n'ont pas montré une altération significative de la fonction contractile du myocarde post-ischémie chez la souris hétérozygote pour CuZnSOD comparativement au modèle hétérozygote pour la MnSOD (Asimakis, Lick et al. 2002). Ceci suggère qu'une activité même partielle de la CuZnSOD est suffisante est nécessaire à la fonction vasculaire post-ischémie. Notre étude est donc la première à démontrer le rôle protecteur de la CuZnSOD dans la néovascularisation en réponse à l'ischémie.

La néovascularisation est le mécanisme par lequel l'organisme essaie de pallier à une ischémie tissulaire. L'ischémie est en général causée par une maladie athérosclérotique avancée, elle-même associée à différents facteurs de risque et à une augmentation du stress oxydant. Dans notre étude, nous avons étudié le rôle de la CuZnSOD dans un modèle murin déficient pour ce gène. Le premier modèle de souris génétiquement supprimé fut créé en 1989 par Evans, Cappechi et Smithies. Cette découverte leur valut le prix Nobel de Physiologie/Médecine en 2007. Les modèles invalidés génétiquement possèdent l'avantage de muter l'ensemble du génome pour un ou plusieurs gènes d'intérêt. Depuis 1989, la technique de

l'invalidation génétique a été utilisée dans la génération de milliers de modèles animaux différents qui sont devenus des outils indispensables dans la compréhension du génome humain et la pathophysiologie des maladies (Paigen 2003). Plus récemment, des équipes ont mis au point un modèle murin de déficience génétique dite conditionnelle, c'est-à-dire restreint à un tissu ou un type de cellules spécifiques (Rajewsky, Gu et al. 1996). Cette stratégie permet l'inhibition d'un gène au moment voulu et/ou dans un tissu donné sans interférer avec le développement normal de l'animal à l'âge adulte (Rajewsky, Gu et al. 1996).

Bien que le modèle de déficience génétique conditionnelle des cellules endothéliales pour CuZnSOD aurait pu être utilisé dans nos études, nous avons choisi l'invalidation génétique complète car nous pensons qu'il adresse mieux nos hypothèses de recherche. Tout d'abord, dans le processus d'angiogenèse, les cellules endothéliales ne sont pas le seul type cellulaire impliqué. Tel que précédemment discuté, les cellules musculaires lisses, les macrophages, les péricytes et les fibroblastes sont des exemples de cellules de soutien nécessaires au développement et à la stabilité des vaisseaux sanguins (voir section 6.1.4. à 6.1.6.). Le stress oxydant augmenté retrouvé dans tous les facteurs de risque cardiovasculaire est connu pour affecter plusieurs sous-types cellulaires dont les cellules endothéliales, les monocytes-macrophages, les VSMCs et les fibroblastes (Stocker and Keaney, 2004). Plusieurs équipes ont aussi démontré l'importance du microenvironnement dans le processus d'angiogenèse (Jung, Ahmad et al. 2000; Giordano and Johnson 2001). En effet, lors de la différenciation endothéliale, l'interaction de l'endothélium avec son environnement, c'est-à-dire des facteurs solubles et/ou des contacts cellules-cellules,

détermine le phénotype de l'endothélium. Des études ont démontré que les cellules endothéliales perdent les caractéristiques spécifiques du tissu ou de l'organe dans lequel elles ont été prélevées lorsque mises en culture (Borsum, Hagen et al. 1982; Augustin, Kozian et al. 1994). Nous pensons donc qu'une suppression génétique conventionnelle de la CuZnSOD nous permet de recréer au moins en partie un microenvironnement oxydant similaire à celui retrouvé chez des patients (Kregel and Zhang 2007; Harrison and Gongora 2009). Ensuite, l'invalidation génétique conditionnelle des cellules endothéliales matures pour CuZnSOD ne garantit pas un effet sur les cellules progénitrices endothéliales. En effet, la délétion conditionnelle d'un gène spécifique à un tissu ou à une cellule n'a pas nécessairement un impact sur la cellule souche lui ayant donné naissance (Bu, Gao et al. 2010). Donc, ce modèle pourrait être intéressant afin de dissocier l'impact de la vasculogénèse et de l'angiogénèse sur la récupération de néovascularisation. Cependant, nous voulions utiliser un modèle se rapprochant de la réalité des patients, c'est-à-dire une exacerbation du stress oxydant dans l'ensemble de l'organisme (cellules endothéliales mais également d'autres types cellulaires dont les macrophages, les érythrocytes et les cellules musculaires lisses) (Morikawa, Kadota et al. 2000; Kohen and Nyska 2002; de la Fuente, Hernanz et al. 2004; Khan, Pham et al. 2009). Enfin, plusieurs études ont soulevé le fait que plusieurs modèles de délétions génétiques conventionnelles développent des mécanismes compensatoires à leur délétion génique (Rajewsky, Gu et al. 1996). Si tel est le cas, nous n'avons pas observé de mécanismes enzymatiques compensatoires chez nos souris. Mis à part une longévité diminuée, les souris déficientes pour CuZnSOD se sont développées et comportées

normalement tout au long de l'expérimentation comparativement à des souris normales contrôles.

Afin d'étudier le rôle de la CuZnSOD dans la néovascularisation, nous avons utilisé un modèle bien défini de l'ischémie du membre inférieur. Ce modèle est couramment utilisé et reproductible (Fukai, Folz et al. 2002; Galasso, Schiekofer et al. 2006; Crawford, Hashmi et al. 2007; Ohashi, Ouchi et al. 2009). De plus, ce modèle permet d'obtenir des résultats semblables aux observations faites chez l'humain lors de complications des maladies athérosclérotiques (Couffinhal, Dufourcq et al. 2009). Le modèle d'ischémie de la patte est un modèle complexe car la réponse anatomique à l'ischémie du membre inférieur est plurifactorielle (Shireman, 2007). En effet, dans la région d'ischémie sévère (sous le genou), la nécrose musculaire est accompagnée d'une activité inflammatoire, d'angiogenèse et de réparation musculaire (Shireman, 2007).

Mes résultats démontrent que l'absence de CuZnSOD diminue la néovascularisation en réponse à l'ischémie. Cette diminution de la perfusion sanguine est corrélée à une diminution significative de la densité capillaire et artériolaire dans les tissus ischémiques déficients en CuZnSOD. Nos résultats démontrent que la diminution du flot sanguin et de la densité vasculaire sont associées à une augmentation du stress oxydant mesuré au site d'ischémie (muscle) et dans l'ensemble de l'organisme (plasma). Ces résultats vont donc dans le même sens que de précédentes études ayant utilisé des modèles murins déficients pour la GPx-1 ou la ecSOD qui ont démontré qu'une augmentation des niveaux de stress oxydant diminue

la néovascularisation en réponse à l'ischémie (Galasso, Schiekofer et al. 2006; Kim, Lin et al. 2007).

En résumé, un niveau basal de ROS est nécessaire à la néovascularisation. Cependant, une quantité excessive de ROS diminue cette même néovascularisation. Ainsi, le contrôle des niveaux de stress oxydant est un facteur important pour la modulation de la néovascularisation post-ischémie.

Tel que mentionné précédemment, l'infiltrat inflammatoire et l'angiogenèse apparaissent en présence de nécrose tissulaire dans le modèle d'ischémie de la patte (Scholz, Ziegelhoeffer et al. 2002; Shireman, Contreras-Shannon et al. 2006). Nous avons démontré que les souris déficientes en CuZnSOD possèdent un score ischémique supérieur aux souris contrôles, c'est-à-dire qu'elles ont tendance à développer de la nécrose tissulaire au niveau du membre ischémique. Cette augmentation de la nécrose en partie causée par une diminution de la néovascularisation, pourrait également être secondaire à une exacerbation de l'inflammation locale. L'inflammation est un phénomène complexe caractérisé par l'activation des macrophages (Marikovsky, Ziv et al. 2003). Les macrophages activés favorisent la résolution de l'inflammation et de l'ischémie en contribuant à la néovascularisation (voir section 6.) Des études ont démontré que l'inhibition de la CuZnSOD chez le macrophage diminue la relâche de TNF-alpha, VEGF, MMP-2 et MMP-9 (Marikovsky, Ziv et al. 2003). L'inhibition de la sécrétion de ces facteurs a pour effet d'augmenter les niveaux de stress oxydant, d'arrêter la croissance des cellules endothéliales et d'inhiber l'angiogenèse induite par les macrophages ce qui

pourrait expliquer en partie la diminution de la néovascularisation observée chez nos souris déficientes en CuZnSOD (Marikovsky, Nevo et al. 2002; Marikovsky, Ziv et al. 2003). De futures études sont cependant nécessaires à l'éclaircissement du rôle de l'inflammation et des macrophages dans la résolution de l'ischémie du membre inférieur chez la souris déficiente en CuZnSOD.

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer la diminution de la néovascularisation suite à un stress oxydant augmenté. Entre autres, des études ont démontré que le stress oxydant cause une diminution de la sécrétion et de la réponse à certains facteurs de croissance tel que VEGF par les cellules endothéliales matures (el-Remessy, Bartoli et al. 2005; Michaud, Dussault et al. 2006). Même si nous n'avons pas documenté une diminution des niveaux de VEGF (résultats non-publiés), une diminution de l'action de VEGF et/ou de VEGFR-2 pourrait potentiellement expliquer une partie de la dysfonction angiogénique observée en absence de CuZnSOD. De même, une diminution de la sécrétion du VEGF par les macrophages causée par une absence de CuZnSOD et une augmentation du stress oxydant pourrait également être en cause dans la diminution de la néovascularisation observée chez les souris déficientes en CuZnSOD (Marikovsky, Ziv et al. 2003).

Un autre mécanisme potentiel expliquant le rôle protecteur de la CuZnSOD dans nos études est la conservation de la biodisponibilité du NO. Dans notre modèle, la concentration élevée de stress oxydant (et particulièrement de superoxydes) causée par une absence de CuZnSOD est associée à une diminution de la biodisponibilité du NO. Le NO est connu comme un facteur essentiel pour le maintien de l'homéostasie

vasculaire. Des études ont démontré que l'absence de eNOS diminue l'angiogenèse en réponse à l'ischémie (Murohara, Asahara et al. 1998; Gigante, Morlino et al. 2006). En contraste, la supplémentation en donneurs de NO ou en L-arginine permet l'accélération de l'angiogenèse (Ziche, Morbidelli et al. 1994; Murohara, Asahara et al. 1998). Ainsi, la baisse de la biodisponibilité du NO cause la dysfonction endothéliale et serait au moins en partie responsable de la réduction d'angiogenèse chez la souris déficiente en CuZnSOD.

Le NO est également connu pour son grand pouvoir vasodilatateur (Joyner and Diez, 1997). En effet, la production de NO par les cellules endothéliales initie une cascade de relaxation des cellules musculaires lisses vasculaires via l'activation de la voie cGMP (Grange, Isotani et al. 2001). La diminution du tonus vasculaire provoque une vasodilatation et une augmentation du flot sanguin favorables à la néovascularisation (Lincoln, Cornwell et al. 1996). Le NO garde également les cellules musculaires lisses dans un état non-prolifératif (Jeremy, Rowe et al. 1999). Ainsi, la diminution de la production de NO subséquente à une dysfonction endothéliale favorise la prolifération des cellules musculaires lisses et leur accumulation dans la couche néointimale (Jeremy, Rowe et al. 1999). Ce remodelage vasculaire rend le vaisseau moins compliant au changement de pression sanguine (Owens, Rabinovitch et al. 1981). Puisque nous avons observé une diminution de la biodisponibilité du NO chez les souris déficientes en CuZnSOD une augmentation de la pression sanguine chez ces animaux aurait pu expliquer partiellement la diminution de la néovascularisation observée. Cependant, nous avons démontré que les souris déficientes en CuZnSOD ne présentent pas d'hypertension comparativement aux

souris contrôles. Par contre, la forte diminution de l'angiogenèse chez les souris déficientes en CuZnSOD pourrait être expliquée par le fait que les cellules musculaires lisses peuvent également sécréter du VEGF lorsque stimulées par le NO (Dulak, Jozkowicz et al. 2000). Ainsi, le NO ne favorise-t-il pas uniquement l'homéostasie vasculaire en gardant les cellules musculaires lisses dans un état stable mais il favorise également la survie de l'endothélium via une boucle autocrine de sécrétion du VEGF par les cellules musculaires lisses (Dulak and Jozkowicz, 2002). Une diminution de la biodisponibilité du NO chez nos souris déficientes pour CuZnSOD pourrait donc résulter, en partie, d'une exacerbation de la dysfonction endothéliale via la perte de sécrétion de VEGF par les cellules musculaires lisses.

Nous avons également observé que la diminution de la biodisponibilité du NO systémique était associée à une augmentation des niveaux de peroxydites au niveau des tissus ischémiques. De précédentes études ont démontré qu'une diminution de la biodisponibilité du NO pouvait être attribuable à la réaction de cette molécule avec une grande quantité d'anions superoxydes. Tel que discuté précédemment, les anions superoxydes réagissent plus rapidement avec le NO qu'avec la superoxyde dismutase, ce qui engendre subséquemment la formation de peroxydites.

Afin de mieux expliquer la diminution de néovascularisation observée chez les souris déficientes en CuZnSOD *in vivo*, nous nous sommes penchés sur des mécanismes cellulaires potentiels *in vitro*. De récentes études ont démontré l'importance des EPCs dans la vasculogenèse post-natale et la réparation d'injures vasculaires (Wyler von Ballmoos, Yang et al. 2010; Yang, von Ballmoos et al. 2010).

Par ailleurs, Dernbach et al. ont démontré que les EPCs ont une plus grande résistance au stress oxydant que les cellules endothéliales matures. Cette résistance est partiellement expliquée par la surexpression de certaines enzymes antioxydantes dont la catalase, la Gpx-1 et la MnSOD (Dernbach, Urbich et al. 2004). De plus, une augmentation de l'activité et de l'expression de l'ARN messenger de la CuZnSOD a été observée chez des EPCs exposées à des fibres de stress ou à de fortes concentrations de glucose (Tao, Yang et al. 2007; Hamed, Brenner et al. 2009). Ceci suggère que l'activité de l'enzyme CuZnSOD joue un rôle dans la réponse au stress des EPCs.

Les résultats de notre première étude ont démontré que l'augmentation du stress oxydant causée par une déficience en CuZnSOD résulte en une réduction du nombre et de l'activité fonctionnelle des EPCs. D'une part, la diminution du nombre total de EPCs est retrouvée au niveau de la moelle osseuse des souris déficientes en CuZnSOD. D'autre part, nous observons également une diminution du nombre de EPCs périphériques isolées de la rate de souris déficientes en CuZnSOD. Cette diminution peut être partiellement expliquée soit par la déplétion de la réserve des EPCs retrouvée dans la moelle osseuse de souris déficientes en CuZnSOD soit par une défectuosité dans la mobilisation des EPCs lorsque la CuZnSOD est absente. En effet, les EPCs isolées de la rate sont un indicateur des EPCs libérées de la moelle osseuse vers la circulation. De précédentes études ont démontré que l'ischémie favorise la mobilisation des EPCs de la moelle osseuse vers le site d'injure (Takahashi, Kalka et al. 1999). Cependant, d'autres études sont nécessaires afin de

déterminer le rôle de la CuZnSOD dans la défectuosité de mobilisation des EPCs de la moelle osseuse vers la périphérie.

Des études ont démontré l'importance du NO dans la mobilisation et la migration des EPCs vers le site d'injure (Laufs, Werner et al. 2004). En effet, les souris déficientes pour eNOS, présentent une diminution de la mobilisation des EPCs provenant de la moelle osseuse (Aicher, Heeschen et al. 2003). Chez la souris déficiente en CuZnSOD, nous avons observé une diminution de la biodisponibilité systémique du NO pouvant au moins en partie expliquer le défaut de mobilisation des EPCs déficients en CuZnSOD. De plus, lorsque mises en culture, les EPCs isolées de la moelle osseuse de souris déficientes en CuZnSOD ont une capacité réduite à migrer vers un stimulus angiogénique tel que VEGF. Ces cellules ont également une capacité diminuée d'adhérer à une monocouche de cellules endothéliales matures. Ce phénomène a précédemment été décrit dans la littérature, où une diminution de l'adhésion et de la migration des EPCs en condition de stress oxydant exacerbé a été observée (Michaud, Dussault et al. 2006). Ces altérations fonctionnelles peuvent être entre autres attribuées à une diminution de la biodisponibilité du NO et une diminution de l'expression de certaines intégrines d'adhésion (Michaud, Dussault et al. 2006). De manière intéressante, nous avons démontré que les EPCs isolées des souris déficientes en CuZnSOD présentent une diminution de l'activité de la eNOS et de la quantité de NO sécrété.

Nous avons également observé que les EPCs déficientes en CuZnSOD présentent un défaut d'incorporation dans un réseau tubulaire de cellules

endothéliales matures. Ceci suggère que bien que certaines cellules réussissent à se mobiliser au site d'ischémie, elles seront incapables de former de nouveaux vaisseaux sanguins. Le défaut d'incorporation des EPCs dans un réseau tubulaire pourrait être partiellement causée par une perte d'intégrines d'adhésion causée par une diminution de la biodisponibilité du NO (Michaud, Dussault et al. 2006). Des études ont également suggéré que l'exposition chronique des EPCs au stress oxydant diminue les capacités fonctionnelles des EPCs par l'activation de la voie p38-kinase; une voie de sénescence cellulaire (Imanishi, Tsujioka et al. 2008). De plus, la diminution de la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques tel que le NO par les EPCs déficientes en CuZnSOD pourrait réduire la stimulation de la réparation vasculaire par les cellules endothéliales matures *in situ*.

