

**Université de Liège**

Faculté des Sciences

GIGA-Research

Laboratoire d'angiogenèse moléculaire

Promoteur : Dr. Ingrid Struman

**Etude de la communication entre les cellules  
endothéliales et les cellules musculaires lisses  
vasculaires via le transfert de microARN**

Marie Fontaine

2016 – 2017



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





*Réaliser une thèse n'est pas une aventure facile mais, fort heureusement, celle-ci ne se fait pas en solo ! Au terme de ces cinq années, je tiens à remercier ceux et celles qui ont rendu cette période de ma vie très enrichissante.*

*Tout d'abord, je remercie le Dr. Ingrid Struman pour sa confiance et pour son aide tout au long de cette thèse. Merci de m'avoir laissé la possibilité de travailler en toute autonomie tout en étant présente dès que j'en avais besoin. Merci d'avoir toujours été à l'écoute et d'avoir été bien plus qu'une cheffe. Merci aussi de m'avoir donné le goût des longs voyages à l'autre bout du monde !*

*Je tiens aussi à remercier comme il se doit nos deux supers techniciens. Mimi, je ne sais pas comment on s'en sortirait sans toi ! Non seulement, nous serions perdus sans toutes tes connaissances mais, en plus, tu es toujours là pour nous aider et nous écouter. Nos petites discussions matinales vont beaucoup me manquer. Oli-lapin, merci pour ton attitude positive et pleine d'entrain. Ta passion sans limite pour les exosomes m'a donné le courage d'aller jusqu'au bout de ce projet. Merci pour les bons moments en culture ainsi que ton soutien lors de mes craquages hyperlipémiques.*

*Ensuite, je voudrais remercier tous mes collègues du laboratoire. Cécile, nous avons bravé la préparation du F.R.I.A. ensemble ainsi que toutes les autres difficultés qu'implique la thèse. Ca a été un plaisir de partager ces années avec toi et je te remercie pour ton soutien. Bientôt, ce sera ton tour d'écrire des remerciements ! Jenn, thanks a lot! It wasn't easy to understand each other everytime but we did it! Don't stop travelling, your pictures always make me dream. Thomas et Stella, merci pour votre bonne humeur quotidienne. Je vous souhaite une très bonne continuation pour vos thèses. Je suis sûre que vous allez gérer ça comme des bêtes. Amandine et Anaïs, les petites dernières, je vous souhaite que tout se passe bien pour la suite. Pour finir, Sébastien et Claire, nous n'avons pas eu beaucoup de temps pour se connaître mais j'espère que vous vous plairez dans le labo autant que je m'y suis plu.*

*Je remercie également les anciens du labo. Nico, merci de m'avoir initié aux techniques relatives à l'étude des particules magiques. Tes nombreux conseils m'ont été très utiles. Steph, un tout grand merci d'utiliser ta chance légendaire pour réaliser mes manip in vivo. Alicia, mon poulain, merci d'avoir été à mes côtés durant un an et d'avoir travaillé avec acharnement sur ce projet. Merci à vous tous pour les supers moments passés au labo.*

*De manière plus générale, je remercie également tous les membres du BMGG et du GIGA ayant fait de cette thèse une réussite. Merci pour votre aide et pour les bons moments passés ensemble.*

*L'aboutissement d'une thèse ne se résume pas uniquement au soutien et à l'aide de ses collègues mais aussi à la présence de ses proches. C'est pourquoi je voudrais remercier les membres de ma famille qui m'ont soutenu d'un bout à l'autre dans ce grand projet. Merci à mes parents d'avoir tout*

*fait pour que je puisse entamer des études à l'université. Sans vous, tout cela n'aurait pas été possible. Merci Nico, mon frangin, pour les moments de complicité. Je ne t'échangerais pour rien au monde. Merci à ma grande famille, je ne peux pas vous faire un remerciement personnalisé à chacun mais je sais que vous constituez mon plus grand fanclub et votre soutien inconditionnel compte énormément pour moi. Merci à tous d'être là.*

*En plus de la famille, il y a aussi les amis. Fleur, merci d'être là depuis le début de cette folle aventure. Ces années d'université ont été remplies de superbes moments, de bons délires et je les recommencerais bien rien que pour cette raison. A toute la clique des biologistes, merci pour ces belles années d'université. A mes vieilles copines, merci d'avoir essayé de comprendre mes histoires de cellules et d'être présentes depuis toutes ces années. J'ai vraiment de la chance de vous avoir tous à mes côtés.*

*Pour finir, Charles, mon partenaire des bons moments et des galères, merci d'avoir toujours été là pour moi depuis 9 ans. Je sais que ça n'a pas toujours été facile pour toi de subir les blocus et le stress de mes examens, et je ne te remercierai jamais assez d'avoir tout fait pour que je me sente bien durant ces moments difficiles. Ta présence et ton soutien me permettent chaque jour de prendre la vie avec positivité et... humour ! Merci d'être toi.*

*Du fond du cœur, je vous remercie !*



## Abréviations

$\alpha$ -SMA	<i>alpha-Smooth Muscle Actin</i>
ADM	adrénomédulline
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
aFGF	<i>acidic Fibroblast Growth Factor</i>
AGO	argonaute
Ang1	angiopoïétine 1
Ang2	angiopoïétine 2
ARN	acide ribonucléique
ARNdb	ARN double-brin
ARNm	ARN messenger
ARNsb	ARN simple-brin
ARNt	ARN de transfert
BMP	<i>Bone Morphogenic Protein</i>
bFGF	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CASP3	caspase 3
CAV2	cavéoline 2
CCR4-NOT	<i>C-C Motif Chemokine Receptor 4-NOT</i>
CDK4	<i>Cyclin-Dependant Kinase 4</i>
CDK6	<i>Cyclin-Dependent Kinase 6</i>
COL18A1	<i>Collagen Type XVIII Alpha 1 Chain</i>
CSC	cellule souche cancéreuse

---

CXCL1	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 1</i>
CXCL12	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 12</i>
CXCR4	<i>C-X-C Motif Chemokine Receptor 4</i>
DBS	<i>Donor Bovine Serum</i>
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome Critical Region 8</i>
DIO3	<i>Deiodinase type 3</i>
DIXDC1	<i>DIX Domain Containing 1</i>
DLK1	<i>Delta-like homologue 1</i>
Dll4	<i>Delta-like ligand 4</i>
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
ESCRT	<i>Endosomal Sorting Complex Required for Transport</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FGFR1	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor 1</i>
FOXO3	<i>Forkhead Box O3</i>
GALNT1	<i>Polypeptide GalNAc Transferase 1</i>
GAPDH	glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GDP	guanosine diphosphate
GTP	guanosine triphosphate
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
HER2	<i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>
HES1	<i>Hairy and Enhancer of Split</i>
HEY1	<i>Hairy/Enhancer-of-split-related with YRPW motif</i>
HIF-1	<i>Hypoxia Inducible Factor-1</i>

---

hnRNPA2B1	<i>Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A2/B1</i>
HOXA5	<i>Homeobox A5</i>
HRE	<i>Hypoxia Responsive Element</i>
HSC70	<i>Constitutive Heat Shock Protein 70</i>
HSP90	<i>Heat Shock Protein 90</i>
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cell</i>
HUVSMC	<i>Human Umbilical Vein Smooth Muscle Cell</i>
ICAM-1	<i>InterCellular Adhesion Molecule-1</i>
IGF-1	<i>Insulin-like Growth Factor-1</i>
IL	interleukine
ILV	<i>intraluminal vesicle</i>
ITGA3	<i>integrin subunit alpha 3</i>
ITGA5	<i>integrin subunit alpha 5</i>
ITGB3	<i>integrin subunit beta 3</i>
kDa	kilodalton
LBPA	acide lysobiphosphatidique
LNA	<i>Locked Nucleic Acid</i>
LRRK2	<i>Leucine-Rich Repeat Kinase 2</i>
MALT	<i>Mucosa-Associated Lymphoid Tissue</i>
MAP3K7	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 7</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MEC	matrice extracellulaire
miARN	microARN
MITF	<i>Microphthalmia-Associated Transcription Factor</i>

---



miR	microARN
MMP	métalloprotéinase
mTOR	<i>mammalian Target Of Rapamycin</i>
MVB	<i>multivesicular body</i>
NO	oxyde nitrique
NOS	oxyde nitrique synthase
nSMase2	<i>neutral SphingoMyelinase 2</i>
O-GlcNAc	O-N-acétylglucosamine
PACT	<i>Protein Activator of PKR</i>
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PC	péricyte
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDCD6	<i>Programmed Cell Death 6</i>
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PDGFR- $\beta$	<i>PDGF Receptor-<math>\beta</math></i>
PECAM-1	<i>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1</i>
PFA	paraformaldéhyde
PGGT1B	<i>Protein GeranylGeranylTransferase type I Beta subunit</i>
PHB2	prohibitine 2
PI3K	<i>Phosphoinositide-3-Kinase</i>
PIK3R2	<i>Phosphoinositide-3-Kinase Regulatory Subunit 2</i>
PlGF	<i>Placental Growth Factor</i>
PPIA	cyclophiline A
pré-miARN	miARN précurseur

---

pri-miARN	miARN primaire
PRL 16K	prolactine 16K
PTPRJ	<i>Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type J</i>
Ran-GTP	<i>Ras-related Nuclear protein-GTP</i>
RBP	<i>RNA-binding protein</i>
RGS16	<i>Regulator Of G-Protein Signaling 16</i>
RhoB	<i>Ras homolog family member B</i>
RISC	<i>RNA-Induced Silencing Complex</i>
RLC	<i>RISC Loading Complex</i>
RNase	ribonucléase
ROBO2	<i>Roundabout Guidance Receptor 2</i>
RTL1	<i>Retrotransposon-like gene 1</i>
SCF	<i>Stem Cell Factor</i>
SD	déviation standard
SDS	dodécylsulfate de sodium
SOCS5	<i>Suppressor Of Cytokine Signaling 5</i>
SPAG5	<i>sperm-associated antigen 5</i>
SPARC	<i>Secreted Protein Acidic And Cysteine Rich</i>
SPRED1	<i>Sprouty Related EVH1 Domain Containing 1</i>
SYNCRIP	<i>Synaptotagmin-binding Cytoplasmic RNA Interacting Protein</i>
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming Growth Factor-<math>\beta</math></i>
TP53INP1	<i>Tumor Protein P53 Inducible Nuclear Protein 1</i>
TRBP	<i>Tar RNA Binding Protein</i>

---

TSG101	<i>Tumor Susceptibility 101</i>
uPA	<i>urokinase Plasminogen Activator</i>
UTR	<i>UnTranslated Region</i>
VASH1	<i>Vasohibin 1</i>
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>
VE-cadhérine	<i>Vascular Endothelial-cadhérine</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR-2	<i>VEGF Receptor-2</i>
VSMC	<i>Vascular Smooth Muscle Cell</i>
YBX1	<i>Y-Box Binding Protein 1</i>
ZO-1	<i>Zonula Occludens 1</i>

---

---

## Table des matières

Introduction .....	1
1. L'angiogenèse.....	1
1.1. Généralités.....	1
1.2. Formation du réseau vasculaire .....	1
1.3. Développement du réseau vasculaire .....	2
1.4. Etapes de l'angiogenèse .....	3
1.5. Régulation de l'angiogenèse .....	9
1.6. L'angiogenèse tumorale .....	11
1.7. La thérapie anti-angiogène .....	15
2. Les microARN.....	17
2.1. Généralités.....	17
2.2. Nomenclature .....	17
2.3. Biogenèse des miARN .....	18
2.4. Mode d'action des miARN .....	21
2.5. Les miARN dans l'angiogenèse et dans les fonctions des cellules endothéliales et des VSMC .....	24
2.6. Utilisation clinique des miARN.....	27
2.7. miR-539 .....	28
2.8. miR-582 .....	31
3. Les miARN circulants.....	32
3.1. Généralités.....	32
3.2. Les miARN circulants en tant que biomarqueurs.....	32
3.3. Les miARN circulants dans des complexes protéiques .....	33
3.4. Les miARN circulants dans des complexes lipoprotéiques .....	33
3.5. Les miARN circulants dans des microvésicules .....	34
4. Les exosomes.....	36
4.1. Généralités.....	36
4.2. Biogenèse .....	36
4.3. Composition des exosomes.....	37
4.4. Sélection du contenu des exosomes.....	39
4.5. Transfert d'informations .....	40
4.6. Les exosomes en tant que biomarqueurs et outils thérapeutiques .....	42
But du travail .....	45
Matériel et méthodes.....	46

---

---

1. Cellules.....	46
1.1. Cellules endothéliales.....	46
1.2. Cellules musculaires lisses vasculaires.....	46
1.3. Culture de cellules eucaryotes.....	46
2. Analyse des exosomes.....	46
2.1. Préparation du milieu de culture déplété en exosomes.....	46
2.2. Purification des exosomes.....	47
2.3. Quantification du niveau protéique des exosomes.....	47
2.4. Analyse par <i>Dynamic Light Scattering</i> (DLS).....	47
2.5. Analyse par microscopie électronique à transmission.....	47
2.6. Analyse par cytométrie de flux.....	48
2.7. Marquage des exosomes au PKH67 et internalisation par les cellules.....	48
2.8. Séparation de populations d'exosomes par immunocapture.....	49
2.9. Traitement des exosomes à la RNase A.....	49
3. Western blotting.....	50
4. Immunocytofluorescence.....	51
5. Coculture en système <i>transwell</i> .....	51
6. Coculture de contact et séparation des populations cellulaires.....	52
7. Transfection inverse de pré-miARN, d'anti-miARN et de siARN.....	52
8. Extraction d'ARN à partir de cellules et d'exosomes.....	53
9. Analyse quantitative de l'expression des miARN par TaqMan.....	53
10. Analyse quantitative de l'expression des gènes par qRT-PCR.....	54
11. Profilage de miARN par qRT-PCR.....	54
12. Tests fonctionnels.....	54
12.1. Test de prolifération par incorporation de BrdU.....	54
12.2. Test de migration par <i>Wound Healing Assay</i> .....	55
12.3. Test de migration en chambre de Boyden.....	55
12.4. Test de tubulogenèse.....	56
13. Analyses transcriptomiques par séquençage nouvelle génération.....	56
14. Analyse de la néovascularisation rétinienne.....	56
15. Analyses statistiques.....	57
16. Séquence des amorces de qRT-PCR.....	57
17. Séquence des siARN.....	58
Résultats.....	59
1. Les HUVEC et les HUVSMC s'échangent des miARN par l'intermédiaire des exosomes.....	59
1.1. Analyse de la taille et des marqueurs caractéristiques des exosomes.....	59

---

---

1.2. Les HUVEC et les HUVSMC sont capables d'internaliser des exosomes.....	60
1.3. Les HUVEC et les HUVSMC s'échangent des miARN.....	61
2. La coculture de HUVEC et de HUVSMC modifie le contenu en miARN des exosomes .....	63
3. Etude du rôle de miR-539-5p dans les fonctions des HUVEC .....	69
3.1. miR-539-5p régule les fonctions des HUVEC <i>in vitro</i> .....	69
3.2. miR-539-5p d'origine endothéliale régule les fonctions des HUVEC.....	69
3.3. miR-539-5p régule de nombreux gènes impliqués dans la prolifération et la migration des HUVEC.....	70
4. Etude du rôle de miR-582-5p dans les fonctions des HUVEC .....	73
4.1. miR-582-5p régule les fonctions des HUVEC <i>in vitro</i> .....	73
4.2. miR-582-5p d'origine musculaire régule les fonctions des HUVEC.....	73
4.3. miR-582-5p régule de nombreux gènes impliqués dans la prolifération et la formation de tubes des HUVEC .....	74
5. Etude du rôle de miR-539-5p sur les fonctions des HUVSMC.....	76
5.1. miR-539-5p régule la prolifération des HUVSMC <i>in vitro</i> .....	76
5.2. miR-539-5p d'origine endothéliale régule la prolifération des HUVSMC .....	77
5.3. miR-539-5p régule de nombreux gènes impliqués dans la prolifération des HUVSMC. ....	77
6. Etude du rôle de miR-582-5p sur les fonctions des HUVSMC.....	79
6.1. miR-582-5p régule les fonctions des HUVSMC <i>in vitro</i> .....	79
6.2. miR-582-5p d'origine musculaire régule la prolifération des HUVSMC .....	80
6.3. miR-582-5p régule de nombreux gènes impliqués dans la prolifération et la migration des HUVSMC .....	80
Résultats préliminaires .....	82
1. Etude du rôle de miR-539-5p et miR-582-5p sur la néovascularisation rétinienne .....	82
2. Etude <i>in silico</i> de l'expression de miR-539-5p et miR-582-5p chez des patientes atteintes du cancer du sein.....	83
Conclusions, discussion et perspectives.....	86
Données supplémentaires.....	98
1. Figures supplémentaires.....	98
2. Tables supplémentaires.....	102
Références bibliographiques.....	112
Liste des publications.....	128

---

# Introduction

## 1. L'angiogenèse

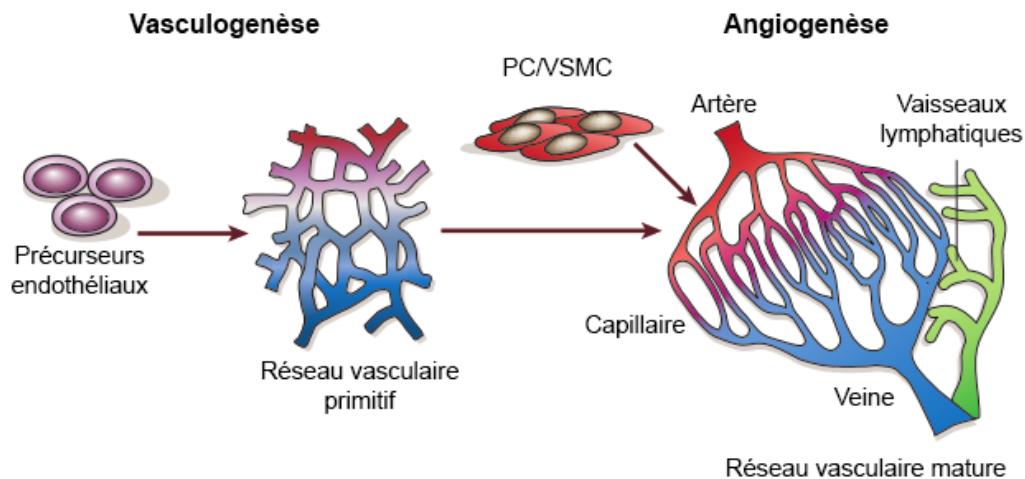
### 1.1. Généralités

Chez les Mammifères, l'embryon commence dans un premier temps par se développer en absence de vascularisation, la diffusion de l'oxygène et des nutriments étant suffisante à sa croissance. Néanmoins, cette diffusion ayant un champ d'action limité, le système circulatoire, composé du cœur, des vaisseaux sanguins et du sang, se développe alors très rapidement, se remodelant ensuite suivant les besoins de l'embryon. Ce système est le premier à se former durant l'embryogenèse, témoignant ainsi de sa grande importance.

Le développement de ce système vasculaire tient en deux temps. La formation du réseau vasculaire primaire se produit lors du processus de vasculogenèse. La croissance et le remodelage de ce réseau primaire relèvent ensuite du processus d'angiogenèse (Conway et al. 2001).

### 1.2. Formation du réseau vasculaire

Durant l'embryogenèse, le réseau vasculaire est créé lors de la vasculogenèse. Provenant du mésoderme, les cellules précurseurs des cellules endothéliales, les angioblastes, migrent, se différencient en cellules endothéliales et s'associent sous forme de tubes. Chez la souris, la vasculogenèse se produit entre les jours 7,5 et 8,5 du développement embryonnaire. Lors du processus d'angiogenèse, ce réseau primaire est remodelé en un réseau plus complexe formé de larges vaisseaux se ramifiant en vaisseaux de plus en plus petits. Ces vaisseaux arrivent finalement à maturité lorsque les cellules murales, comprenant les péricytes (PC) et les cellules musculaires lisses vasculaires (VSMC, *Vascular Smooth Muscle Cells*), sont recrutées afin de stabiliser les vaisseaux précédemment en croissance (**Figure 1**). L'angiogenèse est observée entre les jours 8,5 et 9,5 du développement embryonnaire de la souris. Les cellules murales, quant à elles, sont recrutées dans les jours qui suivent, les VSMC recouvrant l'aorte dès le jour 11,5 (Bautch & Caron 2015, Conway et al. 2001, Gaengel et al. 2009, Garcia & Larina 2014, Potente et al. 2011).



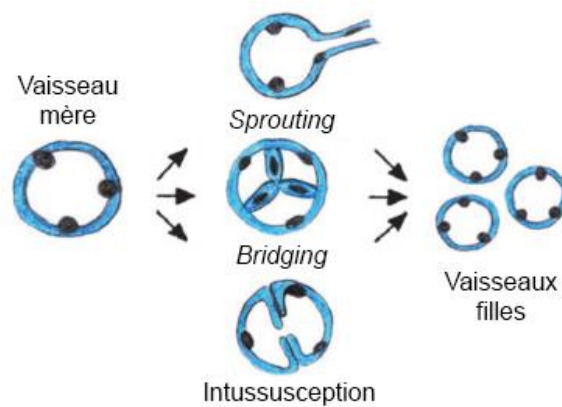
**Figure 1 : Développement du réseau vasculaire.** Durant la vasculogenèse, les précurseurs endothéliaux s'assemblent en un réseau vasculaire primitif, le plexus. Ensuite, lors du processus d'angiogenèse, ce réseau se développe et croît. Des cellules murales, comprenant les péricytes (PC) et les cellules musculaires lisses vasculaires (VSMC), sont finalement recrutées afin de stabiliser les vaisseaux en croissance, donnant naissance au réseau vasculaire mature. Les vaisseaux lymphatiques, quant à eux, se développent par transdifférenciation des veines. Adapté de (Carmeliet 2005).

Après la naissance, l'angiogenèse contribue toujours à la croissance des organes (Carmeliet 2005). Néanmoins, chez l'adulte, le réseau vasculaire se trouve dans un état dit quiescent, avec seulement 0,01% des cellules endothéliales entrant en division cellulaire (Carmeliet & Jain 2000). Les cellules endothéliales en quiescence restent tout de même hautement sensibles aux divers signaux pro-angiogènes et l'angiogenèse peut dès lors être réactivée ponctuellement lors, par exemple, du cycle menstruel ou de la réparation tissulaire. Une réactivation anormale de ce processus peut également mener à diverses pathologies telles que le cancer, des maladies inflammatoires ou encore des rétinopathies (Milkiewicz et al. 2006, Potente et al. 2011).

### 1.3. Développement du réseau vasculaire

L'angiogenèse peut se produire selon trois procédés différents, aboutissant tous à l'expansion du réseau vasculaire. Les nouveaux vaisseaux sanguins peuvent se former par bourgeonnement (ou *sprouting*), où les cellules endothéliales prolifèrent et migrent suite à la stimulation de celles-ci par des facteurs de croissance tels que le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) ou le FGF (*Fibroblast Growth Factor*). Les vaisseaux peuvent également être formés par *bridging*, c'est-à-dire par la septation d'un vaisseau suite à la prolifération de cellules endothéliales à l'intérieur de celui-ci. Finalement, de nouveaux vaisseaux peuvent être formés par intussusception, où le vaisseau s'élargit pour se diviser ensuite en de nouveaux vaisseaux (**Figure 2**) (Carmeliet 2000, Carmeliet & Jain 2011a).



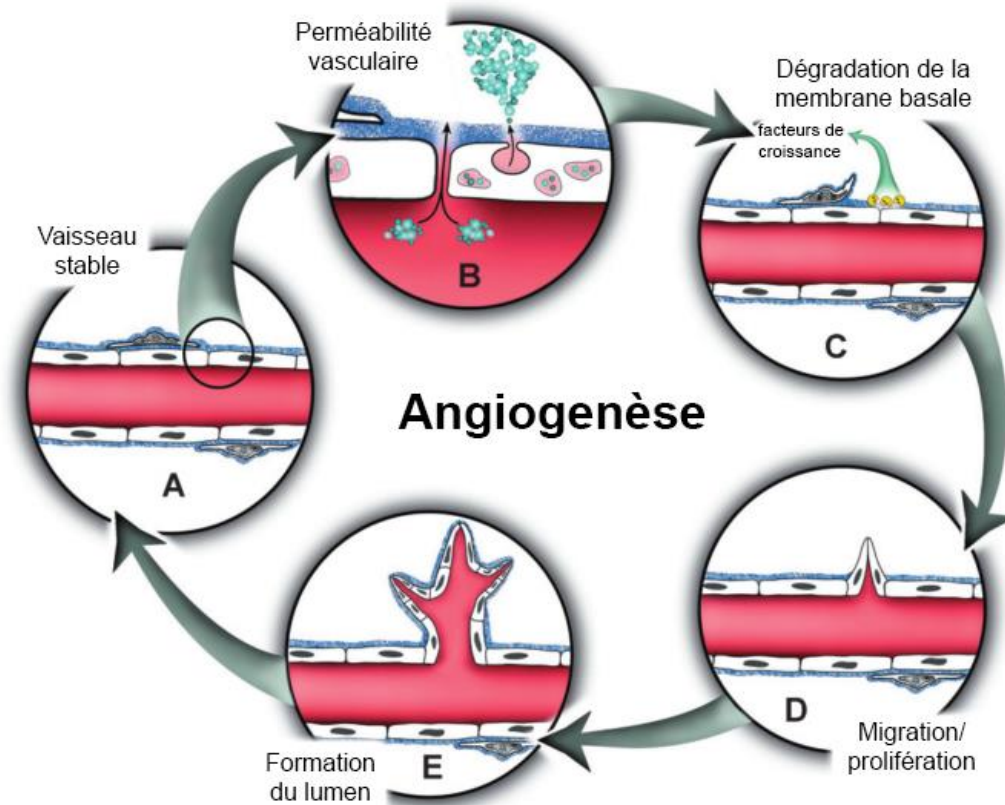


**Figure 2 : Mécanismes de l'angiogenèse.** L'obtention d'un réseau vasculaire mature grâce à l'angiogenèse se produit selon trois mécanismes différents. Les nouveaux vaisseaux sanguins peuvent se former par bourgeonnement (*sprouting*), par septation d'un vaisseau (*bridging*) ou par intussusception. Adapté de (Korpisalo & Ylä-Herttuala 2010).

#### 1.4. Etapes de l'angiogenèse

Lors du développement de l'organisme, les vaisseaux sanguins préexistants ne sont plus en nombre suffisant pour apporter l'oxygène ainsi que les nutriments nécessaires à la survie de toutes les cellules. Les tissus en croissance présentent alors des zones en hypoxie. Ce manque d'oxygénation induit la stabilisation du facteur de transcription HIF-1 (*Hypoxia Inducible Factor-1*). Ce facteur s'associe ensuite à des éléments de réponse à l'hypoxie (HRE, *Hypoxia Responsive Element*) présents au niveau du promoteur de gènes notamment impliqués dans l'angiogenèse. Ceci induit alors l'expression de molécules telles que le VEGF et ses récepteurs, les neuropilines 1 et 2, le TGF- $\beta$ 1 (*Transforming Growth Factor- $\beta$ 1*), le PDGF-BB *Platelet-Derived Growth Factor-BB*) et l'angiopoïétine 2 (Ang2) (Conway et al. 2001). Le VEGF est le facteur clé dans la plupart des événements morphogénétiques de l'angiogenèse et contrôle la perméabilité, la prolifération, la migration et la survie des cellules endothéliales (Affolter et al. 2009).

Comme vu précédemment, les vaisseaux sanguins peuvent être formés à la suite de divers mécanismes. Ceux-ci sont activés selon le type de stress subi par l'organisme. Ainsi, par exemple, dans les muscles squelettiques, l'élongation musculaire induit la formation de nouveaux capillaires par bourgeonnement tandis que le stress de cisaillement induit le *bridging* des vaisseaux existants (Milkiewicz et al. 2006). Cependant, l'angiogenèse par bourgeonnement est la plus largement étudiée à l'heure actuelle. Celle-ci est caractérisée par plusieurs étapes (**Figure 3**).



