

**Université de Liège**  
Faculté des Sciences  
GIGA-R  
Unité de Biologie Moléculaire et Génie Génétique  
Pr. J.A. Martial  
Promoteur: Dr. I. Struman

**Etude de l'implication du  
microARN miR-146a dans  
la cardiomyopathie du  
péripartum**

Julie Halkein 2012



**Thèse soumise en vue de l'obtention  
du grade de Docteur en Sciences**





*Au terme de ce travail et de ces 5 années passées au laboratoire de Biologie Moléculaire et Génie Génétique, je désire tout d'abord remercier le Pr. Martial pour m'avoir ouvert ses portes, avoir cru en moi et permis de réaliser cette thèse.*

*Je remercie ensuite le Dr. Ingrid Struman pour sa confiance, ses conseils et son aide tout au long de ma thèse. Malgré ton absence à mon arrivée, tu as accepté de me laisser ma chance. Tu m'as permis de toujours aller plus loin. Tu as été là quand il le fallait et je t'en remercie vraiment.*

*Un tout grand merci aussi au Dr. Sébastien Tabruyn. Je te remercie pour l'aide précieuse que tu m'as apportée pour la réalisation de ce travail. Merci pour ton optimisme, ta disponibilité et nos nombreuses conversations scientifiques et philosophiques.*

*Je remercie chaleureusement le Dr. Denise Hilfiker-Kleiner pour notre collaboration fructueuse, pour avoir partagé avec nous ses connaissances et nous avoir permis de développer et de faire aboutir ce projet. Je n'oublie pas toute son équipe ayant également contribué à ce travail.*

*Merci également au Dr. Agnès Noël et plus particulièrement au Dr. Vincent Lambert pour m'avoir permis de réaliser les expériences de néovascularisation choroïdienne. Merci Vincent pour ta disponibilité et ton aide.*

*Un énorme merci à Mimi qui est présente depuis le tout début de ma thèse et qui m'a encore montré à quel point on pouvait compter sur elle et spécialement ces derniers mois. Ton aide m'a été précieuse mais ta présence, ta disponibilité et ton écoute l'ont été tout autant.*

*Ensuite, je voudrais remercier tous les collègues du groupe 16K qui sont au final bien plus que de simples collègues. Merci à Tina, ma voisine de bureau, ma relectrice de thèse mais surtout une personne très importante dans la vie en général au labo. Tu as toujours su me donner un avis rassurant et encourageant. Ta présence a été très bénéfique sur moi, je t'en remercie et te souhaite beaucoup de succès pour la suite. Merci aussi à toi, Steph, pour cette belle entente, nos nombreuses conversations et nos rires qui ont égayé mes journées ainsi que l'ambiance au labo. Merci à Nico avec qui j'ai également partagé beaucoup tant au niveau scientifique qu'au niveau extra-scientifique. Merci également pour ton aide et tes « trucs et astuces ». Merci aussi à Oli et JYC pour leur aide et leur sérénité toujours ponctuée d'humour. Merci à Khalid pour ses conseils et ainsi qu'aux petites nouvelles Marie et Cécile.*

*Je n'oublie pas les « anciens » qui ont beaucoup compté durant ma thèse. D'abord mon ex-collègue et surtout amie, Virginie. Ta présence au labo durant ma thèse m'a été précieuse et ton amitié encore plus. Merci à Salvino, le bout-en-train. Tu as apporté beaucoup de gaieté au labo mais aussi sur le chemin de travail. Bonne chance à toi pour la suite. Merci aussi à Karo, Céline, Ludo et Momo. De près ou de loin, vous m'avez tous fait évoluer au cours de ces dernières années.*

*Enfin, un merci plus large à toute l'équipe BMGG et GIGA et à toutes ces personnes qui ont contribué à l'aboutissement de ma thèse.*

*Sortons maintenant de l'unif pour aller remercier mes proches, mes amis. Tout d'abord, un énorme merci à mes amies alias « les gattes » qui ont toujours cru en moi. Vous m'avez apporté des rires, des moments de détente nécessaires, un soutien continu et beaucoup d'amour. Merci à tous mes autres amis également, je ne pourrai tous vous citer ici... Mais chacun à votre façon m'avez apporté quelque chose qui a compté pour moi ces dernières années. J'ai la chance d'être entourée par de nombreux amis formidables. Vous avez fait ma force. Votre présence m'a motivée et m'a permis de garder un juste équilibre depuis ces 5 dernières années.*

*Enfin, le dernier merci et non des moindres, je l'adresse aux membres de ma famille qui sont si importants pour moi. Ils me connaissent mieux que personne et ont toujours su m'aider à aller de l'avant et à ne pas me laisser dépasser par mes doutes et mon manque de confiance en moi. Merci à Marie, ma grande sœur adorée, mon pilier. Tu je suis gâtée et extrêmement fière d'avoir une grande sœur comme toi. Merci aussi à mon beau-frère Jona pour ses coups de « boost » et pour être devenu comme mon grand frère ces dernières années. Enfin, merci à mes parents pour leur soutien inconditionnel et pour avoir toujours cru en moi de cette façon. Merci à ma petite Maman. Toujours là pour m'écouter, pour me rendre service et motiver, j'ai toujours pu compter sur toi ainsi que Phil. Et toi, mon petit Papa, merci de m'avoir toujours soutenue dans mes choix, rassurée et aidée à relativiser beaucoup de choses. Si je suis ici aujourd'hui c'est aussi et surtout grâce à vous.*

*Du fond du cœur, merci à vous tous...*

## Abréviations

aa	acide aminé
Ago	protéine Argonaute
AAV	<i>associated-adenovirus</i> ou adénovirus associé
AAVP	<i>adeno-associated virus phage</i>
aFGF	<i>acidic fibroblast growth factor</i>
Ang	angiopoïétine
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
BBCE	<i>brain bovine capillary endothelial cells</i>
bFGF	<i>fibroblast growth factor</i>
bp	<i>base pair</i> ou paire de bases
CAM	<i>chick chorioallantoic membrane</i>
CNV	<i>choroidal neovascularization</i> ou néovascularisation choroïdienne
D2R	récepteur dopaminergique
Dll	<i>delta-like ligand</i>
DCM	<i>dilated cardiomyopathy</i> ou cardiomyopathie dilatée
DMLA	dégénérescence maculaire liée à l'âge
ECM	<i>extracellular matrix</i>
EF	<i>ejection fraction</i> ou fraction d'éjection
eNOS	<i>endothelial nitric oxide synthase</i>
EPC	<i>endothelial progenitor cell</i>
FS	<i>fractional shortening</i> ou fraction de raccourcissement
GH	<i>growth hormone</i> ou hormone de croissance
GH-V	variant de l'hormone de croissance
HB-EGF	<i>heparin-binding EGF-like growth factor</i>
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
IFN	<i>interférons</i>
Ig	immunoglobuline
IL	interleukine
JAK	<i>janus kinase</i>
kDa	<i>kilodalton</i>
LNA	<i>locked-nucleic acid</i>
LPS	lipopolysaccharide
LVED	<i>left ventricular ejection fraction</i> ou fraction d'éjection du ventricule gauche
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
miARN	microARN
miRISC	<i>microRNA RNA-induced silencing complex</i>
miRNP	<i>microRNA ribonucleoprotein complex</i>
MMP	<i>matrix metalloproteinase</i>
MnSOD	<i>manganese superoxide dismutase</i>

Mut	muté
MVB	<i>multivesicular bodies</i> ou corps multivésiculaires
NO	monoxyde nitrique
NRCM	<i>neonatal rat cardiomyocytes</i>
NRG1	neuréguline-1
nt	nucléotides
NYHA	<i>New-York heart association</i>
oxLDL	<i>oxidized low-density lipoprotein</i>
P-body	<i>processing body</i>
PAI-1	<i>plasminogen activator inhibitor 1</i>
PC	péricyte
PDGFB	<i>platelet-derived growth factor subunit B</i>
PGC-1 $\alpha$	<i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha</i>
PI3K	<i>phosphatidylinositol 3-kinases</i>
PL	<i>placental hormone</i> ou hormone placentaire
PP	postpartum
PPCM	<i>peripartum cardiomyopathy</i> ou cardiomyopathie du péripartum
PPIA	<i>peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)</i>
pré-miRNA	microARN précurseur
pri-miRNA	microARN primaire
PRL	prolactine
PRL 16K	fragment N-terminal de 16 kDa de la prolactine
PRLR	récepteur à la prolactine
qRT-PCR	<i>quantitative real-time PCR</i>
RCAS	<i>replication-competent avian leukosis virus LTR with splice acceptor</i>
RIP	<i>RNA-binding protein immunoprecipitation</i>
RISC	<i>miRNA-induced silencing complex</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
sFLT1	<i>soluble fms-like tyrosine kinase-1</i>
siARN	<i>Small interfering RNA</i>
SMC	<i>smooth muscle cell</i> ou cellules musculaires lisses
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor <math>\beta</math></i>
TNF $\alpha$	<i>tumor necrosis factor-<math>\alpha</math></i>
tPA	<i>tissue plasminogen activator</i>
TU	<i>transcription unit</i> ou unité de transcription
uPA	<i>urokinase plasminogen activator</i>
uPAR	<i>urokinase plasminogen activator receptor</i>
UTR	<i>untranslated region</i>
VE	<i>vascular endothelial</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	<i>vascular endothelial growth factor receptor</i>
WT	<i>wild type</i> ou sauvage

# Table des matières

<b>Introduction.....</b>	<b>- 1 -</b>
<b>1. L'angiogenèse .....</b>	<b>- 1 -</b>
1.1. Généralités .....	- 1 -
1.2. Apparition du système vasculaire .....	- 1 -
1.3. Développement du système vasculaire .....	- 2 -
1.4. Mécanismes moléculaires des différentes étapes de l'angiogenèse.....	- 3 -
1.5. Régulation de l'angiogenèse .....	- 6 -
1.6. Pathologies liées à un défaut d'angiogenèse.....	- 8 -
1.6.1. Angiogenèse excessive.....	- 8 -
1.6.2. Angiogenèse insuffisante.....	- 9 -
<b>2. Famille de la prolactine.....</b>	<b>- 10 -</b>
2.1. Prolactine .....	- 10 -
2.1.1. Généralités.....	- 10 -
2.1.2. Structure de la prolactine.....	- 10 -
2.1.3. Fonctions biologiques de la prolactine .....	- 11 -
2.1.4. Mécanisme d'action de la prolactine .....	- 12 -
2.1.5. Régulation de la production de prolactine .....	- 13 -
2.1.6. Fragment 16K de la prolactine .....	- 13 -
2.1.6.1. Clivage de la prolactine.....	- 13 -
2.1.6.2. Activités anti-angiogènes de la PRL 16K .....	- 14 -

2.1.6.3.	Effets <i>in vitro</i> de la PRL 16K.....	- 15 -
2.1.6.4.	Effets <i>in vivo</i> de la PRL 16K.....	- 17 -
2.1.6.4.1.	Effet thérapeutique en modèles tumoraux.....	- 17 -
2.1.6.4.2.	Effet thérapeutique en modèles d'angiogenèse pathologique et de thrombose .....	- 18 -
2.1.6.5.	Rôle physiologique de la PRL 16K.....	- 19 -
<b>3.</b>	<b>Maladies cardiovasculaires.....</b>	<b>- 20 -</b>
3.1.	Généralités .....	- 20 -
3.2.	Homéostasie cardiaque .....	- 20 -
3.2.1.	Généralités.....	- 20 -
3.2.2.	Facteurs impliqués dans l'homéostasie cardiaque.....	- 20 -
3.3.	Modifications cardiaques pendant la grossesse .....	- 21 -
3.3.1.	Généralités.....	- 21 -
3.3.2.	Facteurs impliqués dans la maintenance cardiaque pendant la grossesse .....	- 22 -
3.4.	Les cardiomyopathies .....	- 22 -
3.4.1.	La cardiomyopathie du péripartum .....	- 23 -
3.4.1.1.	Généralités .....	- 23 -
3.4.1.2.	Etiologie .....	- 24 -
3.4.1.3.	Pathophysiologie.....	- 25 -
3.4.1.4.	Biomarqueurs .....	- 27 -
3.4.1.5.	Traitements.....	- 28 -
<b>4.</b>	<b>Les microARN .....</b>	<b>- 31 -</b>
4.1.	Généralités .....	- 31 -
4.2.	Biogenèse de miARN .....	- 31 -
4.3.	Mode d'action des miARN .....	- 33 -
4.3.1.	Complexe effecteur .....	- 33 -
4.3.2.	Répression de la cible.....	- 33 -
4.3.3.	Les miARN dans l'angiogenèse .....	- 35 -
4.3.3.1.	Les miARN pro-angiogènes .....	- 36 -
4.3.3.2.	Les miARN anti-angiogènes .....	- 37 -
4.3.4.	Les miARN dans les maladies cardio-vasculaires.....	- 37 -
4.3.5.	Thérapies miARN.....	- 39 -
4.4.	miR-146a.....	- 41 -
4.4.1.	Généralités.....	- 41 -
4.4.2.	Rôle de miR-146a dans l'immunité.....	- 43 -
4.4.2.1.	Immunité innée.....	- 43 -
4.4.2.2.	Immunité adaptative .....	- 44 -
4.4.3.	Implication de miR-146a dans les maladies immunitaires .....	- 44 -
4.4.4.	Implication de miR-146a dans le cancer .....	- 45 -
4.4.5.	Polymorphisme.....	- 46 -
4.4.6.	Autres cas spécifiques .....	- 47 -
<b>5.</b>	<b>Les miARN extracellulaires.....</b>	<b>- 48 -</b>
5.1.	Les miARN extracellulaires peuvent servir de biomarqueurs biologiques .....	- 48 -
5.1.1.	Généralités.....	- 48 -
5.1.2.	Biomarqueurs dans les pathologies cardiaques .....	- 48 -
5.2.	Les miARN extracellulaires permettent la communication intercellulaire.....	- 49 -
5.2.1.	Généralités.....	- 49 -
5.2.2.	Microvésicules.....	- 49 -
5.2.3.	Exosomes.....	- 50 -



5.2.3.1. Description, historique .....	50 -
5.2.3.2. Composition des exosomes .....	51 -
5.2.3.3. Transfert des exosomes aux cellules receveuses .....	51 -
5.2.4. Les miARN extracellulaires: transfert d'information.....	52 -
5.2.4.1. Transfert local.....	53 -
5.2.4.2. Transfert à distance.....	53 -
<b>BUT DU TRAVAIL .....</b>	<b>54 -</b>
<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES .....</b>	<b>ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.</b>
1. Patients.....	Erreur ! Signet non défini.
2. Souris.....	Erreur ! Signet non défini.
3. Culture cellulaire et réactifs .....	Erreur ! Signet non défini.
4. Analyse quantitative de l'expression des miARN par TaqMan...	Erreur ! Signet non défini.
5. Analyse quantitative de l'expression des gènes par qRT-PCR....	Erreur ! Signet non défini.
6. Transfection de pré-miARN, anti-miARN et siARN dans les HUVEC .....	Erreur ! Signet non défini.
7. Analyse de la prolifération cellulaire.....	Erreur ! Signet non défini.
8. Analyse de l'apoptose.....	Erreur ! Signet non défini.
9. Scratch test.....	Erreur ! Signet non défini.
10. Formation d'un réseau capillaire sur matrice de Matrigel.....	Erreur ! Signet non défini.
11. Modèle des anneaux d'aorte.....	Erreur ! Signet non défini.
12. Modèle de néovascularisation choroïdienne .....	Erreur ! Signet non défini.
13. Transfection et analyses fonctionnelles en NRCM.....	Erreur ! Signet non défini.
14. Purification d'exosomes, marquage et analyse.....	Erreur ! Signet non défini.
15. Northern blotting .....	Erreur ! Signet non défini.
16. Analyse transcriptomique.....	Erreur ! Signet non défini.
17. Hybridation <i>in situ</i> et immunohistochimie.....	Erreur ! Signet non défini.
18. Construction du vecteur lentiviral S-miR-146a-IEW .....	Erreur ! Signet non défini.
19. Transduction du vecteur lentiviral miR-146a et RIP-Assay (immuno-précipitation des complexes formés avec l'AGO2 humaine) .....	Erreur ! Signet non défini.
20. Test 3'UTR luciférase .....	Erreur ! Signet non défini.
21. Test promoteur luciférase.....	Erreur ! Signet non défini.
22. Préparation d'extraits cellulaires et Western blotting.....	Erreur ! Signet non défini.
23. Test de l'activité de NF- $\kappa$ B .....	Erreur ! Signet non défini.
24. Quantifications et analyses statistiques .....	Erreur ! Signet non défini.
25. Séquences des amorces, siARN et oligonucléotides anti-miR-146a ....	Erreur ! Signet non défini.
25.1. Oligonucléotides pour qRT-PCR (IDT-DNA).....	Erreur ! Signet non défini.
25.2. Oligonucléotides pour siARN.....	Erreur ! Signet non défini.
25.3. Oligonucléotides pour bloquer miR-146a.....	Erreur ! Signet non défini.
25.4. Amplification du promoteur de miR-146a.....	Erreur ! Signet non défini.
25.4.1. Séquence sauvage du promoteur de miR-146a.....	Erreur ! Signet non défini.
25.4.2. Séquence mutée du promoteur de miR-146a.....	Erreur ! Signet non défini.

<b>RÉSULTATS.....</b>	<b>ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.</b>
<b>1. La PRL 16K médie ses effets anti-angiogènes via l'induction de l'expression de miR-146a.....</b>	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
1.1. La PRL 16K induit l'expression de miR-146a via l'activation de NF-kB ..	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
1.2. MiR-146a possède des propriétés anti-angiogènes <i>in vitro</i> .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
1.3. MiR-146a possède des propriétés anti-angiogènes <i>in vivo</i> .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
1.4. La diminution de l'expression de NRAS par miR-146a permettrait d'expliquer partiellement les effets anti-angiogènes de la PRL 16K dans les cellules endothéliales	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
1.4.1. Recherche de gènes cibles potentiels de miR-146a.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
1.4.2. MiR-146a régule l'expression de NRAS dans les cellules endothéliales	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
1.4.3. La répression de l'expression de NRAS pourrait participer au rôle anti-angiogène de la PRL 16K.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>2. La PRL 16K favorise l'augmentation du contenu en miR-146a dans les exosomes produits par les cellules endothéliales.....</b>	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>3. Les exosomes endothéliaux peuvent interagir avec les cardiomyocytes et réguler leur métabolisme via le transfert de leur contenu en miR-146a.....</b>	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
3.1. Les exosomes endothéliaux peuvent interagir avec les cardiomyocytes <i>in vitro</i> et y transférer leur contenu en miR-146a.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
3.2. MiR-146a, transféré à partir des exosomes endothéliaux, réduit le métabolisme des cardiomyocytes et réduit le niveau d'expression d'ErbB4 .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>4. MiR-146a est impliqué dans la pathophysiologie de la PPCM chez la souris</b>	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
4.1. Le tissu cardiaque de souris PPCM présente une expression de miR-146a augmentée corrélée à une expression diminuée d'ErbB4 et de NRAS	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
4.2. L'inhibition de miR-146a <i>in vivo</i> par des oligonucléotides anti-sens modifiés améliore le phénotype des souris PPCM .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
4.3. La voie NRG1/ErbB permet d'améliorer l'activité cardiaque de souris PPCM	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>5. MiR-146a est un biomarqueur spécifique de la PPCM .....</b>	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
5.1. L'expression de miR-146a est spécifiquement augmentée dans le sang de patientes atteintes de la PPCM et est normalisée après traitement à la bromocriptine .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
5.2. Le tissu cardiaque de patientes atteintes de la PPCM présente une augmentation spécifique du niveau d'expression de miR-146a corrélée à une diminution de l'expression d'ErbB4.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>6. Contribution des auteurs .....</b>	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>

**CONCLUSIONS, DISCUSSION ET PERSPECTIVES ..ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.**

.....ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.

**DONNÉES SUPPLÉMENTAIRES.....ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.**

**1. Figures supplémentaires ..... Erreur ! Signet non défini.**

**2. Tables supplémentaires..... Erreur ! Signet non défini.**

**BIBLIOGRAPHIE.....- 107 -**

# Introduction

## 1. L'angiogenèse

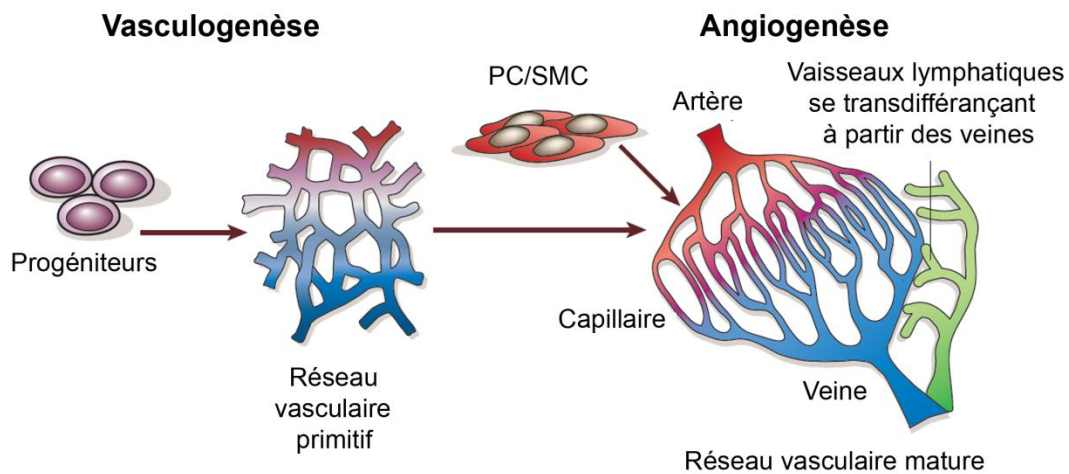
### 1.1. Généralités

L'oxygène est capable de diffuser au travers du corps entier d'espèces animales plus primitives telles que le *Caenorhabditis elegans* ou la *Drosophila melanogaster*. Cependant, les vaisseaux sanguins sont apparus au cours de l'évolution chez les espèces plus complexes, permettant alors le développement d'organes. Le sang est capable de transporter l'oxygène des poumons aux cellules et organes distants, via les vaisseaux sanguins et ce système est activé par le cœur qui remplit son rôle de pompe. Le système cardiovasculaire est le premier système qui apparaît chez l'embryon, témoignant de sa grande importance au cours du développement. De plus, il ne fournit pas seulement l'oxygène aux tissus mais également les nutriments et produits catalytiques nécessaires (Carmeliet, 2000).

### 1.2. Apparition du système vasculaire

Au cours de l'embryogenèse, les vaisseaux sanguins apparaissent par vasculogenèse et par angiogenèse. La vasculogenèse est définie comme la formation du réseau vasculaire primitif. Les cellules précurseurs dérivées du mésoderme (angioblastes) ou les cellules endothéliales précurseurs (EPC) se différencient en cellules endothéliales qui s'assemblent en un réseau vasculaire. Une fois ce plexus formé, de nouvelles cellules endothéliales peuvent former de nouveaux capillaires par bourgeonnement ou par division à partir du réseau vasculaire préexistant, c'est ce qu'on appelle l'angiogenèse. Finalement, ces nouveaux vaisseaux sanguins sont recouverts par des cellules murales, les péricytes (PC) et les *smooth muscle cells* (SMC) ou cellules musculaires lisses, permettant la stabilisation du réseau vasculaire (**Figure 1**).

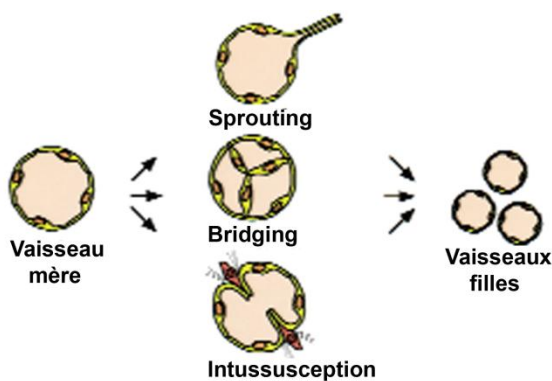
Après la naissance, l'angiogenèse contribue encore à la croissance des organes. Par contre, chez l'adulte, l'angiogenèse est quiescente, excepté dans certaines conditions bien particulières comme lors du cycle menstruel, de la réparation tissulaire ou dans le placenta lors de la grossesse (Carmeliet, 2000; Carmeliet, 2005).



**Figure 1. Développement du système vasculaire.** Durant la vasculogenèse, les cellules endothéliales progénitrices donnent naissance à un labyrinthe vasculaire primitif d'artères et de veines; durant l'angiogenèse subséquente, le réseau s'agrandit, les péricytes (PC) et cellules musculaires lisses (SMC) couvrent les chaînes endothéliales naissantes et un réseau vasculaire mature apparaît. D'après (Carmeliet, 2005).

### 1.3. Développement du système vasculaire

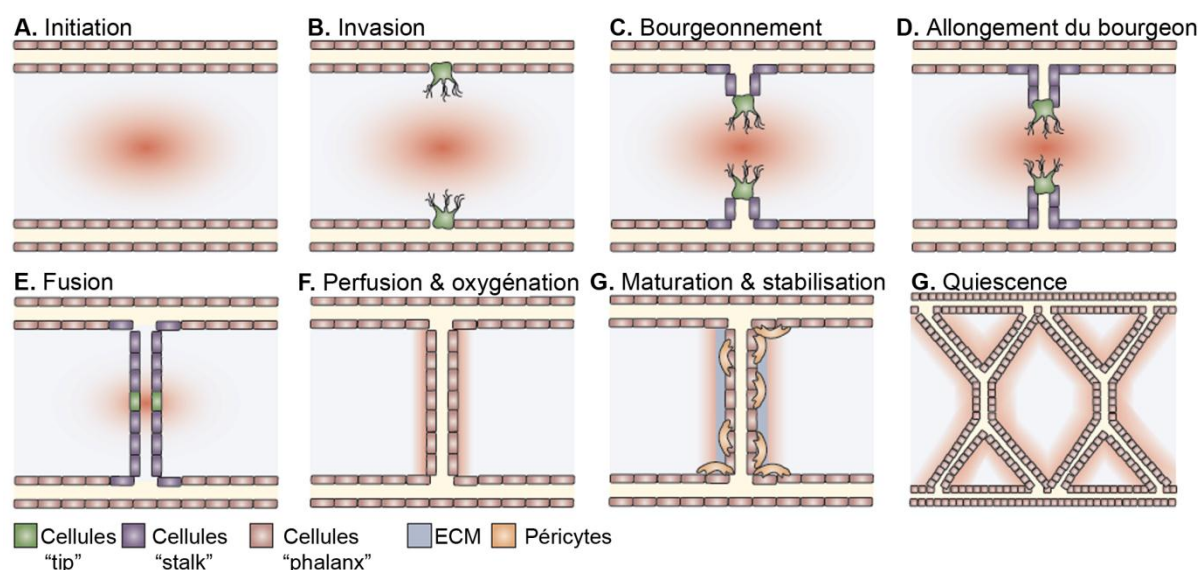
L'angiogenèse, qui est donc le processus de formation et de remodelage du réseau vasculaire primitif en un système vasculaire complexe, peut se dérouler selon trois mécanismes différents. Les vaisseaux sanguins peuvent en effet se former par bourgeonnement (*sprouting*), par élargissement et séparation des vaisseaux sanguins déjà formés (*intussusception*) ou encore par septation formée par les cellules poussant à l'intérieur des vaisseaux afin de créer des canaux vasculaires séparés (*bridging*) (**Figure 2**) (Carmeliet, 2000).



**Figure 2. Mécanismes d'angiogenèse.** Le remodelage du réseau vasculaire primitif a lieu au cours de l'angiogenèse qui implique le bourgeonnement (*sprouting*), l'élargissement et séparation des vaisseaux sanguins déjà formés (*intussusception*) ou la septation formée par les cellules poussant à l'intérieur des vaisseaux afin de créer des canaux vasculaires séparés (*bridging*). D'après (Carmeliet, 2000).

## 1.4. Mécanismes moléculaires des différentes étapes de l'angiogenèse

L'angiogenèse bourgeonnante est de loin le mécanisme le plus étudié. Le *vascular endothelial growth factor* (VEGF) est le facteur clé impliqué dans la plupart des événements morphogénétiques lors de l'angiogenèse et contrôle la migration, la prolifération et la survie des cellules endothéliales (Affolter *et al.*, 2009). Il répond à plusieurs stimuli dont l'hypoxie ressentie par un tissu lorsqu'il se développe au-delà de la limite de diffusion de l'oxygène. La formation de nouveaux vaisseaux sanguins est alors activée via l'induction du facteur de transcription inducible par l'hypoxie HIF-1. HIF-1 active, dans le noyau, l'expression de plus de 60 gènes liés à l'adaptation aux conditions hypoxiques par liaison d'éléments de réponse à l'hypoxie (HRE) au niveau de leur promoteur, dont le VEGF. La production de VEGF est également stimulée par des forces mécaniques (*shear stress*) ou par des médiateurs inflammatoires tels que l'interleukine-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) ou le *transforming growth factor*  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Milkiewicz *et al.*, 2006). L'angiogenèse bourgeonnante est caractérisée par plusieurs étapes (**Figure 3**).



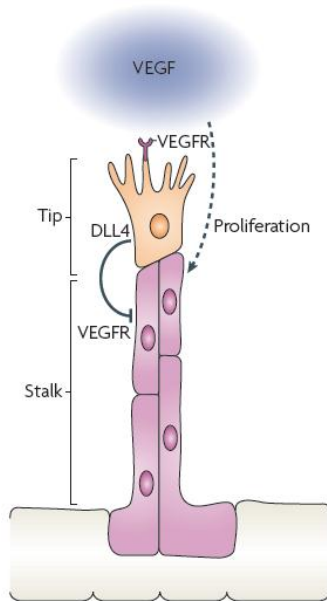
**Figure 3. Formation de nouveaux vaisseaux.** A. Réponse à l'hypoxie; les cellules non vascularisées déposent du VEGF dans un gradient. B. La cellule endothéliale exposée à la plus haute concentration en VEGF est sélectionnée pour devenir une cellule « tip ». C. La cellule « tip » dirige le bourgeonnement au premier plan et envahit le tissu environnant par extension de nombreuses filopodia. D. Le bourgeon s'allonge par prolifération des cellules endothéliales « stalk » traînant derrière la cellule « tip ». E. La nouvelle branche se connecte à une autre branche via la fusion des cellules « tip ». F. La formation du lumen vasculaire permet l'initiation du flux sanguin et, en retour, l'oxygénation du tissu qui réduit le niveau de VEGF. G. La maturation et la stabilisation du plexus naissant dépend du recrutement des PC et du dépôt de la matrice extracellulaire. H. Dans le réseau vasculaire établi, les cellules endothéliales adoptent un phénotype quiescent de type « phalanx ». D'après (Carmeliet *et al.*, 2009).

1) Suite au stimulus angiogène, la première étape est marquée par une augmentation de la **perméabilité vasculaire**, dépendante de l'oxyde nitrique (NO) en réponse au VEGF. Cette augmentation de la perméabilité est médiée notamment par la formation de fenestrations, d'organelles vésiculo-vacuolaires et par une perte des contacts entre cellules endothéliales due à une redistribution des molécules d'adhésion telles que PECAM-1 (*Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule*) et VE (*Vascular Endothelial*)-cadhérine. On observe en effet une dissolution des jonctions adhérentes, formées par des interactions extracellulaires homophiles entre les VE-cadhérines avec une stabilisation intracellulaire par le cytosquelette d'actine via des interactions avec la  $\beta$ -caténine et l' $\alpha$ -caténine. L'extravasation des protéines du plasma permet alors le dépôt d'une structure provisoire sur laquelle les cellules endothéliales activées vont pouvoir migrer. La perméabilité vasculaire est également favorisée par l'angiopoïétine 2 (Ang2), un antagoniste de l'angiopoïétine 1 (Ang1) sur le récepteur Tie-2. L'Ang2 déstabilise les vaisseaux, détruit le support cellulaire péri-endothélial et induit le détachement de la matrice permettant aux cellules endothéliales activées de migrer (Ferrero *et al.*, 1996; Eliceiri *et al.*, 1999; Conway *et al.*, 2001; Dejana *et al.*, 2008).

2) Ensuite, la **dégradation de la matrice extracellulaire** et de la membrane basale environnante est une étape nécessaire à l'invasion des cellules endothéliales. Les métalloprotéinases de la matrice (MMP), protéases dépendantes du zinc, l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA) ainsi que plusieurs autres protéinases sont des protéines impliquées dans la dégradation de la matrice et dans l'activation ou la libération de facteurs de croissance, séquestrés à l'intérieur de la matrice (Coussens *et al.*, 1999; Carmeliet, 2000; De Smet *et al.*, 2009).

