

UNIVERSITE DROIT ET SANTE DE LILLE II

École Doctorale Biologie – Santé

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE II

Soutenue par :

POISSONNIER Loïc

**Expression et fonctions du microARN miR-126-5p dans les
cellules endothéliales.**

Le **21 janvier 2014** devant le Jury composé de :

Présidente :

Sophie SUSEN

Professeur de l'université de Lille 2, Centre de Biologie
Pathologie, Lille

Rapporteurs :

Claudine KIEDA

Stéphane GERMAIN

Directrice de Recherche, CNRS CBM, UPR4301, Orléans

Directeur de Recherche, INSERM, CIRB, Paris

Directrice de Thèse :

Virginie MATTOT

Chargée de recherche, CNRS, IBL, UMR8161, Lille

Remerciements :

J'adresse mes remerciements :

Au Docteur Claudine KIEDA et au Docteur Stéphane GERMAIN qui m'ont fait l'honneur d'être les rapporteurs de ce travail. Merci d'avoir consacré votre temps afin d'évaluer ce manuscrit.

Au Professeur Sophie SUSEN d'avoir accepté d'être la présidente de mon jury.

Au Docteur Yvan DE LAUNOIT, directeur de l'UMR8161 de m'avoir accueilli dans son laboratoire et au Docteur Fabrice SONCIN de m'avoir intégré à son équipe.

Au Docteur Virginie MATTOT de m'avoir encadré tout au long de ma thèse. Je suis très reconnaissant pour tous ce que tu m'as appris au cours de ces années. Je rends hommage à tes qualités scientifiques et à ton dynamisme incommensurable.

A Gaëlle pour toute l'aide technique qu'elle m'a apporté ainsi que pour sa pédagogie (même si tu ne crois pas être pédagogue) et sa grande sympathie !

A mes deux bons amis, Sébastien et Pierre. Merci Séb de m'avoir écouté au cours de ces longues années dans le métro à essayer de répondre aux différentes questions scientifiques et non-scientifiques sans perdre ton sang-froid. Merci Pierre pour tes nombreux conseils et astuces très utiles. Bon courage pour la suite !

Aux techniciennes Ingrid, Catherine et Chantal qui ont joué un rôle majeur dans ma formation au cours de ma thèse.

A Julie pour toutes nos conversations scientifiques et personnelles ainsi que pour ton soutien dans certains moments de stress intense ! J'espère que nos chemins se croiseront très vite de nouveau.

A Diane pour ta bonne humeur, ton dynamisme qui ont mis l'ambiance dans le laboratoire et à ta passion pour les couleurs vives (je me suis senti moins seul) ainsi qu'à Anne, ta moitié !

Aux anciens, Etienne, pour ses précieux conseils de clonage, Suzanne, pour sa gentillesse et Géraldine, pour ta pêche et ta franchise.

A Nicole et Marie-Christine pour l'aide qu'elles nous apportent au quotidien et pour leur gentillesse.

Aux thésards et M2, Racha, Mandy, Sonia, Rémi, Joe, Jieshuang et Marion. Bon courage pour la suite !!!

A ma femme sans qui rien n'aurait été possible. Cette thèse est un peu la tienne. Pendant ces quatre années tu as eu le mérite de m'encourager, de me soutenir et de me supporter dans les moments les plus durs. En plus de cela, tu m'offres cette année le plus beau des cadeaux, je suis comblé.

A mon Parrain et ma Marraine, mes plus grands supporters !

A Denis et Cécile qui ont su me relever dans un moment critique de mon existence.

A mes Beaux-Parents pour leur soutien et leurs encouragements depuis ma première année de licence et plus particulièrement à Françoise pour sa relecture en un temps record. Merci.

A mes amis, Gaëtan, Paul, Ludo et Roland pour leur soutien même sans s'en rendre compte.

À mon père,

À ma femme et à mon futur enfant,

RÉSUMÉ

Résumé en français

Expression et fonctions du microARN miR-126-5p dans les cellules endothéliales.