**Figure 3 : Formation de nouveaux vaisseaux.** A. Le vaisseau sanguin est stable. B. Suite à l'exposition à des facteurs pro-angiogènes, la vasodilatation et la perméabilité vasculaire augmentent. C. La membrane basale est dégradée et les facteurs de croissance qu'elle contient sont libérés. D. Le bourgeon s'allonge suite à la migration et à la prolifération des cellules endothéliales vers le stimulus pro-angiogène. E. Le lumen se forme et le vaisseau se stabilise pour arriver à maturité. Adapté de (Bryan & D'Amore 2007).

#### 1.4.1. Vasodilatation et perméabilité des vaisseaux

La vasodilatation, en réponse à l'oxyde nitrique (NO), est l'une des premières étapes de l'angiogenèse. Le VEGF induit l'expression de l'oxyde nitrique synthase (NOS), stimulant ainsi la production de NO par les cellules endothéliales (Cooke 2003). Ceci conduit à une augmentation de la perméabilité vasculaire. Celle-ci est notamment due à la formation de fenestrations, d'organelles vésiculo-vacuolaires, c'est-à-dire de réseaux de vésicules et de vacuoles reliant les faces luminale et abluminale des cellules endothéliales et permettant l'extravasation de macromolécules, et à la redistribution de molécules d'adhésion intercellulaires telles que le PECAM-1 (*Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1*) et la VE-cadhérine (*Vascular Endothelial-cadhérine*). La perméabilité vasculaire est également favorisée par l'Ang2, un inhibiteur de la voie de signalisation Tie2, permettant le détachement des cellules murales, la détérioration de la matrice environnante et, par conséquent, la migration des cellules endothéliales (Caporali et al. 2016, Conway et al. 2001, Dvorak & Feng 2001, Milkiewicz et al. 2006).

### 1.4.2. Dégradation de la matrice extracellulaire

La dégradation de la matrice extracellulaire implique une série de métalloprotéinases (MMP), des protéases capables de dégrader de nombreux composants de la matrice extracellulaire. Celles-ci ne vont pas seulement créer un environnement propice à la migration des cellules endothéliales mais elles vont également libérer différents facteurs de croissance, à l'origine séquestrés dans la matrice, tels que le bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*), le VEGF et l'IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor-1*) (Conway et al. 2001, Potente et al. 2011).

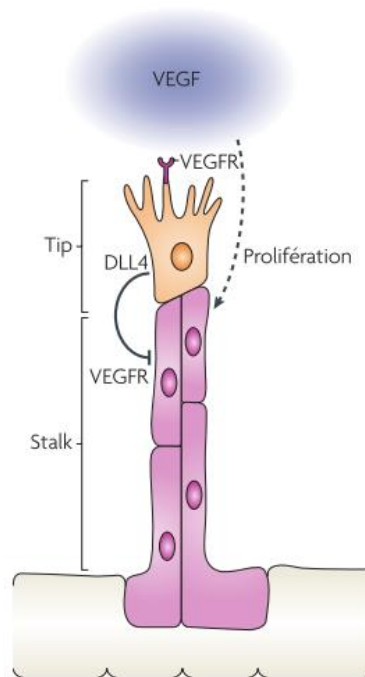
Un autre acteur de cette dégradation de la matrice extracellulaire est le système plasmine/plasminogène. La plasmine est une protéase issue du clivage du plasminogène par l'uPA (*urokinase Plasminogen Activator*). Elle intervient dans la dégradation de la matrice extracellulaire soit directement, soit indirectement en activant des MMP (Tkachuk et al. 2009).

### 1.4.3. Elongation des vaisseaux

Une fois les barrières physiques éliminées, les cellules endothéliales sont libres de proliférer et de migrer vers les sites nécessitant une vascularisation.

Le vaisseau en cours d'élongation est composé de cellules endothéliales spécialisées, à savoir les cellules *tip* et les cellules *stalk*. La cellule *tip* se trouve à l'extrémité du vaisseau en élongation et est suivie des cellules *stalk*. Sensible aux gradients de VEGF, la cellule *tip* se dirige vers la source en VEGF grâce à la présence de nombreux filopodes, conduisant alors les cellules *stalk* dans son sillage. Ces dernières se divisent alors afin de conduire à l'élongation du vaisseau. A chaque branchement, une nouvelle cellule endothéliale prend le rôle de cellule *tip* et conduit ainsi le nouveau vaisseau à destination (Bautch & Caron 2015). La spécification de la cellule *tip* est contrôlée par la voie Notch. Des analyses de la voie Notch révèlent que Notch1 est fortement exprimé au niveau des cellules *stalk* tandis qu'il ne l'est que très peu au niveau de la cellule *tip*. Au contraire, un ligand au récepteur Notch1, Dll4 (*Delta-like ligand 4*), est très exprimé par la cellule *tip*. La liaison de Dll4 à son récepteur au niveau des cellules avoisinantes diminue l'expression de l'un des récepteurs au VEGF, le VEGFR-2 (*VEGF Receptor-2*), générant ainsi le phénotype de cellule *stalk* (**Figure 4**) (Potente et al. 2011). Les cellules endothéliales possèdent une grande plasticité. Ainsi, au cours de l'élongation du vaisseau, chaque cellule peut devenir à son tour une cellule *tip*, une cellule *stalk* ou encore entrer en quiescence. En plus d'être influencée par la voie de signalisation de Notch1, la spécification des cellules *tip* et *stalk* est également dépendante de la voie des BMP (*Bone Morphogenic Proteins*). Ainsi, l'activation de la voie de signalisation des BMP induit la phosphorylation de protéines Smad, notamment Smad1 et Smad5, et la formation de complexes entre celles-ci et les récepteurs aux BMP. Ces complexes sont alors capables de se lier

au produit du clivage du domaine intracellulaire de Notch1, conduisant ensuite à l'expression de HES1 (*Hairy and Enhancer of Split*) et HEY1 (*Hairy/Enhancer-of-split-related with YRPW motif*). Finalement, la stabilisation de HES1 par les protéines Id inhibe l'expression de Dll4 et conduit à la perte des marqueurs de cellule *tip* (Beets et al. 2013). Ainsi, chez la souris, l'inhibition de l'expression de Smad1 et Smad5 conduit à des défauts dans la spécification des cellules *tip* et *stalk*, un grand nombre de cellules prenant alors un aspect de cellule *tip* (Moya et al. 2012).



**Figure 4 : Induction des phénotypes de cellules *tip* et *stalk*.** Au cours de l'angiogenèse, la voie de signalisation du VEGF induit la formation de bourgeons angiogènes et contrôle l'identité de la cellule *tip* (en orange) et des cellules *stalk* (en rose) via la voie de signalisation Delta-Notch. Adapté de (Affolter et al. 2009).

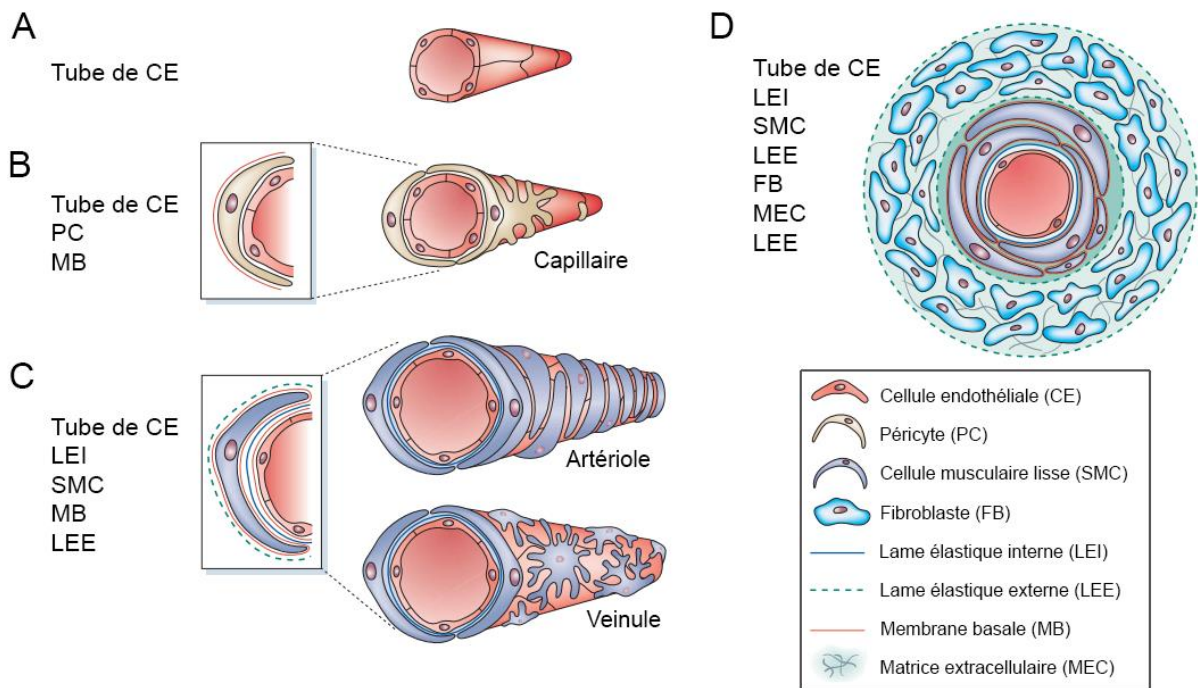
#### 1.4.4. Formation du lumen

La formation du lumen est nécessaire à l'établissement du flux sanguin. Il se produit en parallèle de l'élongation des vaisseaux et découle de différents mécanismes. Le lumen peut se former suite à la coalescence de vacuoles intracellulaires entre cellules voisines. Un autre mécanisme consiste en le réarrangement des jonctions intercellulaires afin de créer un espace entre les cellules voisines. Ces procédés nécessitent une réorganisation du cytosquelette et l'action de MMP (Betz et al. 2016, Potente et al. 2011). De plus, les intégrines jouent un rôle important dans la formation du lumen grâce à leur interaction avec la matrice extracellulaire et l'induction de voies de signalisation telles que celle des MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) ou des Rho GTPases (Avraamides et al. 2008, Bryan & D'Amore 2007)

Le diamètre du lumen est régulé par différents facteurs, notamment les différentes isoformes du VEGF. Le VEGF<sub>121</sub> ainsi que le VEGF<sub>165</sub> augmentent le diamètre du lumen tandis que le VEGF<sub>189</sub> le réduit (Conway et al. 2001).

#### **1.4.5. Maturation des vaisseaux**

Une fois les nouveaux vaisseaux formés, ceux-ci sont stabilisés par des cellules murales (PC et VSMC) afin d'aboutir à des vaisseaux fonctionnels. Les PC et les cellules endothéliales sont intégrés au sein d'une membrane basale unique. Celle-ci est à la fois formée par les PC et les cellules endothéliales et est interrompue à divers endroits afin de permettre des contacts directs entre les deux types cellulaires (Caporali et al. 2016). Les VSMC sont, quant à elles, séparées des cellules endothéliales par une matrice extracellulaire. Ces cellules murales inhibent la prolifération ainsi que la migration des cellules endothéliales, stabilisant dès lors le vaisseau venant d'être formé. Les PC recouvrent les vaisseaux de petit calibre dont le diamètre est inférieur au millimètre, à savoir les capillaires. Les VSMC, quant à elles, recouvrent les vaisseaux de calibre moyen, tels que les veinules et les artérioles, ainsi que les vaisseaux de plus gros calibre comme les artères et les veines (Conway et al. 2001). Au niveau des artères, les cellules endothéliales sont recouvertes de plusieurs couches de VSMC. Les veines, quant à elles, sont moins recouvertes de VSMC (**Figure 5**) (Potente et al. 2011).



**Figure 5 : Composition des vaisseaux naissants et des vaisseaux matures.** **A.** Les vaisseaux naissants sont composés de cellules endothéliales. Les vaisseaux se développent ensuite en capillaires, artères et veines. **B.** Les capillaires sont composés d'un tube de cellules endothéliales enveloppé d'une membrane basale dans laquelle sont intégrés quelques péricytes. **C.** Les artérioles et les veinules possèdent une couverture en cellules murales plus dense que les capillaires. **D.** La paroi des plus gros vaisseaux sont composés de trois couches distinctes : l'intima, la média et l'adventice. L'intima est composée de cellules endothéliales, la média de cellules musculaires lisses et l'adventice de fibroblastes. Adapté de (Jain 2003).

Les cellules endothéliales composant les artères et les veines possèdent une identité moléculaire spécifique. Les composants de la voie de signalisation Notch sont hautement exprimés au sein des artères tandis qu'ils sont peu exprimés au niveau des veines. La répression de la voie Notch entraîne la perte des marqueurs artériels et la réexpression des marqueurs veineux, indiquant que Notch induit la spécification artérielle en inhibant l'identité veineuse. De plus, Notch contrôle les membres de la famille Eph-Ephrine, qui configure les limites artério-veineuses. L'expression de l'Ephrine B2 au niveau des cellules endothéliales artérielles est augmentée en réponse à la voie de signalisation Notch tandis que son récepteur, EphB4, est réprimé par Notch dans les cellules endothéliales veineuses (Conway et al. 2001, Potente et al. 2011, Wang et al. 1998).

Lors de l'étape de maturation des vaisseaux, les cellules murales sont recrutées grâce à la sécrétion de PDGF-BB, un chimioattractant, par les cellules endothéliales. Cette molécule induit la prolifération et la migration des cellules murales et possède un motif de rétention à son extrémité C-terminale, lui permettant de se lier aux protéoglycanes à héparane sulfate présentes dans la

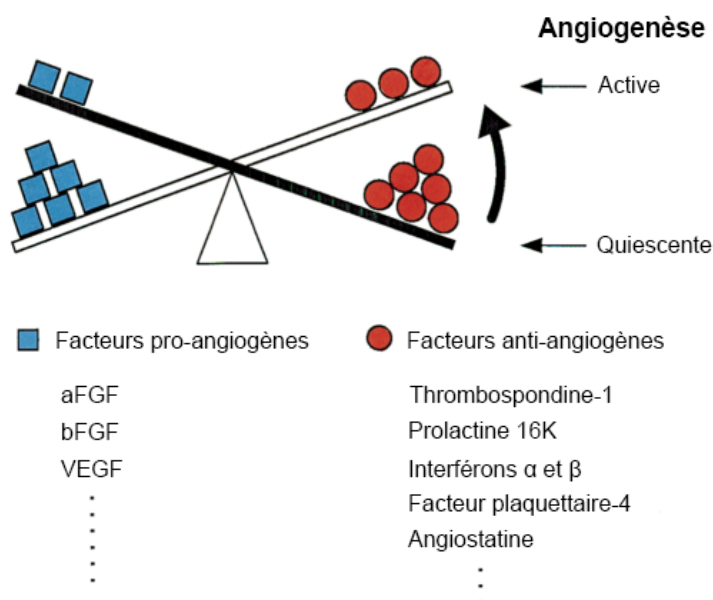
matrice extracellulaire ou au niveau de la surface cellulaire. Cette rétention permet une forte liaison entre le PDGF-BB et son récepteur, le PDGFR- $\beta$  (*PDGF Receptor- $\beta$* ), au niveau du vaisseau nécessitant une stabilisation (Caporali et al. 2016). En retour, les cellules murales produisent de l'angiopoïétine 1 (Ang1) qui augmente la survie des cellules endothéliales en stimulant l'expression d'une protéine anti-apoptotique, la survivine. Les membres de la famille du TGF- $\beta$  sont également importants dans le phénomène de maturation des vaisseaux. En effet, le TGF- $\beta$ 1, le TGF- $\beta$  récepteur-2, l'endogline et Smad5 travaillent de concert afin de stabiliser le vaisseau en induisant la différenciation des cellules murales. La prolifération et la migration des cellules endothéliales sont également influencées par le TGF- $\beta$ 1 qui régule l'identité des cellules *tip* et *stalk*. Ainsi, en présence de fortes concentrations en TGF- $\beta$ 1, les cellules endothéliales expriment moins de VEGFR-2 et de Notch1, abolissant de concert le phénotype de la cellule *tip* ainsi que celui des cellules *stalk* (Jarad et al. 2017). La sphingosine-1-phosphate, sécrétée par les cellules murales, et son récepteur, présent à la surface des cellules endothéliales, interviennent également dans le contrôle des interactions entre cellules endothéliales et cellules murales en agissant sur le cytosquelette, les jonctions cellulaires et l'adhésion des cellules. Cette voie influence également la migration, la prolifération et la survie cellulaires. Finalement, les cellules endothéliales produisent une nouvelle membrane basale et entrent en quiescence (Conway et al. 2001, Potente et al. 2011).

La stabilisation des vaisseaux est une étape importante à l'obtention d'un réseau vasculaire fonctionnel. En effet, les vaisseaux ne présentant pas de couverture murale adéquate montrent de nombreuses anomalies telles qu'une tortuosité vasculaire, des microanévrismes, une altération de l'organisation des jonctions entre cellules endothéliales et une augmentation de la perméabilité des vaisseaux (Ribatti et al. 2015). Dans certains tissus, les cellules murales possèdent des fonctions spécialisées. C'est notamment le cas des cellules stellaires hépatiques que l'on retrouve au niveau des sinusoides. Un autre exemple est celui des cellules mésangiales présentes au niveau des capillaires fenestrés rénaux (Bergers & Song 2005).

### **1.5. Régulation de l'angiogenèse**

Comme expliqué précédemment, l'angiogenèse est très active lors de l'embryogenèse. Ce processus n'est, néanmoins, plus actif à l'âge adulte où les vaisseaux sanguins sont en quiescence. Cependant, l'angiogenèse peut être à nouveau stimulée dans certaines conditions comme lors du cycle menstruel, de l'inflammation et de la réparation tissulaire. Afin de n'être que ponctuellement réactivé, ce processus est finement régulé par une balance entre des facteurs pro-angiogènes et des facteurs anti-angiogènes. Un excès en facteurs anti-angiogènes permet de maintenir les cellules endothéliales en quiescence tandis qu'un excès en facteur pro-angiogènes induit l'activation de l'angiogenèse. Le passage de l'angiogenèse quiescente à l'angiogenèse active est

appelé le *switch* angiogène (**Figure 6**) (Bergers & Benjamin 2003, Hanahan & Folkman 1996). De nombreuses pathologies sont caractérisées par une angiogenèse dérégulée. C'est notamment le cas de maladies ophtalmiques et inflammatoires et du développement tumoral, mais aussi lors de problèmes de santé liés à l'obésité, le diabète ou l'asthme (Carmeliet 2005).



**Figure 6 : La balance angiogène.** Le réseau vasculaire en quiescence peut être temporairement stimulé à croître suite au *switch* angiogène. La balance entre les facteurs pro- et anti-angiogènes est alors modifiée en faveur des facteurs pro-angiogènes. Adapté de (Hanahan & Folkman 1996).

### 1.5.1. Les facteurs pro-angiogènes

Les facteurs pro-angiogènes ont, pour la plupart, été décrits dans la section 1.4. On retrouve parmi ceux-ci les différents membres de la famille du VEGF et leurs récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2 – les effets pro-angiogènes observés étant essentiellement dûs à l'activité du VEGFR-2 –, l'aFGF (*acidic Fibroblast Growth Factor*), le bFGF, le PDGF, les angiopoïétines et leur récepteur Tie-2, le TGF- $\beta$ , HIF-1 et les MMP (Conway et al. 2001, Shibuya 2011).

### 1.5.2. Les facteurs anti-angiogènes

De nombreuses molécules anti-angiogènes sont issues de la dégradation de composants de la matrice extracellulaire (MEC) par diverses enzymes telles que les MMP, les cathepsines ou les élastases. Le premier inhibiteur de l'angiogenèse découvert est la thrombospondine-1, une protéine de liaison aux héparanes sulfates (Good et al. 1990). Celle-ci est capable d'inhiber la prolifération et la migration des cellules endothéliales et d'induire leur apoptose. Elle déstabilise également les contacts entre les cellules endothéliales. L'endostatine est le fragment C-terminal de 20 kDa du collagène de type XVIII (O'Reilly et al. 1997). Ce fragment agit directement sur les



cellules endothéliales en altérant leur prolifération et leur migration mais également en bloquant leur cycle cellulaire en phase G1 et en induisant leur apoptose. De plus, il agit de manière indirecte sur l'angiogenèse en inhibant l'activité de MMP-2, en bloquant la liaison du VEGF à son récepteur et en stabilisant les contacts entre les cellules ainsi que l'adhésion à la MEC (Ribatti 2009, Tabruyn & Griffioen 2007).

D'autres molécules anti-angiogènes ne proviennent pas de la dégradation de la MEC. De nombreuses cytokines immunitaires possèdent également des propriétés anti-angiogènes. L'interféron- $\alpha$ , par exemple, inhibe la tubulogénèse *in vitro* et bloque la production de bFGF par les cellules tumorales. Les interleukines (IL) régulent également l'angiogenèse. Ainsi, les IL-1 $\beta$ , -4, -12 et -18 présentent des propriétés anti-angiogènes (Ribatti 2009).

D'autres facteurs, notamment issus du clivage de facteurs de coagulation, possèdent également des fonctions anti-angiogènes. L'angiostatine, par exemple, est obtenue suite au clivage du plasminogène. Ce fragment induit l'apoptose des cellules endothéliales et inhibe leur prolifération et leur migration. Le facteur plaquettaire-4 est une chimiokine connue pour inhiber l'angiogenèse. Secrétée par les plaquettes, cette molécule est capable d'empêcher la migration et la prolifération des cellules endothéliales (Ribatti 2009, Tabruyn & Griffioen 2007). Le fragment N-terminal de 16 kDa de la prolactine (PRL 16K) bloque également la migration et la prolifération des cellules endothéliales et induit leur apoptose (Bajou et al. 2014).

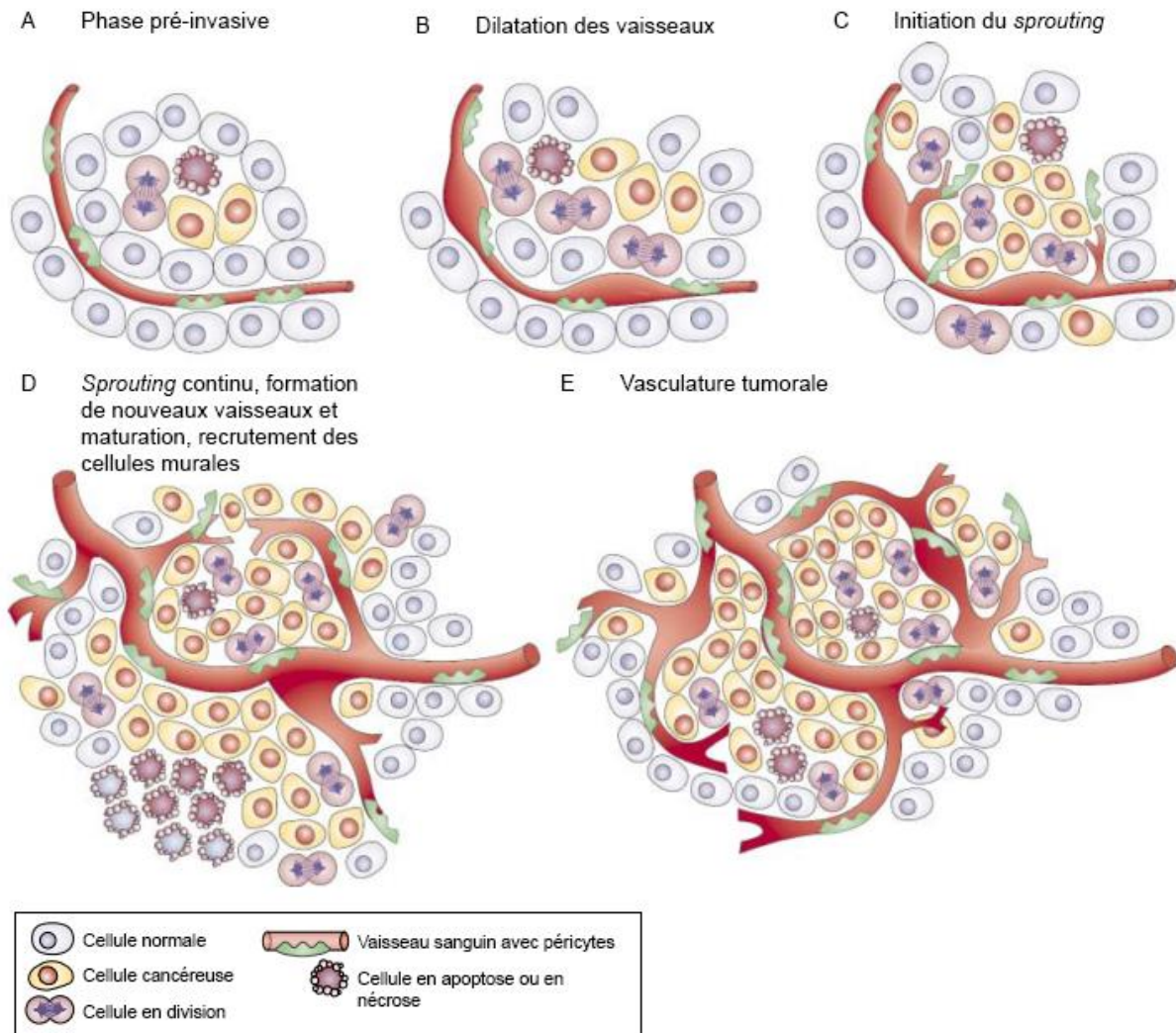
Finalement, une nouvelle catégorie de régulateurs de l'angiogenèse a été découverte il y a plusieurs années : les microARN (miARN ou miR). Ces petits ARN simple-brin régulent négativement l'expression de gènes, ayant alors un impact sur de nombreux processus biologiques. La biogenèse, le mode d'action ainsi que le rôle de ces molécules dans l'angiogenèse seront détaillés au point 2 de cette introduction.

## **1.6. L'angiogenèse tumorale**

Le développement tumoral débute par l'activation d'oncogènes suite à l'accumulation d'altérations génétiques et épigénétiques. Ceci induit la prolifération des cellules tumorales ainsi qu'une altération du taux d'apoptose. A mesure que le néoplasme se développe et croît, certaines zones se retrouvent en hypoxie. Si la tumeur n'est pas capable d'initier l'angiogenèse, celle-ci s'arrête alors de croître et atteint une taille d'environ 2 à 3 mm (Folkman 1971). Néanmoins, si la tumeur en est capable, la vascularisation de celle-ci lui permet alors d'obtenir l'oxygène et les nutriments nécessaires à son développement. Le développement tumoral est donc caractérisé par deux phases : une phase pré-invasive et une phase invasive. Le passage d'une phase à l'autre est caractérisé par la réactivation de l'angiogenèse via le *switch* angiogène. Le développement des

vaisseaux sanguins tumoraux ressemble fortement à celui des vaisseaux sanguins sains, à la différence que les cellules endothéliales tumorales n'entrent plus en quiescence une fois le vaisseau formé. En conséquence, les vaisseaux sanguins tumoraux développent des caractéristiques uniques, se distinguant des vaisseaux issus du système vasculaire normal (Bergers & Benjamin 2003).

Lors de la phase pré-invasive, la tumeur croît sous la forme d'un petit nodule avasculaire jusqu'à atteindre une taille critique où le nombre de cellules en apoptose est en équilibre avec le nombre de cellules en prolifération. Survient alors le *switch* angiogène, accompagné du passage à la phase invasive. Une augmentation de la production de VEGF, de FGF et de PlGF (*Placental Growth Factor*) par le microenvironnement tumoral déstabilise ainsi la balance angiogène en faveur de la croissance de nouveaux vaisseaux. Lors de cette phase invasive, les vaisseaux préexistants donnent naissance à de nouveaux vaisseaux, permettant alors un meilleur apport en oxygène et en nutriments de la tumeur. Celle-ci peut alors croître de manière exponentielle et envahir le tissu environnant (**Figure 7**) (Bergers & Benjamin 2003).