3) Les cellules endothéliales **prolifèrent et migrent** vers le stimulus angiogène. Une sous-population des cellules endothéliales va alors être sélectionnée pour bourgeonner et acquérir un phénotype particulier permettant la migration. Ces cellules endothéliales sont les cellules « tip » qui sont localisées à l'extrémité du vaisseau bourgeonnant et caractérisées par des extensions filopodiales qui sont des projections cytoplasmiques contenant des filaments d'actine. Ce sont elles qui dirigent la croissance du bourgeon vers le stimulus angiogène (Adams *et al.*, 2007). Alors que les cellules « tip » migrent, guidées par un gradient en VEGF, la prolifération des autres cellules du vaisseau bourgeonnant ou cellules « stalk » est activée par la concentration en VEGF et permet l'élongation du nouveau vaisseau en formation. Ce

mécanisme repose sur une communication cellulaire via la voie Dll4/Notch. En effet, le VEGF induit l'expression de Dll4 (Delta like ligand 4) dans les cellules « tip » qui lie le récepteur Notch1 sur les cellules adjacentes ou cellules « stalk ». Ainsi, l'expression du récepteur au VEGF, le VEGFR2, est réduite, ce qui supprime le phénotype cellule « tip ». Le phénotype cellule « stalk » est alors spontanément induit (**Figure 4**) (Affolter *et al.*, 2009; De Smet *et al.*, 2009; Kume, 2009).



**Figure 4. Induction des cellules « tip » et cellules « stalk ».** Au cours de l'angiogenèse, la voie de signalisation du VEGF détermine la formation de bourgeons angiogènes et contrôle l'identité de la cellule « tip » (orange) et des cellules « stalk » (rose) via la signalisation Delta-Notch. D'après (Affolter *et al.*, 2009).

4) Pour former de nouvelles connections vasculaires, les cellules « tip » doivent supprimer leur comportement de motilité lorsqu'elles rencontrent les extrémités d'autres bourgeons ou des capillaires existants. Des jonctions entre cellules endothéliales sont alors formées à ces points de rencontre (Adams *et al.*, 2007). Ensuite, l'établissement du flux sanguin requiert la **formation du lumen** par canalisation intracellulaire (fusions des vésicules cytoplasmiques) ou intercellulaire (apposition des membranes de deux cellules différentes) (Milkiewicz *et al.*, 2006). Différentes intégrines ainsi que les MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) sont impliquées dans la formation du lumen (Bayless *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2004).

5) Le processus angiogène s'achève par la **maturation** et la **stabilisation** du réseau vasculaire. Cette étape cruciale consiste en un recouvrement vasculaire par les cellules murales afin de stabiliser les vaisseaux nouvellement formés. Ces cellules murales sont subdivisées en cellules musculaires lisses (SMC) et péricytes (PC) en fonction de leur densité,



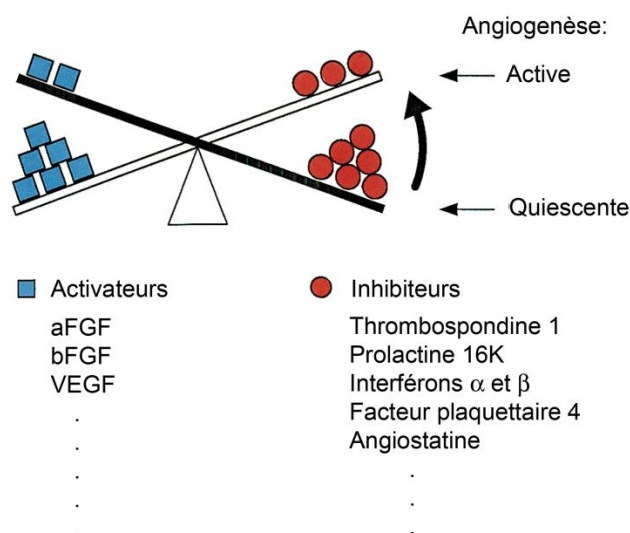
morphologie, localisation et des marqueurs qu'elles expriment. Les SMC sont associées aux artères et veines alors que les PC sont associés avec les vaisseaux sanguins de plus faible diamètre (artérioles, capillaires et vénules) (Gaengel *et al.*, 2009).

Le premier facteur impliqué dans le recrutement de ces cellules murales est le *platelet-derived growth factor subunit B* (PDGF-B). Le PDGF-B, sécrété par les cellules endothéliales, est retenu proche de ces dernières par son motif de rétention carboxy-terminal lié à certains protéoglycans de la matrice extracellulaire. Les PC qui expriment le récepteur au PDGF-B sont alors recrutés (Lindblom *et al.*, 2003). L'Ang1, exprimé par les SMC et les PC, est un facteur qui favorise la stabilisation des nouveaux capillaires en liant son récepteur à tyrosine kinase spécifique des cellules endothéliales Tie-2. Cette interaction peut être contrée par l'Ang2. Le lipide sphingosine 1-phosphate (S1P) extracellulaire semble également jouer un rôle prépondérant dans la maturation vasculaire. Il active et relocalise la molécule d'adhésion N-cadhérine, connue pour connecter les cellules endothéliales avec les PC (Paik *et al.*, 2004; Gaengel *et al.*, 2009). Notch3 est requis pour la maturation des SMC artérielles (Domenga *et al.*, 2004). Enfin, le TGF- $\beta$  via l'activation de ces deux récepteurs ALK-1 et ALK-5 régule également la maturation des vaisseaux sanguins (Goumans *et al.*, 2002).

Après ce recouvrement par les cellules murales, une membrane basale est produite par les cellules endothéliales avec l'aide des cellules environnantes qui fournissent un support structural et maintiennent la quiescence des cellules endothéliales. Une fois la formation du vaisseau terminée, le flux sanguin amène au vaisseau nouvellement formé de l'oxygène qui résulte en une diminution du niveau de VEGF. Ceci a pour effet de terminer le processus d'angiogenèse (Chung *et al.*, 2010).

## 1.5. Régulation de l'angiogenèse

L'angiogenèse est un processus complexe finement régulé par une balance entre des facteurs de stimulation ou pro-angiogènes et des facteurs d'inhibition ou anti-angiogènes (Bergers *et al.*, 2003). Un excès de facteurs anti-angiogènes permet de maintenir une angiogenèse quiescente. Lorsque la balance s'inverse, le *switch* angiogène a lieu et cet excès de facteurs pro-angiogènes active l'angiogenèse (**Figure 5**) (Hanahan *et al.*, 1996).



**Figure 5. La balance angiogène.** L'angiogenèse est contrôlée par différents facteurs activateurs et inhibiteurs dont certains sont listés ci-dessus. D'après (Hanahan *et al.*, 1996).

Parmi les facteurs de stimulation, dont certains ont été cités dans les mécanismes moléculaires liés à l'angiogenèse, on retrouve principalement les différents membres de la famille du VEGF et leurs récepteurs, les aFGF et bFGF (*acidic and basic fibroblast growth factors*), les PDGF, les angiopoïétines et leur récepteur Tie-2 ou encore le TGF- $\beta$  et les MMP (Conway *et al.*, 2001).

Les inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse sont, pour la plupart, des fragments issus de la dégradation de la matrice. C'est le cas de la thrombospondine-1 (TSP-1), une protéine de liaison à l'héparine qui inhibe la migration et la prolifération des cellules endothéliales et peut induire leur apoptose mais aussi déstabiliser les contacts entre cellules endothéliales. L'endostatine, fragment C-terminal de 20kDa du collagène de type XVIII possédant un motif Arg-Gly-Asp (RGD) capable de se lier aux intégrines- $\beta$ 1 et à l'héparine présentes à la surface des cellules endothéliales. Elle interfère ainsi avec la migration, la prolifération, les interactions cellulaires mais aussi avec l'activation des MMP et induit l'apoptose. Mais, certains inhibiteurs de l'angiogenèse ne sont pas issus de la matrice extracellulaire. L'angiostatine, par exemple, est un produit de clivage du plasminogène de 38 kDa qui cible les cellules endothéliales pour empêcher principalement leur migration et leur prolifération (Nyberg *et al.*, 2005; Ribatti, 2009). Les fragments N-terminaux de 16 kDa de la prolactine et de l'hormone de croissance possèdent des propriétés anti-angiogènes (Struman *et al.*, 1999). Le fragment de 16 kDa de la prolactine sera développé plus en détail au point 2.1.6.

Une nouvelle catégorie de régulateurs de l'angiogenèse est apparue il y a quelques années, il s'agit des microARN (miARN) aussi appelés les angiomiR. Ce sont de petits ARN

(environ 22 nucléotides) simple brin non-codants, hautement conservés, qui régulent négativement l'expression des gènes de façon post-transcriptionnelle. Plusieurs miARN sont décrits pour être impliqués dans l'angiogenèse. Parmi eux, on retrouve miR-126, let-7f ou miR-27b qui favorisent le processus d'angiogenèse alors que miR-221/222, miR-15b ou miR-16 tendent plutôt à l'inhiber (Wang *et al.*, 2009). Les miARN impliqués dans l'angiogenèse seront détaillés au point 4.

## **1.6. Pathologies liées à un défaut d'angiogenèse**

Cet équilibre entre facteurs pro- et anti-angiogènes permettant de maintenir une angiogenèse quiescente est fréquemment soumis à des dérégulations. L'angiogenèse est impliquée aujourd'hui dans plusieurs dizaines de pathologies différentes résultant d'un manque d'angiogenèse ou au contraire d'une angiogenèse excessive (Carmeliet, 2005).

### **1.6.1. Angiogenèse excessive**

Les pathologies résultant d'une activation du *switch* angiogène sont principalement d'ordre malin (cancer), oculaire ou inflammatoire (Carmeliet, 2005). L'angiogenèse est activée dans le cadre du cancer afin de d'apporter l'oxygène et les nutriments nécessaires au développement tumoral (Bergers *et al.*, 2003). Elle peut également mener à la cécité dans la plupart des maladies oculaires liées à un excès d'angiogenèse. Parmi ces pathologies, on retrouve la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) qui est la cause première de cécité dans le monde (Park *et al.*, 2012). Enfin, l'angiogenèse peut contribuer au processus inflammatoire lié à certaines maladies comme l'arthrite rhumatoïde ou des maladies auto-immunes systémiques (Szekanecz *et al.*, 2007). Au vu du rôle central tenu par le VEGF dans l'activation de l'angiogenèse, qu'elle soit tumorale ou pathologique, les thérapies contre l'angiogenèse ont, jusqu'à présent, principalement visé le VEGF. Même si dans le cas de la DMLA, la thérapie anti-VEGF à l'aide d'anticorps bloquants, empêche la perte de vision chez les patients traités et améliore leur acuité visuelle (Rosenfeld *et al.*, 2006), elle n'a pas le succès escompté, notamment dans le traitement du cancer face au problème des mécanismes de résistance développés par les tumeurs (Bergers *et al.*, 2008). De nombreuses études sont toujours en cours afin d'étudier plus en détail les mécanismes impliqués dans toutes ces pathologies afin de trouver des traitements plus ciblés.

### 1.6.2. Angiogenèse insuffisante

A l'inverse, il arrive que le *switch* angiogène soit insuffisant et cause un dysfonctionnement au niveau des cellules endothéliales ainsi qu'une malformation ou une régression vasculaire. Il en découle des désordres tels que la pré-éclampsie. La pré-éclampsie est une maladie touchant environ 5% des femmes dans la seconde moitié de leur grossesse et caractérisée par de l'hypertension artérielle et une protéinurie (présence de protéines dans l'urine). Même si l'étiologie de la maladie n'est pas encore claire à l'heure actuelle, il semble qu'une diminution placentaire du niveau de VEGF et consécutivement du NO contribue à une angiogenèse placentaire défectueuse, à de l'hypertension, à de la protéinurie ainsi qu'à une réduction du poids du fœtus, caractéristiques de la pré-éclampsie (Vatish *et al.*, 2006). De plus, une augmentation du niveau du fragment de 16 kDa de la prolactine a été mise en évidence dans le sérum, l'urine et le liquide amniotique des femmes atteintes de pré-éclampsie. De même, une élévation des niveaux circulants de deux autres facteurs anti-angiogènes chez la mère, sFlt1 (*soluble fms-like tyrosine kinase-1*) et sEng (*soluble endoglin*) est observée. Cette augmentation de sFlt1 et sEng est associée à une diminution du niveau de VEGF et de PlGF (*placental growth factor*) menant à un dysfonctionnement des cellules endothéliales lors de la pré-éclampsie (Maynard *et al.*, 2011). Plus récemment encore, l'endothéline-1 a été montrée pour être le facteur commun en aval de toutes les voies de signalisation impliquées dans la pathophysiologie de la pré-éclampsie et ouvre donc une nouvelle voie de recherche en thérapeutique (George *et al.*, 2012).

## 2. Famille de la prolactine

### 2.1. Prolactine

#### 2.1.1. Généralités

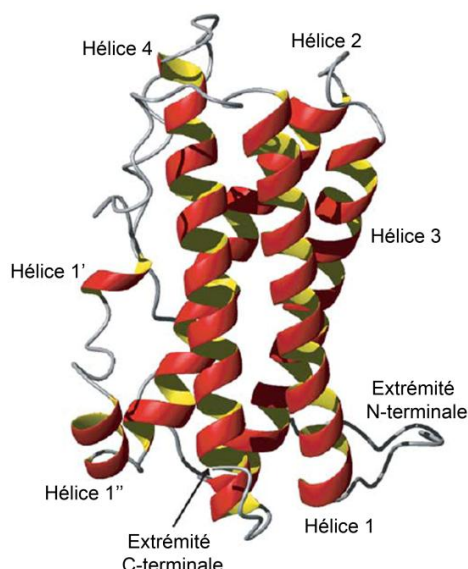
La prolactine (PRL), découverte il y a 80 ans, est une hormone apparentée à l'hormone de croissance (GH), au variant de l'hormone de croissance (GH-V) ainsi qu'au lactogène placentaire (PL). On leur reconnaît des similarités fonctionnelles mais également structurales dont les gènes résultent probablement d'un gène ancestral commun (Sinha, 1995). Plus récemment, des protéines nouvellement identifiées telles que la proliférine, les *proliferin related-proteins*, la somatolactine et d'autres protéines apparentées à la PRL ont été ajoutées à la famille PRL/GH/PL, au vu de leurs similarités de séquence (Goffin *et al.*, 2005).

La PRL est principalement synthétisée et sécrétée par les cellules de la glande pituitaire antérieure ou partie antérieure de l'hypophyse, qu'on appelle les cellules lactotropes (Freeman *et al.*, 2000). Toutefois, de nombreux sites extra-pituitaires sont également décrits pour produire de la PRL tels que le placenta, l'utérus, les glandes mammaires, le cerveau ou l'endothélium, parmi tant d'autres (Corbacho *et al.*, 2000; Freeman *et al.*, 2000).

#### 2.1.2. Structure de la prolactine

Chez l'homme et la plupart des mammifères, la PRL est d'abord produite sous forme d'une pré-hormone composée de 227 acides aminés (aa). L'hormone mature est obtenue après le clivage protéolytique de la séquence signal de 28 aa située à l'extrémité amino-terminale de cette pré-hormone. La PRL contient donc 199 aa et possède une masse moléculaire de 23 kDa. De plus, elle contient 3 ponts disulfure intramoléculaires formés entre les résidus cystéines 4-11, 58-174 et 191-199. Plusieurs variants de la PRL résultent de modifications post-transcriptionnelles telles que la glycosylation, la phosphorylation, la sulfatation, la déamination, la multimérisation et les clivages protéolytiques (Sinha, 1995; Bole-Feysot *et al.*, 1998).

Le corps de la structure tertiaire de la PRL est constitué de 4 hélices  $\alpha$ . Ces hélices sont groupées en deux paires anti-parallèles hélice1/hélice4 et hélice2/hélice3 (**Figure 6**) (Teilum *et al.*, 2005).



**Figure 6. Structure de la hPRL.** Quatre hélices  $\alpha$  sont présentes dans la structure de la PRL humaine (vue de profil ici). L'hélice 1 (Leu15 - Arg43), l'hélice 2 (Lys78 - Arg103), l'hélice 3 (Ala111 - Val137) et l'hélice 4 (Glu161 - Ile193). D'après (Teilum *et al.*, 2005).

### 2.1.3. Fonctions biologiques de la prolactine

Initialement découverte comme étant l'hormone de stimulation du développement de la glande mammaire et de la lactation, on attribue aujourd'hui à la PRL plus de 300 fonctions, classées en différents groupes tels que l'osmorégulation, la croissance et le développement, le cerveau et le comportement, l'endocrinologie et le métabolisme, la reproduction et la régulation immunitaire (Bole-Feysot *et al.*, 1998; Freeman *et al.*, 2000).

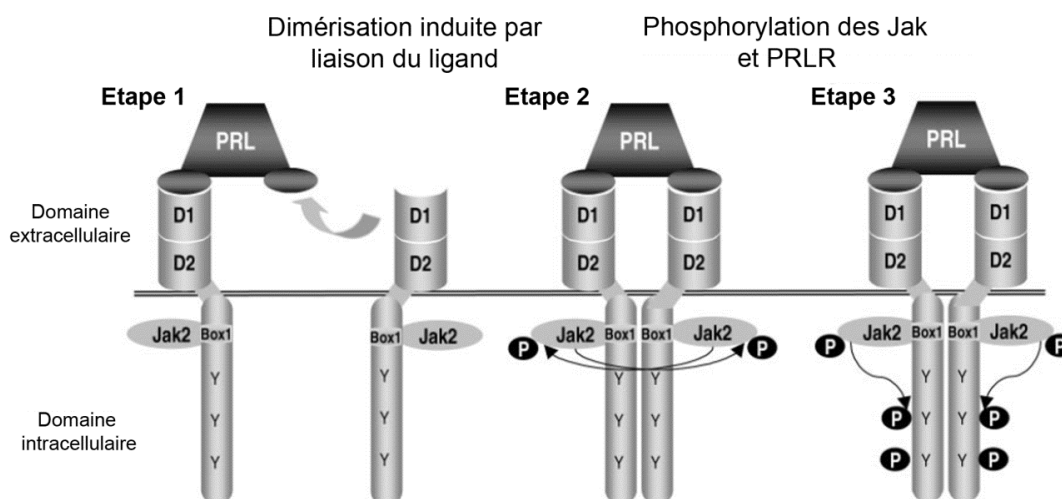
Plus que dans le processus de lactation, la PRL est aujourd'hui reconnue pour être impliquée dans le comportement de la mère envers son enfant. A peu près tous les mammifères montrent une attention maternelle à leur jeune progéniture immédiatement après l'accouchement. Depuis plusieurs années, il est connu que la bromocriptine, inhibiteur de la sécrétion de PRL, perturbe l'attention portée par des rats femelles à leur progéniture notamment au niveau du léchage du corps alors que l'administration de PRL rétablit ce comportement (Bridges *et al.*, 1990; Melo *et al.*, 2009).

La PRL intervient également dans la fertilité ainsi que dans le développement et la fonction du corps jaune, dans la fonction du pancréas en augmentant la sécrétion de l'insuline, dans l'induction de réponses comportementales d'adaptation au stress et présente des effets analgésiques. La PRL semble favoriser l'immunité en induisant la production de certains anticorps ou du récepteur à l'IL-2 par exemple (Bole-Feysot *et al.*, 1998). De plus, la prolactine peut, dans certaines conditions, réguler l'angiogenèse. Par exemple, la prolactine stimule la formation de nouveaux capillaires à partir de capillaires en quiescence dans le modèle de la membrane chorio-allantoïdienne de poulet ou *chick chorioallantoic membrane* (CAM) de poulet alors qu'elle n'a pas d'effet sur des vaisseaux en croissance (Struman *et al.*,

1999; Corbacho *et al.*, 2002). Ces effets ne sont que quelques exemples parmi tant d'autres. Toutefois, ils permettent de comprendre à quel point la PRL est impliquée dans des processus biologiques extrêmement nombreux et variés.

### 2.1.4. Mécanisme d'action de la prolactine

L'étape initiale du mécanisme d'action de la PRL est sa liaison à son récepteur (PRLR). Il s'agit d'un récepteur appartenant à la famille des récepteurs aux cytokines comprenant un domaine de liaison extracellulaire, un domaine transmembranaire hydrophobe et un domaine cytoplasmique. L'activation du récepteur suite à la liaison de la PRL est séquentielle et mène à l'homodimérisation du récepteur (**Figure 7**). Une fois le complexe actif composé d'une molécule de PRL et d'un récepteur homodimérique formé, le PRLR déclenche plusieurs cascades de signalisation intracellulaire. Comme tous les récepteurs à cytokines, il manque une activité enzymatique intrinsèque au PRLR. C'est pourquoi, il induit ses effets via une série de kinases associées JAK (*janus kinase*), qui à leur tour activent des effecteurs en aval. A côté de la voie majeure de signalisation JAK/STAT (*signal transducer and activator of transcription*), la signalisation du PRLR implique également la voie des MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) ou les protéines tyrosine kinases Src. Ce récepteur est exprimé de façon ubiquiste mais selon le type cellulaire, le niveau d'expression peut varier de 200 à 3000 récepteurs/cellule (Bole-Feysot *et al.*, 1998; Goffin *et al.*, 2002).



**Figure 7. Mécanisme d'activation du récepteur de la PRL.** D'abord, le site de liaison 1 de la PRL interagit avec une molécule PRLR (étape 1). Le domaine extracellulaire de tous les PRLR est constitué des sous-domaines D1 et D2. La formation initiale du complexe homo-récepteur induit l'interaction du site de liaison 2 de la même molécule PRL avec un deuxième PRLR (étape 2). Cette dimérisation est nécessaire pour l'activation des kinases à tyrosine Jak2, associées de façon constitutive avec le domaine intracellulaire des PRLR. Les kinases Jak2 se trans-phosphorylent l'une l'autre (étape 2) et phosphorylent les résidus tyrosine (Y) du PRLR (étape 3). D'après (Freeman *et al.*, 2000).

### 2.1.5. Régulation de la production de prolactine

La sécrétion de PRL est régulée de façon positive ou négative par un très grand nombre de facteurs. Ces facteurs peuvent agir sur l'hypothalamus qui contrôle la sécrétion de la PRL par l'hypophyse, ou agir directement sur l'hypophyse. Parmi tous ces facteurs, on retrouve l'angiotensine II, le glutamate ou l'hormone thyroïdienne qui diminuent la sécrétion de PRL et à l'inverse, les oestrogènes, l'histamine et la sérotonine notamment qui favorisent la sécrétion de la PRL (Freeman *et al.*, 2000).

Toutefois, la régulation majeure de la production de PRL et de la prolifération des cellules lactotropes qui la produisent se fait par la dopamine, produite par l'hypothalamus et agissant sur les récepteurs D2 de la dopamine (D2R). Les souris déficientes en récepteur D2R développent en effet des hyperprolactinémies (taux de prolactine supérieur à 25 ng/ml), des prolactinomes (tumeur de l'hypophyse résultant en un excès de prolactine) ou une hyperplasie lactotrope hypophysaire. Ces données confirment un rôle important tenu par la dopamine et son récepteur D2R dans la régulation physiologique de la sécrétion de la PRL mais également dans la prolifération des cellules lactotropes (Kelly *et al.*, 1997; Asa *et al.*, 1999).

De plus, la PRL elle-même, via l'activation de son récepteur PRLR, active la production de dopamine au niveau de l'hypothalamus dans une boucle de rétro-action (Freeman *et al.*, 2000). L'absence de PRLR chez la souris induit également une hyperprolactinémie et des prolactinomes. La PRL joue donc un rôle important dans la régulation de sa propre sécrétion ainsi que dans la régulation de la prolifération des cellules lactotropes. Elle peut agir de façon indirecte sur les neurones à dopamine de l'hypothalamus mais il est montré qu'elle peut également agir de façon directe sur l'hypophyse de façon indépendante à la dopamine (Schuff *et al.*, 2002).

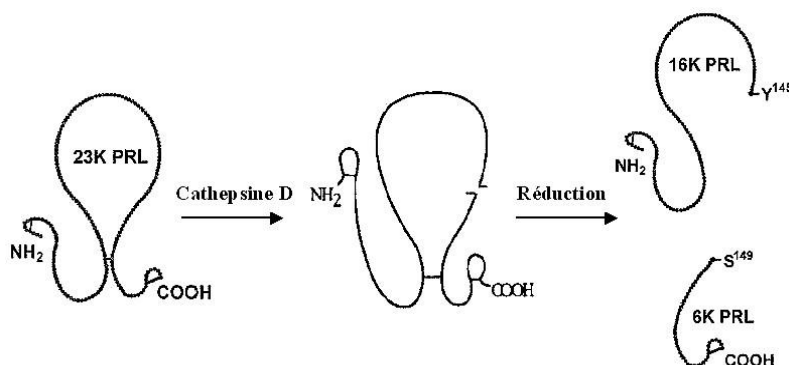
### 2.1.6. Fragment 16K de la prolactine

#### 2.1.6.1. Clivage de la prolactine

Parmi les modifications post-transcriptionnelles majeures que subit la PRL, un clivage par des enzymes protéolytiques peut donner naissance à des fragments qui sont biologiquement actifs. Ce clivage de la PRL a d'abord été mis en évidence dans des extraits hypophysaires de rat, puis plus tard, au niveau de l'hypophyse chez la souris ainsi que chez l'homme (Sinha, 1995). Le clivage de la PRL de rat par la protéase acide cathepsine D libère deux fragments N-terminal et C-terminal de 16 kDa et 8 kDa, respectivement, après réduction



du pont disulfure reliant les deux fragments (**Figure 8**) (Baldocchi *et al.*, 1993). Chez l'homme, le clivage de la PRL par la cathepsine D se fait avec une plus faible efficacité que chez le rat. Cette protéolyse de la PRL humaine génère 3 fragments apparentés au fragment de 16 kDa de la PRL correspondants aux acides aminés suivants: 1-132 (15 kDa), 1-147 (16,5 kDa) et 1-150 (17 kDa) (Piwnica *et al.*, 2004).



**Figure 8. Production de PRL 16K.** Le clivage de la PRL de rat par la cathepsine D libère deux fragments de 16 kDa N-terminal et de 6 kDa C-terminal, après réduction du pont disulfure. D'après (Sinha, 1995).

Le clivage de la PRL en son fragment de 16 kDa a été observé dans le tissu d'origine de la PRL comme la partie antérieure de l'hypophyse ou le cerveau ainsi qu'au niveau de sites ciblés comme la glande mammaire. Il est désormais montré que la cathepsine D peut être sécrétée à partir de cellules épithéliales mammaires de rates allaitantes et qu'elle peut cliver la PRL en son fragment de 16 kDa à pH physiologique (Lkhider *et al.*, 2004). Pour expliquer ce clivage à pH physiologique, Piwnica et ses collaborateurs proposent, comme nouveau mécanisme, l'intervention de pompes à protons qui assurent une sécrétion acide locale, nécessaire à l'activité protéolytique la cathepsine D (Piwnica *et al.*, 2006).

Il a également été montré que les MMP produites et sécrétées par les chondrocytes sont elles aussi capable de générer de la PRL 16K biologiquement fonctionnelle à partir de la forme entière de la PRL (Macotella *et al.*, 2006).

### 2.1.6.2. Activités anti-angiogènes de la PRL 16K

En 1991, Ferrara a mis en évidence pour la première fois un rôle anti-angiogène de la PRL 16K. Il a en effet montré que la PRL 16K de rat inhibait spécifiquement la prolifération induite par le bFGF des *brain bovine capillary endothelial cells* (BBCE) spécifiquement et de façon dose-dépendante. De plus, l'action de la PRL 16K ne semble pas faire intervenir le récepteur PRLR, puisque la forme entière de celle-ci est, elle, inactive (Ferrara *et al.*, 1991).

Afin de déterminer si la PRL 16K possède un récepteur spécifique, sa liaison à la membrane des cellules BBCE fut caractérisée. Ainsi, un site de liaison spécifique, de haute affinité et saturable fut identifié (Clapp *et al.*, 1992). Des données beaucoup plus récentes présentent l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1) comme le partenaire de liaison de la PRL 16K. Cette dernière forme en effet un complexe à la surface de la membrane cellulaire avec PAI-1, l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA) et le récepteur de l'uPA (uPAR) qui permettrait de médier son action anti-angiogène *in vitro* et *in vivo* (Bajou *et al.*, in revision).

Plus généralement, il a été montré que tous les fragments N-terminaux des membres de la famille de la PRL et de la GH humaines présentent des activités anti-angiogènes alors que les formes entières de ces protéines sont au contraire angiogènes (Struman *et al.*, 1999).

### 2.1.6.3. Effets *in vitro* de la PRL 16K

Même si les mécanismes moléculaires impliqués dans l'action de la PRL 16K ne sont pas encore complètement élucidés, il est clair que la PRL 16K inhibe des processus essentiels à l'angiogenèse via un effet direct sur les cellules endothéliales (**Figure 9**). Dans le but de mieux caractériser les propriétés anti-angiogènes de la PRL 16K, la protéine humaine recombinante fut produite (hPRL 16K).

La hPRL 16K interfère avec la **prolifération** des cellules endothéliales induite par le bFGF et le VEGF (Clapp *et al.*, 1993). Pour ce faire, la hPRL 16K inhibe la phosphorylation induite par le VEGF et le bFGF et l'activation des MAPK p42 et p44 (D'Angelo *et al.*, 1995) en empêchant ainsi l'induction de la protéine Ras dans la voie de signalisation (D'Angelo *et al.*, 1999). De plus, la hPRL 16K provoque l'arrêt du cycle cellulaire endothélial aux phases G0-G1 et G2-M (Tabruyn *et al.*, 2005).

Le deuxième mécanisme utilisé par la hPRL 16K pour inhiber l'angiogenèse est l'activation de l'**apoptose**. Elle est capable d'induire un programme de mort cellulaire dans les cellules endothéliales par activation des caspases 1 et 3 et induction de la fragmentation de l'ADN (Martini *et al.*, 2000). Cette induction de l'apoptose par la hPRL 16K a lieu via l'activation du facteur NF- $\kappa$ B, nécessaire à l'activation des caspases 8 et 9, et consécutivement de la caspase 3 (Tabruyn *et al.*, 2003).

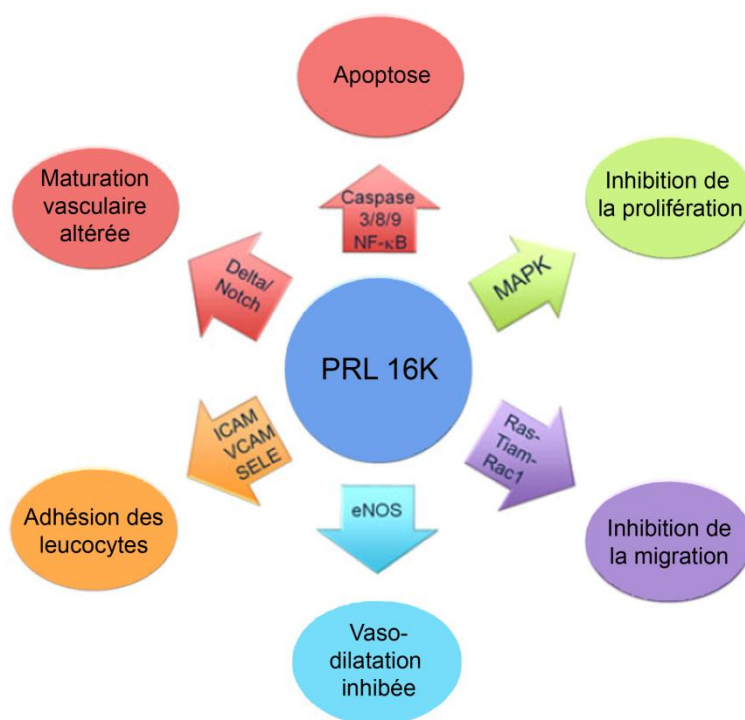
Ensuite, la hPRL 16K interfère avec le processus de **migration** cellulaire, nécessaire à l'angiogenèse. Elle inhibe la migration des cellules endothéliales en interagissant avec la voie Ras-Tiam1-Rac1-Pak1 (Lee *et al.*, 2007).

Un autre processus impliqué dans l'action anti-angiogène de la hPRL 16K est l'inhibition de la **vasodilatation**. La hPRL 16K empêche l'activation de l'oxyde nitrique synthétase endothéliale (eNOS) dépendante de la mobilisation intracellulaire en calcium et par conséquent, bloque la production NO dans les cellules endothéliales (Gonzalez *et al.*, 2004). La hPRL 16K peut également réduire la production de NO via l'inhibition de l'oxyde nitrique synthétase inductible (iNOS) dans les cellules endothéliales en interférant sur la voie p38 MAPK/STAT1/IRF-1 (*interferon regulatory factor-1*) (Lee *et al.*, 2005).

De plus, une étude transcriptomique par microarray fut réalisée afin d'identifier de nouveaux gènes cibles de la hPRL 16K. Cette analyse a confirmé le rôle central tenu par le facteur NF- $\kappa$ B et a permis de déterminer une nouvelle fonction de la hPRL 16K dans l'**inflammation** ainsi que dans l'**adhésion cellulaire**. De fait, la hPRL 16K augmente le recrutement des leucocytes au niveau des cellules endothéliales par augmentation des molécules d'adhésion sur ces dernières (Tabruyn *et al.*, 2007). De plus, le gène Sprouty1 (SPRY1), issu de cette analyse transcriptomique, a été confirmé pour être induit spécifiquement dans les cellules endothéliales par la hPRL 16K. SPRY1 possède également des propriétés anti-angiogènes et permettrait d'expliquer, du moins partiellement, les effets négatifs de la hPRL 16K sur l'angiogenèse (Sabatel *et al.*, 2010).

Enfin, la hPRL 16K perturbe également la voie de signalisation Delta/Notch en diminuant l'expression de gènes comme Dll4, Notch4 ou éphrine-B2 dans les cellules endothéliales. Ceci résulte en une diminution du recrutement des péricytes et donc en l'inhibition de la **maturation des vaisseaux** (Nguyen *et al.*, 2011).