Le gène *Egfl7* codant une protéine majoritairement sécrétée par les cellules endothéliales a été découvert au sein du laboratoire. Ce gène a la particularité d'héberger dans sa séquence intronique deux microARNs complémentaires nommés miR126-3p et miR-126-5p. Les microARNs sont de petites séquences de 20 à 25 nucléotides régulant l'expression de leurs cibles en se fixant sur leurs ARNm pour induire leur dégradation ou l'inhibition de leur traduction. L'expression endothéliale et les fonctions du microARN miR126-3p (microARN principal du duplex miR126-3p/126-5p) ont déjà été très largement abordées alors que celles de miR126-5p (microARN secondaire du duplex) restent inconnues. Les objectifs de notre étude ont donc été d'établir le patron d'expression de miR-126-5p lors du développement vasculaire et de caractériser ses fonctions dans les cellules endothéliales. Par hybridation *in situ*, miR-126-5p a été détecté dans les vaisseaux sanguins embryonnaires de souris principalement dans les cellules endothéliales. Cette spécificité endothéliale a été retrouvée dans différents organes tels que le cœur et les poumons et est maintenue *in vitro*. L'inhibition et la surexpression de miR-126-5p dans des cellules endothéliales veineuses (HUVEC) *in vitro* n'affectent pas les capacités de prolifération, de migration ou d'organisation en pseudocapillaires de ces cellules. En revanche, l'inhibition de miR-126-5p dans les HUVECs entraîne une répression de l'adhérence des leucocytes à la surface d'un tapis de cellules endothéliales ainsi qu'une augmentation de la transmigration de monocytes à travers une monocouche endothéliale. A l'inverse, sa surexpression génère des phénotypes opposés. Des analyses *in silico* de recherche de cibles pour miR-126-5p en lien avec le recrutement leucocytaire ont permis d'identifier une protéine participant à la transmigration des leucocytes *in vitro* et *in vivo* nommée ALCAM. A l'aide de test de transactivation, nous avons pu démontrer que miR-126-5p était capable de se fixer au 3'UTR de l'ARNm d'ALCAM afin de réprimer l'expression de la protéine. De plus, l'augmentation de la transmigration induite par la chute d'expression de miR-126-5p dans les cellules endothéliales est inhibée suite au blocage direct de la protéine ALCAM montrant ainsi que l'effet répresseur de miR-126-5p sur ce mécanisme est établi via ALCAM. Une étude par microarray, réalisée sur des HUVECs où miR-126-5p a été inhibé, a permis d'identifier une seconde cible pour miR-126-5p nommée SetD5 pour laquelle aucune fonction n'est connue à

ce jour. Des tests de transactivation ont permis de confirmer que SetD5 était une cible de miR-126-5p. De plus, l'effet de miR-126-5p sur l'adhérence des leucocytes aux cellules endothéliales est directement lié à la modulation d'expression de ce gène. Enfin, l'analyse de l'inhibition de miR-126-5p *in vivo* a permis de montrer que notre microARN d'intérêt contrôle effectivement les expressions d'ALCAM et de SetD5. Cependant, alors que miR-126-5p régule uniquement l'expression d'ALCAM dans les poumons, celle de SetD5 est sous le contrôle de miR-126-5p dans la rétine.

Nos travaux ont donc permis de mettre en évidence l'expression endothéliale de miR-126-5p et d'identifier deux de ses cibles lui permettant de jouer un rôle dans le recrutement des leucocytes au niveau de l'endothélium.

Expression and functions of the microRNA miR-126-5p in endothelial cells.

The *Egfl7* gene which was identified within the laboratory codes for a protein mainly secreted by endothelial cells. This gene harbors in its intronic sequence two complementary microRNAs named miR-126-3p and miR-126-5p. MicroRNAs are 20-25 nucleotides-long non coding RNAs which repress protein expression through binding to a complementary sequence of their target mRNAs, leading to mRNA degradation or translation inhibition. Endothelial expression and functions of miR-126-3p (The main miRNAs of the miR-126-3p/miR-126-5p duplex) was widely described while those of miR-126-5p remain unknown. The goal of our study was to establish the expression of miR-126-5p during the vascular development and to characterize its functions in endothelial cells. By *in situ* hybridization, miR-126-5p was detected in mouse embryonic vessels mainly in endothelial cells. This miR-126-5p endothelial specific expression was also found in different organs such as in the heart or lungs and is maintained *in vitro*. The inhibition and overexpression of miR-126-5p in vein endothelial cells (HUVECs) did not affect HUVECs proliferation, neither their migration nor their ability to form pseudocapillaries *in vitro*. On the other hand, miR-126-5p inhibition in HUVEC led to a repression of leukocyte adhesion onto endothelial cells as well as an increase of leukocyte transmigration across an endothelial cell monolayer. Interestingly, opposite phenotypes were observed after miR-126-5p overexpression. *In silico* analyses of miR-126-5p targets led to identify ALCAM as a potential mRNA transcript that could be regulated by miR-126-5p and which was already involved in leukocyte transmigration *in vitro* and *in vivo*. By transactivation assays, we showed that miR-126-5p was able to bind the 3'UTR of ALCAM mRNA and to repress ALCAM protein expression. Furthermore, endothelial cell treatment with an ALCAM blocking antibody abolished the effect of miR-126-5p inhibition on leukocyte transmigration indicating that miR-126-5p controls this process via ALCAM. A microarray analysis performed on HUVEC after miR-126-5p inhibition allowed the identification of another target for miR-126-5p named SetD5, a gene with unknown function. Transactivation assays confirmed that SetD5 is a target for miR126-5p. Furthermore, we showed that miR-126-5p controls leukocyte adhesion onto endothelial cells by regulating SetD5 expression. Finally, the inhibition of miR-126-5p *in vivo* demonstrated that miR-126-5p controls ALCAM and SetD5 expression in mouse. However,

