

Université de Montréal

L'effet de l'hyperoxie néonatale sur la néovascularisation post-ischémique à l'âge adulte

par
Raphaël Mathieu

Faculté de Médecine

Mémoire **présenté** à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Maître
en Sciences Biomédicales

Septembre 2018
Copyright, Raphaël Mathieu, 2018

Résumé

Il est de plus en plus reconnu que les conditions néonatales, incluant la prématurité, peuvent moduler de façon significative la santé cardiovasculaire chez l'adulte. Les bébés prématurés sont souvent exposés à de hauts niveaux d'oxygène, ce qui dans des modèles animaux a été associé chez l'adulte au développement de la dysfonction endothéliale, de l'hypertension et du remodelage cardiaque. La néovascularisation est un mécanisme de défense essentiel contre les maladies vasculaires ischémiques. Ici nous avons testé l'hypothèse qu'une exposition néonatale à un haut taux d'oxygène pourrait porter atteinte à la néovascularisation post-ischémique à l'âge adulte.

Des souris C57BL/6 ont été exposées à l'hyperoxie (85% O₂) ou à la normoxie (20% O₂) du jour 2 à 14 après leur naissance. Lorsque les souris ont atteint la maturité (6 à 8 semaines), une ischémie du membre postérieur a été réalisée de façon chirurgicale, par le retrait de l'artère fémorale. Nous avons découvert que l'hyperoxie néonatale est associée à une diminution significative de la récupération du flux sanguin après l'ischémie du membre postérieur, comme démontré par l'imagerie au moyen d'un Laser Doppler. Les ratios du flux Doppler sont significativement diminués chez les souris exposées à l'hyperoxie néonatale au jour 7 et au jour 21 après la chirurgie. Au niveau des muscles ischémiques, l'hyperoxie néonatale est associée à une diminution de la densité capillaire, une augmentation du stress oxydant et une réduction de l'expression de l'enzyme superoxyde dismutase de type 1 (SOD1) et du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF).

Les cellules angiogéniques circulantes (PACs) ont un rôle important dans la néovascularisation postnatale. Nous avons découvert que l'exposition à une hyperoxie néonatale est associée chez l'adulte à une diminution significative du nombre de PACs dans la moelle osseuse et dans la rate au jour 7 après l'ischémie du membre postérieur. De plus, la propriété d'adhérence des PACs aux cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVECs) fut significativement diminuée chez les souris exposées à l'hyperoxie néonatale. Les cellules endothéliales isolées de l'aorte de souris exposées aux conditions hyperoxiques à la naissance démontrent une altération de leur capacité de migration, une diminution de la production d'oxyde nitrique et une réduction de la formation de tubules.

Globalement, nos résultats indiquent que l'exposition transitoire néonatale à des niveaux élevés d'oxygène porte atteinte à la néovascularisation post-ischémique à l'âge adulte. Les mécanismes impliqués comprennent des effets délétères sur les voies de signalisation angiogéniques dans les muscles ischémiques, et également une diminution du nombre et de la fonction des PACs et des cellules endothéliales matures.

Mots-Clés: Néovascularisation, hyperoxie néonatale, cellules pro-angiogéniques, angiogenèse

Abstract

It is increasingly recognized that neonatal conditions, including prematurity, can significantly modulate adult cardiovascular health. Premature infants are often exposed to high oxygen levels, which in animal models has been associated with the development of endothelial dysfunction, hypertension, and cardiac remodeling in the adult. Neovascularization is an essential defense mechanism against ischemic vascular diseases. Here we tested the novel hypothesis that neonatal exposure to high oxygen levels might impair ischemia-induced neovascularization in the adult.

C57BL/6 mice were exposed to hyperoxia (85% O₂) or normoxia (20% O₂) from days 2 to 14 after birth. When the mice reached adulthood (6-8 weeks), hindlimb ischemia was surgically induced by femoral artery removal. We found that neonatal hyperoxia was associated with a significantly slower rate of blood flow recovery after hindlimb ischemia, as assessed by Laser Doppler imaging. Doppler flow ratios were significantly reduced in mice exposed to neonatal hyperoxia, both at day 7 and at day 21 after surgery. In ischemic tissues, previous exposure to neonatal hyperoxia led in adults to decreased capillary density, increased oxidative stress levels and reduced expression of the enzyme superoxide dismutase 1 (SOD1) and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). Pro-angiogenic cells (PACs) have been shown to have an important role for postnatal neovascularisation. In adult mice, we found that previous neonatal exposure to hyperoxia was associated with a significant reduced number of bone marrow and peripheral PACs at day 7 after hindlimb ischemia. Moreover, the adhesion properties of PACs to Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) were significantly impaired in mice exposed to neonatal

hyperoxia. Interestingly, aortic endothelial cells (MAECs) isolated from mice that had been exposed to neonatal hyperoxic conditions appear to exhibit impaired migration capacity, lower NO production and reduction of tube formation compared to MAECs isolated from control mice.

Globally, our results indicate that transient neonatal exposure to high oxygen levels leads to impaired ischemia-induced neovascularization during adulthood. The mechanism involves negative effects of neonatal hyperoxia on angiogenic pathways in ischemic muscles, together with a reduction in the number and the function of PACs and mature endothelial cells.

Keywords: Neovascularisation, neonatal hyperoxia, pro-angiogenics cells, angiogenesis

À tous ceux qui m'ont supporté et grâce à qui tout cela fut possible

Remerciements

L'accomplissement de ma maîtrise ne fut pas sans embûches. Du début de mes expériences infructueuses avec l'antioxydant du thé vert l'EGCG, jusqu'à mon interminable écriture de mémoire qui se solde par ces remerciements, tant de rivières traversées et d'apprentissages qui m'ont permis de grandir et de mieux me définir en tant que personne.

Je tiens à remercier ma conjointe Catherine, qui avec ses motivations et encouragements m'a permis de terminer ce parcours. Mes collègues de travail d'hémodynamie de l'hôpital Maisonneuve-Rosemont ont également contribué à mes études en remplaçant mon congé pour études et en palliant à mon absence par leurs efforts soutenus pour continuer d'offrir le même service de qualité aux patients de cardiologie. Plusieurs m'ont également remplacé lorsque j'étais de garde pour les STEMI pour que je puisse donner des conférences ou bien compléter des expériences.

Merci à tous de tout cœur!

Le personnel et les étudiants du CRCHUM ont aussi fait partie de ce parcours. Je pense à Henry Leung qui a été une épaule pour moi tout au cours de ma maîtrise et qui le sera encore. Je remercie Patrick Fournier pour son aide précieuse lorsque mes Western Blot ne fonctionnaient pas du tout. Katia Cáceres, colocataire de laboratoire, m'a aussi motivé par nos cafés matinaux et par son sourire quotidien. Les membres de mon laboratoire ont tous aussi été d'une grande aide. Plus

précisément, je tiens à remercier Sylvie qui par son expertise et expérience m'a permis d'accomplir des expériences avec succès.

Merci à Dr Alain Rivard, qui m'a donné la chance exceptionnelle de travailler dans son laboratoire. Il fut une source de soutien tout au long de ces années et jamais je ne pourrai le remercier assez.

Finalement, je remercie tous ceux qui auront mis le temps et l'énergie dans la lecture de cet ouvrage.

Merci à tous

Table des matières

1. La problématique	1
1.1. Étendue des maladies cardiovasculaires.	1
1.2. Description des maladies cardiovasculaires.	1
1.3. La maladie coronarienne athérosclérotique (MCAS).	2
1.4. Les traitements conventionnels des MCAS.	2
1.5. Les limites des traitements conventionnels.	4
1.5.1. L'angioplastie.	4
1.5.2. La chirurgie de pontages aorto-coronariens.	5
1.6. La néovascularisation : une défense contre l'ischémie.	5
1.7. Facteurs de risque cardiovasculaire : le dénominateur commun	6
1.8. L'hyperoxie néonatale : contexte de prématurité.	6
2. L'athérosclérose.	8
2.1 Dysfonction endothéliale.	8
2.1.1 La biodisponibilité du NO.	9
2.1.2 Les effets des facteurs de risque cardiovasculaire sur la dysfonction endothéliale.	11
2.1.2.1 La dyslipidémie.	11
2.1.2.2 Le diabète.	13
2.1.2.3 Le tabagisme.	14
2.1.2.4 L'hypertension artérielle.	15
2.1.2.5 L'obésité.	16
2.1.2.6 L'âge.	17

2.2 Formation de l'athérosclérose.....	18
3. La néovascularisation.....	21
3.1 L'angiogenèse.	21
3.1.1 L'inflammation et angiogenèse.....	23
3.2 La vasculogenèse.....	24
3.2.1 Caractérisation des PACs.....	25
3.2.1.1 Early Outgrowth PACs.....	26
3.2.1.2 Late Outgrowth PACs..	26
3.3 Facteur de risques affectant la néovascularisation.	27
4. l'hyperoxie néonatale.	28
4.1 Mécanismes connus.....	28
4.2 Conséquences à court et long terme.....	30
5. Hypothèse de recherche.....	31
5.1 Objectifs spécifiques.....	32
6. Article.....	33
7. Discussion	67
8. Conclusion	72
9. Bibliographie	73

Légende des figures

Figure 1. Angioplastie coronarienne	3
Figure 2. Pontage aorto-coronarien.....	4
Figure 3. Structure de la NO Synthase.....	9
Figure 4. Formation et activité biologiques du NO.....	11
Figure 5. Formation de l'athérosclérose.....	18
Figure 6. Mécanisme de l'angiogenèse.....	22
Figure 7. La vasculogenèse	25

Liste des abréviations

AKT	Protein Kinase B
ARN	Acide ribonucléique
BH4	Tétrahydrobioptérine
cGMP	Cyclic Guanosine MonoPhosphate
EGF	Epidermal Growth Factor
eNOS	Endothelial Nitric Oxide Synthase
EPO	Érythropoïétine
H2O2	Peroxyde d'hydrogène
HDL	High Density Lipoprotein
Hg	Mercure
HIF1 α	Hypoxia Inducible Factor-1 α
HIF1 β	Hypoxia Inducible Factor 1-bêta
HMG CoA	Hydroxyméthylglutaryl Coenzyme A
ICAM-1	Inter-Cellular Adhesion Molecule-1
IL (1)	Interleukine
LDL	Low Density Lipoprotein
MAEC	Mouse Aortic Endothelial Cell
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MCAS	Maladie Coronarienne Athérosclérotique
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor

mm	millimètre
MPOC	Maladie Pulmonaire Obstructive Chronique
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NO	Oxyde nitrique
oxLDL	Oxidysed Low Density Lipoprotein
O ₂ ⁻	Anion superoxide
PAC	Pro Angiogenic Cell
PAF	Platelet-Activating Factor
PCSK9	Proprotéine Convertase Subtilisine/Kexine de type 9
PDGF	Platelet Derived-Growth Factor
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase
PSGL-1	P-Selectin Glycoprotein Ligand-1
ROS	Reactive Oxygen Species
SOD	Superoxyde Dismutase
TGF- α	Transforming Growth Factor- α
TIE2	Tyrosine-protein kinase receptor
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR(1,2)	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VLDL	Very Low Density Lipoprotein

1. La problématique

1.1. Étendue des maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires sont encore une des premières causes de mortalité au Canada. En 2009, celles-ci représentaient plus de 20.7% des décès au pays (Agence de santé publique du Canada).

1.2. Description des maladies cardiovasculaires

L'expression « maladies cardiovasculaires » désigne l'ensemble des maladies affectant le cœur et/ou les vaisseaux sanguins. Parmi les différentes pathologies, il y a les maladies des valves cardiaques (valvulopathies), du muscle cardiaque (cardiopathies, insuffisance cardiaque), les différentes arythmies, l'hypertension artérielle et les maladies coronariennes athérosclérotiques (MCAS), sur lesquelles nous nous concentrerons plus en profondeur (Lloyd-Jones et al., 2009).

1.3. La maladie coronarienne athérosclérotique (MCAS)

La MCAS est une pathologie chronique qui se développe tout au long de la vie du patient. Les plaques d'athérosclérose commencent normalement à apparaître dès l'âge de 30 ans. Ces plaques sont formées par l'accumulation de lipides (principalement de la famille des LDL) dans l'espace sous endothélial des vaisseaux sanguins (Lusis, 2000). Lorsque non traitée, la plaque s'épaissit, obstruant de plus en plus le flux sanguin. Au niveau cardiaque, cette obstruction peut se refléter par de l'angor ou angine de poitrine. C'est alors que les cardiomyocytes commencent à manquer de nutriments et d'oxygène. Cette partie musculaire se retrouve alors en ischémie. La plaque peut progresser et éventuellement rompre, occasionnant la formation d'un thrombus qui lui-même cause l'infarctus du myocarde (van der Wal & Becker, 1999) (Lusis, 2000).

1.4. Les traitements conventionnels des MCAS

Il existe deux principaux traitements de revascularisation des MCAS : l'angioplastie et la chirurgie de pontages aorto-coronariens. L'angioplastie consiste en l'écrasement de la plaque par un ballonnet dans le but de rétablir un flux sanguin optimal. L'installation d'une endoprothèse cardiaque (tuteur) au niveau même de la plaque est de mise, car l'artère coronaire ayant été fragilisée par l'athérosclérose pourrait plus facilement resténoser (O'Laughlin et al., 1993).

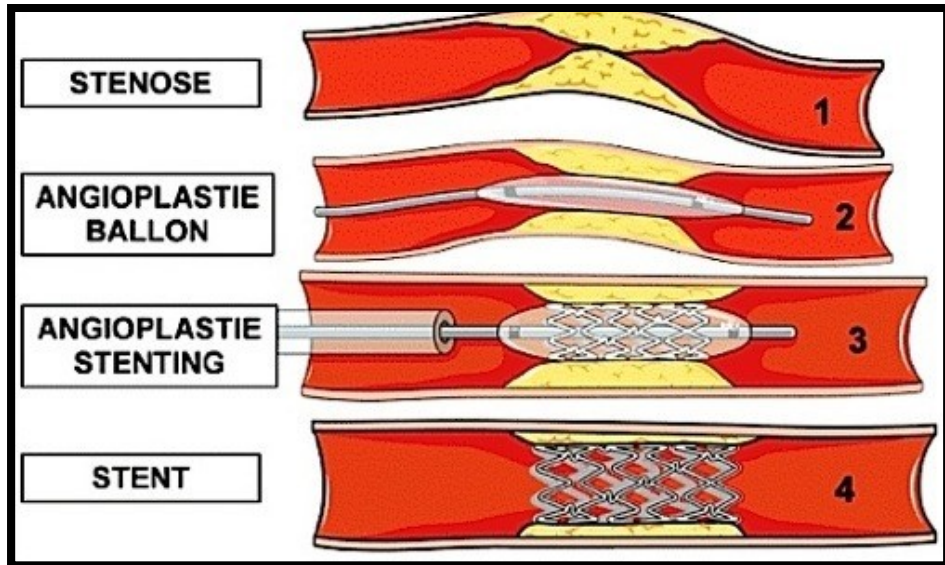


Figure 1 : Angioplastie coronarienne. Figure adaptée(Schoukroun, 2013).

Lorsque les plaques d'athérosclérose se retrouvent à plusieurs niveaux dans les artères coronariennes et que l'angioplastie est trop risquée, l'alternative est la chirurgie par pontages aorto-coronariens. Cette procédure se fait sous anesthésie générale et consiste à créer une route alternative au flux sanguin par l'installation de greffon veineux ou d'une artère mammaire vers les lits distaux des coronaires, au-delà des obstructions (Moreyra et al., 2018).

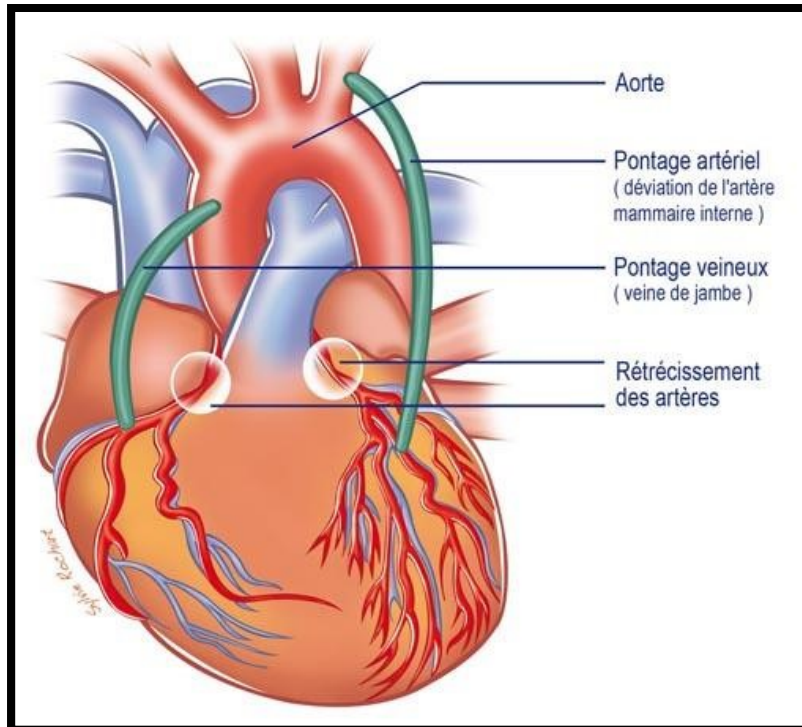


Figure 2 : Pontage aorto-coronarien. Figure adaptée (Le comité scientifique cardiologie, 2013)

1.5. Les limites des traitements conventionnels

Malgré les perfectionnements développés au cours des dernières années, tant au niveau de l'angioplastie que de la chirurgie par pontages aorto-coronariens, ces deux techniques ont leurs limites respectives (Gustavo S. Oderich et al. 2015; (Peterson et al., 2010).

1.5.1. L'angioplastie

Les facteurs influençant le succès d'une angioplastie sont nombreux. Il peut s'agir d'une plaque d'athérosclérose ayant atteint un stade de calcification élevée,

empêchant le déploiement d'une endoprothèse coronarienne. Un patient ayant une allergie à un antiplaquettaire (Plavix, Effient, Aspirine, Brilanta, etc.) peut aussi causer problème considérant la nécessité de la double thérapie d'antiplaquettaire pour plusieurs mois suivant l'installation d'un tuteur. L'anatomie coronarienne étant unique à chaque personne, les plaques peuvent se retrouver dans de petites artères difficiles d'accès, rendant l'angioplastie ardue (Oderich et al., 2012)(Peterson et al., 2010).

1.5.2. La chirurgie de pontages aorto-coronariens

Des facteurs d'une toute autre nature affectent la chirurgie de pontage. Un patient ayant une maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC) a des risques de complication et décès beaucoup plus élevés suite à la chirurgie. L'âge du patient et diverses co-morbidités (insuffisance rénale, diabète, etc.) sont aussi des facteurs dont il faut tenir compte. Les risques de décès sont seulement de 1 à 2 % chez les personnes de moins de 60 ans, mais grimpent à 15-25% à 75 ans (dos Santos et al., 2014). Avec l'espérance de vie qui augmente de plus en plus grâce aux innovations de la médecine, les patients sont de plus en plus âgés. Existe-t-il une alternative pour ces patients ?