Notre laboratoire a pu identifier une séquence de 14 aa dans les différents fragments de 16 kDa de la famille PRL/GH, présentant les caractéristiques d'un peptide oblique. Les peptides obliques de la PRL et de la GH permettent d'induire l'apoptose des cellules endothéliales, d'inhiber leur prolifération et d'inhiber la formation de capillaires. Leurs effets anti-angiogènes sont supprimés par altération de leur gradient d'hydrophobicité (Nguyen *et al.*, 2006).



**Figure 9. Résumé des actions anti-angiogènes de la PRL 16K *in vitro*.** La PRL 16K inhibe la prolifération des cellules endothéliales en empêchant l'activation des MAPK. L'inhibition de la migration des cellules endothéliales par la PRL 16K requiert la voie Ras-Tiam-Rac-Pak alors que l'induction de l'apoptose a lieu via l'activation de caspases dépendante de NF-κB. Le blocage d'eNOS par la PRL 16K inhibe la vasodilatation. La PRL 16K, via l'induction de l'expression d'ICAM-1, VCAM-1 et de la sélectine E, accroît les interactions entre leucocytes et cellules endothéliales. PRL prolactine; MAPK *mitogen-activated protein kinase*; NF-κB *nuclear factor kappa beta*; eNOS *endothelial oxide synthase*; ICAM-1 *intercellular adhesion molecule 1*; VCAM-1 *vascular cell adhesion molecule 1*. D'après (Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2012).

#### 2.1.6.4. Effets *in vivo* de la PRL 16K

Un premier résultat a montré que la PRL 16K inhibe la formation de capillaires dans le modèle de CAM (*chick chorioallantoic membrane*) (Clapp *et al.*, 1993). Depuis lors, le potentiel thérapeutique de la PRL 16K a été étudié et mis en évidence dans de nombreux autres modèles.

##### 2.1.6.4.1. Effet thérapeutique en modèles tumoraux

Le potentiel thérapeutique de la PRL 16K a été évalué dans différents modèles murins tumoraux. La PRL 16K s'est avérée être efficace dans la réduction de la croissance tumorale de cellules tumorales de colon humaines (HCT116) (Bentzien *et al.*, 2001), de cellules cancéreuses prostatiques DU145 et PC-3 (Kim *et al.*, 2003) et de cellules tumorales de mélanome murin B16F10 (Nguyen *et al.*, 2007). De plus, il a été montré que la PRL 16K

réduit l'angiogenèse tumorale *in vivo*. Toujours dans le modèle de mélanome murin, il a été montré que cette réduction de la croissance tumorale par la PRL 16K est associée à une réduction de la taille et de la perfusion des vaisseaux sanguins tumoraux mais également à une diminution du recouvrement vasculaire par les péricytes (Nguyen *et al.*, 2007; Kinet *et al.*, 2009; Nguyen *et al.*, 2011). De plus, la PRL 16K empêche l'établissement de métastases pulmonaires de cellules B16F10 injectées chez la souris dans la circulation (Nguyen *et al.*, 2007). Il semble que la fonction de la PRL 16K dans l'immunité et l'adhésion cellulaire intervienne également *in vivo*. En effet, il a été montré que la PRL 16K augmente le niveau d'infiltration des leucocytes au niveau d'un mélanome murin (Tabruyn *et al.*, 2007). Enfin, il a été montré que la PRL 16K n'est plus capable de médier ses effets anti-angiogènes sur le développement tumoral dans des souris déficientes en PAI-1, son partenaire de liaison (Bajou *et al.*, in revision).

#### **2.1.6.4.2. Effet thérapeutique en modèles d'angiogenèse pathologique et de thrombose**

Le potentiel thérapeutique de la PRL 16K a également été évalué dans des modèles d'angiogenèse non-tumorale. L'administration intra-vitréenne de la PRL 16K à l'aide d'un vecteur adénoviral, réduit la néovascularisation de la rétine dans un modèle de rétinopathie induite par l'oxygène dans la souris (Pan *et al.*, 2004) ainsi que la néovascularisation de la cornée, induite par le bFGF au niveau d'implants contenant de la PRL 16K exogène (Duenas *et al.*, 1999).

Dans la lignée du résultat montrant sa liaison à son partenaire PAI-1, notre laboratoire s'est demandé si la PRL 16K pouvait interférer avec la capacité de PAI-1 à empêcher la fibrinolyse. Dans un test de lyse de caillots sanguins *in vitro*, PAI-1 réduit l'efficacité d'action de l'activateur du plasminogène tissulaire (tPA), agent thrombolytique thérapeutique qui induit la lyse des caillots. Cependant, il a été montré que l'addition de la PRL 16K interfère avec l'action anti-protéolytique de PAI-1. La PRL 16K est également capable d'inhiber *in vivo* la formation du thrombus induite par la thromboplastine dans un modèle de thromboembolisme chez la souris. Enfin, dans un modèle murin de restauration du flux sanguin artériel où le thrombus est induit au chlorure de fer (FeCl<sub>3</sub>) au niveau de la carotide, la PRL 16K augmente le nombre de souris reperfusées et réduit le temps de reperfusion montrant à nouveau l'activité fibrinolytique de la PRL 16K (Bajou *et al.*, in revision).

### 2.1.6.5. Rôle physiologique de la PRL 16K

Même si il est encore très peu décrit, le rôle anti-angiogène de la PRL 16K a également été montré *in vivo* dans des conditions physiologiques et pathologiques.

Il est maintenant clairement montré qu'une production locale et excessive de PRL 16K est associée aux effets observés dans certaines conditions pathologiques. En 2004, Duenas a montré que de la PRL 16K est produite de façon localisée dans les yeux dans le cas de la rétinopathie du prématuré et qu'elle serait impliquée dans la régression vasculaire intra-oculaire liée à une induction de l'apoptose. Ainsi, la PRL 16K contribuerait naturellement à la résolution de la rétinopathie du prématuré (Duenas *et al.*, 2004). Par contre, un excès de PRL 16K au niveau du cœur a été montré pour tenir un rôle central dans le développement de la cardiomyopathie du péripartum. Il s'agit d'une pathologie caractérisée par des symptômes d'insuffisance cardiaque touchant certaines femmes entre le dernier mois de la grossesse et jusqu'à cinq mois après l'accouchement (Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2007). Nous reviendrons plus en détail sur la cardiomyopathie du péripartum au point 3.4.1. De même, il a été montré que le niveau d'expression de la PRL 16K est augmenté dans le sérum, dans l'urine ainsi que dans le liquide amniotique de femmes enceintes présentant de la pré-éclampsie. Le liquide amniotique des femmes atteintes de pré-éclampsie est capable de réduire la prolifération de cellules endothéliales induite au VEGF ainsi que l'activité d'eNOS. Un anticorps neutralisant l'effet de la PRL empêche ces effets. Ces données suggèrent que la PRL 16K pourrait être responsable du dysfonctionnement des cellules endothéliales dans le cas de la pré-éclampsie également (Gonzalez *et al.*, 2007).

Dès lors, il semble que la PRL 16K pourrait également avoir un rôle physiologique. Une première étude montre que la PRL est synthétisée et clivée en PRL 16K par la rétine et que ces molécules jouent un rôle dans la prévention de l'angiogenèse au niveau de la rétine. En effet, les rétines traitées avec un siARN dirigé contre la PRL présentent de la néo-vascularisation (Aranda *et al.*, 2005). Il s'agit du seul rôle physiologique de la PRL 16K démontré jusqu'à présent. Cependant, une seconde étude montre que durant le cycle oestral, le niveau de PRL diminue et celui de la cathepsine D augmente au niveau du corps lutéal, un des seuls organes qui présente de l'angiogenèse chez l'adulte. De plus, le clivage de la PRL a lieu *in vitro* à partir du milieu conditionné de cellules issues du corps luteum, suggérant fortement un rôle physiologique de la PRL 16K durant le cycle oestral (Erdmann *et al.*, 2007).

### **3. Maladies cardiovasculaires**

#### **3.1. Généralités**

Les maladies cardiaques ou cardiovasculaires sont devenues la première cause de mortalité dans le monde. Ce sont des maladies, comme leur nom l'indique, liées à un problème touchant le cœur et les vaisseaux sanguins, dont les principales causes sont l'hypertension et l'athérosclérose. De nos jours, plus de 30% des femmes dans le monde meurent d'un problème cardiaque. Parmi ce pourcentage déjà trop élevé, on retrouve un nombre croissant de femmes en-dessous de l'âge de 50 ans depuis ces dernières années. Il s'agit donc d'une thématique très sérieuse qui demande qu'on s'y intéresse urgemment afin de prévenir la maladie et de pouvoir adapter chaque traitement le plus spécifiquement possible (Huffman *et al.*, 2011).

#### **3.2. Homéostasie cardiaque**

##### **3.2.1. Généralités**

Le cœur qui tient une place centrale dans le système vasculaire, est le sujet de nombreuses études. Longtemps décrites comme des cellules incapables de se renouveler, les cardiomyocytes, cellules du muscle cardiaque, peuvent en fait se régénérer même si ce niveau de renouvellement reste faible, à raison de 1% des cellules du cœur par an dès 25 ans (Bergmann *et al.*, 2009). Il est donc crucial de préserver le tissu cardiaque intact et d'empêcher l'altération de la fonction des cardiomyocytes.

##### **3.2.2. Facteurs impliqués dans l'homéostasie cardiaque**

Différents facteurs ou voies de signalisation sont connus pour maintenir l'intégrité et la fonction cardiaques en conditions normales. Parmi eux, le facteur de transcription transducteur de signal STAT3 participe à une large variété de processus physiologiques dans le cœur tels que la survie et l'hypertrophie des cardiomyocytes ou l'angiogenèse cardiaque (Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2005). L'absence de STAT3 au niveau des cardiomyocytes chez la souris provoque une diminution de la densité vasculaire myocardiale ainsi qu'une augmentation de la fibrose interstitielle. Ces souris développent des cardiomyopathies dilatées et présentent également une susceptibilité accrue à l'ischémie myocardiale et aux lésions dues

à la reperfusion ou aux arrêts cardiaques, avec une augmentation de l'apoptose et une réduction de la fonction et de la survie cardiaque (Haghikia *et al.*, 2011). De plus, STAT3 serait impliqué dans la protection du cœur contre les réactions inflammatoires exagérées induites par des cytokines ou bactéries lors d'une infection/lésions (Jacoby *et al.*, 2003).

La voie PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinases*)/Akt est, elle aussi, importante dans le développement cardiaque post-natal et favorise la survie des cardiomyocytes et l'hypertrophie lorsque celle-ci est physiologique. Par contre, elle protège le cœur contre l'hypertrophie pathologique ainsi que contre l'ischémie et les lésions cardiaques (Patten *et al.*, 2004; DeBosch *et al.*, 2006).

L'activation du récepteur à activité tyrosine kinase ErbB4 par le facteur de croissance neuréguline-1 (NRG1) semble également bénéfique pour le cœur. En effet, l'activation du récepteur ErbB4 par la NRG1 induit la prolifération des cardiomyocytes et leur permet de se régénérer, permettant une amélioration de la fonction cardiaque et une régénération des cardiomyocytes suite à des lésions provoquées par un infarctus. En effet, il est montré que la NRG1 permet la ré-entrée des cardiomyocytes dans le cycle cellulaire via l'hétérodimère formé entre ErbB4 et ErbB2 mais également grâce à l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt (Bersell *et al.*, 2009).

Enfin, un nouveau groupe de régulateurs indispensables au développement cardiaque ainsi qu'à la maintenance de la survie et de la fonction des cardiomyocytes sont les miARN. Ce sont d'importants régulateurs de l'expression des gènes. Ils régulent de nombreuses étapes de la morphogenèse cardiovasculaire telles que la prolifération des cardiomyocytes, la différenciation myocardiale ou l'hypertrophie cardiaque (Boettger *et al.*, 2012).

### **3.3. Modifications cardiaques pendant la grossesse**

#### **3.3.1. Généralités**

Le cœur est soumis à rude épreuve lors d'une grossesse puisqu'il doit supporter une surcharge du volume sanguin afin d'assurer la circulation de la mère ainsi que celle de son enfant. Il subit alors divers remodelages dont une hypertrophie et une augmentation du réseau capillaire en maintenant l'absence de fibrose cardiaque (Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2007). C'est pourquoi, assurer sa protection et maintenir sa fonction est doublement crucial durant la grossesse.



### 3.3.2. Facteurs impliqués dans la maintenance cardiaque pendant la grossesse

L'hypertrophie cardiaque liée à la grossesse est un processus complexe impliquant de nombreuses modifications telles qu'un remodelage de la matrice de la matrice extracellulaire cardiaque ou l'implication de différents facteurs et voies de signalisation (Li *et al.*, 2012). Parmi celles-ci, les voies de signalisation STAT3 et PI3K/Akt sont toutes deux connues pour favoriser l'hypertrophie et l'angiogenèse liée à la grossesse (Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2004; Walsh, 2006). La voie de signalisation PI3K/Akt, activée par les oestrogènes dans les cardiomyocytes (Patten *et al.*, 2004), est importante afin de maintenir la cardio-protection durant la grossesse contre le stress oxydatif. Ce mécanisme décline alors subitement après l'accouchement et le rôle de cardio-protection de STAT3 prend alors le pas sur celui d'Akt après l'accouchement afin de protéger à son tour le cœur contre le stress oxydatif et de maintenir une augmentation de la densité capillaire. De plus, la PRL est connue pour activer STAT3 au niveau du cœur (Cataldo *et al.*, 2000; Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2007). Il protège le cœur contre le stress oxydatif notamment par augmentation des enzymes anti-oxydantes telles que la superoxyde dismutase à manganèse (MnSOD), une enzyme qui capture les ROS (Negoro *et al.*, 2001).

Le système NRG1/ErbB est lui aussi nécessaire au cœur pendant la grossesse et est activé dans le ventricule gauche en conditions de surcharge hémodynamique et de remodelage associés à la grossesse. Une inhibition partielle de ce système par le lapatinib (inhibiteur des récepteurs à activité tyrosine kinase ErbB1 et ErbB2 mais pas ErbB4) provoque la mort prématurée de souris gestantes mais pas des souris non gestantes, accentue la dilatation du ventricule gauche induite par la grossesse avec une légère diminution de la fraction de raccourcissement et semble induire la mort cellulaire et de la fibrose au niveau du ventricule gauche. De plus, l'inhibition de ErbB1 et ErbB2 par le lapatinib empêche l'activation en aval des MAPK p42 et p44 mais n'empêche pas celle d'Akt (Lemmens *et al.*, 2011).

### 3.4. Les cardiomyopathies

Une cardiomyopathie ou maladie du muscle cardiaque correspond à un groupe hétérogène de maladies touchant le myocarde et responsable d'un dysfonctionnement de ce muscle. Les causes peuvent être variées et d'origine soit extrinsèque, conséquence d'une pathologie extérieure au muscle (cardio-vasculaire, systémique, résultant de la prise de toxines ou d'une malnutrition), soit intrinsèque, liées à une atteinte directe du muscle cardiaque. Il existe quatre grands groupes de cardiomyopathies:

- La cardiomyopathie hypertrophique est une maladie génétique causée par diverses mutations potentielles au niveau de gènes codant les protéines sarcomériques, comme la chaîne lourde de la myosine ou l'actine et caractérisée par une hypertrophie du muscle cardiaque, pouvant engendrer un obstacle au flux sanguin (Maron, 2002).
- La cardiomyopathie ventriculaire droite arythmogène est une maladie héréditaire causée par le remplacement de certaines portions du ventricule droit ou gauche par du tissu fibro-graisseux. Les patients présentent un haut risque de tachyarythmie ou de mort subite. Son étiologie n'est pas encore connue mais il semble que des mutations au niveau des gènes codant les protéines desmosomales puissent avoir lieu (Basso *et al.*, 2009).
- La cardiomyopathie restrictive est une maladie rare (la moins fréquente des cardiomyopathies reconnues) caractérisée par une perte de souplesse de la paroi des ventricules causant un remplissage ventriculaire limité ainsi qu'une pression plus forte à l'intérieur des ventricules et une réduction de la fonction diastolique. La cause la plus connue de cette augmentation de la rigidité des ventricules est une infiltration myocardiale d'amyloïdose (dépôt extracellulaire de protéines fibrillaires) (Mookadam *et al.*, 2011).
- La cardiomyopathie dilatée, la forme la plus courante, est caractérisée par un élargissement du ventricule gauche conduisant à de l'insuffisance cardiaque et une réduction de l'activité contractile de ce ventricule sans modification de l'épaisseur des parois. Elle peut être causée par de multiples facteurs tels que des mutations, la prise d'agents toxiques ou une infection virale (Jefferies *et al.*, 2010).

### **3.4.1. La cardiomyopathie du péripartum**

#### **3.4.1.1. Généralités**

La cardiomyopathie du péripartum ou postpartum (PPCM) est une maladie caractérisée par un dysfonctionnement du ventricule gauche et une insuffisance cardiaque soudaine survenant chez la femme, typiquement entre le dernier mois de la grossesse et jusqu'à cinq mois après l'accouchement. Elle expose ces femmes à un haut risque de mortalité. Son incidence se situe entre 1:3000 et 1:4000 en Europe et aux Etats-Unis mais augmente jusqu'à 1:1000 en Afrique du Sud et jusqu'à 1:300 en Haïti (Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2008).

La PPCM est souvent mal diagnostiquée au vu de la variabilité symptomatique mais également dû au fait que de tels symptômes sont souvent négligés chez de jeunes femmes précédemment saines. Les premiers symptômes observés tels que de la fatigue, un

essoufflement, une dyspnée (difficulté respiratoire), des palpitations ou un malaise abdominal sont facilement confondus avec le réajustement postpartum (PP), conséquence physiologique d'une grossesse, d'un accouchement et d'un manque de sommeil. Ainsi, le diagnostic et donc l'administration d'un traitement adapté sont parfois réalisés plusieurs semaines voire plusieurs mois après l'apparition des premiers symptômes, ce qui peut avoir des conséquences graves sur la survie des patientes (Sliwa *et al.*, 2010).

Le cœur est, la plupart du temps, dilaté au niveau du ventricule gauche et n'assure plus son rôle de pompe aussi efficacement qu'en conditions normales. On décrit la fraction d'éjection du ventricule gauche (LVEF) inférieur à 45% chez les patientes atteintes de la PPCM. Même si la PPCM rappelle certaines caractéristiques de la cardiomyopathie dilatée (DCM), elle est bel et bien considérée aujourd'hui comme une maladie distincte de toute autre forme de cardiomyopathie (Pearson *et al.*, 2000).

### **3.4.1.2. Etiologie**

Il semble y avoir différents facteurs de risque potentiellement liés au développement de la PPCM. Principalement, on retrouve l'âge, la multiparité (nombre de grossesses), l'hypertension ou la pré-éclampsie, l'utilisation d'agents tocolytiques, le diabète ou encore la cigarette. Cependant, il n'y pas encore de cause claire responsable de la PPCM (Sliwa *et al.*, 2006).

A côté de ces facteurs de risque, certains suggèrent que des facteurs génétiques pourraient être la cause du développement de la PPCM. Il existe en effet quelques cas de patientes atteintes de la PPCM dont la mère ou la sœur a également été diagnostiquée pour la PPCM (Massad *et al.*, 1993; Fett *et al.*, 2002; Meyer *et al.*, 2010). Deux études plus récentes suggèrent également que la PPCM pourrait découler de la DCM familiale et pourrait être associée à certaines mutations (Morales *et al.*, 2010; van Spaendonck-Zwarts *et al.*, 2010). La PPCM a également été reliée au polymorphisme rs258415, situé sur le chromosome 12p11.22 (Horne *et al.*, 2011).

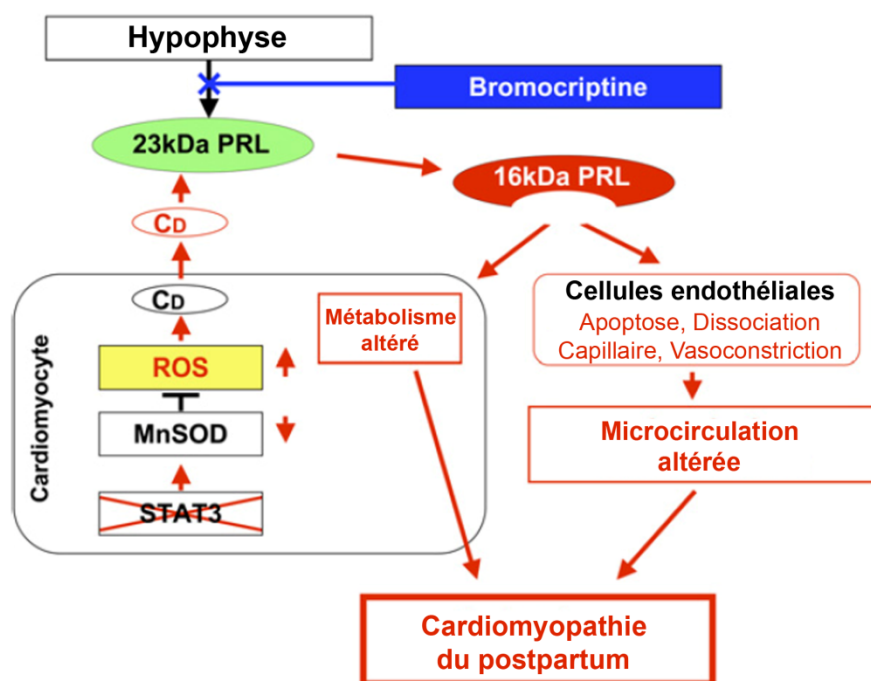
Des facteurs environnementaux de type infection virale ou déficience en micronutriments due à une malnutrition sont également associés à la PPCM (Fett *et al.*, 2002; Bultmann *et al.*, 2005; Fett, 2007; Ntusi *et al.*, 2009). D'autres encore associent son développement à un problème d'auto-immunité relié à une myocardite (Lamparter *et al.*, 2007), à la présence d'auto-anticorps dans le sérum des patientes (Ansari *et al.*, 2002; Warraich *et al.*, 2005) ou à l'augmentation du microchimérisme (cellules fœtales dans le sang de la mère pendant et après

la grossesse) (Ansari *et al.*, 2002). Enfin, une étude associe l'inhibition de la maturation des cellules dendritiques au défaut cardiaque chez des patientes PPCM (Ellis *et al.*, 2005).

Malgré la diversité de ces facteurs et mécanismes évoqués et potentiellement liés au développement de PPCM, aucune cause de la maladie n'est clairement identifiée. Il semble plutôt que l'étiologie de PPCM puisse être multifactorielle (Sliwa *et al.*, 2006).

### 3.4.1.3. Pathophysiologie

Récemment, il a été montré que des souris transgéniques possédant une délétion du gène STAT3 spécifiquement au niveau des cardiomyocytes développent la PPCM après deux grossesses successives. Ce modèle a permis d'impliquer un stress oxydatif et des niveaux augmentés de cathepsine D et de PRL dans la pathophysiologie de la PPCM. Le stress oxydatif cardiaque semble être le déclencheur de ce nouveau mécanisme, activant la cathepsine D dans les cardiomyocytes (Roberg *et al.*, 1998). La cathepsine D clive alors la PRL, dont le niveau de production est fortement augmenté en conditions péripartum. Les patientes PPCM présentent, elles aussi, des niveaux plasmatiques augmentés en lipoprotéines de faible densité oxydées (oxLDL), témoignant du stress oxydatif, en PRL, en cathepsine D ainsi qu'en PRL 16K. La PRL 16K serait le facteur clé dans la pathophysiologie de la PPCM. En effet, la PRL 16K injectée dans des souris *wild-type* à l'aide d'adénovirus provoque une diminution de la densité capillaire du myocarde ainsi qu'une diminution de la fonction cardiaque. De plus, la bromocriptine, inhibiteur de la sécrétion de PRL et agoniste du récepteur D2R, renverse le phénotype de la PPCM dans les souris déficientes en STAT3 au niveau des cardiomyocytes (**Figure 12**) (Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2007).

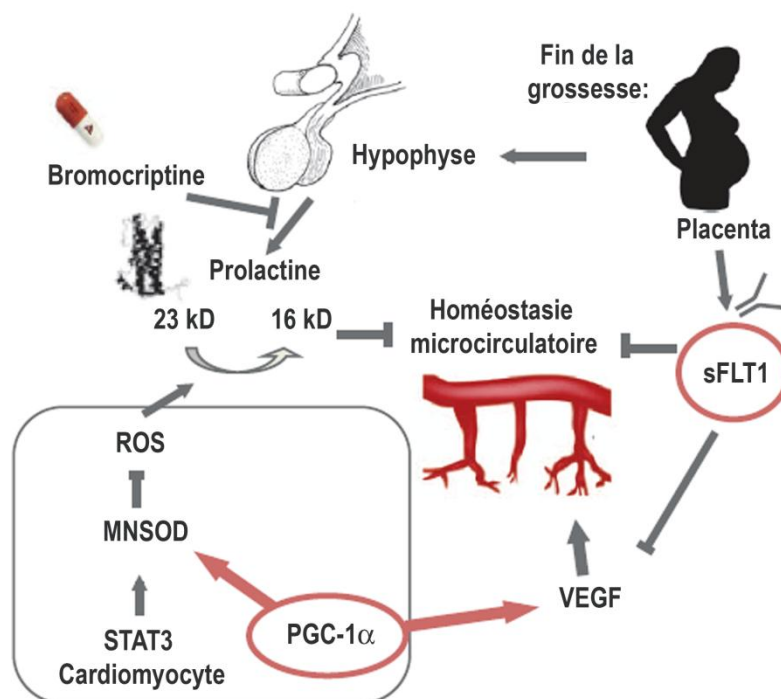


**Figure 12. Modèle schématique du développement de la PPCM.** En absence de l'activité de STAT3 dans les cardiomyocytes, l'expression postpartum de la MnSOD est atténuée, menant à un stress oxydatif augmenté et la libération de la cathepsine D (CD) qui clive la PRL de 23 kDa en sa forme délétère de 16 kDa. La PRL 16K induit l'apoptose des cellules endothéliales, la dissociation des capillaires, favorisant ainsi la PPCM. En conséquence, la bromocriptine (BR), un inhibiteur pharmacologique de la libération de PRL, empêche la PPCM chez la souris par diminution du niveau de PRL circulante. D'après (Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2007).

De plus, l'apoptose semble également tenir une place prépondérante dans la pathophysiologie de la PPCM. Elle a pu être mise en évidence dans un modèle de souris transgéniques surexprimant la sous-unité  $\alpha$  de la protéine Gq ( $G\alpha_q$ ) permettant d'induire la PPCM (Adams *et al.*, 1998). L'inhibition de l'apoptose des cardiomyocytes induite par la grossesse permet d'améliorer les dimensions du ventricule gauche dilaté et son activité contractile (Hayakawa *et al.*, 2003).

Enfin, un rapport très récent propose qu'un déséquilibre de la balance angiogène cardiaque, conduise à la PPCM. Des souris transgéniques, déficientes en PGC-1 $\alpha$  (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*), un co-activateur transcriptionnel de gènes impliqués dans le métabolisme énergétique mais également un régulateur de l'angiogenèse cardiaque, développent la PPCM. A la fin de la grossesse, le placenta libère des facteurs anti-angiogènes tel que le sFLT1. Ce niveau augmenté de sFLT1 est reflété dans le sang des femmes atteintes de la PPCM. L'absence de PGC-1 $\alpha$  ne permet plus de contrer cette augmentation de facteurs anti-angiogènes et permet à la PPCM de se développer. Une thérapie pro-angiogène permet de renverser partiellement le phénotype de ces souris PPCM. Ces données suggèrent que la PPCM est une maladie vasculaire pouvant

être causée par un excès de facteurs anti-angiogènes. L'administration de VEGF et de bromocriptine à ces souris permet de renverser complètement le phénotype PPCM suggérant l'implication de ces deux mécanismes dans le développement de la PPCM (**Figure 13**) (Patten *et al.*, 2012).



**Figure 13. Schéma du rôle proposé de PGC-1 $\alpha$  cardiaque dans la régulation de l'angiogenèse cardiaque et dans la défense contre les facteurs anti-angiogènes induits par la grossesse.** Un traitement combiné avec du VEGF et de la bromocriptine permet de restaurer la fonction cardiaque des souris PPCMMinPGC-1aHKO. D'après (Patten *et al.*, 2012).

#### 3.4.1.4. Biomarqueurs

Il est donc important d'identifier des biomarqueurs sanguins spécifiques de la PPCM afin de diagnostiquer la maladie le plus rapidement possible. Plusieurs biomarqueurs ont déjà été mis en évidence dans le plasma de femmes atteintes de la PPCM. Parmi eux, on retrouve principalement certains marqueurs des processus d'apoptose tel que Fas-Apo1, d'inflammation tels que l'IFN- $\gamma$  (interféron-gamma), l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, le TNF- $\alpha$ , la protéine C réactive ou de l'insuffisance cardiaque tels que le pro-peptide natriurétique cérébral (NT-proBNP). On retrouve également, chez les patientes atteintes de la PPCM, un niveau plasmatique augmenté de MMP-2, marqueur du remodelage tissulaire, d'oxLDL marquant le stress oxydatif, de la cathepsine D, de la PRL, de la PRL 16K ou encore du facteur sFLT-1

(Sliwa *et al.*, 2002; Forster *et al.*, 2006; Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2007; Forster *et al.*, 2008; Patten *et al.*, 2012).

Tous ces biomarqueurs témoignent de l'implication de plusieurs processus biologiques différents dans la pathophysiologie de la PPCM. Cependant, le manque de spécificité lié à l'utilisation de ces marqueurs afin de diagnostiquer la PPCM démontre qu'il existe un réel besoin de comprendre plus en détail la pathophysiologie de la maladie.

#### **3.4.1.5. Traitements**

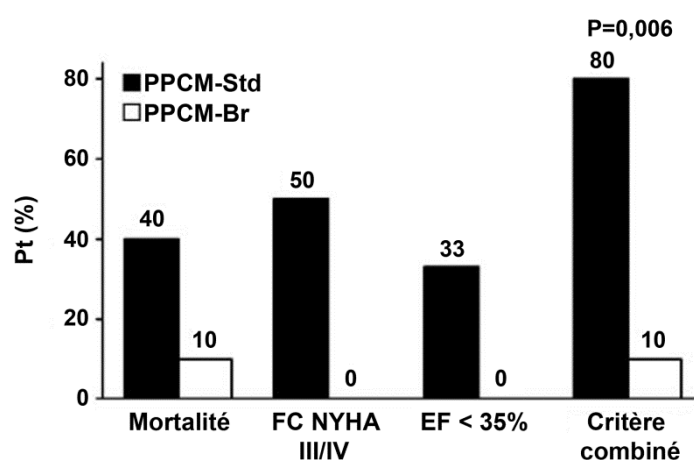
Le taux de mortalité de la PPCM est de 15% en Afrique du Sud et en Haïti avec une normalisation de la fonction du ventricule gauche de 23% et 31%, respectivement et un taux de mortalité de 9% aux Etats-Unis, avec un taux de récupération du ventricule gauche de 54% (Sliwa *et al.*, 2004; Elkayam *et al.*, 2005; Fett *et al.*, 2005). Ainsi, il est primordial de trouver un traitement adapté aux femmes atteintes de la PPCM afin de réduire le taux de mortalité, de les aider à récupérer une fonction cardiaque normale et que la grossesse ne soit plus un risque de mortalité pour ces femmes.

Le traitement de base donné aux patientes atteintes de la PPCM est un traitement classique dirigé contre l'insuffisance cardiaque, appelé thérapie standard, permettant de réduire le volume sanguin et donc le travail cardiaque, l'hypertension, les arythmies et le rythme cardiaque élevé. Ce traitement comprend des inhibiteurs ACE (enzyme de conversion de l'angiotensine), des antagonistes à l'aldostérone et des beta-bloquants ainsi que des diurétiques (Sliwa *et al.*, 2006). Certaines études montrent que, même si la thérapie standard permet à 20-30% des femmes haïtiennes et sud-africaines atteintes de la PPCM de récupérer une fonction du ventricule gauche presque normale, le taux de mortalité reste trop élevé (Sliwa *et al.*, 2000; Fett *et al.*, 2005; Sliwa *et al.*, 2006). Il est donc crucial de trouver un traitement plus ciblé contre la PPCM.

Dès lors, plusieurs études pilotes ont tenté de trouver un adjuvant à cette thérapie standard. La première a montré que l'addition d'immunoglobulines à la thérapie standard permettait d'améliorer la fraction d'éjection du ventricule gauche des femmes atteintes de la PPCM (Bozkurt *et al.*, 1999). Ensuite, il a été montré que l'inhibiteur de la sécrétion du TNF- $\alpha$ , la pentoxifylline, est également efficace pour améliorer la classe fonctionnelle (classification de l'ampleur de l'hypertension selon 4 catégories définies par la *New-York Heart Association* ou NYHA sur base des limitations physiques et des symptômes) ainsi que la fonction du ventricule gauche chez ces patientes par rapport à des patientes atteintes de la PPCM ne recevant que la thérapie standard (Sliwa *et al.*, 2002).