Bref, la CuZnSOD semble avoir une importance clé dans la préservation du nombre et de l'activité fonctionnelle des EPCs. Des études ont suggéré que les EPCs pourraient être constitutivement résistantes au stress oxydant (He, Peterson et al. 2004). Dernbach et al. ont rapporté que les EPCs sont résistantes au stress oxydant ce qui favorise la réparation des vaisseaux endommagés et des tissus ischémiques (Dernbach, Urbich et al. 2004). En fait, des études *in vitro* ont démontré que les EPCs expriment de hauts niveaux de MnSOD et de Gpx-1 (Blokhina, Virolainen et al. 2003; Dernbach, Urbich et al. 2004). Nous sommes cependant les premiers à confirmer le rôle protecteur de la CuZnSOD contre la dysfonction endothéliale, l'altération de la néovascularisation et la perte de fonction des EPCs en situation de stress oxydant augmenté.

Nos résultats nous ont également permis d'identifier au moins deux mécanismes potentiels de la dysfonction des EPCs déficientes en CuZnSOD. Tout d'abord, l'absence de CuZnSOD semble rendre les EPCs moins résistantes au stress oxydant ce qui diminue leurs activités fonctionnelles. Ensuite, la diminution de la biodisponibilité du NO chez la souris déficiente en CuZnSOD peut également avoir un impact négatif sur la capacité fonctionnelle de ces mêmes cellules. Pour confirmer nos hypothèses, nous avons donc tenté de restaurer la fonction des EPCs déficientes en CuZnSOD. Pour ce faire, nous avons traité des EPCs isolés de la moelle osseuse de souris déficientes pour CuZnSOD avec un antioxydant qui mime les effets des superoxydes dismutases (Tempol) ou avec un donneur de NO (nitroprusside de sodium). Dans les deux cas, nous avons observé une amélioration significative de la fonction des EPCs, suggérant que l'état dysfonctionnel de ces cellules est réversible. Ces résultats constituent l'une des forces de nos études car ils nous permettent de confirmer les mécanismes que nous pensions responsables de la dysfonction des EPCs en absence de CuZnSOD et d'envisager de futurs traitements pour les patients. En effet, nous pouvons imaginer qu'il serait intéressant d'isoler des EPCs de patients athérosclérotiques, de les traiter avec un antioxydant ou un donneur de NO et de les réintroduire chez ces mêmes patients afin d'améliorer leur potentiel de néovascularisation. Cependant, la réintroduction de cellules traitées *in vitro* dans l'organisme ne garantit pas l'efficacité de ces cellules à long terme. L'effet positif pourrait être transitoire dans un milieu contrôlé (*in vitro*) mais pourrait ne pas être efficace dans un environnement plus hostile (*in vivo*). D'autres études sont donc nécessaires pour adresser ce point.

Après avoir éclairci les mécanismes responsables des dysfonctions observées chez les EPCs déficientes en CuZnSOD, nous avons voulu confirmer le rôle des EPCs dans le défaut de néovascularisation des souris déficientes en CuZnSOD. Pour ce faire, nous avons utilisé des expériences de thérapies cellulaires. Les thérapies cellulaires expérimentales sont généralement effectuées via la transplantation des cellules mononucléées de la moelle osseuse complète ou via la transplantation d'une fraction sélectionnée de cellules de la moelle osseuse (Niimi 2009). Plusieurs études ont utilisé la transplantation de cellules mononucléées isolées de moelle osseuse pour récupérer divers états pathologiques (Leblond A 2009; Yoon, Koyanagi et al. 2010; Cox, Baumgartner et al. 2011). Cependant, l'injection de toutes les cellules mononucléées de la moelle osseuse ne permet pas de connaître avec certitude le contenu exact ni les proportions de chaque type cellulaire impliqué. Par ailleurs, les études ayant utilisé les cellules mononucléées de la moelle osseuse ne permettent pas de conclure avec certitude de l'efficacité de cette méthode puisque les résultats obtenus varient énormément (Balsam, Wagers et al. 2004; Murry, Soonpaa et al. 2004; Pittenger and Martin 2004). De plus, certaines études ont transplantés une quantité de cellules chez l'animal difficile à extrapoler chez l'humain de par la rareté et l'impossibilité d'expandre les cellules mononucléées de la moelle osseuse *ex vivo* (Gnecchi, Zhang et al. 2008).

Afin de pallier aux problèmes soulevés par une transplantation de cellules mononucléées complète, notre projet propose une infusion de cellules souches de type «thérapie cellulaire sélectionnée». L'utilisation des cellules d'intérêts seulement et non de la moelle osseuse totale comporte plusieurs avantages. Tout d'abord, la

quantité de cellules à injecter est beaucoup plus faible. Ensuite, la pureté et la quantité d'une population cellulaire injectée est connue. De plus, la sélection d'un type cellulaire spécifique à la nature de l'injure est possible (Gnecchi, Zhang et al. 2008). Enfin, des injections ciblées aux tissus endommagés sont également possibles (Edelberg, Tang et al. 2002).

Nous avons traité les souris déficientes en CuZnSOD avec une fraction des cellules de la moelle osseuse fraîchement sélectionnée par bille magnétique: les cellules progénitrices CD117 positives. La fraction isolée de cellules progénitrices CD117 positives représentent environ 3% du total des cellules mononuclées isolées de la moelle osseuse (résultats non-publiés). Ces proportions sont d'ailleurs gardées à la fois chez l'humain et chez la souris (Sperling, Shwartz et al.1997; Li, Hamano et al. 2006). Des études ont démontré que les cellules CD117⁺ injectées dans un modèle murin d'ischémie survivent bien et s'intègrent au site d'injure en se différenciant en cellules endothéliales matures (Li, Hamano et al. 2003). De plus, des études ont démontré l'importance d'injecter des cellules CD117 fraîchement isolées car l'expansion de ces cellules en culture leur fait perdre leur phénotype pro-angiogénique (Li, Hayashi et al. 2004). Enfin, les EPCs CD117⁺ injectées au site d'intérêt ont démontré leur capacité à stimuler la néovascularisation *in situ* particulièrement via des mécanismes paracrins (Krenning, van Luyn et al. 2009).

Tel que discuté précédemment dans la section 6.4.3., la définition précise d'une EPCs reste encore controversée à la fois parce que les méthodes d'isolation de ces cellules sont différentes, et parce que les marqueurs utilisés afin de les

caractériser sont également différents. Il est cependant généralement accepté dans la littérature que les EPCs humaines sont $CD34^+CD133^+VEGFR2^+$ et les EPCs murines sont $CD34^+CD117^+VEGFR2^+$ (Kauser 2007) (Aird 2007). En accord avec les découvertes initiales d'Asahara, les premières thérapies cellulaires tentées chez l'humain furent exécutées avec des cellules $CD34^+$ isolées du sang périphérique (Michallet, Philip et al. 2000; Iwasaki, Kawamoto et al. 2006). Dans un modèle murin, l'utilisation du sang périphérique comme source thérapeutique de cellules progénitrices est limitée par la quantité de sang disponible pour l'isolation de ces cellules. C'est pourquoi nous avons préféré utiliser la moelle osseuse comme source de cellules progénitrices endothéliales. De récentes études ont démontré que la sélection de cellules $CD34^+$ n'était pas essentielle puisque la sous-population de cellules $CD117^+/CD34^-$ régénère automatiquement dans les proportions gardées la fraction $CD117^+/CD34^+$ normalement retrouvée dans l'organisme (Nakamura, Ando et al. 1999; Sato, Laver et al. 1999). De plus, le marqueur CD117 est maintenant accepté comme un marqueur alternatif à CD34 puisque CD117 n'est pas exprimé par les cellules endothéliales matures alors que l'expression de CD34 est conservée durant le processus de différenciation (Asahara and Kawamoto 2004). Par ailleurs, des études ont démontré que les cellules souches et progénitrices perdent rapidement l'expression de CD117 lorsqu'elles se différencient en cellules endothéliales matures (Miraglia, Godfrey et al. 1997; Yin, Miraglia et al. 1997).

Nos résultats démontrent que les souris déficientes pour CuZnSOD recevant une thérapie cellulaire des EPCs $CD117^+$ isolées de souris contrôles ont eu une nette amélioration de leur néovascularisation post-ischémique qui se traduit par une

augmentation de la perfusion sanguine et une augmentation de la densité capillaire et artériolaire. Les EPCs infusées doivent cependant être saines car l'injection des EPCs dérivées de souris déficientes en CuZnSOD ne peut améliorer le défaut angiogénique des souris receveuses. Ces observations suggèrent que le nombre mais également la fonction des EPCs ont un rôle à jouer dans la défektivité néovasculaire en réponse à l'ischémie. Bref, une autre force de notre papier est donc la récupération du phénotype angiogénique des souris déficientes en CuZnSOD par une thérapie cellulaire, ce qui confirme le rôle protecteur de la CuZnSOD dans les EPCs et l'implication des EPCs dans la néovascularisation en réponse à l'ischémie. Malgré les controverses existantes sur la définition d'une cellule progénitrice endothéliale, nous avons clairement démontré le potentiel pro-angiogénique des cellules utilisées. De plus, nous pensons qu'au-delà du nom ou des marqueurs, les cellules progénitrices endothéliales doivent ultimement posséder une capacité de réparation des dommages vasculaires, ce que nous avons démontré.

Nous avons précédemment mentionné que le stress oxydant est le lien commun à tous les facteurs de risque cardiovasculaire. De tous facteurs de risque, le vieillissement pourrait faire partie d'une classe à part. En effet, en plus d'être un facteur de risque incontrôlable, le vieillissement augmente le risque de développer d'autres facteurs de risque cardiovasculaire tels que l'hypertension, l'hypercholestérolémie et le diabète de type II (Nilsson, Boutouyrie et al. 2009). De plus, le vieillissement confère des changements phénotypiques qui rendent le système cardiovasculaire plus susceptible aux maladies, et ce même en absence des facteurs de risque traditionnels (hypertension, diabète, tabagisme) (Ungvari, Kaley et al.

2010). Enfin, l'âge reste à ce jour un facteur irréversible dont les effets néfastes sont visibles même chez les sujets sains sans aucun autre facteur de risque (Hoenig, Bianchi et al. 2008).

L'âge est associé à une diminution de l'ensemble des fonctions systémiques car l'organisme vieillissant perd ses capacités régénératrices et réparationnelles (Martin 2009). Des centaines d'hypothèses ont été émises pour expliquer les mécanismes du vieillissement afin de mieux comprendre quand, comment et pourquoi le corps cesse d'être pleinement fonctionnel (Medvedev 1990). Cependant, la complexité et la multicausalité du vieillissement rendent le processus de synthèse vers une théorie unique difficile et peu probable.

Bien qu'il n'y ait pas de cause universelle au vieillissement, le passage du temps laisse plusieurs phénomènes observables dont la perte de fonction des grands systèmes (cardiovasculaires, neurologiques...), l'augmentation de l'incidence des tumeurs, l'accumulation des dommages génétiques, les modifications anormales des protéines et les dommages moléculaires générés par les ROS (Holliday 2006). Il a été postulé que le vieillissement vasculaire pourrait être un facteur important de l'ensemble du processus de vieillissement et que l'altération cellulaire, tissulaire, ou d'organe pourrait être au moins en partie secondaire à la dysfonction vasculaire reliée à l'âge (Kregel and Zhang 2007).

Il a précédemment été discuté que le vieillissement est associé à une dysfonction endothéliale causée par une exacerbation du stress oxydant. Le rôle du

stress oxydant dans le vieillissement vasculaire reste cependant à mieux définir. Des études ont démontré une réduction significative de l'activité de certaines enzymes antioxydantes telles que la Gpx-1 et la MnSOD avec l'âge (Dernbach, Urbich et al. 2004). Au niveau de la vasculature, l'enzyme antioxydante principale est la CuZnSOD. Nous avons démontré que le vieillissement normal est associé à une diminution de l'expression de la CuZnSOD. Cependant, son rôle dans le vieillissement vasculaire n'est pas encore défini.

Dans notre deuxième étude, nous nous sommes donc penchés sur le rôle du stress oxydant et de la CuZnSOD dans le vieillissement vasculaire et la réponse de néovascularisation en réponse à l'ischémie. Pour ce faire, nous avons comparé la néovascularisation en réponse à l'ischémie chez de jeunes (6-8 semaines) et vieilles (7-8 mois) souris déficientes ou non pour la CuZnSOD. Les souris de laboratoire vivent normalement jusqu'à l'âge de 2 ans environ (Swindell 2008). Des études ont démontré que les souris déficientes en CuZnSOD ont une longévité réduite. En effet, leur courbe de survie commence à décliner à l'âge de 40 semaines (Sentman, Granstrom et al. 2006). À 90 semaines, seulement 20% des souris déficientes pour CuZnSOD sont encore vivantes (Sentman, Granstrom et al. 2006). Nous avons nous-même observé une mortalité spontanée chez ces souris à partir de l'âge de 26 semaines, avec une accélération importante de la mortalité vers l'âge de 44 semaines (résultats non-publiés).

Bien que l'âge de 7-8 mois ne représente pas un phénotype de sénescence chez nos souris contrôles mais plutôt l'âge adulte avancé, nous avons observé une

diminution significative de la néovascularisation en réponse à l'ischémie entre les jeunes et vieilles souris d'un même groupe (contrôles ou déficientes pour CuZnSOD). Il est connu que le vieillissement normal diminue la capacité néovasculaire de l'organisme. Nous sommes cependant les premiers à démontrer que le vieillissement normal entraîne une diminution de la néovascularisation chez la jeune souris déficiente en CuZnSOD similaire à celle observée chez la vieille souris contrôle. Nous avons également observé que la diminution de la perfusion sanguine liée à l'âge et à la déficience en CuZnSOD est associée à une réduction de la densité capillaire et artériolaire. De récentes études ont démontré que le vieillissement est associé à une raréfaction microvasculaire, une réduction de la plasticité microvasculaire, une augmentation de l'hypertension et une diminution de l'angiogenèse. Ces phénomènes sont aussi corrélés à une augmentation des niveaux de stress oxydant (Rivard, Fabre et al. 1999; Aviv 2001; Ungvari, Kaley et al. 2010). Par ailleurs, de récentes études ont aussi démontré qu'une augmentation de la production des ROS avec l'âge, en partie causée par l'augmentation de l'activité de la NADPH oxydase, mène à une dysfonction endothéliale à la fois chez l'animal de laboratoire et chez l'humain (Ungvari, Kaley et al. 2010).

Une production excessive de ROS dans des conditions pathologiques mène à une toxicité cellulaire et a été associée à une altération de l'angiogenèse dans différents modèles animaux (Urbich, Dernbach et al. 2002; Ebrahimian, Heymes et al. 2006; Michaud, Dussault et al. 2006; Groleau, Dussault et al. 2010). Nous avons démontré qu'un vieillissement normal est associé à une réduction de l'expression de l'enzyme CuZnSOD. L'activité de la CuZnSOD pourrait alors agir comme un

mécanisme de défense à la fois contre l'accumulation excessive de stress oxydant et contre le dommage tissulaire chez des animaux âgés. Nous avons démontré que la production de superoxydes et d'espèces radicalaires oxygénées dans les tissus ischémiques est significativement augmentée avec l'âge, et que les plus hauts niveaux de stress oxydant sont retrouvés chez les vieilles souris déficientes en CuZnSOD. Ces résultats corréleront parfaitement avec la diminution de la néovascularisation observée chez ces souris, c'est-à-dire que les animaux ayant le moins bien récupéré présentent les plus hauts niveaux de stress oxydant. Il est concevable que les hauts niveaux de ROS chez les vieilles souris déficientes pour CuZnSOD favorisent la dysfonction endothéliale dans les tissus ischémiques, ce qui contribue à l'altération de l'angiogenèse. De plus, la production excessive de ROS dans les tissus ischémiques peut également interférer avec l'activité de facteurs pro-angiogéniques tel que VEGF (Urbich, Dernbach et al. 2002; Michaud, Dussault et al. 2006).

Plusieurs mécanismes associés à l'âge ont été proposés comme responsables de l'augmentation du risque cardiovasculaire. Par exemple, les cellules endothéliales matures isolées d'animaux et de patients âgés présentent une augmentation de leur taux de sénescence *in vivo* et *in vitro* (Blimline 2009). Nous avons observé une augmentation de l'expression des marqueurs de sénescence cellulaire p53 et p16 au niveau microvasculaire associée à l'âge et à une déficience en CuZnSOD. L'augmentation de l'expression de p53 favorise la production de fragments antiangiogéniques et réprime des gènes encodant pour des facteurs proangiogéniques dont le VEGF et bFGF (Teodoro, Albert et al. 2006; Teodoro, Evans et al. 2007). De même, des études ont démontré que l'expression de p16 diminue l'expression de

VEGF (Alhaja, Adan et al. 2004). Enfin, l'accumulation de ces marqueurs est un phénomène de sénescence associé à des dommages oxydatifs, en particulier l'accumulation des peroxynitrites (Chen and Goligorsky, 2006). Ainsi, une augmentation des niveaux de stress oxydant et en particulier des peroxynitrites associée à l'âge et à une déficience en CuZnSOD module l'expression des protéines p53 et p16 qui, en plus d'être des marqueurs de sénescence cellulaire, contribue à la diminution de l'angiogenèse chez nos souris âgées et/ou déficientes en CuZnSOD.