while miR-126-5p exclusively regulates ALCAM expression in lungs, SetD5 expression is controlled by miR-126-5p in the retina.

In this study, we demonstrated that miR-126-5p is a functional microRNA expressed in endothelial cells. We identified two targets for this microRNA indicating that miR-126-5p participates in the control of leukocyte trafficking onto endothelial cells.

Liste des publications et communication

Le travail que j'ai réalisé au cours de ma thèse a donné lieu aux manuscrits en révision et communications suivantes :

Articles Scientifiques en révision

Poissonnier L., Villain V., Soncin F., Mattot V., *miR126-5p repression of ALCAM and SetD5 in endothelial cells regulates leukocyte adhesion and transmigration*. En révision pour Cardiovascular Research.

Poissonnier L., Villain V., Soncin F., Mattot V., *Egfl7 is specifically repressed in arteries during retinal vascular development*. En révision pour PloS One.

Communication

Poissonnier L., Villain V., Soncin F., Mattot V., *Role of miR126-5p during vascular development*. 4ème congrès de la société française d'angiogenèse, Monaco. (Communication orale et affichée).

SOMMAIRE

ABRÉVIATIONS	5
INTRODUCTION	13
Chapitre I : Généralités sur les microARNs.....	15
A. La découverte des microARNs	15
B. Biosynthèse des microARNs	16
1. La voie canonique	16
a. La transcription : Du gène au Pri-miARN	17
b. Maturation du Pri-miARN dans le noyau	18
c. Export du Pri-miARN dans le cytoplasme.....	19
d. Maturation du pré-miARN.....	20
2. Les voies non canoniques	24
a. Voies Drosha/DGCR8 indépendantes.....	24
- Les miRtrons	24
- Les snoARNs	24
- Les endoshARN	25
- La voie dépendante de la tRNase Z.....	25
- La voie des endo-siARN	26
b. Voie Dicer indépendante.....	26
3. Le « duel » miR-3p/miR-5p.....	27
C. Mode de régulation des microARNs.....	28
1. Appariement à l'ARNm cible	28
a. Sites de fixation « classiques ».....	28
- Identification des sites de fixation.....	28
- Les sites canoniques de fixation.....	29
- Les sites marginaux.....	29
- Les sites atypiques	31
b. Autres voies	31
- Fixation au niveau du 5'UTR de l'ARNm.....	31

-	Fixation au niveau de la séquence codante d'un ARNm	32
2.	Régulation de l'expression de la cible	32
a.	L'inhibition de la traduction	32
-	Inhibition lors de l'initiation de la traduction	33
-	Inhibition lors de l'élongation ou de la terminaison	34
b.	La dégradation de l'ARNm.....	35
3.	Le cas particulier des microARNs circulants.....	37
Chapitre 2 : Les microARNs et l'endothélium		39
A.	Importance des microARNs dans l'endothélium	39
1.	Leçon des inactivations de Dicer, Drosha et Argonaute	39
2.	Les microARNs endothéliaux.....	40
3.	Régulation des microARNs dans l'endothélium.....	42
a.	Par hypoxie	42
b.	Par les facteurs angiogéniques	43
c.	Par les cytokines.....	44
d.	Par le flux sanguin.....	45
B.	Fonctions des microARNs dans l'endothélium.....	46
1.	Fonctions des microARNs dans l'endothélium en condition physiologique	46
2.	Fonctions des microARNs dans l'endothélium pathologique.....	48
a.	MicroARNs et athérosclérose	48
b.	MicroARNs et inflammation	50
c.	MicroARNs et ischémie vasculaire.....	53
d.	MicroARNs et Senescence.....	55
e.	MicroARNs et angiogenèse tumorale	57
-	MicroARNs indépendant de l'hypoxie	58
-	MicroARNs dépendant de l'hypoxie	59
Chapitre 3 : Le cas particulier du duplex miR-126-3p/miR-126-5p.....		61
A.	Généralités sur le duplex.....	61
1.	Egfl7, gène hôte de miR-126-3p (miR-126) /miR-126-5p (miR-126*).....	61
2.	Expression du duplex miR-126-3p/miR-126-5p.....	62
B.	Fonctions de miR-126-3p/miR-126-5p.....	63
1.	Fonctions physiologiques.....	65
a.	Inactivations de miR-126-3p et miR-126-5p <i>in vivo</i>	65