Depuis la récente découverte du rôle prépondérant tenu par la PRL 16K dans la pathophysiologie de la PPCM (Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2007), la recherche thérapeutique s'est intéressée à l'addition de bromocriptine, peptide de la famille des alcaloïdes dérivé de l'ergot de seigle et antagoniste du récepteur D2R, à la thérapie standard. La bromocriptine constitue un inhibiteur de la sécrétion de la PRL des glandes pituitaires chez l'homme (Harrison, 1979) et chez la souris (Nagafuchi *et al.*, 1999). Elle est utilisée depuis plus de vingt ans afin de stopper le processus de lactation chez la femme (Kochenour, 1980) et est aujourd'hui utilisée comme traitement contre l'hyperprolactinémie, la galactorée (sécrétions lactaires anormales), la maladie de Parkinson et l'hyperglycémie dans le cadre du diabète de type 2 (Holt *et al.*, 2010).

Les souris transgéniques développant la PPCM, suite à l'absence de STAT3 au niveau de leurs cardiomyocytes, ont permis de montrer que la bromocriptine supprime toute mortalité chez ces souris après 2 grossesses successives et préserve l'angiogenèse postpartum (PP), la fonction et les dimensions cardiaques. Elle empêche également l'apoptose et la fibrose apparentes dans le cœur de ces souris et finalement réduit la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) témoignant d'une réduction du stress oxydatif (Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2007).



**Figure 14. La bromocriptine améliore le pronostic des femmes atteintes de PPCM.** Comparaison de différents paramètres chez des patientes PPCM (Pt) 6 mois après traitement à la thérapie standard (PPCM-Std, n=10) ou à la bromocriptine additionnée à la thérapie standard (PPCM-Br, n=10). Ces paramètres sont la mortalité, la classe fonctionnelle (FC) NYHA III/IV, la fraction d'éjection (EF) du ventricule gauche inférieure à 35% et un critère d'évaluation combiné incluant les 3 paramètres précédents. D'après (Sliwa *et al.*, 2010).

Les résultats quant à l'utilisation de la bromocriptine, additionnée à la thérapie standard, chez la femme, sont également très encourageants en terme d'amélioration du pronostic et de la fonction cardiaque (**Figure 14**) (Meyer *et al.*, 2010; Sliwa *et al.*, 2010). Un



traitement à la bromocriptine permet d'augmenter la fraction d'éjection et d'améliorer la classe fonctionnelle NYHA ainsi que les paramètres échocardiographiques chez des femmes présentant une PPCM aigüe (signes d'insuffisance graves selon la classe fonctionnelle NYHA) (**Figure 15**) (Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2007; Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2008). La bromocriptine permet également de préserver ou d'améliorer la taille et la fonction du ventricule gauche ainsi que de réduire la mortalité chez des femmes présentant un haut risque de développer la PPCM c'est-à-dire des femmes enceintes déjà diagnostiquées pour la PPCM lors de la précédente grossesse (Sliwa *et al.*, 2004; Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2007; Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2008). Ces études pilotes restent très limitées en nombre et des études plus larges sont encore attendues.

	Case 1			Case 2		
	Baseline	2 Weeks	4 Months	Baseline	2 Weeks	4 Months
NYHA functional class	III	II	II	IV	III	I
NT-proBNP (ng/l)	10,611	3,142	n.d.	14,933	462	97
LVEDD (mm)	60	59	51	55	53	43
LVESD (mm)	53	49	34	39	39	32
Fractional shortening (%)	12	17	33	19	26	25
Ejection fraction (%)	17	29	57	30	50	49
Heart rate (beats/min)	123	79	71	119	94	48

**Figure 15. La bromocriptine est efficace dans le traitement de la PPCM aigüe.** Evolution au cours du temps de la classe fonctionnelle NYHA, du niveau de NT-proBNP et des données échocardiographiques chez deux patientes atteintes d'une PPCM aigüe. LVEDD: diamètre à la fin de la dyastole du ventricule gauche; LVESD: diamètre à la fin de la systole du ventricule gauche; NT-proBNP peptide natriurétique cérébral N-terminal (Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2007).

Finalement, lorsque les symptômes d'insuffisance cardiaque et du dysfonctionnement du ventricule gauche persistent malgré la thérapie médicamenteuse, un dispositif d'assistance mécanique du ventricule gauche est considéré. S'il permet une amélioration clinique de la patiente et récupération de la fonction cardiaque, on procède à la suppression de l'assistance mécanique. Par contre, si aucune amélioration n'est observée, c'est la transplantation cardiaque qui est finalement envisagée et concerne de 0 à 11% des patientes PPCM (Sliwa *et al.*, 2010; Gevaert *et al.*, 2011).

## 4. Les microARN

### 4.1. Généralités

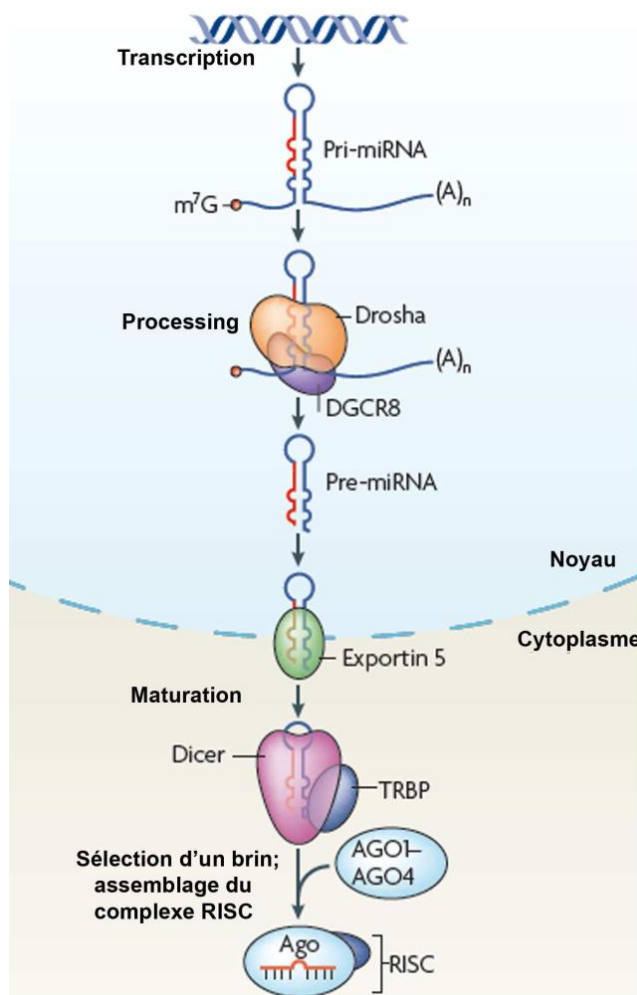
Les microARN (miARN) sont de petits ARN simple brin, non codants d'environ 22 nucléotides et décrits pour être hautement conservés au cours de l'évolution. Ils contrôlent l'expression des gènes de façon post-transcriptionnelle. En se liant à la région 3'UTR des ARN messagers (ARNm), ils empêchent leur traduction en protéine ou induisent leur dégradation (Bartel, 2004).

Le premier miARN, *lin-4*, découvert en 1993 chez *Caenorhabditis elegans*, est impliqué dans le développement larvaire (Lee *et al.*, 1993). Depuis lors, le nombre de publications concernant les miARN ne cesse d'augmenter, montrant qu'ils sont impliqués dans la plupart des processus physiologiques et pathologiques connus tels que le développement embryonnaire, la différenciation des cellules hématopoïétiques, les maladies cardio-vasculaires ou le développement tumoral. Ils constituent donc un groupe important de régulateurs de l'expression génique, avec plus de 50% des gènes chez l'homme prédits pour être régulés par les miARN (Friedman *et al.*, 2009).

### 4.2. Biogenèse de miARN

A l'heure actuelle, au-delà de 1000 miARN ont déjà été identifiés chez l'homme ([www.mirbase.org](http://www.mirbase.org), *Release 19*). Parmi les gènes codant les miARN, approximativement 40% sont situés dans des régions introniques de transcrits non-codants et 10% sont situés dans des régions exoniques ou au niveau d'unités de transcription poly-cistroniques (TU, plusieurs unités de codage regroupées une seule unité de transcription) non-codantes. Mais les miARN situés au niveau de TU codant des protéines sont généralement situés au niveau des introns (40%). La plupart des gènes codant les miARN sont transcrits par la polymérase II en un transcrit primaire appelé le pri-miARN, pouvant faire jusqu'à plusieurs centaines de nucléotides et contenant des structures en épingle à cheveux. Il subit une première phase de maturation qui consiste en un clivage à la base de cette structure en épingle à cheveux, dans le noyau, par la protéine de type RNase III, Drosha, qui agit en association avec un co-facteur le DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region 8*), formant un complexe appelé microprocesseur. Ces structures en épingles à cheveux, appelées les pré-miARN sont alors libérées. A côté de cette voie principale de biogenèse des miARN, il existe un groupe de miARN appelés les miRtrons qui ne requièrent pas l'intervention Drosha. Ils sont contenus dans des

petits introns qui miment la structure des pré-miARN et sont libérés par l'intervention de la machinerie d'épissage de l'ARN (Curtis *et al.*, 2012). Les pré-miARN sont alors exportés dans le cytoplasme par l'exportine 5, un récepteur de transport nucléaire et son co-facteur Ran-GTP hydrolysé en GDP permettant la libération des pré-miARN dans le cytoplasme. Dans le cytoplasme, la deuxième étape de maturation consiste en une excision de la boucle terminale des pré-miARN par Dicer associé à des protéines de liaison à l'ARN double brin, libérant un duplex de miARN d'environ 22 nt. Après cette seconde phase de maturation, le duplex est chargé sur une protéine Argonaute (Ago) pour générer le complexe effecteur RISC (*RNA-induced silencing complex*). Un seul brin du duplex reste dans le complexe, c'est le miARN mature, choisi sur base de la stabilité thermodynamique des deux extrémités du duplex. L'autre brin, le brin passager ou miARN\*, est dégradé (**Figure 17**) (Kim *et al.*, 2009).



**Figure 17. La biogenèse des miARN.**

Après leur transcription à partir d'un gène codant un miARN ou à partir d'un intron d'un gène codant une protéine (miRtron), les pri-miARN (miARN primaires) se replient en une structure en épingle à cheveux dont la tige contient des appariements imparfaits. Les pri-miARN sont processés en pré-miARN (miARN précurseur) par l'endonuclease Drosha complexée à son co-facteur DGCR8. Certains introns excisés par la machinerie cellulaire d'épissage, correspondant à des pré-miARN, contournent le besoin de Drosha. Après leur export dans le cytoplasme via l'exportine 5, les pré-miARN sont processés par une seconde endonuclease, Dicer, complexée à TRBP. Les miARN matures sont sélectionnés et chargés dans un complexe RISC contenant des protéines Argonaute. D'après (Inui *et al.*, 2010).

### 4.3. Mode d'action des miARN

#### 4.3.1. Complexe effecteur

RISC est un complexe ribonucléoprotéique effecteur, appelé également miRISC lorsqu'il comprend un miARN, dont la protéine la plus importante et la mieux caractérisée est la protéine AGO. L'homme possède 4 protéines AGO (AGO1-4). La structure du crystal des protéines AGO des procaryotes a permis de mieux comprendre leur architecture et leur mécanisme. Leur structure bilobée permet de lier les extrémités opposées du miARN au niveau de chacun des deux lobes, le domaine N-terminal PAZ possède une poche permettant d'encrer l'extrémité 3' du miARN et le domaine C-terminal lie l'extrémité 5' phosphate du miARN. Le troisième domaine PIWI présente des homologies avec l'ARNase H et peut hydrolyser les ARNm ciblés. Seulement certaines protéines AGO possèdent cette activité catalytique comme la protéine AGO2 chez l'homme. Le complexe formé par la protéine AGO et le miARN constitue le cœur du complexe effecteur qui permet de médier la fonction du miARN (Pratt *et al.*, 2009). Les miARN peuvent également lier d'autres protéines. Des études montrent que GW182 est également requis pour la fonction du miARN (Eulalio *et al.*, 2008).

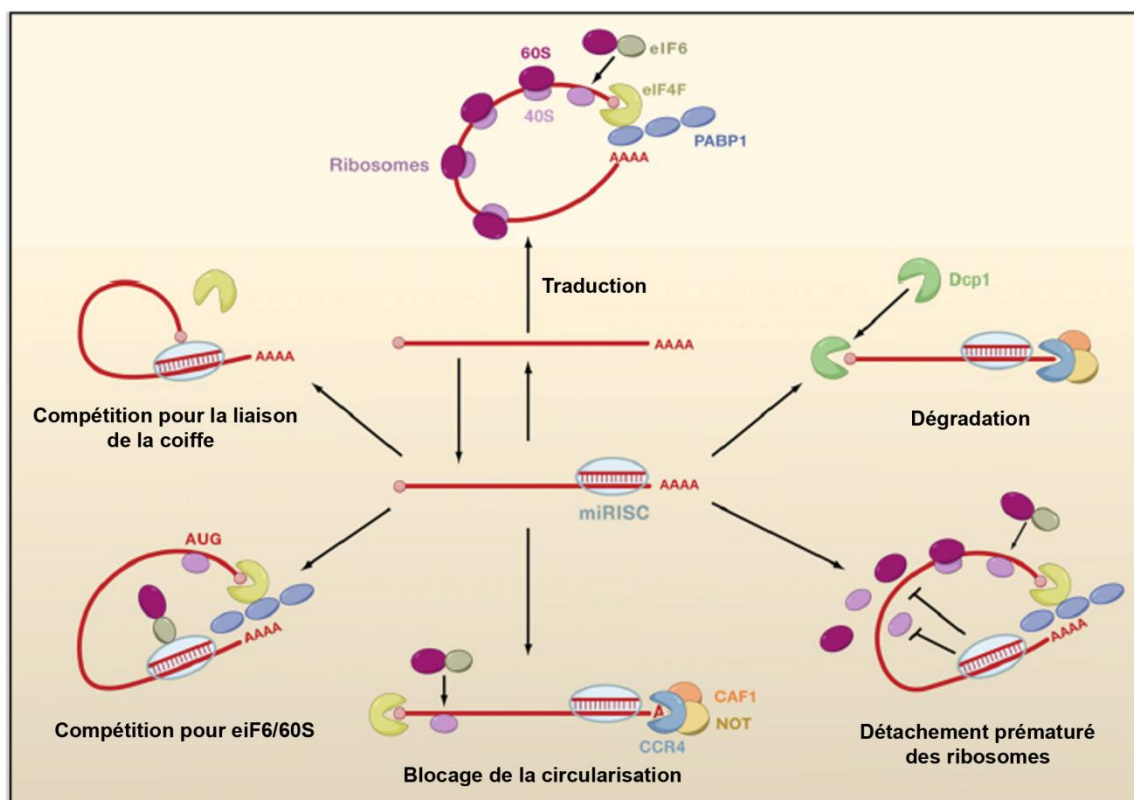
#### 4.3.2. Répression de la cible

C'est alors chargé dans ce complexe protéique que le miARN mature va pouvoir réguler négativement l'expression de gènes en ciblant des sites spécifiques au niveau de la 3'UTR de l'ARNm et ainsi empêcher leur traduction en protéines. L'appariement de type Watson-Crick entre la graine du miARN correspondant aux nt 2 à 7 à partir de l'extrémité 5' du miARN et la cible est nécessaire à la répression de cette dernière. Cependant, l'appariement de sites supplémentaires le long de la séquence du miARN semble favoriser l'affinité et la spécificité du miARN mature pour sa cible (Bartel, 2009). De plus, des données récentes montrent qu'il existe des cas où un miARN peut cibler un ARNm en s'appariant au niveau de la région codante d'un ARNm pour empêcher son expression (Tay *et al.*, 2008) mais également au niveau de la 5'UTR (Moretti *et al.*, 2010).

Chez les plantes, cette complémentarité est généralement parfaite ou presque parfaite et on observe alors une dégradation de l'ARNm ciblé par l'activité endonucléase de la protéine AGO du complexe miRISC. Par contre, chez les animaux, cette complémentarité

généralement imparfaite mène à l'inhibition de la traduction de l'ARNm, selon plusieurs mécanismes possibles.

Le premier mécanisme possible est l'inhibition de la post-initiation de la traduction. C'est-à-dire que les miARN pourraient rendre les ribosomes plus propices à une terminaison pré-maturée (Petersen *et al.*, 2006). Le deuxième mécanisme possible est la répression de l'étape d'initiation de la traduction et plusieurs mécanismes possibles sont envisagés (Chendrimada *et al.*, 2007; Kiriakidou *et al.*, 2007; Wakiyama *et al.*, 2007). Ensuite, il peut y avoir dégradation de l'ARNm même si sa complémentarité avec le miARN mature n'est pas parfaite. Dans les cellules animales, la dégradation de l'ARNm ne se fait pas via l'activité endonucléolytique de la protéine AGO mais par l'intervention d'enzymes, recrutées par le facteur GW182, induisant la dé-adénylation de l'ARNm, le retrait de la coiffe ainsi qu'une dégradation exonucléolytique (**Figure 18**) (Filipowicz *et al.*, 2008). Enfin, il semble que les ARNm réprimés puissent être dirigés vers des structures cellulaires appelées *P-bodies* (*processing bodies*). Ce sont des domaines cytoplasmiques enrichis en protéines impliquées dans la décomposition et la répression de la traduction des ARNm. Il semble que les ARNm peuvent s'y accumuler expliquant une répression de leur traduction. Cependant, les *P-bodies* ne semblent pas nécessaires à la répression traductionnelle et leur formation serait une conséquence plutôt qu'une cause de cette répression traductionnelle (Eulalio *et al.*, 2007).



**Figure 19. Les mécanismes possibles pour la répression de la traduction par les miARN.** Les ARNm non-réprimés recrutent des facteurs d'initiation et des sous-unités ribosomales et forment des structures circularisées qui augmentent la traduction (en haut). Quand les miRISC se lient aux ARNm, ils peuvent réprimer l'initiation à l'étape de reconnaissance de la coiffe (en haut, à gauche) ou à l'étape du recrutement de la sous-unité ribosomale 60S (en bas, à gauche). De façon alternative, ils peuvent induire la déadénylation de l'ARNm et ainsi, inhiber la circularisation du miARN (en bas). Ils peuvent également réprimer une étape de post-initiation de la traduction en induisant les ribosomes à se détacher prématurément (en bas, à droite). Finalement, ils peuvent favoriser la dégradation de l'ARNm par induction de la déadénylation suivie du retrait de la coiffe (en haut, à droite) (Carthew *et al.*, 2009).

#### 4.3.3. Les miARN dans l'angiogénèse

Parmi tous les processus régulés par les miARN, on retrouve l'angiogénèse. L'implication générale des miARN dans l'angiogénèse ainsi que dans la fonction des cellules endothéliales a été montrée en perturbant la fonction des enzymes de maturation des miARN, Dicer et Drosha au sein des cellules endothéliales. Ces expériences montrent que l'extinction génétique de Drosha ou de Dicer perturbe l'angiogénèse *in vitro* alors que seule la suppression de Dicer semble affecter l'angiogénèse *in vivo* dans un modèle de matrigel plug assay (Kuehbacher *et al.*, 2007; Suarez *et al.*, 2007). De plus, Dicer est requis pour l'angiogénèse embryonnaire au cours du développement de la souris (Yang *et al.*, 2005). Plus précisément, certains miARN sont plutôt pro-angiogènes, tandis que d'autres sont anti-angiogènes.

#### 4.3.3.1. Les miARN pro-angiogènes

Le miARN le plus largement décrit pour contrôler l'angiogenèse est **miR-126** qui est, de plus, spécifiquement exprimé au sein des cellules endothéliales. Par des expériences de perte de fonction chez la souris et chez le poisson zèbre, il a été montré que miR-126 tient un rôle central dans l'intégrité vasculaire et l'angiogenèse. Des souris possédant une délétion génétique de miR-126 présentent des vaisseaux perméables, des hémorragies ainsi qu'une mortalité embryonnaire partielle. La suppression de miR-126 dans le poisson zèbre résulte également en une perte de l'intégrité vasculaire ainsi qu'en des hémorragies pendant le développement embryonnaire. *In vitro*, miR-126 semble réguler le phénotype endothélial en jouant sur la migration, la survie cellulaire ou la stabilité du réseau de capillaires. D'un point de vue moléculaire, miR-126 est capable d'induire les voies de signalisation des MAPK et PI3K/Akt en réponse au VEGF et au bFGF en ciblant deux régulateurs négatifs de ces voies, PIK3R2 (*phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 2*) et SPRED-1 (*sprouty-related, EVH1 domain-containing protein 1*). A côté de ces deux gènes, la molécule d'adhésion VCAM-1 (*Vascular cell adhesion protein 1*) est également un gène cible de miR-126 (Fish *et al.*, 2008; Harris *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008).

L'inhibition de let-7f et miR-27b réduit la formation de bourgeons dans les tests de *sprouting* (Kuehbach *et al.*, 2007). Lorsqu'il est surexprimé en conditions normoxiques, miR-210 induit la migration des cellules endothéliales et la formation de tubes (Fasanaro *et al.*, 2008). L'expression de miR-130a dans les cellules endothéliales permet de réguler négativement leur phénotype anti-angiogène via la répression de l'expression de GAX et HOXA5 (Chen *et al.*, 2008). MiR-296 favorise des voies de signalisation pro-angiogènes en ciblant le HGS (*Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate*), impliqué dans la régulation du niveau de PDGFRb et VEGFR2 en induisant leur dégradation (Wurdinger *et al.*, 2008). MiR-146a est régulé positivement par un facteur pro-angiogène et pourrait réguler des gènes impliqués dans le cycle cellulaire (Hsieh *et al.*, 2010). Encore beaucoup d'autres miARN sont considérés comme des miARN pro-angiogènes. Parmi eux, on retrouve miR-320 (Wang *et al.*, 2009), miR-663 (Afonyushkin *et al.*, 2012), miR-27a/b Urbich, 2012 #426}, le cluster miR-23~27~24 (Zhou *et al.*, 2011), miR-132 (Anand *et al.*, 2010) et miR-214 (Chan *et al.*, 2009).

#### 4.3.3.2. Les miARN anti-angiogènes

Les premiers miARN à avoir été décrits comme étant anti-angiogènes sont les miARN du cluster **miR-221/222**. Ils sont également fortement exprimés au sein de cellules endothéliales HUVEC. Ils sont montrés pour inhiber l'angiogenèse *in vitro* en bloquant la formation de tubes et la migration des cellules endothéliales via la régulation du gène c-Kit, récepteur du SCF (*stem cell factor*) (Poliseno *et al.*, 2006). Le cluster miR-221/222 a également été montré pour réguler eNOS dans des cellules endothéliales déficientes en Dicer (Suarez *et al.*, 2007).

Au sein de notre laboratoire, le rôle anti-angiogène de **miR-21** a été mis en évidence pour la première fois. Il régule négativement l'angiogenèse *in vitro* en affectant la prolifération, la migration et la tubulogenèse des cellules endothéliales mais perturbe également l'angiogenèse *in vivo* dans un modèle de néovascularisation choroïdienne. Les effets observés sur la migration et la tubulogenèse pourraient s'expliquer par la régulation négative de miR-21 sur l'expression du gène RhoB (*Ras homolog gene family, member B*) (Sabatell *et al.*, 2011).

Le cluster **miR-17-92** code les 7 miARN suivants: miR-17-5p (miR-17, miR-17-3p, miR-18a, miR-19a/b, miR-20a et miR-92a). L'expression forcée de miR-92a en cellules endothéliales bloque l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo*, probablement dû à la régulation de la sous-unité  $\alpha 5$  de l'intégrine (ITGA5) et d'eNOS (Bonauer *et al.*, 2009). De même, miR-17, -18a, -19 et -20a possèdent des propriétés anti-angiogènes *in vitro* et miR-17 et -20a présentent une fonction anti-angiogène *in vivo* dans un modèle de matrigel plugs. MiR-17 compte plusieurs gènes cibles pro-angiogènes dont Jak1 (Doebele *et al.*, 2010). Récemment, miR-19b-1 a également été montré pour bloquer le cycle cellulaire des cellules endothéliales (Yin *et al.*, 2012).

De plus, la diminution de miR-214 dans les cellules endothéliales induit l'expression de eNOS, la migration et la tubulogenèse (Chan *et al.*, 2009). MiR-503 contribuerait à l'altération de la fonction des cellules endothéliales et donc de l'angiogenèse en conditions de diabète ou d'ischémie d'un membre (Caporali *et al.*, 2011). Enfin, on compte parmi les miARN anti-angiogènes miR-100 (Grundmann *et al.*, 2011), miR-125b (Muramatsu *et al.*, 2012), miR-20a (Pin *et al.*, 2012), miR-15a (Yin *et al.*, 2012), miR-24 (Fiedler *et al.*, 2011), miR-200a (Li *et al.*, 2011) et miR-200b (Chan *et al.*, 2011).

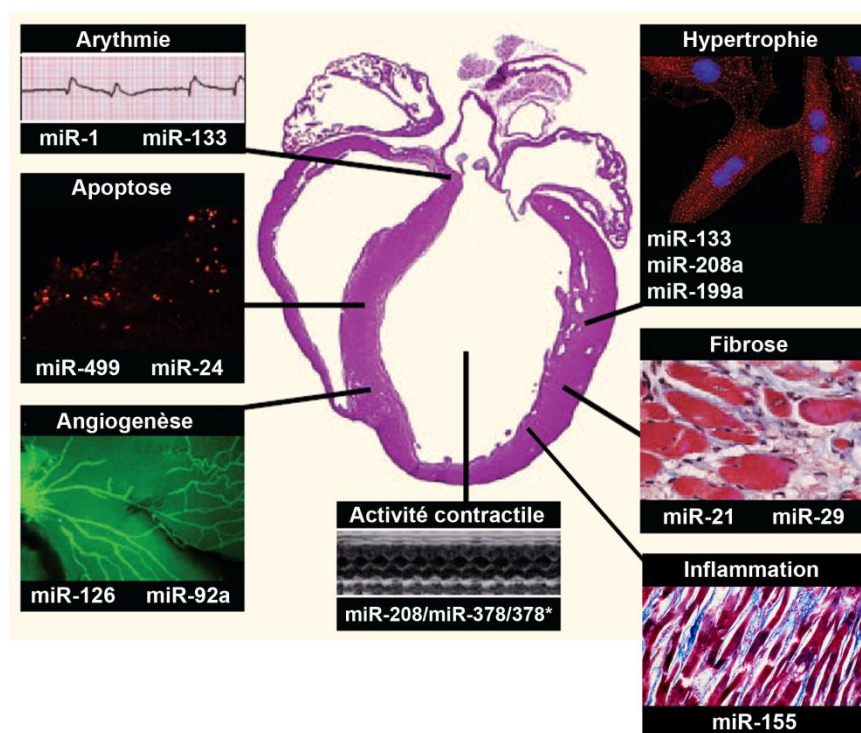
#### 4.3.4. Les miARN dans les maladies cardio-vasculaires



Les miARN sont des régulateurs importants et nécessaires au développement cardiaque. L'arrêt de la biogenèse des miARN dans les cardiomyocytes par délétion spécifique du gène Dicer chez la souris provoque une mortalité embryonnaire, de l'insuffisance cardiaque et une mortalité post-natale ainsi qu'une cardiomyopathie dilatée chez les souris adultes (Chen *et al.*, 2008; da Costa Martins *et al.*, 2008). Ces résultats montrent que les miARN sont requis pour l'homéostasie cardiaque même après les étapes de développement. Par la suite, de nombreuses études ont montré que des miARN particuliers avaient des fonctions importantes dans divers processus cardiaques d'ordre physiologique mais aussi pathologique (**Figure 21**). Parmi les miARN fortement exprimés dans les cardiomyocytes, on retrouve miR-208a et miR-199b impliqués dans l'hypertrophie cardiaque. Ils favorisent le *switch* de la myosine induit par le stress et l'activation de la voie NFAT (*nuclear factor of activated T cells*), respectivement. Leur inhibition chez la souris dans un modèle d'insuffisance cardiaque permet d'inhiber l'hypertrophie et la fibrose cardiaque et favorise la résistance au stress (van Rooij *et al.*, 2007; da Costa Martins *et al.*, 2010). On retrouve également les deux miARN les plus abondants dans le muscle miR-1 et miR-133 qui sont impliqués dans les processus d'arythmie cardiaque (Belevych *et al.*, 2011) et d'hypertrophie cardiaque (Care *et al.*, 2007). MiR-499 inhibe l'apoptose des cardiomyocytes, la fission des mitochondries et son niveau est souvent diminué dans des conditions pathologiques telle que l'ischémie (Wang *et al.*, 2011). Enfin, miR-378/378\* contrôlent la fonction musculaire, interviennent dans l'obésité en régulant le métabolisme mitochondrial et l'homéostasie énergétique (Carrer *et al.*, 2012).

Les miARN exprimés par les cellules de type « non-myocytes » peuvent également affecter la pathophysiologie du cœur. En effet, l'expression de miR-21 est augmentée par les fibroblastes d'un cœur défaillant permettant une fibrose interstitielle et une hypertrophie cardiaque. L'inhibition de miR-21 *in vivo* dans un modèle murin de maladie induite par une surcharge en pression atténue ce phénotype (Thum *et al.*, 2008). MiR-29, produit également par les fibroblastes, est diminué après un arrêt cardiaque afin de permettre une fibrose cardiaque. Dès lors, les stratégies pour maintenir son expression seraient thérapeutiquement intéressantes afin de diminuer la fibrose cardiaque (van Rooij *et al.*, 2008). Il existe également des miARN enrichis dans les cellules endothéliales cardiaques comme miR-24, dont l'expression est fortement augmentée après une ischémie cardiaque. Il favorise l'apoptose des cellules endothéliales et explique que la densité capillaire puisse être insuffisante après un arrêt cardiaque. Dès lors, l'inhibition de miR-24 chez la souris améliore le remodelage cardiaque après un infarctus du myocarde. MiR-92a est également décrit pour être fortement

exprimé dans les cellules endothéliales. Comme décrit dans le paragraphe précédent, il est un miARN anti-angiogène et son inhibition dans des modèles murins d'ischémie et d'arrêt cardiaque favorise la croissance des vaisseaux sanguins et la récupération de la fonction cardiaque après l'endommagement du tissu (Bonauer *et al.*, 2009). MiR-126 semble, quant à lui, nécessaire pour induire la néovascularisation consécutivement à un infarctus du myocarde afin de rétablir le flux sanguin au niveau du tissu endommagé (Wang *et al.*, 2008). Enfin, peu de données concernent l'implication des cellules inflammatoires dans la pathophysiologie des maladies cardiaques. Néanmoins, il a été récemment montré que l'expression du miARN inflammatoire miR-155 est augmentée lors d'une myocardite virale (atteinte inflammatoire du myocarde) et on le retrouve surtout dans les macrophages infiltrés et les lymphocytes T. Son inhibition chez la souris permet de réduire le niveau d'infiltration cardiaque par les monocytes et macrophages, diminue l'activation des lymphocytes T et réduit les dégâts du myocarde lors d'une myocardite virale aïgue (Corsten *et al.*, 2012). Bien que cette liste ne soit pas exhaustive, elle montre que les miARN sont impliqués à tous niveaux dans la pathophysiologie du cœur.

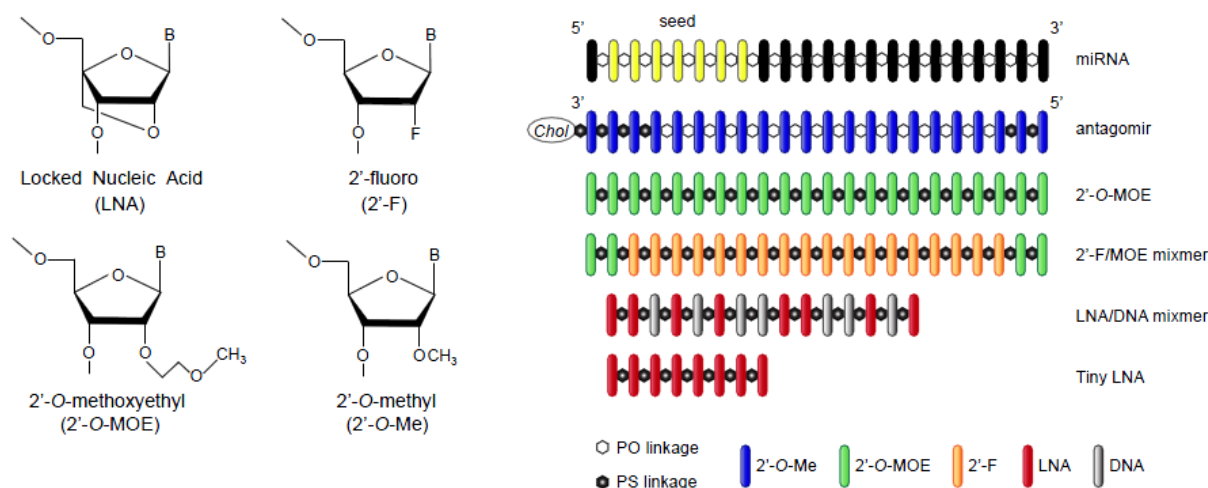


**Figure 21. Les miARN sont impliqués dans divers processus liés à la pathophysiologie du cœur.** On retrouve miR-1 et miR-133 impliqués dans le processus d'arythmie. MiR-499 et miR-24 régulent l'apoptose induite par l'hypoxie. MiR-126 et miR-92a interviennent dans la régulation de la vascularisation consécutive à un infarctus du myocarde et une ischémie, respectivement. MiR-208 est impliqué dans l'activité contractile du cœur et les miR-378/378\* dans la fonction cardiaque liée au métabolisme. MiR-133, miR-208a et miR-199b interviennent dans le processus d'hypertrophie

cardiaque. MiR-21 et miR-29 favorisent et inhibe, respectivement, la fibrose cardiaque. Enfin, miR-155 est impliqué dans l'inflammation du tissu cardiaque consécutive à une myocardite. D'après (van Rooij *et al.*, 2008) et (Corsten *et al.*, 2012).