**Figure 7 : Le *switch* angiogène.** **A.** La tumeur grandit sous forme d'un nodule avasculaire jusqu'à atteindre une taille où le nombre de cellules en apoptose compense celui de cellules en prolifération. **B.** Le *switch* angiogène se déclenche et commence avec le détachement des cellules murales et la dilatation des vaisseaux préexistants. **C.** S'ensuit alors le bourgeonnement de nouveaux vaisseaux. **D.** Ceux-ci se développent au fur et à mesure que la tumeur croît. **E.** La tumeur est alors complètement vascularisée et reçoit l'oxygène et les nutriments nécessaires à sa survie. Adapté de (Bergers & Benjamin 2003).

Les vaisseaux recrutés au sein des tumeurs sont tortueux et désorganisés. Des régions fortement vascularisées côtoient des régions pauvres en vaisseaux sanguins. Les jonctions entre cellules endothéliales sont fragilisées et leur organisation s'en retrouve modifiée, permettant alors l'apparition de plusieurs couches de cellules. L'identité artério-veineuse n'est pas aussi bien définie que lors de l'angiogenèse non-pathologique. La membrane basale est irrégulière et les cellules murales y adhèrent moins bien, rendant la couverture murale des vaisseaux plus éparse. On observe également l'intégration de cellules cancéreuses au sein de l'endothélium lors du processus appelé *vascular mimicry* (Bergers & Benjamin 2003, Carmeliet & Jain 2011a,b, Potente et al. 2011). Certains vaisseaux sanguins tumoraux montrent des lumens déstructurés ne

contenant que peu de globules rouges, indiquant que ces vaisseaux ne sont pas impliqués dans l'oxygénation des tissus. De plus, il est connu que de nombreuses tumeurs dépendent moins de l'oxygénation pour se développer en comparaison avec les tissus sains. Ceci est notamment dû à une augmentation de l'activité de HIF au sein des cellules tumorales ainsi qu'à la présence d'autres facteurs conférant des propriétés invasives et induisant des résistances aux thérapies (Semenza 2012).

Dans le cadre du développement tumoral, le réseau vasculaire n'est pas uniquement limité à des fonctions de transport de nutriments et d'oxygène. Les vaisseaux présents au sein de la tumeur peuvent également contribuer à la croissance tumorale en fournissant un support physique et en régulant les fonctions du stroma, en fournissant une niche pour les cellules souches associées à la tumeur, en permettant la dissémination des métastases et, finalement, en induisant un contexte immunitaire particulier au sein de la tumeur (Orr & Eberhart 2015).

Le réseau vasculaire est important dans le développement de structures définies, que cela soit au niveau des organes sains ou des tumeurs. Dans les tumeurs, les vaisseaux sanguins sont altérés. Ceux-ci présentent de nombreuses fenestrations et, par conséquent, une augmentation de leur perméabilité. Leur couverture péricytaire est également réduite. Une façon qu'ont les vaisseaux sanguins tumoraux de réguler le microenvironnement tumoral est par leurs interactions avec la MEC. Celle-ci est composée de nombreuses protéines fibreuses interagissant avec les laminines, le collagène et la fibronectine. Les cellules endothéliales adhèrent fortement à la membrane basale contenant du collagène IV et d'autres éléments en contact avec la MEC. Les adhésions focales, qui relient le cytosquelette des cellules endothéliales à la MEC, permettent au stroma et aux vaisseaux sanguins de s'influencer l'un et l'autre grâce à la présence de récepteurs transmembranaires, des intégrines et d'autres cascades de transduction (Lu et al. 2012).

Le réseau vasculaire tumoral permet également l'établissement de niches composées de cellules souches cancéreuses (CSC). Ces niches sont préférentiellement présentes dans les régions périvasculaires, où les CSC et les cellules endothéliales communiquent. Le VEGF produit par la tumeur induit diverses voies de signalisation dans les cellules endothéliales, permettant alors le maintien des niches de CSC et le développement tumoral. Par exemple, dans le cadre d'un carcinome ou d'un papillome squameux chez la souris, les niches de CSC sont dépendantes de la voie de signalisation du VEGF. Ainsi, lorsque l'expression du VEGFR-2 est bloquée, les tumeurs régressent complètement en deux semaines (Beck et al. 2011).

Il est actuellement clair que la vascularisation d'une tumeur est essentielle à la dissémination des métastases vers des organes distants. Néanmoins, tous les vaisseaux sanguins ne conduisent pas à ce phénomène. En effet, selon le degré de maturité des vaisseaux adjacents à la tumeur, celle-

ci ne peut pas toujours libérer des cellules métastatiques. Ainsi, dans le cadre du cancer du sein, les cellules métastatiques sont maintenues en dormance grâce à la thrombospondine-1 se trouvant à proximité des vaisseaux matures. Ces cellules métastatiques sont, cependant, capables de rejoindre les organes distants lorsque qu'elles se trouvent à proximité de vaisseaux en croissance (Ghajar et al. 2013).

Finalement, les vaisseaux sanguins peuvent également conférer un avantage immunitaire à la tumeur en croissance. Les cellules immunitaires nécessitent la présence de molécules d'adhésion à leur surface ainsi qu'à celle des cellules endothéliales afin de se déplacer vers le site d'action. Dans certains cancers, tels que les carcinomes rénaux ou les mélanomes, on observe une diminution des molécules d'adhésion ICAM-1 (*InterCellular Adhesion Molecule-1*) et VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*) à la surface des cellules endothéliales intratumorales (Hellwig et al. 1997, Piali et al. 1995).

### **1.7. La thérapie anti-angiogène**

L'angiogenèse étant un processus important au développement et à la progression de la majorité des cancers, l'inhibition de celle-ci apparaît donc comme étant une stratégie thérapeutique prometteuse aux yeux de la communauté scientifique. De plus, contrairement aux cellules cancéreuses qui présentent une instabilité génétique ainsi qu'une hétérogénéité importante, les cellules endothéliales n'acquièrent pas facilement de mutations, ce qui laisse supposer qu'elles ne devraient pas devenir résistantes aux thérapies anti-cancéreuses. (Bergers & Benjamin 2003). Par ailleurs, les traitements anti-angiogènes ne ciblent que les cellules endothéliales en prolifération, augmentant ainsi leur spécificité pour les vaisseaux sanguins tumoraux et minimisant leur toxicité puisque les vaisseaux sanguins chez l'adulte sont majoritairement à l'état quiescent (Yadav et al. 2015).

A l'heure actuelle, six molécules ont reçu l'approbation de la *Food and Drug Administration* et sont utilisées cliniquement dans le traitement de cancers. Ces molécules ont toutes pour cibles différents acteurs impliqués dans la voie de signalisation du VEGF. Le bevacizumab, un anticorps se liant au VEGF-A, est utilisé en combinaison avec la chimiothérapie lors du traitement de cancers métastatiques avancés tels que le cancer colorectal, le cancer rénal ou le cancer du sein (Potente et al. 2011). Le sorafenib, le sunitinib, le pazopanib et le vandetanib sont des inhibiteurs des récepteurs à activité tyrosine kinase dont font partie les récepteurs au VEGF, au PDGF et à l'EGF (*Epidermal Growth Factor*). Pour finir, l'everolimus inhibe mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) (Yadav et al. 2015). Ces traitements basés sur l'inhibition de la voie de signalisation du VEGF augmentent la durée de vie de nombreux patients atteints du cancer. Néanmoins, ces thérapies restent limitées et n'accordent en réalité que quelques mois supplémentaires aux

patients. De plus, bien que ces molécules anti-angiogènes inhibent le développement de la tumeur primaire, elles peuvent également favoriser la dissémination de métastases (Carmeliet & Jain 2011b). En effet, en détruisant les vaisseaux approvisionnant la tumeur, un environnement hostile, hypoxique et acide, se crée. La tumeur présentant une population hétérogène de cellules cancéreuses, les clones les plus résistants sont alors sélectionnés et peuvent envahir les organes distants en rejoignant la circulation sanguine.

Il apparaît, dès lors, nécessaire d'établir de nouvelles stratégies thérapeutiques, l'inhibition seule de la voie de signalisation du VEGF n'étant pas suffisante pour traiter efficacement les cancers. Une première possibilité est de cibler plusieurs voies de signalisation impliquées dans l'angiogenèse afin d'augmenter les effets des thérapies anti-angiogènes actuelles.

Une seconde option est de normaliser les vaisseaux sanguins tumoraux. Bien que ce principe soit, à priori, au strict opposé de la thérapie anti-angiogène, on observe souvent une phase de normalisation des vaisseaux sanguins tumoraux avant la régression de ceux-ci lors de traitements anti-angiogènes. Lors de cette période de normalisation, la perfusion sanguine et l'oxygénation du tissu tumoral s'améliore, rendant celui-ci plus accessible aux agents chimiothérapeutiques et plus sensible aux traitements par radiations. En normalisant ces vaisseaux dysfonctionnels, l'organisation de ceux-ci devient moins chaotique. Les vaisseaux deviennent moins perméables, les cellules endothéliales formant des jonctions intercellulaires plus fortes, et la couverture des vaisseaux par les cellules murales est restaurée. La dissémination des métastases est alors fortement limitée (Carmeliet & Jain 2011b, Mazzone et al. 2009).

Cette période étant de courte durée, il est intéressant de découvrir des molécules permettant de prolonger ces effets.

## 2. Les microARN

### 2.1. Généralités

Les miARN sont de petits ARN non codant ayant un rôle dans la régulation de la traduction protéique et la dégradation des ARN messagers (ARNm). On estime que les miARN régulent 60% des ARNm chez l'humain et qu'ils sont associés à la régulation de tous les processus physiologiques. Ces miARN peuvent être spécifiques à certains tissus et être dérégulés lors de certaines pathologies (Tonge & Gant 2016).

Le premier miARN a été découvert en 1993 chez *Caenorhabditis elegans*. En effet, le gène *lin-4* ne code pas pour une protéine mais pour un ARN de 22 nucléotides capable de s'apparier avec l'ARNm de *lin-14* et de réguler la synthèse protéique de celui-ci (Lee et al. 1993). Depuis lors, d'autres miARN ont été découverts dans de nombreux organismes différents, dont l'être humain où 2588 miARN matures sont actuellement décrits (MiRBase, *Release 21*). De nombreuses publications montrent que les miARN sont impliqués dans la plupart des processus biologiques tels que le développement embryonnaire, la différenciation cellulaire, la prolifération cellulaire, etc. Ils sont également impliqués dans diverses pathologies comme les maladies cardiovasculaires ou le développement tumoral. A l'instar des facteurs de transcription, les miARN sont des régulateurs de l'expression génique importants et hautement conservés entre les différentes espèces (Ibáñez-Ventoso et al. 2008). Chaque miARN peut potentiellement réguler les ARNm de plus d'une centaine de gènes (Hammond 2015).

### 2.2. Nomenclature

La nomenclature des miARN reprend les éléments suivants :

- l'espèce chez laquelle le miARN est exprimé (hsa pour l'Homme, mmu pour la souris, par exemple) ;
- un nombre, correspondant à la famille du miARN (miR-1, miR-20, etc.).

Le nom du miARN peut également être suivi d'un chiffre lorsque les séquences matures sont identiques mais que les précurseurs et loci génétiques diffèrent. C'est le cas, par exemple, de miR-138-1 et miR-138-2.

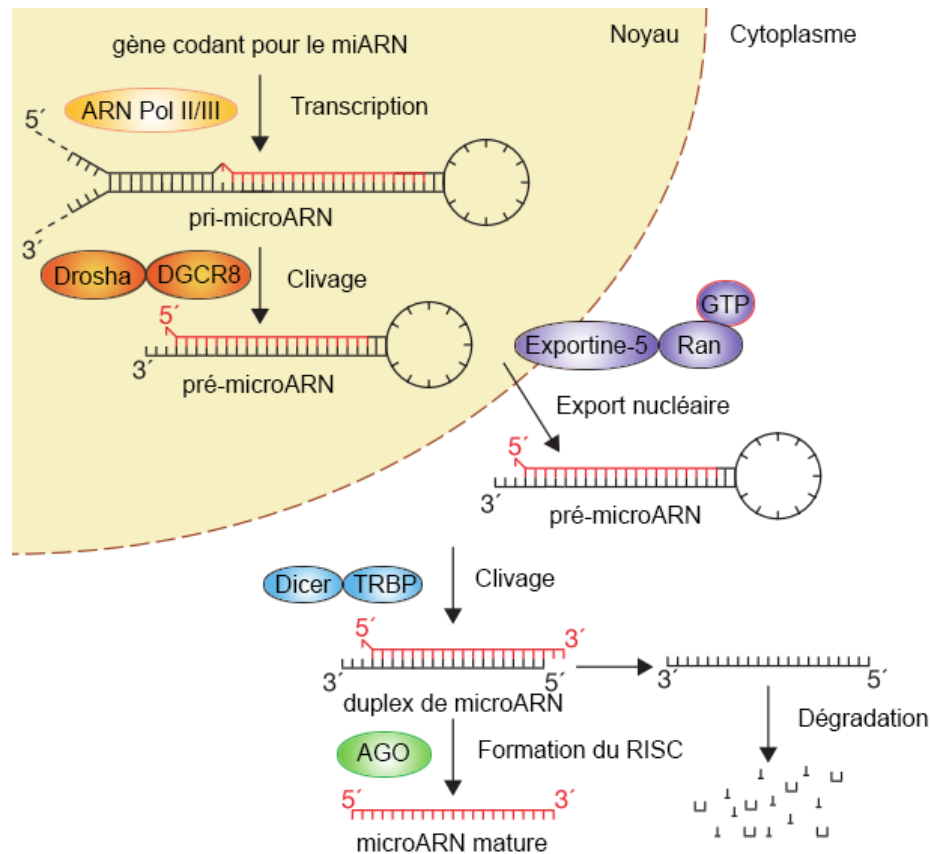
Lorsque le nom du microARN est suivi d'une lettre (a, b, c, etc.), celle-ci indique que les miARN considérés présentent un lien de parenté et font partie d'une même famille. Ainsi, il existe, par exemple, trois membres dans la famille de hsa-miR-200 : hsa-miR-200a, hsa-miR-200b et hsa-miR-200c.

Finalement, le nom du miARN peut se terminer par le suffixe -5p ou -3p. Ceci fait référence au brin du pré-miARN dont est issu le miARN mature. Pour certains miARN, les deux brins du pré-miARN peuvent être clivés et donner lieu à la production d'un miARN mature. Néanmoins, ce phénomène étant dépendant de la thermodynamique des brins du pré-miARN, certains pré-miARN ne peuvent produire qu'un seul type de miARN. Dans le passé, il était accepté de ne pas utiliser les suffixes -5p et -3p. Le brin le plus présent ne possédait alors pas de suffixe (par exemple miR-200c) et le brin le moins présent ou absent était noté d'un astérisque (miR-200c\*). Les deux séquences étant totalement différentes, cette nomenclature portait à confusion et a été progressivement abandonnée.

### **2.3. Biogenèse des miARN**

La biogenèse des miARN est un processus hautement régulé. Les miARN des plantes étant différents de ceux des animaux, que cela soit au niveau de leur séquence, de leur structure ou de leur biogenèse, nous nous focaliserons dans ce travail sur la description des miARN présents chez les animaux. L'obtention d'un miARN mature se produit suite à un processus en cinq étapes (**Figure 8**).





**Figure 8 : Biogenèse des miARN.** Le gène codant le miARN est tout d'abord transcrit par une ARN polymérase, donnant un miARN primaire (pri-miARN). Celui-ci est ensuite clivé par l'enzyme Drosha accompagnée de son cofacteur DGCR8. La séquence d'environ 70 nucléotides résultant de ce clivage, le miARN précurseur (pré-miARN), va ensuite être exportée hors du noyau grâce à l'exportine-5. Une fois dans le cytoplasme, le pré-miARN subit un clivage par l'enzyme Dicer. Du duplex résultant, seul l'un des deux brins d'ARN est reconnu comme étant le miARN mature par le complexe RISC. Adapté de (Winter et al. 2009).

### 2.3.1. Transcription du miARN

Les miARN sont localisés partout dans le génome. La majorité des miARN se situent dans les régions introniques de transcrits codants mais également dans des régions non codantes où le miARN est le seul transcrit produit. Dans des cas plus rares, il est possible de trouver des miARN dans les exons (Kim et al. 2009).

La transcription des miARN est principalement effectuée par l'ARN polymérase II ou l'ARN polymérase III et aboutit à la synthèse d'un transcrit primaire, le pri-miARN (Borchert et al. 2006, Lee et al. 2004). Celui-ci est long de plusieurs centaines de nucléotides et présente une structure en épingle à cheveux double-brin avec une boucle simple-brin terminale. Lorsqu'il est transcrit par l'ARN polymérase II, le pri-miARN présente également une coiffe à son extrémité 5' et une queue polyadénylée à son extrémité 3' (Hammond 2015, Winter et al. 2009).

L'expression des miARN est sous le contrôle de facteurs de transcription, tels que c-Myc ou p53, ou dépend de la méthylation de leur promoteur. De plus, les miARN présents au sein d'un même cluster peuvent être transcrits et régulés de manière indépendante (Song & Wang 2008, Winter et al. 2009).

### **2.3.2. Clivage nucléaire du pri-miARN**

Dans le noyau, le pri-miARN est ensuite clivé par la ribonucléase (RNase) de type III Drosha, accompagnée de son cofacteur DGCR8 (*DiGeorge syndrome Critical Region 8*). Ensemble, ils forment le complexe du Microprocesseur. La présence de DGCR8 est essentielle au déroulement de ce clivage, cette protéine permettant la reconnaissance de la jonction ARN double-brin (ARNdb)-ARN simple-brin (ARNsb) (Han et al. 2006). Drosha est alors capable de cliver l'ARNdb se trouvant à 11 nucléotides de cette jonction et ce clivage aboutit à une séquence d'environ 70 nucléotides appelée le miARN précurseur (pré-miARN) (Hammond 2015).

### **2.3.3. Export nucléaire**

Le pré-miARN est ensuite exporté hors du noyau grâce à l'exportine-5 couplée à la Ran-GTP (*Ras-related Nuclear protein-GTP*). L'hydrolyse du GTP en GDP permet alors la libération du pré-miARN dans le cytoplasme. L'exportine-5 reconnaît le pré-miARN indépendamment de sa séquence. La taille de la partie double-brin du pré-miARN ainsi que son extrémité 3' sont importants à la prise en charge par l'exportine-5, permettant ainsi l'export des pré-miARN correctement clivés (Winter et al. 2009).

### **2.3.4. Clivage cytosolique du pré-miARN**

Une fois dans le cytoplasme, le pré-miARN est pris en charge par le RLC (*RISC Loading Complex*), un complexe composé de la RNase de type III Dicer et de ses cofacteurs TRBP (*Tar RNA Binding Protein*) et PACT (*Protein Activator of PKR*). Ces cofacteurs ne sont pas essentiels à l'activité de Dicer mais augmentent significativement l'efficacité de cette étape. Dicer clive alors le pré-miARN au niveau de la jonction tige-boucle, aboutissant à un duplex d'ARN d'environ 21 nucléotides. Dicer est une protéine hautement conservée chez les eucaryotes (Hammond 2015, Winter et al. 2009).

### **2.3.5. Formation du RNA-Induced Silencing Complex (RISC)**

Une fois le second clivage effectué, Dicer et ses cofacteurs se dissocient du duplex d'ARN. Il est nécessaire alors de déterminer le brin d'ARN qui deviendra le miARN mature. En théorie, deux miARN peuvent être obtenus de ce duplex d'ARN. Néanmoins, pour certains miARN, seul l'un des

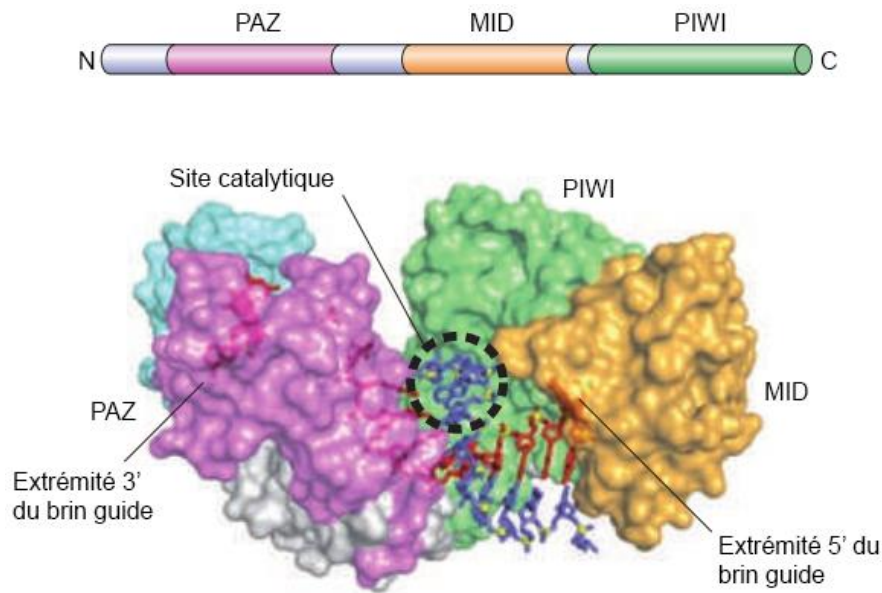
deux brins est sélectionné pour devenir le miARN mature. Cette sélection se base sur la stabilité thermodynamique des extrémités 5' des brins formant le duplex. Le brin présentant une stabilité plus faible en 5' est alors chargé par le complexe RISC et deviendra le brin guide. L'autre brin, le brin passager, est quant à lui éliminé. Le brin guide est ensuite pris en charge par une protéine argonaute (AGO). Le complexe AGO-brin guide s'associe finalement à d'autres protéines afin de former le complexe RISC qui sera impliqué dans le mécanisme d'action des miARN (Hammond 2015, Winter et al. 2009).

Ces cinq étapes sont représentatives de la voie canonique de biosynthèse des miARN. Néanmoins, d'autres processus existent et permettent l'obtention de miARN matures. L'alternative la plus commune implique la classe des mirtrons où le miARN est localisé au sein d'un intron. Dans ce cas, l'enzyme Drosha n'intervient pas dans le clivage du transcrit et le pré-miARN est obtenu par épissage. Il existe également une autre voie alternative indépendante de Dicer (Hammond 2015, Winter et al. 2009).

## **2.4. Mode d'action des miARN**

### **2.4.1. Composition du complexe RISC**

Le RISC est le complexe ribonucléoprotéique effecteur impliqué dans l'activité régulatrice des miARN. Celui-ci comprend le miARN mature associé à une protéine AGO. Cette protéine est hautement conservée chez les eucaryotes. Chez l'humain, il existe quatre protéines AGO (AGO1-4). Les protéines AGO présentent une structure bilobée divisée en trois domaines : PAZ, MID et PIWI. Le domaine MID lie l'extrémité 5' du brin guide et est responsable de la sélection thermodynamique de celui-ci. L'extrémité 3', quant à elle, est reconnue par le domaine PAZ. Le domaine PIWI possède une structure proche de la RNase H, permettant l'activité endonucléasique (**Figure 9**). Chez l'humain, seule AGO2 est capable d'hydrolyser l'ARNm cible (Kim et al. 2009, Nakanishi 2016).

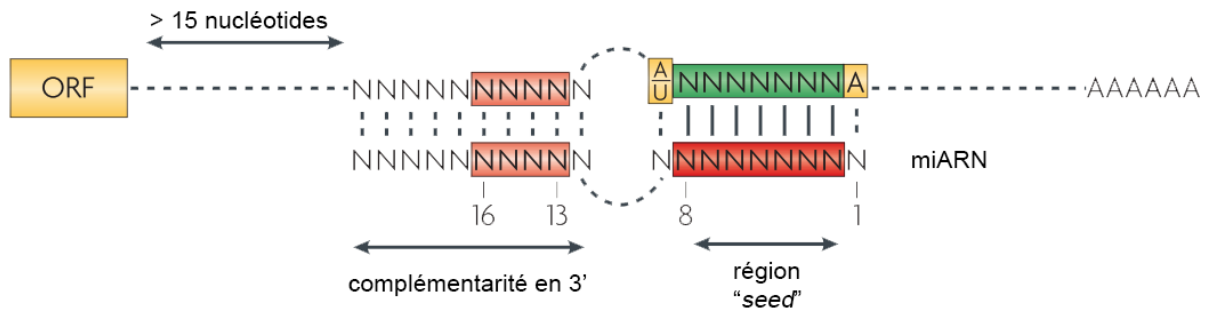


**Figure 9 : Structure tridimensionnelle du complexe RISC.** La protéine AGO présente une structure bilobée divisée en trois domaines. Le domaine PAZ lie l'extrémité 3' du brin guide. Le domaine MID lie l'extrémité 5' du brin guide. Le domaine PIWI, quant à lui, possède une structure proche de la RNase H. Adapté de (Kim et al. 2009).

La formation et l'activité du complexe RISC sont fortement améliorées par la présence de cofacteurs. Ainsi, la présence des chaperonnes HSC70 (*Constitutive Heat Shock Protein 70*) et HSP90 (*Heat Shock Protein 90*) permet la prise en charge efficace du duplex d'ARN par AGO2. De même, afin d'effectuer une dégradation efficace de l'ARNm cible, le RISC nécessite l'association de cofacteurs tels que GW182, qui facilite la répression traductionnelle en recrutant le complexe désadénylase CCR4-NOT (*C-C Motif Chemokine Receptor 4-NOT*) (Nakanishi 2016).

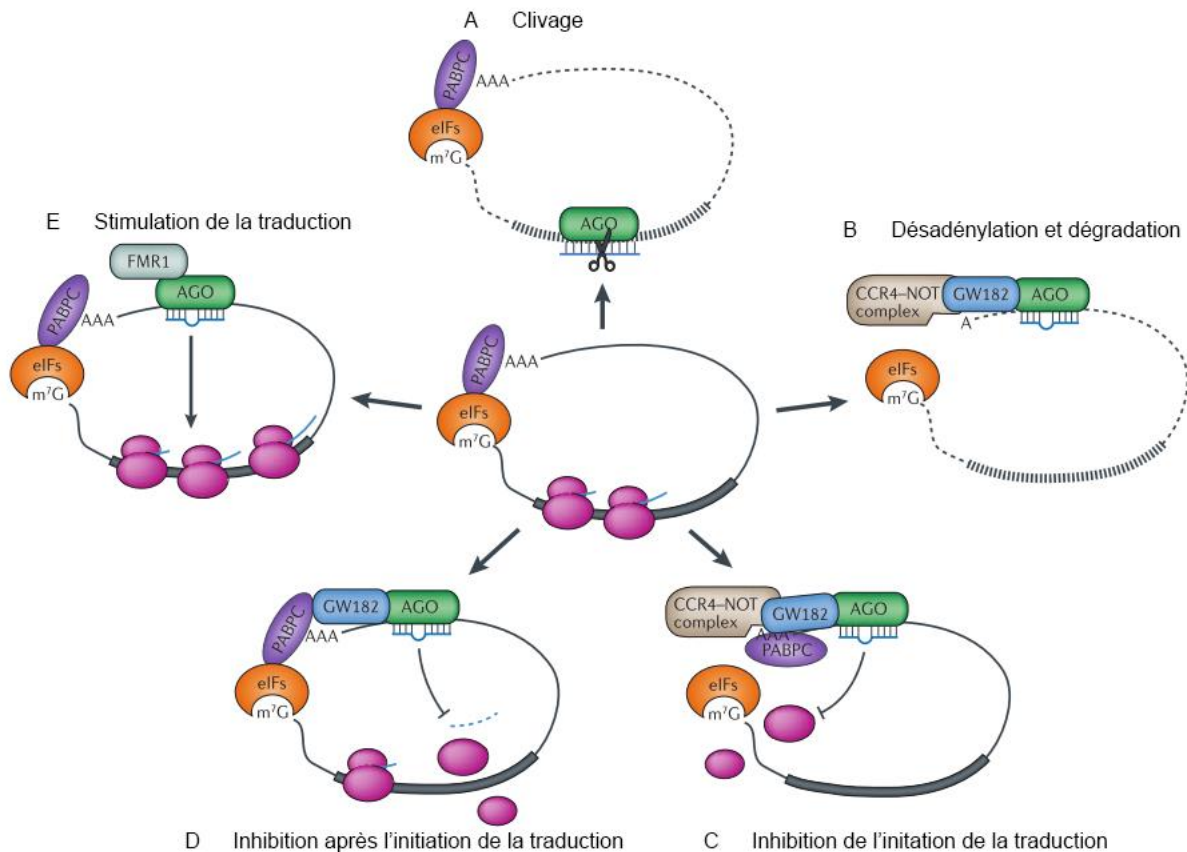
#### 2.4.2. Régulation de la cible

Une fois chargé dans le complexe RISC, le miARN mature est capable d'effectuer son activité régulatrice. Pour ce faire, le miARN doit s'hybrider à son ARNm cible, selon les règles de Watson et Crick, au niveau de la région située entre les nucléotides 2 et 7 du miARN. Cette région est appelée la région *seed*. Cet appariement se produit habituellement au niveau de la région 3'UTR (*UnTranslated Region*) de l'ARNm, qui présente souvent plusieurs sites de liaison pour un même miARN. Plus rarement, le miARN peut se lier au niveau de la région codante de l'ARNm cible ou au niveau de sa région 5'UTR mais cette interaction est nettement moins efficace qu'en 3'UTR (Lytle et al. 2007, Zhou et al. 2009). L'affinité et la spécificité du miARN pour sa cible peuvent également être renforcées par la présence d'appariements supplémentaires tout au long de la séquence du miARN (**Figure 10**) (Bartel 2009, Pasquinelli 2012).