Le stress oxydant a été proposé comme lien potentiel entre la sénescence vasculaire, la diminution de la biodisponibilité du NO et la diminution de la réparation vasculaire associée au vieillissement (Gennaro, Menard et al. 2003; Donato, Eskurza et al. 2007; Voghel, Thorin-Trescases et al. 2007; Voghel, Thorin-Trescases et al. 2010). Plusieurs études ont par ailleurs démontré que le vieillissement est associé à une diminution de la biodisponibilité du NO et à une dysfonction endothéliale, ce qui favorise le développement de plaques athérosclérotiques (Gates, Strain et al. 2009; Versari, Daghini et al. 2009). Les mécanismes précis menant à la dysfonction endothéliale associée à l'âge sont cependant méconnus.

Il est maintenant reconnu que les EPCs participent activement à la néovascularisation chez l'adulte et que ces cellules possèdent une activité antioxydante supérieure aux cellules endothéliales matures, ces cellules auront potentiellement un rôle pour le traitement du vieillissement vasculaire. Bien que les EPCs soient reconnues pour posséder des niveaux d'antioxydants plus élevés que les cellules endothéliales matures, de récentes études ont démontré une diminution de

l'expression de la Gpx-1 chez les cellules progénitrices endothéliales isolées de sujets âgés (Blokhina, Virolainen et al. 2003; Dernbach, Urbich et al. 2004; He, Joyner et al. 2009). Nous sommes néanmoins les premiers à démontrer l'importance de l'activité antioxydante de la CuZnSOD dans la protection du nombre et de la fonction des EPCs dans le contexte du vieillissement.

Dans notre étude, nous avons observé une diminution du nombre de EPCs dans la moelle osseuse chez les souris âgées et chez les souris déficientes en CuZnSOD. Cette observation pourrait partiellement expliquer l'importante réduction du nombre de EPCs périphériques (rate) que nous avons observés chez ces animaux. De récentes études ont démontré que la mobilisation des EPCs est inversement proportionnelle à l'âge chez des patients ayant présenté un infarctus du myocarde (Turan, Brehm et al. 2007). D'autres études sont cependant nécessaires afin de déterminer si la déficience en CuZnSOD peut également altérer la mobilisation des EPCs de la moelle osseuse dans le contexte du vieillissement.

Bien que l'âge diminue le nombre des EPCs, nous avons observé qu'un vieillissement modéré semble avoir peu d'effet sur l'activité fonctionnelle de ces cellules si l'enzyme CuZnSOD est encore présente, c'est-à-dire chez les animaux contrôles. Il a précédemment été décrit que la perte de fonction des EPCs avec l'âge est en partie le résultat d'un déséquilibre entre d'une part les facteurs favorisant la croissance, la migration et la survie, et d'autre part les facteurs augmentant le stress oxydant et la sénescence cellulaire (Ungvari, Kaley et al. 2010). Nous pensons que la CuZnSOD a un rôle primordial à jouer dans le maintien de cet équilibre. Ce qui est

intéressant dans nos résultats sur les EPCs c'est que la quantité d'anions superoxydes reste relativement basse sauf si la déficience en CuZnSOD est combinée au vieillissement. C'est aussi dans cette situation qu'on observe les effets néfastes sur la fonction des EPCs, renforçant l'hypothèse selon laquelle l'activité de la CuZnSOD est capitale pour maintenir la fonctionnalité de ces cellules lors du vieillissement. De récentes études ont démontré que des niveaux élevés du marqueur p16 réduisent les propriétés d'adhésion, de migration et de formation de réseaux tubulaires sur matrigel des cellules endothéliales matures en partie via la diminution de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Alhaja, Adan et al. 2004). Bien que nous n'ayons pas mesuré directement l'expression de p16 chez nos EPCs, la forte expression microvasculaire de p16 chez nos souris âgées déficientes en CuZnSOD pourrait expliquer partiellement la perte de fonctionnalité observée chez les EPCs isolées de ce groupe de souris.

Nous devons garder en tête que les animaux contrôles utilisés dans nos expériences sont âgés mais pas sénescents. Le fait que nous ayons tout de même observé une diminution du nombre sans altération visible des fonctions des EPCs pourrait constituer une piste de recherche intéressante pour l'élucidation des mécanismes de vieillissement cardiovasculaire.

En résumé, l'augmentation du stress oxydant causée par l'âge et/ou une déficience en CuZnSOD engendre une diminution du nombre et de l'activité fonctionnelle des EPCs. L'effet combiné de l'absence de CuZnSOD et du vieillissement bloque le processus de néovascularisation normal en réponse à

l'ischémie. De même, la combinaison du vieillissement à une déficience en CuZnSOD abolit de façon presque absolue la fonction des EPCs.

La CuZnSOD a donc un rôle protecteur crucial dans le mécanisme de vieillissement vasculaire. L'équipe de van der Loo a récemment démontré que la CuZnSOD normalement cytosolique se relocalise vers la mitochondrie dans des cellules endothéliales matures de rats âgés (van der Loo, Bachschmid et al. 2006). Plusieurs évidences suggèrent que le vieillissement altère la biogenèse mitochondriale dans les cellules endothéliales artérielles et capillaires, ce qui fait augmenter la production totale de ROS par les mitochondries (Ungvari, Labinskyy et al. 2008). La relocalisation de la CuZnSOD a certainement une implication dans la détoxification des anions superoxydes mitochondriaux et il serait intéressant de vérifier si le phénomène peut ralentir le processus du vieillissement.

En somme, nos études démontrent, en accord avec la littérature, que le vieillissement «normal» est associé à une augmentation de la production des ROS (Kregel and Zhang 2007). Avec l'âge, cette surproduction semble compensée jusqu'à un certain point par la CuZnSOD, ce qui permet tout le maintien des fonctions vasculaires. Dans le cadre d'un vieillissement «pathologique» associé à d'autres facteurs de risque tels que le diabète et l'hypertension des études ont démontré une diminution de l'activité de la CuZnSOD (Kawamura, Ookawara et al. 1992; Kotake, Shinohara et al. 1998; Amirkhizi, Siassi et al. 2010). L'augmentation des ROS non-compensée par la CuZnSOD peut alors altérer les fonctions vasculaires et diminuer la néovascularisation réparatrice post-ischémie.

Au niveau du vieillissement, la grande critique faite à l'égard de la théorie du stress oxydant est l'absence d'incorporation des effets physiologiques et des rôles bénéfiques des radicaux libres dans la fonction cellulaire. À ce sujet, la balance physiologique entre les pro et les antioxydants a longuement été abordée précédemment. Rappelons que le vieillissement est caractérisé par un déséquilibre du système redox en faveur de l'augmentation du stress oxydant. Bien que le stress oxydant soit nécessaire à faibles concentrations dans un organisme jeune et sain, l'organisme vieillissant fait face à un tout autre problème. En effet, l'âge diminue la capacité antioxydante de l'organisme. Cette réduction crée un déséquilibre en faveur du stress oxydant, ce qui augmente son accumulation dans les tissus. De plus, l'âge réduit la capacité de l'organisme à réparer les dommages causés par les espèces radicalaires oxygénées, réduisant ainsi la fonction des cellules affectées. Puisque les cellules âgées semblent plus fragiles et sensibles au stress oxydant, celui-ci devrait être ramené à des niveaux plus faibles que dans un organisme jeune et sain pour ne pas avoir d'effets délétères. Des études ont par ailleurs proposé l'administration d'antioxydants afin de pallier à l'exacerbation oxydative (Karasu 2010; Agarwal and Baur 2011). Néanmoins, les études faites avec des antioxydants n'ont pas donné tous les effets bénéfiques escomptés (Steinberg and Witztum 2002). Les thérapies avec les antioxydants n'ont pas réussi à augmenter la longévité, confirmant que les ROS et l'environnement redox ne sont pas les seules voies impliquées dans le phénomène complexe qu'est le vieillissement.

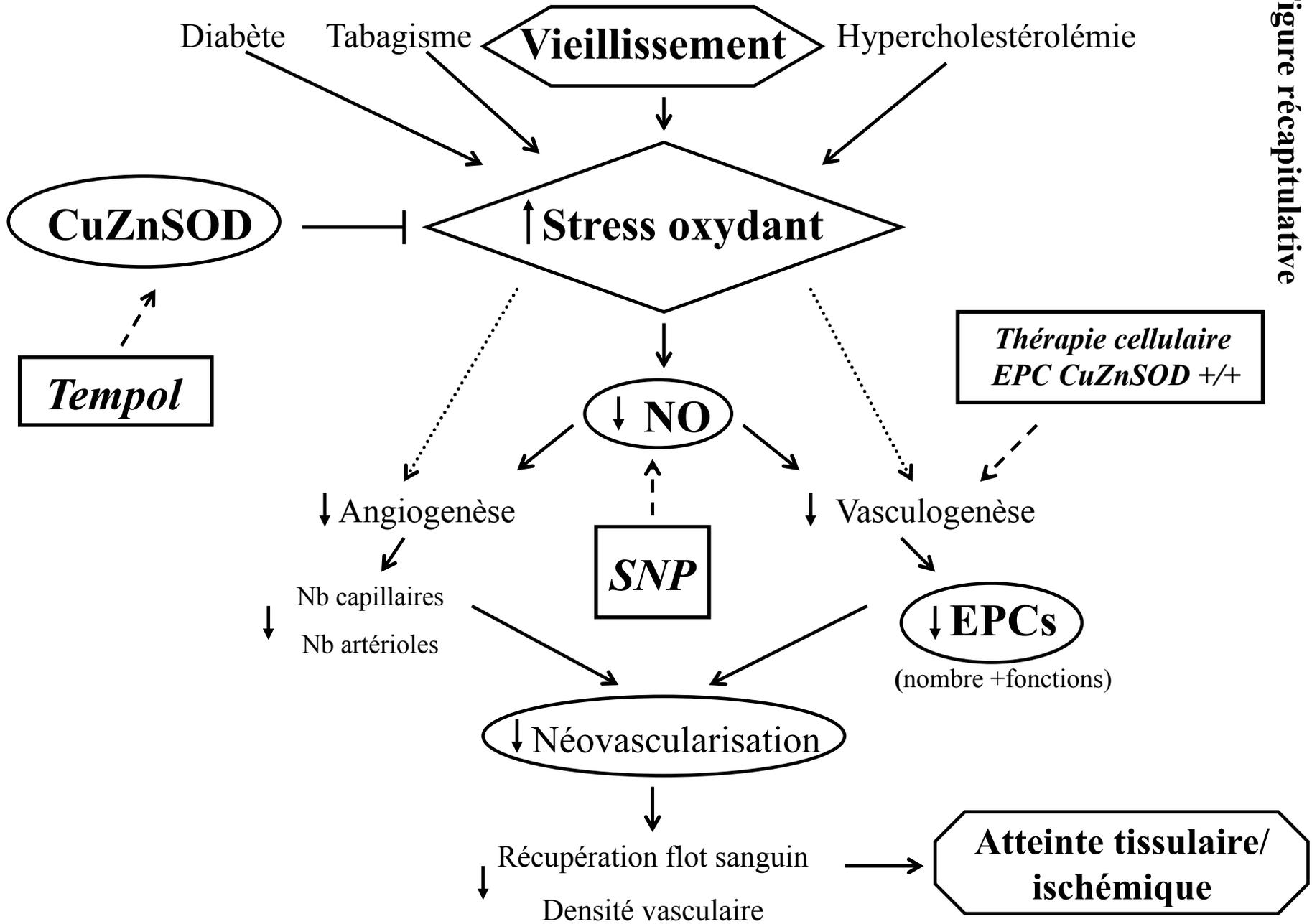
Une des raisons pour laquelle les traitements aux antioxydants ne donnent pas les résultats escomptés est que ce traitement ne cible pas spécifiquement les défenses ou mécanismes de réparation défectueux et que les cellules traitées sont déjà endommagées. C'est pourquoi une approche thérapeutique incluant la cellule entière (EPCs) pourrait être intéressante à explorer. Afin de contourner le problème de l'immunité, de très récentes études ont utilisés le sécrétome des EPCs comme traitement des maladies athérosclérotiques ischémiques (Kushner 2010). Cependant, à l'image du traitement avec les antioxydants, ce traitement ne cible pas spécifiquement les mécanismes défectueux et pourrait, comme les traitements au VEGF, créer des problèmes de croissances tumorales et d'oedème tissulaire (Vajanto, Rissanen et al. 2002; Rissanen, Rutanen et al. 2004). Dans le contexte précis de l'injure vasculaire, nous pensons que l'emploi de cellules progénitrices endothéliales est une voie intéressante à explorer. Ces cellules, en plus d'avoir démontré leurs capacités proangiogéniques dans diverses conditions, peuvent migrer vers les sites d'injures même si elles sont administrées par voie sanguine périphérique (Groleau, Dussault et al. 2010; Turgeon, Dussault et al. 2010). La voie est ouverte pour de plus amples recherches sur la question.

12. Conclusion

Qu'elle soit causée par l'âge et/ou la déficience en enzyme antioxydante CuZnSOD, l'augmentation du stress oxydant dans un modèle murin d'ischémie est associée avec une diminution de la néovascularisation. L'augmentation du stress oxydant induit d'une part, une diminution de l'angiogenèse, caractérisée par une réduction de la densité capillaire et artériolaire dans des tissus ischémiques. D'autre part, cette augmentation de stress oxydant est également responsable d'une réduction de la vasculogenèse post-natale caractérisée par une diminution du nombre et de l'activité fonctionnelle des cellules progénitrices endothéliales (EPCs). L'activité fonctionnelle des cellules progénitrices endothéliales peut être améliorée par des traitements aux antioxydants et aux donneurs de NO. De plus, l'incorporation de cellules progénitrices endothéliales saines dans l'organisme déficient en CuZnSOD récupère en grande partie la néovascularisation en réponse à l'ischémie. Le stress oxydant augmenté de manière anormale lors de la déficience en CuZnSOD fait vieillir prématurément les cellules (voir figure récapitulative p.245). Cette sénescence vasculaire perturbe les mécanismes de défense en réponse à l'ischémie et empêche l'organisme de former correctement de nouveaux vaisseaux sanguins. Nos études mettent également en lumière l'importance des EPCs dans la réponse néovasculaire en situation d'ischémie. La capacité fonctionnelle de ces cellules corrèle avec le degré de revascularisation du tissu ischémique. C'est donc dire que plus le stress oxydant est élevé, plus les EPCs ont une activité fonctionnelle réduite et moins de néovaisseaux seront formés en réponse à l'ischémie.

Nous proposons que la CuZnSOD exerce son effet protecteur d'une part en diminuant l'excès de stress oxydant et d'autre part en maintenant le nombre et les fonctions des EPCs. La stimulation de la néovascularisation par l'incorporation de cellules progénitrices endothéliales saines dans l'organisme représente une nouvelle avenue thérapeutique très prometteuse chez des patients souffrants de maladies vasculaires ischémiques et présentant divers facteurs de risque cardiovasculaires.

Facteurs de risque cardiovasculaire



13. Figure récapitulative

14. Bibliographie

- Abaci, A., A. Oguzhan, et al. (1999). "Effect of diabetes mellitus on formation of coronary collateral vessels." Circulation **99**(17): 2239-2242.
- Abdul-Salam, F., M. H. Mansour, et al. (2005). "The selective expression of distinct fucosylated glycoproteins on murine T and B lymphocyte subsets." Immunobiology **210**(9): 695-708.
- Agarwal, B. and J. A. Baur (2011). "Resveratrol and life extension." Ann N Y Acad Sci **1215**: 138-143.
- Ahrendt, G. (1998). "Angiogenic growth factors : a review for tissue engineering." Tissue Engineering **4**(2): 117-130.
- Aicher, A., C. Heeschen, et al. (2003). "Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells." Nat Med **9**(11): 1370-1376.
- Aird, W. C. (2007). Endothelial biomedecine, Cambridge University Press. Chapitre 158. p.1457-1470.
- Alhaja, E., J. Adan et al. (2004). "Anti-migratory and anti-angiogenic effect of p16 : a novel localization at membrane ruffles and lamellipodia in endothelial cells." Angiogenesis **7** :323-333.
- Alom-Ruiz, S. P., N. Anilkumar, et al. (2008). "Reactive oxygen species and endothelial activation." Antioxid Redox Signal **10**(6): 1089-1100.

- Amatschek, S., E., Kriehuber et al. (2007). "Blood and lymphatic endothelial cell-specific differentiation programs are stringently controlled by the tissue environment." Blood **109** : 4777-4785.
- Amirkhizi, F., F. Siassi, et al. (2010). "Assessment of antioxidant enzyme activities in erythrocytes of pre-hypertensive and hypertensive women." J Res Med Sci **15**(5): 270-278.
- Antonyuk, S. V., R. W. Strange, et al. (2009). "The structure of human extracellular copper-zinc superoxide dismutase at 1.7 Å resolution: insights into heparin and collagen binding." J Mol Biol **388**(2): 310-326.
- Apel, K. and H. Hirt (2004). "Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction." Annu Rev Plant Biol **55**: 373-399.
- Asahara, T. (2007). "Cell therapy and gene therapy using endothelial progenitor cells for vascular regeneration." Handb Exp Pharmacol(180): 181-194.
- Asahara, T. and A. Kawamoto (2004). "Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis." Am J Physiol Cell Physiol **287**(3): C572-579.
- Asahara, T., H. Masuda, et al. (1999). "Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization." Circ Res **85**(3): 221-228.
- Asahara, T., T. Murohara, et al. (1997). "Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis." Science **275**(5302): 964-967.
- Asahara, T., T. Takahashi, et al. (1999). "VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells." EMBO J **18**(14): 3964-3972.