1.6. La néovascularisation : une défense contre l'ischémie

La néovascularisation est la formation de nouveaux vaisseaux sanguins vers les tissus ischémiques dans le but de permettre l'apport en oxygène et en nutriments. Le processus est divisé en deux phases : l'angiogenèse et la vasculogenèse (Dhahri et al., 2017).

1.7. Facteurs de risque cardiovasculaire : le dénominateur commun

Le point commun entre le développement de l'athérosclérose et la néovascularisation, c'est que ces processus sont affectés par les mêmes facteurs de risque cardiovasculaire. L'âge, le diabète, les antécédents familiaux, la dyslipidémie, la haute tension artérielle, le tabagisme, l'obésité et plusieurs autres sont des déterminants qui favoriseront la formation de la plaque d'athérosclérose, ainsi que la diminution de la néovascularisation (Glasser, Selwyn, & Ganz, 1996) (Auerbach, Lewis, Shinnors, Kubai, & Akhtar, 2003). Un facteur encore peu étudié est l'hyperoxie néonatale (Yzydorczyk et al., 2008).

1.8. L'hyperoxie néonatale : contexte de prématurité

Le nombre de bébés prématurés a augmenté de 30% de 1980 à 2010. Avec l'évolution de la médecine, ceux-ci ont eu de meilleures chances de survie qu'auparavant. Compte tenu de l'immaturation de leurs poumons, les prématurés doivent être soumis à de fortes concentrations d'oxygène, beaucoup plus importantes que le niveau de l'air ambiant, dans le but de maintenir un niveau adéquat de saturation en oxygène sanguin. Cependant, ce traitement n'est pas sans conséquences tant au niveau respiratoire qu'au niveau vasculaire. Certains de ces effets perdurent à l'âge adulte (Edgar et al., 2018); (Yzydorczyk et al., 2013).

C'est sur ce sujet que le présent mémoire va porter. Plus précisément, l'étude de la néovascularisation après une ischémie provoquée chez des sujets ayant été soumis à une situation d'hyperoxie néonatale.

En premier lieu, nous décrirons le processus de formation de l'athérosclérose et l'influence des facteurs de risque cardiovasculaire sur. Par la suite, nous discuterons du stress oxydant et des mécanismes de dysfonction endothéliale. Nous terminerons par le mécanisme de réponse physiologique à l'ischémie, la néovascularisation, en expliquant l'implication de l'angiogenèse et de la vasculogenèse dans ce phénomène.

2. L'athérosclérose

L'athérosclérose est caractérisée par une diminution de l'élasticité d'une artère, due à la formation de sclérose, causée par l'accumulation de cholestérol de type lipoprotéine de basse densité (LDL) au niveau de l'intima du tissu artériel. Ce n'est pas une maladie aiguë, son évolution se développe tout au long de l'existence. Le processus débute par l'agglutination de LDL sous la surface du vaisseau sanguin formant une strie lipidique qui deviendra éventuellement une plaque d'athérome.

L'athérosclérose se développe suite au phénomène de dysfonction endothéliale. La dysfonction endothéliale est induite par différents facteurs de risques cardiovasculaires (Hadi, Carr, & Al Suwaidi, 2005).

2.1 Dysfonction endothéliale

La dysfonction endothéliale se définit par un état physiologique où il y a une augmentation des agents vasoconstricteurs endothéliaux et/ou une diminution de la biodisponibilité des agents vasodilatateurs (prostacycline, le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium et le monoxyde d'azote (NO)) (Lerman & Burnett, 1992). Ce phénomène induit la formation de la plaque d'athérosclérose via différents mécanismes : une augmentation de la perméabilité cellulaire, une activation des molécules d'adhésion endothéliale, une augmentation de l'oxydation des LDL, l'activation des plaquettes, une augmentation de la sécrétion de cytokines attractantes

ainsi que l'adhésion des leucocytes et une augmentation de la prolifération et de la migration des cellules musculaires lisses (Anderson et al., 1995). Pour décrire la dysfonction endothéliale, nous nous concentrerons plus particulièrement sur le NO.

2.1.1 La biodisponibilité du NO

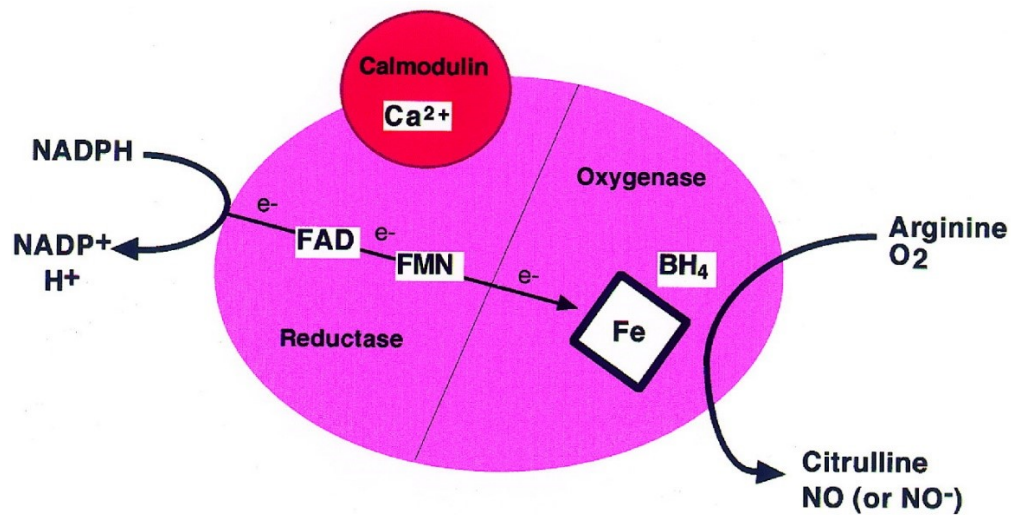


Figure 3 : Structure de la NO Synthase. Figure adaptée (Alderton, Cooper, & Knowles, 2001).

Le NO est formé à partir de l'acide aminé arginine par l'enzyme NO synthase (NOS) en présence d'oxygène et des cofacteurs BH4 et calmoduline (Figure 3). L'enzyme NOS existe sous trois isoformes, toutes synthétisant du NO. Ce qui les distingue, c'est dans quelles types de cellules celles-ci sont exprimées. La « neuronal

nitric oxide synthase » (nNOS) est exprimée dans les neurones cérébraux, la « inducible nitric oxide synthase » (iNOS) est exprimée lors de processus inflammatoire et la eNOS, est exprimée dans les cellules endothéliales. La tétrahydrobioptéine (BH4) est un cofacteur lors de la synthèse du NO par eNOS, mais est aussi essentielle dans l'organisme lors de la conversion de la phénylalanine en tyrosine, de la tyrosine en lévodopa et du tryptophane en 5-Hydroxytryptophane. Le NO est produit par eNOS dans la cellule endothéliale et diffuse vers la cellule musculaire lisse, où il active la guanylate cyclase qui catalyse la transformation de Guanosine tri-phosphate en second messenger Guanosine monophosphate cyclique (cGMP) qui à son tour activera les protéines kinase G, causant une relaxation musculaire et diminuant ainsi la pression artérielle par la dilatation des vaisseaux sanguins (Figure 4) (Schächinger et al. 2000). Les ROS sont produits normalement dans les métabolismes cellulaires et ont un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasies et dans de nombreuses voies de signalisation cellulaires. Les ROS sont des réactifs chimiques contenant de l'oxygène et sont retrouvés sous diverse formes telles que les peroxydes, superoxydes, radicaux, etc. Dans la cellule, il y a un équilibre entre la production et l'élimination des ROS. Lorsqu'il y a un débalancement entre la production et l'élimination des ROS (espèces réactives de l'oxygène), la cellule se retrouve en situation de stress oxydant et l'enzyme eNOS se retrouve sous sa forme découplée, où elle ne catalysera plus le transfert de l'électron provenant de la NADPH sur la molécule d'O₂, et ce dû à l'absence de BH4 et/ou de L-Arginine, créant ainsi un anion superoxyde. Dans cet état de dysfonction, la capacité de réponse de

l'endothélium aux stimuli de production de NO est grandement diminuée, causant les changements physiologiques mentionnés plus haut (Yzidorczyk et al., 2013).

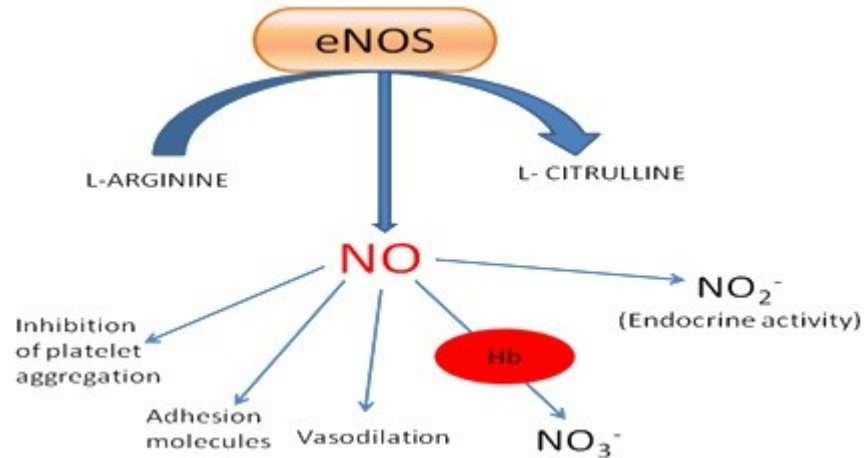


Figure 4 : Formation et activités biologiques du NO. Figure adaptée (Shiva, 2015).

2.1.2 Les effets des facteurs de risque cardiovasculaire sur la dysfonction endothéliale

La dysfonction endothéliale est la conséquence physiologique des différents facteurs de risques cardiovasculaires. Les principaux facteurs de risque sur lesquels nous élaborerons sont la dyslipidémie, le diabète, l'âge, le tabagisme, l'hypertension artérielle et l'obésité (Davignon & Ganz, 2004).

2.1.2.1 La dyslipidémie

La dyslipidémie désigne un taux sanguin anormal de lipides. Il peut s'agir d'un niveau élevé de cholestérol, de triglycérides ou de LDL, ou bien un niveau faible de HDL. Cette pathologie est attribuable soit à une diète trop riche en lipides, soit à une

dysfonction des transporteurs lipidiques (HDL, LDL, VLDL, Chylomicrons), notamment dans les cas d'hypercholestérolémie familiale. Nous observons cliniquement de plus en plus de patients ayant une diète relativement saine, mais développant une dyslipidémie, laissant présager une composante génique encore mal comprise (Steinberg, 2006).

Les LDL sont des transporteurs du cholestérol vers les cellules. Cependant, en quantité trop élevée, ils favoriseront une hypercholestérolémie, ce qui entraînera l'accumulation de cholestérol sous la paroi vasculaire. Les HDL sont quant à eux les transporteurs du cholestérol vers le foie, favorisant son élimination.

Le principal traitement est l'abaissement des niveaux de cholestérol, de LDL et le rehaussement des HDL. Les statines sont parmi les médicaments les plus utilisés pour le traitement de la dyslipidémie. Ce sont des inhibiteurs de la HMG-CoA réductase, réduisant ainsi la formation de cholestérol (Udenigwe & Rouvinen-Watt, 2015). Beaucoup de recherches sont encore en cours sur des stratégies de régulation de la dyslipidémie. Par exemple, les anticorps anti-PCSK9 semblent donner des résultats favorables. La protéine de type PCSK9 appartient à la classe de proprotéine convertases, clivant des précurseurs de différentes protéines. Les PCSK9 se retrouvent en surface d'hépatocytes et dans la circulation sanguine. Les PCSK9 fixent les récepteurs cellulaires des LDL, favorisant leur dégradation dans le lysosome. Selon les études, il ne semble pas y avoir de conséquences physiologiques à la diminution de la PCSK9. En diminuant les PCSK9, il y a alors diminution des niveaux sanguins de LDL (Stein et al., 2012). Un taux sanguin de LDL le plus bas possible est associé à une diminution des risques cardiovasculaires. Un niveau anormalement bas par une

approche pharmacologique reste controversé. Certaines études semblent démontrer des risques de cancer plus élevé, mais les lignes directrices de cardiologie recommande un niveau de LDL le plus bas possible (DeMaria & Ben-Yehuda, 2007) (Law, Wald, & Rudnicka, 2003).

Au niveau de la dysfonction endothéliale, les LDL, lorsque sous forme oxydée, favorisent la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) via la Xanthine oxidase et la NADPH oxidase (Ceriello et al., 2002).

2.1.2.2 Le diabète

Le diabète est un syndrome qui se caractérise par une anomalie du métabolisme des carbohydrates et des lipides. Il peut être associé à une prédisposition génétique importante causant une absence d'insuline dans la circulation sanguine par une composante auto-immune (diabète type 1) ou par différents facteurs de risque (âge, prédisposition familiale, obésité) causant une perte de sensibilité cellulaire à l'insuline (diabète type 2). L'insuline est une hormone peptidique qui est produite dans le pancréas, plus particulièrement dans les cellules β des îlots de Langerhans. Elle a des effets sur le métabolisme des glucides, mais également sur celui des lipides et des protéines. Cette hormone permet l'absorption du glucose sanguin par les hépatocytes, les adipocytes et les cellules des muscles squelettiques. Le rôle de l'insuline est de maintenir la glycémie à un niveau dit normal (4 à 6.8 mmol/L), par son effet hypoglycémiant, surtout après un repas ou durant l'exercice physique. Le diagnostic

du diabète se fait principalement par un test de glycémie à jeun, mais le niveau d'hémoglobine glyquée est également utilisé. Le diabète est associé à de nombreux symptômes chez le patient atteint de la maladie : une vision floue, de grandes fatigues, une fréquence élevée de miction urinaire, une soif anormale, une perte ou un gain de poids, des coupures qui guérissent lentement, des pertes de sensation dans les mains et/ou pieds, etc. (Butler et al., 2003). Au niveau cardiovasculaire, le diabète entraîne le développement de différentes pathologies comme l'hypertension artérielle, les accidents vasculaires cérébraux, la formation d'athérosclérose, et plusieurs autres. Au niveau des effets directement liés à la dysfonction endothéliale, le diabète est associé à une diminution des réserves de NADPH, une enzyme nécessaire à la formation de NO par la eNOS. Il augmente également le niveau de stress oxydant, favorisant ainsi un état de dysfonction endothéliale. De plus, cette pathologie augmente le niveau d'oxydation des LDL, facilitant l'évolution de l'athérosclérose. Le diabète est traité par des hypoglycémifiants plus ou moins puissants selon l'évolution de la maladie. Pour éviter le plus possible les différents effets du diabète, il faut contrôler étroitement la glycémie et éviter les fluctuations de celle-ci (Resnick & Howard, 2002; Grundy et al., 1999).

2.1.2.3 Le tabagisme

Bien que depuis 10 ans le pourcentage de fumeurs ait diminué d'environ 7% (de 24.7 % à 17.7 %) au Canada, le tabagisme reste un facteur de risque important, augmentant grandement les chances de maladies cardiovasculaires (Santé Canada, 2015). En effet, un fumeur a de 2 à 4 fois plus de chance de développer un problème

cardiovasculaire comparativement à un non-fumeur. Une mort sur 5 aux États-Unis est causée par le tabagisme dans le cadre des maladies cardiovasculaires (Saha, Bhalla, Whayne, & Gairola, 2007). Les effets néfastes comprennent le développement de l'hypertension artérielle, notamment par la formation de dysfonction endothéliale en réduisant la biodisponibilité du NO et en augmentant la formation de ROS via une augmentation de l'enzyme xanthine oxydase (Thomas et al., 2018). Le tabagisme augmente aussi le rythme cardiaque chez le patient, ainsi que le risque de formation de caillot, augmentant ainsi le risque d'accidents vasculaires cérébraux. Ceci s'explique par une augmentation de l'adhérence des plaquettes, favorisant un état procoagulant. Le tabagisme augmente également l'adhérence des macrophages, créant un environnement inflammatoire. Cela favorise l'oxydation des LDL, ainsi que leur phagocytose par les macrophages qui migreront vers l'intérieur des parois vasculaires, entraînant ainsi leur transformation en « foam cells », une étape importante de la formation d'athérosclérose (Weitzman et al., 2005). Un point important est que la plupart des effets du tabagisme sont réversibles, expliquant qu'après 5 ans, une personne cessant de fumer se retrouve au même point qu'un non-fumeur au niveau des risques de maladies cardiovasculaires (Wilson, Gibson, Willan, & Cook, 2000).

2.1.2.4 L'hypertension artérielle

L'hypertension artérielle est très répandue au Canada, plus de 7.5 millions de personnes en souffrent. Un patient est diagnostiqué hypertendu s'il présente une pression systolique plus élevée que 140 mm Hg et/ou une pression diastolique de plus de 90 mm Hg. Plusieurs facteurs peuvent expliquer son développement : une

prédisposition génétique, l'embonpoint, un régime riche en sel et la sédentarité. Ce n'est pas toujours clair selon les cas si l'hypertension artérielle cause la dysfonction endothéliale ou si la dysfonction endothéliales a causé l'hypertension (Chin, Lee, & Lee, 2018). Certaines études semblent suggérer que pour les patients dont l'hypertension est causée par une forte consommation de sel, une altération de la voie L-arginine-NO serait à l'origine de la dysfonction de l'endothélium (Curb, SL, JA, & al, 1996) (Sowers, Epstein, & Frohlich, 2001).

Beaucoup de recherches pharmaceutiques ont été réalisées dans le but de trouver les meilleurs anti-hypertenseurs possibles. Il en existe effectivement de nombreux qui se classent dans différentes catégories selon leur mécanisme d'action. Leur combinaison est possible dans le traitement de l'hypertension artérielle (DJ & VN, 2000).

2.1.2.5 L'obésité

L'obésité est associée à une accumulation de graisse soit au niveau des hanches et des cuisses, soit au niveau abdominal. Cette dernière forme est plus à même de favoriser les maladies cardiovasculaires, notamment en augmentant les risques de développer de l'hypertension artérielle, du diabète et de la dyslipidémie (augmentation de LDL et triglycérides et diminution des HDL) (Higdon & Frei, 2003) (Robert Ross & Janiszewski, 2008). L'obésité induit également un contexte inflammatoire important favorisant ainsi la formation d'athérosclérose. En effet, plusieurs articles démontrent une production de molécules inflammatoires accrue (TNF- α et IL-6), notamment par

une augmentation de l'infiltration des macrophages dans les tissus graisseux (Shimano, 2009).