#### 4.3.5. Thérapies miARN

L'implication des miARN dans de nombreuses maladies pousse la recherche thérapeutique à mettre au point des outils permettant de les inhiber ou de les surexprimer afin de renverser le phénotype de la maladie étudiée. Une approche couramment employée dans les expériences de perte de fonction est l'utilisation d'oligonucléotides anti-sens modifiés chimiquement, appelés les anti-miARN. Ils séquestrent le miARN mature sur base d'un appariement Watson-Crick menant à l'inhibition fonctionnelle du miARN et à l'arrêt de la répression des gènes cibles directs. Plusieurs catégories d'anti-miARN existent et sont classés en fonction des modifications apportées à leur structure telles que des bases modifiées, une séquence combinant ARN et ADN ou l'ajout d'un groupement cholestérol. Ces modifications confèrent aux anti-miARN une résistance accrue aux nucléases, une meilleure affinité de liaison avec leurs cibles ainsi qu'une entrée efficace dans les tissus *in vivo* (**Figure 22**). Parmi eux, les anti-miARN de type LNA possèdent une affinité plus forte pour l'ARN complémentaire comparés, par exemple, aux oligonucléotides anti-sens modifiés avec des bases 2'-O-méthyl (2'-O-Me), qui peuvent être couplés avec un groupement cholestérol à l'extrémité 3' (antagomir) (Horwich *et al.*, 2008). Par contre, l'addition de ce groupement cholestérol permet aux antagomirs d'être des outils de choix pour inhiber un miARN *in vivo* (Krutzfeldt *et al.*, 2005).



**Figure 22. Les oligonucléotides anti-miARN chimiquement modifiés.** Structure des modifications chimiques les plus communément utilisées. Le LNA est un analogue de l'ARN bicyclique dans lequel le ribose est bouclé en conformation C3'-endo par introduction d'un pont méthylène 2'O, 4'O. Les nucléotides 2'-F, 2'-MOE et 2'-O-Me sont modifiés en position 2' du ribose (Stenvang *et al.*, 2012).

L'anti-miR-122 est le premier des anti-miARN à être entré en phase clinique 2 pour son application dans le traitement contre l'hépatite C. La société Santaris développe le « miravirsen », première drogue ciblant un miARN, en l'occurrence miR-122, permettant de

réduire significativement le niveau du virus de l'hépatite C chez les personnes infectées. Des tests sur chimpanzés montrent que le LNA anti-miR-122 est efficace dans la répression durable du virus de l'hépatite C et ne semble pas induire de résistance virale ou d'effets secondaires chez les animaux traités (Lanford *et al.*, 2010). Les tests de phase clinique 1 montrent que le « miravasen » est bien toléré chez des personnes volontaires et en bonne santé (www.santaris.com). Concernant les désordres cardiaques, l'administration de LNA anti-miR-208a, par exemple, à des rats souffrant d'insuffisance cardiaque améliore la fonction cardiaque et la survie (Montgomery *et al.*, 2011). A côté de ces oligonucléotides anti-sens, il existe encore une autre catégorie d'inhibiteurs de la fonction des miARN. Il s'agit des *miRNA sponges* qui contiennent des sites multiples complémentaires à un miARN d'intérêt et qui sont produits à partir de transgènes dans la cellule. Ils permettent de séquestrer des miARN et ainsi d'inhiber un miARN d'intérêt ou une famille de miARN possédant la même graine qui ne peuvent alors plus réprimer leurs cibles dans la cellule (Ebert *et al.*, 2010).

A l'inverse, il est possible de surexprimer un miARN *in vivo* par injection d'oligonucléotides correspondant à la séquence du miARN (miARN *mimics*) comme par exemple, l'injection de miR-29 *mimics* dans le cœur de souris après un infarctus du myocarde (van Rooij *et al.*, 2008). Mais la surexpression de miARN *in vivo* peut également se faire à l'aide de vecteurs d'expression tels que des adénovirus. L'injection d'adénovirus dirigeant l'expression de miR-101 à des rats présentant un infarctus du myocarde chronique permet d'améliorer les performances cardiaques (Pan *et al.*, 2012). De façon intéressante, le tropisme de l'adénovirus associé de sérotype 9 (AVV9) est préférentiellement cardiaque et permet ainsi d'y surexprimer un miARN (Geisler *et al.*, 2011).

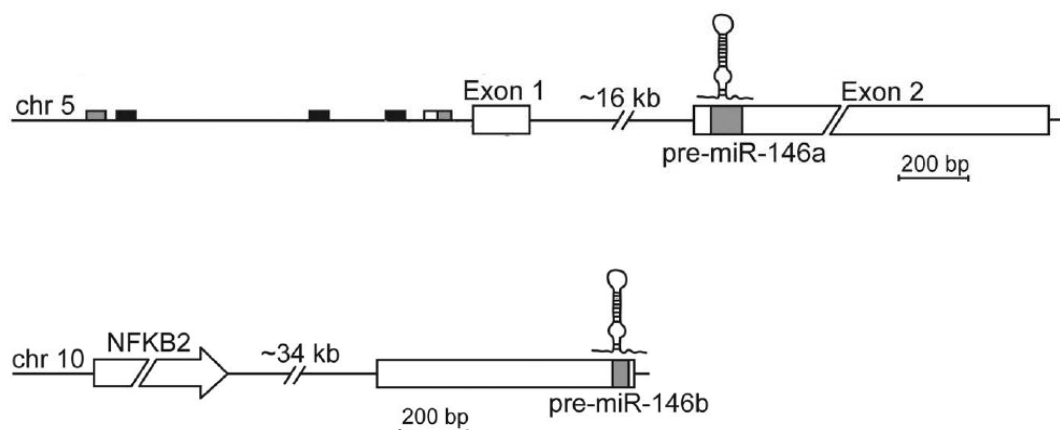
## 4.4. miR-146a

### 4.4.1. Généralités

Le miARN auquel nous nous sommes particulièrement intéressés dans ce travail est miR-146a. Initialement identifié comme régulateur de l'immunité innée dans une étude visant à découvrir des miARN impliqués dans la réponse inflammatoire des mammifères aux infections microbiennes, le nombre de publications concernant miR-146a ne cesse d'augmenter chaque année.

MiR-146a avec miR-146b, constituent à eux deux une famille de miARN, miR-146, au vu de la similarité de leur séquence. En effet, seuls deux nucléotides diffèrent au niveau de leur extrémité 3'. Ainsi, ils sont prédits pour avoir la majorité de leurs gènes cibles en

commun. Ils sont cependant exprimés de façon indépendante (Lagos-Quintana *et al.*, 2002). Etant situés sur deux chromosomes différents, ils sont donc sous la dépendance de deux promoteurs différents. MiR-146a est situé dans le deuxième exon du gène LOC285628 sur le chromosome 5 chez l'homme alors que miR-146b est situé sur le chromosome 10 au niveau d'une séquence encore non incluse dans les EST clonés jusqu'à présent (**Figure 23**) (Taganov *et al.*, 2006). Il n'y a encore que très peu d'études concernant miR-146b à l'heure actuelle, à l'inverse de miR-146a.



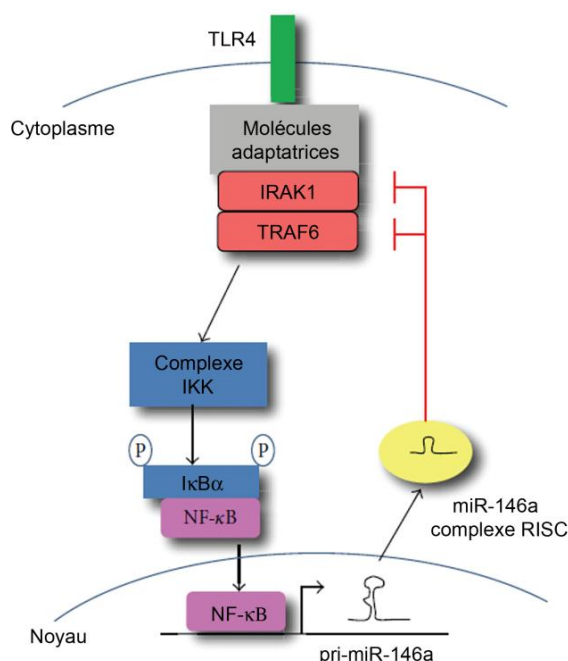
**Figure 23. MiR-146a et miR-146b sont situés sur deux chromosomes différents.** MiR-146a et -146b appartiennent à une même famille de miARN au vu de la grande similarité de leur séquence. Chez l'homme, alors que la séquence codant miR-146a est située sur le chromosome 5, celle codant miR-146b est située sur le chromosome 10. D'après (Taganov *et al.*, 2006).

MiR-146a est un miARN capable de réguler plusieurs processus physiologiques et pathologiques différents et possède une fonction dans de nombreux types cellulaires. Cette fonction est dépendante des gènes cibles régulés par miR-146a dans un type cellulaire donné. En résumé, miR-146a majoritairement décrit pour pouvoir interférer avec la réponse inflammatoire des cellules du système immunitaire inné et sur la réponse immunitaire adaptative. On le retrouve également impliqué dans divers mécanismes et principalement dans le développement de maladies auto-immunes et dans la régulation de certains types de cancers.

## 4.4.2. Rôle de miR-146a dans l'immunité

### 4.4.2.1. Immunité innée

C'est Taganov qui, en 2006, fut le premier à décrire miR-146a comme étant un miARN impliqué dans la réponse immunitaire primaire. Son expression est induite dans les cellules myéloïdes, via l'activation des récepteurs TLR-2, -4 et -5 par divers composants microbiens ou par des cytokines pro-inflammatoires comme les lipopolysaccharides (LPS), le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  ou la flagelline. De plus, les gènes TRAF6 et IRAK1, molécules adaptatrices clés dans la cascade d'activation de NF- $\kappa$ B induites par les récepteurs à l'IL-1 ou TLR, sont négativement régulées par miR-146a. Enfin, cette première étude a montré par analyse transcriptomique que l'expression de miR-146a est principalement sous le contrôle de NF- $\kappa$ B (**Figure 24**) (Taganov *et al.*, 2006). En plus de cibler TRAF6 et IRAK1, miR-146a diminue aussi l'expression des gènes IRAK2 (Hou *et al.*, 2009) et TRAF2 (Tanic *et al.*, 2012). Ainsi, miR-146a semble tenir un rôle crucial dans la boucle de rétro-action négative de l'activation de NF- $\kappa$ B. Il permet de réguler la réponse immunitaire innée en empêchant que l'activation de NF- $\kappa$ B ne soit constitutive. De plus, miR-146a joue un rôle important dans la tolérance aux LPS, état de non-réponse des cellules à des expositions prolongées de LPS (Nahid *et al.*, 2009).



**Figure 24. MiR-146a fait partie d'une boucle de régulation négative de l'activation de NF- $\kappa$ B.** MiR-146a régule négativement les voies de transduction menant à l'activation de NF- $\kappa$ B. Suite à l'activation de récepteurs à la surface cellulaire tels que le TLR4, une cascade moléculaire incluant TRAF6 et IRAK1 mène à la phosphorylation et à la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$  et à l'activation et la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B. L'activation de NF- $\kappa$ B induit la transcription de nombreux gènes dont pri-miR-146a. Une fois transféré dans le cytoplasme et chargé dans le complexe RISC, miR-146a contribue à atténuer la signalisation du récepteur en diminuant l'expression d'IRAK1 et TRAF6. D'après (Rusca *et al.*, 2011).

Plusieurs études montrent que miR-146a permet également de réguler la réponse inflammatoire lorsqu'il est exprimé dans des cellules non-immunitaires. Par exemple, la surexpression de miR-146a induite par l'IL-1 $\beta$  permet de cibler les chémokines pro-inflammatoires IL-8 et RANTES dans les cellules alvéolaires épithéliales pulmonaires (Perry *et al.*, 2008). MiR-146a empêche également la production de la chémokine CCL8/MCP-2 dans les cellules microgliales infectées par le HIV assurant leur maintenance suite à une inflammation chronique (Rom *et al.*, 2010). Enfin, miR-146a empêche l'apoptose des cellules épithéliales bronchiques, induite par une inflammation des voies respiratoires, en induisant l'expression de Bcl-XL et la phosphorylation de STAT3 (Liu *et al.*, 2009).

#### **4.4.2.2. Immunité adaptative**

A côté de son rôle dans la régulation de la réponse immunitaire innée, plusieurs données montrent que miR-146a possède aussi un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire adaptative. Après l'activation des récepteurs des lymphocytes T (TCR), l'expression de miR-146a est induite dans les lymphocytes T naïfs humains interférant alors avec l'activité de la protéine activatrice 1 et la production de l'IL-2 induites par l'activation des TCR. De plus, miR-146a perturbe la mort cellulaire induite par l'activation des lymphocytes T, en ciblant le domaine de mort associé à Fas (FADD) (Curtale *et al.*, 2010). Il a été récemment montré que les cellules T de souris déficientes en miR-146a sont hyperactives. Ce qui suggère que dans les cellules T également, miR-146a intervient dans une boucle de rétro-action négative afin de réguler l'activation de NF- $\kappa$ B par les récepteurs TCR (Yang *et al.*, 2012). Dans les cellules T régulatrices (Treg) aussi, l'expression de miR-146a est cruciale et leur permet d'assurer leur rôle suppresseur afin de maintenir l'homéostasie immunitaire en limitant le nombre de réponses inflammatoires. En effet, la déficience en miR-146a dans des cellules Treg provoque un arrêt de la tolérance immunologique et des lésions sont observées dans plusieurs organes en réponse à la production d'IFN  $\gamma$  (Lu *et al.*, 2010).

#### **4.4.3. Implication de miR-146a dans les maladies immunitaires**

Avec un rôle central dans la régulation de l'immunité, l'implication de miR-146a dans les maladies inflammatoires chroniques auto-immunes semble évidente. MiR-146a est en effet impliqué dans le lupus érythémateux disséminé, une maladie auto-immune systémique chronique s'attaquant à n'importe quel tissu sain du corps ainsi que dans l'arthrite rhumatoïde (Chan *et al.*, 2009), dans des maladies inflammatoires de la peau telles que l'eczéma ou le

psoriasis où son expression est accrue (Sonkoly *et al.*, 2008) ou encore dans la maladie d'Alzheimer (Lukiw, 2008).

Finalement, des souris transgéniques ont été créées afin d'étudier la fonction de miR-146a *in vivo* par délétion spécifique du gène. On observe chez ces souris plusieurs défauts immunitaires tels qu'une hypersensibilité aux LPS, une augmentation de la prolifération des cellules myéloïdes ainsi que de l'auto-immunité corrélée à une perte de tolérance des lymphocytes T (Boldin *et al.*, 2011). Il est de plus montré qu'une délétion génétique de la sous-unité p50 du facteur NF- $\kappa$ B chez les souris déficientes en miR-146a supprime la prolifération des cellules myéloïdes montrant qu'une dérégulation de NF- $\kappa$ B est responsable des maladies myéloprolifératives (Zhao *et al.*, 2011).

#### 4.4.4. Implication de miR-146a dans le cancer

Les souris transgéniques possédant une délétion génétique de miR-146a, décrites ci-dessus, développent également des tumeurs au niveau des organes lymphoïdes secondaires, suggérant un rôle anti-tumoral de miR-146a (Boldin *et al.*, 2011). Son expression semble de plus dérégulée dans plusieurs types de cancers où il peut être anti-tumoral mais également favoriser le développement tumoral dans d'autres cas.

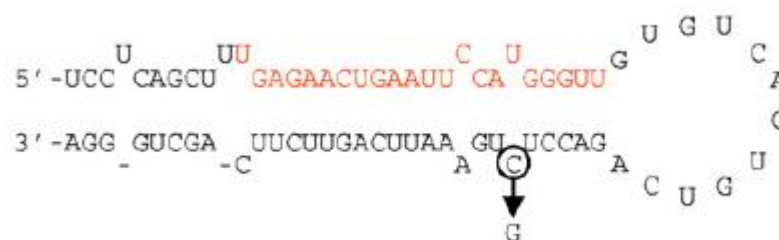
MiR-146a est décrit pour être un miARN anti-tumoral ou gène suppresseur de tumeur dans le cas du cancer de la prostate (Lin *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2012), du cancer gastrique (Kogo *et al.*, 2011; Hou *et al.*, 2012), des lymphomes à cellules NK/T (Paik *et al.*, 2011) ou encore de gliomes (Mei *et al.*, 2011). MiR-146a réduit également le potentiel métastatique de différentes lignées cellulaires de cancer du sein (Bhaumik *et al.*, 2008; Hurst *et al.*, 2009) et l'activité métastatique des métastases du cerveau (Hwang *et al.*, 2012). A l'inverse, l'expression de miR-146a est augmentée dans certains cas et semble favoriser le développement du cancer gastrique (Xiao *et al.*, 2012), du cancer de l'utérus (Wang *et al.*, 2008) ou du cancer de la thyroïde anaplastique (Pacifico *et al.*, 2010). De plus, l'inhibition de miR-146a dans la lignée cellulaire de carcinome rénal réduit la croissance tumorale *in vivo* (Perske *et al.*, 2010). MiR-146a est également induit par la protéine oncogénique Tax du virus de type 1 lymphotrope T humain (HTLV1) et induit la prolifération des cellules infectées par le virus (Tomita *et al.*, 2012).

Au vu des observations faites quant à son rôle sur le phénotype des cellules cancéreuses étudiées, on constate que miR-146a agit sur plusieurs mécanismes cellulaires tels que la survie, la prolifération, la migration, l'invasion et la différenciation des cellules cancéreuses au travers de gènes cibles différents.



#### 4.4.5. Polymorphisme

Chez l'homme, il existe un SNP, variation ou polymorphisme d'un seul nucléotide entre individus, au niveau de la tige de la structure en épingle à cheveux formée par le pré-miR-146a. En effet, au niveau du site polymorphique un « G » peut être remplacé par un allèle variant « C » pouvant alors interférer avec l'intégrité de cette structure et donc influencer la maturation de miR-146a (**Figure 25**) (Iwai *et al.*, 2005). Certains postulent que ce polymorphisme augmente le niveau de production de miR-146a (Shen *et al.*, 2008) alors que d'autres démontrent l'inverse (Jazdzewski *et al.*, 2008). Ce polymorphisme peut être associé à une augmentation ou une diminution du risque de prédisposition à différents types de cancer tels que le cancer colorectal (Zhou *et al.*, 2012), le cancer du sein (Lian *et al.*, 2012), le cancer du poumon (Vinci *et al.*, 2011) ou encore le cancer de la thyroïde (Jazdzewski *et al.*, 2008). Enfin, ce polymorphisme est décrit pour diminuer le risque de développer le lupus systémique érythémateux (Luo *et al.*, 2011) et l'allèle variant est aussi associé à la protection contre l'asthme (Jimenez-Morales *et al.*, 2012).



**Figure 25. La séquence du pré-miR-146a présente un polymorphisme.** Au niveau de la tige de la structure en épingle à cheveux du pré-miR-146a, une cytosine (C, entourée) peut être remplacée par une guanine (G). La flèche indique le génotype mineur. La séquence du miARN mature est mise en évidence en rouge (Iwai *et al.*, 2005).

#### 4.4.6. Autres cas spécifiques

MiR-146a est fortement impliqué dans le contrôle de l'hématopoïèse mais les mécanismes impliqués ne sont pas encore bien élucidés. En effet, miR-146a favorise les processus de différenciation et de maturation des macrophages (Ghani *et al.*, 2011), des cellules dendritiques (Chen *et al.*, 2011) et des cellules myéloïdes (Boldin *et al.*, 2011) alors qu'il aurait l'effet inverse sur les mégacaryocytes (Labbaye *et al.*, 2008).

MiR-146a est également impliqué dans des désordres cardiovasculaires tels qu'un arrêt cardiaque avec rupture ventriculaire (Zidar *et al.*, 2011), dans la maladie des artères coronaires (Takahashi *et al.*, 2010) ainsi que dans le syndrome coronarien aigu ou d'athérosclérose en modulant la fonction des cellules Th1 (Guo *et al.*, 2010).

MiR-146a module également le phénotype de différents types cellulaires en agissant sur divers processus. Parmi tout ce qui est décrit, la cardiotoxicité cardiaque induite par la doxorubicine, agent utilisé en chimiothérapie contre le cancer, fait intervenir une augmentation de l'expression de miR-146a associée à une réduction du niveau d'expression d'ErbB4 et de la survie des cardiomyocytes (Horie *et al.*, 2010). De plus, miR-146a est associé au vieillissement des cellules endothéliales humaines de la veine ombilicale (HUVEC) (Vasa-Nicotera *et al.*, 2011; Olivieri *et al.*, 2012) et son expression est rapportée pour être augmentée dans les cellules endothéliales microvasculaires humaines (HMVEC) par le PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*). Ce composant est connu pour induire la protéine kinase C qui elle-même induit l'activité angiogène des cellules endothéliales (Hsieh *et al.*, 2010). MiR-146a est également impliqué dans le contrôle de la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires (Sun *et al.*, 2011) et dans la régulation de la balance entre la différenciation musculaire et la prolifération (Kuang *et al.*, 2009). Il perturbe également la prolifération des cellules hépatiques stellaires induite par le TGF- $\beta$ 1 en plus d'augmenter leur apoptose empêchant ainsi leur activation qui est nécessaire à la fibrose hépatique (He *et al.*, 2012). MiR-146a peut interférer avec le remodelage vasculaire induit lors d'une inflammation en participant à la phase de résolution de l'inflammation (Nazari-Jahantigh *et al.*, 2012). On retrouve également miR-146a dérégulé dans l'ostéoarthrose et l'identification de sa fonction au sein des chondrocytes a montré qu'il était capable d'induire l'expression du VEGF ainsi que l'apoptose, interférant ainsi avec la voie du TGF- $\beta$  (Li *et al.*, 2012).

## **5. Les miARN extracellulaires**

### **5.1. Les miARN extracellulaires peuvent servir de biomarqueurs biologiques**

#### **5.1.1. Généralités**

Il est désormais connu que les miARN intracellulaires peuvent être exportés hors des cellules et se retrouver dans la plupart des fluides biologiques comme le sérum ou le plasma, la salive, l'urine, le lait maternel ou encore le liquide amniotique (Weber *et al.*, 2010). Ces miARN extracellulaires peuvent dans ce cas être également appelés, miARN circulants. En plus de leur grande accessibilité, les miARN circulants présentent plusieurs caractéristiques intéressantes. Premièrement, ils sont très stables. Il est en effet observé que leur expression reste stable après conservation d'échantillons plasmatiques à température ambiante ou après plusieurs cycles de congélation décongélation, par exemple (Mitchell *et al.*, 2008). De plus, leur détection est rapide, reproductible et peut se faire à partir d'un faible volume de fluide (Kroh *et al.*, 2010). Pour toutes ces raisons, les miARN circulants constituent des biomarqueurs biologiques non invasifs très prometteurs.

C'est en 2008 qu'un miARN présent dans le plasma fut proposé pour la première fois comme biomarqueur dans le cancer. MiR-141 est montré comme étant un biomarqueur intéressant, dont l'expression est significativement augmentée dans le plasma d'individus atteints d'un cancer de la prostate par rapport à des individus sains (Mitchell *et al.*, 2008). La qualité du miARN étudié pour son rôle de biomarqueur se reflète dans le graphique appelé courbe ROC. Il s'agit d'un graphe qui, basé sur la détection du miARN d'intérêt dans deux populations de patients malades et de personnes saines, permet de se rendre compte de la sensibilité et de la spécificité de ce biomarqueur. Une étude sur le carcinome à cellules rénales a plus récemment montré que l'utilisation de deux miARN voire plusieurs plutôt qu'un seul permettait un diagnostic plus sensible et plus spécifique des patients effectivement atteints par ce type de carcinome (Redova *et al.*, 2012).

#### **5.1.2. Biomarqueurs dans les pathologies cardiaques**

Depuis 2008, une large proportion des publications valorisant l'utilisation des miARN circulants comme biomarqueur concerne le diagnostic du cancer. Mais très vite après la découverte du rôle des miARN comme biomarqueurs sanguins, de nombreuses études ont montré que les miARN circulants constituaient également de bons biomarqueurs pour le

diagnostic d'un bon nombre d'autres pathologies et notamment les maladies cardiovasculaires (van Empel *et al.*, 2012).

Par exemple, miR-423-5p est un bon biomarqueur de l'insuffisance cardiaque (Tijssen *et al.*, 2010). On peut également observer une réduction du niveau plasmatique de miR-126, -17, -92a et -155 ainsi qu'une augmentation de miR-208a et miR-133a chez les patients atteints de la maladie des artères coronaires (Fichtlscherer *et al.*, 2010). Dans le cas encore d'un infarctus du myocarde aigu, les niveaux plasmatiques de miR-208b et miR-499 sont augmentés (Corsten *et al.*, 2010).

## **5.2. Les miARN extracellulaires permettent la communication intercellulaire**

### **5.2.1. Généralités**

A côté de leur rôle de biomarqueur, les miARN extracellulaires apparaissent de plus en plus comme un moyen de communication entre cellules. Il semble que ce transfert d'information puisse se faire grâce à l'inclusion de ces miARN dans des microvésicules, produites par les cellules donneuses et pouvant être captées par des cellules receveuses afin d'y transférer leur contenu en miARN notamment (Valadi *et al.*, 2007). De très récentes études montrent que les miARN extracellulaires pourraient également être sécrétés en association à des protéines de liaison à l'ARN (Wang *et al.*, 2010; Arroyo *et al.*, 2011; Turchinovich *et al.*, 2011) ou encore associés à des oxLDL (Vickers *et al.*, 2011). Cependant, le modèle de l'inclusion des miARN extracellulaires dans les microvésicules reste le plus communément admis à l'heure actuelle.

### **5.2.2. Microvésicules**

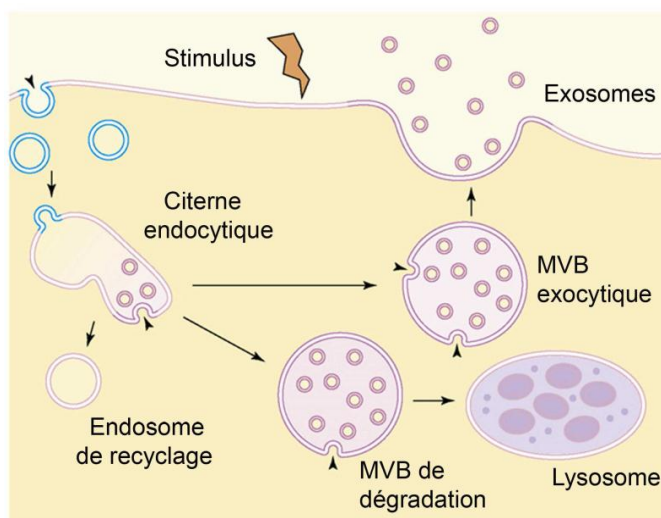
Les microvésicules extracellulaires sont une classe d'organelles membranaires sécrétées par divers types cellulaires. Elles regroupent les ectosomes ou vésicules de rejet qui sont des vésicules membranaires larges (100-1000 nm de diamètre) libérées directement de la membrane plasmique, les bourgeons apoptotiques (50-500 nm de diamètre) libérés par les cellules en apoptose et les exosomes ou vésicules membranaires (40-100 nm de diamètres) d'origine endocytaire (Mathivanan *et al.*, 2010). Les exosomes constituent le groupe de microvésicules le plus étudié et le mieux décrit.

### 5.2.3. Exosomes

#### 5.2.3.1. Description, historique

Découverts dans les années 80, les exosomes ont d'abord été décrits pour être produits lors de la maturation des réticulocytes et pour posséder des caractéristiques de la membrane plasmique de la cellule productrice en terme de composition protéique et lipidique. Rapidement, ils furent considérés comme des organelles permettant l'élimination des débris et autres molécules cellulaires (Johnstone *et al.*, 1987). Il est désormais connu que les exosomes sont de petites vésicules membranaires de 40 à 100 nm, d'origine endosomale, sécrétées dans le milieu extracellulaire par une large variété de types cellulaires, comme par exemple, les cellules B et T, les cellules épithéliales, endothéliales ou encore tumorales (Hunter *et al.*, 2008; Lakkaraju *et al.*, 2008; Mitchell *et al.*, 2008; Pegtel *et al.*, 2010).

Ils sont formés par invagination de la membrane des endosomes, eux-mêmes formés par fusion de vésicules d'endocytose au sein de la cellule. Ces endosomes deviennent alors des corps multivésiculaires qui, lorsqu'ils fusionnent avec la membrane plasmique, libèrent les exosomes dans le milieu extracellulaire (**Figure 27**) (Thery *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2008; Mathivanan *et al.*, 2010). Ainsi, les exosomes possèdent de nombreuses caractéristiques membranaires de la cellule hôte.



**Figure 26. La biogenèse des exosomes.**

Les endosomes générés à la membrane plasmique de la cellule fusionnent et génèrent des citernes ou réservoirs endocytiques. Ceux-ci peuvent être ciblés pour devenir des endosomes de recyclage ou alors l'accumulation de vésicules intraluminales par des processus de triage convertit les citernes endocytiques en corps multi-vésiculaires (MVB). Ces MVB peuvent soit évoluer en lysosomes et mener ainsi à la dégradation de leur contenu, soit fusionner avec la membrane plasmique et ainsi libérer leur contenu en exosomes dans le milieu extracellulaire. D'après (Cocucci *et al.*, 2009).

### 5.2.3.2. Composition des exosomes

Ce qui a réellement créé un regain d'intérêt pour les exosomes, c'est la découverte qu'en plus de contenir des protéines et des lipides, ils contiennent de l'ARNm ainsi que des miARN (Valadi *et al.*, 2007). Les exosomes sont aujourd'hui reconnus pour constituer un réel compartiment cellulaire organisé et non un ensemble de protéines et lipides présents aléatoirement dans ces structures vésiculaires, comme le monde scientifique l'a cru pendant des années (Mathivanan *et al.*, 2012). Outre leurs caractéristiques morphologiques et de biogenèse, les exosomes se différencient des autres microvésicules par certaines protéines ou certains lipides qu'ils contiennent. De plus, la composition des exosomes peut être influencée par le type cellulaire des cellules productrices (Mathivanan *et al.*, 2010; Vlassov *et al.*, 2012).

La gamme de protéines détectées au sein des exosomes est très large. Citons par exemple, les tétraspanines (CD63, CD9, CD81), des protéines impliquées dans la biogenèse des corps multivésiculaires (Alix, TSG101, clathrine), des protéines de transport membranaire, des protéines de fusion (GTPases dont les Rabs, annexines), d'adhésion ou encore des molécules d'ubiquitine (Conde-Vancells *et al.*, 2008 ; Vlassov *et al.*, 2012). En terme de lipides, on peut retrouver du cholestérol, des céramides, des sphingolipides et des phosphoglycérides au sein des exosomes (Laulagnier *et al.*, 2004; Batista *et al.*, 2011). Enfin, concernant les miARN, il semble y avoir une réelle sélection des miARN chargés dans les exosomes au vu de différentes analyses transcriptomiques réalisées en parallèle sur l'ARN des exosomes et sur l'ARN cellulaire d'origine. Certains miARN sont plus exprimés soit dans les cellules productrices soit dans les exosomes sécrétés voire même absents dans l'un des deux compartiments (Valadi *et al.*, 2007; Taylor *et al.*, 2008).

### 5.2.3.3. Transfert des exosomes aux cellules receveuses

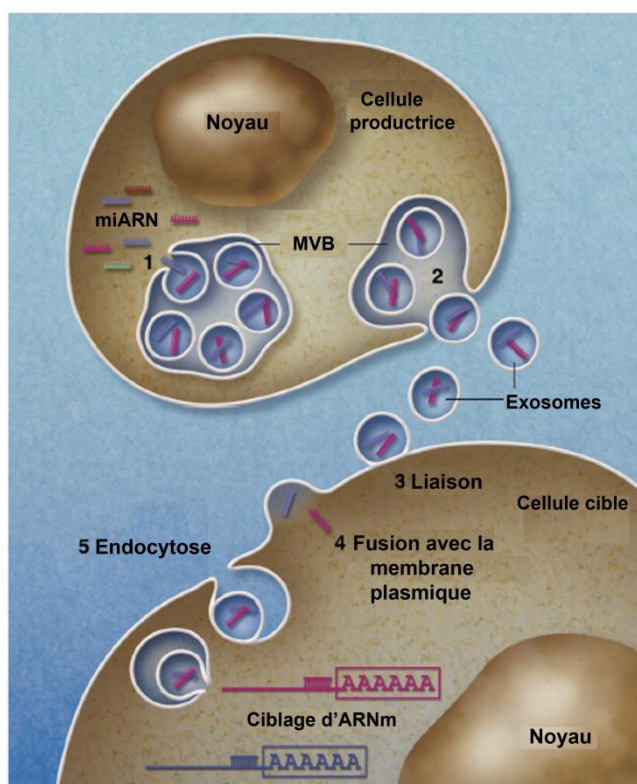
De part leurs propriétés biologiques, les exosomes ont alors commencé à être fortement suspectés de permettre la communication entre cellules. Même si en 2006, il a déjà été montré qu'il existait un transfert horizontal de l'ARN messager et de protéines entre cellules (Ratajczak *et al.*, 2006), c'est en 2007 que Valadi a montré pour la première fois l'existence d'un transfert de miARN entre cellules, via les exosomes (Valadi *et al.*, 2007).