- Asimakis, G. K., S. Lick, et al. (2002). "Postischemic recovery of contractile function is impaired in SOD2(+/-) but not SOD1(+/-) mouse hearts." Circulation **105**(8): 981-986.
- Association, C. D. (2008). Clinical Practice Guidelines for the Prevention and Management of Diabetes in Canada, Canadian Journal of Diabetes. **32**: S1-S4.
- Augustin, H. G., D. H. Kozian, et al. (1994). "Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes." Bioessays **16**(12): 901-906.
- Aviram, M. (1991). "The contribution of the macrophage receptor for oxidized LDL to its cellular uptake." Biochem Biophys Res Commun **179**(1): 359-365.
- Aviv, A. (2001). "Hypothesis: pulse pressure and human longevity." Hypertension **37**(4): 1060-1066.
- Babior, B. M. (2002). "The activity of leukocyte NADPH oxidase: regulation by p47PHOX cysteine and serine residues." Antioxid Redox Signal **4**(1): 35-38.
- Balbarini, A., di Stefano (2008). Circulating Endothelial Progenitor Cells – Characterisation, Function and Relationship with Cardiovascular Risk Factors. Risk Management T. Briefings, University of Pisa: 16-19.
- Baldassarre, D., S. Castelnovo, et al. (2009). "Effects of timing and extent of smoking, type of cigarettes, and concomitant risk factors on the association between smoking and subclinical atherosclerosis." Stroke **40**(6): 1991-1998.
- Baldus, S. E., J. Thiele, et al. (1994). "Carbohydrate antigens of human megakaryocytes and platelet glycoproteins: a comparative study." Histochemistry **102**(3): 205-211.

- Balsam, L. B., A. J. Wagers, et al. (2004). "Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium." Nature **428**(6983): 668-673.
- Banai, S., M. T. Jaklitsch, et al. (1994). "Angiogenic-induced enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by vascular endothelial growth factor in dogs." Circulation **89**(5): 2183-2189.
- Bannister, W.H. (1988). "From haemocuprein to copper-zinc superoxide dismutase : a history on the fiftieth anniversary of the discovery of haemocuprein and the twentieth anniversary of the discovery of superoxide dismutase." Free Rad. Res. Comms. **5**(1):35-42.
- Barnes, P. J. (2005). "Theophylline in chronic obstructive pulmonary disease: new horizons." Proc Am Thorac Soc **2**(4): 334-339; discussion 340-331.
- Barton, M., F. Cosentino, et al. (1997). "Anatomic heterogeneity of vascular aging: role of nitric oxide and endothelin." Hypertension **30**(4): 817-824.
- Baumbach, G. L., S. P. Didion, et al. (2006). "Hypertrophy of cerebral arterioles in mice deficient in expression of the gene for CuZn superoxide dismutase." Stroke **37**(7): 1850-1855.
- Beasley, D. (1990). "Interleukin 1 and endotoxin activate soluble guanylate cyclase in vascular smooth muscle." Am J Physiol **259**(1 Pt 2): R38-44.
- Beasley, D., R. A. Cohen, et al. (1989). "Interleukin 1 inhibits contraction of vascular smooth muscle." J Clin Invest **83**(1): 331-335.
- Beasley, D., R. A. Cohen, et al. (1990). "Endotoxin inhibits contraction of vascular smooth muscle in vitro." Am J Physiol **258**(4 Pt 2): H1187-1192.

- Beasley, D. and M. McGuiggin (1994). "Interleukin 1 activates soluble guanylate cyclase in human vascular smooth muscle cells through a novel nitric oxide-independent pathway." J Exp Med **179**(1): 71-80.
- Beckman, J. A., M. A. Creager, et al. (2002). "Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management." JAMA **287**(19): 2570-2581.
- Beckman, K. B. and B. N. Ames (1998). "The free radical theory of aging matures." Physiol Rev **78**(2): 547-581.
- Bedard, K. and K. H. Krause (2007). "The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology." Physiol Rev **87**(1): 245-313.
- Behrendt, D. and P. Ganz (2002). "Endothelial function. From vascular biology to clinical applications." Am J Cardiol **90**(10C): 40L-48L.
- Belik, J., M. Jerkic, et al. (2009). "Age-dependent endothelial nitric oxide synthase uncoupling in pulmonary arteries of endoglin heterozygous mice." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **297**(6): L1170-1178.
- Belton, O. and D. J. Fitzgerald (2003). "Cyclooxygenase isoforms and atherosclerosis." Expert Rev Mol Med **5**(9): 1-18.
- Benjamin, L. E., D. Golijanin, et al. (1999). "Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal." J Clin Invest **103**(2): 159-165.
- Bergmann, C. E., I. E. Hofer, et al. (2006). "Arteriogenesis depends on circulating monocytes and macrophage accumulation and is severely depressed in op/op mice." J Leukoc Biol **80**(1): 59-65.

- Berliner, J. A., M. C. Territo, et al. (1990). "Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions." J Clin Invest **85**(4): 1260-1266.
- Bertolini, F., P. Mancuso, et al. (2009). "The multiple personality disorder phenotype(s) of circulating endothelial cells in cancer." Biochim Biophys Acta **1796**(1): 27-32.
- Bilheimer, D. W. (1988). "Therapeutic control of hyperlipidemia in the prevention of coronary atherosclerosis: a review of results from recent clinical trials." Am J Cardiol **62**(15): 1J-9J.
- Black, H. R. (1992). Cardiovascular risk factors. Yale University of Medicine Heart Book, Hearst Book: 32-36.
- Blanc, A., N. R. Pandey, et al. (2003). "Synchronous activation of ERK 1/2, p38mapk and PKB/Akt signaling by H₂O₂ in vascular smooth muscle cells: potential involvement in vascular disease (review)." Int J Mol Med **11**(2): 229-234.
- Blimline (2009). Aging and vascular endothelial cell senescence: potential role of SIRT1 in development of inflammation and dysfunction. Meeting abstract supplement LB81, FASEB J.
- Blokhina, O., E. Virolainen, et al. (2003). "Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review." Ann Bot **91 Spec No**: 179-194.
- Bloom, H. L., I. Shukrullah, et al. (2010). "Statins Decrease Oxidative Stress and ICD Therapies." Cardiol Res Pract **2010**: 253803.
- Boaz, M., S. Smetana, et al. (2000). "Secondary prevention with antioxidants of cardiovascular disease in endstage renal disease (SPACE): randomised placebo-controlled trial." Lancet **356**(9237): 1213-1218.

- Bonomini, F., S. Tengattini, et al. (2008). "Atherosclerosis and oxidative stress." Histol Histopathol **23**(3): 381-390.
- Boring, L., J. Gosling, et al. (1998). "Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis." Nature **394**(6696): 894-897.
- Borsum, T., I. Hagen, et al. (1982). "Alterations in the protein composition and surface structure of human endothelial cells during growth in primary culture." Atherosclerosis **44**(3): 367-378.
- Botti, H., A. Trostchansky, et al. (2005). "Reactivity of peroxynitrite and nitric oxide with LDL." IUBMB Life **57**(6): 407-412.
- Botting, R. (2003). "COX-1 and COX-3 inhibitors." Thromb Res **110**(5-6): 269-272.
- Boveris, A. and B. Chance (1973). "The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen." Biochem J **134**(3): 707-716.
- Broeckel, U., C. Hengstenberg, et al. (2002). "A comprehensive linkage analysis for myocardial infarction and its related risk factors." Nat Genet **30**(2): 210-214.
- Bu, L., X. Gao, et al. (2010). "Targeted conditional gene knockout in human embryonic stem cells." Cell Res **20**(3): 379-382.
- Burdon, R. H. (1995). "Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation." Free Radic Biol Med **18**(4): 775-794.
- Burdon, R. H., D. Alliangana, et al. (1995). "Hydrogen peroxide and the proliferation of BHK-21 cells." Free Radic Res **23**(5): 471-486.
- Burdon, R. H., V. Gill, et al. (1989). "Cell proliferation and oxidative stress." Free Radic Res Commun **7**(3-6): 149-159.

- Buschmann, I. and W. Schaper (1999). "Arteriogenesis Versus Angiogenesis: Two Mechanisms of Vessel Growth." News Physiol Sci **14**: 121-125.
- Cai, H. and D. G. Harrison (2000). "Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress." Circ Res **87**(10): 840-844.
- Cai, W. and W. Schaper (2008). "Mechanisms of arteriogenesis." Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) **40**(8): 681-692.
- Calabrese, V., A. Ravagna et al. (2005). "Acetylcarnitine induces heme oxygenase in rat astrocytes and protects against oxidative stress : involvement of the transcription factor Nrf2." Journal of neuroscience research **79** :509-521.
- Calabrese, V. and V. Rizza (1999). "Effects of l-carnitine on the formation of fatty acid ethyl esters in brain and peripheral organs after short-term ethanol administration in rat." Neurochem Res **24** :79-84.
- Camejo, G., G. Fager, et al. (1993). "Binding of low density lipoproteins by proteoglycans synthesized by proliferating and quiescent human arterial smooth muscle cells." J Biol Chem **268**(19): 14131-14137.
- Campbell, J.H., J.L. Efendy et al. (1994). "Novel vascular graft grown within recipient's own peritoneal cavity." Circ Res **85** :1173-1178.
- Canada, P. H. A. o. (2009). 2009 Tracking Heart Disease and Stroke in Canada. P. H. A. o. Canada: 132.
- Canada, S. (2010). CANSIM Tableau 102-0529: Mortalité, par cause, Chapitre IX: Maladie de l'appareil circulatoire (Groupe d'âge et sexe. A. d. s. p. d. Canada, Statistique Canada: I00-I99.

- Cangemi, R., L. Loffredo, et al. (2008). "Early decrease of oxidative stress by atorvastatin in hypercholesterolaemic patients: effect on circulating vitamin E." Eur Heart J **29**(1): 54-62.
- Case, J., L. E. Mead, et al. (2007). "Human CD34+AC133+VEGFR-2+ cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors." Exp Hematol **35**(7): 1109-1118.
- Cathcart, M. K. (2004). "Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidase in monocytes/macrophages: contributions to atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(1): 23-28.
- Cebe-Suarez, S., A. Zehnder-Fjallman, et al. (2006). "The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships." Cell Mol Life Sci **63**(5): 601-615.
- Celermajer, D. S., K. E. Sorensen, et al. (1994). "Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age-related decline in women." J Am Coll Cardiol **24**(2): 471-476.
- Chauhan, A., R. S. More, et al. (1996). "Aging-associated endothelial dysfunction in humans is reversed by L-arginine." J Am Coll Cardiol **28**(7): 1796-1804.
- Chen, L. H., G. A. Boissonneault, et al. (1988). "Vitamin C, vitamin E and cancer (review)." Anticancer Res **8**(4): 739-748.
- Chen, Y. H., S. J. Lin, et al. (2007). "High glucose impairs early and late endothelial progenitor cells by modifying nitric oxide-related but not oxidative stress-mediated mechanisms." Diabetes **56**(6): 1559-1568.
- Chen, Z., T. D. Oberley, et al. (2000). "Overexpression of CuZnSOD in coronary vascular cells attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury." Free Radic Biol Med **29**(7): 589-596.

- Cheng, W. H., G. F. Combs, Jr., et al. (1998). "Knockout of cellular glutathione peroxidase affects selenium-dependent parameters similarly in mice fed adequate and excessive dietary selenium." Biofactors **7**(4): 311-321.
- Cheng, W. H., Y. S. Ho, et al. (1997). "Cellular glutathione peroxidase knockout mice express normal levels of selenium-dependent plasma and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases in various tissues." J Nutr **127**(8): 1445-1450.
- Chen, J. and M.S. Goligorsky (2006). "Premature senescence of endothelial cells : Methusaleh's dilemma." Am J Physiol Heart Circ Physiol **290** :H1729-1739.
- Chen, J. and R.F. Regan. (2004). "Heme oxygenase-2 gene deletion increases astrocyte vulnerability to hemin." Biochem Biophys Res Commun **318** : 88-94.
- Cheung, M. C., X. Q. Zhao, et al. (2001). "Antioxidant supplements block the response of HDL to simvastatin-niacin therapy in patients with coronary artery disease and low HDL." Arterioscler Thromb Vasc Biol **21**(8): 1320-1326.
- Chua, C. C., R. C. Hamdy, et al. (1998). "Upregulation of vascular endothelial growth factor by H₂O₂ in rat heart endothelial cells." Free Radic Biol Med **25**(8): 891-897.
- Cipollone, F., C. Prontera, et al. (2001). "Overexpression of functionally coupled cyclooxygenase-2 and prostaglandin E synthase in symptomatic atherosclerotic plaques as a basis of prostaglandin E(2)-dependent plaque instability." Circulation **104**(8): 921-927.

- Clinton, S. K., R. Underwood, et al. (1992). "Macrophage colony-stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis." Am J Pathol **140**(2): 301-316.
- Collin, B., D. Busseuil, et al. (2007). "Increased superoxide anion production is associated with early atherosclerosis and cardiovascular dysfunctions in a rabbit model." Mol Cell Biochem **294**(1-2): 225-235.
- Cooke, J. P. and V. J. Dzau (1997). "Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease." Annu Rev Med **48**: 489-509.
- Cooke, M. S., M. D. Evans, et al. (2003). "Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease." FASEB J **17**(10): 1195-1214.
- Corvo, M. L., O. C. Boerman, et al. (1999). "Intravenous administration of superoxide dismutase entrapped in long circulating liposomes. II. In vivo fate in a rat model of adjuvant arthritis." Biochim Biophys Acta **1419**(2): 325-334.
- Costopoulos, C., T. V. Liew, et al. (2008). "Ageing and atherosclerosis: Mechanisms and therapeutic options." Biochem Pharmacol **75**(6): 1251-1261.
- Couffinhal, T., P. Dufourcq, et al. (2009). "Mouse models to study angiogenesis in the context of cardiovascular diseases." Front Biosci **14**: 3310-3325.
- Couffinhal, T., M. Silver, et al. (1999). "Impaired collateral vessel development associated with reduced expression of vascular endothelial growth factor in ApoE^{-/-} mice." Circulation **99**(24): 3188-3198.
- Cox, C. S., Jr., J. E. Baumgartner, et al. (2011). "Autologous bone marrow mononuclear cell therapy for severe traumatic brain injury in children." Neurosurgery **68**(3): 588-600.

- Crawford, R. S., F. F. Hashmi, et al. (2007). "A novel model of acute murine hindlimb ischemia." Am J Physiol Heart Circ Physiol **292**(2): H830-837.
- Cross, A. R. and O. T. Jones (1991). "Enzymic mechanisms of superoxide production." Biochim Biophys Acta **1057**(3): 281-298.
- Cross, M. J. and L. Claesson-Welsh (2001). "FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition." Trends Pharmacol Sci **22**(4): 201-207.
- Curzen, N. P. and K. M. Fox (1997). "Do ACE inhibitors modulate atherosclerosis?" Eur Heart J **18**(10): 1530-1535.
- Cybulsky, M. I. and M. A. Gimbrone, Jr. (1991). "Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis." Science **251**(4995): 788-791.
- Cybulsky, M. I., K. Iiyama, et al. (2001). "A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis." J Clin Invest **107**(10): 1255-1262.
- Danson, E. J., J. K. Choate, et al. (2005). "Cardiac nitric oxide: emerging role for nNOS in regulating physiological function." Pharmacol Ther **106**(1): 57-74.
- Datta, S. R., A. Brunet, et al. (1999). "Cellular survival: a play in three Akts." Genes Dev **13**(22): 2905-2927.
- Davies, M. J., N. Woolf, et al. (1988). "Morphology of the endothelium over atherosclerotic plaques in human coronary arteries." Br Heart J **60**(6): 459-464.
- Davignon, J. and P. Ganz (2004). "Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis." Circulation **109**(23 Suppl 1): III27-32.

- Davis, S., T. H. Aldrich, et al. (1996). "Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning." Cell **87**(7): 1161-1169.
- Day, B. J. (2005). "Glutathione: a radical treatment for cystic fibrosis lung disease?" Chest **127**(1): 12-14.
- de la Fuente, M., A. Hernanz et al. (2004). "Changes with age in peritoneal macrophage functions. Implication of leukocytes in the oxidative stress of senescence." Cell Mol Biol **50** : Online publication.
- de Resende, M. M., L. Y. Huw, et al. (2007). "Role of endothelial nitric oxide in bone marrow-derived progenitor cell mobilization." Handb Exp Pharmacol(180): 37-44.
- Dernbach, E., C. Urbich, et al. (2004). "Antioxidative stress-associated genes in circulating progenitor cells: evidence for enhanced resistance against oxidative stress." Blood **104**(12): 3591-3597.
- DeRubertis, F. R., P. A. Craven, et al. (2007). "Acceleration of diabetic renal injury in the superoxide dismutase knockout mouse: effects of tempol." Metabolism **56**(9): 1256-1264.
- Diana, J. N. (1990). "Tobacco smoking and atherosclerosis: overview." Adv Exp Med Biol **273**: 1-7.
- Didion, S. P., D. A. Kinzenbaw, et al. (2005). "Critical role for CuZn-superoxide dismutase in preventing angiotensin II-induced endothelial dysfunction." Hypertension **46**(5): 1147-1153.
- Didion, S. P., M. J. Ryan, et al. (2002). "Increased superoxide and vascular dysfunction in CuZnSOD-deficient mice." Circ Res **91**(10): 938-944.