**Figure 10 : Interaction entre le miARN et l'ARNm cible.** Le miARN présente une région *seed*, comprenant les nucléotides situés entre les positions 2 et 7, parfaitement complémentaire avec l'ARNm. Cette complémentarité est primordiale à la reconnaissance de la cible par le miARN. L'affinité et la spécificité de cette liaison peuvent être renforcées par des appariements supplémentaires tout au long de la séquence du miARN. Adapté de (Filipowicz et al. 2008).

Chez les plantes, l'appariement entre le miARN et sa cible est souvent parfaite et induit la dégradation de l'ARNm par l'activité endonucléasique de la protéine AGO du complexe RISC. Dans les cellules animales, ce cas de figure est moins fréquent et l'appariement est souvent imparfait. L'ARNm cible peut alors être régulé selon différents mécanismes (**Figure 11**). Tout d'abord, l'ARNm cible peut être désadénylé suite au recrutement du complexe CCR4-NOT par la protéine GW182. La perte de la queue poly(A) cause la dissociation des protéines se liant à celle-ci, nécessaires à la traduction du transcrite. S'en suit alors la dégradation de l'ARNm. Le miARN peut également réguler la traduction en inhibant son initiation suite au recrutement du complexe CCR4-NOT. L'inhibition de la traduction peut aussi se produire après son étape d'initiation en induisant la dissociation des ribosomes ou en stimulant la protéolyse du peptide naissant. Étonnamment, en plus de cette activité inhibitrice, certains miARN sont capables de stimuler la traduction de certains transcrits (Pasquinelli 2012, Shobha Vasudevan, Yingchun Tong 2007). Ainsi, par exemple, miR-10a se lie au niveau de la 5'UTR d'ARNm codant pour des protéines ribosomiques et stimule leur traduction (Ørom et al. 2008).



**Figure 11 : Mécanismes de régulation de la cible par les miARN.** Les miARN peuvent réguler leur cible de diverses façons. **A.** Si l'appariement entre le miARN et sa cible est parfait, la protéine AGO, si elle possède une activité endonucléasique, clive l'ARNm cible. **B.** Si l'appariement est imparfait, l'ARNm cible peut être désadénylé et dégradé suite au recrutement du complexe CCR4-NOT par la protéine GW182. **C.** L'initiation de la traduction peut également être bloquée. **D.** La traduction peut aussi être régulée après son initiation. **E.** Plus rarement, le miARN peut stimuler la traduction d'un transcrit. Adapté de (Pasquinelli 2012).

## 2.5. Les miARN dans l'angiogenèse et dans les fonctions des cellules endothéliales et des VSMC

### 2.5.1. Généralités

L'influence des miARN sur l'angiogenèse a été mise en évidence pour la première fois lors d'expériences visant à étudier l'importance de Dicer au cours de l'embryogenèse. En effet, il s'avère que Dicer est essentiel au développement embryonnaire chez la souris et que la délétion de Dicer induit des défauts dans la vascularisation de l'embryon (Yang et al. 2005). D'autres expériences ont confirmé que la présence de Dicer, ainsi que celle de Drosha, est nécessaire au bourgeonnement et à la tubulogenèse des cellules endothéliales. Dicer est également nécessaire à la migration de ces cellules (Kuehbach et al. 2007). Depuis lors, de nombreux miARN possédant un rôle dans l'angiogenèse ont été identifiés. Ainsi, il a été montré que miR-21, miR-126, miR-221,

miR-222 et la famille let-7 sont fortement exprimés dans les cellules endothéliales. Certains de ces miARN sont connus pour favoriser l'angiogenèse, tandis que d'autres l'inhibent. De plus, les miARN peuvent également influencer le phénotype des VSMC et, ainsi, réguler la stabilisation des vaisseaux sanguins.

### 2.5.2. Les miARN pro-angiogènes

Parmi les miARN connus pour réguler l'angiogenèse, miR-126 est l'un des plus décrits. miR-126 est le miARN le plus exprimé au sein des cellules endothéliales et il régule de nombreuses fonctions dans ces cellules. *In vitro*, miR-126 régule l'angiogenèse induite par le VEGF et le bFGF et son inhibition diminue la migration, la survie cellulaire et la formation d'un réseau de capillaires par les cellules endothéliales. Des expériences chez le poisson zèbre et la souris ont montré que l'inhibition de miR-126 induit une désorganisation des vaisseaux sanguins, causant des hémorragies lors du développement embryonnaire. D'un point de vue moléculaire, miR-126 cible SPRED1 (*Sprouty Related EVH1 Domain Containing 1*) et PIK3R2 (*Phosphoinositide-3-Kinase Regulatory Subunit 2*), deux régulateurs négatifs des voies de signalisation des MAPK et de PI3K (*Phosphoinositide-3-Kinase*) respectivement. Ces voies de signalisation sont impliquées dans la réponse au VEGF et au bFGF. miR-126 régule également la molécule d'adhésion VCAM-1 (Fish et al. 2008, Wang et al. 2008).

Il existe de nombreux miARN pro-angiogènes. Parmi eux, on retrouve les miARN de la famille let-7. L'inhibition de let-7f diminue le bourgeonnement des cellules endothéliales (Kuehbach et al. 2007). Le cluster miR-17~92 comprend 7 miARN : miR-17-5p, miR-17-3p, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-20a et miR-92a. L'expression de ce cluster est stimulée par le VEGF et induit la prolifération et la tubulogenèse des cellules endothéliales. Ce cluster participe également au *switch* angiogène de l'endothélium quiescent (Chamorro-Jorganes et al. 2016). De même, miR-23 et miR-27, faisant partie du cluster miR-23~27~24, stimulent la prolifération et la migration des cellules endothéliales en réponse au VEGF (Zhou et al. 2011). L'expression de miR-130a est induite par la stimulation des cellules endothéliales par des facteurs mitogènes, leur permettant alors de sortir de leur état quiescent. Ce miARN régule l'expression de GAX et de HOXA5 (*Homeobox A5*), deux facteurs anti-angiogènes (Chen & Gorski 2008). En conditions hypoxiques, l'expression de miR-210 est augmentée dans les cellules endothéliales, stimulant ainsi leur migration et leur organisation sous forme de tubes sur du Matrigel (Fasanaro et al. 2008). L'angiogenèse tumorale peut également être stimulée par les miARN. Ainsi, lorsqu'elles sont cultivées en présence de cellules cancéreuses, les cellules endothéliales surexpriment miR-296, ayant pour conséquence une augmentation de la tubulogenèse et de la migration de ces cellules (Würdinger et al. 2008).

### 2.5.3. Les miARN anti-angiogènes

Les premiers miARN aux fonctions anti-angiogènes ayant été décrits sont les miARN du cluster miR-221/222. En ciblant le récepteur c-Kit, ces miARN inhibent la stimulation de la migration, de la tubulogénèse et de la survie des cellules endothéliales par le SCF (*Stem Cell Factor*) (Poliseno et al. 2006). Ces miARN inhibent également la prolifération des cellules endothéliales (Liu et al. 2012). Bien que, lors de la stimulation par le VEGF, le cluster miR-17~92 présente une activité globale pro-angiogène, certains membres de ce cluster possèdent également une activité anti-angiogène. Ainsi, miR-92a inhibe la tubulogénèse, la migration ainsi que l'adhésion des cellules endothéliales en ciblant ITGA5 (*integrin subunit alpha 5*) (Bonauer et al. 2009). De plus, miR-19a présente également des propriétés anti-angiogènes *in vitro* et *in vivo* (Landskroner-Eiger et al. 2015). Un autre exemple est celui de miR-34a, qui inhibe la formation de tubes par les cellules précurseurs des cellules endothéliales et induit leur sénescence (Zhao et al. 2010). Pour finir, en ciblant mTOR, miR-100 régule négativement la tubulogénèse et la prolifération des cellules endothéliales *in vitro*. De même, l'inhibition de ce miARN permet de stimuler l'angiogénèse *in vivo* dans un modèle de Matrigel *plug* (Grundmann et al. 2011).

Dans notre laboratoire, trois miARN anti-angiogènes ont été caractérisés. Connu pour être surexprimé dans de nombreux cancers, miR-21 régule également l'angiogénèse en inhibant la prolifération, la migration et la tubulogénèse des cellules endothéliales *in vitro*. Les effets observés résultent de la régulation de l'expression de RhoB (*Ras homolog family member B*) par miR-21. Il inhibe également la néovascularisation choroïdienne *in vivo* (Sabatel et al. 2011). Dans une autre étude, nous avons montré que l'expression de miR-146a dans les cellules endothéliales est induite par la PRL 16K. miR-146a inhibe la prolifération et augmente le nombre de cellules en apoptose *in vitro*. Ce miARN diminue également le bourgeonnement des cellules endothéliales dans un modèle *ex vivo* d'anneaux d'aorte et réduit la néovascularisation choroïdienne *in vivo*. Ce miARN intervient dans la physiopathologie de la cardiomyopathie du peripartum (Halkein et al. 2013). Finalement, miR-205 diminue la prolifération, la migration et la tubulogénèse des cellules endothéliales en ciblant des acteurs de la voie de signalisation du TGF- $\beta$ , à savoir Smad1 et Smad4. L'expression de ce miARN est altérée dans une maladie génétique affectant l'endothélium, la télangiectasie hémorragique héréditaire (Tabruyn et al. 2013).

### 2.5.4. Les miARN dans les fonctions des VSMC

Les fonctions des VSMC sont également sous l'influence des miARN. Contrairement aux cellules endothéliales, le cluster miR-221/222 stimule la prolifération, la migration et la survie des VSMC en ciblant p27<sup>Kip1</sup> et p57<sup>Kip2</sup>, deux gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (Liu et al. 2012). L'expression de miR-328, quant à elle, est régulée négativement par le PDGF-BB,



ce miARN inhibant la prolifération et la migration des VSMC (Qian et al. 2016). miR-143 et miR-145, des miARN fortement exprimés par les VSMC, régulent négativement la prolifération cellulaire (Cordes et al. 2009). La prolifération et l'apoptose des VSMC est également sous le contrôle de miR-1 qui inhibe l'expression de l'IGF-1, un facteur de croissance connu pour stimuler la prolifération et réduire l'apoptose des VSMC (Liu et al. 2015).

De plus, les VSMC présentent deux phénotypes différents, à savoir un phénotype contractile et un phénotype synthétique. Lorsque les vaisseaux sanguins sont matures, les VSMC présentent un phénotype contractile. Néanmoins, les VSMC conservent une certaine plasticité, celles-ci pouvant alors retrouver un phénotype synthétique, c'est-à-dire conduisant à la prolifération cellulaire. Ce *switch* phénotypique d'un statut contractile à un statut synthétique est à l'origine de certaines pathologies telles que l'athérosclérose, le cancer, l'hypertension ou, encore, de complications médicales telles que la resténose post-angioplastie. Dès lors, ce *switch* est très fortement régulé par les miARN. Ainsi, miR-145 régule le passage d'un phénotype à l'autre, au profit du phénotype contractile. Dans des cas d'athérosclérose, l'expression de miR-145 est diminuée au sein des plaques d'athérome, les VSMC adoptant alors un phénotype synthétique (Zhang et al. 2016b). De même, miR-133 favorise le phénotype contractile en inhibant le facteur de transcription Sp-1 ainsi que la moésine. L'expression de ce miARN se retrouve, dès lors, réduite lorsque les cellules sont en prolifération (Torella et al. 2011). Au contraire, l'expression de miR-26a est stimulée lorsque les cellules présentent un phénotype synthétique. En ciblant Smad1 et Smad4, ce miARN stimule, en effet, la prolifération et la migration des VSMC mais diminue également leur apoptose (Leeper et al. 2011). Pour finir, miR-1 régule les fonctions contractiles des VSMC. Lorsque ces cellules présentent un phénotype contractile, l'expression de la myocardine, un facteur de transcription, est stimulée. La myocardine induit l'expression de protéines contractiles telles que la transgeline ou l' $\alpha$ -SMA (*alpha-Smooth Muscle Actin*) mais induit également l'expression de miR-1 qui, en retour, régule ces protéines contractiles. miR-1 est donc capable d'équilibrer la réponse contractile des VSMC face à un stimulus (Jiang et al. 2010).

## **2.6. Utilisation clinique des miARN**

Les miARN étant impliqués dans de nombreux processus physiologiques et étant régulés dans certaines pathologies, des thérapies basées sur la modulation de l'expression des miARN ont été développées. Celles-ci impliquent généralement l'utilisation de miARN *mimics* ou d'inhibiteurs antisens.

### **2.6.1. miARN *mimics***

Lorsqu'un miARN est moins exprimé dans une pathologie, une stratégie thérapeutique est de restaurer l'expression de celui-ci. Cela est possible grâce à l'utilisation de miARN *mimics*. Ce sont des duplex double-brin pouvant être directement pris en charge par le complexe RISC. Des pré-miARN peuvent également être utilisés. Le désavantage de cette technique est qu'elle nécessite des traitements répétés, l'effet des miARN *mimics* n'étant que temporaire (Caporali & Emanuelli 2011). A l'heure actuelle, certaines thérapies sont en cours de développement. Des *mimics* de miR-34 sont utilisés en phase I d'essai clinique pour traiter des cancers et des *mimics* de let-7 et de miR-29 sont en phase préclinique afin de traiter certains cancers et des fibroses, respectivement (Hammond 2015, Yin et al. 2015).

### **2.6.2. Inhibiteurs antisens**

Dans d'autres cas pathologiques, l'expression du miARN en cause est augmentée. Il est alors nécessaire d'inhiber l'expression de celui-ci grâce à l'utilisation de séquences antisens. Ces inhibiteurs sont généralement sous forme simple-brin et se lient alors au miARN d'intérêt de manière complémentaire afin de l'empêcher de réguler son ARNm cible. La stabilité de la séquence antisens peut être améliorée grâce à des modifications chimiques telles que les *Locked Nucleic Acid* (LNA) qui présentent une meilleure résistance à la dégradation et une meilleure stabilité *in vivo* par rapport à la séquence non modifiée (Caporali & Emanuelli 2011). Un candidat prometteur est le RG-101, développé par Regulus, qui est actuellement en phase II d'essai clinique. Ce traitement est basé sur l'utilisation d'un inhibiteur antisens de miR-122 afin de diminuer la stabilité et la réplication du virus de l'hépatite C au niveau des hépatocytes (Hammond 2015). Dans cette même optique, le Miravirsén, mis au point par Roche, est basé sur l'utilisation de LNA et est également en phase II d'essai clinique. Pour finir, le MRG-106, mis au point par miRagen Therapeutics, est en phase I d'essai clinique afin d'évaluer le potentiel d'un inhibiteur LNA de miR-155 afin de traiter des lymphomes T cutanés (Yin et al. 2015).

## **2.7. miR-539**

### **2.7.1. Généralités**

Dans ce travail, nous nous sommes particulièrement intéressés à miR-539. La première étude faisant état du rôle de miR-539 a été publiée en 2010 (Bao et al. 2010). Depuis lors, plusieurs publications ont mis en avant de nombreuses fonctions de ce miARN dans des contextes divers tels que le cancer, la régulation du système nerveux ou encore le métabolisme lipidique. A l'heure actuelle, aucune étude ne fait part d'un rôle de miR-539 dans la régulation de l'angiogenèse.

miR-539 appartient au plus grand cluster de miARN du génome humain, à savoir celui présent au sein du locus *DLK1-DIO3* situé sur le chromosome 14. Ce locus est soumis à l'empreinte parentale. Ainsi, le chromosome paternel contient les gènes codant pour *DLK1* (*Delta-like homologue 1*), *RTL1* (*Retrotransposon-like gene 1*) et *DIO3* (*Deiodinase type 3*), tandis que le chromosome maternel inclut de nombreux gènes non codants, notamment des miARN. Ce locus est exprimé dans de nombreux types cellulaires au cours du développement embryonnaire. Il est ensuite essentiellement exprimé au niveau du cerveau après la naissance (Edwards et al. 2008, Jeanson-Leh et al. 2014). Selon miRbase, ce locus compte actuellement 55 miARN.

### **2.7.2. Rôle de miR-539 dans le cancer**

miR-539 est décrit pour inhiber les fonctions de certains types cellulaires cancéreux. Ainsi, la surexpression de miR-539 au sein de cellules cancéreuses thyroïdiennes inhibe leur migration et leur invasion (Gu & Sun 2015). De même, miR-539 diminue la prolifération, la migration ainsi que l'invasion de cellules cancéreuses d'ostéosarcome en ciblant la métalloprotéinase MMP8 (Jin & Wang 2015). Une autre étude a démontré que miR-539 réduit la prolifération de cellules cancéreuses provenant de carcinomes nasopharyngés *in vitro* ainsi que la tumorigenèse *in vivo*. Dans ce modèle, miR-539 cible *CDK4* (*Cyclin-Dependant Kinase 4*), induisant alors un arrêt du cycle cellulaire (Lv et al. 2015). En ce qui concerne le cancer de la prostate, *SPAG5* (*sperm-associated antigen 5*) augmente graduellement au fur et à mesure que le cancer se développe. *SPAG5* étant une cible directe de miR-539, il est possible de réduire la prolifération, la migration et l'invasion de cellules cancéreuses *in vitro* ainsi que le développement de métastases *in vivo* en surexprimant ce miARN (Zhang et al. 2016a). miR-539 inhibe également la tumorigenèse dans le cadre de modèles murins du carcinome hépatocellulaire en régulant la prolifération cellulaire ainsi que l'apoptose. La surexpression de ce miARN augmente également la sensibilité des cellules cancéreuses vis-à-vis de la chimiothérapie (Zhu et al. 2016). Dans chacune de ces études, l'expression de miR-539 s'avère être diminuée dans les tissus cancéreux par rapport aux tissus sains, indiquant alors un rôle anti-tumoral de ce miARN.

Plusieurs études ont mis en évidence des modifications du niveau d'expression de miR-539 qui pourraient permettre d'utiliser ce miARN en tant que biomarqueur. Ainsi, dans le cadre du cancer du côlon, l'expression de miR-539 et de quatre autres miARN permettent d'évaluer les risques de rechute dès les premières étapes du développement du cancer (Bobowicz et al. 2016). De même, le suivi du niveau d'expression de cinq miARN, dont miR-539, permettrait d'évaluer plus efficacement le passage d'une gastrite à un lymphome de type MALT (*Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*) (Thorns et al. 2012). Dans le cadre de l'ostéosarcome, le niveau de miR-539 et

de huit autres miARN permettraient de différencier les cellules osseuses malignes des cellules saines (Hu et al. 2012).

### **2.7.3. Autres cas spécifiques**

miR-539 est impliqué dans la régulation de la biotinylation des histones en ciblant l'holocarboxylase synthétase. Le promoteur de miR-539 joue également le rôle de biosenseur puisque l'expression de ce miARN est proportionnelle à la concentration extracellulaire en biotine (Bao et al. 2010).

miR-539 est également impliqué dans la régulation des fonctions des mastocytes en ciblant MITF (*Microphthalmia-Associated Transcription Factor*), une protéine essentielle au développement de ces cellules. L'expression de miR-539 est, par ailleurs, sous le contrôle de la protéine KIT, un récepteur dont l'activation conduit à la prolifération, la survie, l'adhésion et la différenciation des mastocytes. Ainsi, dans le cadre de la mastocytose systémique, KIT est constitutivement activé. Les niveaux faibles de miR-539 ne suffisent donc plus à inhiber MITF, provoquant alors la prolifération et la formation de colonies de mastocytes au sein de divers organes (Lee et al. 2011).

L'insuffisance cardiaque, quant à elle, est caractérisée par une augmentation de l'expression de miR-539 au sein des cardiomyocytes. miR-539 régule alors le niveau d'O-N-acétylglucosamylation des protéines en ciblant l'O-GlcNAcase, responsable de l'hydrolyse du résidu O-N-acétylglucosamine (O-GlcNAc) (Muthusamy et al. 2014). En réponse à l'hypoxie, l'expression de miR-539 au sein des cardiomyocytes est également augmentée et ce miARN régule les fonctions de ces cellules en ciblant PHB2 (prohibitine 2), provoquant alors la fission des mitochondries et l'apoptose des cellules. L'utilisation *in vivo* d'un inhibiteur de miR-539 permet, par ailleurs, de diminuer les conséquences de l'infarctus du myocarde (Wang et al. 2014).

Au niveau du système nerveux, miR-539 régule l'expression de la sous-unité GluN2B intervenant dans la composition des récepteurs N-méthyl-D-aspartate. Ceux-ci sont fortement exprimés au niveau des cellules nerveuses et participent au développement des circuits neuronaux ainsi qu'à l'induction de la plasticité synaptique (Corbel et al. 2015). miR-539 ainsi que d'autres miARN pourraient également être impliqués dans les réactions neuronales face aux situations de stress (Cohen et al. 2017).

Finalement, miR-539 a été détecté dans le tissu adipeux de rats et son expression est augmentée suite à un traitement avec du resvératrol, un polyphénol aux propriétés anti-obésité.

miR-539 influence le métabolisme lipidique en ciblant le facteur de transcription Sp-1 (Gracia et al. 2016).

## **2.8. miR-582**

### **2.8.1. Généralités**

Au cours de ce travail, nous nous sommes également intéressés à miR-582. Le rôle de ce miARN dans les fonctions cellulaires et son incidence sur le développement de pathologies sont, à l'heure actuelle, peu connus. miR-582 est localisé au niveau de la région chromosomique 5q12.

### **2.8.2. Rôle de miR-582 dans le cancer**

L'expression de miR-582 et de 20 autres miARN est régulée dans le cadre du mésothéliome malin. Dans ce contexte, l'expression de miR-582 est moindre dans le tissu cancéreux en comparaison avec le tissu sain (Guled et al. 2009).

miR-582 est également moins exprimé dans le cadre du cancer de la vessie, proportionnellement à l'agressivité de la tumeur. La restauration de l'expression de ce miARN permet d'inhiber la prolifération et l'invasion des cellules cancéreuses. *In vivo*, miR-582 réduit la croissance tumorale ainsi que la dissémination des métastases. Ces effets sont dus à la régulation de PGGT1B (*Protein GeranylGeranylTransferase type I Beta subunit*), LRRK2 (*Leucine-Rich Repeat Kinase 2*) et DIXDC1 (*DIX Domain Containing 1*) par miR-582 (Uchino et al. 2013).

### **2.8.3. Autres cas spécifiques**

miR-582, ainsi que deux autres miARN, peuvent servir de biomarqueurs afin d'identifier les patients contractant une thrombose veineuse profonde suite à une chirurgie orthopédique. L'expression de ces trois miARN est, en effet, augmentée dans le sérum de ces patients. L'analyse de l'expression de ces miARN pourrait, dès lors, constituer un test non invasif afin de détecter cette complication (Qin et al. 2015).

### **3. Les miARN circulants**

#### **3.1. Généralités**

Il y a quelques années, la présence de miARN dans le plasma a été mise en évidence. Encapsulés dans des petites vésicules, ces miARN extracellulaires sont protégés de l'action des RNases présentes dans le milieu (Mitchell et al. 2008, Valadi et al. 2007). Peu de temps après, ces miARN circulants ont été détectés dans divers fluides biologiques tels que le sang, l'urine, la salive mais aussi le lait maternel ou les larmes (Weber et al. 2010). La facilité d'accès à ces fluides rend intéressante l'étude de ces miARN circulants en tant que biomarqueurs non invasifs. Cet intérêt est d'autant plus renforcé que, tout comme dans les prélèvements tissulaires, les miARN circulants semblent être sécrétés de manière spécifique selon le type cellulaire ou le type de pathologie (Pigati et al. 2010). De plus, ces miARN circulants peuvent être transférés de leurs cellules productrices à des cellules receveuses, jouant alors un rôle régulateur sur leurs ARNm cibles (Montecalvo et al. 2012). Cette caractéristique constitue, dès lors, un nouveau moyen de communication entre cellules. Bien qu'à l'origine les miARN circulants ont été découverts au sein de vésicules extracellulaires, il s'avère que l'on peut également les trouver dans des complexes protéiques ou lipoprotéiques extracellulaires non vésiculaires (Arroyo et al. 2011, Turchinovich et al. 2011, Vickers et al. 2011).

#### **3.2. Les miARN circulants en tant que biomarqueurs**

Depuis leur découverte, un grand nombre de publications concernant l'utilisation des miARN circulants en tant que biomarqueurs a vu le jour. A la base fortement étudiés dans le cadre du dépistage ou de la caractérisation de divers cancers, les miARN circulants sont maintenant étudiés dans de nombreuses pathologies telles que les maladies cardiaques ou encore les maladies neurodégénératives.

Par exemple, l'analyse des niveaux plasmatiques de miR-505-5p, miR-125b-5p, miR-21-5p, et miR-96-5p permet d'identifier les patients atteints d'un cancer du sein à un stade précoce (Matamala et al. 2015). Le profil des miARN circulants permet également de prédire la réponse aux traitements. Ainsi, les niveaux circulants de miR-126 permettent de distinguer les patients atteints d'un cancer colorectal répondant à la chimiothérapie de ceux qui n'y répondent pas (Hansen et al. 2015). Finalement, l'analyse des niveaux de miR-182 dans le plasma de patients atteints d'un cancer du pancréas permet d'identifier le stade du cancer mais également de déterminer le pronostic de survie des patients (Chen et al. 2014b).

Il est également intéressant d'identifier les miARN circulants étant présents chez le sujet en bonne santé. Il a ainsi été montré que les miR-486-5p, miR-25-3p, miR-10b-5p, miR-99b-5p, let-7f-5p, miR-10a-5p, miR-423-3p, miR-101-3p, miR-532-5p et miR-103a-3p sont présents de manière stable chez les sujets ne présentant aucune maladie. Il est à noter que les niveaux en miARN circulants peuvent varier de manière considérable selon le genre, le statut de fumeur ou encore l'indice de masse corporelle du sujet, rendant complexe l'interprétation des profils en miARN circulants (Tonge & Gant 2016).