b. MiR-126-3p/miR-126-5p dans les cellules souches hématopoïétiques et cellules progénitrices endothéliales.....	67
2. Fonctions pathologiques	69
a. Rôles de miR-126-3p au cours de l'inflammation	69
- Athérosclérose.....	70
- Asthme	72
- Autres pathologies inflammatoires.	72
b. Rôle de miR-126-3p au cours de la réplication virale.....	73
c. Rôles du duplex miR-126-3p/miR-126-5p dans le cancer	75
- miR-126-3p	75
- miR-126-5p	76
- Rôles synergiques du duplex.....	77
RÉSULTATS	81
<i>Première partie des résultats</i>	<i>83</i>
miR-126-5p participe au recrutement des leucocytes en régulant l'expression d'ALCAM et SetD5 dans les cellules endothéliales.....	83
<i>Deuxième partie des résultats</i>	<i>101</i>
Effet de l'inhibition de miR-126-5p sur le développement vasculaire de la rétine.....	101
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	129
ANNEXE	133
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	137

ABRÉVIATIONS

Abréviations

5'TOP	5'-Terminal Oligopyrimidine
ADAM9	Disintegrin and metalloproteinase Domain-containing protein 9
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AGOs	Argonaute
AKT	Protein Kinase B
ALCAM	Activated Leukocytes Cell Adhesion Molecule
ANGs	Angiopoïétines
ApoE	Apolipoprotein E
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
Bcl-2	B-Cell Lymphoma 2
BEN	Bursal epithelium and neurons
BMPR2	Bone Morphogenetic Protein Receptor II
BRCA-1	Breast Cancer 1
β TRC	β -Transducin Repeat Containing Gene
CAF-1	Chromatin Assembly Factor 1
CCNs	Cyclin
CCR4	Chemokine (C-C motif) receptor 4
CDCs	Cell division control protein
COUP-TFII	COUP Transcription Factor 2
CREB	C-AMP Response Element-binding protein
CRK	<i>v-crk</i> Avian sarcoma virus CT10 oncogene homolog
hCSHs	Cellules Souches Hématopoïétiques Humaines
mCSHs	Cellules Souches Hématopoïétiques murines
CTGF	Connective tissue growth factor
CUL-2	Cullin 2
CVB3	Coxsackievirus B3
CXCL12 (SDF1 α)	C-X-C motif chemokine 12 (Stromal Derived Factor 1 alpha)

CXCR4	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4
CYP2A3	Cytochrome P450 2A3
DCPs	Decapping Protein
DGCR8	DiGeorge Critical Region 8
Dnmt1	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1
eIF4 (A,E,G,F)	Eukaryotic initiation factor 4
EGFL7	Epidermal Growth Factor Like-domain 7
Eph	Ephrin
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinases
ESAM	Endothelial cell adhesion molecule
ETS	E26 transformation-specific sequence
EZH2	Enhancer of zeste homolog 2
FGFs	Fibroblast Growth Factor
FLT-1	Fms related tyrosine kinase 1
G-CSF	Granulocyte Colony-Stimulating Factor
GATA2	Globin transcription factor 2
GDP	Guanosine DiPhosphate
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GLCE	Glucuronic acid epimerase
GSK-3 β	Glycogen Synthase Kinase 3
GTP	Guanosine TriPhosphate
GW182 (TNRC6A)	Trinucleotide repeat containing 6A
HB-EGF	Heparin-Binding EGF-like growth factor
HDL	Lipoprotéines à haute densité
HIF-1 α	Hypoxia inducible factor 1 alpha
HKMTs	Histone lysine methyl-transférases
HMGA2	High mobility group AT-hook 2
HOXs	Homeobox
HMVEC-L	Human Microvascular Endothelial Cells (Lung)