2.1.2.6 L'âge

Le vieillissement s'accompagne de risques accrus de maladies cardiovasculaires. Bien qu'il soit difficile de différencier les dommages causés par une pathologie (e.g. hypertension artérielle, diabète) versus l'âge, certains processus sont bien définis quant au changement qu'apporte le vieillissement sur les structures vasculaires. Premièrement, la paroi des vaisseaux sanguins s'épaissit et il y a développement de rigidité vasculaire (van der Heijden-Spek et al., 2000). Celle-ci s'explique par une diminution des fibres élastiques, une augmentation des fibres de collagène, la formation de plaque d'athérosclérose, ainsi qu'une augmentation de formation de plaques calciques (Vingerling et al., 1995). L'âge s'accompagne également de dysfonction endothéliale, principalement causée par une diminution de la production de vasodilatateurs (NO) par les cellules endothéliales et par une réponse altérée à ceux-ci au niveau des cellules musculaires lisses (Lyons, Roy, Patel, Benjamin, & Swift, 1997). Le vieillissement est associé à la sénescence cellulaire, état physiologique irréversible où il y a arrêt du cycle cellulaire. Les cellules sénescents expriment des micro-ARN différents des cellules non-sénescents, ce qui explique au moins en partie le changement dans l'expression génique et l'altération de différentes fonctions. Il peut y avoir augmentation ou diminution de l'expression de différents miRs observés dans les cellules sénescents. Par exemple, les cellules endothéliales exprimant une quantité plus importante de miR-34a auront un phénotype de sénescence, notamment par une

diminution de leur prolifération dû à un arrêt du cycle cellulaire. Les cellules sènescentes ont une morphologie différente, étant plus allongées et volumineuses. Celles-ci expriment moins de eNOS et plus de molécules inflammatoires (Matsushita et al., 2001) (Minamino & Komuro, 2007) (Gennaro, 2003).

2.2 Formation de l'athérosclérose

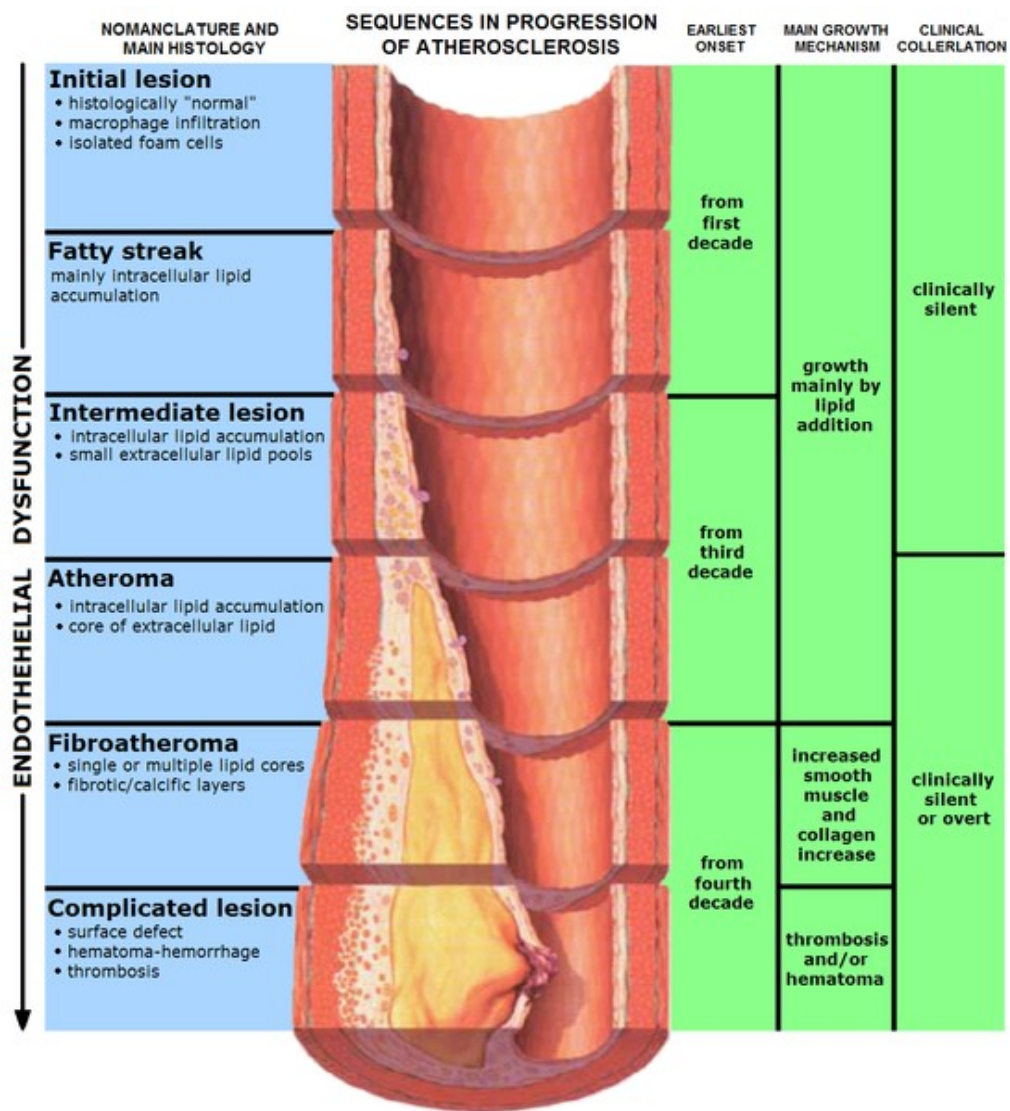


Figure 5 : Formation de l'athérosclérose. Figure adaptée (Lome 2016).

L'athérosclérose se développe plus facilement au niveau des bifurcations artérielles, car ces régions de l'endothélium sont soumises à un flux oscillatoire. Ce phénomène conduit à la présence de faibles contraintes de cisaillement et donc à des sites pro-athérogènes. Avant qu'il y ait formation de plaque d'athérosclérose, il doit y avoir activation de l'endothélium. À la suite de cette activation, il y aura une perméabilité accrue aux LDL. Il y aura également une accumulation de protéines de la matrice extracellulaire causant un épaissement de l'intima. Le tout causera un déséquilibre au niveau de l'entrée versus la sortie des LDL dans l'endothélium, favorisant la rétention de ceux-ci (R Ross, 1990).

Dans l'état de dysfonction endothéliale, cette accumulation de LDL se retrouvera en présence de ROS provenant de différentes sources. La résultante sera une lipoprotéine de type LDL sous une forme oxydée (LDLox) qui est hautement inflammatoire. Les monocytes circulants seront plus facilement recrutés vers l'endothélium, notamment dû à la dysfonction endothéliale et à l'activation de « Vascular cell adhesion protein 1 » (VCAM-1) ainsi que « Intercellular Adhesion Molecule 1 » (ICAM-1) (Bobryshev, 2006). À la suite de leur diapédèse, les monocytes subiront une transformation en macrophages, favorisée par les protéines « Monocyte chemoattractant protein-1 » (MCP-1) et « macrophage colony-stimulating factor » (M-CSF). L'expression de la MCP-1 se retrouve augmentée par l'effet des LDLox sur les cellules endothéliales. Les macrophages phagocyteront par la suite les LDLox, les transformant en cellules spumeuses. Les macrophages sont de grands producteurs de cytokines pro-inflammatoires comme « Tumor Necrosis Factor

Alpha » (TNF- α) et l'interleukine 1 (IL1). L'IL1 et le TNF- α causeront une attraction supplémentaire de monocytes supplémentaires. Les cellules spumeuses produiront quant à elles des facteurs de croissance et des métalloprotéinases, favorisant ainsi la prolifération cellulaire et la dégradation de la matrice. Cette organisation se nomme strie lipidique. C'est un épaissement de l'intima, formé de macrophages, de cellules spumeuses et de cellules musculaires (Mullenix, Andersen, & Starnes, 2018).

Par la suite, il y a formation du cap fibromusculaire. L'invasion de l'intima par les cellules musculaires cause leur regroupement autour du cœur lipidique, isolant celui-ci. Lorsqu'il y a présence de calcifications dans ces structures, nous qualifions alors la plaque d'athéroscléreuse. Une plaque athérosclérotique compliquée implique une rupture du cap fibreux, causant un thrombus, et éventuellement l'infarctus du myocarde (Badimon, Fuster, Chesebro, & Badimon, 1993).

3. La néovascularisation

La néovascularisation est un mécanisme de réponse physiologique très puissant contre l'ischémie cardiovasculaire. Ce processus est une combinaison d'angiogenèse et de vasculogenèse. Portons notre attention sur chacun de ces processus.

3.1 L'angiogenèse

L'angiogenèse est la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir du système vasculaire existant. Les cellules endothéliales matures doivent être activées pour ensuite proliférer et migrer vers le site ischémique (Abramson et al., 2001).

Le processus est induit par l'ischémie d'un tissu. Les cellules du tissu seront alors en état hypoxique. Cet état empêchera l'hydroxylation de la protéine « Hypoxia-inducible factor 1-alpha » (HIF1- α) par une proline et une asparagine hydroxylase. Sa dégradation ainsi interrompue, HIF1- α pourra alors transloquer suite à sa liaison à la protéine « Hypoxia-inducible factor 1-bêta » (HIF1- β), au noyau pour activer la transcription de facteur de croissance comme le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), le « Platelet-derived growth factor subunit B » (PDGF- β), le « transforming growth factor alpha » (TGF- α) et l'érythropoïétine (EPO). Ces facteurs de croissance s'accumuleront au site ischémique. Le VEGF activera alors les cellules endothéliales via son récepteur « Vascular endothelial growth factor receptor 1 » (VEGFR1 ou Flt-1) ainsi que le « Vascular endothelial growth factor receptor 2 » (VEGFR2 ou Flk-1/KDR). La cellule endothéliale ainsi activée favorisera les voies de signalisation dont celle de « mitogen-activated protein kinase » (MAPK) et celle de

« phosphatidylinositol-3-kinase-protein kinase B » (PI3K-AKT) qui régulent des fonctions cellulaires importantes dans le processus d'angiogenèse (Auerbach et al., 2003). La voie MAPK activée par le VEGF favorisera la prolifération de la cellule endothéliale. La voie PI3K-AKT, quant à elle, est associée à une augmentation de la survie cellulaire, ainsi qu'à la migration. Le VEGF a aussi un effet d'augmentation de la perméabilité de l'endothélium. Cet effet est dû à l'activation de la voie « Platelet-activating factor » (PAF) favorisant un remodelage au niveau des espaces inter-endothéliaux, augmentant ainsi la perméabilité cellulaire (Hicklin & Ellis, 2005). Dans le processus d'angiogenèse, il y aura aussi une dégradation de la matrice extracellulaire par des métalloprotéinases. Les cellules endothéliales ainsi libérées de leur membrane basale migreront vers le gradient le plus concentré de facteur de croissance, dont le VEGF (Hicklin & Ellis, 2005). Par la suite, elles prolifèrent et forment le futur vaisseau sanguin (Figure 6).

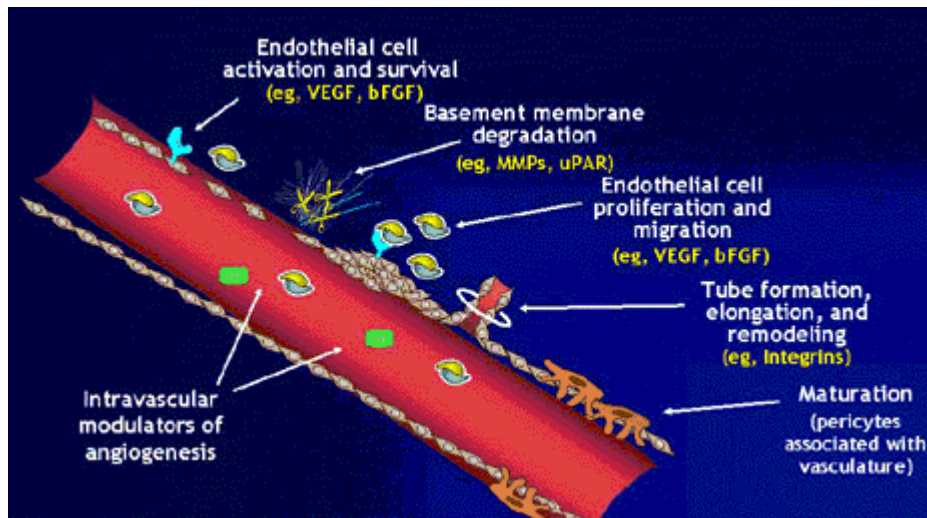


Figure 6 : Mécanisme de l'angiogenèse. Figure adaptée (Griffioen & Molema, 2000).

Suivant cette prolifération, migration et formation d'un nouveau vaisseau sanguin, il doit y avoir une maturation qui comprend l'intégration de péricytes et de cellules musculaires lisses. Ces processus sont encore mal compris, mais plusieurs évidences suggèrent que les angiopoïétines ont un rôle important. L'angiopoïétine de type 1 induit la maturation et la stabilisation des cellules endothéliales via l'activation des récepteurs « tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains » (TIE-2). L'angiopoïétine de type 2 quant à elle semble avoir un effet anti-angiogénique entre autre par son effet pro-apoptotique. L'évidence de son rôle dans le processus angiogénique serait qu'en présence de VEGF, elle aurait des effets de déstabilisation vasculaire, favorisant ainsi l'accès des cellules endothéliales aux facteurs de croissance (Zhao & Guan, 2011).

3.1.1 L'inflammation et angiogenèse

L'angiogenèse comporte un aspect inflammatoire. Cependant, l'effet précis de l'inflammation est encore mal compris. Il dépend de l'intensité du signal inflammatoire et du temps d'exposition, de façon similaire au rôle du stress oxydant dans le processus angiogénique. Il doit y avoir présence d'un stress oxydant minimal physiologique au niveau cellulaire, souvent induit par l'hypoxie dans le contexte ischémie-néovascularisation. Par contre, un stress oxydant trop important conduit à une diminution de l'expression de VEGF et ainsi de l'angiogenèse (Dhahri et al., 2017) (Michaud, Dussault, Haddad, Groleau, & Rivard, 2005) (Maingrette et al., 2015). Il en va de même pour l'état inflammatoire : un minimum est nécessaire, mais un niveau trop élevé devient délétère (Jackson, Seed, Kircher, Willoughby, & Winkler, 1997).

Le VEGF induit la translocation de la P-sélectine à la surface cellulaire via la libération des corps de Weibel-Palade favorisée par le PAF, lui-même induit par le VEGF. L'angiopoïétine de type 1 et 2 semblent avoir un effet similaire en libérant aussi la P-sélectine. Celle-ci attire les globules blancs dont les neutrophiles qui expriment son récepteur le « P-selectin glycoprotein ligand-1 » (PSGL-1). Ceux-ci adhèrent alors aux cellules endothéliales. Sous l'effet des angiopoïétines de type 1 et 2, les neutrophiles libéreront aussi du VEGF de leurs granules bêta (Brkovic & Sirois, 2007). Les différentes cytokines, dont l'interleukine 8, semblent avoir un effet pro-angiogénique et seraient produites par les cellules inflammatoires (Fiedler & Augustin, 2006).

3.2 La vasculogénèse

La vasculogénèse est la participation des cellules angiogéniques circulantes (PACs) à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Ces PACs sont issues de la moelle osseuse, plus particulièrement, des cellules souches CD34 positives. Celles-ci migrent vers les sites ischémiques ou elles participeront au processus de néovascularisation par leur différenciation en cellules endothéliales (rare) ou par leur

sécrétion de facteur pro-angiogéniques. Cette stimulation est faite majoritairement via des facteurs de croissance, dont le VEGF (Figure 7) (Murohara, 2003).

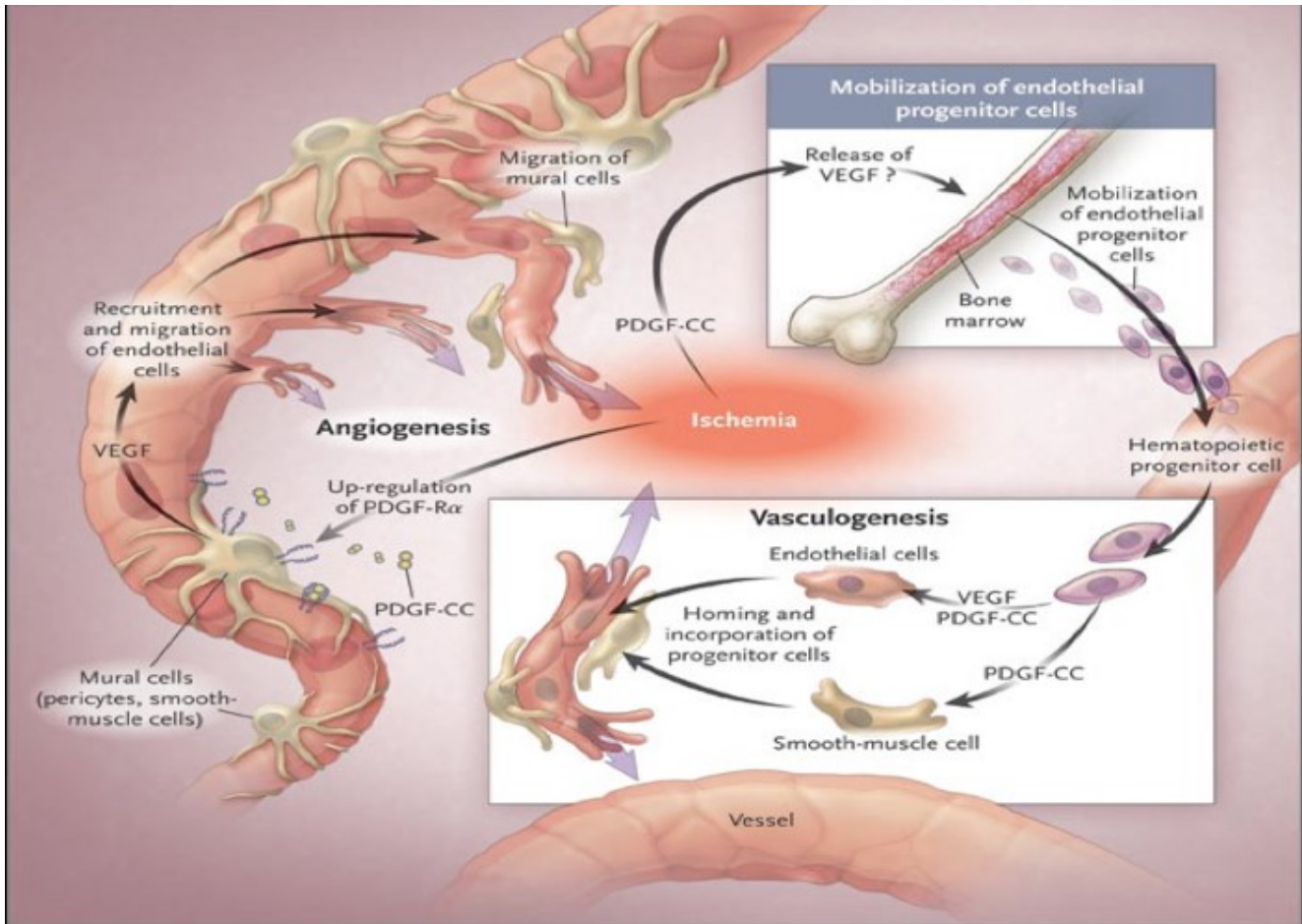


Figure 7 : La vasculogénèse. Figure adaptée (Dimmeler, 2005).