### **3.3. Les miARN circulants dans des complexes protéiques**

Une grande partie des miARN circulants n'est pas contenue dans des vésicules extracellulaires. En effet, ces miARN circulants peuvent être protégés par des complexes protéiques. Ainsi, il a été démontré qu'une série de RBP (*RNA-binding protein*), dont la nucléophosmine 1, est libérée dans le milieu extracellulaire et pourrait protéger les miARN de la dégradation (Wang et al. 2010). Dans le sang, la majorité des miARN circulants n'est pas encapsulée dans des microvésicules et certains miARN, notamment miR-16 et miR-92a, sont préférentiellement associés à des complexes protéiques. Par immunoprécipitation, AGO2 a été identifié comme étant associé à ces miARN (Arroyo et al. 2011). Une autre étude a également confirmé la présence de miARN associés à AGO2 dans le plasma. Des miARN peuvent aussi s'associer à AGO1, présentant alors un profil différent de celui des miARN liés à AGO2 (Turchinovich & Burwinkel 2012). Néanmoins, il est à savoir que ces complexes ribonucléoprotéiques semblent issus d'un relargage dans le milieu extracellulaire suite à la lyse de cellules mortes et que leur rôle dans la communication intercellulaire est toujours indéterminé (Turchinovich et al. 2011).

### **3.4. Les miARN circulants dans des complexes lipoprotéiques**

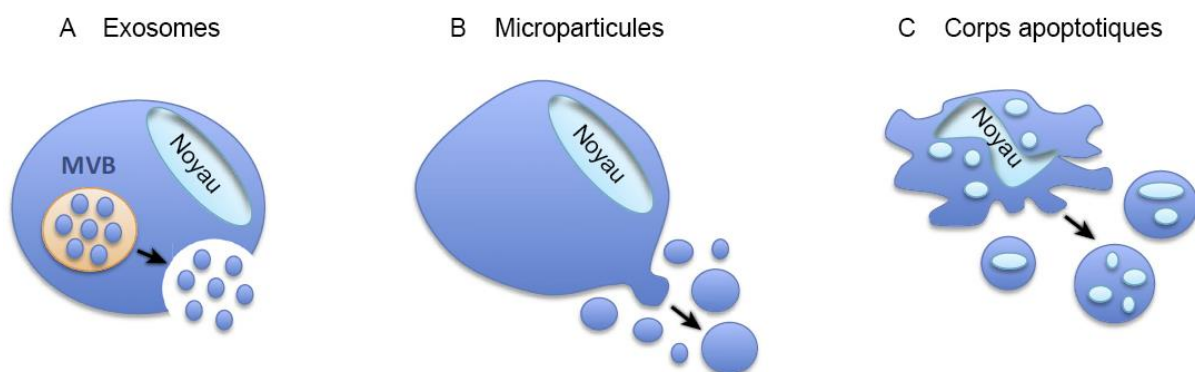
Les miARN circulants peuvent également être protégés de la dégradation par des HDL (*High Density Lipoprotein*). Les HDL sont les lipoprotéines responsables du transport du cholestérol vers le foie, où il y sera éliminé, diminuant ainsi les risques d'accumulation au niveau des vaisseaux sanguins. Ces complexes lipoprotéiques plasmatiques peuvent contenir des miARN et le profil en miARN permet de distinguer les patients atteints d'hypercholestérolémie familiale des sujets en bonne santé (Vickers et al. 2011). L'analyse des niveaux de miR-486 et de miR-92a circulants en association aux HDL permet également de distinguer les maladies coronariennes dites stables (angines de poitrine stables) de celles dites vulnérables (angines de poitrine instables et infarctus du myocarde) (Niculescu et al. 2015). De plus, les HDL sont capables de délivrer leurs miARN à des cellules receveuses, conduisant alors à l'inhibition de l'expression de leurs ARNm cibles

(Vickers et al. 2011). Par exemple, miR-223 peut être transféré à des cellules endothéliales grâce aux HDL et y inhiber l'expression d'ICAM-1 (Tabet et al. 2014). Les mécanismes d'incorporation des miARN au sein des HDL ainsi que de transfert vers les cellules receveuses restent encore, à l'heure actuelle, méconnus.

### 3.5. Les miARN circulants dans des microvésicules

#### 3.5.1. Généralités

La communication intercellulaire est un processus essentiel au maintien de l'homéostasie tissulaire normale. Cette communication peut s'établir par contacts directs entre les cellules grâce à des jonctions intercellulaires et des molécules d'adhésion. Une communication à courte ou à longue distance peut également se produire grâce à des facteurs solubles comme, par exemple, des hormones ou des cytokines. Récemment, un nouveau mode de communication impliquant des vésicules extracellulaires a été identifié. Ces vésicules peuvent être transférées d'une cellule productrice à une cellule receveuse, permettant la transmission d'un message complexe. En effet, ces microvésicules contiennent des lipides, des protéines et des acides nucléiques permettant une communication intercellulaire diversifiée. Actuellement, on distingue trois grandes catégories de microvésicules en fonction de leur mode de formation (**Figure 12**). Les microparticules proviennent directement de la membrane plasmique de la cellule. Les corps apoptotiques, quant à eux, sont obtenus suite à la mort cellulaire programmée. Finalement, les exosomes sont originaires du processus d'endocytose. Ces derniers sont fortement étudiés et font l'objet de ce travail. Ils seront décrits plus en détails dans le point 4 de cette introduction.



**Figure 12 : Les types de vésicules extracellulaires.** On distingue actuellement trois types de vésicules extracellulaires selon leur mode de formation : les exosomes, les microparticules et les corps apoptotiques. **A.** Les exosomes sont originaires du processus d'endocytose. **B.** Les microparticules sont produites directement à partir de la membrane plasmique cellulaire. **C.** Les corps apoptotiques sont produits suite à la mort cellulaire programmée. MVB : *multivesicular body*. Adapté de (Kanada et al. 2016).



### 3.5.2. Les microparticules

Les microparticules, aussi appelés microvésicules ou ectosomes, sont issues du bourgeonnement de la membrane plasmique vers le milieu extracellulaire. Leur taille est variable, pouvant aller de 200 à 2000 nm, et elles sont produites par divers types cellulaires. Ces vésicules provenant du bourgeonnement de la membrane plasmique, elles sont dès lors composées de lipides et de protéines similaires à ceux de la cellule productrice (de Souza et al. 2016). Les microparticules endothéliales permettent le transfert de miR-222 à d'autres cellules endothéliales. Suite à un stress, le niveau de miR-222 au sein des microparticules augmente. Par ailleurs, le transfert de ce miARN induit l'inhibition d'ICAM-1, ayant pour conséquence de réduire les risques d'inflammation vasculaire et la protection des cellules endothéliales adjacentes. De plus, des patients atteints de maladie coronarienne présentent des niveaux de miR-222 circulants plus faibles par rapport aux sujets sains. Les cellules endommagées ne produisent alors plus assez de miR-222 circulant, perdant alors leurs capacités anti-inflammatoires (Jansen et al. 2015). Les microparticules produites par les cellules cancéreuses, également appelés oncosomes, peuvent de même transférer des miARN à des cellules receveuses et en modifier les fonctions. Par exemple, des cellules cancéreuses résistantes aux traitements peuvent transférer miR-21, miR-27a et miR-451 à des cellules cancéreuses sensibles aux chimiothérapies afin d'en stimuler le potentiel de résistance (de Souza et al. 2015).

### 3.5.3. Les corps apoptotiques

L'apoptose est l'une des voies principales de mort cellulaire. Elle se caractérise par la condensation de la chromatine et la désagrégation progressive de la cellule en vésicules nommées corps apoptotiques. Ce sont des vésicules de grande taille, pouvant mesurer entre 1 à 5  $\mu\text{m}$ . Celles-ci sont ensuite éliminées par les macrophages. Néanmoins, ces corps apoptotiques sont capables de transférer du matériel génétique. Par exemple, lorsque les cellules endothéliales entrent en apoptose, elles peuvent produire des corps apoptotiques chargés en miR-126. Ce miARN est alors transféré aux cellules adjacentes, les poussant à produire du CXCL12 (*C-X-C Motif Chemokine Ligand 12*) suite à l'inhibition de RGS16 (*Regulator Of G-Protein Signaling 16*). RGS16 inhibe CXCR4 (*C-X-C Motif Chemokine Receptor 4*), un récepteur couplé aux protéines-G, impliqué dans la production du CXCL12. En inhibant RGS16, miR-126 induit alors la production de CXCL12, permettant ainsi de mobiliser les cellules progénitrices produites au niveau de la moelle osseuse vers la circulation sanguine et de prévenir la formation de plaques d'athérosclérose (Zernecke et al. 2009).

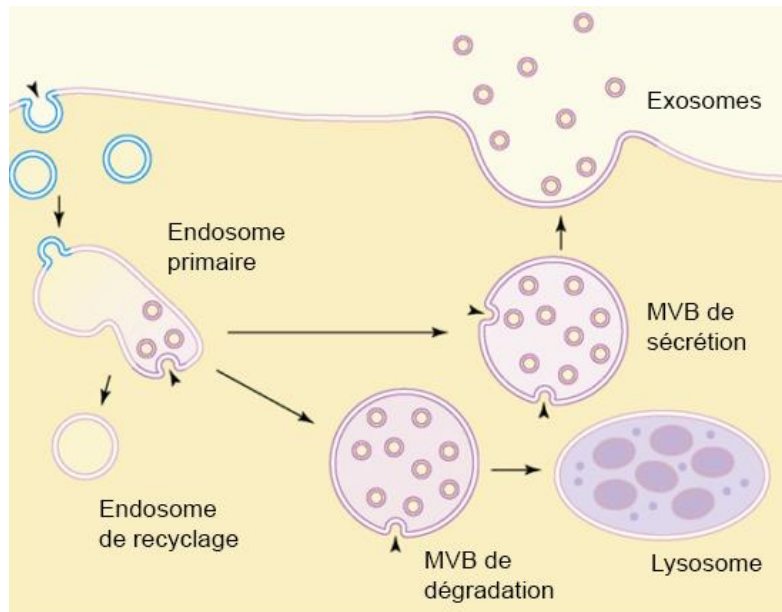
## 4. Les exosomes

### 4.1. Généralités

Les exosomes ont été observés pour la première fois en 1983 dans les réticulocytes (Harding et al. 1983, Pan & Johnstone 1983). Leur taille est de 30 à 150 nm et ils sont produits activement par les cellules. Pendant de nombreuses années, les exosomes ont été peu étudiés car considérés comme un moyen pour la cellule d'éliminer des molécules indésirables (Johnstone et al. 1987). Un regain d'intérêt pour ces vésicules a ensuite été provoqué par la découverte d'ARNm et de miARN au sein des exosomes. Il est, dès lors, vite apparu que les exosomes sont des médiateurs de la communication intercellulaire grâce au transfert de leur contenu (Valadi et al. 2007). En plus de ce rôle dans la communication intercellulaire, les exosomes constituent une nouvelle classe de biomarqueurs pouvant être utilisée dans le domaine biomédical. Dans cette idée, ils sont également des cibles prometteuses dans l'élaboration de nouvelles approches thérapeutiques.

### 4.2. Biogenèse

Les exosomes sont issus du processus d'endocytose. Au départ connu comme étant un processus dynamique permettant d'internaliser des molécules extracellulaires et d'ensuite les recycler, les hydrolyser ou les sécréter, il s'avère que les vésicules d'endocytose peuvent également participer à la sécrétion de vésicules contenant du matériel intracellulaire. Tout d'abord, les vésicules d'endocytose fusionnent dans le cytosol afin de former un endosome primaire. Celui-ci subit une étape de maturation où de nombreuses vésicules intraluminales (ILV, *intraluminal vesicle*) se forment par invagination de la membrane de l'endosome. Ces ILV s'accumulent au sein du lumen de l'endosome et contiennent des protéines, des lipides et des acides nucléiques sélectionnés de manière spécifique. L'endosome tardif, aussi appelé corps multivésiculaire (MVB, *multivesicular body*), peut ensuite suivre deux voies. L'une de ces voies implique la fusion du MVB avec des lysosomes, des compartiments cellulaires contenant des hydrolases induisant la dégradation de leur contenu. L'autre voie consiste en la fusion du MVB avec la membrane plasmique et au relargage des ILV dans le milieu extracellulaire. Une fois sécrétées, ces vésicules sont renommées exosomes (**Figure 13**). Il existe différentes sous-populations de MVB en fonction de leur morphologie, leur composition ou leur localisation (Colombo et al. 2014). Les MVB riches en cholestérol semblent être destinés à fusionner avec la membrane plasmique afin de sécréter leur contenu (Möbius et al. 2003) tandis que les MVB riches en acide lysobiphosphatidique (LBPA) suivent plutôt la voie de la dégradation (Wubbolts et al. 2003). Néanmoins, les mécanismes contrôlant le destin des MVB restent à l'heure actuelle peu connus.



**Figure 13 : Biogenèse des exosomes.** Les endosomes formés à partir de la membrane plasmique fusionnent en un endosome primaire. Ceux-ci peuvent conduire au recyclage des molécules internalisées par endocytose ou alors former des vésicules intraluminales par invagination de leur membrane. Ces corps multivésiculaires (MVB) ainsi formés peuvent ensuite fusionner avec un lysosome, conduisant à la dégradation de leur contenu, ou alors fusionner avec la membrane plasmique et relarguer des exosomes dans le milieu extracellulaire. Adapté de (Cocucci et al. 2009).

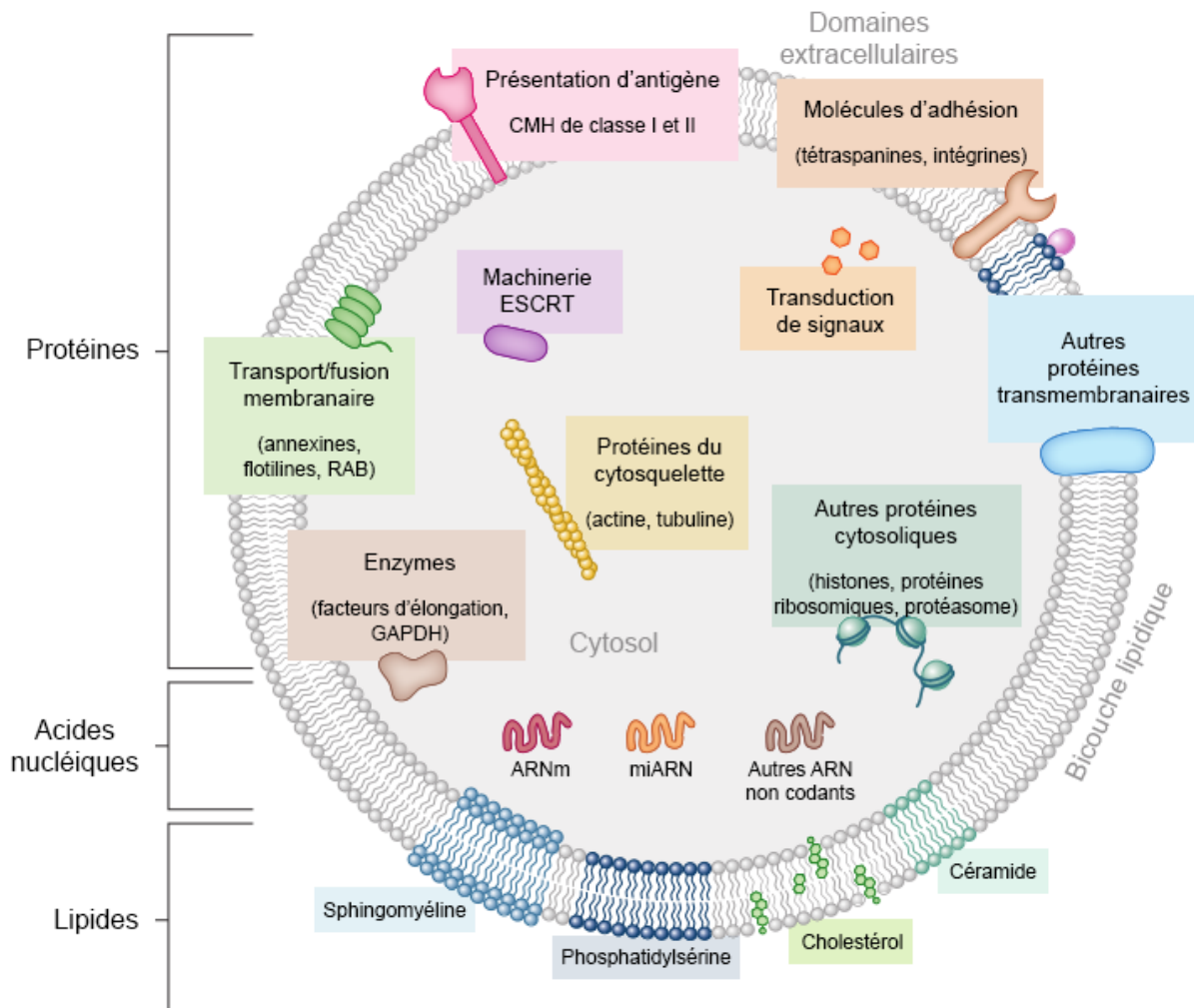
### 4.3. Composition des exosomes

Les exosomes sont composés de protéines, de lipides mais également d'acides nucléiques (**Figure 14**). Des analyses protéomiques ont révélé que les exosomes contiennent une série de protéines propres à la cellule productrice. Néanmoins, certaines protéines sont communes à la plupart des exosomes, peu importe le type cellulaire producteur. Celles-ci incluent des protéines endosomales, des protéines membranaires et des protéines cytosoliques. Il n'y a, par contre, pas de traces de protéines provenant du noyau, du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi au sein des exosomes (Colombo et al. 2014). Certaines protéines sont considérées comme étant des marqueurs exosomaux. Parmi celles-ci, on compte notamment les protéines ALIX et TSG101 (*Tumor Susceptibility 101*), faisant partie du complexe ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*), et les tétraspanines CD63, CD9 et CD81 (Janas et al. 2015).

La composition en lipides des exosomes est particulière. Ils sont enrichis en sphingomyéline, en phosphatidylsérine, en cholestérol et en céramide (Colombo et al. 2014, Janas et al. 2015). Certains de ces lipides sont retrouvés dans les *lipid rafts*, des microdomaines de la membrane plasmique, pouvant être internalisés par endocytose et dont les protéines et les lipides peuvent être incorporés au sein des exosomes (Tan et al. 2013).

Ces dernières années, de nombreuses études ont montré la présence d'une grande variété d'ARN (ARNm et miARN) dans les exosomes. Leur abondance au sein des exosomes peut être différente de celle retrouvée dans la cellule productrice. Ceci suggère que des mécanismes de sélection du cargo en ARN sont à l'œuvre. On trouve également d'autres types d'ARN, à savoir des ARN de transfert (ARNt) ou encore des longs ARN non codants. Pour finir, il semble que les ARN ribosomiques 18S et 28S soient absents des exosomes (Colombo et al. 2014, Janas et al. 2015).

Il est à noter que cette description synthétise les données actuelles concernant la composition des exosomes et que celle-ci n'est pas représentative de toutes les populations d'exosomes existantes. L'environnement extracellulaire peut, en effet, avoir un impact sur la composition et le cargo de ces vésicules. Ainsi, les cellules endothéliales activées ou exposées à des conditions d'hypoxie ne produisent pas des exosomes similaires en composition (de Jong et al. 2012).



**Figure 14 : Composition des exosomes.** Les exosomes sont composés de protéines, de lipides et d'acides nucléiques. Adapté de (Colombo et al. 2014).

#### 4.4. Sélection du contenu des exosomes

Le mécanisme de formation des ILV et de sélection de leur contenu le mieux compris à l'heure actuelle implique une trentaine de protéines formant l'ESCRT. Celles-ci s'assemblent en quatre complexes protéiques. Le complexe ESCRT-0 reconnaît les protéines transmembranaires ubiquitinées et les séquestre au niveau de la membrane de l'endosome. ESCRT-I et -II induisent ensuite la déformation de la membrane afin de former une invagination. Finalement, ESCRT-III provoque la scission de la membrane afin de former une vésicule dans le lumen du MVB (Colombo et al. 2014). Ce mécanisme peut également être favorisé par la présence syndécanes et de leur adaptateur cytosolique, la synthénine. Celle-ci interagit directement avec la protéine ALIX, une protéine accessoire du complexe ESCRT. Ces interactions induisent alors la formation d'ILV au sein des MVB et, par conséquent, stimulent la production d'exosomes. De plus, les chaînes d'héparane sulfates présentes au niveau des syndécanes permettent la formation de clusters de syndécanes, favorisant le recrutement de la synthénine et d'ALIX. Ces chaînes d'héparane sulfates permettent également l'incorporation de protéines telles que le FGFR1 (*Fibroblast Growth Factor Receptor 1*) au sein des exosomes (Baietti et al. 2012, David & Zimmermann 2016). Le mécanisme régulant la sélection du contenu en protéines solubles n'est pas encore élucidé à l'heure actuelle. Néanmoins, il semblerait que HSC70 soit impliqué (Sahu et al. 2011). Les lipides sont, quant à eux, incorporés dans les ILV indépendamment de la machinerie ESCRT. Ainsi, la nSMase2 (*neutral SphingoMyelinase 2*) génère les céramides entrant dans la composition des ILV (Trajkovic et al. 2008). Certaines tétraspanines, telles que CD63 (Verweij et al. 2011), CD9 (Chairoungdua et al. 2010) ou CD81 (Perez-Hernandez et al. 2013), semblent réguler la sélection des protéines incorporées au sein des ILV. Concernant l'incorporation des ARN dans les exosomes, les mécanismes restent encore peu connus pour le moment. La présence de séquences spécifiques favorise la liaison entre les ARN et les bicouches lipidiques, en particulier au niveau de régions similaires aux *lipid rafts* (Janas et al. 2015). De même, les miARN sélectionnés pour l'export dans les exosomes présentent des séquences spécifiques permettant leur prise en charge par des RBP. Ainsi, certains miARN sont exportés spécifiquement dans les exosomes produits par les lymphocytes T grâce à la reconnaissance d'une séquence présente sur ces miARN par hnRNPA2B1 (*Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A2/B1*), une RBP impliquée dans le transport d'ARN (Villarroya-Beltri et al. 2013). C'est également le cas au niveau des hépatocytes, qui produisent des exosomes enrichis en miARN présentant une séquence permettant la prise en charge par la RBP SYNCRIP (*Synaptotagmin-binding Cytoplasmic RNA Interacting Protein*) (Santangelo et al. 2016). YBX1 (*Y-Box Binding Protein 1*), quant à elle, est une RBP favorisant l'incorporation de certains miARN, notamment miR-223 et miR-144, dans les exosomes produits par des cellules rénales embryonnaires (Shurtleff et al. 2016). Ces diverses publications démontrent que

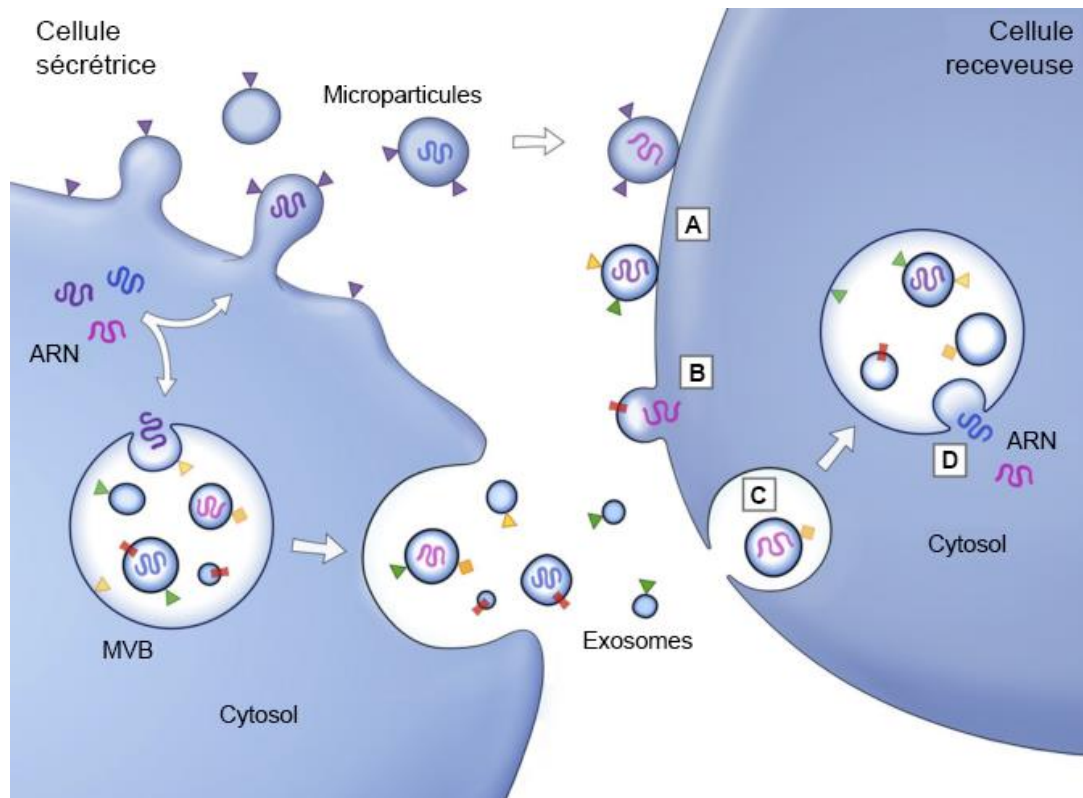
différentes protéines peuvent être impliquées dans l'export de miARN selon le type cellulaire considéré. Finalement, il semble que des modifications post-transcriptionnelles peuvent également moduler le chargement des miARN dans les exosomes. Ainsi, l'adénylation de l'extrémité 3' du miARN constitue un signal de rétention de celui-ci et en diminue l'export extracellulaire. L'uridylation constitue, par contre, un signal d'adressage vers les exosomes (Koppers-Lalic et al. 2014).

## **4.5. Transfert d'informations**

### **4.5.1. Interaction avec la cellule receveuse**

Une fois libérés dans le milieu extracellulaire, les exosomes peuvent ensuite interagir avec des cellules receveuses. Bien que les mécanismes moléculaires ne soient pas encore clairement identifiés, il est clair que l'interaction entre un exosome et sa cellule receveuse n'est pas aléatoire. La spécificité de cette interaction résulte sans doute de la présence de récepteurs et de ligands à la surface des exosomes et de la membrane plasmique de la cellule receveuse.

L'interaction entre les exosomes et la cellule receveuse peut être suffisante à l'induction d'un changement physiologique au sein de la cellule (**Figure 15A**). Un exemple classique est celui de la liaison d'exosomes provenant de cellules présentatrices d'antigènes à des lymphocytes T (Segura et al. 2007). Lorsque cette interaction n'est, néanmoins, pas suffisante pour induire des effets sur la cellule receveuse, les exosomes peuvent fusionner avec la membrane plasmique ou encore être internalisés (**Figure 15B-C**). Lors de la fusion des exosomes avec la membrane plasmique de la cellule receveuse, le contenu des exosomes est directement libéré dans le cytoplasme de celle-ci. L'internalisation par endocytose, par contre, permet à la cellule receveuse de dégrader et de réutiliser toutes les molécules composant les exosomes. Pour que le contenu de ces derniers puisse ensuite rejoindre le cytoplasme, ils doivent alors fusionner avec la membrane de la vésicule d'endocytose (**Figure 15D**) (Colombo et al. 2014). A l'heure actuelle, le mécanisme de stabilisation des acides nucléiques libérés dans le cytoplasme de la cellule receveuse reste encore inconnu. Il semblerait, néanmoins, que la protéine AGO2 puisse s'associer à miR-16 au sein des exosomes et empêcher la dégradation de ce miARN par les RNases de la cellule receveuse (Lv et al. 2014). D'autres miARN, tels que miR-223 et miR-230b, montrent une grande résistance aux nucléases alors qu'ils ne sont pas associés à AGO2, indiquant que d'autres protéines pourraient être impliquées dans la stabilisation des miARN libérés par les exosomes (Li et al. 2012).