HUAEC	Human Umbilical Artery Endothelial Cells
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
ICAMs	InterCellular adhesion molecule
IGFs	Insulin Growth Factor
IGFBP-2	Insulin growth factor binding protein 2
IGFRs	Insulin Growth Factor Receptor
I κ B α	Nuclear factor of <i>kappa</i> light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, <i>alpha</i>
ILs	Interleukine
IRES	Internal Ribosome Entry Site
IRS-1	Insulin receptor substrate 1
ITGA5	Integrin alpha 5
Jak1	Janus Kinase 1
JAMs	Junction Adhesion Molecule
KLF	Krüppel-like factor
LDL	Lipoprotéines de Faible Densité
LDLR	Low density lipoprotein receptor
LFA-1	Lymphocyte Function Antigen-1
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
LRP6	Low Density Lipoprotein Receptor-related protein 6
Mac-1	Macrophage-1 Antigen
MAP3K7	Mitogen-Activated Kinase Kinase Kinase
MCP-1	Monocyte Chimioattractant protein 1
MEMD	Human Melanoma Metastasis clone D
MERTK	c-Mer Tyrosine Kinase
miARN, miR	microARN
MLL2	Histone-Lysine N-Methyltransferase
MMP-7	Matrix Metalloproteinase-7
MRE	miRNA Response Element
mRNP	Messenger ribonucleoprotein

NF- κ B	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells
NOS	Nitric Oxide Synthase
NOT1	General negative regulator of transcription subunit 1
NOX4	NADPH Oxydase 4
OCS	Oscillatory Shear Stress
Oct4	Octamer-binding transcription factor 4
PABP1	Poly(A) Binding Protein 1
PACT	Protein Activator of PKR
PAKs	p21-Activated Kinase
PDGFs	Platelet-Derived Growth Factor
PDGFRs	Platelet-Derived Growth Factor Receptor
PECAM-1	Platelet-Derived Cell Adhesion Molecule-1
PGR	Prostaglandin Receptor
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIK3R2	PhosphoInositide-3-Kinase Regulatory subunit 2
PITPNC	Phosphatidylinositol Transfer Protein, Cytoplasmic 1
PLK2	Polo-like kinase 2
PMVEC	Pulmonary Microvascular Endothelial Cells
PPARs	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
PSGL-1	P-Selectin Glycoprotein Ligand 1
PTPNs	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type
RAS	Ras-related C3 botulinum toxin substrate
RAF	Proto-oncogene serine/threonine-protein kinase
RGS-16	Regulator of G-protein Signaling 16
RHOB	Ras homolog family member B
RISC	RNA-Induced Silencing complex
RLC	RISC Loading Complex
ROBOs	Roundabout, axon guidance receptor, homolog
ROS	Reactive Oxygen Species

SEMA _s	Sémaphorine
SetD5	SET domain containing 5
SIRT1	Silent Information Regulator 1
SLC7A5	Solute Carrier Family 7
Sox2	(Sex determining region Y)-Box 2
SPRED-1	Sprouty-Related EVH1 Domain Containing 1
SPRY2	Sprouty homolog 2
STATs	Signal Transducer and Activator of Transcription
TGF- β	Transforming Growth Factor β
THP-1	Human acute monocytic leukemia cell line
THUMPD3	THUMP Domain 3
TIEs	Tyrosine kinase with Immunoglobulin and EGF homology domains
TIMP-1	Tissue Inhibitor of metalloproteases
TNF- α	Tumor Necrosis Factor α
TOM-1	Target Of Myb 1
TRBP	HIV-1 transactivating response RNA-binding protein
TSP-1	Tumor Suppressor Region 1
UTR	Untranslated Region
VCAM-1	Vascular cell-adhesion molecule
VEGFs	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFRs	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VE-Statin	Vascular Endothelial Statin
VLA-4	Very Late Antigen-4
WRCH1	Wnt Responsive Cdc42 Homolog 1
XPO5	Exportine 5
ZEBs	Zinc finger E-box binding homeobox

INTRODUCTION

Chapitre I : Généralités sur les microARNs

A. La découverte des microARNs

Avant les années 90, les ARNs étaient majoritairement considérés comme un produit intermédiaire entre l'ADN et la protéine. Cependant, en 1961, Jacob et Monod ont décrit l'éventuelle participation des ARNs aux différents mécanismes cellulaires en inhibant l'expression des opérons par hybridation avec leur séquence opérateur (Jacob and Monod, 1961). Trente ans plus tard, la découverte totalement par hasard de l'ARN interférence chez le pétunia met en évidence l'impact de petites séquences d'ARN non codants dans divers processus biologiques (Napoli et al., 1990). Parallèlement à ces recherches, l'étude du développement du nématode *Caenorhabditis elegans* a permis de mettre en évidence des petites séquences d'ARN non codants transcrits à partir du génome : les microARNs ou miARNs (Lee et al., 1993).