3.2.1 Caractérisation des PACs

Il n'est pas simple de définir de façon précise une cellule en tant que PACs. Plusieurs auteurs tentent de les identifier en utilisant des protéines typiques des cellules endothéliales comme le facteur Von Willebrand, la eNOS, le CD31, le CD144, et le VEGFR2. Cependant, d'autres cellules provenant de la circulation sanguine ou de la moelle osseuse peuvent exprimer ses protéines. En effet, certaines cellules souches, monocytes, lymphocytes T, etc. les expriment aussi. Cependant, ce qui est sans

équivoque, c'est que peu importe la nature exacte de ces cellules (PACs), elles ont des effets importants sur les cellules endothéliales et la néovascularisation. Les PACs mises en culture sont séparés en deux groupes : les « *Early Outgrowth PACs* » et les « *Late Outgrowth PACs* » (Hristov, Erl, & Weber, 2018).

3.2.1.1 Early Outgrowth PACs

Les PACs sont des cellules isolées soit de la circulation sanguine, soit de la moelle osseuse. Les cellules ainsi isolées sont mises en culture dans des pétries contenant de la fibronectine durant environ trois jours. Les cellules exprimant les marqueurs CD34, VEGFR2 et CD144 (chez l'humain, CD117 chez la souris), sont considérées comme des PACs. Ce type de PACs contribue à la néovascularisation par leur recrutement au site d'ischémie et surtout par leur sécrétion de facteurs proangiogéniques, notamment le VEGF et le NO (Hur et al., 2004).

3.2.1.2 Late Outgrowth PACs

Les *Late Outgrowth PACs* sont également des cellules isolées de la circulation sanguine ou de la moelle osseuse. Ces cellules sont plutôt mises en culture en présence de collagène de type I et ce durant une période plus longue, environ trois à quatre semaines. Ces cellules contribuent également à la néovascularisation grâce à leur haut taux de prolifération et leur capacité de formation tubulaire (Hur et al., 2004).

3.3 Facteur de risques affectant la néovascularisation

Les facteurs de risque affectant le développement de maladies cardiovasculaires affectent aussi la néovascularisation. En effet, le diabète, la dyslipidémie, l'hypertension artérielle, le tabagisme, l'âge, etc. sont des conditions qui diminuent les capacités angiogéniques de l'organisme. Comme pour la formation d'athérosclérose, le point commun est la dysfonction endothéliale, affectant les différentes fonctions des cellules endothéliales et des PACs (Umemura et al., 2008) (Tamarat et al., 2004) (Rivard et al., 1999) (Michaud et al., 2005) (Van Belle et al., 1997).

4. L'hyperoxie néonatale

L'hyperoxie néonatale est souvent nécessaire pour un prématuré afin de maintenir une saturation d'oxygène élevée pour éviter l'ischémie au niveau de tout l'organisme. Malheureusement, cette grande quantité d'oxygène n'est pas sans danger. Elle est associée à une forte production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui sont normalement gérées par différentes voies cellulaires pour éviter la formation de stress oxydant excessif dans les cellules endothéliales. Cependant, ces processus ne sont pas entièrement développés chez un prématuré, ce qui entraîne un excès de stress oxydant pouvant causer de l'hypertension artérielle pulmonaire et du remodelage cardiaque, des conditions qui perdurent jusqu'à l'âge adulte (Carr and al., 2017).

4.1 Mécanismes connus

Dans un tissu vasculaire mature et en santé, la présence de l'enzyme eNOS empêche l'apoptose et favorise la survie cellulaire, notamment par sa production de vasodilatateur de type NO. Son activité permet à un organisme mature (non prématuré) de contrebalancer la production de ROS, par exemple dans un contexte d'hyperoxie. Dans un cas d'immaturité (prématurité), l'enzyme eNOS se retrouve dysfonctionnelle sous sa forme découplée, produisant davantage de ROS et moins de NO, ce qui conduit à la production de peroxy-nitrite, un radical libre très dommageable pour la cellule endothéliale. De précédentes études ont également démontré une augmentation de l'activité de l'enzyme NADPH oxydase, ce qui induit aussi la production de ROS et le stress oxydant global. Les mécanismes sous-jacents causant cette réponse inappropriée

de l'endothélium vasculaire sont mal compris et sont actuellement le sujet de nombreuses recherches (Bertagnolli et al., 2014) (Yzydorczyk et al., 2013).

Les antioxydants se divisent en quatre catégories. La première comprend les antioxydants qui préviennent la formation de radicaux libres et/ou ROS. La SOD, la catalase et la glutathione peroxydase en font partie. La SOD a pour action la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et dioxygène. La catalase catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène. La glutathione peroxydase lutte contre les peroxydes organiques en transformant les R-OOH en ROH.

La deuxième catégorie comprend les antioxydants neutralisant les radicaux libres actifs par leur don d'électron. Ces antioxydants deviennent ainsi des radicaux libres, mais seront neutralisés à leur tour par d'autre type d'antioxydant. L'acide urique et la glutathione sont des exemples d'antioxydant neutralisant les radicaux libres.

La troisième catégorie comprend les enzymes et protéines permettant la réparation des dégâts causés par les ROS. Elles peuvent réparer l'ADN et membrane cellulaire endommagées.

La quatrième catégorie comprend l'adaptation de l'organisme au stress oxydant, notamment par un meilleur transport des antioxydants aux différents sites (Ighodaro & Akinloye, 2017).

4.2 Conséquences à court et long terme

L'hyperoxie néonatale a des conséquences immédiates connues incluant la dysplasie bronchopulmonaire, un terme regroupant les maladies pulmonaires résultantes de l'oxygénation via un respirateur et caractérisées par la présence d'inflammation et de troubles de développement alvéolaire. La rétinopathie du nouveau-né a été également beaucoup étudiée. Elle est caractérisée par une dysfonction de l'enzyme eNOS durant la phase d'hyperoxie suivie d'une ischémie causant une néovascularisation importante suite au passage en normoxie.

À long terme, une augmentation du risque de développer de l'hypertension artérielle a été démontrée chez les adultes nés prématurés et ayant été exposés à l'hyperoxie néonatale. Plusieurs autres désordres cardiovasculaires ont également été décrits dans les mêmes circonstances, notamment une augmentation du risque d'arrêt cardiaque chez les enfants et les jeunes adultes (Edgar et al., 2015) (Velten et al., 2011) (Deuber & Terhaar, 2011).

5. Hypothèse de recherche

Il est reconnu que les conditions néonatales incluant la prématurité affectent significativement la santé cardiovasculaire à l'âge adulte. Les nouveau-nés prématurés, à cause de leur immaturité pulmonaire, doivent recevoir de fortes concentrations d'oxygène. Cette hyperoxie néonatale est associée au développement d'hypertension artérielle, de remodelage cardiaque et de dysfonction endothéliale à l'âge adulte. Les facteurs de risques cardiovasculaires mènent à la formation d'athérosclérose. Lorsque les techniques de revascularisation traditionnelles sont insuffisantes pour contrer l'ischémie, l'organisme dépend de la réponse physiologique à l'ischémie, la néovascularisation.

L'effet de la prématurité et de l'exposition néonatale à l'hyperoxie sur la réponse ultérieure à l'ischémie, et plus spécifiquement sur la néovascularisation post-ischémique, est mal connu. Il est reconnu que ces conditions sont associées à la présence d'un stress oxydatif excessif, principalement causé par les ROS générés par les fortes concentrations en oxygène, et ce combiné à un défaut des mécanismes antioxydants. Il reste encore à découvrir les effets spécifiques que l'hyperoxie néonatale peut avoir sur la prédisposition aux maladies cardiovasculaires, la réponse de l'organisme face aux différents stress ischémiques, ainsi que la nature et l'intensité des dommages vasculaires induits.

Afin de mieux définir les impacts de l'hyperoxie néonatale sur la néovascularisation post-ischémique à l'âge adulte, les hypothèses de mon étude étaient
1) que l'hyperoxie néonatale cause une diminution de la néovascularisation post-

ischémique à l'âge adulte et 2) que cette diminution est causée par un effet délétère sur les PACs et les cellules endothéliales matures.

5.1 Objectifs spécifiques

L'objectif spécifique de l'étude est de caractériser l'effet de l'hyperoxie néonatale sur la néovascularisation dans un modèle murin d'ischémie de la patte à l'âge adulte. Ce modèle permettra de comprendre le lien entre le stress oxydant subit chez le nouveau-né et les capacités de réponse à l'ischémie de l'organisme à maturité. Nous étudierons aussi les effets de cet état hyperoxique sur les fonctions des cellules endothéliales aortiques et sur les PACs. L'autre objectif spécifique de cette étude est donc de comprendre les mécanismes impliqués dans la modulation de la néovascularisation post-ischémique par l'hyperoxie néonatale.

6. Article

Publié dans Scientific reports

Sci Rep. 2017 Oct 26;7(1):14143. doi: 10.1038/s41598-017-14396-8

Neonatal exposure to high oxygen levels leads to impaired ischemia-induced neovascularization in adulthood

Short title: **Neonatal hyperoxia and neovascularization in adults**

Raphael Mathieu, Sylvie Dussault, Michel Desjarlais, François Rivard, Wahiba Dhahri, Anik Cloutier, Anne-Monique Nuyt and Alain Rivard

From the Department of Medicine, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) Research Center (R.M, S.D, M.D, F.R, W.D, A.R) and the Department of Pediatrics, Sainte-Justine University Hospital Research Center (A.C, A.M.N). Montréal, Québec, Canada

Address for correspondence:

Alain Rivard, MD

Centre de recherche du CHUM

Tour Viger, R08.466

900 rue St-Denis

Montreal, Quebec, Canada, H2X 0A9

Tel (514) 890-8000 ext: 25776

alain.rivard@umontreal.ca

ABSTRACT

Adverse perinatal conditions can lead to developmental programming of cardiovascular diseases. Prematurely born infants are often exposed to high oxygen levels, which in animal models has been associated with endothelial dysfunction, hypertension, and cardiac remodeling during

adulthood. Here we found that adult mice that have been transiently exposed to O₂ after birth show defective neovasculariation after hindlimb ischemia, as demonstrated by impaired blood flow recovery, reduced vascular density in ischemic muscles and increased tissue damages. Ischemic muscles isolated from mice exposed to O₂ after birth exhibit increased oxidative stress levels and reduced expression of superoxide dismutase 1 (SOD1) and vascular endothelial growth factor (VEGF). Pro-angiogenic cells (PACs) have been shown to have an important role for postnatal neovascularisation. We found that neonatal exposure to O₂ is associated with reduced number of PACs in adults. Moreover, the angiogenic activities of both PACs and mature mouse aortic endothelial cells (MAECs) are significantly impaired in mice exposed to hyperoxia after birth. Our results indicate that neonatal exposure to high oxygen levels leads to impaired ischemia-induced neovascularization during adulthood. The mechanism involves deleterious effects on oxidative stress levels and angiogenic signals in ischemic muscles, together with dysfunctional activities of PACs and mature endothelial cells.

INTRODUCTION

Increasing evidence suggests that adverse perinatal events can induce developmental programming of future diseases during adulthood, particularly in the cardiovascular system^{1,2}. For instance, a Swedish cohort study documented a 7% higher risk of dying from cardiovascular disease in young adulthood for each week of increased prematurity³. Preterm birth has also been associated with higher blood pressure, increased incidence of hypertension, and signs of vascular dysfunction in adolescents and young adults². Infants born preterm are often exposed to high concentrations of O₂, especially when compared to the relative hypoxic condition of the intrauterine life⁴. This can lead to increased oxidative stress⁵, a factor that is thought to be involved in several diseases of prematurity including retinopathy and bronchopulmonary dysplasia⁶. It has been suggested that exposure to high oxygen levels in infants born prematurely could also contribute to alter cardiovascular function during adulthood. In animal models, perinatal hyperoxia (a model of prematurity) has been associated with the adult development of endothelial dysfunction, hypertension, and cardiac remodeling^{7,8}. However, the specific mechanisms that are involved in that pathophysiology are largely unknown. Moreover, how prematurity and transient neonatal exposure to high oxygen levels might modulate the physiological response to cardiovascular stresses in adults remains to be determined.

One of the most important adaptive mechanisms in the cardiovascular system is the response to ischemia and hypoxic stress. The capacity of the organism to counteract the negative effects of ischemia following vascular occlusion depends in large part on its ability to develop new vessels (neovascularization)⁹. Postnatal neovascularization is a complex phenomenon that

necessitates the activation, proliferation and migration of mature endothelial cells (angiogenesis)¹⁰. Vascular endothelial growth factor (VEGF), an endothelial cell specific mitogen, has been shown to be a critical limiting factor for the induction of angiogenesis¹¹. In addition, nitric oxide (NO) is recognized as an essential factor for endothelial function, VEGF-induced angiogenesis^{12,13}, and ischemia-induced neovascularization¹⁴. Recently, it has been proposed that postnatal neovascularization does not only relies on the sprouting of pre-existing vessels, but also involves the contribution of bone marrow-derived pro-angiogenic cells (PACs)^{15,16}. Evidence suggests that these cells are mobilized from the bone marrow into the peripheral blood in response to tissue ischemia. PACs migrate and reach sites of ischemia where they can promote neovascularization after differentiation into mature endothelial cells, or more often through paracrine secretion of growth factors and cytokines¹⁷.

Unfortunately, conditions leading to the development of atherosclerosis and vascular occlusions in patients are also often associated with impaired neovascularization in response to ischemia⁹. Cardiovascular risk factors such as aging, cigarette smoke exposure, diabetes and hypercholesterolemia have been associated with impaired ischemia-induced neovascularization and reduced number of PACs, both in animal models and in humans^{9,17}. Preterm birth is increasingly recognized as a risk factor associated with the development of cardiovascular diseases later in life^{1,2}. However, whether prematurity and/or perinatal adverse conditions can modify the physiological response to ischemia in adults is currently unknown. Here we used an animal model of prematurity and tested the hypothesis that neonatal exposure to hyperoxia might impair ischemia-induced neovascularization during adulthood. We also investigated potential

mechanism involved in that pathophysiology, including the effects of perinatal hyperoxia on the functional activities of mature endothelial cells and PACs.

RESULTS

Effect of neonatal hyperoxia on blood flow recuperation after hindlimb ischemia

C57BL/6 mice were exposed to 85% O₂ or room air (controls) from day 2 to 14 after birth. When the mice reached adulthood (8-10 weeks old), hindlimb ischemia was surgically induced by femoral artery removal. Compared to controls, mice exposed to O₂ after birth showed a significant impairment of blood flow recuperation after hindlimb ischemia (**Figure 1A-D**).

Immediately after surgery (day 0), Laser Doppler flow ratios (DFR) between the ischemic and normal hindlimbs reached comparable low levels, indicating that the severity of the ischemia was similar in the 2 groups (**Figure 1B**). However, DFR were significantly reduced in mice exposed to O₂ after birth both at day 7 (DFR 0.41 ± 0.04 vs. 0.66 ± 0.08 , $P < 0.05$, **Figure 1C**) and at day 21 (DFR 0.63 ± 0.06 vs. 0.79 ± 0.03 , $P < 0.05$, **Figure 1A and 1D**). Clinically, this was also associated with increased hindlimb ischemic damages (**Figure 1E**). Because neonatal exposure to high oxygen levels has previously been shown to increase blood pressure in rats, we measured blood pressure in adult mice that had been exposed or not to O₂ after birth. As shown in **Figure 1F**, blood pressure was similar in the 2 groups of mice, indicating that the impairment of blood flow recuperation in mice exposed to O₂ after birth is not due to hypertension.

Effect of neonatal hyperoxia in ischemic tissues

At the microvascular level, baseline capillary density was similar between groups in non-ischemic muscles (**Figure 2B**). However, exposure to O₂ after birth was associated with a significant reduction of capillary density (**Figure 2A-B**) in ischemic hindlimb muscles at day 21

after surgery (467 ± 32 vs. 761 ± 64 capillaries per mm^2 , $p < 0.05$). Moreover, the number of arterioles (**Figure 2C**) was also significantly decreased in mice exposed to O_2 (1.0 ± 0.2 vs. 5.3 ± 0.7 arterioles per field, $p < 0.05$). Interestingly, the expression of the angiogenic factor VEGF was found to be significantly reduced in the ischemic muscles of mice that had been exposed to O_2 after birth (**Figure 2D**). VEGF levels were similar between groups in non-ischemic muscles (**Supplemental Figure A and B**). Systemically, there was a small reduction of IGF1 in the serum of mice that had been exposed to hyperoxia (**Figure 2E**), but the levels of other angiogenic factors were similar between groups. Since excessive oxidative stress levels have been associated with impaired angiogenesis and reduced VEGF levels locally, we compared superoxide formation in the hindlimb muscles of mice exposed or not to high levels of O_2 after birth. As shown in **Figure 3A-B**, oxidative stress (DHE staining) was low in non-ischemic muscles. There was a small but non-significant increase of oxidative stress in ischemic muscles of mice exposed to normoxia. By contrast, mice exposed to hyperoxia exhibited an important increase of oxidative stress in ischemic muscles. Oxidative stress was localized in myocytes but also between muscle bundles in lectin positive vascular endothelial cells (data not shown). Ultimately, neonatal hyperoxia led to significant increase of superoxide levels in the ischemic muscles of adult mice. This was associated with a reduced expression of copper-zinc superoxide dismutase (CuZnSOD; SOD1), a major antioxidant enzyme involved in the modulation of vascular health and angiogenesis (**Figure 3C**). SOD1 levels were similar between groups in non-ischemic muscles (**Supplemental Figure A and C**).

Effects of neonatal hyperoxia on mature endothelial cells in vitro

To better characterize the effects of neonatal hyperoxia on angiogenesis, in vitro studies were performed using mouse aortic endothelial cells (MAECs) isolated from adult mice. As shown in **Figure 4**, neonatal hyperoxia was associated with endothelial dysfunction during adulthood. MAECs isolated from adult mice exposed to high levels of O₂ after birth exhibited impaired tubule formation (**Figure 4A-B**) and cellular migration (**Figure 4C**) compared to MAECs isolated from control mice. Moreover, NO expression (DAF staining) was significantly reduced in MAECs originating from O₂-exposed mice (**Figure 4D**).

Effect of neonatal hyperoxia on PAC number and function

PACs have been shown to reach sites of neovascularization where they can contribute to the formation of new blood vessels. We investigated the effect of neonatal hyperoxia on the number and the functional activities of PACs in adult mice. The number of PACs in the bone marrow of mice that had been exposed to high levels of O₂ after birth was significantly reduced compared to control mice (**Figure 5A**). Similarly, the percentage of PACs contained in the total viable cell population derived from the spleen (FACS analysis) was also significantly reduced in mice exposed to O₂ after birth (**Figure 5B**). In addition, we observed that PACs isolated from mice exposed to O₂ after birth showed decreased adhesion to endothelial cells (**Figure 5C**) compared to PACs isolated from control mice.