**Figure 15 : Interactions entre les exosomes et les cellules receveuses.** Une fois les exosomes libérés dans l'espace extracellulaire, ceux-ci peuvent interagir avec la cellule receveuse de diverses manières. **A.** L'exosome peut se lier à la cellule receveuse au niveau de sa membrane plasmique grâce à l'interaction entre des récepteurs et leurs ligands. **B.** L'exosome peut fusionner avec la membrane plasmique de la cellule receveuse et y libérer son contenu directement dans le cytosol. **C.** L'exosome peut être internalisé par endocytose par la cellule receveuse. **D.** Suite à cette endocytose, l'exosome peut ensuite fusionner avec la vésicule d'endocytose afin de libérer son contenu dans le cytosol. Adapté de (Raposo & Stoorvogel 2013).

#### 4.5.2. Transfert fonctionnel de miARN

Suite à la découverte de la présence de miARN au sein des exosomes, il est très vite apparu que ceux-ci jouent un rôle très important dans la communication intercellulaire. Cette hypothèse a rapidement été validée suite à l'observation que les monocytes produisent des exosomes spécifiquement chargés en miR-150 et que ce miARN peut être transféré à des cellules endothéliales. Ce transfert permet également de réguler les fonctions des cellules receveuses. De fait, suite au transfert de miR-150, la migration des cellules endothéliales est stimulée grâce à l'inhibition de c-Myb (Zhang et al. 2010). L'angiogenèse peut également être stimulée suite au transfert de miR-125b via les exosomes produits par des cellules souches adipeuses. Ce miARN contrôle notamment la spécification des cellules *tip*, ainsi que leur nombre, en ciblant l'ARNm codant pour Dll4 (Liang et al. 2016).

Une autre étude a montré que, lorsqu'elles sont soumises à des contraintes de cisaillement, les cellules endothéliales produisent des exosomes enrichis en miR-143 et miR-145. Le transfert de ces exosomes induit ensuite le phénotype athéroprotecteur des VSMC et réduit la formation de lésions athérosclérotiques *in vivo* (Hergenreider et al. 2012). Plus récemment, il a également été montré que ces miARN régulent les fonctions des cellules endothéliales. Ainsi, le transfert de ces miARN des VSMC aux cellules endothéliales réduit leur prolifération ainsi que leur capacité à former des tubes sur une couche de Matrigel (Climent et al. 2015).

Dans le cadre du développement tumoral, le transfert de miARN grâce aux exosomes permet aux cellules cancéreuses de modifier leur microenvironnement. Ainsi, les cellules cancéreuses sont capables d'induire la migration des cellules endothéliales grâce à la sécrétion d'exosomes et au transfert de miR-9. Ces effets sont la conséquence de l'inhibition de SOCS5 (*Suppressor Of Cytokine Signaling 5*) par miR-9, conduisant alors à l'activation de la voie de signalisation JAK-STAT (Zhuang et al. 2012). La sécrétion d'exosomes peut également promouvoir la dissémination des métastases. Dans le cadre du cancer du sein, les cellules cancéreuses sont capables de détruire la fonction de barrière des cellules endothéliales en leur transférant des exosomes enrichis en miR-105. Ce miARN cible, en effet, ZO-1 (*Zonula Occludens 1*), ce qui a pour conséquence d'augmenter la perméabilité vasculaire ainsi que de détruire les structures tubulaires créées par les cellules endothéliales (Zhou et al. 2014).

#### **4.6. Les exosomes en tant que biomarqueurs et outils thérapeutiques**

##### **4.6.1. Les exosomes en tant que biomarqueurs**

Il est connu que les exosomes, ainsi que leur contenu, représentent la cellule productrice et l'état dans lequel celle-ci se trouve. Cette particularité permet d'envisager l'utilisation des exosomes comme de nouveaux biomarqueurs dans le domaine clinique. De plus, leur présence dans de nombreux fluides biologiques permet d'effectuer des prélèvements de manière moins invasive par rapport à certaines analyses effectuées à l'heure actuelle.

De nombreuses publications montrent l'intérêt grandissant pour ces vésicules dans le cadre du cancer. En effet, il a été constaté que les cellules cancéreuses produisent de très grandes quantités d'exosomes et que le cargo de ceux-ci permet de différencier les différents stades d'un cancer (Mirzaei et al. 2016). Par exemple, la survivine-B2, un variant d'épissage de la survivine, est de moins en moins présente au sein des exosomes au cours du développement du cancer du sein. L'analyse des niveaux de survivine-B2 au sein des exosomes permettrait alors d'identifier les stades précoces de la maladie (Khan et al. 2014). Un profil particulier en lipides des exosomes a également été identifié dans le cadre du cancer de la prostate (Skotland et al. 2017). De plus, les



ARN contenus dans les exosomes peuvent également constituer de bons biomarqueurs. Ainsi, les exosomes provenant de l'urine de patients atteints d'un cancer de la vessie contiennent les ARNm de *GALNT1* (*Polypeptide GalNAc Transferase 1*) et de *LASS2* tandis que ces ARNm sont absents des exosomes de sujets sains. Au contraire, les ARNm d'*ARHGEF39* et de *FOXO3* (*Forkhead Box O3*) sont uniquement détectés dans les exosomes de sujets sains. L'utilisation de ces quatre transcrits permettrait alors de différencier les patients atteints de ce cancer par rapport aux sujets sains (Perez et al. 2014). De même, le profil de huit miARN permet de différencier des sujets sains de sujets atteints d'un carcinome colorectal et ce dès les stades les plus précoces (Ogata-Kawata et al. 2014). Pour finir, la combinaison de marqueurs protéiques et du profil en miARN permet d'augmenter la sensibilité ainsi que la spécificité des biomarqueurs utilisés (Madhavan et al. 2015).

#### **4.6.2. Les exosomes en tant qu'outils thérapeutiques**

Les exosomes sont également des vecteurs très prometteurs pour l'administration de molécules thérapeutiques. Comparés aux systèmes utilisés jusqu'à présent, les exosomes présentent de nombreux avantages. Ils sont disponibles aisément, ne présentent pas de toxicité, peuvent cibler spécifiquement certains tissus, sont stables et fusionnent efficacement avec les membranes. De nombreuses études citées dans ce travail ont démontré qu'il est possible de traiter des tumeurs grâce à des exosomes chargés avec des miARN aux propriétés anti-tumorales. Cependant, il est également possible d'utiliser ces vésicules pour transporter d'autres agents thérapeutiques. Par exemple, la doxorubicine, un agent chimiothérapeutique, peut être encapsulée dans des exosomes et ensuite être utilisée *in vivo* pour traiter des souris porteuses d'une tumeur. En plus de transporter efficacement cet agent thérapeutique, les exosomes limitent la toxicité cardiaque de celui-ci (Tian et al. 2014).

Comme expliqué précédemment, les cellules cancéreuses produisent de nombreux exosomes afin de modifier leur microenvironnement pour qu'il leur soit favorable. Par exemple, les cellules cancéreuses mammaires HER2 (*Human Epidermal growth factor Receptor 2*)-positives sont capables de produire des exosomes HER2-positifs. L'herceptine, un anticorps ciblant HER2, est alors séquestrée par ces exosomes, l'empêchant de cibler les cellules cancéreuses. L'élimination spécifique de ces exosomes grâce à un système proche de la dialyse permet de contrecarrer ce mode de résistance et d'améliorer les effets des traitements (Marleau et al. 2012).

Une autre approche thérapeutique implique l'utilisation d'exosomes afin d'éduquer le système immunitaire. Il est, par exemple, possible de diminuer les risques de rejet d'une greffe d'organe en injectant au receveur des exosomes produits par les cellules dendritiques du donneur. Ces exosomes induisent une tolérance des lymphocytes T du receveur envers l'organe greffé

(Yang et al. 2011). Les exosomes produits par les cellules dendritiques peuvent également induire une réponse anti-tumorale en présentant des antigènes tumoraux aux lymphocytes T (Pitt et al. 2014). Ces résultats ont menés à des études cliniques en phase II confirmant l'effet de ces exosomes sur la maintenance de l'immunité anti-tumorale chez des patients atteints du cancer du poumon à un stade avancé (Besse et al. 2016).

## But du travail

L'angiogenèse est un processus essentiel au développement embryonnaire. Chez l'adulte, le réseau vasculaire se trouve à l'état quiescent mais peut temporairement être réactivé dans certaines conditions telles que la réparation tissulaire, le cycle menstruel ou l'inflammation. Néanmoins, l'angiogenèse peut aussi être réactivée dans des conditions pathologiques comme, par exemple, lors du développement tumoral. Dans ce cas, l'angiogenèse aboutit à un réseau vasculaire dysfonctionnel. Les vaisseaux sanguins sont, en effet, structurellement anormaux. Ils sont tortueux, présentent des fenestrations et leur couverture en cellules murales est amoindrie, le tout favorisant la dissémination des métastases (Jain 2005). Dans ce contexte, l'angiogenèse est une cible de choix pour l'élaboration de thérapies anti-cancéreuses. Ainsi, de nombreuses thérapies ciblant l'angiogenèse tumorale ont vu le jour. Malheureusement, celles-ci présentent des limites, des phénomènes de résistances apparaissant rapidement. En outre, il apparaît que les cellules murales jouent un rôle important dans certains mécanismes de résistance aux thérapies anti-angiogènes (Armulik et al. 2005). C'est pourquoi il est important de mieux comprendre les bases moléculaires de l'angiogenèse afin de développer des traitements plus efficaces.

Ces dernières années, la communauté scientifique s'est intéressée aux miARN et à leur fonction régulatrice. Dans ce contexte, notre laboratoire a précédemment identifié plusieurs miARN aux fonctions anti-angiogènes (Halkein et al. 2013, Sabatel et al. 2011, Tabruyn et al. 2013). Par ailleurs, les miARN ont été identifiés dans de nombreux fluides biologiques. Protégés à l'intérieur de vésicules extracellulaires, les exosomes, ces miARN peuvent être transférés d'une cellule donneuse à une cellule receveuse afin d'y réguler l'expression de gènes. Ainsi, notre laboratoire a montré récemment que les cellules endothéliales sont capables de communiquer avec les cellules tumorales et d'en modifier les fonctions (Bovy et al. 2015).

Les rapports entre les cellules endothéliales et les VSMC qui leur sont associées étant fortement perturbés lors du développement tumoral, il est important de mieux comprendre comment ces cellules communiquent. Bien que de nombreuses informations soient connues quant aux facteurs sécrétés par les cellules endothéliales et les VSMC, peu d'informations sont disponibles quant au rôle des exosomes dans la communication entre ces cellules. C'est pourquoi nous nous sommes demandé si l'étude de la communication par l'intermédiaire des exosomes nous permettrait d'identifier de nouveaux miARN impliqués dans la régulation des fonctions des cellules endothéliales et des VSMC. Ceux-ci pourraient, en outre, avoir un intérêt thérapeutique dans le cadre de l'élaboration de nouvelles thérapies anti-angiogènes.

## Matériel et méthodes

### 1. Cellules

#### 1.1. Cellules endothéliales

Les cellules endothéliales humaines de la veine ombilicale (HUVEC, *Human Umbilical Vein Endothelial Cell*) sont isolées comme précédemment décrit (Jaffe et al. 1973). La veine ombilicale est lavée au PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) puis remplie d'une solution de trypsine (0,05% trypsine, 0,2% EDTA, PBS, pH 7,6), clampée et incubée durant 30 minutes à 37°C. La veine ombilicale est ensuite lavée au PBS et l'éluat est centrifugé afin de récupérer les cellules. Les HUVEC sontensemencées dans des boîtes de culture enduites de gélatine 0,2% et cultivées dans du milieu EGM-2 (*EGM-2 BulletKit medium*) (Lonza) supplémenté de 5% de sérum DBS (*Donor Bovine Serum*) (Gibco). Pour les expériences, les HUVEC sont utilisées entre les passages 6 et 11.

#### 1.2. Cellules musculaires lisses vasculaires

Les cellules musculaires lisses vasculaires de la veine ombilicale (HUVSMC, *Human Umbilical Vein Smooth Muscle Cell*) ont été obtenues chez ScienCell Research Laboratories. Les HUVSMC sontensemencées dans des boîtes de culture enduites de poly-L-lysine (2 µg/cm<sup>2</sup>) et cultivées dans du milieu SMCM (ScienCell Research Laboratories). Pour les expériences, les populations cellulaires ayant doublés entre 6 et 15 fois sont utilisées.

#### 1.3. Culture de cellules eucaryotes

Lorsque les cellules arrivent à confluence dans une flasque T-75 (Greiner Bio One), elles sont d'abord lavées avec 5 ml de PBS. Elles sont ensuite incubées avec 1 ml de solution de trypsine pendant 2 à 3 minutes à 37°C afin de les détacher. Les cellules sont récoltées dans 5 ml de milieu complet et centrifugées à 400 g pendant 5 minutes. Le culot est ensuite resuspendu dans du milieu complet. Les cellules sont finalement réparties dans de nouvelles flasques et du milieu complet y est ajouté afin d'atteindre un volume final de 10 ml. Les flasques sont alors placées dans un incubateur à 37°C sous une atmosphère de 5% en CO<sub>2</sub>.

### 2. Analyse des exosomes

#### 2.1. Préparation du milieu de culture déplété en exosomes

Le sérum nécessaire à la préparation du milieu est dilué dans un rapport 1:1 avec du milieu de culture sans sérum. Ce mélange est ensuite ultracentrifugé à 110.000 g pendant 5h afin

d'éliminer les exosomes qu'il contient. Le surnageant est récupéré et filtré avec un filtre de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore) pour qu'il soit stérile avant d'être ajouté au reste du milieu de culture.

## **2.2. Purification des exosomes**

Les cellules sont cultivées durant 72h dans du milieu de culture déplété en exosomes. Les exosomes produits par les cellules sont ensuite purifiés grâce à une série de centrifugations et d'ultracentrifugations à 4°C. La première centrifugation de 20 minutes à 2.000 g est réalisée afin d'éliminer les débris cellulaires ainsi que les cellules mortes. Le surnageant est ensuite centrifugé pendant 45 minutes à 12.000 g afin d'éliminer les microvésicules de taille importante. Le surnageant est alors filtré avec un filtre de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore) puis ultracentrifugé pendant 2h à 110.000 g avec un rotor SW 32 TI (Beckman Coulter) pour culoter les exosomes. Le surnageant est éliminé, le culot est lavé au PBS puis de nouveau ultracentrifugé pendant 2h à 110.000 g avec un rotor SW 32 TI. Le surnageant est éliminé et le culot d'exosomes est finalement resuspendu dans du PBS.

## **2.3. Quantification du niveau protéique des exosomes**

Le dosage des exosomes est réalisé à l'aide du kit *Pierce BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific) selon les instructions de la firme. Le principe de ce dosage repose sur la réduction d'ions  $\text{Cu}^{2+}$  en ions  $\text{Cu}^+$  par les protéines en milieu alcalin et la détection des complexes formés entre ces ions  $\text{Cu}^+$  et l'acide bicinchoninique. Les exosomes sont d'abord lysés dans du PBS contenant 1% de Triton X-100 et 0,1% de SDS (dodécylsulfate de sodium). Les échantillons sont ensuite répartis dans une microplaque en présence des réactifs et incubés à 60°C pendant 1h. L'absorbance est ensuite lue à 562 nm avec un spectrophotomètre VICTOR X3 Multilabel Reader (PerkinElmer).

## **2.4. Analyse par *Dynamic Light Scattering* (DLS)**

L'analyse par DLS permet de mesurer la diffraction de la lumière d'un échantillon de particules en suspension soumises aux mouvements Browniens. Il est ainsi possible d'établir la taille des particules de 0,3 nm à 10  $\mu\text{m}$  de diamètre. Pour les expériences de DLS, les exosomes sont resuspendus dans du PBS et analysés avec un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). Les données d'intensité, de volume et de distribution pour chaque échantillon correspondent à la moyenne de 20 mesures collectées sur une base continue de 3 minutes et 20 secondes.

## **2.5. Analyse par microscopie électronique à transmission**

Les exosomes sont placés sur une grille de nickel recouverte d'une couche mince de carbone pendant 1h, lavés 3 fois au PBS puis fixés avec du paraformaldéhyde (PFA) 2% pendant

10 minutes. Après 3 lavages, les grilles sont post-fixées avec du glutaraldéhyde 2,5% pendant 10 minutes. Les échantillons sont ensuite contrastés à l'aide d'acétate d'uranyle 2,5% pendant 10 minutes. Après 4 lavages, les grilles sont incubées pendant 10 minutes dans du citrate de plomb. Les grilles sont finalement lavées 4 fois dans de l'eau désionisée et examinées grâce à un microscope électronique à transmission JEM-1400 (JEOL) à 80 kV.

## **2.6. Analyse par cytométrie de flux**

Les exosomes purifiés par ultracentrifugation étant trop petits que pour être détectés par le laser d'un cytomètre, ceux-ci sont d'abord couplés à des billes de latex aldéhyde/sulfate de 4 µm de diamètre (Invitrogen) pendant 30 minutes à température ambiante. Les exosomes couplés aux billes sont ensuite incubés dans une solution de blocage (PBS-5% BSA (*Bovine Serum Albumin*)) pendant 30 minutes. Ils sont ensuite incubés avec un anticorps primaire dilué 50 fois dans une solution de PBS-5% BSA pendant 1h. Après deux lavages, les exosomes couplés aux billes sont incubés avec l'anticorps secondaire biotinylé dilué 200 fois dans une solution de PBS-5% BSA pendant 30 minutes. Après deux lavages, ils sont ensuite incubés avec de la streptavidine couplée à de la phycoérythrine (016-110-084, Jackson ImmunoResearch) diluée 50 fois dans une solution de PBS-5% BSA pendant 30 minutes. Après deux lavages, les exosomes couplés aux billes sont resuspendus dans du PBS et analysés par un cytomètre de flux FACSCalibur (BD Biosciences).

Les anticorps primaires utilisés sont les suivants :

- Souris anti-CD31 humain (M0823, Dako)
- Souris anti-CD63 humain (556019, BD Biosciences)

L'anticorps secondaire utilisé est un anticorps chèvre anti-souris couplé à la biotine (E0433, Dako).

## **2.7. Marquage des exosomes au PKH67 et internalisation par les cellules**

Pour les expériences d'internalisation, les exosomes sont marqués à l'aide d'un fluorochrome membranaire, le PKH67, suivant le protocole fourni avec le kit *PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Kit for General Cell Membrane Labeling* (Sigma-Aldrich). Après la première ultracentrifugation à 110.000 g de la purification des exosomes, le culot est resuspendu dans 500 µl de diluant C. On y ajoute ensuite 500 µl de diluant C contenant 2 µl de PKH67. Le mélange est incubé 5 minutes à température ambiante puis neutralisé avec 1 ml de PBS-20% BSA pendant 1 minute à température ambiante. Finalement, deux ultracentrifugations à 110.000 g à 4°C pendant 90 minutes sont réalisées afin de laver les exosomes avec du PBS. Le culot d'exosomes est ensuite resuspendu dans du PBS.

Les cellules sontensemencées dans leur milieu respectif à raison de 30.000 cellules par *coverslip* préalablement enduit de gélatine 0,2% pendant 45 minutes à 37°C. Après une nuit dans l'incubateur, les cellules sont traitées avec 5 µg d'exosomes marqués au PKH67 pendant 6h à 24h. Les cellules sont ensuite lavées deux fois au PBS puis fixées avec du PFA 1% pendant 15 minutes. Après un lavage au PBS, les cellules sont ensuite marquées avec du DAPI 0,1% dans une solution PBS-1% BSA-0,1% Tween 20 pendant 30 minutes à 4°C dans l'obscurité. Les cellules sont finalement lavées deux fois au PBS puis montées sur lame grâce à du ProLong (Invitrogen). L'internalisation des exosomes par les cellules est observée au microscope à fluorescence Eclipse Eclipse 90i (Nikon).

## 2.8. Séparation de populations d'exosomes par immunocapture

L'isolement des exosomes CD31-positifs a été réalisé à l'aide de billes magnétiques couplées à un anticorps dirigé contre CD31. Deux types de billes magnétiques ont été utilisés dans ce travail : des Dynabeads CD31 (Invitrogen) et des CD31 MicroBeads (Miltenyi Biotec).

Pour l'isolement des exosomes CD31-positifs réalisé à l'aide des Dynabeads CD31,  $2 \times 10^6$  Dynabeads sont lavées avec 1 ml de PBS-0,1% BSA. Celles-ci sont ensuite incubées pendant 24h à 4°C avec 20 µg d'exosomes dans un volume final de 200 µl de PBS-0,1% BSA. Les billes magnétiques sont ensuite récupérées à l'aide d'un aimant et lavées 2 fois avec 500 µl de PBS-0,1% BSA puis sont resuspendues dans du PBS. Les exosomes sont ensuite ultracentrifugés à 110.000 g pendant 2h à 4°C. Le culot d'exosomes est finalement resuspendu dans du PBS.

Pour l'isolement des exosomes CD31-positifs réalisé à l'aide des CD31 MicroBeads, le mélange d'exosomes est resuspendu dans 60 µl de PBS auxquels sont ajoutés 20 µl de *FcR blocking Reagent* et 20 µl de CD31 MicroBeads. Ce mélange est incubé durant 2h à 4°C puis mélangé à 1 ml de PBS-0,1% Tween 20. Il est ensuite passé sur une colonne MS (Miltenyi Biotec) placée sur un séparateur MIDIMACS (Miltenyi Biotec). Les exosomes liés aux billes sont retenus au niveau de la colonne tandis que les exosomes CD31-négatifs se retrouvent dans l'éluat. La colonne est lavée 3 fois avec du PBS-0,1% Tween 20 puis retirée du séparateur MIDIMACS afin de collecter les exosomes CD31-positifs. Ceux-ci sont détachés de la colonne en chassant 1 ml de PBS-0,1% Tween 20 à l'aide du piston fourni avec la colonne. Les billes magnétiques sont décrochées des exosomes suite à une centrifugation de 5 minutes à 2.000 g. Les exosomes sont ensuite ultracentrifugés à 110.000 g pendant 2h à 4°C. Le culot d'exosomes est finalement resuspendu dans du PBS.

## 2.9. Traitement des exosomes à la RNase A

50 µg d'exosomes ont été traités durant 30 minutes à 37°C en présence de RNase A (ThermoFisher Scientific) à une concentration finale de 40 µg/ml. Ceux-ci sont ensuite incubés

dans du *QIAzol Lysis Reagent* (Qiagen) afin de procéder à l'extraction des miARN qu'ils contiennent. Avant d'être traités à la RNase A, certains échantillons ont été également lysés durant 10 minutes dans un tampon de lyse concentré 10 fois composé de SDS 10% et de Triton X-100 1% dans du PBS qui est alors dilué dans la solution d'exosomes.

### 3. Western blotting

Les cellules sont lavées avec du PBS et grattées dans du tampon de lyse RIPA (50 mM Tris (pH 7,5), 150 mM NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,5% NP-40, 0,25% désoxycholate de sodium, 0,1% SDS, inhibiteurs de protéases (Roche), 0,2% octylglucoside). Les débris cellulaires insolubles sont éliminés par centrifugation à 10.000 g pendant 10 minutes. Les exosomes sont, quant à eux, lysés dans un tampon de lyse concentré 10 fois composé de SDS 10% et de Triton X-100 1% dans du PBS qui sera dilué dans la solution d'exosomes. La concentration protéique est déterminée à l'aide du kit *BCA protein assay* (Pierce) selon les instructions fournies avec le kit.

Les lysats protéiques (15 µg de protéines exosomales ou de protéines cellulaires) sont séparés par SDS-PAGE et transférés sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (Millipore). La membrane est ensuite incubée pendant 1h dans une solution de blocage contenant du TBS (*Tris-Buffered Saline*), 5% de lait et 0,1% de Tween 20 à température ambiante. Elle est ensuite incubée durant une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire dilué 1.000 fois dans une solution de TBS-0,5% lait-0,1% Tween 20. Après 3 lavages au TBS-0,1% Tween 20, les complexes antigène-anticorps sont détectés avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase dilué 2.000 fois dans une solution de TBS-0,5% lait-0,1% Tween 20 et le système d'amplification fluoro-chemiluminescent ECL (Pierce).

Les anticorps primaires utilisés sont les suivants :

- Souris anti- $\alpha$ -SMA humain (M0851, Dako)
- Souris anti-CD31 humain (M0823, Dako)
- Souris anti-CD63 humain (556019, BD Biosciences)
- Souris anti-CD81 humain (10630D, Invitrogen)
- Souris anti-CD9 humain (sc-20048, Santa Cruz Biotechnology)
- Souris anti-TSG101 humain (GTX70255, GeneTex)

L'anticorps secondaire utilisé est un anticorps cheval anti-souris couplé à la peroxydase de raifort (7076, Cell Signaling).



#### 4. Immunocytofluorescence

Les cellules sontensemencées dans leur milieu respectif à raison de 30.000 cellules par *coverslip* préalablement enduit de gélatine 0,2% pendant 45 minutes à 37°C. Après 48h d'incubation à 37°C, les cellules sont lavées deux fois au PBS puis fixées avec du PFA 1% pendant 15 minutes. Après deux lavages au PBS, les cellules sont ensuite incubées dans une solution de PBS-5% BSA pendant 30 minutes. Elles sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire dilué 50 fois dans une solution de PBS-1% BSA-0,1% Tween 20 pendant 1h à 4°C. Après deux lavages au PBS, les cellules sont ensuite incubées avec du DAPI 0,1% et l'anticorps secondaire couplé à une molécule fluorescente dilué 100 fois dans une solution PBS-1% BSA-0,1% Tween 20 pendant 30 minutes à 4°C dans l'obscurité. Les cellules sont finalement lavées 2 fois au PBS puis montées sur lame grâce à du ProLong (Invitrogen). Le marquage fluorescent est finalement observé au microscope à fluorescence Eclipse 90i (Nikon).

Les anticorps primaires utilisés sont les suivants :

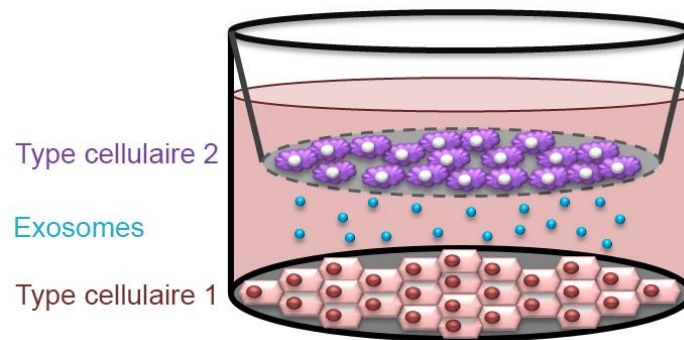
- Souris anti-CD105 humain (M3527, Dako)
- Souris anti-CD31 humain (M0823, Dako)
- Souris anti-ICAM-1 humain (ab2213, Abcam)
- Souris anti-intégrines  $\alpha_v\beta_3$  humain (MAB1976, Millipore)
- Lapin anti-NG2 humain (AB5320, Millipore)
- Lapin anti-VEGFR-2 (2479, Cell Signaling)

Les anticorps secondaires utilisés sont les suivants :

- Cheval anti-souris couplé à la fluorescéine (FI-2000, Vector Laboratories)
- Chèvre anti-lapin couplé à un Alexa Fluor 488 (A-11034, Invitrogen)

#### 5. Coculture en système *transwell*

Pour la réalisation de cocultures de HUVEC et de HUVSMC sans contact physique, l'un des deux types cellulaires estensemencé à raison de 200.000 cellules par puits dans une plaque 6 puits enduites à la gélatine 0,2% ou à la poly-L-lysine (2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) selon le type cellulaire utilisé. Les cellules sont incubées une nuit à 37°C. Le lendemain, des inserts de coculture *transwell* composés d'une membrane percée de micropores de 0,4  $\mu\text{m}$  (3412, Corning) sont ajoutés dans les puits. Le second type cellulaire y est alorsensemencé à raison de 100.000 cellules par insert. Les cocultures sont ensuite incubées pendant 48h supplémentaires (**Figure 16**).