- Dimmeler, S. (2005). "Platelet-derived growth factor CC--a clinically useful angiogenic factor at last?" N Engl J Med **352**(17): 1815-1816.
- Dimmeler, S., I. Fleming, et al. (1999). "Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation." Nature **399**(6736): 601-605.
- Dimmeler, S. and A. M. Zeiher (1999). "Nitric oxide-an endothelial cell survival factor." Cell Death Differ **6**(10): 964-968.
- Dimmeler, S. and A. M. Zeiher (2000). "Reactive oxygen species and vascular cell apoptosis in response to angiotensin II and pro-atherosclerotic factors." Regul Pept **90**(1-3): 19-25.
- Dimmeler, S. and A. M. Zeiher (2009). "Cell therapy of acute myocardial infarction: open questions." Cardiology **113**(3): 155-160.
- Donato, A. J., I. Eskurza, et al. (2007). "Direct evidence of endothelial oxidative stress with aging in humans: relation to impaired endothelium-dependent dilation and upregulation of nuclear factor-kappaB." Circ Res **100**(11): 1659-1666.
- Driver, J. A., L. Djousse, et al. (2008). "Incidence of cardiovascular disease and cancer in advanced age: prospective cohort study." BMJ **337**: a2467.
- Dulak, J., A. Jozkowicz et al. (2000). "Nitric oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells." Atheroscler Thromb Vasc Biol **20** :659-666
- Dulak, J. and A. Jozkowicz (2002). "Nitric oxide and angiogenic activity of endothelial cells : direct of VEGF-dependant effect ?" Cardiovascular research **56** : 487-488.

- Dutta, A. and S. K. Dutta (2003). "Vitamin E and its role in the prevention of atherosclerosis and carcinogenesis: a review." J Am Coll Nutr **22**(4): 258-268.
- Ebrahimian, T. G., C. Heymes, et al. (2006). "NADPH oxidase-derived overproduction of reactive oxygen species impairs postischemic neovascularization in mice with type 1 diabetes." Am J Pathol **169**(2): 719-728.
- Edelberg, J. M., L. Tang, et al. (2002). "Young adult bone marrow-derived endothelial precursor cells restore aging-impaired cardiac angiogenic function." Circ Res **90**(10): E89-93.
- el-Remessy, A. B., M. Bartoli, et al. (2005). "Oxidative stress inactivates VEGF survival signaling in retinal endothelial cells via PI 3-kinase tyrosine nitration." J Cell Sci **118**(Pt 1): 243-252.
- Erusalimsky, J. D. (2009). "Vascular endothelial senescence: from mechanisms to pathophysiology." J Appl Physiol **106**(1): 326-332.
- Esper, R. J., R. A. Nordaby, et al. (2006). "Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal." Cardiovasc Diabetol **5**: 4.
- Estes, M. L., J. A. Mund, et al. (2010). "Identification of endothelial cells and progenitor cell subsets in human peripheral blood." Curr Protoc Cytom **Chapter 9**: Unit 9 33 31-11.
- Everaert, B. R., E. M. Van Craenenbroeck, et al. (2010). "Current perspective of pathophysiological and interventional effects on endothelial progenitor cell biology: Focus on Pi3K/AKT/eNOS pathway." Int J Cardiol.
- Falk, E., P. K. Shah, et al. (1995). "Coronary plaque disruption." Circulation **92**(3): 657-671.

- Faraci, F. M. (2005). "Oxidative stress: the curse that underlies cerebral vascular dysfunction?" Stroke **36**(2): 186-188.
- Faraci, F. M. and S. P. Didion (2004). "Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(8): 1367-1373.
- Ferrara, N. (2004). "Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress." Endocr Rev **25**(4): 581-611.
- Ferrara, N., G. Frantz, et al. (2003). "Differential expression of the angiogenic factor genes vascular endothelial growth factor (VEGF) and endocrine gland-derived VEGF in normal and polycystic human ovaries." Am J Pathol **162**(6): 1881-1893.
- Ferrara, N., H. P. Gerber, et al. (2003). "The biology of VEGF and its receptors." Nat Med **9**(6): 669-676.
- Fichtlscherer, S., S. Breuer, et al. (2004). "Prognostic value of systemic endothelial dysfunction in patients with acute coronary syndromes: further evidence for the existence of the "vulnerable" patient." Circulation **110**(14): 1926-1932.
- Flamme, I. and W. Risau (1992). "Induction of vasculogenesis and hematopoiesis in vitro." Development **116**(2): 435-439.
- Flaumenhaft, R., M. Abe, et al. (1992). "Basic fibroblast growth factor-induced activation of latent transforming growth factor beta in endothelial cells: regulation of plasminogen activator activity." J Cell Biol **118**(4): 901-909.
- Flaumenhaft, R. and D. B. Rifkin (1992). "Cell density dependent effects of TGF-beta demonstrated by a plasminogen activator-based assay for TGF-beta." J Cell Physiol **152**(1): 48-55.

- Fleissner, F. and T. Thum (2010). "Critical role of the nitric oxide / reactive oxygen species balance in endothelial progenitor dysfunction." Antioxid Redox Signal.
- Flohe, L., W. A. Gunzler, et al. (1973). "Glutathione peroxidase: a selenoenzyme." FEBS Lett **32**(1): 132-134.
- Fong, G. H., J. Rossant, et al. (1995). "Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium." Nature **376**(6535): 66-70.
- Fontaine, R., M. Kim, et al. (1954). "Surgical treatment of peripheral circulation disorders." Helv Chir Acta **21**(5-6): 499-533.
- Force, U. S. P. S. T. (2008). Screening for type 2 diabetes mellitus in adult: U.S. Preventive Services Task Force Recommendation statement, Ann Intern Med. **148**: 846-854.
- Foresti, R., M. Hoque et al. (2003). "Haem and nitric oxide : synergism in the modulation of endothelial haem oxygenase pathway." Biochem J **372** :381-390.
- Forman, H. (1982). Free Radicals in Biology. New York, Academic Press. Vol. V 65-90.
- Frank, S., Zacharowski, K. et al. (1999). "Identification of copper/zinc superoxide dismutase as a novel nitric oxide-regulated gene in rat glomerular mesangial cells and kidney of endotoxemic rats." FASEB **13** : 869-882.
- Fu, Y., H. Sies, et al. (2001). "Opposite roles of selenium-dependent glutathione peroxidase-1 in superoxide generator diquat- and peroxynitrite-induced apoptosis and signaling." J Biol Chem **276**(46): 43004-43009.

- Fukai, T., R. J. Folz, et al. (2002). "Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease." Cardiovasc Res **55**(2): 239-249.
- Furuya, M., M. Nishiyama, et al. (2005). "Pathophysiology of tumor neovascularization." Vasc Health Risk Manag **1**(4): 277-290.
- Fuster, V., L. Badimon, et al. (1992). "The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1)." N Engl J Med **326**(4): 242-250.
- Galasso, G., S. Schiekofer, et al. (2006). "Impaired angiogenesis in glutathione peroxidase-1-deficient mice is associated with endothelial progenitor cell dysfunction." Circ Res **98**(2): 254-261.
- Galiano, R. D., O. M. Tepper, et al. (2004). "Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells." Am J Pathol **164**(6): 1935-1947.
- Garg, A. (2011). "What is the Role of Alternative Biomarkers for Coronary Heart Disease?" Clin Endocrinol (Oxf) **75**(3) :289-293.
- Gates, P. E., W. D. Strain, et al. (2009). "Human endothelial function and microvascular ageing." Exp Physiol **94**(3): 311-316.
- Genest J, L. P. (2007). Lipoprotein disorders and cardiovascular diseases. A Textbook of Cardiovascular Medicine. B. s. H. Disease. Philadelphia, Saunders Elsevier. Chapter 5. 55-75.
- Genetech. (2011). "Tissue Growth and Repair." Retrieved <http://www.gene.com/gene/research/focusareas/tgr/>, 2011.

- Gennaro, G., C. Menard, et al. (2003). "Age-dependent impairment of reendothelialization after arterial injury: role of vascular endothelial growth factor." Circulation **107**(2): 230-233.
- George, J. C. (2010). "Stem cell therapy in acute myocardial infarction: a review of clinical trials." Transl Res **155**(1): 10-19.
- Georgiou, S., E. Pasmatzi, et al. (2005). "Age-related alterations in the carbohydrate residue composition of the cell surface in the unexposed normal human epidermis." Gerontology **51**(3): 155-160.
- Gerber, H. P., V. Dixit, et al. (1998). "Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells." J Biol Chem **273**(21): 13313-13316.
- Gerber, H. P., A. McMurtrey, et al. (1998). "Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation." J Biol Chem **273**(46): 30336-30343.
- Gering, M., A. R. Rodaway, et al. (1998). "The SCL gene specifies haemangioblast development from early mesoderm." EMBO J **17**(14): 4029-4045.
- Ghio, A. J., H. B. Suliman, et al. (2002). "Overexpression of extracellular superoxide dismutase decreases lung injury after exposure to oil fly ash." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **283**(1): L211-218.
- Ghosh, S., A. J. Janocha, et al. (2006). "Nitrotyrosine proteome survey in asthma identifies oxidative mechanism of catalase inactivation." J Immunol **176**(9): 5587-5597.

- Gibson, C. M., L. Diaz, et al. (1993). "Relation of vessel wall shear stress to atherosclerosis progression in human coronary arteries." Arterioscler Thromb **13**(2): 310-315.
- Gigante, B., G. Morlino, et al. (2006). "Plgf^{-/-}eNos^{-/-} mice show defective angiogenesis associated with increased oxidative stress in response to tissue ischemia." FASEB J **20**(7): 970-972.
- Giordano, F. J. and R. S. Johnson (2001). "Angiogenesis: the role of the microenvironment in flipping the switch." Curr Opin Genet Dev **11**(1): 35-40.
- Gnecchi, M., Z. Zhang, et al. (2008). "Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy." Circ Res **103**(11): 1204-1219.
- Goad, D. L., J. Rubin, et al. (1996). "Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in human SaOS-2 osteoblast-like cells and murine osteoblasts induced by insulin-like growth factor I." Endocrinology **137**(6): 2262-2268.
- Goldstein, S., G. Czapski, et al. (2000). "Tyrosine nitration by simultaneous generation of (.)NO and O-(2) under physiological conditions. How the radicals do the job." J Biol Chem **275**(5): 3031-3036.
- Goligorsky, M. S., M. C. Kuo, et al. (2009). "Review article: endothelial progenitor cells in renal disease." Nephrology (Carlton) **14**(3): 291-297.
- Goyal, M. M. and A. Basak (2010). "Human catalase: looking for complete identity." Protein Cell **1**(10): 888-897.
- Grange, R.W., E., Isotani et al. (2001). "Nitric oxide contributes to vascular smooth muscle relaxation in contracting fast-twitch muscles." Physiol. Genomics **5**: 35-44.

- Griendling, K. K., D. Sorescu, et al. (2000). "Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(10): 2175-2183.
- Groleau, J., S. Dussault, et al. (2010). "Essential Role of Copper-Zinc Superoxide Dismutase for Ischemia-Induced Neovascularization Via Modulation of Bone Marrow-Derived Endothelial Progenitor Cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol.
- Gross, S. S., E. A. Jaffe, et al. (1991). "Cytokine-activated endothelial cells express an isotype of nitric oxide synthase which is tetrahydrobiopterin-dependent, calmodulin-independent and inhibited by arginine analogs with a rank-order of potency characteristic of activated macrophages." Biochem Biophys Res Commun **178**(3): 823-829.
- Gross, S. S. and R. Levi (1992). "Tetrahydrobiopterin synthesis. An absolute requirement for cytokine-induced nitric oxide generation by vascular smooth muscle." J Biol Chem **267**(36): 25722-25729.
- Gu, L., Y. Okada, et al. (1998). "Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice." Mol Cell **2**(2): 275-281.
- Gupta, R., J. Tongers, et al. (2009). "Human studies of angiogenic gene therapy." Circ Res **105**(8): 724-736.
- Guthrie, S. M., L. M. Curtis, et al. (2005). "The nitric oxide pathway modulates hemangioblast activity of adult hematopoietic stem cells." Blood **105**(5): 1916-1922.

- Haddad, P., S. Dussault, et al. (2009). "Nox2-containing NADPH oxidase deficiency confers protection from hindlimb ischemia in conditions of increased oxidative stress." Arterioscler Thromb Vasc Biol **29**(10): 1522-1528.
- Halliwell, B. G. J. (1999). Free Radicals in Biology and Medicine. New York, Oxford University Press.
- Hamed, S., B., Brenner et al. (2009). "Nitric oxide and superoxide dismutase modulate endothelial progenitor cell function in type 2 diabetes mellitus." Cardiovascular diabetology **8**(56) :1-12.
- Hanahan, D. and J. Folkman (1996). "Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis." Cell **86**(3): 353-364.
- Harfouche, R., N. A. Malak, et al. (2005). "Roles of reactive oxygen species in angiotensin-1/tie-2 receptor signaling." FASEB J **19**(12): 1728-1730.
- Harman, D. (1992). "Free radical theory of aging." Mutat Res **275**(3-6): 257-266.
- Harrison, D. G. and M. C. Gongora (2009). "Oxidative stress and hypertension." Med Clin North Am **93**(3): 621-635.
- Hashizume, K., M. Hirasawa, et al. (2008). "Retinal dysfunction and progressive retinal cell death in SOD1-deficient mice." Am J Pathol **172**(5): 1325-1331.
- Hattori, Y., S. Hattori, et al. (1997). "Co-induction of nitric oxide and tetrahydrobiopterin synthesis in the myocardium in vivo." Mol Cell Biochem **166**(1-2): 177-181.
- He, T., M. J. Joyner, et al. (2009). "Aging decreases expression and activity of glutathione peroxidase-1 in human endothelial progenitor cells." Microvasc Res **78**(3): 447-452.

- He, T., T. E. Peterson, et al. (2004). "Human endothelial progenitor cells tolerate oxidative stress due to intrinsically high expression of manganese superoxide dismutase." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(11): 2021-2027.
- Health., (2004). *The Health Consequences of Smoking: Cardiovascular Disease*. Washington DC, U.S. Government Printing Office.
- Heikkila, R. E. and G. Cohen (1973). "6-Hydroxydopamine: evidence for superoxide radical as an oxidative intermediate." Science **181**(98): 456-457.
- Heil, M., I. Eitenmuller, et al. (2006). "Arteriogenesis versus angiogenesis: similarities and differences." J Cell Mol Med **10**(1): 45-55.
- Hirschi, K. K. and P. A. D'Amore (1996). "Pericytes in the microvasculature." Cardiovasc Res **32**(4): 687-698.
- Hirschi, K. K., D. A. Ingram, et al. (2008). "Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**(9): 1584-1595.
- Hoenig, M. R., C. Bianchi, et al. (2008). "Decreased vascular repair and neovascularization with ageing: mechanisms and clinical relevance with an emphasis on hypoxia-inducible factor-1." Curr Mol Med **8**(8): 754-767.
- Holliday, R. (2006). "Aging is no longer an unsolved problem in biology." Ann N Y Acad Sci **1067**: 1-9.
- Holmqvist, K., M. J. Cross, et al. (2004). "The adaptor protein shb binds to tyrosine 1175 in vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 and regulates VEGF-dependent cellular migration." J Biol Chem **279**(21): 22267-22275.
- Holvoet, P. and D. Collen (1997). "Thrombosis and atherosclerosis." Curr Opin Lipidol **8**: 320-328.

- Hotamisligil, G. S., N. S. Shargill, et al. (1993). "Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance." Science **259**(5091): 87-91.
- Houck, K. A., N. Ferrara, et al. (1991). "The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA." Mol Endocrinol **5**(12): 1806-1814.
- Houston, M., A. Estevez, et al. (1999). "Binding of xanthine oxidase to vascular endothelium. Kinetic characterization and oxidative impairment of nitric oxide-dependent signaling." J Biol Chem **274**(8): 4985-4994.
- Huang, P. L., Z. Huang, et al. (1995). "Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase." Nature **377**(6546): 239-242.
- Huo, Y., L. Zhao, et al. (2004). "Critical role of macrophage 12/15-lipoxygenase for atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice." Circulation **110**(14): 2024-2031.
- Ignarro, L. J. (2000). Nitric Oxide : Biology and pathobiology. California, USA, Academic Press.
- Ikeda, S., M. Ushio-Fukai, et al. (2005). "Novel role of ARF6 in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis." Circ Res **96**(4): 467-475.
- Ikeda, Y., N. Fukuda, et al. (2004). "Development of angiogenic cell and gene therapy by transplantation of umbilical cord blood with vascular endothelial growth factor gene." Hypertens Res **27**(2): 119-128.
- Illingworth. (2007). "BIOC1010: Nitrogen Metabolism." Retrieved november, 2010, from <http://www.bmb.leeds.ac.uk/illingworth/bioc1010/index.htm>.