DISCUSSION

To our knowledge, the present study is the first documentation of the negative effect of neonatal hyperoxia on ischemia-induced neovascularization during adulthood. We used an established mouse model of prematurity, where pups were exposed to hyperoxic conditions (85% O₂) from day 2 to 14 after birth¹⁸. Since organ maturation continues after birth in rodents, the immediate neonatal period in these animals is thought to reflect a developmental time equivalent in humans to the last trimester of gestation. Hyperoxia in this model replicates the ex utero marked rise in PO₂ (blood partial pressure in oxygen) occurring at delivery, a phenomenon that is accentuated in premature infants treated with high levels of oxygen. Even short-term (2-5 hours) exposure to hyperoxia has been associated with organ dysfunction after ischemia in some models¹⁹. Neonatal exposure to hyperoxia in rodents is a recognized model to study classical (lungs, eyes) O₂-related complications of prematurity^{20,21}. Moreover this model has also been used to document developmental programming of future diseases in the cardiovascular system, including hypertension⁷ and cardiac dysfunction⁸. Our study extends these previous findings by showing that neonatal exposure to hyperoxia also significantly impairs the future physiological response to ischemia (i.e. neovascularization) in adults. This could have important clinical implications since prematurity has been associated with a higher risk of dying from cardiovascular disease in young adulthood³. Therefore improving neovascularization and blood flow recovery in the context of tissue ischemia could constitute an important therapeutic target in this population.

We used a well-characterized mouse model of hindlimb ischemia²² to define the effects of neonatal hyperoxia on post-natal neovascularization in adults. We found that previous neonatal exposure to high levels of O₂ was associated with a significant impairment of neovascularization following hindlimb ischemia in adult animals. This was reflected by a reduced blood flow recovery after surgery, together with decreased vascular densities (both capillaries and arterioles) in ischemic muscles. Clinically, the reduction in neovascularization was also associated with increased hindlimb ischemic damages. The mechanisms involved in the inhibition of ischemia-induced neovascularization are potentially diverse. Interestingly, neonatal hyperoxia has previously been associated with increased blood pressure levels in adult rats whereas both angiogenesis^{23,24} and vasculogenesis (EPC function)²⁵ have been shown to be impaired in animal models of hypertension. In humans, hypertension is more prevalent among adults born preterm² and preterm-born individuals exhibit an enhanced antiangiogenic state in adult life that is specifically related to elevations in blood pressure²⁶. However, here we found that blood pressure levels were not significantly increased in mice that had been exposed to hyperoxia after birth. Compared to previous findings, this might reflect differences in the animal model used (mice vs. rats) and/or be related to the fact that animals were studied at a relatively young age (8-10 weeks old) in the current study. In any case, our data suggest that the deleterious effect of neonatal hyperoxia on ischemia-induced neovascularization in adults is not due to hypertension.

An important factor that could be involved in the modulation of neovascularization is oxidative stress. Infants born prematurely have reduced antioxidant defenses²⁷ and are often

exposed upon birth to high concentrations of O₂ and pro-oxidant conditions⁶. This oxidative injury is thought to be an important factor involved in short-term complications of prematurity such as bronchopulmonary dysplasia and retinopathy of prematurity²⁸. It has also been associated with reduced pulmonary angiogenesis in neonates²⁹. Interestingly, our results indicate that adult mice that have been exposed to hyperoxia after birth also exhibit increased oxidative stress in ischemic muscles compared to control mice (**Figure 3**). Angiogenesis and neovascularization have been shown to be impaired in conditions where oxidative stress levels are increased, a situation that can be improved by antioxidant therapies or genetic manipulations³⁰⁻³². Moreover, reactive oxygen species (ROS) can impair the activity of VEGF^{30,33}, a critical limiting factor involved in the initiation and the maintenance of angiogenesis¹¹. Here we found that increased oxidative stress levels in ischemic muscles of mice exposed to hyperoxia after birth was associated with a significant reduction of VEGF expression (**Figure 2D**). It is possible that impaired defense against oxidative stress persists during adulthood in individuals that have been exposed to hyperoxia after birth. Consistent with this, we found that the antioxidant enzyme CuZnSOD (SOD1) was significantly reduced in the ischemic muscles of mice that had been exposed to hyperoxia after birth compared to control mice. The functional importance of SOD1 has been demonstrated in homozygous SOD1-deficient mice, which present increased superoxide levels and altered responsiveness in both large arteries and microvessels³⁴. Moreover, we have previously shown that increased oxidative stress levels in SOD1-deficient mice lead to impaired ischemia-induced neovascularization³⁵ and accelerated vascular aging³⁶. Therefore, combined with previous studies, our results suggest that defective antioxidant mechanisms (including SOD1) could contribute to impair VEGF activity and ischemia-induced neovascularization in adult mice exposed to neonatal hyperoxia. However the mechanisms

involved in the developmental programming of defective antioxidant defense in adults, especially in the context of tissue ischemia, remain to be defined.

The results of the present study suggest that PACs could also be involved in the inhibition of neovascularization in adults that have been exposed to hyperoxia after birth. PACs are recruited into ischemic tissues where they can facilitate neovascularization directly through incorporation into new vessels, or indirectly by secreting angiogenic factors in a paracrine fashion¹⁷. The effect of prematurity on the number of PACs is unclear. Previous studies have found increased, reduced or equal number of PACs in preterm infants compared to term controls³⁷. However, preterm PACs seem more vulnerable to exogenous factors such as oxidative stress³⁷. To our knowledge, no study has examined the effects of prematurity and/or neonatal hyperoxia on PAC number and function beyond the neonatal period. Here we found that previous neonatal exposure to hyperoxia is associated in adult animals not only with defective angiogenic activities of mature endothelial cells, but also with a significant reduction in the number and the functional activities of PACs. Although the mechanisms involved in that physiopathology are currently unknown, the deleterious effects of neonatal hyperoxia on PACs could be at least in part related to increased ROS levels. Indeed, previous reports have shown that excessive oxidative stress leads to impaired PAC angiogenic activities^{35,38}. In future studies, it will be interesting to determine whether defective antioxidant defense mechanisms are found in PACs isolated from adults born preterm, which could contribute to impair PAC function and neovascularization in these individuals.

In conclusion, our study demonstrates for the first time that transient neonatal exposure to high oxygen levels leads to impaired ischemia-induced neovascularization during adulthood. We propose that this occurs through deleterious effects on oxidative stress levels and angiogenic signals in ischemic muscles, together with dysfunctional activities of mature endothelial cells and PACs. Our study sheds light on a novel mechanism that could contribute to increase the incidence and morbidity of cardiovascular diseases in individuals born preterm. The development of strategies to therapeutically improve neovascularization in this population could have important clinical implications.

METHODS

Animals and exposure to hyperoxia

The animal protocol was approved and all experiments were conducted in accordance with the Comité Institutionnel de Protection des Animaux (CIPA) of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM). Time-dated pregnant female C57Bl/6 mice were obtained from Charles River (St-Constant, Canada), maintained in a 12h light-dark cycle and fed ad libitum. At day 2 after birth, pups were divided in two groups: the control group was maintained in normoxic conditions whereas the second group was exposed to hyperoxic conditions (85% O₂ by a mixture of medical grade 100% O₂ and room air with an oxycycler ProOx model 110, Biosherix, Lacona, NY) as previously described^{18,39}. Nursing dams were rotated between the hyperoxia and normoxia groups every 24h to avoid maternal oxygen toxicity. Fourteen days after birth, exposure to hyperoxia was ended and all mice were then maintained in normoxic room air until the end of the study. For the measurement of angiogenic growth factors in the serum, enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) were performed using the mouse angiogenesis ELISA strip assays from Signosis (Sunnyvale, CA) according to the manufacturer's instructions.

Murine ischemic hindlimb model and blood flow monitoring

When mice reached 8-10 weeks of age, unilateral hindlimb ischemia was surgically induced after anesthesia with 2% isoflurane as previously described⁴⁰. Our model does not involve necrosis and tissue repair in hindlimb muscles but can be associated with ischemic damages distally in the foot and toes. Hindlimb blood flow was assessed at day 21 after surgery using a Laser Doppler

perfusion imager (LDPI) system (Moor Instrument Ltd., Axminster, UK)⁴⁰. Low and/or no perfusion was displayed in dark blue, whereas the highest perfusion interval was displayed in red. 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. Ischemic damage of foot and toes was evaluated using a scale from 0 (no necrosis) to 4 (amputation). Blood pressure was measured using a tail-cuff pressure instrument (BP-2000, Visitech Systems, Apex, NC)⁴¹.

Tissue preparation and immunochemistry

Whole ischemic hindlimb muscles were immediately fixed in tissue-fix overnight. Identification of endothelial cells was performed by immunostaining for mouse platelet endothelial cells adhesion molecule-1 (PECAM-1 or CD31) with a rat monoclonal antibody (PharMingen, San Diego, CA). 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. 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 were analyzed for the entire section under a 100x magnification⁴¹.

Detection of superoxide in ischemic muscle

To evaluate superoxide production in ischemic muscles, dihydroethidium (DHE) fluorescence labeling was performed⁴¹. After bones had been carefully removed, ischemic muscles were put in a 25% sucrose solution for 10 minutes and were frozen in eppendorf tubes at -80°C for 24h, molded in OCT and kept at -20°C. 3 mm frozen sections were made at three different levels in the ischemic muscles. Sections were labeled with 10 mM DHE (Calbiochem, San Diego, CA) for 30 minutes. Intensities of fluorescence were measured and analyzed using computer-based software (ImageJ) 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) 500 U/ml for 1h (data not shown).

Western blot analysis

Hindlimb muscles were rinsed in PBS, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Protein extracts were obtained after homogenization of muscles in ice-cold RIPA lysis buffer. The membranes were probed with the following antibodies: 1:1000 VEGF (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX), 1:1000 SOD-1 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) and 1:5000 alpha-tubulin (Abcam, Toronto, Canada). Protein expression was quantified by high-resolution optical densitometry (image J software). Results are expressed as density values normalized to the loading control.

Flow cytometry analysis of pro-angiogenic cells (PACs)

The percentages of PACs contained in the total viable cell population derived from the spleen was measured by flow cytometry (FACSCalibur flow cytometer, Becton Dickinson, Oakville,

Ontario, Canada) using the fluorescence-coupled cell markers CD34-FITC, VEGFR-2 (Flk1)-PE and CD117 (c-kit)-APC (eBioscience, San Diego, CA). Cell phenotypes were determined by the analysis of 300 000 events⁴¹.

PACs isolation and characterization

Seven days after hindlimb ischemia, mouse bone marrow mononuclear cells were isolated from the femora, tibiae and humeri bones by flushing the bone marrow cavities using culture medium (medium 200 (Life Technologies) supplemented with 18% fetal bovine serum (FBS, Life Technologies) and low serum growth supplement (2% FBS, 3 ng/ml bFGF, 10 mg/ml heparin, 1 mg/ml hydrocortisone, and 10 ng/ml EGF; Life Technologies)). After red blood cell lysis and washing, bone marrow mononuclear cells were plated on 0.005% fibronectin (Sigma). After 4 days in culture, non-adherent cells were removed by thorough washing with PBS. Adherent cells were stained with 1,10-dicetadecyl-3,3,30,30 tetramethylindocarbocyanine perchlorate-acetylated low-density lipoprotein (DiI-acLDL, 2.5 mg/ml for 1 h; Alfa Aesar, Tewksbury, MA). Bone marrow PACs were characterized as adherent cells that were positive for DiI-acLDL uptake⁴¹.

PAC adhesion to an endothelial monolayer

A monolayer of confluent human umbilical vein endothelial cells (HUVECs; passage 3-5) was prepared in 24 well plates. HUVECs were pretreated for 16h with tumor necrosis factor- α (1

ng/ml; BD Biosciences, Mississauga, Canada), fixed and stained with DAPI (0.5 mg/ml; Life Technologies). PACs were labeled with DiI-AcLDL and 15 000 PACs were added to each well (2 wells/mouse) and incubated for 3h at 37°C. Non-attached cells were gently removed by PBS washing and adherent PACs were fixed with 2% paraformaldehyde and counted in three random fields per well⁴².

Isolation and culture of aortic endothelial cells

Endothelial cells were isolated from the thoracic aorta using an explant technique³². The thoracic aorta was opened longitudinally and cut into 2 mm-long explants. The aortic segments were placed face-down on a Matrigel-coated 6-well plates (2 aorta per well; Basement membrane, BD Biosciences) and incubated in DMEM supplemented with 10% FBS, 10% Newborn Calf serum, 1% penicillin-streptomycin (Life Technologies), 90 ug/mL heparin (Sigma), 50ug/ml endothelial cell growth supplements (VWR), and 100 U/mL fungizone (Life Technologies) at 37°C in a 95% air/5% CO₂ incubator. The vessel segments were removed once cell outgrowth was observed (around day 7). 1-2 weeks later, the cells were detached with dispase (BD Biosciences) and plated onto 1% gelatin-coated 25 cm² flasks. Cells were used at early passage (P2).

Capillary-like tube formation on Matrigel

Endothelial cells were plated (20 000) in 96-well plates that had been pre-coated with 50 μ l of growth factor reduced Matrigel Matrix (Biosciences) and cultured at 37°C for 6h with 50 ng/ml of VEGF. Capillary-like tubes were then photographed under an inverted microscope and all side branches were counted by a single investigator in a blinded manner⁴².

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 medium with 50 ng/ml of VEGF. Cells were allowed to migrate from the upper to the lower chamber for 6h at 37°C. The number of cells that had migrated was counted in three different representative high power (200x) fields per insert (2 inserts/condition)⁴².

Detection of intracellular nitric oxide (NO)

Intracellular generation of NO was visualized with diaminofluorescein-2-diacetate (DAF-2DA, Cell Technology). Cells were incubated with DAF-2DA for 30 minutes. Fluorescence intensities were quantified using image J, with the same threshold for each experiment⁴¹.

Statistical analysis

All results are presented as mean \pm SEM. Statistical significance was evaluated by unpaired t-test. A value of $P < 0.05$ was interpreted to denote statistical significance.

Data availability

All data generated or analyzed during this study are included in this published article.

REFERENCES

1. Lewandowski, A.J. & Leeson, P. Preeclampsia, prematurity and cardiovascular health in adult life. *Early Hum Dev* **90**, 725-729 (2014).
2. Luu, T.M., Katz, S.L., Leeson, P., Thebaud, B. & Nuyt, A.M. Preterm birth: risk factor for early-onset chronic diseases. *CMAJ* **188**, 736-746 (2016).
3. Crump, C., Sundquist, K., Sundquist, J. & Winkleby, M.A. Gestational age at birth and mortality in young adulthood. *JAMA* **306**, 1233-1240 (2011).
4. Vento, M., *et al.* Hyperoxemia caused by resuscitation with pure oxygen may alter intracellular redox status by increasing oxidized glutathione in asphyxiated newly born infants. *Semin Perinatol* **26**, 406-410 (2002).
5. Comporti, M., *et al.* Plasma F2-isoprostanes are elevated in newborns and inversely correlated to gestational age. *Free Radic Biol Med* **37**, 724-732 (2004).
6. Saugstad, O.D. Optimal oxygenation at birth and in the neonatal period. *Neonatology* **91**, 319-322 (2007).
7. Yzydorczyk, C., *et al.* Neonatal oxygen exposure in rats leads to cardiovascular and renal alterations in adulthood. *Hypertension* **52**, 889-895 (2008).
8. Bertagnolli, M., *et al.* Transient neonatal high oxygen exposure leads to early adult cardiac dysfunction, remodeling, and activation of the renin-angiotensin system. *Hypertension* **63**, 143-150 (2014).
9. Losordo, D.W. & Dimmeler, S. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease: part I: angiogenic cytokines. *Circulation* **109**, 2487-2491 (2004).
10. D'Amore, P.A. & Thompson, R.W. Mechanisms of angiogenesis. *Annu Rev Physiol* **49**, 453-464 (1987).

11. Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S. & Poltorak, Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb J* **13**, 9-22. (1999).
12. Papapetropoulos, A., Garcia-Cardena, G., Madri, J.A. & Sessa, W.C. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest* **100**, 3131-3139. (1997).
13. Fukumura, D., *et al.* Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 2604-2609. (2001).
14. Murohara, T., *et al.* Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest* **101**, 2567-2578 (1998).
15. Asahara, T., *et al.* Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* **275**, 964-967 (1997).
16. Asahara, T., *et al.* Bone Marrow Origin of Endothelial Progenitor Cells Responsible for Postnatal Vasculogenesis in Physiological and Pathological Neovascularization. *Circ Res* **85**, 221-228 (1999).
17. Urbich, C. & Dimmeler, S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res* **95**, 343-353 (2004).
18. Rieger-Fackeldey, E., *et al.* Lung development alterations in newborn mice after recovery from exposure to sublethal hyperoxia. *Am J Pathol* **184**, 1010-1016 (2014).
19. Wittnich, C., Torrance, S.M. & Carlyle, C.E. Effects of hyperoxia on neonatal myocardial energy status and response to global ischemia. *Ann Thorac Surg* **70**, 2125-2131 (2000).
20. O'Reilly, M. & Thebaud, B. Animal models of bronchopulmonary dysplasia. The term rat models. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **307**, L948-958 (2014).

21. Sapienza, P., *et al.* Retinopathy of prematurity: understanding ischemic retinal vasculopathies at an extreme of life. *J Clin Invest* **120**, 3022-3032 (2010).
22. Couffinhal, T., *et al.* Mouse model of angiogenesis. *Am J Pathol* **152**, 1667-1679 (1998).
23. Emanuelli, C., *et al.* Rescue of impaired angiogenesis in spontaneously hypertensive rats by intramuscular human tissue kallikrein gene transfer. *Hypertension* **38**, 136-141 (2001).
24. Takeshita, S., *et al.* Angiotensin-converting enzyme inhibition improves defective angiogenesis in the ischemic limb of spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res* **52**, 314-320 (2001).
25. You, D., *et al.* Hypertension impairs postnatal vasculogenesis: role of antihypertensive agents. *Hypertension* **51**, 1537-1544 (2008).
26. Pierce, E.A., Foley, E.D. & Smith, L.E. Regulation of vascular endothelial growth factor by oxygen in a model of retinopathy of prematurity. *Arch Ophthalmol* **114**, 1219-1228 (1996).
27. Georgeson, G.D., *et al.* Antioxidant enzyme activities are decreased in preterm infants and in neonates born via caesarean section. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **103**, 136-139 (2002).
28. Saugstad, O.D. Oxidative stress in the newborn--a 30-year perspective. *Biol Neonate* **88**, 228-236 (2005).
29. Perveen, S., *et al.* Role of EC-SOD overexpression in preserving pulmonary angiogenesis inhibited by oxidative stress. *PLoS One* **7**, e51945 (2012).
30. Michaud, S.E., Dussault, S., Groleau, J., Haddad, P. & Rivard, A. Cigarette smoke exposure impairs VEGF-induced endothelial cell migration: role of NO and reactive oxygen species. *Journal of molecular and cellular cardiology* **41**, 275-284 (2006).