**Figure 16 : Schéma du système de coculture *transwell* de deux types cellulaires.** Les deux types cellulaires sont placés en coculture et séparés par un insert *transwell* composé d'une membrane percée de micropores de 0,4  $\mu\text{m}$  permettant l'échange d'exosomes.

## 6. Coculture de contact et séparation des populations cellulaires

Pour la réalisation de coculture de HUVEC et de HUVSMC avec contacts physiques, 1.200.000 HUVEC sontensemencées dans une flasque T-75 dans du milieu complet. Une fois les cellules adhérentes, 1.200.000 HUVSMC sontensemencées sur la monocouche de HUVEC dans du milieu EGM-2 complet déplété en exosomes. Les cellules sont incubées ainsi pendant 72h.

La séparation des deux populations cellulaires est réalisée à l'aide de CD31 MicroBeads (Miltenyi Biotec). Pour ce faire, les cellules sont détachées à la trypsine et comptées. Pour 10.000.000 cellules, les cellules sont resuspendues dans 60  $\mu\text{l}$  de milieu auxquels sont ajoutés 20  $\mu\text{l}$  de *FcR blocking Reagent* et 20  $\mu\text{l}$  de CD31 MicroBeads. Ce mélange est incubé durant 15 minutes à 4°C. On y ajoute ensuite 1 ml de milieu. La séparation magnétique est réalisée à l'aide d'une colonne MS et d'un séparateur MIDIMACS. Les HUVEC liées aux billes sont retenues au niveau de la colonne tandis que les HUVSMC se retrouvent dans l'éluat. La colonne est lavée 3 fois avec du milieu puis retirée du séparateur MIDIMACS afin de collecter les HUVEC. Celles-ci sont détachées de la colonne en chassant 3 ml de milieu à l'aide du piston fourni avec la colonne. Les cellules sont ensuite centrifugées à 400 g pendant 5 minutes, resuspendues dans leur milieu respectif et, finalement,ensemencées dans de nouvelles flasques T-75 pour la production d'exosomes.

## 7. Transfection inverse de pré-miARN, d'anti-miARN et de siARN

Le contenu en miARN des cellules peut être modifié transitoirement sans en modifier le matériel génétique cellulaire grâce à la transfection de certaines molécules, les pré-miARN (Ambion) et les anti-miARN (Ambion). Les pré-miARN sont des molécules mimant le duplex de miARN pouvant être pris en charge par le RISC. Ces molécules permettent d'augmenter la concentration cellulaire en un miARN donné. Les anti-miARN sont, quant à eux, des séquences antisens prévues pour s'hybrider spécifiquement avec un miARN endogène donné. Ces molécules

permettent de séquestrer un miARN et d'en réduire les fonctions au sein de la cellule. Les siARN permettent, quant à eux, d'inhiber transitoirement l'expression d'un gène cible.

Les cellules sont transfectées avec les pré-miARN, les anti-miARN ou les siARN à l'aide de Dharmafect-4 (Dharmacon) selon le protocole du fabricant. Pour une flasque T-25, 1 µl de Dharmafect-4 est ajouté à 299 µl de milieu sans sérum et sans antibiotique. Ce mélange est ensuite incubé pendant 10 minutes à température ambiante. Les pré-miARN, les anti-miARN ou les siARN sont mélangés à du milieu sans sérum et sans antibiotique pour obtenir un volume final de 300 µl à une concentration de 25 nM. Les mélanges de pré-miARN, d'anti-miARN ou de siARN sont ensuite ajoutés aux mélanges de Dharmafect-4 et incubés pendant 20 minutes à température ambiante. Finalement, 800.000 cellules, resuspendues au préalable dans 1,4 ml de milieu complet, sontensemencées dans une T-25 contenant le mélange de transfection. Après une nuit à 37°C, le milieu de culture est renouvelé avec du milieu frais. Les volumes de transfection peuvent être adaptés aux différents formats de culture et les cellules peuvent également être directement mélangées à la solution de transfection pour êtreensemencées par la suite.

## **8. Extraction d'ARN à partir de cellules et d'exosomes**

Après 2 lavages au PBS, les cellules sont lysées dans 350 µl de *QIAzol Lysis Reagent* (Qiagen) et les ARN sont extraits à l'aide du kit *miRNeasy Mini Kit* (Qiagen) selon les instructions de la firme. L'extraction d'ARN à partir d'exosomes est réalisée avec le même kit. Dans ce cas, 5 µg d'exosomes sont lysés dans 1 ml de *QIAzol Lysis Reagent* contenant 6,25 fmol de miARN *spike-in* (cel-miR-39 et cel-miR-238) (Integrated DNA Technologies). Les *spike-in* sont utiles à la normalisation des échantillons.

## **9. Analyse quantitative de l'expression des miARN par TaqMan**

La synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) est réalisée à partir de 10 ng d'ARN cellulaire ou de 1,67 µl d'ARN exosomal grâce au kit *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) combiné à des amorces *TaqMan MicroRNA Assay* (Applied Biosystems). Les ADNc produits sont alors utilisés pour la réaction de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) quantitative réalisée à l'aide des kits *TaqMan MicroRNA Assay* et *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems). Le cycle thermique est réalisé sur le système de détection *7900HT Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). Pour toutes les réactions, deux contrôles négatifs sont réalisés. Le premier contrôle consiste à ne pas ajouter d'ADNc afin de vérifier que les amorces ne s'hybrident pas. Le second contrôle consiste en une transcription réverse sans enzyme afin de vérifier l'absence d'amplification génomique. La quantité relative du niveau de miARN est quantifiée par la méthode  $2^{-\Delta Ct}$  et est normalisée par rapport aux contrôles internes. Pour

normaliser les données obtenues à partir de cellules, les petits ARN nucléolaires RNU44 et RNU48 ont été utilisés. Pour les exosomes, le niveau relatif de miARN est normalisé par rapport à la moyenne de deux miARN exogènes ajoutés lors de l'extraction des ARN, à savoir cel-miR-39 et cel-miR-238.

## **10. Analyse quantitative de l'expression des gènes par qRT-PCR**

La synthèse d'ADNc est réalisée à partir de 1 µg d'ARN cellulaire grâce au kit *iScript cDNA Synthesis Kit* (Bio-Rad) selon le protocole fourni avec le kit. Les ADNc produits sont alors utilisés pour la réaction de PCR quantitative réalisée à l'aide du kit *Takyon MasterMix* (Eurogentec) et d'amorces spécifiques au gène analysé (Integrated DNA Technologies). Le cycle thermique est réalisé sur le système de détection *7900HT Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). Pour toutes les réactions, deux contrôles négatifs sont réalisés. Le premier contrôle consiste à ne pas ajouter d'ADNc afin de vérifier que les amorces ne s'hybrident pas. Le second contrôle consiste en une transcription inverse sans enzyme afin de vérifier l'absence d'amplification génomique. La quantité relative du niveau d'expression du gène d'intérêt est quantifiée par la méthode  $2^{-\Delta Ct}$  et est normalisée par rapport aux gènes *housekeeping* de la cyclophiline A (PPIA) et de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH). Les amorces sont choisies dans la base de données PrimerBank (<https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>) et sélectionnées de telle sorte qu'elles recouvrent des jonctions exon-exon afin d'éviter la détection d'ADN génomique.

## **11. Profilage de miARN par qRT-PCR**

Les ARN totaux sont extraits grâce au kit *miRNeasy Mini Kit* (Qiagen) à partir de 100 µg d'exosomes. La réverse transcription des miARN est ensuite réalisée grâce au kit *miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR* (Exiqon). Les ADNc sont ensuite mélangés au *ExiLENT SYBR Green master mix* (Exiqon) et à la *ROX Passive Reference Dye* (Bio-Rad) selon les instructions fournies par Exiqon et répartis sur une plaque 384 puits *microRNA Ready-to-Use PCR panel 1 V3.M* (Exiqon) contenant des amorces pour la détection de 377 miARN différents. Le cycle thermique est réalisé sur le système de détection *7900HT Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). Les contrôles comprennent des gènes de référence, des calibreurs inter-plaques et des contrôles négatifs.

## **12. Tests fonctionnels**

### **12.1. Test de prolifération par incorporation de BrdU**

Les cellules sontensemencées dans une plaque 96 puits à raison de 2.000 HUVEC ou 3.000 HUVSMC par puits dans 100 µl de leur milieu complet respectif. Le lendemain, le milieu est

renouvelé pour du milieu contenant 0,5% de sérum. Si les cellules doivent être traitées avec des exosomes, ce milieu contient alors 15 µg d'exosomes/ml. Les cellules sont ensuite incubées pendant 48h supplémentaires, comprenant une incubation de 8h (HUVEC) ou de 24h (HUVSMC) avec du BrdU 10 µM. La prolifération est ensuite analysée par mesure de l'incorporation de BrdU à l'aide du kit *Cell Proliferation ELISA BrdU (Colorimetric)* (Roche) selon le protocole du kit. L'absorbance à 370 nm des échantillons est mesurée à l'aide d'un luminomètre/fluorimètre VICTOR X3 Multilabel Reader (PerkinElmer). Ce test permet la détection du BrdU incorporé dans l'ADN génomique des cellules en division.

### **12.2. Test de migration par *Wound Healing Assay***

Les HUVEC sontensemencées dans une plaque 48 puits à raison de 50.000 cellules par puits dans 500 µl de milieu complet. Si les cellules doivent être traitées avec des exosomes, ceux-ci sont ajoutés le lendemain au milieu de culture à une concentration de 15 µg d'exosomes/ml. A l'arrière de la plaque, sur la face extérieure, sont tracés 3 traits équidistants et parallèles qui serviront de repères lors de la mesure du *scratch*. Lorsque les cellules forment un tapis cellulaire confluent, un *scratch* perpendiculaire aux traits dessinés à l'arrière de la plaque est réalisé dans la monocouche cellulaire à l'aide d'un *tip*. Le milieu est éliminé et les cellules sont lavées au PBS pour retirer les cellules décrochées suite au *scratch*. 300 µl de milieu contenant 0,5% de sérum sont ensuite ajoutés aux cellules. A l'aide d'un objectif gradué, la largeur des *scratches* est mesurée aux intersections avec les traits se trouvant à l'arrière de la plaque. Après 6h d'incubation, une nouvelle mesure est réalisée. La vitesse de migration correspond à la différence entre la mesure au temps 0h et la mesure au temps 6h, le tout divisé par la mesure au temps 0h.

### **12.3. Test de migration en chambre de Boyden**

La chambre de Boyden consiste en une membrane percée de micropores de 8 µm. Les cellules peuvent être attirées par une substance placée de l'autre côté de la membrane et migrer par chimiotactisme à travers les pores de la membrane. Les inserts (3422, Corning) sont posés dans les puits d'une plaque 24 puits. 750 µl de milieu complet contenant 20 ng/ml de PDGF-BB (Reliatech) sont déposés dans les puits. Les inserts sont ensuite ajoutés dans les puits puis remplis avec 300 µl de milieu sans sérum contenant 40.000 HUVSMC. Si les cellules doivent être traitées avec des exosomes, ce milieu sans sérum contient alors 15 µg d'exosomes/ml. Après 6h de migration, les inserts sont récupérés, vidés et placés dans une nouvelle plaque contenant du méthanol froid. La plaque est placée à -20°C pendant 30 minutes pour fixer les cellules. La plaque est ensuite vidée de son méthanol et mise à sécher à l'air libre à température ambiante pour la nuit. Le lendemain, les cellules sont colorées au Giemsa 4% (Merck) pendant 30 minutes. Après 3 lavages à l'eau, le surplus de cellules à la surface interne des inserts est éliminé et les membranes

sont détachées des inserts pour être montées sur lame. L'analyse est réalisée au microscope, où les cellules colorées sont alors comptées.

#### **12.4. Test de tubulogenèse**

Les puits d'une plaque 96 puits sont enduits de 35  $\mu$ l de Matrigel (Corning). La plaque est ensuite incubée pendant 30 minutes à 37°C afin que le Matrigel forme un gel. Les cellules sont alors ensemencées à raison de 8.750 HUVEC par puits dans 100  $\mu$ l de milieu complet. Si les cellules doivent être traitées avec des exosomes, ce milieu contient alors 15  $\mu$ g d'exosomes/ml. Après une nuit d'incubation à 37°C, la formation de tubes par les cellules est observée au microscope. Des photos de chaque puits sont réalisées et le réseau tubulaire est analysé grâce au plugin *Angiogenesis Analyzer* (<http://image.bio.methods.free.fr/ImageJ/?Angiogenesis-Analyzer-for-ImageJ&lang=en>) sur ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij>).

### **13. Analyses transcriptomiques par séquençage nouvelle génération**

Les ARN totaux sont extraits grâce au kit *miRNeasy Mini Kit* à partir de cellules transfectées avec des pré-miARN pendant 72h et cultivées dans des flasques T-25. La qualité des ARN extraits est ensuite mesurée à l'aide du kit *RNA 6000 Nano Kit* (Agilent) sur un 2100 Bioanalyzer (Agilent). A partir de 1  $\mu$ g d'ARN, les bibliothèques d'ADNc sont générées à l'aide du kit *TruSeq Stranded Total RNA Sample Preparation with Ribo-Zero* (Illumina) selon les instructions du fournisseur. Les bibliothèques indexées sont finalement séquencées à l'aide d'un séquenceur NextSeq500 (Illumina). L'analyse des transcriptomes est réalisée avec les outils *TopHat* et *Cufflinks Assembly & Differential Expression* disponibles sur *BaseSpace* (<http://basespace.illumina.com>). Ces résultats sont ensuite comparés avec les listes de cibles potentielles prédites sur *TargetScan* (<http://www.targetscan.org>) et les processus biologiques dans lesquels interviennent les gènes modulés par les miARN sont mis en évidence grâce aux annotations disponibles sur *Gene Ontology* (<http://geneontology.org/>).

### **14. Analyse de la néovascularisation rétinienne**

Afin d'analyser la néovascularisation rétinienne, des souriceaux en P1 sont injectés soit de façon intra-vitelline avec 0,5  $\mu$ l de pré-miR-contrôle (100  $\mu$ M), de pré-miR-539-5p (100  $\mu$ M) ou de pré-miR-582-5p (100  $\mu$ M), soit de façon intra-péritonéale avec 20  $\mu$ g d'exosomes chargés en pré-miR-contrôle ou en pré-miR-539-5p. Le P0 correspond au jour de la naissance des souriceaux. A P5, les souriceaux sont sacrifiés, les yeux sont récupérés puis fixés durant 30 minutes dans du PFA 4%. Après trois lavages au PBS, les rétines sont disséquées et post-fixées durant 30 minutes avec du PFA 4%. Un marquage immunofluorescent est ensuite réalisé avec l'isolectine b4 pour marquer les vaisseaux sanguins. Brièvement, les rétines sont perméabilisées dans du PBS

contenant 1% de BSA et 0,1% de Triton X-100 durant une nuit à 4°C. Ensuite, l'isolectine b4 (B12-05, Vector Laboratories) est ajoutée à la rétine à une concentration de 1/100 durant 4h à 4°C. Les rétines sont ensuite lavées dans du PBS durant une nuit entière. L'anticorps secondaire couplé à un Alexa 488 (S11223, Invitrogen) est alors ajouté à une concentration de 1/200 et incubé avec la rétine durant 4h. Les rétines sont finalement montées sur lames et analysées par microscopie à fluorescence Eclipse 90i (Nikon).

## 15. Analyses statistiques

Toutes les expériences sont réalisées au moins 3 fois. Toutes les valeurs sont exprimées sous la forme de moyenne relative  $\pm$  déviation standard (SD). La comparaison entre les différentes conditions est évaluée par le test de Student. Pour les analyses transcriptomiques, les statistiques sont représentées par la *q value*, c'est-à-dire la *p value* ajustée selon le taux de faux positifs.

## 16. Séquence des amorces de qRT-PCR

Nom	Amorce sens	Amorce antisens
ADM	ATGAAGCTGGTTTCCGTCG	GACATCCGCAGTTCCTCTT
AKT1	AGCGACGTGGCTATTGTGAAG	GCCATCATTCTTGAGGAGGAAGT
CASP3	CATGGAAGCGAATCAATGGACT	CTGTACCAGACCGAGATGTCA
CAV2	AAGACCTGCCTAATGGTTCTGC	CTCGTACACAATGGAGCAATGAT
COL18A1	TGGTCTACGTGTCGGAGCA	GCCTCGTTCGCCCTTAGAG
CDK6	TGCCCCGATCTATAGTTTCCA	AGCCAACACTCCAGAGATCCAC
CXCL1	CTTGCCTCAATCCTGCATC	CCTTCTGGTCAGTTGGATTTG
FGF2	CACATTTAGAAGCCAGTAATCT	CCCGACGGCCGAG TTAGC
ITGA3	TGTGGCTTGGAGTACTGTG	TCATTGCCTCGCACGTAGC
ITGB3	AGTAACCTGCGGATTGGCTTC	GTCACCTGGTCAGTTAGCGT
MAP3K7	ATTGTAGAGCTTCGGCAGTTATC	CTGTAAACACCAACTCATTGCG
PDCD6	ATGGCCGCCTACTCTTACC	TCCTGTCTTTATCGACCCTCTG
PHB2	GTGCGCGAATCTGTGTTTAC	GATAATGGGGTACTGGAACCAAG
PTPRJ	GGCACCCCTAGTCCAATTCC	TCCCATTAGATCCTTGTTTCAGGT
ROBO2	GTTTGTGTTGCGAGGAATATCT	GTTTTGTGCGGAAGTCATCTCGTA
TP53INP1	TTCTCCAACCAAGAACCAGA	GCTCAGTAGGTGACTCTTCACT
VASH1	GGTGGGCTACCTGTGGATG	CACTCGGTATGGGGATCTTGG
VCAM-1	GAGACCACCCAGAATCTAGATA	ACTTCCTGTCTGCATCCTCCA

## 17. Séquence des siARN

Nom	Séquence
<b>TSG101 siARN1</b>	CCAGUCUUCUCUCGUCCUAdTdT
<b>TSG101 siARN2</b>	CCUCCAGUCUUCUCUCGUCdtdt



## Références bibliographiques

- Affolter M, Zeller R, Caussinus E. 2009. Tissue remodelling through branching morphogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10(12):831–42
- Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. 2005. Endothelial/pericyte interactions. *Circ. Res.* 97(6):512–23
- Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, et al. 2011. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108(12):5003–8
- Avraamides CJ, Avraamides CJ, Garmy-Susini B, Garmy-Susini B, Varner JA, Varner JA. 2008. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat. Rev. Cancer.* 8(8):604–17
- Baietti MF, Zhang Z, Mortier E, Melchior A, Degeest G, et al. 2012. Syndecan–syntenin–ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat. Cell Biol.* 14(7):677–85
- Bajou K, Herkenne S, Thijssen VL, D’Amico S, Nguyen N-Q-NQ, et al. 2014. PAI-1 mediates the antiangiogenic and profibrinolytic effects of 16K prolactin. *Nat Med.* 20(7):741–47
- Bao B, Rodriguez-Melendez R, Wijeratne SSK, Zempleni J. 2010. Biotin regulates the expression of holocarboxylase synthetase in the miR-539 pathway in HEK-293 cells. *J. Nutr.* 140(9):1546–51
- Bartel DP. 2009. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell.* 136(2):215–33
- Bautch VL, Caron KM. 2015. Blood and lymphatic vessel formation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7(3):a008268
- Beck B, Driessens G, Goossens S, Youssef KK, Kuchnio A, et al. 2011. A vascular niche and a VEGF–Nrp1 loop regulate the initiation and stemness of skin tumours. *Nature.* 478(7369):399–403
- Beets K, Huylebroeck D, Moya IM, Umans L, Zwijsen A. 2013. Robustness in angiogenesis: Notch and BMP shaping waves
- Bergers G, Benjamin LE. 2003. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer.* 3(6):401–10
- Bergers G, Song S. 2005. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro. Oncol.* 7(4):452–64

- Besse B, Charrier M, Lapiere V, Dansin E, Lantz O, et al. 2016. Dendritic cell-derived exosomes as maintenance immunotherapy after first line chemotherapy in NSCLC. *Oncoimmunology*. 5(4):e1071008
- Betz C, Lenard A, Belting H-G, Affolter M. 2016. Cell behaviors and dynamics during angiogenesis. *Development*. 143(13):2249–60
- Bobowicz M, Skrzypski M, Czapiewski P, Marczyk M, Maciejewska A, et al. 2016. Prognostic value of 5-microRNA based signature in T2-T3N0 colon cancer. *Clin. Exp. Metastasis*. 33(8):765–73
- Bonauer A, Carmona G, Iwasaki M, Mione M, Koyanagi M, et al. 2009. MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice. *Science (80-. )*. 324(5935):1710–13
- Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. 2006. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13(12):1097–1101
- Bovy N, Blomme B, Frères P, Dederen S, Nivelles O, et al. 2015. Endothelial exosomes contribute to the antitumor response during breast cancer neoadjuvant chemotherapy via microRNA transfer. *Oncotarget*. 6(12):10253–66
- Bryan BA, D'Amore PA. 2007. What tangled webs they weave: Rho-GTPase control of angiogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* 64(16):2053–65
- Caporali A, Emanuelli C. 2011. MicroRNA regulation in angiogenesis. *Vascul. Pharmacol.* 55(4):79–86
- Caporali A, Martello A, Miscianinov V, Maselli D, Vono R, Spinetti G. 2016. Contribution of pericyte paracrine regulation of the endothelium to angiogenesis. *Pharmacol. Ther.* S0163-7258(16):30179–6
- Carmeliet P. 2000. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Med.* 6(3):389–95
- Carmeliet P. 2005. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*. 438(December):932–36
- Carmeliet P, Jain RK. 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 407(6801):249–57
- Carmeliet P, Jain RK. 2011a. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 473(7347):298–307
- Carmeliet P, Jain RK. 2011b. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10(6):417–27

- Cartland S, Genner S, Zahoor A, Kavurma M. 2016. Comparative Evaluation of TRAIL, FGF-2 and VEGF-A-Induced Angiogenesis In Vitro and In Vivo. *Int. J. Mol. Sci.* 17(12):2025
- Chairoungdua A, Smith DL, Pochard P, Hull M, Caplan MJ. 2010. Exosome release of  $\beta$ -catenin: A novel mechanism that antagonizes Wnt signaling. *J. Cell Biol.* 190(6):1079–91
- Chamorro-Jorganes A, Lee MY, Araldi E, Landskroner-Eiger S, Fernández-Fuertes M, et al. 2016. VEGF-Induced Expression of miR-17-92 Cluster in Endothelial Cells Is Mediated by ERK/ELK1 Activation and Regulates Angiogenesis. *Circ. Res.* 118(1):38–47
- Chen G, Zhang Y, Wu X. 2014a. 786-0 renal cancer cell line-derived exosomes promote 786-0 cell migration and invasion in vitro. *Oncol. Lett.* 7(5):1576–80
- Chen Q, Yang L, Xiao Y, Zhu J, Li Z. 2014b. Circulating microRNA-182 in plasma and its potential diagnostic and prognostic value for pancreatic cancer. *Med. Oncol.* 31(11):225
- Chen Y, Gorski DH. 2008. Regulation of angiogenesis through a microRNA (miR-130a) that down-regulates antiangiogenic homeobox genes GAX and HOXA5. *Blood.* 111(3):1217–26
- Climent M, Quintavalle M, Miragoli M, Chen J, Condorelli G, Elia L. 2015. TGF $\beta$  triggers miR-143/145 transfer from smooth muscle cells to endothelial cells, thereby modulating vessel stabilization. *Circ. Res.* 116(11):1753–64
- Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. 2009. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol.* 19(2):43–51
- Cohen JL, Ata AE, Jackson NL, Rahn EJ, Ramaker RC, et al. 2017. Differential stress induced c-Fos expression and identification of region-specific miRNA-mRNA networks in the dorsal raphe and amygdala of high-responder/low-responder rats. *Behav. Brain Res.* 319:110–23
- Colombo M, Raposo G, Théry C. 2014. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30(August):255–89
- Conway EM, Collen D, Carmeliet P. 2001. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc. Res.* 49(3):507–21
- Cooke JP. 2003. NO and angiogenesis. *Atheroscler. Suppl.* 4(4):53–60
- Corbel C, Hernandez I, Wu B, Kosik KS. 2015. Developmental attenuation of N-methyl-D-aspartate receptor subunit expression by microRNAs. *Neural Dev.* 10(20):1–9
- Cordes KR, Sheehy NT, White MP, Berry EC, Morton SU, et al. 2009. miR-145 and miR-143 regulate

- smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature*. 460(7256):705–10
- David G, Zimmermann P. 2016. Heparanase tailors syndecan for exosome production. *Mol. Cell. Oncol.* 3(3):e1047556
- De Donatis A, Ranaldi F, Cirri P, Donatis A De, Ranaldi F, Cirri P. 2010. Reciprocal control of cell proliferation and migration. *Cell Commun. Signal.* 8(1):20
- de Jong OG, Verhaar MC, Chen Y, Vader P, Gremmels H, et al. 2012. Cellular stress conditions are reflected in the protein and RNA content of endothelial cell-derived exosomes. *J. Extracell. Vesicles.* 1(4):1–12
- de Souza PS, Cruz ALS, Viola JPB, Maia RC. 2015. Microparticles induce multifactorial resistance through oncogenic pathways independently of cancer cell type. *Cancer Sci.* 106(1):60–68
- de Souza PS, Faccion RS, Bernardo PS, Maia RC. 2016. Membrane microparticles: shedding new light into cancer cell communication. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 142(7):1395–1406
- Dvorak AM, Feng D. 2001. The Vesiculo-Vacuolar Organelle (VVO): A New Endothelial Cell Permeability Organelle. *J. Histochem. Cytochem.* 49(4):419–31
- Edwards CA, Mungall AJ, Matthews L, Ryder E, Gray DJ, et al. 2008. The evolution of the DLK1-DIO3 imprinted domain in mammals. *PLoS Biol.* 6(6):1292–1305
- Fasanaro P, D'Alessandra Y, Di Stefano V, Melchionna R, Romani S, et al. 2008. MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand ephrin-A3. *J. Biol. Chem.* 283(23):15878–83
- Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. 2008. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet.* 9(2):102–14
- Fish JE, Santoro MM, Morton SU, Yu S, Yeh RF, et al. 2008. miR-126 Regulates Angiogenic Signaling and Vascular Integrity. *Dev. Cell.* 15(2):272–84
- Folkman J. 1971. Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *N. Engl. J. Med.* 285(21):1182–86
- Gaengel K, Genové G, Armulik A, Betsholtz C. 2009. Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29(5):630–38
- Garcia MD, Larina IV. 2014. Vascular development and hemodynamic force in the mouse yolk sac. *Front. Physiol.* 5 AUG:308

- Ghajar CM, Peinado H, Mori H, Matei IR, Evason KJ, et al. 2013. The perivascular niche regulates breast tumour dormancy. *Nat. Cell Biol.* 15(7):807–17
- Good DJ, Polverini PJ, Rastinejad F, Le Beau MM, Lemons RS, et al. 1990. A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87(17):6624–28
- Gracia A, Miranda J, Fernández-Quintela A, Eseberri I, Garcia-Lacarte M, et al. 2016. Involvement of miR-539-5p in the inhibition of de novo lipogenesis induced by resveratrol in white adipose tissue. *Food Funct.* 7(3):1680–88
- Grundmann S, Hans FP, Kinniry S, Heinke J, Helbing T, et al. 2011. MicroRNA-100 regulates neovascularization by suppression of mammalian target of rapamycin in endothelial and vascular smooth muscle cells. *Circulation.* 123(9):999–1009
- Gu L, Sun W. 2015. MiR-539 inhibits thyroid cancer cell migration and invasion by directly targeting CARMA1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 464(4):1128–33
- Guled M, Lahti L, Lindholm PM, Salmenkivi K, Bagwan I, et al. 2009. CDKN2A, NF2, and JUN are dysregulated among other genes by miRNAs in malignant mesothelioma - A mirna microarray analysis. *Genes Chromosom. Cancer.* 48(7):615–23
- Halkein J, Tabruyn SP, Ricke-Hoch M, Haghikia A, Nguyen NQN, et al. 2013. MicroRNA-146a is a therapeutic target and biomarker for peripartum cardiomyopathy. *J. Clin. Invest.* 123(5):2143–54
- Hammond SM. 2015. An overview of microRNAs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 87:3–14
- Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, et al. 2006. Molecular Basis for the Recognition of Primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 Complex. *Cell.* 125(5):887–901
- Hanahan D, Folkman J. 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 86(3):353–64
- Hansen TF, Carlsen AL, Heegaard NHH, Sørensen FB, Jakobsen A. 2015. Changes in circulating microRNA-126 during treatment with chemotherapy and bevacizumab predicts treatment response in patients with metastatic colorectal cancer. *Br. J. Cancer.* 112(4):624–29
- Harding C, Heuser J, Stahl P. 1983. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J. Cell Biol.* 97(2):329–39
- Hellwig SMM, Damen CA, Van Adrichem NPH, Blijham GH, Groenewegen G, Griffioen AW. 1997.