Concernant le mode d'entrée des exosomes dans les cellules receveuses, plusieurs hypothèses sont envisagées mais aucun modèle consensus n'est encore établi à l'heure actuelle. La spécificité cellulaire semble influencer le mécanisme impliqué. Ainsi, les exosomes sont décrits pour être soit endocytés (Tian *et al.*, 2010) ou phagocytés (Feng *et al.*,

2010), soit pour fusionner avec la cellule receveuse (Parolini *et al.*, 2009). L'hypothèse d'une spécificité ou reconnaissance entre l'exosome et la cellule receveuse est fortement soutenue.

#### 5.2.4. Les miARN extracellulaires: transfert d'information

Le précurseur dans le domaine du transfert de miARN entre cellules via les exosomes, Kosaka, a mis en évidence pour la première fois la fonction tenue par le miARN transféré aux cellules receveuses. Dans un système d'expression forcée de miR-146a, il est montré que miR-146a transféré à des cellules cancéreuses de la prostate PC3, via les exosomes, permet de réduire leur prolifération (Kosaka *et al.*, 2010). Depuis lors, on attribue aux miARN extracellulaires transférés entre cellules une fonction importante dans de nombreux processus biologiques tels que la régulation de l'immunité (Mittelbrunn *et al.*, 2011) ou la migration cellulaire (Zhang *et al.*, 2010) ainsi que dans des processus pathologiques tels que le développement tumoral (Yang *et al.*, 2011) (**Figure 28**).



**Figure 27. Schéma montrant le transfert de miARN via les exosomes.** Les miARN sont incorporés de façon sélective dans les vésicules intraluminales des corps multi-vésiculaires (MVB) (1). Les corps multi-vésiculaires fusionnent avec la membrane plasmique, libérant leurs vésicules intra-luminales dans le milieu extracellulaire (2). Les exosomes peuvent se lier à la membrane plasmique d'une cellule cible (3). Ils peuvent soit fusionner avec la membrane plasmique (4) soit être endocytés (5). Il en résulte le transfert des miARN exosomaux dans le cytosol de la cellule cible où ils peuvent réprimer des ARNm de la cellule hôte. D'après (Stoorvogel, 2012).

#### 5.2.4.1. Transfert local

Parmi les quelques cas déjà décrits, on retrouve par exemple miR-223 qui peut être transféré, via des exosomes, à partir de macrophages associés aux tumeurs vers des cellules cancéreuses mammaires, réduisant le phénotype invasif de ces dernières (Yang *et al.*, 2011). Les cellules de carcinome hépatique s'échangent aussi entre elles des miARN via les exosomes afin d'augmenter leur croissance et leur potentiel métastatique (Kogure *et al.*, 2011). Les cellules de leucémie monocytaires sont capable d'induire la migration des cellules endothéliales par transfert de microvésicules contenant miR-150 (Zhang *et al.*, 2010). Le transfert de miR-133b entre cellules stromales mésenchymateuses et astrocytes induit la croissance du corps cellulaire d'un neurone (Xin *et al.*, 2012). Ou encore, le transfert du cluster miR-143/145 à partir des cellules endothéliales vers les cellules musculaires lisses favorise la protection contre l'athérosclérose (Hergenreider *et al.*, 2012). Plus étonnant encore, les miARN viraux provenant de l'infection de cellules B, par le virus de l'Epstein-Barr (EBV), sont transférés à des cellules dendritiques immatures où ils sont capable de diminuer l'expression de CXCL11, cytokine impliquée la stimulation immunitaire (Pegtel *et al.*, 2010). Enfin, il existe à l'heure actuelle un cas montrant que sans un rapprochement particulier entre les cellules, le transfert de miARN ne peut pas avoir lieu. Il est montré que l'interface spécifique entre une cellule T et une cellule présentatrice d'antigène, appelé la synapse immunitaire, est strictement requis afin de permettre un transfert unidirectionnel de miARN via les exosomes (Mittelbrunn *et al.*, 2011).

#### 5.2.4.2. Transfert à distance

Une première étude a récemment montré que ce transfert de miARN entre cellules via les exosomes pouvait s'effectuer à distance. Hood et ses collaborateurs ont montré que des exosomes relargués par des cellules de mélanome sont capable de migrer jusqu'aux ganglions lymphatiques sentinelles afin de préparer le terrain pour l'établissement de métastases par les cellules cancéreuses (Hood *et al.*, 2011). Mais aussi, un exemple encore plus récent montre que les exosomes dérivés du placenta protègent les nodules thyroïdiens de toute attaque auto-immune grâce au transfert du cluster de miARN C19MC (Bullerdiek *et al.*, 2012).





## But du travail

La PPCM est une maladie cardiaque mortelle caractérisée par un dysfonctionnement systolique du ventricule gauche et des symptômes d'insuffisance cardiaque. A la fois l'endothélium cardiaque et les cardiomyocytes sont affectés lors du développement de la maladie chez la femme entre le dernier mois de grossesse et les 5 mois qui suivent l'accouchement. De plus, il est maintenant connu que la PRL 16K est l'élément clé dans le développement de la PPCM (Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2007). Puisque l'action de la PRL 16K est spécifiquement endothéliale (Martini *et al.*, 2000; Nguyen *et al.*, 2007; Nguyen *et al.*, 2011), notre but fut de déterminer comment l'effet de la PRL 16K sur les cellules endothéliales du cœur pouvait se répercuter sur les cardiomyocytes dans la pathophysiologie de PPCM.

Récemment découverts, les miARN sont des régulateurs d'un très grand nombre de processus biologiques et pathologiques. Ils sont de plus en plus décrits pour être impliqués notamment dans la régulation de l'angiogenèse (Wu *et al.*, 2009). Nous avons donc pensé que certains miARN pouvaient être régulés par la PRL 16K dans les cellules endothéliales afin d'y jouer un rôle anti-angiogène. De plus, les miARN sont nouvellement décrits pour pouvoir être exportés hors de la cellule productrice via des exosomes. Ces exosomes peuvent alors interagir avec d'autres cellules afin d'y introduire les miARN qu'ils contiennent. Ces miARN transférés vont alors pouvoir cibler certains gènes dans ces cellules receveuses et y remplir une fonction (Kosaka *et al.*, 2010). Nous avons émis l'hypothèse qu'il pouvait exister une telle communication entre les cellules endothéliales et les cardiomyocytes via les miARN suite à la production de PRL 16K lors du développement de PPCM. Ainsi, ce travail va permettre de mieux comprendre la pathophysiologie de la PPCM et donc permettre de déterminer de nouvelles cibles thérapeutiques plus spécifiques de la maladie grâce à l'implication des miARN.

Finalement, depuis quelques années, les miARN sont également décrits pour être présents dans des fluides biologiques tels que le plasma. Ces miARN circulants constituent des biomarqueurs de choix dans le diagnostic du cancer ou d'autres pathologies comme les maladies cardiovasculaires (Mitchell *et al.*, 2008; Tijssen *et al.*, 2012). Au vu du manque de spécificité des biomarqueurs sanguins déjà décrits pour être modulés lors de la PPCM, nous avons donc cherché à mettre en évidence la spécificité d'un miARN comme biomarqueur de la PPCM.

## Note du promoteur de thèse

Un article reprennant les resultats de Julie Halkein etant en cours de revision à la revue Journal of Clinical Investigation, les resultats seront publiés après acceptation de ce manuscrit.



## Bibliographie

Adams, J. W., Sakata, Y., Davis, M. G., Sah, V. P., Wang, Y., Liggett, S. B., Chien, K. R., Brown, J. H. and Dorn, G. W., 2nd (1998). "Enhanced Galphaq signaling: a common pathway mediates cardiac hypertrophy and apoptotic heart failure." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(17): 10140-10145.

Adams, R. H. and Alitalo, K. (2007). "Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(6): 464-478.

Affolter, M., Zeller, R. and Caussinus, E. (2009). "Tissue remodelling through branching morphogenesis." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(12): 831-842.

Afonyushkin, T., Oskolkova, O. V. and Bochkov, V. N. (2012). "Permissive role of miR-663 in induction of VEGF and activation of the ATF4 branch of unfolded protein response in endothelial cells by oxidized phospholipids." Atherosclerosis.

Alvarez-Erviti, L., Seow, Y., Yin, H., Betts, C., Lakhal, S. and Wood, M. J. (2011). "Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes." Nat Biotechnol **29**(4): 341-345.

Anand, S., Majeti, B. K., Acevedo, L. M., Murphy, E. A., Mukthavaram, R., Scheppke, L., Huang, M., Shields, D. J., Lindquist, J. N., Lapinski, P. E., King, P. D., Weis, S. M. and Cheresch, D. A. (2010). "MicroRNA-132-mediated loss of p120RasGAP activates the endothelium to facilitate pathological angiogenesis." Nat Med **16**(8): 909-914.

Ansari, A. A., Fett, J. D., Carraway, R. E., Mayne, A. E., Onlamoon, N. and Sundstrom, J. B. (2002). "Autoimmune mechanisms as the basis for human peripartum cardiomyopathy." Clin Rev Allergy Immunol **23**(3): 301-324.

Aranda, J., Rivera, J. C., Jeziorski, M. C., Riesgo-Escovar, J., Nava, G., Lopez-Barrera, F., Quiroz-Mercado, H., Berger, P., Martinez de la Escalera, G. and Clapp, C. (2005). "Prolactins are natural inhibitors of angiogenesis in the retina." Invest Ophthalmol Vis Sci **46**(8): 2947-2953.

Arroyo, J. D., Chevillet, J. R., Kroh, E. M., Ruf, I. K., Pritchard, C. C., Gibson, D. F., Mitchell, P. S., Bennett, C. F., Pogosova-Agadjanyan, E. L., Stirewalt, D. L., Tait, J. F. and Tewari, M. (2011). "Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(12): 5003-5008.

Asa, S. L., Kelly, M. A., Grandy, D. K. and Low, M. J. (1999). "Pituitary lactotroph adenomas develop after prolonged lactotroph hyperplasia in dopamine D2 receptor-deficient mice." Endocrinology **140**(11): 5348-5355.

Avruch, J., Khokhlatchev, A., Kyriakis, J. M., Luo, Z., Tzivion, G., Vavvas, D. and Zhang, X. F. (2001). "Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade." Recent Prog Horm Res **56**: 127-155.

Bajou, K., Herkenne, S., Thijssen, V. L., D'Amico, S., Nguyen, N. Q. N., Tabruyn, S., Srahna, M., Carabin, J. Y., Nivelles, O., Carmeliet, P., Noel, A., Gils, A., Declercq, P. J., Griffioen, A. W., Martial, J. and Struman, I. (in revision). "PAI-1 mediates antiangiogenic and fibrinolytic actions of 16-14K prolactin/growth hormone fragments." Nat Med.

Bala, S., Petrasek, J., Mundkur, S., Catalano, D., Levin, I., Ward, J., Alao, H., Kodys, K. and Szabo, G. (2012). "Circulating microRNAs in exosomes indicate hepatocyte injury and inflammation in alcoholic, drug-induced, and inflammatory liver diseases." Hepatology.

Baldocchi, R. A., Tan, L., King, D. S. and Nicoll, C. S. (1993). "Mass spectrometric analysis of the fragments produced by cleavage and reduction of rat prolactin: evidence that the cleaving enzyme is cathepsin D." Endocrinology **133**(2): 935-938.

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

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

Basso, C., Corrado, D., Marcus, F. I., Nava, A. and Thiene, G. (2009). "Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy." Lancet **373**(9671): 1289-1300.

Batista, B. S., Eng, W. S., Pilobello, K. T., Hendricks-Munoz, K. D. and Mahal, L. K. (2011). "Identification of a conserved glycan signature for microvesicles." J Proteome Res **10**(10): 4624-4633.

Bayless, K. J., Salazar, R. and Davis, G. E. (2000). "RGD-dependent vacuolation and lumen formation observed during endothelial cell morphogenesis in three-dimensional fibrin matrices involves the  $\alpha(v)\beta(3)$  and  $\alpha(5)\beta(1)$  integrins." Am J Pathol **156**(5): 1673-1683.

Belevych, A. E., Sansom, S. E., Terentyeva, R., Ho, H. T., Nishijima, Y., Martin, M. M., Jindal, H. K., Rochira, J. A., Kunitomo, Y., Abdellatif, M., Carnes, C. A., Elton, T. S., Gyorke, S. and Terentyev, D. (2011). "MicroRNA-1 and -133 increase arrhythmogenesis in heart failure by dissociating phosphatase activity from RyR2 complex." PLoS One **6**(12): e28324.

Bentzien, F., Struman, I., Martini, J. F., Martial, J. and Weiner, R. (2001). "Expression of the antiangiogenic factor 16K hPRL in human HCT116 colon cancer cells inhibits tumor growth in Rag1(-/-) mice." Cancer Res **61**(19): 7356-7362.

Bergers, G. and Benjamin, L. E. (2003). "Tumorigenesis and the angiogenic switch." Nat Rev Cancer **3**(6): 401-410.

- Bergers, G. and Hanahan, D. (2008). "Modes of resistance to anti-angiogenic therapy." Nat Rev Cancer **8**(8): 592-603.
- Bergmann, O., Bhardwaj, R. D., Bernard, S., Zdunek, S., Barnabe-Heider, F., Walsh, S., Zupicich, J., Alkass, K., Buchholz, B. A., Druid, H., Jovinge, S. and Frisen, J. (2009). "Evidence for cardiomyocyte renewal in humans." Science **324**(5923): 98-102.
- Berndt, S., Perrier d'Hauterive, S., Blacher, S., Pequeux, C., Lorquet, S., Munaut, C., Applanat, M., Herve, M. A., Lamande, N., Corvol, P., van den Brule, F., Frankenne, F., Poutanen, M., Huhtaniemi, I., Geenen, V., Noel, A. and Foidart, J. M. (2006). "Angiogenic activity of human chorionic gonadotropin through LH receptor activation on endothelial and epithelial cells of the endometrium." FASEB J **20**(14): 2630-2632.
- Bersell, K., Arab, S., Haring, B. and Kuhn, B. (2009). "Neuregulin1/ErbB4 signaling induces cardiomyocyte proliferation and repair of heart injury." Cell **138**(2): 257-270.
- Bhaumik, D., Scott, G. K., Schokrpur, S., Patil, C. K., Campisi, J. and Benz, C. C. (2008). "Expression of microRNA-146 suppresses NF-kappaB activity with reduction of metastatic potential in breast cancer cells." Oncogene **27**(42): 5643-5647.
- Boettger, T. and Braun, T. (2012). "A new level of complexity: the role of microRNAs in cardiovascular development." Circ Res **110**(7): 1000-1013.
- Boldin, M. P., Taganov, K. D., Rao, D. S., Yang, L., Zhao, J. L., Kalwani, M., Garcia-Flores, Y., Luong, M., Devrekanli, A., Xu, J., Sun, G., Tay, J., Linsley, P. S. and Baltimore, D. (2011). "miR-146a is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice." J Exp Med **208**(6): 1189-1201.
- Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N. and Kelly, P. A. (1998). "Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice." Endocr Rev **19**(3): 225-268.
- Bonauer, A., Carmona, G., Iwasaki, M., Mione, M., Koyanagi, M., Fischer, A., Burchfield, J., Fox, H., Doebele, C., Ohtani, K., Chavakis, E., Potente, M., Tjwa, M., Urbich, C., Zeiher, A. M. and Dimmeler, S. (2009). "MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice." Science **324**(5935): 1710-1713.
- Boon, R. A., Seeger, T., Heydt, S., Fischer, A., Hergenreider, E., Horrevoets, A. J., Vinciguerra, M., Rosenthal, N., Sciacca, S., Pilato, M., van Heijningen, P., Essers, J., Brandes, R. P., Zeiher, A. M. and Dimmeler, S. (2011). "MicroRNA-29 in aortic dilation: implications for aneurysm formation." Circ Res **109**(10): 1115-1119.
- Bozkurt, B., Villaneuva, F. S., Holubkov, R., Tokarczyk, T., Alvarez, R. J., Jr., MacGowan, G. A., Murali, S., Rosenblum, W. D., Feldman, A. M. and McNamara, D. M. (1999). "Intravenous immune globulin in the therapy of peripartum cardiomyopathy." J Am Coll Cardiol **34**(1): 177-180.

Bridges, R. S. and Ronsheim, P. M. (1990). "Prolactin (PRL) regulation of maternal behavior in rats: bromocriptine treatment delays and PRL promotes the rapid onset of behavior." Endocrinology **126**(2): 837-848.

Bullerdiek, J. and Flor, I. (2012). "Exosome-delivered microRNAs of "chromosome 19 microRNA cluster" as immunomodulators in pregnancy and tumorigenesis." Mol Cytogenet **5**(1): 27.

Bultmann, B. D., Klingel, K., Nabauer, M., Wallwiener, D. and Kandolf, R. (2005). "High prevalence of viral genomes and inflammation in peripartum cardiomyopathy." Am J Obstet Gynecol **193**(2): 363-365.

Caporali, A., Meloni, M., Vollenkle, C., Bonci, D., Sala-Newby, G. B., Addis, R., Spinetti, G., Losa, S., Masson, R., Baker, A. H., Agami, R., le Sage, C., Condorelli, G., Madeddu, P., Martelli, F. and Emanuelli, C. (2011). "Deregulation of microRNA-503 contributes to diabetes mellitus-induced impairment of endothelial function and reparative angiogenesis after limb ischemia." Circulation **123**(3): 282-291.

Care, A., Catalucci, D., Felicetti, F., Bonci, D., Addario, A., Gallo, P., Bang, M. L., Segnalini, P., Gu, Y., Dalton, N. D., Elia, L., Latronico, M. V., Hoydal, M., Autore, C., Russo, M. A., Dorn, G. W., 2nd, Ellingsen, O., Ruiz-Lozano, P., Peterson, K. L., Croce, C. M., Peschle, C. and Condorelli, G. (2007). "MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy." Nat Med **13**(5): 613-618.

Carmeliet, P. (2000). "Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis." Nat Med **6**(4): 389-395.

Carmeliet, P. (2005). "Angiogenesis in life, disease and medicine." Nature **438**(7070): 932-936.

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

Carrer, M., Liu, N., Grueter, C. E., Williams, A. H., Frisard, M. I., Hulver, M. W., Bassel-Duby, R. and Olson, E. N. (2012). "Control of mitochondrial metabolism and systemic energy homeostasis by microRNAs 378 and 378." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(38): 15330-15335.

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

Castellano, E., De Las Rivas, J., Guerrero, C. and Santos, E. (2007). "Transcriptional networks of knockout cell lines identify functional specificities of H-Ras and N-Ras: significant involvement of N-Ras in biotic and defense responses." Oncogene **26**(6): 917-933.

Castellano, E., Guerrero, C., Nunez, A., De Las Rivas, J. and Santos, E. (2009). "Serum-dependent transcriptional networks identify distinct functional roles for H-Ras and N-Ras during initial stages of the cell cycle." Genome Biol **10**(11): R123.



- Cataldo, L., Chen, N. Y., Yuan, Q., Li, W., Ramamoorthy, P., Wagner, T. E., Sticca, R. P. and Chen, W. Y. (2000). "Inhibition of oncogene STAT3 phosphorylation by a prolactin antagonist, hPRL-G129R, in T-47D human breast cancer cells." Int J Oncol **17**(6): 1179-1185.
- Chan, E. K., Satoh, M. and Pauley, K. M. (2009). "Contrast in aberrant microRNA expression in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: is microRNA-146 all we need?" Arthritis Rheum **60**(4): 912-915.
- Chan, L. S., Yue, P. Y., Mak, N. K. and Wong, R. N. (2009). "Role of microRNA-214 in ginsenoside-Rg1-induced angiogenesis." Eur J Pharm Sci **38**(4): 370-377.
- Chan, Y. C., Khanna, S., Roy, S. and Sen, C. K. (2011). "miR-200b targets Ets-1 and is down-regulated by hypoxia to induce angiogenic response of endothelial cells." J Biol Chem **286**(3): 2047-2056.
- Chen, J. F., Murchison, E. P., Tang, R., Callis, T. E., Tatsuguchi, M., Deng, Z., Rojas, M., Hammond, S. M., Schneider, M. D., Selzman, C. H., Meissner, G., Patterson, C., Hannon, G. J. and Wang, D. Z. (2008). "Targeted deletion of Dicer in the heart leads to dilated cardiomyopathy and heart failure." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(6): 2111-2116.
- Chen, T., Li, Z., Jing, T., Zhu, W., Ge, J., Zheng, X., Pan, X., Yan, H. and Zhu, J. (2011). "MicroRNA-146a regulates the maturation process and pro-inflammatory cytokine secretion by targeting CD40L in oxLDL-stimulated dendritic cells." FEBS Lett **585**(3): 567-573.
- Chen, Y. and Gorski, D. H. (2008). "Regulation of angiogenesis through a microRNA (miR-130a) that down-regulates antiangiogenic homeobox genes GAX and HOXA5." Blood **111**(3): 1217-1226.
- Chendrimada, T. P., Finn, K. J., Ji, X., Baillat, D., Gregory, R. I., Liebhaber, S. A., Pasquinelli, A. E. and Shiekhattar, R. (2007). "MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6." Nature **447**(7146): 823-828.
- Chung, A. S., Lee, J. and Ferrara, N. (2010). "Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis." Nat Rev Cancer **10**(7): 505-514.
- Clapp, C., Martial, J. A., Guzman, R. C., Rentier-Delure, F. and Weiner, R. I. (1993). "The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis." Endocrinology **133**(3): 1292-1299.
- Clapp, C. and Weiner, R. I. (1992). "A specific, high affinity, saturable binding site for the 16-kilodalton fragment of prolactin on capillary endothelial cells." Endocrinology **130**(3): 1380-1386.
- Cocucci, E., Racchetti, G. and Meldolesi, J. (2009). "Shedding microvesicles: artefacts no more." Trends Cell Biol **19**(2): 43-51.

Conde-Vancells, J., Rodriguez-Suarez, E., Embade, N., Gil, D., Matthiesen, R., Valle, M., Elortza, F., Lu, S. C., Mato, J. M. and Falcon-Perez, J. M. (2008). "Characterization and comprehensive proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes." J Proteome Res **7**(12): 5157-5166.

Conway, E. M., Collen, D. and Carmeliet, P. (2001). "Molecular mechanisms of blood vessel growth." Cardiovasc Res **49**(3): 507-521.

Corbacho, A. M., Macotela, Y., Nava, G., Torner, L., Duenas, Z., Noris, G., Morales, M. A., Martinez De La Escalera, G. and Clapp, C. (2000). "Human umbilical vein endothelial cells express multiple prolactin isoforms." J Endocrinol **166**(1): 53-62.

Corbacho, A. M., Martinez De La Escalera, G. and Clapp, C. (2002). "Roles of prolactin and related members of the prolactin/growth hormone/placental lactogen family in angiogenesis." J Endocrinol **173**(2): 219-238.

Corsten, M. F., Dennert, R., Jochems, S., Kuznetsova, T., Devaux, Y., Hofstra, L., Wagner, D. R., Staessen, J. A., Heymans, S. and Schroen, B. (2010). "Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease." Circ Cardiovasc Genet **3**(6): 499-506.

Corsten, M. F., Papageorgiou, A., Verhesen, W., Carai, P., Lindow, M., Obad, S., Summer, G., Coort, S. L., Hazebroek, M., van Leeuwen, R., Gijbels, M. J., Wijnands, E., Biessen, E. A., De Winther, M. P., Stassen, F. R., Carmeliet, P., Kauppinen, S., Schroen, B. and Heymans, S. (2012). "MicroRNA profiling identifies microRNA-155 as an adverse mediator of cardiac injury and dysfunction during acute viral myocarditis." Circ Res **111**(4): 415-425.

Coussens, L. M., Raymond, W. W., Bergers, G., Laig-Webster, M., Behrendtsen, O., Werb, Z., Caughey, G. H. and Hanahan, D. (1999). "Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis." Genes Dev **13**(11): 1382-1397.

Curtale, G., Citarella, F., Carissimi, C., Goldoni, M., Carucci, N., Fulci, V., Franceschini, D., Meloni, F., Barnaba, V. and Macino, G. (2010). "An emerging player in the adaptive immune response: microRNA-146a is a modulator of IL-2 expression and activation-induced cell death in T lymphocytes." Blood **115**(2): 265-273.

Curtis, H. J., Sibley, C. R. and Wood, M. J. (2012). "Mirtrons, an emerging class of atypical miRNA." Wiley Interdiscip Rev RNA **3**(5): 617-632.

D'Angelo, G., Martini, J. F., Iiri, T., Fantl, W. J., Martial, J. and Weiner, R. I. (1999). "16K human prolactin inhibits vascular endothelial growth factor-induced activation of Ras in capillary endothelial cells." Mol Endocrinol **13**(5): 692-704.

D'Angelo, G., Struman, I., Martial, J. and Weiner, R. I. (1995). "Activation of mitogen-activated protein kinases by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in capillary endothelial cells is inhibited by the antiangiogenic factor 16-kDa N-terminal fragment of prolactin." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(14): 6374-6378.

da Costa Martins, P. A., Bourajjaj, M., Gladka, M., Kortland, M., van Oort, R. J., Pinto, Y. M., Molkenstein, J. D. and De Windt, L. J. (2008). "Conditional *dicer* gene deletion in the postnatal myocardium provokes spontaneous cardiac remodeling." Circulation **118**(15): 1567-1576.

da Costa Martins, P. A., Salic, K., Gladka, M. M., Armand, A. S., Leptidis, S., el Azzouzi, H., Hansen, A., Coenen-de Roo, C. J., Bierhuizen, M. F., van der Nagel, R., van Kuik, J., de Weger, R., de Bruin, A., Condorelli, G., Arbones, M. L., Eschenhagen, T. and De Windt, L. J. (2010). "MicroRNA-199b targets the nuclear kinase *Dyrk1a* in an auto-amplification loop promoting calcineurin/NFAT signalling." Nat Cell Biol **12**(12): 1220-1227.

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

DeBosch, B., Treskov, I., Lupu, T. S., Weinheimer, C., Kovacs, A., Courtois, M. and Muslin, A. J. (2006). "Akt1 is required for physiological cardiac growth." Circulation **113**(17): 2097-2104.

Dejana, E., Orsenigo, F. and Lampugnani, M. G. (2008). "The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability." J Cell Sci **121**(Pt 13): 2115-2122.

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

Domenga, V., Fardoux, P., Lacombe, P., Monet, M., Maciazek, J., Krebs, L. T., Klonjowski, B., Berrou, E., Mericskay, M., Li, Z., Tournier-Lasserre, E., Gridley, T. and Joutel, A. (2004). "Notch3 is required for arterial identity and maturation of vascular smooth muscle cells." Genes Dev **18**(22): 2730-2735.

Duenas, Z., Rivera, J. C., Quiroz-Mercado, H., Aranda, J., Macotela, Y., Montes de Oca, P., Lopez-Barrera, F., Nava, G., Guerrero, J. L., Suarez, A., De Regil, M., Martinez de la Escalera, G. and Clapp, C. (2004). "Prolactin in eyes of patients with retinopathy of prematurity: implications for vascular regression." Invest Ophthalmol Vis Sci **45**(7): 2049-2055.

Duenas, Z., Torner, L., Corbacho, A. M., Ochoa, A., Gutierrez-Ospina, G., Lopez-Barrera, F., Barrios, F. A., Berger, P., Martinez de la Escalera, G. and Clapp, C. (1999). "Inhibition of rat corneal angiogenesis by 16-kDa prolactin and by endogenous prolactin-like molecules." Invest Ophthalmol Vis Sci **40**(11): 2498-2505.

Ebert, M. S. and Sharp, P. A. (2010). "MicroRNA sponges: progress and possibilities." RNA **16**(11): 2043-2050.

- Eliceiri, B. P., Paul, R., Schwartzberg, P. L., Hood, J. D., Leng, J. and Cheresch, D. A. (1999). "Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability." Mol Cell **4**(6): 915-924.
- Elkayam, U., Akhter, M. W., Singh, H., Khan, S., Bitar, F., Hameed, A. and Shotan, A. (2005). "Pregnancy-associated cardiomyopathy: clinical characteristics and a comparison between early and late presentation." Circulation **111**(16): 2050-2055.
- Ellis, J. E., Ansari, A. A., Fett, J. D., Carraway, R. D., Randall, H. W., Mosunjac, M. I. and Sundstrom, J. B. (2005). "Inhibition of progenitor dendritic cell maturation by plasma from patients with peripartum cardiomyopathy: role in pregnancy-associated heart disease." Clin Dev Immunol **12**(4): 265-273.
- Erdmann, S., Ricken, A., Merkwitz, C., Struman, I., Castino, R., Hummitzsch, K., Gaunitz, F., Isidoro, C., Martial, J. and Spaniel-Borowski, K. (2007). "The expression of prolactin and its cathepsin D-mediated cleavage in the bovine corpus luteum vary with the estrous cycle." Am J Physiol Endocrinol Metab **293**(5): E1365-1377.
- Eulalio, A., Behm-Ansmant, I., Schweizer, D. and Izaurralde, E. (2007). "P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing." Mol Cell Biol **27**(11): 3970-3981.
- Eulalio, A., Huntzinger, E. and Izaurralde, E. (2008). "GW182 interaction with Argonaute is essential for miRNA-mediated translational repression and mRNA decay." Nat Struct Mol Biol **15**(4): 346-353.
- Fasanaro, P., D'Alessandra, Y., Di Stefano, V., Melchionna, R., Romani, S., Pompilio, G., Capogrossi, M. C. and Martelli, F. (2008). "MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3." J Biol Chem **283**(23): 15878-15883.
- Feng, D., Zhao, W. L., Ye, Y. Y., Bai, X. C., Liu, R. Q., Chang, L. F., Zhou, Q. and Sui, S. F. (2010). "Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis." Traffic **11**(5): 675-687.
- Ferrara, N., Clapp, C. and Weiner, R. (1991). "The 16K fragment of prolactin specifically inhibits basal or fibroblast growth factor stimulated growth of capillary endothelial cells." Endocrinology **129**(2): 896-900.
- Ferrero, E., Villa, A., Ferrero, M. E., Toninelli, E., Bender, J. R., Pardi, R. and Zocchi, M. R. (1996). "Tumor necrosis factor alpha-induced vascular leakage involves PECAM1 phosphorylation." Cancer Res **56**(14): 3211-3215.
- Fett, J. D. (2007). "Viral infection as a possible trigger for the development of peripartum cardiomyopathy." Int J Gynaecol Obstet **97**(2): 149-150.

Fett, J. D., Ansari, A. A., Sundstrom, J. B. and Combs, G. F. (2002). "Peripartum cardiomyopathy: a selenium disconnection and an autoimmune connection." Int J Cardiol **86**(2-3): 311-316.

Fett, J. D., Christie, L. G., Carraway, R. D. and Murphy, J. G. (2005). "Five-year prospective study of the incidence and prognosis of peripartum cardiomyopathy at a single institution." Mayo Clin Proc **80**(12): 1602-1606.

Fichtlscherer, S., De Rosa, S., Fox, H., Schwietz, T., Fischer, A., Liebetrau, C., Weber, M., Hamm, C. W., Roxel, T., Muller-Ardogan, M., Bonauer, A., Zeiher, A. M. and Dimmeler, S. (2010). "Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease." Circ Res **107**(5): 677-684.

Fiedler, J., Jazbutyte, V., Kirchmaier, B. C., Gupta, S. K., Lorenzen, J., Hartmann, D., Galuppo, P., Kneitz, S., Pena, J. T., Sohn-Lee, C., Loyer, X., Soutschek, J., Brand, T., Tuschl, T., Heineke, J., Martin, U., Schulte-Merker, S., Ertl, G., Engelhardt, S., Bauersachs, J. and Thum, T. (2011). "MicroRNA-24 regulates vascularity after myocardial infarction." Circulation **124**(6): 720-730.

Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N. and Sonenberg, N. (2008). "Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?" Nat Rev Genet **9**(2): 102-114.

Fish, J. E., Santoro, M. M., Morton, S. U., Yu, S., Yeh, R. F., Wythe, J. D., Ivey, K. N., Bruneau, B. G., Stainier, D. Y. and Srivastava, D. (2008). "miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity." Dev Cell **15**(2): 272-284.

Forster, O., Ansari, A. A. and Sliwa, K. (2006). "Current issues in the diagnosis and management of peripartum cardiomyopathy." Womens Health (Lond Engl) **2**(4): 587-596.

Forster, O., Hilfiker-Kleiner, D., Ansari, A. A., Sundstrom, J. B., Libhaber, E., Tshani, W., Becker, A., Yip, A., Klein, G. and Sliwa, K. (2008). "Reversal of IFN-gamma, oxLDL and prolactin serum levels correlate with clinical improvement in patients with peripartum cardiomyopathy." Eur J Heart Fail **10**(9): 861-868.