31. Lefevre, J., *et al.* Moderate consumption of red wine (cabernet sauvignon) improves ischemia-induced neovascularization in ApoE-deficient mice: effect on endothelial progenitor cells and nitric oxide. *FASEB J* **21**, 3845-3852 (2007).
32. Haddad, P., *et al.* Nox2-Containing NADPH Oxidase Deficiency Confers Protection From Hindlimb Ischemia in Conditions of Increased Oxidative Stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**, 1522-1528 (2009).
33. Urbich, C., Dernbach, E., Aicher, A., Zeiher, A.M. & Dimmeler, S. CD40 ligand inhibits endothelial cell migration by increasing production of endothelial reactive oxygen species. *Circulation* **106**, 981-986 (2002).
34. Didion, S.P., *et al.* Increased superoxide and vascular dysfunction in CuZnSOD-deficient mice. *Circ Res* **91**, 938-944 (2002).
35. Groleau, J., *et al.* Essential Role of Copper-Zinc Superoxide Dismutase for Ischemia-Induced Neovascularization Via Modulation of Bone Marrow-Derived Endothelial Progenitor Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**, 2173-2181 (2010).
36. Groleau, J., Dussault, S., Turgeon, J., Haddad, P. & Rivard, A. Accelerated Vascular Aging in CuZnSOD-Deficient Mice: Impact on EPC Function and Reparative Neovascularization. *PLoS One* **6**, e23308 (2011).
37. Bertagnolli, M., Nuyt, A.M., Thebaud, B. & Luu, T.M. Endothelial Progenitor Cells as Prognostic Markers of Preterm Birth-Associated Complications. *Stem Cells Transl Med* **6**, 7-13 (2017).
38. Ingram, D.A., *et al.* Clonogenic endothelial progenitor cells are sensitive to oxidative stress. *Stem Cells* **25**, 297-304 (2007).

39. Yzydorczyk, C., *et al.* Developmental programming of eNOS uncoupling and enhanced vascular oxidative stress in adult rats after transient neonatal oxygen exposure. *J Cardiovasc Pharmacol* **61**, 8-16 (2013).
40. Michaud, S.E., Menard, C., Guy, L.G., Gennaro, G. & Rivard, A. Inhibition of hypoxia-induced angiogenesis by cigarette smoke exposure: impairment of the HIF-1alpha/VEGF pathway. *Faseb J* **17**, 1150-1152 (2003).
41. Desjarlais, M., Dussault, S., Dhahri, W., Mathieu, R. & Rivard, A. Direct renin inhibition with aliskiren improves ischemia-induced neovascularization: blood pressure-independent effect. *Atherosclerosis* **242**, 450-460 (2015).
42. Dussault, S., *et al.* Sildenafil increases endothelial progenitor cell function and improves ischemia-induced neovascularization in hypercholesterolemic apolipoprotein E-deficient mice. *Hypertension* **54**, 1043-1049 (2009).

Acknowledgements

This study was supported by grants from the Canadian Institute of Health Research (CIHR MOP-123490) and the Heart and Stroke Foundation of Canada (HSFC G-17-0019106) to AR.

Author Contributions

R.M. Conception and design, acquisition of data, analysis and interpretation of data, writing of the manuscript. S.D., M.D., F.R., W.D. and A.C. Acquisition of data, analysis and interpretation of data. A.M.N. Conception and design, interpretation of data, revision of the manuscript. A.R. Obtained funding, conception and design, study supervision, writing of the manuscript. All authors discussed the results and commented on the manuscript.

Competing financial interests

The authors declare no competing financial interests

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Neonatal hyperoxia and blood flow perfusion after hindlimb ischemia.

A. Pictures of representative Laser Doppler measurements 21 days after hindlimb ischemia. A color scale illustrates blood flow variation from minimal (dark blue) to maximal perfusion (red). Arrows indicate ischemic hindlimbs. **B-D.** Laser Doppler perfusion ratios at baseline (**B**), day 7 (**C**) and day 21 (**D**) after ischemia. **E-F:** Effect of neonatal hyperoxia on ischemic damages (**E**) and systolic blood pressure (**F**). Data are mean \pm SEM (n=7-12/group). * $P < 0.05$ vs. normoxia.

Figure 2: Effect of neonatal hyperoxia in ischemic tissues. Capillary density (**A-B**) and arteriolar density (**C**) in ischemic muscles harvested at day 21 after surgery in the different groups of mice. Arrows in **2A** indicate positive (brown) CD31 staining in capillaries.

Isch=ischemic. N-Isch=non ischemic. **D.** Representative Western blots and quantitative analyses of VEGF expression in ischemic muscles at day 7 after surgery. Data were normalized using loading controls (alpha-tubulin) and are presented as mean \pm SEM (n=4/ group). **E.** Effect of hyperoxia exposure on the level of angiogenic factors in the serum, as evaluated by Elisa at day 7 after surgery. * $P < 0.05$ vs. normoxia.

Figure 3: Neonatal hyperoxia and oxidative stress levels after ischemia. A-B. Oxidative stress levels (DHE staining) in non-ischemic muscles and in ischemic muscles at day 7 after surgery. **C.** Representative Western blots and quantitative analyses of SOD1 in ischemic muscles. Data were normalized using loading controls (α -tubulin) and are presented as mean \pm SEM (n=8/group). * P <0.05 vs. normoxia ischemic. # P <0.05 vs. hyperoxia non-ischemic.

Figure 4: Effect of neonatal hyperoxia on mature endothelial cells in vitro. Analyses of tube formation (**A-B**), cellular migration (**C**) and nitric oxide formation (**D**) in MAECs isolated from adult mice that have been exposed to neonatal hyperoxia or normoxia. Data are presented as mean \pm SEM. * P <0.05 vs. normoxia.

Figure 5: Effect of neonatal hyperoxia on PAC number and function. Number of PACs isolated from the bone marrow (**A**) and % of PACs in the spleen as assessed by flow cytometry (**B**) in mice exposed to neonatal hyperoxia or normoxia. To assess PAC adhesion (**C**), PACs were labelled with a DiI fluorescent marker and allowed to adhere to a monolayer of tumor necrosis factor- α -stimulated HUVECs. Data are mean \pm SEM (n=4-6/group). * P <0.05 vs. normoxia.

Figure 1: Neonatal hyperoxia and blood flow perfusion after hindlimb ischemia.

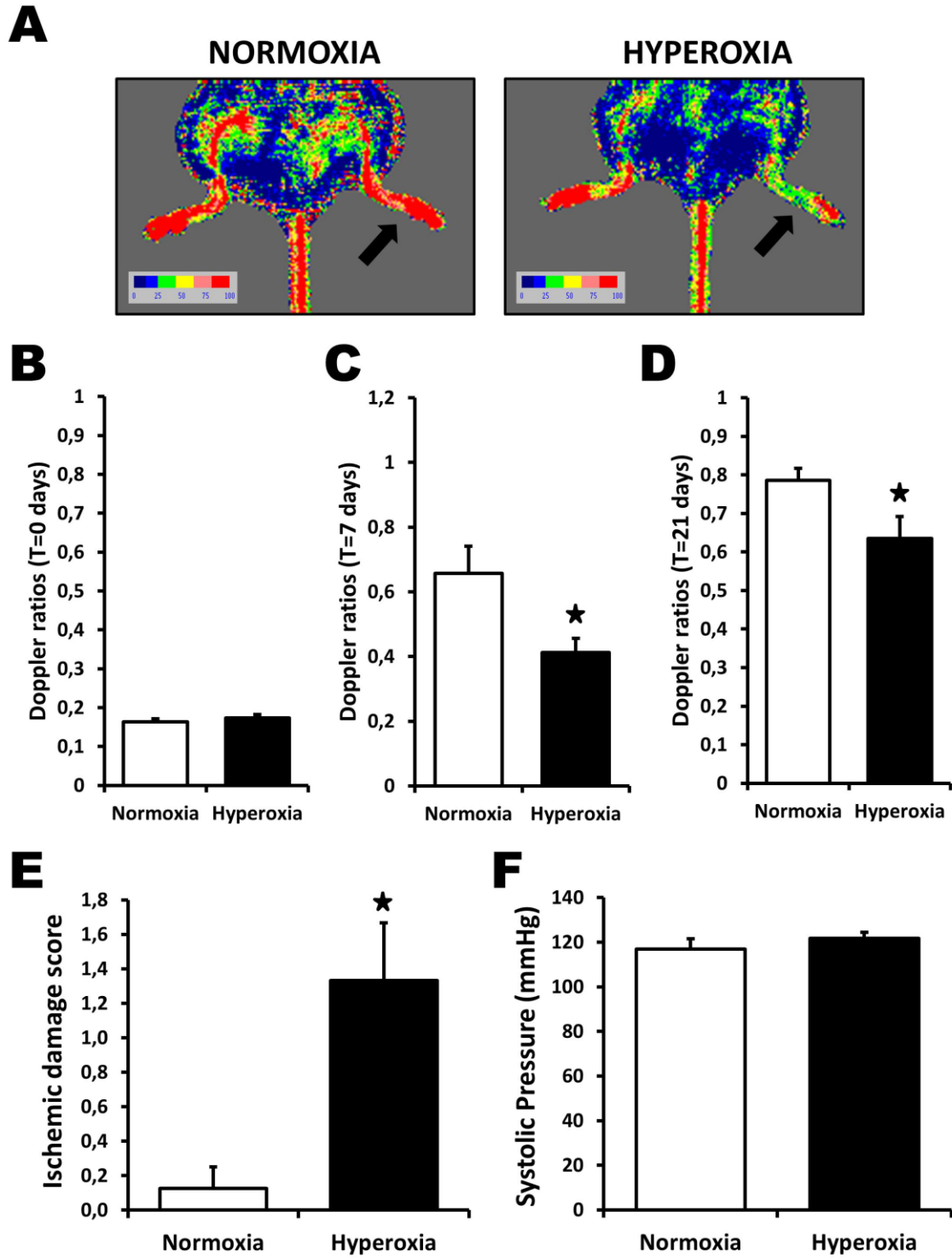


Figure 2: Effect of neonatal hyperoxia in ischemic tissues.

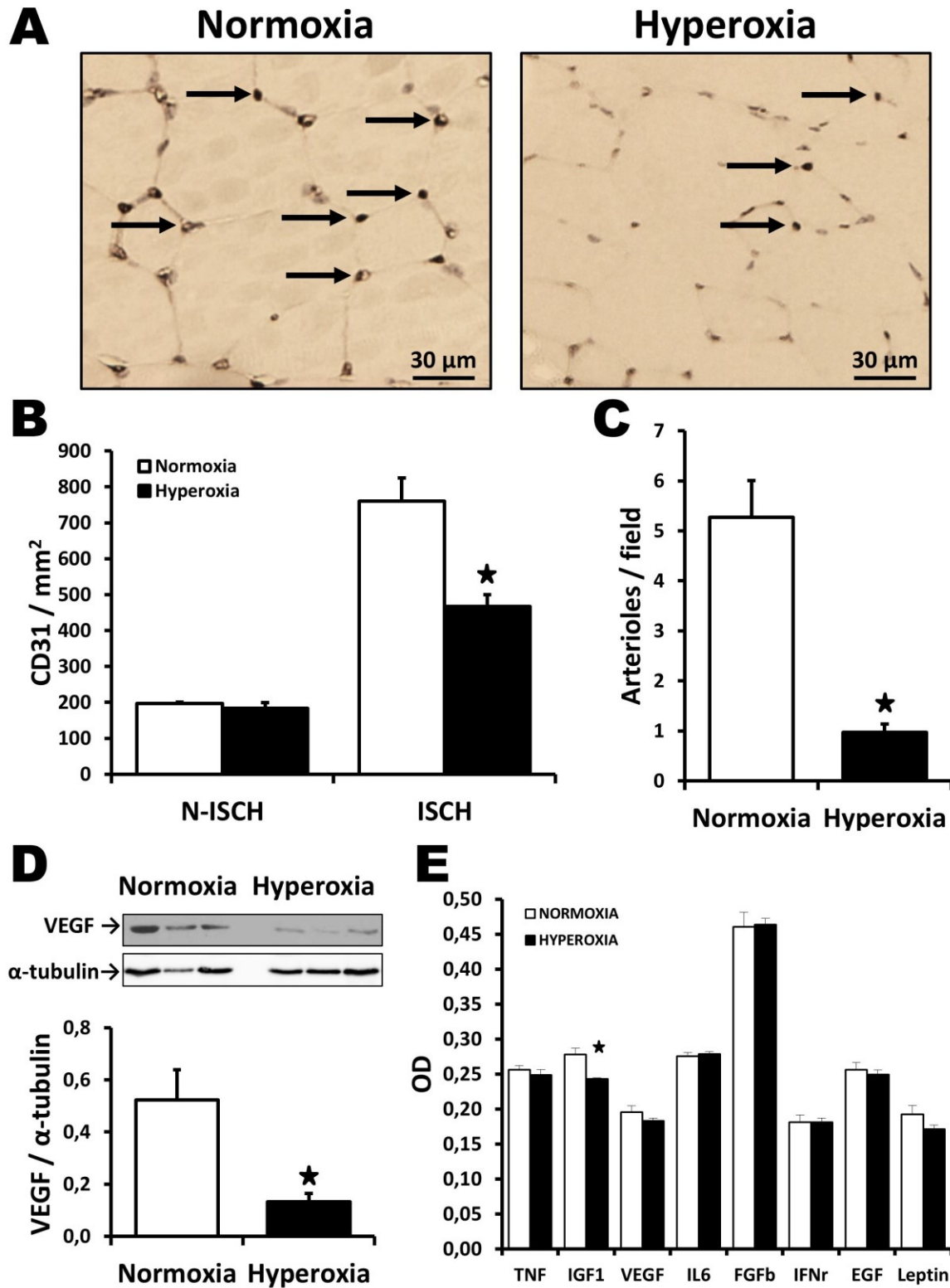


Figure 3: Neonatal hyperoxia and oxidative stress levels after ischemia.

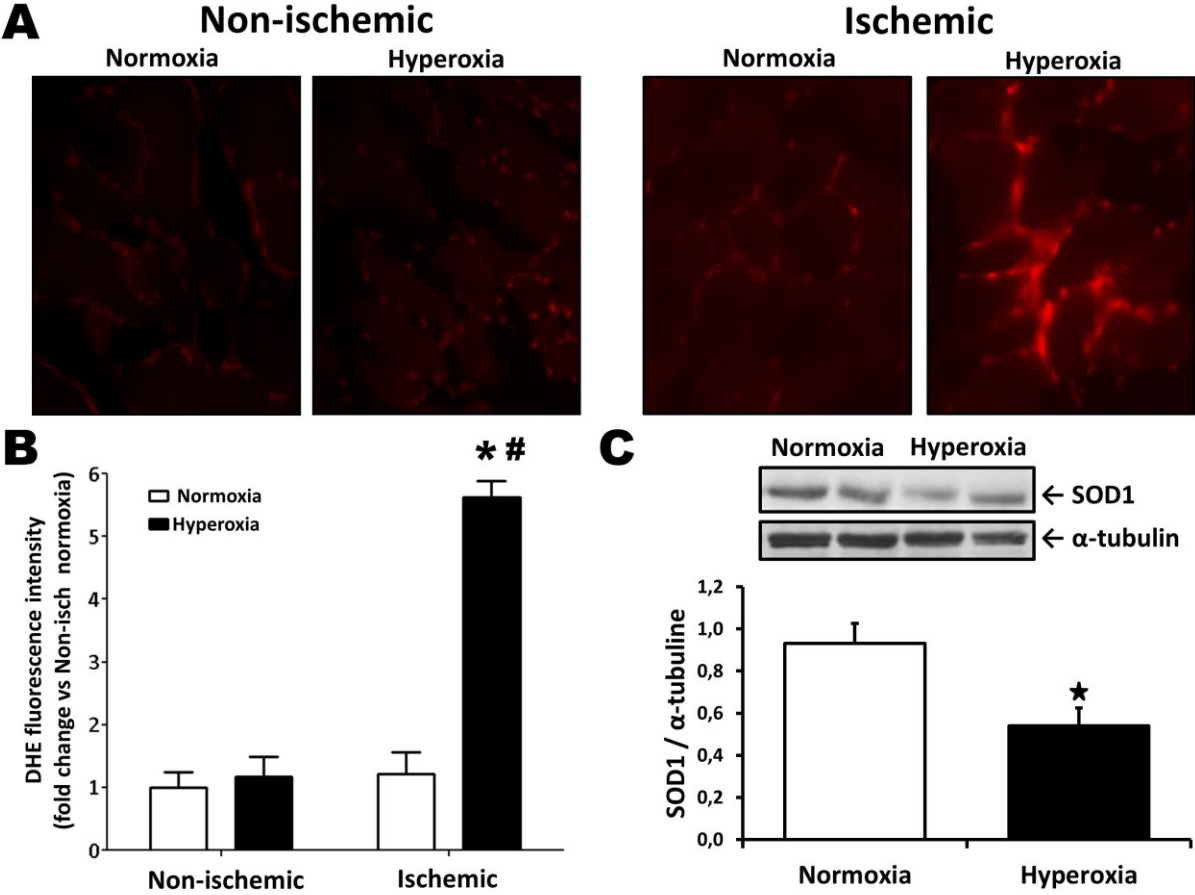


Figure 4: Effect of neonatal hyperoxia on mature endothelial cells in vitro.