- Imanishi, T., H. Tsujioka et al. (2008). "Endothelial progenitor cells dysfunction and senescence : contribution to oxidative stress." Current cardiovascular reviews **4** :275-286.
- Ingram, D. A., L. E. Mead, et al. (2004). "Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood." Blood **104**(9): 2752-2760.
- Isner, J. M. (1996). "The role of angiogenic cytokines in cardiovascular disease." Clin Immunol Immunopathol **80**(3 Pt 2): S82-91.
- Iwaguro, H., J. Yamaguchi, et al. (2002). "Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration." Circulation **105**(6): 732-738.
- Iwasaki, H., A. Kawamoto, et al. (2006). "Dose-dependent contribution of CD34-positive cell transplantation to concurrent vasculogenesis and cardiomyogenesis for functional regenerative recovery after myocardial infarction." Circulation **113**(10): 1311-1325.
- Jang, J. J., H. K. Ho, et al. (2000). "Angiogenesis is impaired by hypercholesterolemia: role of asymmetric dimethylarginine." Circulation **102**(12): 1414-1419.
- Jiang, C. Q., X. Q. Lao, et al. (2009). "Smoking, smoking cessation and aortic arch calcification in older Chinese: the Guangzhou Biobank Cohort Study." Atherosclerosis **202**(2): 529-534.
- Jeremy, J.Y., D. Rowe et al. (1999). "Nitric oxide and the proliferation of vascular smooth muscle cells." Cardiovascular research **43**: 580-594

- John, S., M. Schlaich, et al. (1998). "Increased bioavailability of nitric oxide after lipid-lowering therapy in hypercholesterolemic patients: a randomized, placebo-controlled, double-blind study." Circulation **98**(3): 211-216.
- Jones, D. P. (2008). "Radical-free biology of oxidative stress." Am J Physiol Cell Physiol **295**(4): C849-868.
- Jones, S. P., W. G. Girod, et al. (2000). "Myocardial reperfusion injury in neuronal nitric oxide synthase deficient mice." Coron Artery Dis **11**(8): 593-597.
- Jourd'heuil, D., F. L. Jourd'heuil, et al. (2001). "Reaction of superoxide and nitric oxide with peroxynitrite. Implications for peroxynitrite-mediated oxidation reactions in vivo." J Biol Chem **276**(31): 28799-28805.
- Joyner, M.J., N.M., Dietz (1997). "Nitric oxide and vasodilation in human limbs." J. Appl. Physiol. **83**(6) :1785-1796.
- Jujo, K., M. Ii, et al. (2008). "Endothelial progenitor cells in neovascularization of infarcted myocardium." J Mol Cell Cardiol **45**(4): 530-544.
- Julou-Schaeffer, G., G. A. Gray, et al. (1990). "Loss of vascular responsiveness induced by endotoxin involves L-arginine pathway." Am J Physiol **259**(4 Pt 2): H1038-1043.
- Jung, O., S. L. Marklund, et al. (2003). "Extracellular superoxide dismutase is a major determinant of nitric oxide bioavailability: in vivo and ex vivo evidence from ecSOD-deficient mice." Circ Res **93**(7): 622-629.
- Jung, Y. D., S. A. Ahmad, et al. (2000). "Role of the tumor microenvironment in mediating response to anti-angiogenic therapy." Cancer Metastasis Rev **19**(1-2): 147-157.

- Jussila, L. and K. Alitalo (2002). "Vascular growth factors and lymphangiogenesis." Physiol Rev **82**(3): 673-700.
- K Wilkins, N. C., MR Joffres, FA McAlister, M Nichol, S Quach et al. (2010). Blood pressure in Canadian adults. P. H. A. o. Canada, Public Health Agency of Canada.
- Kalinowski, L., I. T. Dobrucki, et al. (2002). "Cerivastatin potentiates nitric oxide release and enos expression through inhibition of isoprenoids synthesis." J Physiol Pharmacol **53**(4 Pt 1): 585-595.
- Kalinowski, L., L. W. Dobrucki, et al. (2002). "Increased nitric oxide bioavailability in endothelial cells contributes to the pleiotropic effect of cerivastatin." Circulation **105**(8): 933-938.
- Kalka, C., H. Masuda, et al. (2000). "Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(7): 3422-3427.
- Kalpakcioglu, B. and K. Senel (2008). "The interrelation of glutathione reductase, catalase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and glucose-6-phosphate in the pathogenesis of rheumatoid arthritis." Clin Rheumatol **27**(2): 141-145.
- Kamata, H. and H. Hirata (1999). "Redox regulation of cellular signalling." Cell Signal **11**(1): 1-14.
- Kamihata, H., H. Matsubara, et al. (2001). "Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines." Circulation **104**(9): 1046-1052.

- Karamysheva, A. F. (2008). "Mechanisms of angiogenesis." Biochemistry (Mosc) **73**(7): 751-762.
- Karasu, C. (2010). "Glycooxidative stress and cardiovascular complications in experimentally-induced diabetes: effects of antioxidant treatment." Open Cardiovasc Med J **4**: 240-256.
- Katusic, Z. S. (1996). "Superoxide anion and endothelial regulation of arterial tone." Free Radic Biol Med **20**(3): 443-448.
- Kauser, K. (2007). Bone marrow-derived progenitors. Leipzig, Springer. Chapitre 6. 89-116.
- Kawamoto, A., H. C. Gwon, et al. (2001). "Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia." Circulation **103**(5): 634-637.
- Kawamura, N., T. Ookawara, et al. (1992). "Increased glycated Cu,Zn-superoxide dismutase levels in erythrocytes of patients with insulin-dependent diabetes mellitus." J Clin Endocrinol Metab **74**(6): 1352-1354.
- Kawase, M., K. Murakami, et al. (1999). "Exacerbation of delayed cell injury after transient global ischemia in mutant mice with CuZn superoxide dismutase deficiency." Stroke **30**(9): 1962-1968.
- Khan, S.J., S. Pham et al. (2009). "Stress-induced senescence exaggerates postinjury neointimal formation in the old vasculature." Am J Physiol Heart Circ Physiol **298** : H66-H74.
- Kiefer, F. N., S. Neysari, et al. (2003). "Hypertension and angiogenesis." Curr Pharm Des **9**(21): 1733-1744.

- Kim, H. W., A. Lin, et al. (2007). "Essential role of extracellular SOD in reparative neovascularization induced by hindlimb ischemia." Circ Res **101**(4): 409-419.
- Kinoshita, H., M. Tsutsui, et al. (1997). "Tetrahydrobiopterin, nitric oxide and regulation of cerebral arterial tone." Prog Neurobiol **52**(4): 295-302.
- Kisucka, J., A. K. Chauhan, et al. (2008). "Peroxiredoxin1 prevents excessive endothelial activation and early atherosclerosis." Circ Res **103**(6): 598-605.
- Klasgrun, M. (1995). "Cardiovascular cell growth factors and the arterial wall." Molecular Cardiovascular Medicine. H. E. New York, Scientific American Inc.: 63-78.
- Knockx, M.M. (1998). "Apoptosis in the atherosclerotic plaque : quantitative and qualitative aspects." Atheroscler Thromb Vasc Biol **18** :1519-1522.
- Koehne, P., C., Willam et al. (2000). "Lack of hypoxic stimulation of VEGF secretion from neutrophils and platelets. Am J Physiol Heart Circ Physiol **279** : 817-824.
- Kohen, R. and A. Nyska (2002). "Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification." Toxicol Pathol **30**(6): 620-650.
- Kohnen, S. L., A. A. Mouithys-Mickalad, et al. (2001). "Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite or oxoferryl species occurs by a radical pathway." Free Radic Res **35**(6): 709-721.
- Kondo, T., A. G. Reaume, et al. (1997). "Reduction of CuZn-superoxide dismutase activity exacerbates neuronal cell injury and edema formation after transient focal cerebral ischemia." J Neurosci **17**(11): 4180-4189.

- Koppenol, W. H., J. J. Moreno, et al. (1992). "Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide." Chem Res Toxicol **5**(6): 834-842.
- Kotake, M., R. Shinohara, et al. (1998). "Reduction of activity, but no decrease in concentration, of erythrocyte Cu,Zn-superoxide dismutase by hyperglycaemia in diabetic patients." Diabet Med **15**(8): 668-671.
- Kregel, K. C. and H. J. Zhang (2007). "An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **292**(1): R18-36.
- Krenning, G., M. J. van Luyn, et al. (2009). "Endothelial progenitor cell-based neovascularization: implications for therapy." Trends Mol Med **15**(4): 180-189.
- Kuliszewski, M. A., J. Kobulnik, et al. (2011). "Vascular Gene Transfer of SDF-1 Promotes Endothelial Progenitor Cell Engraftment and Enhances Angiogenesis in Ischemic Muscle." Mol Ther **19**(5): 895-902.
- Kurbel, S., M. Gros, et al. (2009). "Complexity of human circulation design: tips for students." Adv Physiol Educ **33**(2): 130-131.
- Kushner, E., G.V. Guilder, et al. (2010). "Ageing and endothelial progenitor cell release of proangiogenic cytokines." Age Ageing **39**(2): 268-272.
- Kwak, H. J., J. N. So, et al. (1999). "Angiopoietin-1 is an apoptosis survival factor for endothelial cells." FEBS Lett **448**(2-3): 249-253.
- Labarthe, D. R. (1998). Epidemiology and prevention of cardiovascular diseases, Jones & Bartlett Learning. Chapter 1. 3-17.

- Lakatta, E. G. (2003). "Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part III: cellular and molecular clues to heart and arterial aging." Circulation **107**(3): 490-497.
- Lakatta, E. G. and D. Levy (2003). "Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: aging arteries: a "set up" for vascular disease." Circulation **107**(1): 139-146.
- Lambeth, JD. (2007). "Nox enzymes, ROS, and chronic diseases : an exemple of antagonistic pleotropy. " Free Radic Biol Med **43**(3) :332-47.
- Langseth, L. (1996). Oxidants, Antioxidants and disease prevention. Belgium, International Life Science Institute. 1-24.
- Laufs, U., N. Werner, et al. (2004). "Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis." Circulation **109**(2): 220-226.
- Laursen, J. B., M. Somers, et al. (2001). "Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin." Circulation **103**(9): 1282-1288.
- Leblond A, O. S. J. a. C. N. (2009). "Bone marrow mononuclear cells: potential in the treatment of myocardial infarction." Stem Cells and Cloning : Advances and Applications **2**: 11-19.
- Lefevre, J., S. E. Michaud, et al. (2007). "Moderate consumption of red wine (cabernet sauvignon) improves ischemia-induced neovascularization in ApoE-deficient mice: effect on endothelial progenitor cells and nitric oxide." FASEB J **21**(14): 3845-3852.

- Lei, X. G., W. H. Cheng, et al. (2007). "Metabolic regulation and function of glutathione peroxidase-1." Annu Rev Nutr **27**: 41-61.
- Lennon, S. V., S. J. Martin, et al. (1991). "Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli." Cell Prolif **24**(2): 203-214.
- Levesque, J. P., J. Hendy, et al. (2003). "Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by GCSF or cyclophosphamide." J Clin Invest **111**(2): 187-196.
- Li, L. (2005). "Finding the hematopoietic stem cell niche in the placenta." Dev Cell **8**(3): 297-298.
- Li, L.X., J.X. Chen et al. (1998). "Probucol inhibits oxidized-low density lipoprotein-induced adhesion of monocytes to endothelial cells by reducing P-selectin synthesis in vitro." Endothelium **6**: 1-8.
- Li, T. S., K. Hamano, et al. (2003). "CD117+ stem cells play a key role in therapeutic angiogenesis induced by bone marrow cell implantation." Am J Physiol Heart Circ Physiol **285**(3): H931-937.
- Li, T. S., M. Hayashi, et al. (2004). "Low angiogenic potency induced by the implantation of ex vivo expanded CD117(+) stem cells." Am J Physiol Heart Circ Physiol **286**(4): H1236-1241.
- Libby, P. (2002). "Inflammation in atherosclerosis." Nature **420**(6917): 868-874.
- Libby, P., P. M. Ridker, et al. (2002). "Inflammation and atherosclerosis." Circulation **105**(9): 1135-1143.
- Lin, M. T., M. L. Yen, et al. (2003). "Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis by resveratrol through interruption of Src-dependent

- vascular endothelial cadherin tyrosine phosphorylation." Mol Pharmacol **64**(5): 1029-1036.
- Lincoln, T.M., T.L., Cornwell et al. (1996). "The nitric oxide-cyclic GMP signaling system." Biochemistry of Smooth Muscle Contraction, edited by Barany M. New York: Academic, p. 257–268.
- Lloyd-Jones, D., R. Adams, et al. (2009). "Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee." Circulation **119**(3): 480-486.
- Loft, S., P. Moller, et al. (2008). "Antioxidant vitamins and cancer risk: is oxidative damage to DNA a relevant biomarker?" Eur J Nutr **47 Suppl 2**: 19-28.
- Longland, C. J. (1953). "The collateral circulation of the limb; Arris and Gale lecture delivered at the Royal College of Surgeons of England on 4th February, 1953." Ann R Coll Surg Engl **13**(3): 161-176.
- Loomans, C. J., H. Wan, et al. (2006). "Angiogenic murine endothelial progenitor cells are derived from a myeloid bone marrow fraction and can be identified by endothelial NO synthase expression." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(8): 1760-1767.
- Lu, C. (2008). Role of pericytes in angiogenesis. Cancer drug and development : Antiangiogenic agents in cancer therapy. Teicher. Totowa, Humana Press: 117-132.
- Luczak, K., A. Balcerzyk, et al. (2004). "Low concentration of oxidant and nitric oxide donors stimulate proliferation of human endothelial cells in vitro." Cell Biol Int **28**(6): 483-486.

- Lusis, A. J., A. M. Fogelman, et al. (2004). "Genetic basis of atherosclerosis: part I: new genes and pathways." Circulation **110**(13): 1868-1873.
- Lusis, A. J., A. M. Fogelman, et al. (2004). "Genetic basis of atherosclerosis: part II: clinical implications." Circulation **110**(14): 2066-2071.
- Mahmoudi, M., J. Mercer, et al. (2006). "DNA damage and repair in atherosclerosis." Cardiovasc Res **71**(2): 259-268.
- Maier, J. A., M. Statuto, et al. (1993). "Senescence stimulates U937-endothelial cell interactions." Exp Cell Res **208**(1): 270-274.
- Maisonpierre, P. C., C. Suri, et al. (1997). "Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis." Science **277**(5322): 55-60.
- Marin-Corral, J., J. Minguella, et al. (2009). "Oxidised proteins and superoxide anion production in the diaphragm of severe COPD patients." Eur Respir J **33**(6): 1309-1319.
- Maritim, A.C., R.A., Sanders, et al. (2003). "Diabetes, oxidative stress, and antioxidants : a review." J Biochem Molecular Toxicology **17**(1) :24-38.
- Marklund, S. L. (1984). "Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines." J Clin Invest **74**(4): 1398-1403.
- Marklund, S. L., E. Holme, et al. (1982). "Superoxide dismutase in extracellular fluids." Clin Chim Acta **126**(1): 41-51.
- Marikovsky, M., N. Nevo et al. (2002). "Cu/Zn superoxide dismutase plays a role in angiogenesis." Int J Cancer **97** :34-45.
- Marikovsky, M., V. Ziv et al. (2003). "Cu/Zn superoxide dismutase plays a role in immune response." J Immunol **170** :2993-3001.

- Martin (2009). Modalities of Gene Action Predicted by the Classical Evolutionary Theory of Aging. Handbook of theories of aging. Berstern. New York, Springer publishing company. Chapitre 1. 3-23.
- Martin-Rendon, E., S. J. Brunskill, et al. (2008). "Autologous bone marrow stem cells to treat acute myocardial infarction: a systematic review." Eur Heart J **29**(15): 1807-1818.
- Masini, E., S. Cuzzocrea, et al. (2002). "Protective effects of M40403, a selective superoxide dismutase mimetic, in myocardial ischaemia and reperfusion injury in vivo." Br J Pharmacol **136**(6): 905-917.
- Mason, D. P., R. D. Kenagy, et al. (1999). "Matrix metalloproteinase-9 overexpression enhances vascular smooth muscle cell migration and alters remodeling in the injured rat carotid artery." Circ Res **85**(12): 1179-1185.
- Matsumoto, T. and L. Claesson-Welsh (2001). "VEGF receptor signal transduction." Sci STKE **2001**(112): re21.
- Matzuk, M. M., L. Dionne, et al. (1998). "Ovarian function in superoxide dismutase 1 and 2 knockout mice." Endocrinology **139**(9): 4008-4011.
- Maulik, N. and D. K. Das (2002). "Redox signaling in vascular angiogenesis." Free Radic Biol Med **33**(8): 1047-1060.
- Mayer, B., M. John, et al. (1991). "Brain nitric oxide synthase is a biopterin- and flavin-containing multi-functional oxido-reductase." FEBS Lett **288**(1-2): 187-191.
- McCord, J. M. (1985). "Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury." N Engl J Med **312**(3): 159-163.