Freeman, M. E., Kanyicska, B., Lerant, A. and Nagy, G. (2000). "Prolactin: structure, function, and regulation of secretion." Physiol Rev **80**(4): 1523-1631.

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

Gaengel, K., Genove, G., Armulik, A. and Betsholtz, C. (2009). "Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **29**(5): 630-638.

Gatto, G., Rossi, A., Rossi, D., Kroening, S., Bonatti, S. and Mallardo, M. (2008). "Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 trans-activates miR-155 transcription through the NF-kappaB pathway." Nucleic Acids Res **36**(20): 6608-6619.

Geisler, A., Jungmann, A., Kurreck, J., Poller, W., Katus, H. A., Vetter, R., Fechner, H. and Muller, O. J. (2011). "microRNA122-regulated transgene expression increases specificity of cardiac gene transfer upon intravenous delivery of AAV9 vectors." Gene Ther **18**(2): 199-209.

George, E. M., Palei, A. C. and Granger, J. P. (2012). "Endothelin as a final common pathway in the pathophysiology of preeclampsia: therapeutic implications." Curr Opin Nephrol Hypertens **21**(2): 157-162.

Gevaert, S., Van Belleghem, Y., Bouchez, S., Herck, I., De Somer, F., De Block, Y., Tromp, F., Vandecasteele, E., Martens, F. and De Pauw, M. (2011). "Acute and critically ill peripartum cardiomyopathy and 'bridge to' therapeutic options: a single center experience with intra-aortic balloon pump, extra corporeal membrane oxygenation and continuous-flow left ventricular assist devices." Crit Care **15**(2): R93.

Ghani, S., Riemke, P., Schonheit, J., Lenze, D., Stumm, J., Hoogenkamp, M., Lagendijk, A., Heinz, S., Bonifer, C., Bakkers, J., Abdelilah-Seyfried, S., Hummel, M. and Rosenbauer, F. (2011). "Macrophage development from HSCs requires PU.1-coordinated microRNA expression." Blood **118**(8): 2275-2284.

Goffin, V., Bernichtein, S., Touraine, P. and Kelly, P. A. (2005). "Development and potential clinical uses of human prolactin receptor antagonists." Endocr Rev **26**(3): 400-422.

Goffin, V., Binart, N., Touraine, P. and Kelly, P. A. (2002). "Prolactin: the new biology of an old hormone." Annu Rev Physiol **64**: 47-67.

Gonzalez, C., Corbacho, A. M., Eiserich, J. P., Garcia, C., Lopez-Barrera, F., Morales-Tlalpan, V., Barajas-Espinosa, A., Diaz-Munoz, M., Rubio, R., Lin, S. H., Martinez de la Escalera, G. and Clapp, C. (2004). "16K-prolactin inhibits activation of endothelial nitric oxide synthase, intracellular calcium mobilization, and endothelium-dependent vasorelaxation." Endocrinology **145**(12): 5714-5722.

Gonzalez, C., Parra, A., Ramirez-Peredo, J., Garcia, C., Rivera, J. C., Macotela, Y., Aranda, J., Lemini, M., Arias, J., Ibarguengoitia, F., de la Escalera, G. M. and Clapp, C. (2007). "Elevated vasoinhibins may contribute to endothelial cell dysfunction and low birth weight in preeclampsia." Lab Invest **87**(10): 1009-1017.

Goumans, M. J., Valdimarsdottir, G., Itoh, S., Rosendahl, A., Sideras, P. and ten Dijke, P. (2002). "Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors." EMBO J **21**(7): 1743-1753.

Grundmann, S., Hans, F. P., Kinniry, S., Heinke, J., Helbing, T., Bluhm, F., Sluijter, J. P., Hofer, I., Pasterkamp, G., Bode, C. and Moser, M. (2011). "MicroRNA-100 regulates

neovascularization by suppression of mammalian target of rapamycin in endothelial and vascular smooth muscle cells." Circulation **123**(9): 999-1009.

Guo, M., Mao, X., Ji, Q., Lang, M., Li, S., Peng, Y., Zhou, W., Xiong, B. and Zeng, Q. (2010). "miR-146a in PBMCs modulates Th1 function in patients with acute coronary syndrome." Immunol Cell Biol **88**(5): 555-564.

Haghikia, A., Missol-Kolka, E., Tsikas, D., Venturini, L., Brundiers, S., Castoldi, M., Muckenthaler, M. U., Eder, M., Stapel, B., Thum, T., Petrasch-Parwez, E., Drexler, H., Hilfiker-Kleiner, D. and Scherr, M. (2011). "Signal transducer and activator of transcription 3-mediated regulation of miR-199a-5p links cardiomyocyte and endothelial cell function in the heart: a key role for ubiquitin-conjugating enzymes." Eur Heart J **32**(10): 1287-1297.

Hajitou, A., Trepel, M., Lilley, C. E., Soghomonyan, S., Alauddin, M. M., Marini, F. C., 3rd, Restel, B. H., Ozawa, M. G., Moya, C. A., Rangel, R., Sun, Y., Zaoui, K., Schmidt, M., von Kalle, C., Weitzman, M. D., Gelovani, J. G., Pasqualini, R. and Arap, W. (2006). "A hybrid vector for ligand-directed tumor targeting and molecular imaging." Cell **125**(2): 385-398.

Hanahan, D. and Folkman, J. (1996). "Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis." Cell **86**(3): 353-364.

Harris, T. A., Yamakuchi, M., Ferlito, M., Mendell, J. T. and Lowenstein, C. J. (2008). "MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(5): 1516-1521.

Harrison, R. G. (1979). "Suppression of lactation." Semin Perinatol **3**(3): 287-297.

Hayakawa, Y., Chandra, M., Miao, W., Shirani, J., Brown, J. H., Dorn, G. W., 2nd, Armstrong, R. C. and Kitsis, R. N. (2003). "Inhibition of cardiac myocyte apoptosis improves cardiac function and abolishes mortality in the peripartum cardiomyopathy of Galpha(q) transgenic mice." Circulation **108**(24): 3036-3041.

He, Y., Huang, C., Sun, X., Long, X. R., Lv, X. W. and Li, J. (2012). "MicroRNA-146a modulates TGF-beta1-induced hepatic stellate cell proliferation by targeting SMAD4." Cell Signal **24**(10): 1923-1930.

Hergenreider, E., Heydt, S., Treguer, K., Boettger, T., Horrevoets, A. J., Zeiher, A. M., Scheffer, M. P., Frangakis, A. S., Yin, X., Mayr, M., Braun, T., Urbich, C., Boon, R. A. and Dimmeler, S. (2012). "Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs." Nat Cell Biol **14**(3): 249-256.

Hilfiker-Kleiner, D., Hilfiker, A. and Drexler, H. (2005). "Many good reasons to have STAT3 in the heart." Pharmacol Ther **107**(1): 131-137.

Hilfiker-Kleiner, D., Hilfiker, A., Fuchs, M., Kaminski, K., Schaefer, A., Schieffer, B., Hillmer, A., Schmiedl, A., Ding, Z., Podewski, E., Poli, V., Schneider, M. D., Schulz, R., Park, J. K., Wollert, K. C. and Drexler, H. (2004). "Signal transducer and activator of

transcription 3 is required for myocardial capillary growth, control of interstitial matrix deposition, and heart protection from ischemic injury." Circ Res **95**(2): 187-195.

Hilfiker-Kleiner, D., Kaminski, K., Podewski, E., Bonda, T., Schaefer, A., Sliwa, K., Forster, O., Quint, A., Landmesser, U., Doerries, C., Luchtefeld, M., Poli, V., Schneider, M. D., Balligand, J. L., Desjardins, F., Ansari, A., Struman, I., Nguyen, N. Q., Zschemisch, N. H., Klein, G., Heusch, G., Schulz, R., Hilfiker, A. and Drexler, H. (2007). "A cathepsin D-cleaved 16 kDa form of prolactin mediates postpartum cardiomyopathy." Cell **128**(3): 589-600.

Hilfiker-Kleiner, D., Meyer, G. P., Schieffer, E., Goldmann, B., Podewski, E., Struman, I., Fischer, P. and Drexler, H. (2007). "Recovery from postpartum cardiomyopathy in 2 patients by blocking prolactin release with bromocriptine." J Am Coll Cardiol **50**(24): 2354-2355.

Hilfiker-Kleiner, D., Schieffer, E., Meyer, G. P., Podewski, E. and Drexler, H. (2008). "Postpartum cardiomyopathy: a cardiac emergency for gynecologists, general practitioners, internists, pulmonologists, and cardiologists." Dtsch Arztebl Int **105**(44): 751-756.

Hilfiker-Kleiner, D., Struman, I., Hoch, M., Podewski, E. and Sliwa, K. (2012). "16-kDa Prolactin and Bromocriptine in Postpartum Cardiomyopathy." Curr Heart Fail Rep **9**(3): 174-182.

Holt, R. I., Barnett, A. H. and Bailey, C. J. (2010). "Bromocriptine: old drug, new formulation and new indication." Diabetes Obes Metab **12**(12): 1048-1057.

Hood, J. L., San, R. S. and Wickline, S. A. (2011). "Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis." Cancer Res **71**(11): 3792-3801.

Hopp, L., Haider, B. and Iffy, L. (1996). "Myocardial infarction postpartum in patients taking bromocriptine for the prevention of breast engorgement." Int J Cardiol **57**(3): 227-232.

Horie, T., Ono, K., Nishi, H., Nagao, K., Kinoshita, M., Watanabe, S., Kuwabara, Y., Nakashima, Y., Takanabe-Mori, R., Nishi, E., Hasegawa, K., Kita, T. and Kimura, T. (2010). "Acute doxorubicin cardiotoxicity is associated with miR-146a-induced inhibition of the neuregulin-ErbB pathway." Cardiovasc Res **87**(4): 656-664.

Horne, B. D., Rasmusson, K. D., Alharethi, R., Budge, D., Brunisholz, K. D., Metz, T., Carlquist, J. F., Connolly, J. J., Porter, T. F., Lappe, D. L., Muhlestein, J. B., Silver, R., Stehlik, J., Park, J. J., May, H. T., Bair, T. L., Anderson, J. L., Renlund, D. G. and Kfoury, A. G. (2011). "Genome-wide significance and replication of the chromosome 12p11.22 locus near the PTHLH gene for peripartum cardiomyopathy." Circ Cardiovasc Genet **4**(4): 359-366.

Horwich, M. D. and Zamore, P. D. (2008). "Design and delivery of antisense oligonucleotides to block microRNA function in cultured Drosophila and human cells." Nat Protoc **3**(10): 1537-1549.



Hou, J., Wang, P., Lin, L., Liu, X., Ma, F., An, H., Wang, Z. and Cao, X. (2009). "MicroRNA-146a feedback inhibits RIG-I-dependent Type I IFN production in macrophages by targeting TRAF6, IRAK1, and IRAK2." J Immunol **183**(3): 2150-2158.

Hou, Z., Yin, H., Chen, C., Dai, X., Li, X., Liu, B. and Fang, X. (2012). "microRNA-146a targets the L1 cell adhesion molecule and suppresses the metastatic potential of gastric cancer." Mol Med Report **6**(3): 501-506.

Hsieh, C. H., Rau, C. S., Jeng, S. F., Lin, C. J., Chen, Y. C., Wu, C. J., Lu, T. H., Lu, C. H. and Chang, W. N. (2010). "Identification of the potential target genes of microRNA-146a induced by PMA treatment in human microvascular endothelial cells." Exp Cell Res **316**(7): 1119-1126.

Huffman, M. D. and Bhatnagar, D. (2011). "Novel Treatments for Cardiovascular Disease Prevention." Cardiovasc Ther.

Hunter, M. P., Ismail, N., Zhang, X., Aguda, B. D., Lee, E. J., Yu, L., Xiao, T., Schafer, J., Lee, M. L., Schmittgen, T. D., Nana-Sinkam, S. P., Jarjoura, D. and Marsh, C. B. (2008). "Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles." PLoS One **3**(11): e3694.

Hurst, D. R., Edmonds, M. D., Scott, G. K., Benz, C. C., Vaidya, K. S. and Welch, D. R. (2009). "Breast cancer metastasis suppressor 1 up-regulates miR-146, which suppresses breast cancer metastasis." Cancer Res **69**(4): 1279-1283.

Hwang, S. J., Seol, H. J., Park, Y. M., Kim, K. H., Gorospe, M., Nam, D. H. and Kim, H. H. (2012). "MicroRNA-146a suppresses metastatic activity in brain metastasis." Mol Cells **34**(3): 329-334.

Inui, M., Martello, G. and Piccolo, S. (2010). "MicroRNA control of signal transduction." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(4): 252-263.

Iwai, N. and Naraba, H. (2005). "Polymorphisms in human pre-miRNAs." Biochem Biophys Res Commun **331**(4): 1439-1444.

Iwamoto, R., Yamazaki, S., Asakura, M., Takashima, S., Hasuwa, H., Miyado, K., Adachi, S., Kitakaze, M., Hashimoto, K., Raab, G., Nanba, D., Higashiyama, S., Hori, M., Klagsbrun, M. and Mekada, E. (2003). "Heparin-binding EGF-like growth factor and ErbB signaling is essential for heart function." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(6): 3221-3226.

Jacoby, J. J., Kalinowski, A., Liu, M. G., Zhang, S. S., Gao, Q., Chai, G. X., Ji, L., Iwamoto, Y., Li, E., Schneider, M., Russell, K. S. and Fu, X. Y. (2003). "Cardiomyocyte-restricted knockout of STAT3 results in higher sensitivity to inflammation, cardiac fibrosis, and heart failure with advanced age." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(22): 12929-12934.

Jaffe, E. A., Nachman, R. L., Becker, C. G. and Minick, C. R. (1973). "Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria." J Clin Invest **52**(11): 2745-2756.

Jazdzewski, K., Murray, E. L., Franssila, K., Jarzab, B., Schoenberg, D. R. and de la Chapelle, A. (2008). "Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(20): 7269-7274.

Jefferies, J. L. and Towbin, J. A. (2010). "Dilated cardiomyopathy." Lancet **375**(9716): 752-762.

Jimenez-Morales, S., Gamboa-Becerra, R., Baca, V., Del Rio-Navarro, B. E., Lopez-Ley, D. Y., Velazquez-Cruz, R., Saldana-Alvarez, Y., Salas-Martinez, G. and Orozco, L. (2012). "MiR-146a polymorphism is associated with asthma but not with systemic lupus erythematosus and juvenile rheumatoid arthritis in Mexican patients." Tissue Antigens **9999**(9999).

Johnstone, R. M., Adam, M., Hammond, J. R., Orr, L. and Turbide, C. (1987). "Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes)." J Biol Chem **262**(19): 9412-9420.

Kelly, M. A., Rubinstein, M., Asa, S. L., Zhang, G., Saez, C., Bunzow, J. R., Allen, R. G., Hnasko, R., Ben-Jonathan, N., Grandy, D. K. and Low, M. J. (1997). "Pituitary lactotroph hyperplasia and chronic hyperprolactinemia in dopamine D2 receptor-deficient mice." Neuron **19**(1): 103-113.

Khurana, S., Liby, K., Buckley, A. R. and Ben-Jonathan, N. (1999). "Proteolysis of human prolactin: resistance to cathepsin D and formation of a nonangiostatic, C-terminal 16K fragment by thrombin." Endocrinology **140**(9): 4127-4132.

Kim, J., Luo, W., Chen, D. T., Earley, K., Tunstead, J., Yu-Lee, L. Y. and Lin, S. H. (2003). "Antitumor activity of the 16-kDa prolactin fragment in prostate cancer." Cancer Res **63**(2): 386-393.

Kim, V. N., Han, J. and Siomi, M. C. (2009). "Biogenesis of small RNAs in animals." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(2): 126-139.

Kinet, V., Nguyen, N. Q., Sabatel, C., Blacher, S., Noel, A., Martial, J. A. and Struman, I. (2009). "Antiangiogenic liposomal gene therapy with 16K human prolactin efficiently reduces tumor growth." Cancer Lett **284**(2): 222-228.

Kiriakidou, M., Tan, G. S., Lamprinaki, S., De Planell-Saguer, M., Nelson, P. T. and Mourelatos, Z. (2007). "An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation." Cell **129**(6): 1141-1151.

Kochenour, N. K. (1980). "Lactation suppression." Clin Obstet Gynecol **23**(4): 1045-1059.

- Kogo, R., Mimori, K., Tanaka, F., Komune, S. and Mori, M. (2011). "Clinical significance of miR-146a in gastric cancer cases." Clin Cancer Res **17**(13): 4277-4284.
- Kogure, T., Lin, W. L., Yan, I. K., Braconi, C. and Patel, T. (2011). "Intercellular nanovesicle-mediated microRNA transfer: a mechanism of environmental modulation of hepatocellular cancer cell growth." Hepatology **54**(4): 1237-1248.
- Kong, L., Zhu, J., Han, W., Jiang, X., Xu, M., Zhao, Y., Dong, Q., Pang, Z., Guan, Q., Gao, L., Zhao, J. and Zhao, L. (2011). "Significance of serum microRNAs in pre-diabetes and newly diagnosed type 2 diabetes: a clinical study." Acta Diabetol **48**(1): 61-69.
- Kosaka, N., Iguchi, H., Yoshioka, Y., Takeshita, F., Matsuki, Y. and Ochiya, T. (2010). "Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells." J Biol Chem **285**(23): 17442-17452.
- Kosaka, N., Izumi, H., Sekine, K. and Ochiya, T. (2010). "microRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk." Silence **1**(1): 7.
- Kroh, E. M., Parkin, R. K., Mitchell, P. S. and Tewari, M. (2010). "Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR)." Methods **50**(4): 298-301.
- Krutzfeldt, J., Rajewsky, N., Braich, R., Rajeev, K. G., Tuschl, T., Manoharan, M. and Stoffel, M. (2005). "Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'." Nature **438**(7068): 685-689.
- Kuang, W., Tan, J., Duan, Y., Duan, J., Wang, W., Jin, F., Jin, Z., Yuan, X. and Liu, Y. (2009). "Cyclic stretch induced miR-146a upregulation delays C2C12 myogenic differentiation through inhibition of Numb." Biochem Biophys Res Commun **378**(2): 259-263.
- Kuehbachner, A., Urbich, C., Zeiher, A. M. and Dimmeler, S. (2007). "Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis." Circ Res **101**(1): 59-68.
- Kume, T. (2009). "Novel insights into the differential functions of Notch ligands in vascular formation." J Angiogenesis Res **1**: 8.
- Labbaye, C., Spinello, I., Quaranta, M. T., Pelosi, E., Pasquini, L., Petrucci, E., Biffoni, M., Nuzzolo, E. R., Billi, M., Foa, R., Brunetti, E., Grignani, F., Testa, U. and Peschle, C. (2008). "A three-step pathway comprising PLZF/miR-146a/CXCR4 controls megakaryopoiesis." Nat Cell Biol **10**(7): 788-801.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W. and Tuschl, T. (2002). "Identification of tissue-specific microRNAs from mouse." Curr Biol **12**(9): 735-739.
- Lakkaraju, A. and Rodriguez-Boulán, E. (2008). "Itinerant exosomes: emerging roles in cell and tissue polarity." Trends Cell Biol **18**(5): 199-209.

Lambert, V., Munaut, C., Noel, A., Frankenne, F., Bajou, K., Gerard, R., Carmeliet, P., Defresne, M. P., Foidart, J. M. and Rakic, J. M. (2001). "Influence of plasminogen activator inhibitor type 1 on choroidal neovascularization." FASEB J **15**(6): 1021-1027.

Lamparter, S., Pankuweit, S. and Maisch, B. (2007). "Clinical and immunologic characteristics in peripartum cardiomyopathy." Int J Cardiol **118**(1): 14-20.

Lanford, R. E., Hildebrandt-Eriksen, E. S., Petri, A., Persson, R., Lindow, M., Munk, M. E., Kauppinen, S. and Orum, H. (2010). "Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection." Science **327**(5962): 198-201.

Laulagnier, K., Motta, C., Hamdi, S., Roy, S., Fauvelle, F., Pageaux, J. F., Kobayashi, T., Salles, J. P., Perret, B., Bonnerot, C. and Record, M. (2004). "Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization." Biochem J **380**(Pt 1): 161-171.

Lazar, L., Nagy, B., Molvarec, A., Szarka, A. and Rigo, J., Jr. (2012). "Role of hsa-miR-325 in the etiopathology of preeclampsia." Mol Med Report **6**(3): 597-600.

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

Lee, S. H., Kunz, J., Lin, S. H. and Yu-Lee, L. Y. (2007). "16-kDa prolactin inhibits endothelial cell migration by down-regulating the Ras-Tiam1-Rac1-Pak1 signaling pathway." Cancer Res **67**(22): 11045-11053.

Lee, S. H., Nishino, M., Mazumdar, T., Garcia, G. E., Galfione, M., Lee, F. L., Lee, C. L., Liang, A., Kim, J., Feng, L., Eissa, N. T., Lin, S. H. and Yu-Lee, L. Y. (2005). "16-kDa prolactin down-regulates inducible nitric oxide synthase expression through inhibition of the signal transducer and activator of transcription 1/IFN regulatory factor-1 pathway." Cancer Res **65**(17): 7984-7992.

Lemmens, K., Doggen, K. and De Keulenaer, G. W. (2011). "Activation of the neuregulin/ErbB system during physiological ventricular remodeling in pregnancy." Am J Physiol Heart Circ Physiol **300**(3): H931-942.

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

Li, J., Huang, J., Dai, L., Yu, D., Chen, Q., Zhang, X. and Dai, K. (2012). "miR-146a, an IL-1 $\beta$  responsive miRNA, induces vascular endothelial growth factor and chondrocyte apoptosis by targeting Smad4." Arthritis Res Ther **14**(2): R75.

Li, J., Umar, S., Amjadi, M., Iorga, A., Sharma, S., Nadadur, R. D., Regitz-Zagrosek, V. and Eghbali, M. (2012). "New frontiers in heart hypertrophy during pregnancy." Am J Cardiovasc Dis **2**(3): 192-207.

Li, Y. X., Liu, D. Q., Zheng, C., Zheng, S. Q., Liu, M., Li, X. and Tang, H. (2011). "miR-200a modulate HUVECs viability and migration." IUBMB Life **63**(7): 553-559.

Lian, H., Wang, L. and Zhang, J. (2012). "Increased risk of breast cancer associated with CC genotype of Has-miR-146a Rs2910164 polymorphism in Europeans." PLoS One **7**(2): e31615.

Lin, S. L., Chiang, A., Chang, D. and Ying, S. Y. (2008). "Loss of mir-146a function in hormone-refractory prostate cancer." RNA **14**(3): 417-424.

Lindblom, P., Gerhardt, H., Liebner, S., Abramsson, A., Enge, M., Hellstrom, M., Backstrom, G., Fredriksson, S., Landegren, U., Nystrom, H. C., Bergstrom, G., Dejana, E., Ostman, A., Lindahl, P. and Betsholtz, C. (2003). "Endothelial PDGF-B retention is required for proper investment of pericytes in the microvessel wall." Genes Dev **17**(15): 1835-1840.

Liu, X., Nelson, A., Wang, X., Kanaji, N., Kim, M., Sato, T., Nakanishi, M., Li, Y., Sun, J., Michalski, J., Patil, A., Basma, H. and Rennard, S. I. (2009). "MicroRNA-146a modulates human bronchial epithelial cell survival in response to the cytokine-induced apoptosis." Biochem Biophys Res Commun **380**(1): 177-182.

Lkhider, M., Castino, R., Bouguyon, E., Isidoro, C. and Ollivier-Bousquet, M. (2004). "Cathepsin D released by lactating rat mammary epithelial cells is involved in prolactin cleavage under physiological conditions." J Cell Sci **117**(Pt 21): 5155-5164.

Loftus, S. K., Larson, D. M., Watkins-Chow, D., Church, D. M. and Pavan, W. J. (2001). "Generation of RCAS vectors useful for functional genomic analyses." DNA Res **8**(5): 221-226.

Logozzi, M., De Mito, A., Lugini, L., Borghi, M., Calabro, L., Spada, M., Perdicchio, M., Marino, M. L., Federici, C., Iessi, E., Brambilla, D., Venturi, G., Lozupone, F., Santinami, M., Huber, V., Maio, M., Rivoltini, L. and Fais, S. (2009). "High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients." PLoS One **4**(4): e5219.

Lu, L. F., Boldin, M. P., Chaudhry, A., Lin, L. L., Taganov, K. D., Hanada, T., Yoshimura, A., Baltimore, D. and Rudensky, A. Y. (2010). "Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses." Cell **142**(6): 914-929.

Lukiw, W. J. (2008). "Emerging amyloid beta (Ab) peptide modulators for the treatment of Alzheimer's disease (AD)." Expert Opin Emerg Drugs **13**(2): 255-271.

Luo, X., Yang, W., Ye, D. Q., Cui, H., Zhang, Y., Hirankarn, N., Qian, X., Tang, Y., Lau, Y. L., de Vries, N., Tak, P. P., Tsao, B. P. and Shen, N. (2011). "A functional variant in microRNA-146a promoter modulates its expression and confers disease risk for systemic lupus erythematosus." PLoS Genet **7**(6): e1002128.

Macotella, Y., Aguilar, M. B., Guzman-Morales, J., Rivera, J. C., Zermeno, C., Lopez-Barrera, F., Nava, G., Lavalle, C., Martinez de la Escalera, G. and Clapp, C. (2006). "Matrix

metalloproteases from chondrocytes generate an antiangiogenic 16 kDa prolactin." J Cell Sci **119**(Pt 9): 1790-1800.

Macotela, Y., Mendoza, C., Corbacho, A. M., Cosio, G., Eiserich, J. P., Zentella, A., Martinez de la Escalera, G. and Clapp, C. (2002). "16K prolactin induces NF-kappaB activation in pulmonary fibroblasts." J Endocrinol **175**(3): R13-18.

Maron, B. J. (2002). "Hypertrophic cardiomyopathy: a systematic review." JAMA **287**(10): 1308-1320.

Martini, J. F., Piot, C., Humeau, L. M., Struman, I., Martial, J. A. and Weiner, R. I. (2000). "The antiangiogenic factor 16K PRL induces programmed cell death in endothelial cells by caspase activation." Mol Endocrinol **14**(10): 1536-1549.

Massad, L. S., Reiss, C. K., Mutch, D. G. and Haskel, E. J. (1993). "Familial peripartum cardiomyopathy after molar pregnancy." Obstet Gynecol **81**(5 ( Pt 2)): 886-888.

Masson, V. V., Devy, L., Grignet-Debrus, C., Bernt, S., Bajou, K., Blacher, S., Roland, G., Chang, Y., Fong, T., Carmeliet, P., Foidart, J. M. and Noel, A. (2002). "Mouse Aortic Ring Assay: A New Approach of the Molecular Genetics of Angiogenesis." Biol Proced Online **4**: 24-31.

Mathivanan, S., Fahner, C. J., Reid, G. E. and Simpson, R. J. (2012). "ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids." Nucleic Acids Res **40**(Database issue): D1241-1244.

Mathivanan, S., Ji, H. and Simpson, R. J. (2010). "Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication." J Proteomics **73**(10): 1907-1920.

Maynard, S. E. and Karumanchi, S. A. (2011). "Angiogenic factors and preeclampsia." Semin Nephrol **31**(1): 33-46.

Maynard, S. E., Min, J. Y., Merchan, J., Lim, K. H., Li, J., Mondal, S., Libermann, T. A., Morgan, J. P., Sellke, F. W., Stillman, I. E., Epstein, F. H., Sukhatme, V. P. and Karumanchi, S. A. (2003). "Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia." J Clin Invest **111**(5): 649-658.

Mayoral, R. J., Pipkin, M. E., Pachkov, M., van Nimwegen, E., Rao, A. and Monticelli, S. (2009). "MicroRNA-221-222 regulate the cell cycle in mast cells." J Immunol **182**(1): 433-445.

Mei, J., Bachoo, R. and Zhang, C. L. (2011). "MicroRNA-146a inhibits glioma development by targeting Notch1." Mol Cell Biol **31**(17): 3584-3592.

Melo, A. I., Perez-Ledezma, M., Clapp, C., Arnold, E., Rivera, J. C. and Fleming, A. S. (2009). "Effects of prolactin deficiency during the early postnatal period on the development

of maternal behavior in female rats: mother's milk makes the difference." Horm Behav **56**(3): 281-291.

Meyer, G. P., Labidi, S., Podewski, E., Sliwa, K., Drexler, H. and Hilfiker-Kleiner, D. (2010). "Bromocriptine treatment associated with recovery from peripartum cardiomyopathy in siblings: two case reports." J Med Case Rep **4**: 80.

Milkiewicz, M., Ispanovic, E., Doyle, J. L. and Haas, T. L. (2006). "Regulators of angiogenesis and strategies for their therapeutic manipulation." Int J Biochem Cell Biol **38**(3): 333-357.

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

Mittelbrunn, M., Gutierrez-Vazquez, C., Villarroya-Beltri, C., Gonzalez, S., Sanchez-Cabo, F., Gonzalez, M. A., Bernad, A. and Sanchez-Madrid, F. (2011). "Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells." Nat Commun **2**: 282.

Montgomery, R. L., Hullinger, T. G., Semus, H. M., Dickinson, B. A., Seto, A. G., Lynch, J. M., Stack, C., Latimer, P. A., Olson, E. N. and van Rooij, E. (2011). "Therapeutic inhibition of miR-208a improves cardiac function and survival during heart failure." Circulation **124**(14): 1537-1547.

Mookadam, F., Jiamsripong, P., Raslan, S. F., Panse, P. M. and Tajik, A. J. (2011). "Constrictive pericarditis and restrictive cardiomyopathy in the modern era." Future Cardiol **7**(4): 471-483.

Morales, A., Painter, T., Li, R., Siegfried, J. D., Li, D., Norton, N. and Hershberger, R. E. (2010). "Rare variant mutations in pregnancy-associated or peripartum cardiomyopathy." Circulation **121**(20): 2176-2182.

Moretti, F., Thermann, R. and Hentze, M. W. (2010). "Mechanism of translational regulation by miR-2 from sites in the 5' untranslated region or the open reading frame." RNA **16**(12): 2493-2502.

Muramatsu, F., Kidoya, H., Naito, H., Sakimoto, S. and Takakura, N. (2012). "microRNA-125b inhibits tube formation of blood vessels through translational suppression of VE-cadherin." Oncogene.

Nagafuchi, H., Suzuki, N., Kaneko, A., Asai, T. and Sakane, T. (1999). "Prolactin locally produced by synovium infiltrating T lymphocytes induces excessive synovial cell functions in patients with rheumatoid arthritis." J Rheumatol **26**(9): 1890-1900.

Nahid, M. A., Pauley, K. M., Satoh, M. and Chan, E. K. (2009). "miR-146a is critical for endotoxin-induced tolerance: IMPLICATION IN INNATE IMMUNITY." J Biol Chem **284**(50): 34590-34599.

Nazari-Jahantigh, M., Wei, Y. and Schober, A. (2012). "The role of microRNAs in arterial remodelling." Thromb Haemost **107**(4): 611-618.

Negoro, S., Kunisada, K., Fujio, Y., Funamoto, M., Darville, M. I., Eizirik, D. L., Osugi, T., Izumi, M., Oshima, Y., Nakaoka, Y., Hirota, H., Kishimoto, T. and Yamauchi-Takahara, K. (2001). "Activation of signal transducer and activator of transcription 3 protects cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress through the upregulation of manganese superoxide dismutase." Circulation **104**(9): 979-981.

Neumann, I. D. (2009). "The advantage of social living: brain neuropeptides mediate the beneficial consequences of sex and motherhood." Front Neuroendocrinol **30**(4): 483-496.

Nguyen, N. Q., Castermans, K., Berndt, S., Herkenne, S., Tabruyn, S. P., Blacher, S., Lion, M., Noel, A., Martial, J. A. and Struman, I. (2011). "The antiangiogenic 16K prolactin impairs functional tumor neovascularization by inhibiting vessel maturation." PLoS One **6**(11): e27318.

Nguyen, N. Q., Cornet, A., Blacher, S., Tabruyn, S. P., Foidart, J. M., Noel, A., Martial, J. A. and Struman, I. (2007). "Inhibition of tumor growth and metastasis establishment by adenovirus-mediated gene transfer delivery of the antiangiogenic factor 16K hPRL." Mol Ther **15**(12): 2094-2100.

Nguyen, N. Q., Tabruyn, S. P., Lins, L., Lion, M., Cornet, A. M., Lair, F., Rentier-Delrue, F., Brasseur, R., Martial, J. A. and Struman, I. (2006). "Prolactin/growth hormone-derived antiangiogenic peptides highlight a potential role of tilted peptides in angiogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(39): 14319-14324.

Noel, A., Jost, M., Lambert, V., Lecomte, J. and Rakic, J. M. (2007). "Anti-angiogenic therapy of exudative age-related macular degeneration: current progress and emerging concepts." Trends Mol Med **13**(8): 345-352.

Ntusi, N. B. and Mayosi, B. M. (2009). "Epidemiology of heart failure in sub-Saharan Africa." Expert Rev Cardiovasc Ther **7**(2): 169-180.

Nyberg, P., Xie, L. and Kalluri, R. (2005). "Endogenous inhibitors of angiogenesis." Cancer Res **65**(10): 3967-3979.