- Endothelial CD34 is suppressed in human malignancies: Role of angiogenic factors. *Cancer Lett.* 120(2):203–11
- Hergenreider E, Heydt S, Tréguer K, Boettger T, Horrevoets AJG, et al. 2012. Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. *Nat. Cell Biol.* 14(3):249–56
- Hu H, Zhang Y, Cai XH, Huang JF, Cai L. 2012. Changes in microRNA expression in the MG-63 osteosarcoma cell line compared with osteoblasts. *Oncol. Lett.* 4(5):1037–42
- Ibáñez-Ventoso C, Vora M, Driscoll M. 2008. Sequence relationships among *C. elegans*, *D. melanogaster* and human microRNAs highlight the extensive conservation of microRNAs in biology. *PLoS One.* 3(7):e2818
- Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. 1973. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J. Clin. Invest.* 52(11):2745–56
- Jain RK. 2003. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat. Med.* 9(6):685–93
- Jain RK. 2005. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science (80-. ).* 307(5706):58–62
- Janas T, Janas MM, Sapoń K, Janas T. 2015. Mechanisms of RNA loading into exosomes. *FEBS Lett.* 589(13):1391–98
- Jansen F, Yang X, Baumann K, Przybilla D, Schmitz T, et al. 2015. Endothelial microparticles reduce ICAM-1 expression in a microRNA-222-dependent mechanism. *J. Cell. Mol. Med.* 19(9):2202–14
- Jarad M, Kuczynski EA, Morrison J, Vilorio-Petit AM, Coomber BL. 2017. Release of endothelial cell associated VEGFR2 during TGF- $\beta$  modulated angiogenesis in vitro. *BMC Cell Biol.* 18(1):10
- Jeanson-Leh L, Lameth J, Krimi S, Buisset J, Amor F, et al. 2014. Serum profiling identifies novel muscle miRNA and cardiomyopathy-related miRNA biomarkers in golden retriever muscular dystrophy dogs and duchenne muscular dystrophy patients. *Am. J. Pathol.* 184(11):2885–98
- Jiang Y, Yin HAO, Zheng XL. 2010. MicroRNA-1 inhibits myocardin-induced contractility of human vascular smooth muscle cells. *J. Cell. Physiol.* 225(2):506–11
- Jin H, Wang W. 2015. MicroRNA-539 suppresses osteosarcoma cell invasion and migration in vitro and targeting Matrix metalloproteinase-8. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8(7):8075–82

- Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. 1987. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J. Biol. Chem.* 262(19):9412–20
- Kanada M, Bachmann MH, Contag CH. 2016. Signaling by Extracellular Vesicles Advances Cancer Hallmarks. *Trends in Cancer.* 2(2):84–94
- Khan S, Bennit HF, Turay D, Perez M, Mirshahidi S, et al. 2014. Early diagnostic value of survivin and its alternative splice variants in breast cancer. *BMC Cancer.* 14(1):176
- Kim VN, Han J, Siomi MC. 2009. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10(2):126–39
- Koppers-Lalic D, Hackenberg M, Bijnsdorp I V, van Eijndhoven MAJ, Sadek P, et al. 2014. Nontemplated nucleotide additions distinguish the small RNA composition in cells from exosomes. *Cell Rep.* 8(6):1649–58
- Korpisalo P, Ylä-Herttuala S. 2010. Stimulation of functional vessel growth by gene therapy. *Integr. Biol. (Camb).* 2(2–3):102–12
- Kuehbacher A, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S. 2007. Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis. *Circ. Res.* 101(1):59–68
- Kurozumi A, Goto Y, Matsushita R, Fukumoto I, Kato M, et al. 2016. Tumor-suppressive microRNA-223 inhibits cancer cell migration and invasion by targeting ITGA3/ITGB1 signaling in prostate cancer. *Cancer Sci.* 107(1):84–94
- Landskroner-Eiger S, Qiu C, Perrotta P, Siragusa M, Lee MY, et al. 2015. Endothelial miR-17~92 cluster negatively regulates arteriogenesis via miRNA-19 repression of WNT signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112(41):12812–17
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 75(5):843–54
- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, et al. 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo J.* 23(20):4051–60
- Lee YN, Brandal S, Noel P, Wentzel E, Mendell JT, et al. 2011. KIT signaling regulates MITF expression through miRNAs in normal and malignant mast cell proliferation. *Blood.* 117(13):3629–40
- Leeper NJ, Raiesdana A, Kojima Y, Chun HJ, Azuma J, et al. 2011. MicroRNA-26a is a novel regulator

- of vascular smooth muscle cell function. *J. Cell. Physiol.* 226(4):1035–43
- Li L, Zhu D, Huang L, Zhang J, Bian Z, et al. 2012. Argonaute 2 Complexes Selectively Protect the Circulating MicroRNAs in Cell-Secreted Microvesicles. *PLoS One.* 7(10):e46957
- Liang X, Zhang L, Wang S, Han Q, Zhao RC. 2016. Exosomes secreted by mesenchymal stem cells promote endothelial cell angiogenesis by transferring miR-125a. *J. Cell Sci.* 129(11):2182–89
- Liu K, Ying Z, Qi X, Shi Y, Tang Q. 2015. MicroRNA-1 regulates the proliferation of vascular smooth muscle cells by targeting insulin-like growth factor 1. *Int. J. Mol. Med.* 36(3):817–24
- Liu X, Cheng Y, Yang J, Xu L, Zhang C. 2012. Cell-specific effects of miR-221/222 in vessels: Molecular mechanism and therapeutic application. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 52(1):245–55
- Lu P, Weaver VM, Werb Z. 2012. The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. *J. Cell Biol.* 196(4):395–406
- Lv L-Y, Wang Y-Z, Zhang Q, Zang H-R, Wang X-J. 2015. miR-539 induces cell cycle arrest in nasopharyngeal carcinoma by targeting cyclin-dependent kinase 4. *Cell Biochem. Funct.* 33(8):534–40
- Lv Z, Wei Y, Wang D, Zhang CY, Zen K, Li M. 2014. Argonaute 2 in cell-secreted microvesicles guides the function of secreted miRNAs in recipient cells. *PLoS One.* 9(7):e103599
- Lytle JR, Yario T a, Steitz J a. 2007. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104(23):9667–72
- Ma J, Feng Y, Li Z, Tang C. 2016. The effect of adrenomedullin and proadrenomedullin N-terminal 20 peptide on angiotensin II induced vascular smooth muscle cell proliferation. *Iran. J. Basic Med. Sci.* 19(1):49–54
- Madhavan B, Yue S, Galli U, Rana S, Gross W, et al. 2015. Combined evaluation of a panel of protein and miRNA serum-exosome biomarkers for pancreatic cancer diagnosis increases sensitivity and specificity. *Int. J. Cancer.* 136(11):2616–27
- Marleau AM, Chen C-S, Joyce JA, Tullis RH. 2012. Exosome removal as a therapeutic adjuvant in cancer. *J. Transl. Med.* 10(1):134
- Matamala N, Vargas MT, González-Cámpora R, Miñambres R, Arias J, et al. 2015. Tumor MicroRNA expression profiling identifies circulating MicroRNAs for early breast cancer detection. *Clin. Chem.* 61(8):1098–1106



- Mazzone M, Dettori D, Leite de Oliveira R, Loges S, Schmidt T, et al. 2009. Heterozygous Deficiency of PHD2 Restores Tumor Oxygenation and Inhibits Metastasis via Endothelial Normalization. *Cell*. 136(5):839–51
- Merkwirth C, Dargazanli S, Tatsuta T, Geimer S, Löwer B, et al. 2008. Prohibitins control cell proliferation and apoptosis by regulating OPA1-dependent cristae morphogenesis in mitochondria. *Genes Dev*. 22(4):476–88
- Milkiewicz M, Ispanovic E, Doyle JL, Haas TL. 2006. Regulators of angiogenesis and strategies for their therapeutic manipulation. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 38(3):333–57
- Mirzaei H, Sahebkar A, Jaafari MR, Goodarzi M, Mirzaei HR. 2016. Diagnostic and Therapeutic Potential of Exosomes in Cancer: The Beginning of a New Tale? *J. Cell. Physiol*. ejpg25739
- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, et al. 2008. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105(30):10513–18
- Möbius W, van Donselaar E, Ohno-Iwashita Y, Shimada Y, Heijnen HFG, et al. 2003. Recycling compartments and the internal vesicles of multivesicular bodies harbor most of the cholesterol found in the endocytic pathway. *Traffic*. 4(1):222–31
- Montecalvo A, Larregina AT, Shufesky WJ, Stolz DB, Sullivan MLG, et al. 2012. Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood*. 119(3):756–66
- Morioka S, Inagaki M, Komatsu Y, Mishina Y, Matsumoto K, Ninomiya-Tsuji J. 2012. TAK1 kinase signaling regulates embryonic angiogenesis by modulating endothelial cell survival and migration. *Blood*. 120(18):3846–57
- Moya IM, Umans L, Maas E, Pereira PNG, Beets K, et al. 2012. Stalk Cell Phenotype Depends on Integration of Notch and Smad1/5 Signaling Cascades. *Dev. Cell*. 22(3):501–14
- Muthusamy S, DeMartino AM, Watson LJ, Brittian KR, Zafir A, et al. 2014. MicroRNA-539 is up-regulated in failing heart, and suppresses O-GlcNAcase expression. *J. Biol. Chem*. 289(43):29665–76
- Nakanishi K. 2016. Anatomy of RISC: How do small RNAs and chaperones activate Argonaute proteins? *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*. 7(5):637–60
- Niculescu LS, Simionescu N, Sanda GM, Carnuta MG, Stancu CS, et al. 2015. MiR-486 and miR-92a identified in circulating HDL discriminate between stable and vulnerable coronary artery

- disease patients. *PLoS One*. 10(10):e0140958
- O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, et al. 1997. Endostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*. 88(2):277–85
- Ogata-Kawata H, Izumiya M, Kurioka D, Honma Y, Yamada Y, et al. 2014. Circulating exosomal microRNAs as biomarkers of colon cancer. *PLoS One*. 9(4):e92921
- Ørom UA, Nielsen FC, Lund AH. 2008. MicroRNA-10a Binds the 5'UTR of Ribosomal Protein mRNAs and Enhances Their Translation. *Mol. Cell*. 30(4):460–71
- Orr BA, Eberhart CG. 2015. Molecular pathways: Not a simple tube-the many functions of blood vessels. *Clin. Cancer Res*. 21(1):18–23
- Otto T, Sicinski P. 2013. The kinase-independent, second life of CDK6 in transcription. *Cancer Cell*. 24(2):141–43
- Pan BT, Johnstone RM. 1983. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: Selective externalization of the receptor. *Cell*. 33(3):967–78
- Pasquinelli AE. 2012. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat. Rev. Genet*. 13(4):271–82
- Perez-Hernandez D, Gutiérrez-Vázquez C, Jorge I, López-Martín S, Ursa A, et al. 2013. The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes. *J. Biol. Chem*. 288(17):11649–61
- Perez A, Loizaga A, Arceo R, Lacasa I, Rabade A, et al. 2014. A pilot study on the potential of RNA-associated to urinary vesicles as a suitable non-invasive source for diagnostic purposes in bladder cancer. *Cancers (Basel)*. 6(1):179–92
- Piali L, Fichtel A, Terpe HJ, Imhof BA, Gisler RH. 1995. Endothelial vascular cell adhesion molecule 1 expression is suppressed by melanoma and carcinoma. *J. Exp. Med*. 181(2):811–16
- Pigati L, Yaddanapudi SCS, Iyengar R, Kim D-J, Hearn SA, et al. 2010. Selective Release of MicroRNA Species from Normal and Malignant Mammary Epithelial Cells. *PLoS One*. 5(10):e13515
- Pitt JM, Charrier M, Viaud S, Andre F, Besse B, et al. 2014. Dendritic Cell-Derived Exosomes as Immunotherapies in the Fight against Cancer. *J. Immunol*. 193(3):1006–11
- Poliseno L, Tuccoli A, Mariani L, Evangelista M, Citti L, et al. 2006. MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. *Blood*. 108(9):3068–71

- Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. 2011. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*. 146(6):873–87
- Qian Z, Zhang L, Chen J, Li Y, Kang K, et al. 2016. MiR-328 targeting PIM-1 inhibits proliferation and migration of pulmonary arterial smooth muscle cells in PDGFBB signaling pathway. *Oncotarget*. 7(34):54998–11
- Qin J, Liang H, Shi D, Dai J, Xu Z, et al. 2015. A panel of microRNAs as a new biomarkers for the detection of deep vein thrombosis. *J. Thromb. Thrombolysis*. 39(2):215–21
- Rama N, Dubrac A, Mathivet T, Ní Chárthaigh R-A, Genet G, et al. 2015. Slit2 signaling through Robo1 and Robo2 is required for retinal neovascularization. *Nat. Med.* 21(5):483–91
- Raposo G, Stoorvogel W. 2013. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* 200(4):373–83
- Rho SB, Song YJ, Lim MC, Lee SH, Kim BR, Park SY. 2012. Programmed cell death 6 (PDCD6) inhibits angiogenesis through PI3K/mTOR/p70S6K pathway by interacting of VEGFR-2. *Cell. Signal.* 24(1):131–39
- Ribatti D. 2009. Endogenous inhibitors of angiogenesis. A historical review. *Leuk. Res.* 33(5):638–44
- Ribatti D, Nico B, Crivellato E. 2015. The development of the vascular system: a historical overview. *Methods Mol. Biol.* 1214:1–14
- Sabatel C, Malvaux L, Bovy N, Deroanne C, Lambert V, et al. 2011. MicroRNA-21 exhibits antiangiogenic function by targeting RhoB expression in endothelial cells. *PLoS One*. 6(2):e16979
- Sahu R, Kaushik S, Clement CC, Cannizzo ES, Scharf B, et al. 2011. Microautophagy of Cytosolic Proteins by Late Endosomes. *Dev. Cell*. 20(1):131–39
- Santangelo L, Giurato G, Cicchini C, Montaldo C, Mancone C, et al. 2016. The RNA-Binding Protein SYNCRIP Is a Component of the Hepatocyte Exosomal Machinery Controlling MicroRNA Sorting. *Cell Rep*. 17(3):799–808
- Segura E, Guerin C, Hogg N, Amigorena S, Thery C, et al. 2007. CD8+ dendritic cells use LFA-1 to capture MHC-peptide complexes from exosomes in vivo. *J. Immunol.* 179(3):1489–96
- Semenza GL. 2012. Hypoxia-inducible factors: Mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol. Sci.* 33(4):207–14

- Seux M, Peugot S, Montero M, Siret C, Rigot V, et al. 2011. TP53INP1 decreases pancreatic cancer cell migration by regulating SPARC expression. *Oncogene*. 30(27):3049–61
- Shibuya M. 2011. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes Cancer*. 2(12):1097–1105
- Shobha Vasudevan, Yingchun Tong JAS. 2007. Switching from Repression to Activation: MicroRNAs Can Up-Regulate Translation. *Science*. 318(5858):1931–34
- Shurtleff MJ, Temoche-Diaz MM, Karfilis K V., Ri S, Schekman R. 2016. Y-box protein 1 is required to sort microRNAs into exosomes in cells and in a cell-free reaction. *Elife*. 5(AUGUST):
- Skotland T, Ekroos K, Kauhanen D, Simolin H, Seierstad T, et al. 2017. Molecular lipid species in urinary exosomes as potential prostate cancer biomarkers. *Eur. J. Cancer*. 70:122–32
- Smart CE, Askarian Amiri ME, Wronski A, Dinger ME, Crawford J, et al. 2012. Expression and function of the protein tyrosine phosphatase receptor J (PTPRJ) in normal mammary epithelial cells and breast tumors. *PLoS One*. 7(7):e40742
- Somanath PR, Razorenova O V, Chen J, Byzova T V. 2006. Akt1 in endothelial cell and angiogenesis. *Cell Cycle*. 5(5):512–18
- Song G, Wang L. 2008. MiR-433 and miR-127 arise from independent overlapping primary transcripts encoded by the miR-433-127 locus. *PLoS One*. 3(10):e3574
- Su D, Xu H, Feng J, Gao Y, Gu L, et al. 2012. PDCD6 is an independent predictor of progression free survival in epithelial ovarian cancer. *J. Transl. Med*. 10:31
- Tabet F, Vickers KC, Cuesta Torres LF, Wiese CB, Shoucri BM, et al. 2014. HDL-transferred microRNA-223 regulates ICAM-1 expression in endothelial cells. *Nat. Commun*. 5:3292
- Tabruyn SP, Griffioen AW. 2007. Molecular pathways of angiogenesis inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 355(1):1–5
- Tabruyn SP, Hansen S, Ojeda-Fernández ML, Bovy N, Zarrabeitia R, et al. 2013. MiR-205 is downregulated in hereditary hemorrhagic telangiectasia and impairs TGF-beta signaling pathways in endothelial cells. *Angiogenesis*. 16(4):877–87
- Tan SS, Yin Y, Lee T, Lai RC, Wee R, et al. 2013. Therapeutic MSC exosomes are derived from lipid raft microdomains in the plasma membrane. *J. Extracell. vesicles*. 2(2):22614

- Tang R, Zhang G, Chen S-Y. 2016. Smooth Muscle Cell Proangiogenic Phenotype Induced by Cyclopentenyl Cytosine Promotes Endothelial Cell Proliferation and Migration. *J. Biol. Chem.* 291(52):26913–21
- Taylor DD, Shah S. 2015. Methods of isolating extracellular vesicles impact down-stream analyses of their cargoes
- Thorns C, Kuba J, Bernard V, Senft A, Szymczak S, et al. 2012. Deregulation of a distinct set of microRNAs is associated with transformation of gastritis into MALT lymphoma. *Virchows Arch.* 460(4):371–77
- Tian T, Wang Y, Wang H, Zhu Z, Xiao Z. 2010. Visualizing of the cellular uptake and intracellular trafficking of exosomes by live-cell microscopy. *J. Cell. Biochem.* 111(2):488–96
- Tian Y, Li S, Song J, Ji T, Zhu M, et al. 2014. A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy. *Biomaterials.* 35(7):2383–90
- Tkachuk VA, Plekhanova OS, Parfyonova Y V. 2009. Regulation of arterial remodeling and angiogenesis by urokinase-type plasminogen activator. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 87(4):231–51
- Todorova D, Simoncini S, Lacroix R, Sabatier F, Dignat-George F. 2017. Extracellular Vesicles in Angiogenesis. *Circ. Res.* 120(10):1658–73
- Tonge DP, Gant TW. 2016. What is normal? Next generation sequencing-driven analysis of the human circulating miRNAome. *BMC Mol. Biol.* 17(1):4
- Torella D, Iaconetti C, Catalucci D, Ellison GM, Leone A, et al. 2011. MicroRNA-133 controls vascular smooth muscle cell phenotypic switch in vitro and vascular remodeling in vivo. *Circ. Res.* 109(8):880–93
- Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L, Wenzel D, et al. 2008. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science.* 319(5867):1244–47
- Turchinovich A, Burwinkel B. 2012. Distinct AGO1 and AGO2 associated miRNA profiles in human cells and blood plasma. *RNA Biol.* 9(8):1066–75
- Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, Burwinkel B. 2011. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res.* 39(16):7223–33
- Uchino K, Takeshita F, Takahashi R, Kosaka N, Fujiwara K, et al. 2013. Therapeutic Effects of

- MicroRNA-582-5p and -3p on the Inhibition of Bladder Cancer Progression. *Mol. Ther.* 21(3):610–19
- Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* 9(6):654–59
- Verweij FJ, van Eijndhoven MAJ, Hopmans ES, Vendrig T, Wurdinger T, et al. 2011. LMP1 association with CD63 in endosomes and secretion via exosomes limits constitutive NF- $\kappa$ B activation. *EMBO J.* 30(11):2115–29
- Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. 2011. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat. Cell Biol.* 13(4):423–33
- Villarroya-Beltri C, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Cabo F, Pérez-Hernández D, Vázquez J, et al. 2013. Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat. Commun.* 4:2980
- Wang HU, Chen ZF, Anderson DJ. 1998. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell.* 93(5):741–53
- Wang K, Long B, Zhou L-Y, Liu F, Zhou Q-Y, et al. 2014. CARL lncRNA inhibits anoxia-induced mitochondrial fission and apoptosis in cardiomyocytes by impairing miR-539-dependent PHB2 downregulation. *Nat. Commun.* 5:3596
- Wang K, Zhang S, Weber J, Baxter D, Galas DJ. 2010. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 38(20):7248–59
- Wang S, Aurora AB, Johnson BA, Qi X, McAnally J, et al. 2008. The Endothelial-Specific MicroRNA miR-126 Governs Vascular Integrity and Angiogenesis. *Dev. Cell.* 15(2):261–71
- Wang X, Zuo D, Yuan Y, Yang X, Hong Z, Zhang R. 2016. MicroRNA-183 promotes cell proliferation via regulating programmed cell death 6 in pediatric acute myeloid leukemia. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 143(1):169–80
- Watanabe K, Hasegawa Y, Yamashita H, Shimizu K, Ding Y, et al. 2004. Vasohibin as an endothelium-derived negative feedback regulator of angiogenesis. *J. Clin. Invest.* 114(7):898–907

- Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, et al. 2010. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin. Chem.* 56(11):1733–41
- Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. 2009. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat. Cell Biol.* 11(3):228–34
- Woo M, Hakem R, Furlonger C, Hakem A, Duncan GS, et al. 2003. Caspase-3 regulates cell cycle in B cells: a consequence of substrate specificity. *Nat. Immunol.* 4(10):1016–22
- Wubbolts R, Leckie RS, Veenhuizen PTM, Schwarzmann G, Möbius W, et al. 2003. Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes: Potential implications for their function and multivesicular body formation. *J. Biol. Chem.* 278(13):10963–72
- Würdinger T, Tannous BA, Saydam O, Skog J, Grau S, et al. 2008. miR-296 Regulates Growth Factor Receptor Overexpression in Angiogenic Endothelial Cells. *Cancer Cell.* 14(5):382–93
- Xie L, Vo-Ransdell C, Abel B, Willoughby C, Jang S, Sowa G. 2011. Caveolin-2 is a negative regulator of anti-proliferative function and signaling of transforming growth factor beta in endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 301(5):C1161-74
- Yadav L, Puri N, Rastogi V, Satpute P, Sharma V. 2015. Tumour angiogenesis and angiogenic inhibitors: A review. *J. Clin. Diagnostic Res.* 9(6):XE01-XE05
- Yang WJ, Yang DD, Na S, Sandusky GE, Zhang Q, Zhao G. 2005. Dicer is required for embryonic angiogenesis during mouse development. *J. Biol. Chem.* 280(10):9330–35
- Yang X, Meng S, Jiang H, Zhu C, Wu W. 2011. Exosomes derived from immature bone marrow dendritic cells induce tolerogenicity of intestinal transplantation in rats. *J. Surg. Res.* 171(2):826–32
- Yin K-J, Hamblin M, Chen YE. 2015. Angiogenesis-regulating microRNAs and Ischemic Stroke. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 13(3):352–65
- Zernecke A, Bidzhekov K, Noels H, Shagdarsuren E, Gan L, et al. 2009. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci. Signal.* 2(100):ra81
- Zhang C-M, Zhao J, Deng H-Y. 2013. MiR-155 promotes proliferation of human breast cancer MCF-7 cells through targeting tumor protein 53-induced nuclear protein 1. *J. Biomed. Sci.* 20(1):79
- Zhang H, Li S, Yang X, Qiao B, Zhang Z, Xu Y. 2016a. miR-539 inhibits prostate cancer progression by directly targeting SPAG5. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 35(1):60

- Zhang Y, Liu D, Chen X, Li J, Li L, et al. 2010. Secreted Monocytic miR-150 Enhances Targeted Endothelial Cell Migration. *Mol. Cell.* 39(1):133–44
- Zhang Y nan, Xie B dong, Sun L, Chen W, Jiang SL, et al. 2016b. Phenotypic switching of vascular smooth muscle cells in the “normal region” of aorta from atherosclerosis patients is regulated by miR-145. *J. Cell. Mol. Med.* 20(6):1049–61
- Zhao T, Li J, Chen AF. 2010. MicroRNA-34a induces endothelial progenitor cell senescence and impedes its angiogenesis via suppressing silent information regulator 1. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 299(April 2010):E110–16
- Zhou Q, Gallagher R, Ufret-Vincenty R, Li X, Olson EN, 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):8287–92
- Zhou W, Fong MY, Min Y, Somlo G, Liu L, et al. 2014. Cancer-Secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis. *Cancer Cell.* 25(4):501–15
- Zhou X, Duan X, Qian J, Li F. 2009. Abundant conserved microRNA target sites in the 5'-untranslated region and coding sequence. *Genetica.* 137(2):159–64
- Zhu C, Zhou R, Zhou Q, Chang Y, Jiang M. 2016. microRNA-539 suppresses tumor growth and tumorigenesis and overcomes arsenic trioxide resistance in hepatocellular carcinoma. *Life Sci.* 166:34–40
- Zhuang G, Wu X, Jiang Z, Kasman I, Yao J, et al. 2012. Tumour-secreted miR-9 promotes endothelial cell migration and angiogenesis by activating the JAK-STAT pathway. *EMBO J.* 31(17):3513–23
- Zippel N, Malik RA, Frömel T, Popp R, Bess E, et al. 2013. Transforming growth factor- $\beta$ -activated kinase 1 regulates angiogenesis via AMP-activated protein kinase- $\alpha$ 1 and redox balance in endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33(12):2792–99



## Liste des publications

Herkenne S, Paques C, Nivelles O, Lion M, Bajou K, Pollenus T, **Fontaine M**, Carmeliet P, Martial JA, Nguyen NQN and Struman I. 2015. The interaction of uPAR with VEGFR2 promotes VEGF-induced angiogenesis. *Sci. Signal.* 8(403):ra117-ra117

Blomme A, Fahmy K, Peulen O, Costanza B, **Fontaine M**, Struman I, Baiwir D, de Pauw E, Thiry M, Bellahcène A, Castronovo V and Turtoi A. 2016. Myoferlin is a novel exosomal protein and functional regulator of cancer-derived exosomes. *Oncotarget.* 7(50):83669-83683