- McIntyre, M., D. F. Bohr, et al. (1999). "Endothelial function in hypertension: the role of superoxide anion." Hypertension **34**(4 Pt 1): 539-545.
- Medina, R. J., C. L. O'Neill, et al. (2010). "Molecular analysis of endothelial progenitor cell (EPC) subtypes reveals two distinct cell populations with different identities." BMC Med Genomics **3**: 18.
- Medvedev, Z. A. (1990). "An attempt at a rational classification of theories of ageing." Biol Rev Camb Philos Soc **65**(3): 375-398.
- Meister, A. and M.E. Anderson, (1983). "Glutathione." Annu Rev Biochem **52** :711-760.
- Mercer, J., M. Mahmoudi, et al. (2007). "DNA damage, p53, apoptosis and vascular disease." Mutat Res **621**(1-2): 75-86.
- Mertens, A. et P. Holvoet (2001). "Oxidized LDL and HDL :antagonists in atherothrombosis." FASEB **15**: 2073-2084.
- Meselson, M. and F. W. Stahl (1958). "The Replication of DNA in Escherichia Coli." Proc Natl Acad Sci U S A **44**(7): 671-682.
- Metheny-Barlow, L. J. and L. Y. Li (2003). "The enigmatic role of angiopoietin-1 in tumor angiogenesis." Cell Res **13**(5): 309-317.
- Meyer, R. D., C. Latz, et al. (2003). "Recruitment and activation of phospholipase C γ 1 by vascular endothelial growth factor receptor-2 are required for tubulogenesis and differentiation of endothelial cells." J Biol Chem **278**(18): 16347-16355.
- Michallet, M., T. Philip, et al. (2000). "Transplantation with selected autologous peripheral blood CD34⁺Thy1⁺ hematopoietic stem cells (HSCs) in multiple

- myeloma: impact of HSC dose on engraftment, safety, and immune reconstitution." Exp Hematol **28**(7): 858-870.
- Michaud, S. E., S. Dussault, et al. (2006). "Cigarette smoke exposure impairs VEGF-induced endothelial cell migration: role of NO and reactive oxygen species." J Mol Cell Cardiol **41**(2): 275-284.
- Michaud, S. E., S. Dussault, et al. (2006). "Circulating endothelial progenitor cells from healthy smokers exhibit impaired functional activities." Atherosclerosis **187**(2): 423-432.
- Michaud, S. E., C. Menard, et al. (2003). "Inhibition of hypoxia-induced angiogenesis by cigarette smoke exposure: impairment of the HIF-1alpha/VEGF pathway." FASEB J **17**(9): 1150-1152.
- Minamino, T. and I. Komuro (2002). "Role of telomere in endothelial dysfunction in atherosclerosis." Curr Opin Lipidol **13**(5): 537-543.
- Minamino, T. and I. Komuro (2007). "Vascular cell senescence: contribution to atherosclerosis." Circ Res **100**(1): 15-26.
- Minamino, T. and I. Komuro (2008). "Vascular aging: insights from studies on cellular senescence, stem cell aging, and progeroid syndromes." Nat Clin Pract Cardiovasc Med **5**(10): 637-648.
- Minamino, T., H. Miyauchi, et al. (2002). "Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: role of telomere in endothelial dysfunction." Circulation **105**(13): 1541-1544.
- Minamino, T., H. Miyauchi, et al. (2004). "Vascular cell senescence and vascular aging." J Mol Cell Cardiol **36**(2): 175-183.

- Minamino, T., T. Yoshida, et al. (2003). "Ras induces vascular smooth muscle cell senescence and inflammation in human atherosclerosis." Circulation **108**(18): 2264-2269.
- Miraglia, S., W. Godfrey, et al. (1997). "A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning." Blood **90**(12): 5013-5021.
- Mohan, I.K. and U.N. Das (1998). "Effect of L-arginine-nitric oxide system on chemical-induced diabetes mellitus." Free Radic Biol Med **25** :757-765.
- Moldovan, N.I. et K. Havemann (2002). "Transdifferentiation, a potential mechanism for covering vascular grafts grown within recipient's peritoneal cavity with endothelial-like cells." Circ Res **91** : e1-e9.
- Moldovan, L. et N.I. Moldovan (2005). "Role of monocytes and macrophages in angiogenesis." EXS 127-146.
- Moore, D. H. and H. Ruska (1957). "The fine structure of capillaries and small arteries." J Biophys Biochem Cytol **3**(3): 457-462.
- Moreno, P. R., J. Sanz, et al. (2009). "Promoting mechanisms of vascular health: circulating progenitor cells, angiogenesis, and reverse cholesterol transport." J Am Coll Cardiol **53**(25): 2315-2323.
- Morikawa, T., J.I. Kadota et al. (2000). "Superoxide dismutase in alveolar macrophages from patients with diffuse panbronchiolitis." Respiration **67** : 546-551.
- Moulton, K. S. (2001). "Plaque angiogenesis and atherosclerosis." Curr Atheroscler Rep **3**(3): 225-233.

- Mosca, L., P. Collins et al. (2001) "Hormone replacement therapy and cardiovascular disease. A statement for healthcare professionals from the American Heart Association." Circulation **104** :499-503
- Munoz-Chapuli, R., A. R. Quesada, et al. (2004). "Angiogenesis and signal transduction in endothelial cells." Cell Mol Life Sci **61**(17): 2224-2243.
- Murasawa, S., J. Llevadot, et al. (2002). "Constitutive human telomerase reverse transcriptase expression enhances regenerative properties of endothelial progenitor cells." Circulation **106**(9): 1133-1139.
- Murohara, T. (2003). "Angiogenesis and vasculogenesis for therapeutic neovascularization." Nagoya J Med Sci **66**(1-2): 1-7.
- Murohara, T., T. Asahara, et al. (1998). "Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia." J Clin Invest **101**(11): 2567-2578.
- Murohara, T., H. Ikeda, et al. (2000). "Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization." J Clin Invest **105**(11): 1527-1536.
- Murohara, T., B. Witzenbichler, et al. (1999). "Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell migration." Arterioscler Thromb Vasc Biol **19**(5): 1156-1161.
- Murry, C. E., M. H. Soonpaa, et al. (2004). "Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts." Nature **428**(6983): 664-668.
- Nakamura, Y., K. Ando, et al. (1999). "Ex vivo generation of CD34(+) cells from CD34(-) hematopoietic cells." Blood **94**(12): 4053-4059.

- Nakashima, Y., T. N. Wight, et al. (2008). "Early atherosclerosis in humans: role of diffuse intimal thickening and extracellular matrix proteoglycans." Cardiovasc Res **79**(1): 14-23.
- Newman, W. A. (2007). Dorland's Illustrated Medical Dictionary, Saunders.
- Nicholls (2000). "Enzymology and structure of catalases." Advances in Inorganic Chemistry **51**: 51-106.
- Niimi (2009). "Current status of therapeutic angiogenesis with protein, gene and cell therapy." Current Drug Therapy **4**(3): 221-233.
- Nijveldt, R. J., E. van Nood, et al. (2001). "Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications." Am J Clin Nutr **74**(4): 418-425.
- Nilsson, P. M., P. Boutouyrie, et al. (2009). "Vascular aging: A tale of EVA and ADAM in cardiovascular risk assessment and prevention." Hypertension **54**(1): 3-10.
- North, S., M. Moenner, et al. (2005). "Recent developments in the regulation of the angiogenic switch by cellular stress factors in tumors." Cancer Lett **218**(1): 1-14.
- Ohashi, K., N. Ouchi, et al. (2009). "Adiponectin promotes revascularization of ischemic muscle through a cyclooxygenase 2-dependent mechanism." Mol Cell Biol **29**(13): 3487-3499.
- Orlic, D., J. Kajstura, et al. (2001). "Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium." Nature **410**(6829): 701-705.
- Owens, G.K., P.S., Rabinovitch et al. (1981). "Smooth muscle cell hypertrophy versus hyperplasia in hypertension." Proc. Natl. Acad. Sci. **78**(12) :759-7763.

- Ozerdem, U. and W. B. Stallcup (2003). "Early contribution of pericytes to angiogenic sprouting and tube formation." Angiogenesis **6**(3): 241-249.
- Pacilli, A., G. Faggioli, et al. (2010). "An update on therapeutic angiogenesis for peripheral vascular disease." Ann Vasc Surg **24**(2): 258-268.
- Packard, R. R. and P. Libby (2008). "Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction." Clin Chem **54**(1): 24-38.
- Paigen, K. (2003). "One hundred years of mouse genetics: an intellectual history. II. The molecular revolution (1981-2002)." Genetics **163**(4): 1227-1235.
- Paul, J. (2009). "Physiopathologie de l'athérosclérose et marqueurs précoces." Revue francophone des laboratoires **2009**(409): 41-50.
- Peichev, M., A. J. Naiyer, et al. (2000). "Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors." Blood **95**(3): 952-958.
- Perez-Lopez, F. R., L. Larrad-Mur, et al. (2010). "Gender differences in cardiovascular disease: hormonal and biochemical influences." Reprod Sci **17**(6): 511-531.
- Perez-Soler, R., G. Lopez-Berestein, et al. (1985). "Superoxide anion (O⁻²) production by peripheral blood monocytes in Hodgkin's disease and malignant lymphoma." J Clin Oncol **3**(5): 641-645.
- Pittenger, M. F. and B. J. Martin (2004). "Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics." Circ Res **95**(1): 9-20.
- Pou, S., W. S. Pou, et al. (1992). "Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase." J Biol Chem **267**(34): 24173-24176.

- Prater, D. N., J. Case, et al. (2007). "Working hypothesis to redefine endothelial progenitor cells." Leukemia **21**(6): 1141-1149.
- Rajewsky, K., H. Gu, et al. (1996). "Conditional gene targeting." J Clin Invest **98**(3): 600-603.
- Rankin, S. M. (2008). "Impact of bone marrow on respiratory disease." Curr Opin Pharmacol **8**(3): 236-241.
- Rey, F. E. and P. J. Pagano (2002). "The reactive adventitia: fibroblast oxidase in vascular function." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(12): 1962-1971.
- Ribera-Casado, J. M. (1999). "Ageing and the cardiovascular system." Z Gerontol Geriatr **32**(6): 412-419.
- Richardson, M. R. and M. C. Yoder (2010). "Endothelial progenitor cells: Quo Vadis?" J Mol Cell Cardiol.
- Risau, W. (1995). "Differentiation of endothelium." FASEB J **9**(10): 926-933.
- Risau, W., H. Sariola, et al. (1988). "Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies." Development **102**(3): 471-478.
- Rissanen, T. T., J. Rutanen, et al. (2004). "Gene transfer for therapeutic vascular growth in myocardial and peripheral ischemia." Adv Genet **52**: 117-164.
- Rivard, A., L. Berthou-Soulie, et al. (2000). "Age-dependent defect in vascular endothelial growth factor expression is associated with reduced hypoxia-inducible factor 1 activity." J Biol Chem **275**(38): 29643-29647.
- Rivard, A., J. E. Fabre, et al. (1999). "Age-dependent impairment of angiogenesis." Circulation **99**(1): 111-120.

- Rivard, A., M. Silver, et al. (1999). "Rescue of diabetes-related impairment of angiogenesis by intramuscular gene therapy with adeno-VEGF." Am J Pathol **154**(2): 355-363.
- Rocha, V. Z. and P. Libby (2009). "Obesity, inflammation, and atherosclerosis." Nat Rev Cardiol **6**(6): 399-409.
- Rojas, A., H. Figueroa, et al. (2006). "Oxidative stress at the vascular wall. Mechanistic and pharmacological aspects." Arch Med Res **37**(4): 436-448.
- Rojo, A.I., M. Salinas et al. (2004). "Regulation of Cu/Zn-superoxide dismutase expression via the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt pathway and nuclear factor kappaB." The journal of neuroscience **24**(33) :7324-7334.
- Ross, R. and J. A. Glomset (1973). "Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis." Science **180**(93): 1332-1339.
- Ross, R. and L. Harker (1976). "Hyperlipidemia and atherosclerosis." Science **193**(4258): 1094-1100.
- Rotruck, J. T., A. L. Pope, et al. (1973). "Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase." Science **179**(73): 588-590.
- Rubbo, H. and V. O'Donnell (2005). "Nitric oxide, peroxynitrite and lipoxygenase in atherogenesis: mechanistic insights." Toxicology **208**(2): 305-317.
- Salminen, U., A. L. Harjula, et al. (2001). "Superoxide dismutase in development of obliterative bronchiolitis." Transplant Proc **33**(4): 2477.
- Salvemini, D., D. P. Riley, et al. (1999). "Protective effects of a superoxide dismutase mimetic and peroxynitrite decomposition catalysts in endotoxin-induced intestinal damage." Br J Pharmacol **127**(3): 685-692.

- Samani, N. J., R. Boulby, et al. (2001). "Telomere shortening in atherosclerosis." Lancet **358**(9280): 472-473.
- Santrucek, M. and J. Krepelka (1988). "Antioxidants from the aspect of their potential use in chemotherapy." Cesk Farm **37**(3): 121-128.
- Sato, T., J. H. Laver, et al. (1999). "Reversible expression of CD34 by murine hematopoietic stem cells." Blood **94**(8): 2548-2554.
- Schachinger, V., M. B. Britten, et al. (1999). "A positive family history of premature coronary artery disease is associated with impaired endothelium-dependent coronary blood flow regulation." Circulation **100**(14): 1502-1508.
- Schachinger, V., M. B. Britten, et al. (2000). "Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease." Circulation **101**(16): 1899-1906.
- Schaper, W. (1993). "New paradigms for collateral vessel growth." Basic Res Cardiol **88**(3): 193-198.
- Schini-Kerth, V. B. and P. M. Vanhoutte (1995). "Nitric oxide synthases in vascular cells." Exp Physiol **80**(6): 885-905.
- Schleicher, E. and U. Friess (2007). "Oxidative stress, AGE, and atherosclerosis." Kidney Int Suppl(106): S17-26.
- Schofield, R. (1978). "The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell." Blood Cells **4**(1-2): 7-25.
- Scholz, D., T. Ziegelhoeffer et al. (2002). "Contribution of arteriogenesis and angiogenesis to postocclusive hindlimb perfusion in mice." J Moll Cell Cardiol **34** :775-787.

- Schonbeck, U., G. K. Sukhova, et al. (1999). "Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions." Am J Pathol **155**(4): 1281-1291.
- Scott, B.C., O.I. Aruomo, et al. (1994). "Lipoic acid and dihydrolipoic acids as antioxidants. A critical evaluation." **20** :119-133.
- Sentman, M. L., M. Granstrom, et al. (2006). "Phenotypes of mice lacking extracellular superoxide dismutase and copper- and zinc-containing superoxide dismutase." J Biol Chem **281**(11): 6904-6909.
- Shanmugam, N., A. Roman-Rego, et al. (2010). "Atherosclerotic Plaque Regression: Fact or Fiction?" Cardiovasc Drugs Ther.
- Shintani, S., T. Murohara, et al. (2001). "Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction." Circulation **103**(23): 2776-2779.
- Shintani, S., T. Murohara, et al. (2001). "Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation." Circulation **103**(6): 897-903.
- Shireman, P.K. (2007). "The chemokine system in arteriogenesis and hind limb ischemia." Journal of vascular surgery **45**(A) : 48-56.
- Shireman, P.K., V. Contreras-Shannon et al. (2006). "MCP-1 parallels inflammatory and regenerative responses in ischemic muscle." J Surg Res **134** :145-157.
- Sieveking, D. P., A. Buckle, et al. (2008). "Strikingly different angiogenic properties of endothelial progenitor cell subpopulations: insights from a novel human angiogenesis assay." J Am Coll Cardiol **51**(6): 660-668.

- Silvagno, F., H. Xia, et al. (1996). "Neuronal nitric-oxide synthase- μ , an alternatively spliced isoform expressed in differentiated skeletal muscle." J Biol Chem **271**(19): 11204-11208.
- Simons, M. and J. A. Ware (2003). "Therapeutic angiogenesis in cardiovascular disease." Nat Rev Drug Discov **2**(11): 863-871.
- Smith, C. J., J. D. Morrow, et al. (1997). "Induction of prostaglandin endoperoxide synthase-1 (COX-1) in a human promonocytic cell line by treatment with the differentiating agent TPA." Adv Exp Med Biol **400A**: 99-106.
- Sperling, C., S. Schwartz et al. (1997). "Expression of the stem cell factor receptor c-kit (CD117) in acute leukemias." Haematologia **82** :617-621.
- Spradling, A., D. Drummond-Barbosa, et al. (2001). "Stem cells find their niche." Nature **414**(6859): 98-104.
- Steinberg, D. (2005). "Thematic review series: the pathogenesis of atherosclerosis: an interpretive history of the cholesterol controversy, part III: mechanistically defining the role of hyperlipidemia." J Lipid Res **46**(10): 2037-2051.
- Steinberg, D. (2006). "Thematic review series: the pathogenesis of atherosclerosis. An interpretive history of the cholesterol controversy, part V: the discovery of the statins and the end of the controversy." J Lipid Res **47**(7): 1339-1351.
- Steinberg, D., S. Parthasarathy, et al. (1989). "Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity." N Engl J Med **320**(14): 915-924.
- Steinberg, D. and J. L. Witztum (2002). "Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? Do the antioxidant trials conducted to date refute the hypothesis?" Circulation **105**(17): 2107-2111.

- Steinmetz, M., G. Nickenig, et al. (2010). "Endothelial-regenerating cells: an expanding universe." Hypertension **55**(3): 593-599.
- Stephens, N. G., A. Parsons, et al. (1996). "Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS)." Lancet **347**(9004): 781-786.
- Stocker, F. (1991). Endogenous antioxidant defenses in human blood plasma. Oxidative Stress: Oxidants and Anti-oxidants. H. Sies. Londo, Academic: 213-243.
- Stocker, R. and J. F. Keaney, Jr. (2004). "Role of oxidative modifications in atherosclerosis." Physiol Rev **84**(4): 1381-1478.
- Stocker, R. and J. F. Keaney, Jr. (2005). "New insights on oxidative stress in the artery wall." J Thromb Haemost **3**(8): 1825-1834.
- Stone, J. R. and T. Collins (2002). "The role of hydrogen peroxide in endothelial proliferative responses." Endothelium **9**(4): 231-238.
- Stralin, P., K. Karlsson, et al. (1995). "The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase." Arterioscler Thromb Vasc Biol **15**(11): 2032-2036.
- Strazzullo, P., S. M. Kerry, et al. (2007). "Do statins reduce blood pressure?: a meta-analysis of randomized, controlled trials." Hypertension **49**(4): 792-798.
- Sugino, N., A. Karube-Harada, et al. (2002). "Differential regulation of copper-zinc superoxide dismutase and manganese superoxide dismutase by progesterone withdrawal in human endometrial stromal cells." Molecular Human Reproduction **8**(1) :68-74.