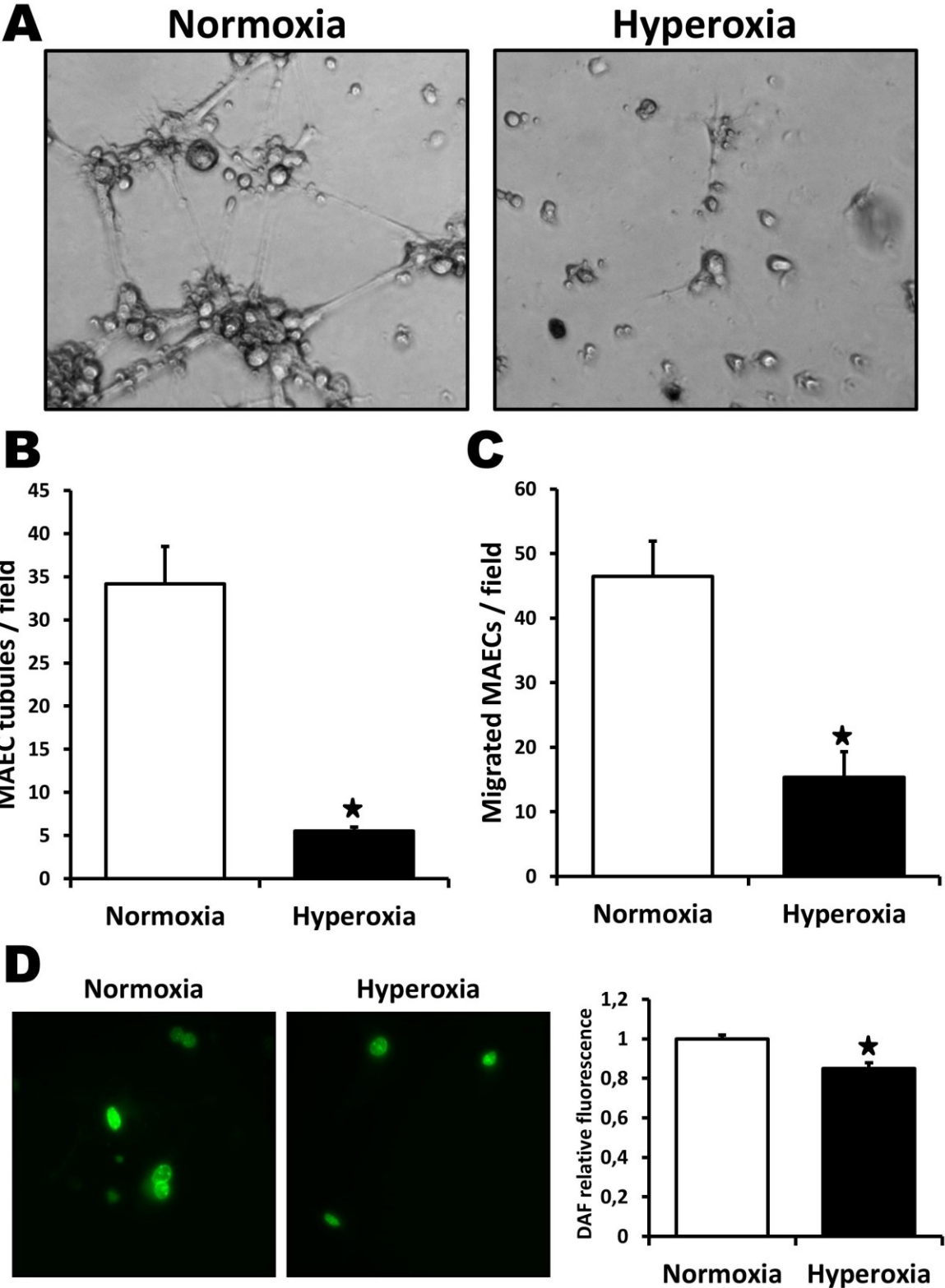
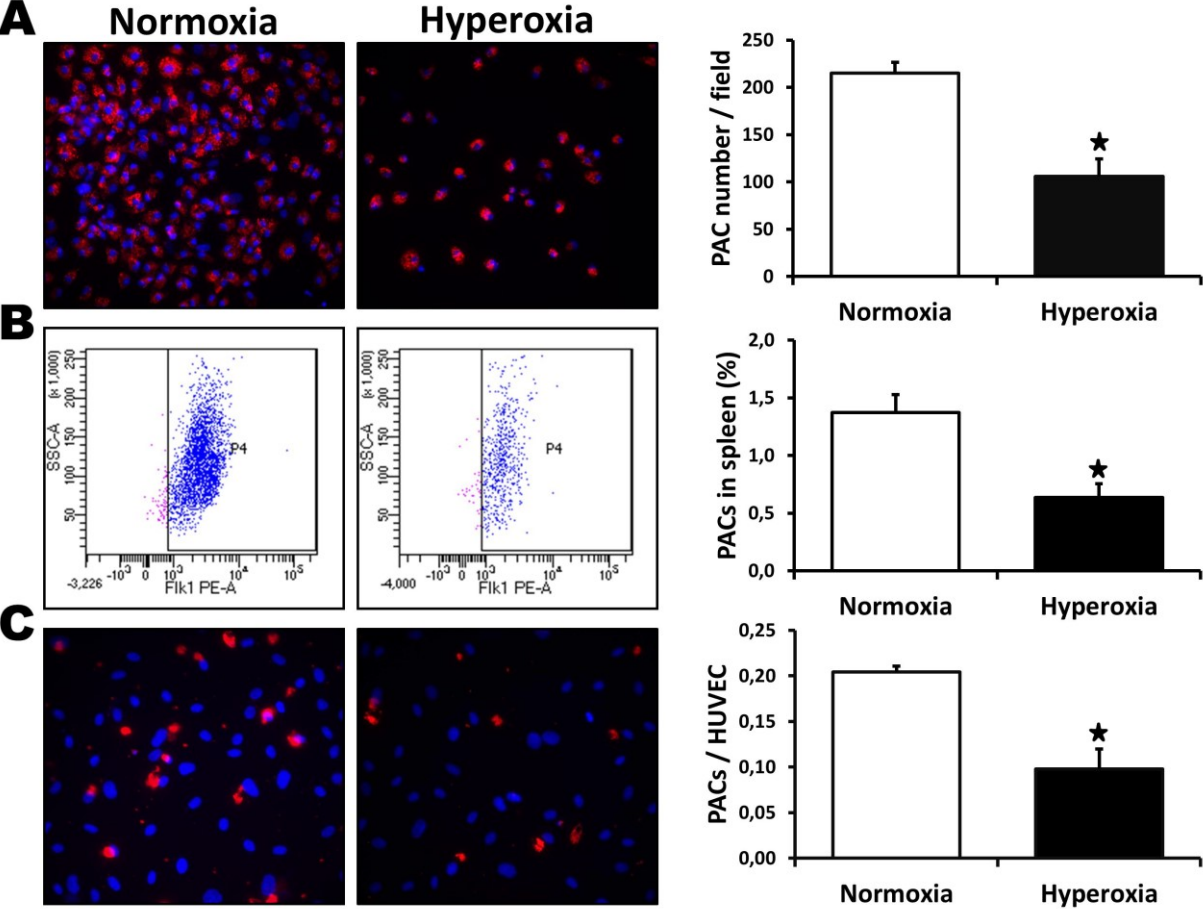


Figure 5: Effect of neonatal hyperoxia on PAC number and function.



7. Discussion

Les impacts de l'hyperoxie néonatale sont encore mal connus, surtout l'effet de cette condition sur la santé à l'âge adulte. Les études déjà réalisées démontrent des conséquences sur le développement à l'âge adulte incluant l'hypertension artérielle, l'hypertrophie ventriculaire gauche et la dysfonction endothéliale (Bertagnolli et al., 2014). Ces conséquences sont expliquées au moins en partie par une augmentation de la production de ROS due à l'état hyperoxique, ce qui semble entraîner la dysfonction endothéliale (Yzydorczyk et al., 2008) (Yzydorczyk et al., 2013). Cette augmentation du niveau de stress oxydant s'explique en partie par un découplage de l'enzyme eNOS, produisant une quantité importante de ROS. Ceci occasionne un endothélium moins réceptif aux vasodilatateurs. Il y a aussi une diminution de la production de NO (Yzydorczyk et al., 2013).

Dans notre étude, nous avons utilisé un modèle d'ischémie de la patte couramment utilisé. Les avantages de ce modèle sont qu'il est aisément reproductible, que différents paramètres cliniques peuvent être étudiés et que les effets obtenus sont semblables aux conséquences ischémiques des maladies athérosclérotiques chez les patients (Fukai, Folz, Landmesser, & Harrison, 2002) (Galasso et al., 2006) (Crawford et al., 2007) (Ohashi et al., 2009). De plus, les rongeurs ayant une maturation des organes qui se poursuit après leurs naissances, la période néonatale de ceux-ci est donc

un excellent modèle représentant le dernier trimestre de la gestation chez l'humain. L'induction d'une hyperoxie, même si celle-ci est brève, chez le modèle de rongeur réplique les augmentations de PO₂ (pression partielle en oxygène sanguin) observées à l'accouchement, surtout chez les prématurés. Ce type d'hyperoxie a été associé avec la dysfonction de certains organes après l'ischémie, dans certains modèles (Wittnich, Torrance, & Carlyle, 2000). L'hyperoxie néonatale chez les rongeurs est un modèle reconnu pour étudier les conséquences telles que la prématurité, la rétinopathie et la dysplasie bronchopulmonaire (Sapieha et al., 2010) (O'Reilly & Thebaud, 2014). Plus récemment, ce même modèle a été utilisé pour démontrer le phénomène de « developmental programming » sur le système cardiovasculaire, notamment sur le développement de maladies à l'âge adulte telles que l'hypertension artérielle et la dysfonction cardiaque (Yzydorczyk et al., 2008) (Bertagnolli et al., 2014).

Nous avons découvert que l'hyperoxie néonatale cause une diminution de la néovascularisation post-ischémique chez la souris à l'âge adulte. Cette découverte est d'une implication clinique importante car la prématurité est déjà associée avec un plus haut risque de décès suite à des maladies cardiovasculaires chez les jeunes adultes. C'est pourquoi les résultats de cette étude pourraient mener vers un traitement améliorant la néovascularisation suite à l'ischémie. La diminution de néovascularisation est observée tant au niveau macroscopique que microscopique. Au laser-doppler nous avons remarqué une altération du ratio de flot de la patte ischémique sur la patte non-ischémique chez les souris hyperoxiques, comparées aux souris contrôles. Cet effet est corrélé à une diminution des vaisseaux capillaires dans les

muscles ischémiques des souris soumises à l'hyperoxie néonatale. Nous avons également observé avec une coloration d'élastine une diminution de la formation des vaisseaux de plus gros calibres (artérioles) dans ces mêmes muscles ischémiques de souris hyperoxiques.

Les effets observés s'expliquent par des altérations au niveau de l'angiogenèse et de la vasculogenèse. Au niveau des MAECs issues des souris hyperoxiques, nous avons observé une diminution de la production de NO, de la formation de réseaux de tubules et de la migration de ces cellules. La capacité de formation de NO des cellules endothéliales est une fonction importante, et ce à différents niveaux dans le processus d'angiogenèse (activation des cellules endothéliales, réponse au VEGF, etc.). La création de tubules est une représentation de la capacité des cellules endothéliales à former de nouveaux vaisseaux stables. La migration de ces cellules est aussi une fonction importante dans l'angiogenèse. Ces deux fonctions sont régulées en outre par le NO. La diminution de la production de NO dans notre modèle est due en partie au stress oxydant observé au niveau du muscle ischémique. Ceci ne semble pas être expliqué par une modification dans l'expression de la eNOS, mais plutôt par une diminution de l'enzyme antioxydante SOD1. Celle-ci a un effet antioxydant par son action de liaison d'ions de cuivre et de zinc pour former un homodimère qui aura pour fonction de réduire les ROS en les métabolisant en oxygène et en peroxyde d'hydrogène. C'est ainsi que la SOD1 a une action de défense contre la toxicité de l'oxygène (Saccon et al., 2013). Nous croyons également que la diminution de cette enzyme antioxydante a pour effet de diminuer la formation de VEGF au niveau du

muscle ischémique hyperoxique. Cette diminution pourrait également s'ajouter à celle de la SOD1 et ainsi mieux expliquer les résultats obtenus.

Au niveau de la vasculogénèse, nous avons observé une diminution du nombre de PACs au niveau de la moelle osseuse chez les souris ayant subi l'hyperoxie néonatale. Ces PACs présentent également une diminution de leur capacité d'attachement aux cellules endothéliales. Pour compléter notre étude, il faudrait cependant évaluer les modulations de différentes protéines au niveau de ces cellules, notamment la eNOS. Il serait aussi souhaitable également d'évaluer la formation de NO et le niveau du stress oxydant des PACs, pour tenter d'expliquer plus précisément l'effet observé au niveau de leur capacité d'attachement. De plus, nous avons observé une diminution des PACs circulants. L'hyperoxie néonatale cause une diminution du nombre de PACs au niveau de la moelle osseuse, mais également une inhibition de leur mobilisation au niveau sanguin et également une diminution de leur capacité d'attachement aux cellules endothéliales. Ces conséquences pourraient être expliquées par un effet délétère sur les cellules souches de la moelle osseuse lors de l'exposition à l'hyperoxie, avec des conséquences néfastes qui seraient maintenues à l'âge adulte. Cependant des expérimentations supplémentaires sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse. Bien qu'une combinaison spécifique de marqueurs pour les cellules souches précurseurs de cellules hématopoïétiques soit encore controversée dans le milieu scientifique, une combinaison de Sca1+/Gr1+, Sca1-/Gr1+, VEGFR1+ et VEGFR2+ pourrait être envisagée (Reddy, Zhou, Schadler, Jia, & Kleinerman, 2008, Rostovskaya & Anastassiadis, 2012)

Pour pousser la recherche sur les effets de l'hyperoxie néonatale sur les maladies cardiovasculaires à l'âge adulte, il serait intéressant de réutiliser notre modèle dans un contexte d'athérosclérose. Considérant l'augmentation du stress oxydant et la diminution de la formation de NO dans notre étude, il serait possible d'observer une augmentation de la formation néointimale et de marqueurs d'inflammation tel que des cytokines (IL-1, TNF- α , IL6, etc.) ou différentes molécules d'adhésion (VCAM, ICAM, etc.). Une autre avenue à explorer serait de tester un traitement antioxydant à administrer durant l'hyperoxie néonatale pour contrer la diminution de la SOD1 et ainsi peut-être retrouver un phénotype normal de néovascularisation post-ischémique à l'âge adulte. Nous pourrions également faire un dépistage ou *screening* de micro-ARN pour ainsi observer leurs modulations et ainsi comprendre plus précisément les effets de l'hyperoxie néonatale sur notre modèle. Par cette technique nous pourrions non seulement consolider nos résultats, mais aussi trouver de nouvelles voies cellulaires affectées par notre condition.

8. Conclusion

L'hyperoxie néonatale cause une diminution de la néovascularisation post-ischémique à l'âge adulte. Ce défaut se manifeste tant au niveau macrovasculaire que microvasculaire. L'effet délétère est dû au moins en partie à une situation de stress oxydant excessif causée par l'état hyperoxique, phénomène qui persiste à l'âge adulte. Le déficit de néovascularisation est relié à une diminution de l'enzyme antioxydante SOD1. Le stress oxydant excessif affecte l'angiogenèse et contribue à expliquer la diminution du nombre de capillaires et d'artéioles formés suite à l'induction d'une ischémie. Ces phénomènes affectent également la vasculogenèse en diminuant le nombre de PACs, ainsi que leur capacité d'attachement aux cellules endothéliales. De plus, cet état oxydatif cause une diminution du NO au niveau des MAECs et inhibe leur capacité à migrer et à former des réseaux tubulaires. Le point commun semble être une diminution du VEGF au niveau du tissu ischémique expliquant les différents effets observés sur l'angiogenèse et la vasculogenèse.

Notre étude suggère la présence d'une fragilité vasculaire chez les patients nés prématurément. Ceux-ci pourraient être plus enclins à développer des complications liées aux maladies cardiovasculaires et présenter une diminution de la réponse physiologique à l'ischémie. La prématurité et l'exposition néonatale à l'hyperoxie pourraient être considérées comme de nouveaux facteurs de risque cardiovasculaire chez l'adulte.

9. Bibliographie

- Abramson, B. L., Batchelor, W., Cantor, W., Casella, L., Chisholm, R. J., Chow, C., ... Strauss, B. H. (n.d.). Conférences scientifiques L ' angiogenèse : une nouvelle technologie pour.
- Alderton, W. K., Cooper, C. E., & Knowles, R. G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *The Biochemical Journal*, 357(Pt 3), 593–615.
- Anderson, T. J., Gerhard, M. D., Meredith, I. T., Charbonneau, F., Delagrangé, D., Creager, M. A., ... Ganz, P. (1995). Systemic nature of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *American Journal of Cardiology*, 75(6), 71B–74B. [https://doi.org/10.1016/0002-9149\(95\)80017-M](https://doi.org/10.1016/0002-9149(95)80017-M)
- Auerbach, R., Lewis, R., Shinnars, B., Kubai, L., & Akhtar, N. (2003). Angiogenesis assays: A critical overview. *Clinical Chemistry*, 49(1), 32–40. <https://doi.org/10.1373/49.1.32>
- Badimon, J. J., Fuster, V., Chesebro, J. H., & Badimon, L. (1993). Coronary atherosclerosis. A multifactorial disease. *Circulation*, 87(3 Suppl), II3—16. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/8443920>
- Bertagnolli, M., Huyard, F., Cloutier, A., Anstey, Z., Huot-Marchand, J. É., Fallaha, C., ... Nuyt, A. M. (2014). Transient neonatal high oxygen exposure leads to early adult cardiac dysfunction, remodeling, and activation of the Renin-Angiotensin system. *Hypertension*, 63(1), 143–150. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01760>
- Bobryshev, Y. V. (2006). Monocyte recruitment and foam cell formation in atherosclerosis. *Micron*, 37(3), 208–222. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micron.2005.10.007>

- Brkovic, A., & Sirois, M. G. (2007). Vascular permeability induced by VEGF family members in vivo: role of endogenous PAF and NO synthesis. *Journal of Cellular Biochemistry*, *100*(3), 727–737. <https://doi.org/10.1002/jcb.21124>
- Butler, A. E., Janson, J., Bonner-Weir, S., Ritzel, R., Rizza, R. A., & Butler, P. C. (2003). β -Cell Deficit and Increased β -Cell Apoptosis in Humans With Type 2 Diabetes. *Diabetes*, *52*(1), 102 LP-110. Retrieved from <http://diabetes.diabetesjournals.org/content/52/1/102.abstract>
- Canada, S. (2015). Smoking 2014, 82-625-X20.
- Carr, H., Cnattingius, S., Granath, F., Ludvigsson, J. F., & Edstedt Bonamy, A. K. (2017). Preterm Birth and Risk of Heart Failure Up to Early Adulthood. *Journal of the American College of Cardiology*, *69*(21), 2634–2642. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.03.572>
- Ceriello, A., Taboga, C., Tonutti, L., Quagliaro, L., Piconi, L., Bais, B., ... Motz, E. (2002). Evidence for an Independent and Cumulative Effect of Postprandial Hypertriglyceridemia and Hyperglycemia on Endothelial Dysfunction and Oxidative Stress Generation. *Circulation*, *106*(10), 1211 LP-1218. Retrieved from <http://circ.ahajournals.org/content/106/10/1211.abstract>
- Chin, Y. R., Lee, I. S., & Lee, H. Y. (2018). Effects of Hypertension, Diabetes, and/or Cardiovascular Disease on Health-related Quality of Life in Elderly Korean Individuals: A Population-based Cross-sectional Survey. *Asian Nursing Research*, *8*(4), 267–273. <https://doi.org/10.1016/j.anr.2014.10.002>
- Crawford, R. S., Hashmi, F. F., Jones, J. E., Albadawi, H., McCormack, M., Eberlin, K., ... Wg, A. (2007). A novel model of acute murine hindlimb ischemia, *2114*, 830–837. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00581.2006>.