Ohtsubo, M., Theodoras, A. M., Schumacher, J., Roberts, J. M. and Pagano, M. (1995). "Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition." Mol Cell Biol **15**(5): 2612-2624.

Olivieri, F., Lazzarini, R., Recchioni, R., Marcheselli, F., Rippo, M. R., Di Nuzzo, S., Albertini, M. C., Graciotti, L., Babini, L., Mariotti, S., Spada, G., Abbatecola, A. M.,



Antonicelli, R., Franceschi, C. and Procopio, A. D. (2012). "MiR-146a as marker of senescence-associated pro-inflammatory status in cells involved in vascular remodelling." Age (Dordr).

Ozcelik, C., Erdmann, B., Pilz, B., Wettschureck, N., Britsch, S., Hubner, N., Chien, K. R., Birchmeier, C. and Garratt, A. N. (2002). "Conditional mutation of the ErbB2 (HER2) receptor in cardiomyocytes leads to dilated cardiomyopathy." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(13): 8880-8885.

Pacifico, F., Crescenzi, E., Mellone, S., Iannetti, A., Porrino, N., Liguoro, D., Moscato, F., Grieco, M., Formisano, S. and Leonardi, A. (2010). "Nuclear factor- $\kappa$ B contributes to anaplastic thyroid carcinomas through up-regulation of miR-146a." J Clin Endocrinol Metab **95**(3): 1421-1430.

Paik, J. H., Jang, J. Y., Jeon, Y. K., Kim, W. Y., Kim, T. M., Heo, D. S. and Kim, C. W. (2011). "MicroRNA-146a downregulates NF $\kappa$ B activity via targeting TRAF6 and functions as a tumor suppressor having strong prognostic implications in NK/T cell lymphoma." Clin Cancer Res **17**(14): 4761-4771.

Paik, J. H., Skoura, A., Chae, S. S., Cowan, A. E., Han, D. K., Proia, R. L. and Hla, T. (2004). "Sphingosine 1-phosphate receptor regulation of N-cadherin mediates vascular stabilization." Genes Dev **18**(19): 2392-2403.

Pan, H., Nguyen, N. Q., Yoshida, H., Bentzien, F., Shaw, L. C., Rentier-Delrue, F., Martial, J. A., Weiner, R., Struman, I. and Grant, M. B. (2004). "Molecular targeting of antiangiogenic factor 16K hPRL inhibits oxygen-induced retinopathy in mice." Invest Ophthalmol Vis Sci **45**(7): 2413-2419.

Pan, Z., Sun, X., Shan, H., Wang, N., Wang, J., Ren, J., Feng, S., Xie, L., Lu, C., Yuan, Y., Zhang, Y., Wang, Y., Lu, Y. and Yang, B. (2012). "MicroRNA-101 inhibited postinfarct cardiac fibrosis and improved left ventricular compliance via the FBJ osteosarcoma oncogene/transforming growth factor-beta1 pathway." Circulation **126**(7): 840-850.

Park, Y. G., Rhu, H. W., Kang, S. and Roh, Y. J. (2012). "New Approach of Anti-VEGF Agents for Age-Related Macular Degeneration." J Ophthalmol **2012**: 637316.

Parolini, I., Federici, C., Raggi, C., Lugini, L., Palleschi, S., De Milito, A., Coscia, C., Iessi, E., Logozzi, M., Molinari, A., Colone, M., Tatti, M., Sargiacomo, M. and Fais, S. (2009). "Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells." J Biol Chem **284**(49): 34211-34222.

Patrick, D. M., Montgomery, R. L., Qi, X., Obad, S., Kauppinen, S., Hill, J. A., van Rooij, E. and Olson, E. N. (2010). "Stress-dependent cardiac remodeling occurs in the absence of microRNA-21 in mice." J Clin Invest **120**(11): 3912-3916.

Patten, I. S., Rana, S., Shahul, S., Rowe, G. C., Jang, C., Liu, L., Hacker, M. R., Rhee, J. S., Mitchell, J., Mahmood, F., Hess, P., Farrell, C., Koulisis, N., Khankin, E. V., Burke, S. D.,

Tudorache, I., Bauersachs, J., del Monte, F., Hilfiker-Kleiner, D., Karumanchi, S. A. and Arany, Z. (2012). "Cardiac angiogenic imbalance leads to peripartum cardiomyopathy." Nature **485**(7398): 333-338.

Patten, R. D., Pourati, I., Aronovitz, M. J., Baur, J., Celestin, F., Chen, X., Michael, A., Haq, S., Nuedling, S., Grohe, C., Force, T., Mendelsohn, M. E. and Karas, R. H. (2004). "17beta-estradiol reduces cardiomyocyte apoptosis in vivo and in vitro via activation of phosphoinositide-3 kinase/Akt signaling." Circ Res **95**(7): 692-699.

Pearson, G. D., Veille, J. C., Rahimtoola, S., Hsia, J., Oakley, C. M., Hosenpud, J. D., Ansari, A. and Baughman, K. L. (2000). "Peripartum cardiomyopathy: National Heart, Lung, and Blood Institute and Office of Rare Diseases (National Institutes of Health) workshop recommendations and review." JAMA **283**(9): 1183-1188.

Pegtel, D. M., Cosmopoulos, K., Thorley-Lawson, D. A., van Eijndhoven, M. A., Hopmans, E. S., Lindenberg, J. L., de Gruijl, T. D., Wurdinger, T. and Middeldorp, J. M. (2010). "Functional delivery of viral miRNAs via exosomes." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(14): 6328-6333.

Pentassuglia, L. and Sawyer, D. B. (2009). "The role of Neuregulin-1beta/ErbB signaling in the heart." Exp Cell Res **315**(4): 627-637.

Perry, M. M., Moschos, S. A., Williams, A. E., Shepherd, N. J., Larner-Svensson, H. M. and Lindsay, M. A. (2008). "Rapid changes in microRNA-146a expression negatively regulate the IL-1beta-induced inflammatory response in human lung alveolar epithelial cells." J Immunol **180**(8): 5689-5698.

Perske, C., Lahat, N., Sheffy Levin, S., Bitterman, H., Hemmerlein, B. and Rahat, M. A. (2010). "Loss of inducible nitric oxide synthase expression in the mouse renal cell carcinoma cell line RENCA is mediated by microRNA miR-146a." Am J Pathol **177**(4): 2046-2054.

Petersen, C. P., Bordeleau, M. E., Pelletier, J. and Sharp, P. A. (2006). "Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells." Mol Cell **21**(4): 533-542.

Pin, A. L., Houle, F., Guillonneau, M., Paquet, E. R., Simard, M. J. and Huot, J. (2012). "miR-20a represses endothelial cell migration by targeting MKK3 and inhibiting p38 MAP kinase activation in response to VEGF." Angiogenesis.

Piwnica, D., Fernandez, I., Binart, N., Touraine, P., Kelly, P. A. and Goffin, V. (2006). "A new mechanism for prolactin processing into 16K PRL by secreted cathepsin D." Mol Endocrinol **20**(12): 3263-3278.

Piwnica, D., Touraine, P., Struman, I., Tabruyn, S., Bolbach, G., Clapp, C., Martial, J. A., Kelly, P. A. and Goffin, V. (2004). "Cathepsin D processes human prolactin into multiple 16K-like N-terminal fragments: study of their antiangiogenic properties and physiological relevance." Mol Endocrinol **18**(10): 2522-2542.

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

Pratt, A. J. and MacRae, I. J. (2009). "The RNA-induced silencing complex: a versatile gene-silencing machine." J Biol Chem **284**(27): 17897-17901.

Ratajczak, J., Miekus, K., Kucia, M., Zhang, J., Reca, R., Dvorak, P. and Ratajczak, M. Z. (2006). "Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery." Leukemia **20**(5): 847-856.

Redova, M., Poprach, A., Nekvindova, J., Iliev, R., Radova, L., Lakomy, R., Svoboda, M., Vyzula, R. and Slaby, O. (2012). "Circulating miR-378 and miR-451 in serum are potential biomarkers for renal cell carcinoma." J Transl Med **10**: 55.

Ribatti, D. (2009). "Endogenous inhibitors of angiogenesis: a historical review." Leuk Res **33**(5): 638-644.

Roberg, K. and Ollinger, K. (1998). "Oxidative stress causes relocation of the lysosomal enzyme cathepsin D with ensuing apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes." Am J Pathol **152**(5): 1151-1156.

Rom, S., Rom, I., Passiatore, G., Pacifici, M., Radhakrishnan, S., Del Valle, L., Pina-Oviedo, S., Khalili, K., Eletto, D. and Peruzzi, F. (2010). "CCL8/MCP-2 is a target for mir-146a in HIV-1-infected human microglial cells." FASEB J **24**(7): 2292-2300.

Rosenfeld, P. J., Brown, D. M., Heier, J. S., Boyer, D. S., Kaiser, P. K., Chung, C. Y. and Kim, R. Y. (2006). "Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration." N Engl J Med **355**(14): 1419-1431.

Rusca, N. and Monticelli, S. (2011). "MiR-146a in Immunity and Disease." Mol Biol Int **2011**: 437301.

S, Y. H. and Jernberg, T. (2011). "Bromocriptine-induced coronary spasm caused acute coronary syndrome, which triggered its own clinical twin--Takotsubo syndrome." Cardiology **119**(1): 1-6.

Sabatel, C., Cornet, A. M., Tabruyn, S. P., Malvaux, L., Castermans, K., Martial, J. A. and Struman, I. (2010). "Sprouty1, a new target of the angiostatic agent 16K prolactin, negatively regulates angiogenesis." Mol Cancer **9**: 231.

Sabatel, C., Malvaux, L., Bovy, N., Deroanne, C., Lambert, V., Gonzalez, M. L., Colige, A., Rakic, J. M., Noel, A., Martial, J. A. and Struman, I. (2011). "MicroRNA-21 exhibits antiangiogenic function by targeting RhoB expression in endothelial cells." PLoS One **6**(2): e16979.

Schaefer, A., Klein, G., Brand, B., Lippolt, P., Drexler, H. and Meyer, G. P. (2003). "Evaluation of left ventricular diastolic function by pulsed Doppler tissue imaging in mice." J Am Soc Echocardiogr **16**(11): 1144-1149.

Schuff, K. G., Hentges, S. T., Kelly, M. A., Binart, N., Kelly, P. A., Iuvone, P. M., Asa, S. L. and Low, M. J. (2002). "Lack of prolactin receptor signaling in mice results in lactotroph proliferation and prolactinomas by dopamine-dependent and -independent mechanisms." J Clin Invest **110**(7): 973-981.

Selcuklu, S. D., Donoghue, M. T. and Spillane, C. (2009). "miR-21 as a key regulator of oncogenic processes." Biochem Soc Trans **37**(Pt 4): 918-925.

Shen, J., Ambrosone, C. B., DiCioccio, R. A., Odunsi, K., Lele, S. B. and Zhao, H. (2008). "A functional polymorphism in the miR-146a gene and age of familial breast/ovarian cancer diagnosis." Carcinogenesis **29**(10): 1963-1966.

Sinha, Y. N. (1995). "Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance." Endocr Rev **16**(3): 354-369.

Sliwa, K., Blauwet, L., Tibazarwa, K., Libhaber, E., Smedema, J. P., Becker, A., McMurray, J., Yamac, H., Labidi, S., Struman, I. and Hilfiker-Kleiner, D. (2010). "Evaluation of bromocriptine in the treatment of acute severe peripartum cardiomyopathy: a proof-of-concept pilot study." Circulation **121**(13): 1465-1473.

Sliwa, K., Fett, J. and Elkayam, U. (2006). "Peripartum cardiomyopathy." Lancet **368**(9536): 687-693.

Sliwa, K., Forster, O., Libhaber, E., Fett, J. D., Sundstrom, J. B., Hilfiker-Kleiner, D. and Ansari, A. A. (2006). "Peripartum cardiomyopathy: inflammatory markers as predictors of outcome in 100 prospectively studied patients." Eur Heart J **27**(4): 441-446.

Sliwa, K., Forster, O., Zhanje, F., Candy, G., Kachope, J. and Essop, R. (2004). "Outcome of subsequent pregnancy in patients with documented peripartum cardiomyopathy." Am J Cardiol **93**(11): 1441-1443, A1410.

Sliwa, K., Hilfiker-Kleiner, D., Petrie, M. C., Mebazaa, A., Pieske, B., Buchmann, E., Regitz-Zagrosek, V., Schaufelberger, M., Tavazzi, L., van Veldhuisen, D. J., Watkins, H., Shah, A. J., Seferovic, P. M., Elkayam, U., Pankuweit, S., Papp, Z., Mouquet, F. and McMurray, J. J. (2010). "Current state of knowledge on aetiology, diagnosis, management, and therapy of peripartum cardiomyopathy: a position statement from the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology Working Group on peripartum cardiomyopathy." Eur J Heart Fail **12**(8): 767-778.

Sliwa, K., Skudicky, D., Bergemann, A., Candy, G., Puren, A. and Sareli, P. (2000). "Peripartum cardiomyopathy: analysis of clinical outcome, left ventricular function, plasma levels of cytokines and Fas/APO-1." J Am Coll Cardiol **35**(3): 701-705.

Sliwa, K., Skudicky, D., Candy, G., Bergemann, A., Hopley, M. and Sareli, P. (2002). "The addition of pentoxifylline to conventional therapy improves outcome in patients with peripartum cardiomyopathy." Eur J Heart Fail **4**(3): 305-309.

Soe, M. J., Moller, T., Dufva, M. and Holmstrom, K. (2011). "A sensitive alternative for microRNA in situ hybridizations using probes of 2'-O-methyl RNA + LNA." J Histochem Cytochem **59**(7): 661-672.

Sonkoly, E., Stahle, M. and Pivarsci, A. (2008). "MicroRNAs: novel regulators in skin inflammation." Clin Exp Dermatol **33**(3): 312-315.

Stenvang, J., Petri, A., Lindow, M., Obad, S. and Kauppinen, S. (2012). "Inhibition of microRNA function by anti-miR oligonucleotides." Silence **3**(1): 1.

Stoorvogel, W. (2012). "Functional transfer of microRNA by exosomes." Blood **119**(3): 646-648.

Struman, I., Bentzien, F., Lee, H., Mainfroid, V., D'Angelo, G., Goffin, V., Weiner, R. I. and Martial, J. A. (1999). "Opposing actions of intact and N-terminal fragments of the human prolactin/growth hormone family members on angiogenesis: an efficient mechanism for the regulation of angiogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(4): 1246-1251.

Suarez, Y., Fernandez-Hernando, C., Pober, J. S. and Sessa, W. C. (2007). "Dicer dependent microRNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells." Circ Res **100**(8): 1164-1173.

Sun, S. G., Zheng, B., Han, M., Fang, X. M., Li, H. X., Miao, S. B., Su, M., Han, Y., Shi, H. J. and Wen, J. K. (2011). "miR-146a and Kruppel-like factor 4 form a feedback loop to participate in vascular smooth muscle cell proliferation." EMBO Rep **12**(1): 56-62.

Szekanecz, Z. and Koch, A. E. (2007). "Mechanisms of Disease: angiogenesis in inflammatory diseases." Nat Clin Pract Rheumatol **3**(11): 635-643.

Tabruyn, S. P., Nguyen, N. Q., Cornet, A. M., Martial, J. A. and Struman, I. (2005). "The antiangiogenic factor, 16-kDa human prolactin, induces endothelial cell cycle arrest by acting at both the G0-G1 and the G2-M phases." Mol Endocrinol **19**(7): 1932-1942.

Tabruyn, S. P., Sabatel, C., Nguyen, N. Q., Verhaeghe, C., Castermans, K., Malvaux, L., Griffioen, A. W., Martial, J. A. and Struman, I. (2007). "The angiostatic 16K human prolactin overcomes endothelial cell anergy and promotes leukocyte infiltration via nuclear factor-kappaB activation." Mol Endocrinol **21**(6): 1422-1429.

Tabruyn, S. P., Sorlet, C. M., Rentier-Delrue, F., Bours, V., Weiner, R. I., Martial, J. A. and Struman, I. (2003). "The antiangiogenic factor 16K human prolactin induces caspase-dependent apoptosis by a mechanism that requires activation of nuclear factor-kappaB." Mol Endocrinol **17**(9): 1815-1823.

Taganov, K. D., Boldin, M. P., Chang, K. J. and Baltimore, D. (2006). "NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(33): 12481-12486.

Takahashi, Y., Satoh, M., Minami, Y., Tabuchi, T., Itoh, T. and Nakamura, M. (2010). "Expression of miR-146a/b is associated with the Toll-like receptor 4 signal in coronary artery disease: effect of renin-angiotensin system blockade and statins on miRNA-146a/b and Toll-like receptor 4 levels." Clin Sci (Lond) **119**(9): 395-405.

Tanic, M., Zajac, M., Gomez-Lopez, G., Benitez, J. and Martinez-Delgado, B. (2012). "Integration of BRCA1-mediated miRNA and mRNA profiles reveals microRNA regulation of TRAF2 and NFkappaB pathway." Breast Cancer Res Treat **134**(1): 41-51.

Tay, Y., Zhang, J., Thomson, A. M., Lim, B. and Rigoutsos, I. (2008). "MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation." Nature **455**(7216): 1124-1128.

Taylor, D. D. and Gercel-Taylor, C. (2008). "MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer." Gynecol Oncol **110**(1): 13-21.

Teilum, K., Hoch, J. C., Goffin, V., Kinet, S., Martial, J. A. and Kragelund, B. B. (2005). "Solution structure of human prolactin." J Mol Biol **351**(4): 810-823.

Thery, C., Zitvogel, L. and Amigorena, S. (2002). "Exosomes: composition, biogenesis and function." Nat Rev Immunol **2**(8): 569-579.

Thum, T., Gross, C., Fiedler, J., Fischer, T., Kissler, S., Bussen, M., Galuppo, P., Just, S., Rottbauer, W., Frantz, S., Castoldi, M., Soutschek, J., Koteliansky, V., Rosenwald, A., Basson, M. A., Licht, J. D., Pena, J. T., Rouhanifard, S. H., Muckenthaler, M. U., Tuschl, T., Martin, G. R., Bauersachs, J. and Engelhardt, S. (2008). "MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts." Nature **456**(7224): 980-984.

Tian, T., Wang, Y., Wang, H., Zhu, Z. and Xiao, Z. (2010). "Visualizing of the cellular uptake and intracellular trafficking of exosomes by live-cell microscopy." J Cell Biochem **111**(2): 488-496.

Tijssen, A. J., Creemers, E. E., Moerland, P. D., de Windt, L. J., van der Wal, A. C., Kok, W. E. and Pinto, Y. M. (2010). "MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure." Circ Res **106**(6): 1035-1039.

Tijssen, A. J., Pinto, Y. M. and Creemers, E. E. (2012). "Circulating microRNAs as diagnostic biomarkers for cardiovascular diseases." Am J Physiol Heart Circ Physiol.

Tili, E., Michaille, J. J., Cimino, A., Costinean, S., Dumitru, C. D., Adair, B., Fabbri, M., Alder, H., Liu, C. G., Calin, G. A. and Croce, C. M. (2007). "Modulation of miR-155 and

miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF- $\alpha$  stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock." J Immunol **179**(8): 5082-5089.

Tomita, M., Tanaka, Y. and Mori, N. (2012). "MicroRNA miR-146a is induced by HTLV-1 tax and increases the growth of HTLV-1-infected T-cells." Int J Cancer **130**(10): 2300-2309.

Turchinovich, A., Weiz, L., Langheinz, A. and Burwinkel, B. (2011). "Characterization of extracellular circulating microRNA." Nucleic Acids Res **39**(16): 7223-7233.

Valadi, H., Ekstrom, K., Bossios, A., Sjostrand, M., Lee, J. J. and Lotvall, J. O. (2007). "Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells." Nat Cell Biol **9**(6): 654-659.

van Dongen, S., Abreu-Goodger, C. and Enright, A. J. (2008). "Detecting microRNA binding and siRNA off-target effects from expression data." Nat Methods **5**(12): 1023-1025.

van Empel, V. P., De Windt, L. J. and Martins, P. A. (2012). "Circulating miRNAs: Reflecting or Affecting Cardiovascular Disease?" Curr Hypertens Rep.

van Rooij, E., Marshall, W. S. and Olson, E. N. (2008). "Toward microRNA-based therapeutics for heart disease: the sense in antisense." Circ Res **103**(9): 919-928.

van Rooij, E., Sutherland, L. B., Qi, X., Richardson, J. A., Hill, J. and Olson, E. N. (2007). "Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA." Science **316**(5824): 575-579.

van Rooij, E., Sutherland, L. B., Thatcher, J. E., DiMaio, J. M., Naseem, R. H., Marshall, W. S., Hill, J. A. and Olson, E. N. (2008). "Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(35): 13027-13032.

van Spaendonck-Zwarts, K. Y., van Tintelen, J. P., van Veldhuisen, D. J., van der Werf, R., Jongbloed, J. D., Paulus, W. J., Dooijes, D. and van den Berg, M. P. (2010). "Peripartum cardiomyopathy as a part of familial dilated cardiomyopathy." Circulation **121**(20): 2169-2175.

Vasa-Nicotera, M., Chen, H., Tucci, P., Yang, A. L., Saintigny, G., Menghini, R., Mahe, C., Agostini, M., Knight, R. A., Melino, G. and Federici, M. (2011). "miR-146a is modulated in human endothelial cell with aging." Atherosclerosis **217**(2): 326-330.

Vatish, M., Randeva, H. S. and Grammatopoulos, D. K. (2006). "Hormonal regulation of placental nitric oxide and pathogenesis of pre-eclampsia." Trends Mol Med **12**(5): 223-233.

Vervoort, V. S., Lu, M., Valencia, F., Lesperance, J., Breier, G., Oshima, R. and Pasquale, E. B. (2008). "A novel Flk1-TVA transgenic mouse model for gene delivery to angiogenic vasculature." Transgenic Res **17**(3): 403-415.

Vickers, K. C., Palmisano, B. T., Shoucri, B. M., Shamburek, R. D. and Remaley, A. T. (2011). "MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins." Nat Cell Biol **13**(4): 423-433.

Vinci, S., Gelmini, S., Pratesi, N., Conti, S., Malentacchi, F., Simi, L., Pazzagli, M. and Orlando, C. (2011). "Genetic variants in miR-146a, miR-149, miR-196a2, miR-499 and their influence on relative expression in lung cancers." Clin Chem Lab Med **49**(12): 2073-2080.

Vlassov, A. V., Magdaleno, S., Setterquist, R. and Conrad, R. (2012). "Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials." Biochim Biophys Acta **1820**(7): 940-948.

Vrijssen, K. R., Sluijter, J. P., Schuchardt, M. W., van Balkom, B. W., Noort, W. A., Chamuleau, S. A. and Doevendans, P. A. (2010). "Cardiomyocyte progenitor cell-derived exosomes stimulate migration of endothelial cells." J Cell Mol Med **14**(5): 1064-1070.

Wakiyama, M., Takimoto, K., Ohara, O. and Yokoyama, S. (2007). "Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system." Genes Dev **21**(15): 1857-1862.

Walsh, K. (2006). "Akt signaling and growth of the heart." Circulation **113**(17): 2032-2034.

Wang, H., Peng, W., Ouyang, X., Li, W. and Dai, Y. (2012). "Circulating microRNAs as candidate biomarkers in patients with systemic lupus erythematosus." Transl Res **160**(3): 198-206.

Wang, J. F., Yu, M. L., Yu, G., Bian, J. J., Deng, X. M., Wan, X. J. and Zhu, K. M. (2010). "Serum miR-146a and miR-223 as potential new biomarkers for sepsis." Biochem Biophys Res Commun **394**(1): 184-188.

Wang, J. X., Jiao, J. Q., Li, Q., Long, B., Wang, K., Liu, J. P., Li, Y. R. and Li, P. F. (2011). "miR-499 regulates mitochondrial dynamics by targeting calcineurin and dynamin-related protein-1." Nat Med **17**(1): 71-78.

Wang, K., Zhang, S., Weber, J., Baxter, D. and Galas, D. J. (2010). "Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells." Nucleic Acids Res **38**(20): 7248-7259.

Wang, S., Aurora, A. B., Johnson, B. A., Qi, X., McAnally, J., Hill, J. A., Richardson, J. A., Bassel-Duby, R. and Olson, E. N. (2008). "The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis." Dev Cell **15**(2): 261-271.

Wang, S. and Olson, E. N. (2009). "AngiomiRs--key regulators of angiogenesis." Curr Opin Genet Dev **19**(3): 205-211.



Wang, X., Tang, S., Le, S. Y., Lu, R., Rader, J. S., Meyers, C. and Zheng, Z. M. (2008). "Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth." PLoS One **3**(7): e2557.

Warraich, R. S., Sliwa, K., Damasceno, A., Carraway, R., Sundrom, B., Arif, G., Essop, R., Ansari, A., Fett, J. and Yacoub, M. (2005). "Impact of pregnancy-related heart failure on humoral immunity: clinical relevance of G3-subclass immunoglobulins in peripartum cardiomyopathy." Am Heart J **150**(2): 263-269.

Weber, J. A., Baxter, D. H., Zhang, S., Huang, D. Y., Huang, K. H., Lee, M. J., Galas, D. J. and Wang, K. (2010). "The microRNA spectrum in 12 body fluids." Clin Chem **56**(11): 1733-1741.

Wu, F., Yang, Z. and Li, G. (2009). "Role of specific microRNAs for endothelial function and angiogenesis." Biochem Biophys Res Commun **386**(4): 549-553.

Wurdinger, T., Tannous, B. A., Saydam, O., Skog, J., Grau, S., Soutschek, J., Weissleder, R., Breakefield, X. O. and Krichevsky, A. M. (2008). "miR-296 regulates growth factor receptor overexpression in angiogenic endothelial cells." Cancer Cell **14**(5): 382-393.

Xiao, B., Zhu, E. D., Li, N., Lu, D. S., Li, W., Li, B. S., Zhao, Y. L., Mao, X. H., Guo, G., Yu, P. W. and Zou, Q. M. (2012). "Increased miR-146a in gastric cancer directly targets SMAD4 and is involved in modulating cell proliferation and apoptosis." Oncol Rep **27**(2): 559-566.

Xin, H., Li, Y., Buller, B., Katakowski, M., Zhang, Y., Wang, X., Shang, X., Zhang, Z. G. and Chopp, M. (2012). "Exosome-Mediated Transfer of miR-133b from Multipotent Mesenchymal Stromal Cells to Neural Cells Contributes to Neurite Outgrowth." Stem Cells **30**(7): 1556-1564.

Xu, B., Wang, N., Wang, X., Tong, N., Shao, N., Tao, J., Li, P., Niu, X., Feng, N., Zhang, L., Hua, L., Wang, Z. and Chen, M. (2012). "MiR-146a suppresses tumor growth and progression by targeting EGFR pathway and in a p-ERK-dependent manner in castration-resistant prostate cancer." Prostate **72**(11): 1171-1178.

Yang, B., Cao, D. J., Sainz, I., Colman, R. W. and Guo, Y. L. (2004). "Different roles of ERK and p38 MAP kinases during tube formation from endothelial cells cultured in 3-dimensional collagen matrices." J Cell Physiol **200**(3): 360-369.

Yang, L., Boldin, M. P., Yu, Y., Liu, C. S., Ea, C. K., Ramakrishnan, P., Taganov, K. D., Zhao, J. L. and Baltimore, D. (2012). "miR-146a controls the resolution of T cell responses in mice." J Exp Med **209**(9): 1655-1670.

Yang, M., Chen, J., Su, F., Yu, B., Lin, L., Liu, Y., Huang, J. D. and Song, E. (2011). "Microvesicles secreted by macrophages shuttle invasion-potentiating microRNAs into breast cancer cells." Mol Cancer **10**: 117.

Yang, W. J., Yang, D. D., Na, S., Sandusky, G. E., Zhang, Q. and Zhao, G. (2005). "Dicer is required for embryonic angiogenesis during mouse development." J Biol Chem **280**(10): 9330-9335.

Yin, K. J., Olsen, K., Hamblin, M., Zhang, J., Schwendeman, S. P. and Chen, Y. E. (2012). "Vascular Endothelial Cell-specific MicroRNA-15a Inhibits Angiogenesis in Hindlimb Ischemia." J Biol Chem **287**(32): 27055-27064.

Yin, R., Bao, W., Xing, Y., Xi, T. and Gou, S. (2012). "MiR-19b-1 inhibits angiogenesis by blocking cell cycle progression of endothelial cells." Biochem Biophys Res Commun **417**(2): 771-776.

Zhang, Y., Liu, D., Chen, X., Li, J., Li, L., Bian, Z., Sun, F., Lu, J., Yin, Y., Cai, X., Sun, Q., Wang, K., Ba, Y., Wang, Q., Wang, D., Yang, J., Liu, P., Xu, T., Yan, Q., Zhang, J., Zen, K. and Zhang, C. Y. (2010). "Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration." Mol Cell **39**(1): 133-144.

Zhao, J. L., Rao, D. S., Boldin, M. P., Taganov, K. D., O'Connell, R. M. and Baltimore, D. (2011). "NF-kappaB dysregulation in microRNA-146a-deficient mice drives the development of myeloid malignancies." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(22): 9184-9189.

Zhou, F., Zhu, H., Luo, D., Wang, M., Dong, X., Hong, Y., Lu, B., Zhou, Y., Zhou, J., Zhang, Z. and Gong, W. (2012). "A Functional Polymorphism in Pre-miR-146a Is Associated with Susceptibility to Gastric Cancer in a Chinese Population." DNA Cell Biol **31**(7): 1290-1295.

Zhou, Q., Gallagher, R., Ufret-Vincenty, R., Li, X., Olson, E. N. and Wang, S. (2011). "Regulation of angiogenesis and choroidal neovascularization by members of microRNA-23~27~24 clusters." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(20): 8287-8292.

Zidar, N., Bostjancic, E., Glavac, D. and Stajer, D. (2011). "MicroRNAs, innate immunity and ventricular rupture in human myocardial infarction." Dis Markers **31**(5): 259-265.

# Résumé

La cardiomyopathie du péripartum (PPCM) est une maladie mortelle qui touche certaines femmes entre le dernier mois de la grossesse et jusqu'à 5 mois après l'accouchement. Ces femmes présentent des symptômes d'hypertension et un dysfonctionnement du ventricule gauche. A la fois l'endothélium et les cardiomyocytes sont affectés dans le cœur des patientes atteintes de la PPCM et il a été récemment montré que le fragment de 16 kDa de la prolactine (PRL 16K) était un facteur majeur dans la pathophysiologie de la maladie. Dans notre laboratoire, nous travaillons depuis des années sur les mécanismes d'action de la PRL 16K. Nous nous intéressons également aux microARN (miARN), ces régulateurs de l'expression des gènes décrits pour être impliqués dans la plupart des processus physiologiques et pathologiques tels que l'angiogenèse ou les maladies cardiovasculaires. Ils sont également décrits depuis peu pour pouvoir être sécrétés par une cellule productrice et transférés à une cellule receveuse, via des microvésicules, afin d'y jouer un rôle.

Au cours de ce travail, nous avons mis en évidence que la PRL 16K est capable d'induire l'expression de miR-146a au sein des cellules endothéliales via l'activation de NF- $\kappa$ B et d'induire son transfert via des microvésicules appelées exosomes. Ces exosomes endothéliaux sont capable d'interagir avec les cardiomyocytes et le contenu en miR-146a y est transféré. Au sein des cellules endothéliales, miR-146a possède des propriétés anti-angiogènes. Il réprime la prolifération et favorise l'apoptose des cellules endothéliales. Parmi ses gènes cibles potentiels, nous validons NRAS via lequel miR-146a pourrait médier une partie de ses effets. Au sein des cardiomyocytes, nous avons mis en évidence un rôle de miR-146a dans la répression du métabolisme corrélé à une diminution de l'expression d'ErbB4. Nous avons ensuite montré le rôle central tenu par miR-146a dans un modèle murin de souris développant la PPCM. On retrouve dans le cœur de ces souris un niveau augmenté de miR-146a et un niveau diminué d'ErbB4 et de NRAS. De plus, l'inhibition de miR-146a dans ces souris PPCM, via l'injection d'oligonucléotides anti-sens, permet de restaurer le phénotype sain des souris PPCM. On observe une restauration de l'activité cardiaque ainsi qu'une normalisation des niveaux d'expression de miR-146a et de ses gènes cibles. Chez la femme présentant une PPCM, les niveaux cardiaques de miR-146a et d'ErbB4 sont également dérégulés. Ces résultats suggèrent que miR-146a tient un rôle central dans la pathophysiologie de la PPCM et permet d'expliquer la dualité d'action de la PRL 16K sur les cellules endothéliales et les cardiomyocytes.

Enfin, les miARN extracellulaires présents dans le plasma constituent des biomarqueurs de choix pour le diagnostic d'un grand nombre de pathologies. Ainsi, nous avons mis en évidence un niveau d'expression plasmatique significativement plus élevé chez les patientes atteintes d'une PPCM comparé à celui de femmes saines ainsi que de patientes présentant également de l'insuffisance cardiaque dû à une cardiomyopathie dilatée.

En conclusion, en plus d'être un facteur impliqué de façon centrale dans la pathophysiologie de la PPCM et constituant dès lors une cible thérapeutique intéressante, miR-146a permet un diagnostic spécifique de la maladie.