- Suwaidi, J. A., S. Hamasaki, et al. (2000). "Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction." Circulation **101**(9): 948-954.
- Suzuki, Y.J., M. Tsuchiya, et al. (1991). "Thioctic acid and dihydrolipoic acid are novel antioxidants which can interact with reactive oxygen species." Free Radic Res Commun **15** :255-263.
- Swindell, H., Miller (2008). "How long will my mouse live? Machine learning approaches for prediction of mouse lifespan." J Gerontol A Biol Sci Med Sci. **63**(9): 895-906.
- Szekanecz, Z. and A. E. Koch (2008). "Targeting Angiogenesis in Rheumatoid Arthritis." Curr Rheumatol Rev **4**(4): 298-303.
- Tabas, I., Y. Li, et al. (1993). "Lipoprotein lipase and sphingomyelinase synergistically enhance the association of atherogenic lipoproteins with smooth muscle cells and extracellular matrix. A possible mechanism for low density lipoprotein and lipoprotein(a) retention and macrophage foam cell formation." J Biol Chem **268**(27): 20419-20432.
- Tabas, I., K. J. Williams, et al. (2007). "Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications." Circulation **116**(16): 1832-1844.
- Takahashi, T., C. Kalka, et al. (1999). "Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization." Nat Med **5**(4): 434-438.

- Takahashi, T. and M. Shibuya (1997). "The 230 kDa mature form of KDR/Flk-1 (VEGF receptor-2) activates the PLC-gamma pathway and partially induces mitotic signals in NIH3T3 fibroblasts." Oncogene **14**(17): 2079-2089.
- Takahashi, T., S. Yamaguchi, et al. (2001). "A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells." EMBO J **20**(11): 2768-2778.
- Tao, J., Z., Yang et al. (2007). "Shear stress increases Cu/ZnSOD activity and mRNA expression in human endothelial progenitor cells." Journal of Human Hypertension **21** :353-358.
- Tastekin, A., A. Gepdiremen et al. (2006). "Protective effect of L-carnitine against bilirubin-induced neuronal cell death." Brain and development **28** :436-439.
- Teo, K. K. (2005). Risk Factors for Peripheral Arterial Disease - Traditional and Emerging, Lifestyle Modification and Evidence for Symptom Relief Canadian Cardiovascular Society Concensus Conference: 187.
- Teodoro, J.G., E. Albert et al. (2006). "p-53-mediated inhibition of angiogenesis through up-regulation of collagen prolyl hydroxylase." Science **313** : 968-971.
- Teodoro, J.G., S.K. Evans et al. (2007). "Inhibition of tumor angiogenesis by p53 : a new role for the guardian of the genome." J Mol Med **85** : 1175-1186.
- Tepper, O. M., R. D. Galiano, et al. (2002). "Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures." Circulation **106**(22): 2781-2786.
- Thomas, G. N., P. Chook, et al. (2008). "Smoking without exception adversely affects vascular structure and function in apparently healthy Chinese: implications in global atherosclerosis prevention." Int J Cardiol **128**(2): 172-177.

- Thorin, E., C.A. Hamilton et al. (1994). "Chronic exposure of cultured bovine endothelial cells to oxidized LDL abolishes prostacyclin release." Arterioscler Thromb **14**: 453-459.
- Thum, T., D. Fraccarollo, et al. (2007). "Endothelial nitric oxide synthase uncoupling impairs endothelial progenitor cell mobilization and function in diabetes." Diabetes **56**(3): 666-674.
- Timmermans, F., F. Van Hauwermeiren, et al. (2007). "Endothelial outgrowth cells are not derived from CD133+ cells or CD45+ hematopoietic precursors." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(7): 1572-1579.
- Timmermans, F. J. Plum, et al. (2009). "Endothelial progenitor cells : identity defined ?" J. Cell. Mol. Med. **13**(1) :87-102
- Tischer, E., R. Mitchell, et al. (1991). "The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing." J Biol Chem **266**(18): 11947-11954.
- Tojo, T., M. Ushio-Fukai, et al. (2005). "Role of gp91phox (Nox2)-containing NAD(P)H oxidase in angiogenesis in response to hindlimb ischemia." Circulation **111**(18): 2347-2355.
- Tongers, J., J. G. Roncalli, et al. (2010). "Role of endothelial progenitor cells during ischemia-induced vasculogenesis and collateral formation." Microvasc Res **79**(3): 200-206.
- Tsigkos, S., M. Koutsilieris, et al. (2003). "Angiopoietins in angiogenesis and beyond." Expert Opin Investig Drugs **12**(6): 933-941.

- Turan, R. G., M. Brehm, et al. (2007). "Factors influencing spontaneous mobilization of CD34+ and CD133+ progenitor cells after myocardial infarction." Eur J Clin Invest **37**(11): 842-851.
- Turgeon, J., S. Dussault, et al. (2010). "Probucol and antioxidant vitamins rescue ischemia-induced neovascularization in mice exposed to cigarette smoke: potential role of endothelial progenitor cells." Atherosclerosis **208**(2): 342-349.
- Uchiyama, S., T. Shimizu, et al. (2006). "CuZn-SOD deficiency causes ApoB degradation and induces hepatic lipid accumulation by impaired lipoprotein secretion in mice." J Biol Chem **281**(42): 31713-31719.
- Ungvari, Z., G. Kaley, et al. (2010). "Mechanisms of vascular aging: new perspectives." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **65**(10): 1028-1041.
- Ungvari, Z., N. Labinskyy, et al. (2008). "Dysregulation of mitochondrial biogenesis in vascular endothelial and smooth muscle cells of aged rats." Am J Physiol Heart Circ Physiol **294**(5): H2121-2128.
- Upston, J. M., J. Neuzil, et al. (1996). "Oxidation of LDL by recombinant human 15-lipoxygenase: evidence for alpha-tocopherol-dependent oxidation of esterified core and surface lipids." J Lipid Res **37**(12): 2650-2661.
- Upston, J. M., J. Neuzil, et al. (1997). "Oxidation of free fatty acids in low density lipoprotein by 15-lipoxygenase stimulates nonenzymic, alpha-tocopherol-mediated peroxidation of cholesteryl esters." J Biol Chem **272**(48): 30067-30074.

- Urao, N., H. Inomata, et al. (2008). "Role of nox2-based NADPH oxidase in bone marrow and progenitor cell function involved in neovascularization induced by hindlimb ischemia." Circ Res **103**(2): 212-220.
- Urbich, C., A. Aicher, et al. (2005). "Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells." J Mol Cell Cardiol **39**(5): 733-742.
- Urbich, C., E. Dernbach, et al. (2002). "CD40 ligand inhibits endothelial cell migration by increasing production of endothelial reactive oxygen species." Circulation **106**(8): 981-986.
- Urbich, C. and S. Dimmeler (2004). "Endothelial progenitor cells functional characterization." Trends Cardiovasc Med **14**(8): 318-322.
- Urbich, C. and S. Dimmeler (2004). "Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology." Circ Res **95**(4): 343-353.
- Urbich, C., C. Heeschen, et al. (2003). "Relevance of monocytic features for neovascularization capacity of circulating endothelial progenitor cells." Circulation **108**(20): 2511-2516.
- Ushio-Fukai, M., Y. Tang, et al. (2002). "Novel role of gp91(phox)-containing NAD(P)H oxidase in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis." Circ Res **91**(12): 1160-1167.
- Vajanto, I., T. T. Rissanen, et al. (2002). "Evaluation of angiogenesis and side effects in ischemic rabbit hindlimbs after intramuscular injection of adenoviral vectors encoding VEGF and LacZ." J Gene Med **4**(4): 371-380.

- Valko, M., D. Leibfritz, et al. (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." Int J Biochem Cell Biol **39**(1): 44-84.
- Vallance, P. (1992). "Endothelial regulation of vascular tone." Postgrad Med J **68**(803): 697-701.
- Van Belle, E., A. Rivard, et al. (1997). "Hypercholesterolemia attenuates angiogenesis but does not preclude augmentation by angiogenic cytokines." Circulation **96**(8): 2667-2674.
- van der Loo, B., M. Bachschmid, et al. (2006). "Age-associated cellular relocation of Sod 1 as a self-defense is a futile mechanism to prevent vascular aging." Biochem Biophys Res Commun **344**(3): 972-980.
- van der Wal, A. C. and A. E. Becker (1999). "Atherosclerotic plaque rupture--pathologic basis of plaque stability and instability." Cardiovasc Res **41**(2): 334-344.
- Varela, I., J. Cadinanos, et al. (2005). "Accelerated ageing in mice deficient in Zmpste24 protease is linked to p53 signalling activation." Nature **437**(7058): 564-568.
- Vasa, M., S. Fichtlscherer, et al. (2001). "Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease." Circ Res **89**(1): E1-7.
- Vepa, S., W. M. Scribner, et al. (1999). "Hydrogen peroxide stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase in vascular endothelial cells." Am J Physiol **277**(1 Pt 1): L150-158.

- Verma, S. (2005). Pathophysiology of atherosclerosis. Canadian Cardiovascular Society Consensus Conference: 3-1 to 3-21.
- Verma, S., M. R. Buchanan, et al. (2003). "Endothelial function testing as a biomarker of vascular disease." Circulation **108**(17): 2054-2059.
- Versari, D., E. Daghini, et al. (2009). "The ageing endothelium, cardiovascular risk and disease in man." Exp Physiol **94**(3): 317-321.
- Vita, J. A., C. B. Treasure, et al. (1990). "Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease." Circulation **81**(2): 491-497.
- Voghel, G., N. Thorin-Trescases, et al. (2007). "Cellular senescence in endothelial cells from atherosclerotic patients is accelerated by oxidative stress associated with cardiovascular risk factors." Mech Ageing Dev **128**(11-12): 662-671.
- Voghel, G., N. Thorin-Trescases, et al. (2010). "Endogenous oxidative stress prevents telomerase-dependent immortalization of human endothelial cells." Mech Ageing Dev **131**(5): 354-363.
- Walter, D. H., S. Fichtlscherer, et al. (2001). "Statin therapy, inflammation and recurrent coronary events in patients following coronary stent implantation." J Am Coll Cardiol **38**(7): 2006-2012.
- Wassmann, S., K. Wassmann, et al. (2004). "Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells." Hypertension **44**(4): 381-386.
- Wang, X., Y. Yu, et al. (2011). "Alpha-lipoic acid protects against myocardial ischemia/reperfusion injury via multiple target effects." Food and chemical toxicology in press.

- Weinberg, R. B., B. S. VanderWerken, et al. (2001). "Pro-oxidant effect of vitamin E in cigarette smokers consuming a high polyunsaturated fat diet." Arterioscler Thromb Vasc Biol **21**(6): 1029-1033.
- Weiss, M. J. and S. H. Orkin (1996). "In vitro differentiation of murine embryonic stem cells. New approaches to old problems." J Clin Invest **97**(3): 591-595.
- Weitzman, M., S. Cook, et al. (2005). "Tobacco smoke exposure is associated with the metabolic syndrome in adolescents." Circulation **112**(6): 862-869.
- Werner, N. and G. Nickenig (2006). "Influence of cardiovascular risk factors on endothelial progenitor cells: limitations for therapy?" Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(2): 257-266.
- Weskamp, G., K. Mendelson, et al. (2010). "Pathological neovascularization is reduced by inactivation of ADAM17 in endothelial cells but not in pericytes." Circ Res **106**(5): 932-940.
- Wever, R. M., T. van Dam, et al. (1997). "Tetrahydrobiopterin regulates superoxide and nitric oxide generation by recombinant endothelial nitric oxide synthase." Biochem Biophys Res Commun **237**(2): 340-344.
- White, C. R., T. A. Brock, et al. (1994). "Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(3): 1044-1048.
- Wilkinson-Berka, J. L. (2004). "Vasoactive factors and diabetic retinopathy: vascular endothelial growth factor, cyclooxygenase-2 and nitric oxide." Curr Pharm Des **10**(27): 3331-3348.
- Williams, K. J. and I. Tabas (1995). "The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **15**(5): 551-561.

- Witzenbichler, B., P. C. Maisonpierre, et al. (1998). "Chemotactic properties of angiopoietin-1 and -2, ligands for the endothelial-specific receptor tyrosine kinase Tie2." J Biol Chem **273**(29): 18514-18521.
- Woodman, C. R., E. M. Price, et al. (2002). "Aging induces muscle-specific impairment of endothelium-dependent dilation in skeletal muscle feed arteries." J Appl Physiol **93**(5): 1685-1690.
- Wu, Z., Y. Zhao, et al. (2010). "Superoxide anion, uncoupling proteins and Alzheimer's disease." J Clin Biochem Nutr **46**(3): 187-194.
- Wyler von Ballmoos, M., Z. Yang, et al. (2010). "Endothelial Progenitor Cells Induce a Phenotype Shift in Differentiated Endothelial Cells towards PDGF/PDGFRbeta Axis-Mediated Angiogenesis." PLoS One **5**(11): e14107.
- Xu, J., Z. Xie, et al. (2006). "Uncoupling of endothelial nitric oxidase synthase by hypochlorous acid: role of NAD(P)H oxidase-derived superoxide and peroxynitrite." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(12): 2688-2695.
- Yamanobe, T., F. Okada, et al. (2007). "Deterioration of ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in SOD1-deficient mice." Free Radic Res **41**(2): 200-207.
- Yamaoka-Tojo, M., M. Ushio-Fukai, et al. (2004). "IQGAP1, a novel vascular endothelial growth factor receptor binding protein, is involved in reactive oxygen species--dependent endothelial migration and proliferation." Circ Res **95**(3): 276-283.
- Yang, J., E. Chang, et al. (1999). "Human endothelial cell life extension by telomerase expression." J Biol Chem **274**(37): 26141-26148.

- Yang, Z., M. W. von Ballmoos, et al. (2010). "Paracrine factors secreted by endothelial progenitor cells prevent oxidative stress-induced apoptosis of mature endothelial cells." Atherosclerosis **211**(1): 103-109.
- Yasuda, M., Y. Ohzeki, et al. (1999). "Stimulation of in vitro angiogenesis by hydrogen peroxide and the relation with ETS-1 in endothelial cells." Life Sci **64**(4): 249-258.
- Yasui, K. and A. Baba (2006). "Therapeutic potential of superoxide dismutase (SOD) for resolution of inflammation." Inflamm Res **55**(9): 359-363.
- Yin, A. H., S. Miraglia, et al. (1997). "AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells." Blood **90**(12): 5002-5012.
- Yin, T. and L. Li (2006). "The stem cell niches in bone." J Clin Invest **116**(5): 1195-1201.
- Yoder, M. C. (2009). "Defining human endothelial progenitor cells." J Thromb Haemost **7 Suppl 1**: 49-52.
- Yoder, M. C. and D. A. Ingram (2009). "Endothelial progenitor cell: ongoing controversy for defining these cells and their role in neoangiogenesis in the murine system." Curr Opin Hematol **16**(4): 269-273.
- Yoon, C. H., M. Koyanagi, et al. (2010). "Mechanism of improved cardiac function after bone marrow mononuclear cell therapy: role of cardiovascular lineage commitment." Circulation **121**(18): 2001-2011.
- Yoshida, T., M. Watanabe, et al. (1996). "Transgenic mice overexpressing glutathione peroxidase are resistant to myocardial ischemia reperfusion injury." J Mol Cell Cardiol **28**(8): 1759-1767.

- Zampetaki, A., J. P. Kirton, et al. (2008). "Vascular repair by endothelial progenitor cells." Cardiovasc Res **78**(3): 413-421.
- Zeiger, A. M., T. Krause, et al. (1995). "Impaired endothelium-dependent vasodilation of coronary resistance vessels is associated with exercise-induced myocardial ischemia." Circulation **91**(9): 2345-2352.
- Zeoli, A., P. Dentelli, et al. (2009). "Endothelial progenitor cells and their potential clinical implication in cardiovascular disorders." J Endocrinol Invest **32**(4): 370-382.
- Zhang, S. J., H. Zhang, et al. (2006). "Adult endothelial progenitor cells from human peripheral blood maintain monocyte/macrophage function throughout in vitro culture." Cell Res **16**(6): 577-584.
- Zhao, H., H. Jin, et al. (2009). "Inhibition of pathologic retinal neovascularization by a small peptide derived from human apolipoprotein(a)." Invest Ophthalmol Vis Sci **50**(11): 5384-5395.
- Zhou, Y., S.J. Fisher et al. (1997). "Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion?" J Clin Invest **99**:2139-2151.
- Ziche, M., L. Morbidelli, et al. (1994). "Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P." J Clin Invest **94**(5): 2036-2044.
- Zou, M. H., C. Shi, et al. (2002). "Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite." J Clin Invest **109**(6): 817-826.