- Curb, J., SL, P., JA, C., & al, et. (1996). Effect of diuretic-based antihypertensive treatment on cardiovascular disease risk in older diabetic patients with isolated systolic hypertension. *JAMA*, 276(23), 1886–1892. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1001/jama.1996.03540230036032>
- Davignon, J., & Ganz, P. (2004). Role of Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis. *Circulation*, 109(23 suppl 1), III-27 LP-III-32. Retrieved from http://circ.ahajournals.org/content/109/23_suppl_1/III-27.abstract
- DeMaria, A. N., & Ben-Yehuda, O. (2007). Low-Density Lipoprotein Reduction and Cancer. *Journal of the American College of Cardiology*, 50(5), 421 LP-422. Retrieved from <http://www.onlinejacc.org/content/50/5/421.abstract>
- Deuber, C., & Terhaar, M. (2011). Hyperoxia in Very Preterm Infants: A Systematic Review of the Literature. *The Journal of Perinatal & Neonatal Nursing*, 25(3). Retrieved from https://journals.lww.com/jpnnjournal/Fulltext/2011/07000/Hyperoxia_in_Very_Preterm_Infants__A_Systematic.13.aspx
- Dhahri, W., Dussault, S., Haddad, P., Turgeon, J., Tremblay, S., Rolland, K., ... Rivard, A. (2017). Reduced expression of let-7f activates TGF- β /ALK5 pathway and leads to impaired ischaemia-induced neovascularization after cigarette smoke exposure. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 21(9), 2211–2222. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13144>
- Dimmeler, S. (2005). ATVB in focus: novel mediators and mechanisms in angiogenesis and vasculogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 25(11), 2245. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000187471.06942.17>
- DJ, H., & VN, P. (2000). Self-reported hypertension treatment practices among primary care

physicians: Blood pressure thresholds, drug choices, and the role of guidelines and evidence-based medicine. *Archives of Internal Medicine*, 160(15), 2281–2286. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1001/archinte.160.15.2281>

dos Santos, C. A., de Oliveira, M. A. B., Brandi, A. C., Botelho, P. H. H., Brandi, J. de C. M., dos Santos, M. A., ... Braile, D. M. (2014). Risk factors for mortality of patients undergoing coronary artery bypass graft surgery. *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular : Órgão Oficial Da Sociedade Brasileira de Cirurgia Cardiovascular*, 29(4), 513–520. <https://doi.org/10.5935/1678-9741.20140073>

Edgar, K. S., Matesanz, N., Gardiner, T. A., Katusic, Z. S., & McDonald, D. M. (2015). Hyperoxia depletes (6R)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin levels in the neonatal retina: Implications for nitric oxide synthase function in retinopathy. *American Journal of Pathology*, 185(6), 1769–1782. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.02.021>

Edgar, K. S., Matesanz, N., Gardiner, T. A., Katusic, Z. S., & McDonald, D. M. (2018). Hyperoxia Depletes (6R)-5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin Levels in the Neonatal Retina. *The American Journal of Pathology*, 185(6), 1769–1782. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.02.021>

Fiedler, U., & Augustin, H. G. (2006). Angiopoietins: a link between angiogenesis and inflammation. *Trends in Immunology*, 27(12), 552–558. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.it.2006.10.004>

Fukai, T., Folz, R. J., Landmesser, U., & Harrison, D. G. (2002). Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. *Cardiovascular Research*, 55(2), 239–249. Retrieved from [http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6363\(02\)00328-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6363(02)00328-0)

- Galasso, G., Schiekofer, S., Sato, K., Shibata, R., Handy, D. E., Ouchi, N., ... Walsh, K. (2006). Impaired Angiogenesis in Glutathione Peroxidase-1–Deficient Mice Is Associated With Endothelial Progenitor Cell Dysfunction. *Circulation Research*, *98*(2), 254 LP-261. Retrieved from <http://circres.ahajournals.org/content/98/2/254.abstract>
- Gennaro, G. (2003). Age-Dependent Impairment of Reendothelialization After Arterial Injury: Role of Vascular Endothelial Growth Factor. *Circulation*, *107*(2), 230–233. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000050652.47145.4C>
- Glasser, S. P., Selwyn, A. P., & Ganz, P. (1996). Atherosclerosis: risk factors and the vascular endothelium. *American Heart Journal*, *131*(2), 379—384. [https://doi.org/10.1016/s0002-8703\(96\)90370-1](https://doi.org/10.1016/s0002-8703(96)90370-1)
- Griffioen, A. W., & Molema, G. (2000). Angiogenesis: Potentials for Pharmacologic Intervention in the Treatment of Cancer, Cardiovascular Diseases, and Chronic Inflammation. *Pharmacological Reviews*, *52*(2), 237 LP-268. Retrieved from <http://pharmrev.aspetjournals.org/content/52/2/237.abstract>
- Grundy, S. M., Benjamin, I. J., Burke, G. L., Chait, A., Eckel, R. H., Howard, B. V., ... Sowers, J. R. (1999). Diabetes and Cardiovascular Disease. *Circulation*, *100*(10), 1134 LP-1146. Retrieved from <http://circ.ahajournals.org/content/100/10/1134.abstract>
- Hadi, H. A. R., Carr, C. S., & Al Suwaidi, J. (2005). Endothelial Dysfunction: Cardiovascular Risk Factors, Therapy, and Outcome. *Vascular Health and Risk Management*, *1*(3), 183–198. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1993955/>
- Hicklin, D. J., & Ellis, L. M. (2005). Role of the Vascular Endothelial Growth Factor Pathway in Tumor Growth and Angiogenesis. *Journal of Clinical Oncology*, *23*(5), 1011–1027.

<https://doi.org/10.1200/JCO.2005.06.081>

Higdon, J. V., & Frei, B. (2003). Obesity and Oxidative Stress. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(3), 365 LP-367. Retrieved from <http://atvb.ahajournals.org/content/23/3/365.abstract>

Hristov, M., Erl, W., & Weber, P. C. (2018). Endothelial Progenitor Cells. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 13(5), 201–206. [https://doi.org/10.1016/S1050-1738\(03\)00077-X](https://doi.org/10.1016/S1050-1738(03)00077-X)

Hur, J., Yoon, C.-H., Kim, H.-S., Choi, J.-H., Kang, H.-J., Hwang, K.-K., ... Park, Y.-B. (2004). Characterization of Two Types of Endothelial Progenitor Cells and Their Different Contributions to Neovasculogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24(2), 288 LP-293. Retrieved from <http://atvb.ahajournals.org/content/24/2/288.abstract>

Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. (2017). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>

Jackson, J. R., Seed, M. P., Kircher, C. H., Willoughby, D. A., & Winkler, J. D. (1997). The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. *The FASEB Journal*, 11(6), 457–465. <https://doi.org/10.1096/fasebj.11.6.9194526>

Law, M. R., Wald, N. J., & Rudnicka, A. R. (2003). Quantifying effect of statins on low density lipoprotein cholesterol, ischaemic heart disease, and stroke: systematic review and meta-analysis. *BMJ*, 326(7404), 1423. Retrieved from <http://www.bmj.com/content/326/7404/1423.abstract>

- Lerman, A., & Burnett, J. C. J. (1992). Intact and altered endothelium in regulation of vasomotion. *Circulation*, *86*(6 Suppl), III12-19.
- Lloyd-Jones, D., Adams, R., Carnethon, M., De Simone, G., Ferguson, T. B., Flegal, K., ... Hong, Y. (2009). Heart Disease and Stroke Statistics—2009 Update. *Circulation*, *119*(3), e21 LP-e181. Retrieved from <http://circ.ahajournals.org/content/119/3/e21.abstract>
- Lusis, A. J. (2000). Atherosclerosis. *Nature*, *407*(6801), 233–241.
<https://doi.org/10.1038/35025203>
- Lyons, D., Roy, S., Patel, M., Benjamin, N., & Swift, C. G. (1997). Impaired Nitric Oxide-Mediated Vasodilatation and Total Body Nitric Oxide Production in Healthy Old Age. *Clinical Science*, *93*(6), 519 LP-525. Retrieved from <http://www.clinsci.org/content/93/6/519.abstract>
- Maingrette, F., Dussault, S., Dhahri, W., Desjarlais, M., Mathieu, R., Turgeon, J., ... Rivard, A. (2015). Psychological stress impairs ischemia-induced neovascularization: Protective effect of fluoxetine. *Atherosclerosis*, *241*(2), 569–578.
<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.06.010>
- Matsushita, H., Chang, E., Glassford, A. J., Cooke, J. P., Chiu, C.-P., & Tsao, P. S. (2001). eNOS Activity Is Reduced in Senescent Human Endothelial Cells. *Circulation Research*, *89*(9), 793 LP-798. Retrieved from <http://circres.ahajournals.org/content/89/9/793.abstract>
- Michaud, S. É., Dussault, S., Haddad, P., Groleau, J., & Rivard, A. (2005). Circulating endothelial progenitor cells from healthy smokers exhibit impaired functional activities. *Atherosclerosis*, *187*(2), 423–432. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2005.10.009>

- Minamino, T., & Komuro, I. (2007). Vascular Cell Senescence. *Circulation Research*, *100*(1), 15 LP-26. Retrieved from <http://circres.ahajournals.org/content/100/1/15.abstract>
- Moreyra, A. E., Maniatis, G. A., Gu, H., Swerdel, J. N., McKinney, J. S., Cosgrove, N. M., ... Kostis, J. B. (2018). Frequency of Stroke After Percutaneous Coronary Intervention or Coronary Artery Bypass Grafting (from an Eleven-Year Statewide Analysis). *American Journal of Cardiology*, *119*(2), 197–202. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2016.09.046>
- Mullenix, P. S., Andersen, C. A., & Starnes, B. W. (2018). Atherosclerosis as Inflammation. *Annals of Vascular Surgery*, *19*(1), 130–138. <https://doi.org/10.1007/s10016-004-0153-z>
- Murohara, T. (2003). Angiogenesis and vasculogenesis for therapeutic neovascularization. *Nagoya Journal of Medical Science*, *66*(81), 1–7. <https://doi.org/10.1172/JCI6889>
- O’Laughlin, M. P., Slack, M. C., Grifka, R. G., Perry, S. B., Lock, J. E., & Mullins, C. E. (1993). Implantation and intermediate-term follow-up of stents in congenital heart disease. *Circulation*, *88*(2), 605 LP-614. Retrieved from <http://circ.ahajournals.org/content/88/2/605.abstract>
- O’Reilly, M., & Thebaud, B. (2014). Animal models of bronchopulmonary dysplasia. The term rat models. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, *307*(12), L948-58. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00160.2014>
- Oderich, G. S., Tallarita, T., Gloviczki, P., Duncan, A. A., Kalra, M., Misra, S., ... Bower, T. C. (2012). Mesenteric artery complications during angioplasty and stent placement for atherosclerotic chronic mesenteric ischemia. *Journal of Vascular Surgery*, *55*(4), 1063–1071. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2011.10.122>

- Ohashi, K., Ouchi, N., Sato, K., Higuchi, A., Ishikawa, T., Herschman, H. R., ... Walsh, K. (2009). Adiponectin Promotes Revascularization of Ischemic Muscle through a Cyclooxygenase 2-Dependent Mechanism . *Molecular and Cellular Biology*, 29(13), 3487–3499. <https://doi.org/10.1128/MCB.00126-09>
- Peterson, J. C., Allegrante, J. P., Pirraglia, P. A., Robbins, L., Lane, K. P., Boschert, K. A., & Charlson, M. E. (2010). Living with heart disease after angioplasty: A qualitative study of patients who have been successful or unsuccessful in multiple behavior change. *Heart & Lung : The Journal of Critical Care*, 39(2), 105–115. <https://doi.org/10.1016/j.hrtlng.2009.06.017>
- Reddy, K., Zhou, Z., Schadler, K., Jia, S.-F., & Kleinerman, E. S. (2008). Bone Marrow Subsets Differentiate into Endothelial Cells and Pericytes Contributing to Ewing's Tumor Vessels. *Molecular Cancer Research : MCR*, 6(6), 929–936. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-07-2189>
- Resnick, H. E., & Howard, B. V. (2002). Diabetes and Cardiovascular Disease. *Annual Review of Medicine*, 53(1), 245–267. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.53.082901.103904>
- Rivard, A., Silver, M., Chen, D., Kearney, M., Magner, M., Annex, B., ... Isner, J. M. (1999). Rescue of Diabetes-Related Impairment of Angiogenesis by Intramuscular Gene Therapy with Adeno-VEGF. *The American Journal of Pathology*, 154(2), 355–363. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65282-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65282-0)
- Ross, R. (1990). Mechanisms of atherosclerosis--a review. *Advances in Nephrology from the Necker Hospital*, 19, 79—86. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/2105588>
- Ross, R., & Janiszewski, P. M. (2008). Is weight loss the optimal target for obesity-related

cardiovascular disease risk reduction? *Canadian Journal of Cardiology*, 24, 25D–31D.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0828-282X\(08\)71046-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0828-282X(08)71046-8)

Rostovskaya, M., & Anastassiadis, K. (2012). Differential Expression of Surface Markers in Mouse Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cell Subpopulations with Distinct Lineage Commitment. *PLOS ONE*, 7(12), e51221. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051221>

Saccon, R. A., Bunton-Stasyshyn, R. K. A., Fisher, E. M. C., & Fratta, P. (2013). Is SOD1 loss of function involved in amyotrophic lateral sclerosis? *Brain : A Journal of Neurology*, 136(Pt 8), 2342–2358. <https://doi.org/10.1093/brain/awt097>

Saha, S. P., Bhalla, D. K., Whayne, T. F., & Gairola, C. G. (2007). Cigarette smoke and adverse health effects: An overview of research trends and future needs. *The International Journal of Angiology : Official Publication of the International College of Angiology, Inc*, 16(3), 77–83. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2733016/>

Sapieha, P., Joyal, J.-S., Rivera, J. C., Kermorvant-Duchemin, E., Sennlaub, F., Hardy, P., ... Chemtob, S. (2010). Retinopathy of prematurity: understanding ischemic retinal vasculopathies at an extreme of life. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(9), 3022–3032. <https://doi.org/10.1172/JCI42142>

Schächinger, V., Britten, M. B., & Zeiher, A. M. (2000). Prognostic Impact of Coronary Vasodilator Dysfunction on Adverse Long-Term Outcome of Coronary Heart Disease. *Circulation*, 101(16), 1899 LP-1906. Retrieved from <http://circ.ahajournals.org/content/101/16/1899.abstract>

Schoukroun, G. (2013). *Mon cardiologue* (éditions C).

- Shimano, H. (2009). [Obesity and atherosclerosis]. *Nihon Rinsho. Japanese Journal of Clinical Medicine*, 67(2), 333—337. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/19202908>
- Shiva, S. (2015). Nitric Oxide Metabolomics Core Facility. Retrieved from <https://www.vmi.pitt.edu/NO/index.html>
- Sowers, J. R., Epstein, M., & Frohlich, E. D. (2001). Diabetes, Hypertension, and Cardiovascular Disease. *Hypertension*, 37(4), 1053 LP-1059. Retrieved from <http://hyper.ahajournals.org/content/37/4/1053.abstract>
- Stein, E. A., Mellis, S., Yancopoulos, G. D., Stahl, N., Logan, D., Smith, W. B., ... Swergold, G. D. (2012). Effect of a Monoclonal Antibody to PCSK9 on LDL Cholesterol. *New England Journal of Medicine*, 366(12), 1108–1118. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1105803>
- 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. *Journal of Lipid Research*, 47(7), 1339–1351. <https://doi.org/10.1194/jlr.R600009-JLR200>
- Tamarat, R., Silvestre, J.-S., Le Ricousse-Roussanne, S., Barateau, V., Lecomte-Raclet, L., Clergue, M., ... Lévy, B. I. (2004). Impairment in Ischemia-Induced Neovascularization in Diabetes: Bone Marrow Mononuclear Cell Dysfunction and Therapeutic Potential of Placenta Growth Factor Treatment. *The American Journal of Pathology*, 164(2), 457–466. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63136-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63136-7)
- Thomas, G. N., Chook, P., Yip, T. W. C., Kwong, S. K., Chan, T. Y. K., Qiao, M., ... Woo, K. S. (2018). Smoking without exception adversely affects vascular structure and function in apparently healthy Chinese: Implications in global atherosclerosis prevention. *International*

Journal of Cardiology, 128(2), 172–177. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2007.11.065>

Udenigwe, C. C., & Rouvinen-Watt, K. (2015). The Role of Food Peptides in Lipid Metabolism during Dyslipidemia and Associated Health Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms16059303>

Umemura, T., Soga, J., Hidaka, T., Takemoto, H., Nakamura, S., Jitsuiki, D., ... Higashi, Y. (2008). Aging and Hypertension Are Independent Risk Factors for Reduced Number of Circulating Endothelial Progenitor Cells. *American Journal of Hypertension*, 21(11), 1203–1209. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/ajh.2008.278>

Van Belle, E., Rivard, A., Chen, D., Silver, M., Bunting, S., Ferrara, N., ... Isner, J. M. (1997). Hypercholesterolemia Attenuates Angiogenesis but Does Not Preclude Augmentation by Angiogenic Cytokines. *Circulation*, 96(8), 2667 LP-2674. Retrieved from <http://circ.ahajournals.org/content/96/8/2667.abstract>

van der Heijden-Spek, J. J., Staessen, J. A., Fagard, R. H., Hoeks, A. P., Boudier, H. A. S., & Van Bortel, L. M. (2000). Effect of Age on Brachial Artery Wall Properties Differs From the Aorta and Is Gender Dependent. *Hypertension*, 35(2), 637 LP-642. Retrieved from <http://hyper.ahajournals.org/content/35/2/637.abstract>

van der Wal, A. C., & Becker, A. E. (1999). Atherosclerotic plaque rupture – pathologic basis of plaque stability and instability. *Cardiovascular Research*, 41(2), 334–344. Retrieved from [http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6363\(98\)00276-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6363(98)00276-4)

Velten, M., Hutchinson, K. R., Gorr, M. W., Wold, L. E., Lucchesi, P. A., & Rogers, L. K. (2011). Systemic Maternal Inflammation and Neonatal Hyperoxia Induces Remodeling and Left Ventricular Dysfunction in Mice. *PLOS ONE*, 6(9), e24544. Retrieved from

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024544>

- Vingerling, J. R., Dielemans, I., Bots, M. L., Hofman, A., Grobbee, D. E., & de Jong, P. T. V. M. (1995). Age-related Macular Degeneration Is Associated with Atherosclerosis The Rotterdam Study. *American Journal of Epidemiology*, *142*(4), 404–409. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a117648>
- Weitzman, M., Cook, S., Auinger, P., Florin, T. A., Daniels, S., Nguyen, M., & Winickoff, J. P. (2005). Tobacco Smoke Exposure Is Associated With the Metabolic Syndrome in Adolescents. *Circulation*, *112*(6), 862 LP-869. Retrieved from <http://circ.ahajournals.org/content/112/6/862.abstract>
- Wilson, K., Gibson, N., Willan, A., & Cook, D. (2000). Effect of smoking cessation on mortality after myocardial infarction: Meta-analysis of cohort studies. *Archives of Internal Medicine*, *160*(7), 939–944. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1001/archinte.160.7.939>
- Witnich, C., Torrance, S. M., & Carlyle, C. E. (2000). Effects of hyperoxia on neonatal myocardial energy status and response to global ischemia. *The Annals of Thoracic Surgery*, *70*(6), 2125–2131.
- Yzydorczyk, C., Comte, B., Cambonie, G., Lavoie, J.-C., Germain, N., Ting Shun, Y., ... Nuyt, A. M. (2008). Neonatal Oxygen Exposure in Rats Leads to Cardiovascular and Renal Alterations in Adulthood. *Hypertension*, *52*(5), 889 LP-895. Retrieved from <http://hyper.ahajournals.org/content/52/5/889.abstract>
- Yzydorczyk, C., Comte, B., Huyard, F., Cloutier, A., Germain, N., Bertagnolli, M., & Nuyt, A. M. (2013). Developmental Programming of eNOS Uncoupling and Enhanced Vascular Oxidative Stress in Adult Rats After Transient Neonatal Oxygen Exposure. *Journal of*

Cardiovascular Pharmacology, 61(1). Retrieved from

https://journals.lww.com/cardiovascularpharm/Fulltext/2013/01000/Developmental_Programming_of_eNOS_Uncoupling_and.2.aspx

Zhao, X., & Guan, J.-L. (2011). Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(8), 610–615.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.11.001>