Le premier microARN décrit chez les animaux, appelé lin-4, a été identifié chez *Caenorhabditis elegans* suite à deux études effectuées au cours de la même année par les équipes de Victor Ambros et Gary Ruvkun (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993). Des études préalables avaient déjà permis d'identifier le rôle de lin-4 dans le contrôle des différentes étapes larvaires du nématode (Chalfie et al., 1981). L'équipe de Victor Ambros a démontré que ce gène ne codait pour aucune protéine. Cependant, la transcription de celui-ci aboutissait à deux petits ARNs non codants de 61 et 22 nucléotides (Lee et al., 1993). En parallèle, Ruvkun et ses collaborateurs ont montré que lin-14, protéine indispensable au passage du premier au second état larvaire de *Caenorhabditis elegans*, était régulé de manière post transcriptionnelle. De plus, cette modification d'expression était inversement proportionnelle à l'expression des deux petites séquences d'ARN non codant de lin-4 (Wightman et al., 1993). Enfin, l'analyse des séquences a permis l'identification de plusieurs sites de complémentarité antisense des ARNs de lin-4 avec le 3'UTR (*Untranslated Region*) de lin-14 (Lee et al., 1993). Ces fixations sont suffisantes pour induire la régulation de lin-14 par lin-4 au niveau post-transcriptionnel (Wightman et al., 1993).

Suite à cette étude, lin-4 était considéré comme une anomalie par le reste de la communauté scientifique jusqu'à la découverte quelques années plus tard d'un autre microARN également chez le nématode nommé let-7. Let-7 est un gène qui permet le passage d'un état larvaire tardif à l'état adulte chez le nématode de la même manière que lin-4 assure le passage du

premier au second état larvaire. Ce gène code pour un petit ARN non codant qui réprime l'expression d'un grand nombre de protéines de manière post-transcriptionnelle comme *lin-41*, *lin-14*, *lin-28*, *lin-42* ou encore *daf-12* (Reinhart et al., 2000; Slack et al., 2000). Contrairement à *lin-4*, des homologues de ce gène ainsi que la présence de l'ARN non codant ont rapidement été identifiés dans différents génomes comme celui de l'homme. Au même moment, la structure du précurseur des microARNs en forme de tige boucle est décrite pour la première fois (Pasquinelli et al., 2000) permettant ainsi d'identifier le précurseur de *lin-4* comme étant la séquence d'ARN de 61 nucléotides précédemment décrite (Figure 1 (He and Hannon, 2004)) (Lee et al., 1993).

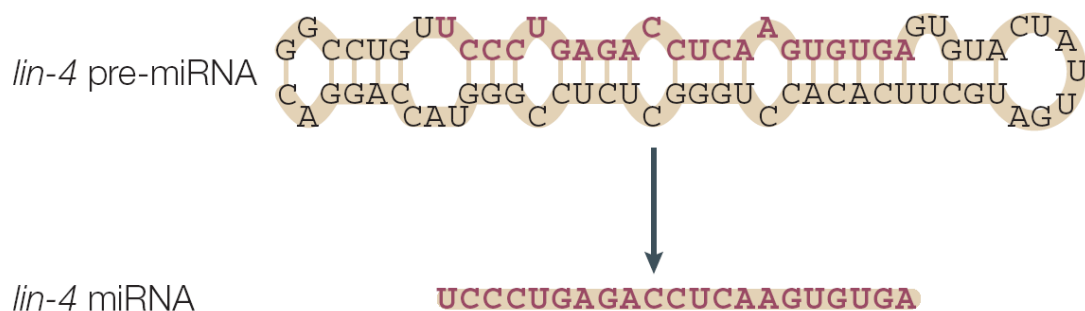


Figure 1 : Identification du premier microARN chez *Caenorhabditis elegans* : *lin-4*. Structure du précurseur (*lin-4 pre-miRNA*) et du microARN mature (*lin-4 miRNA*) de *lin-4* (D'après He and Hannon, 2004).

Au début des années 2000, plusieurs laboratoires ont publié des études montrant la transcription de nombreux petits ARNs non codants très conservés entre les espèces comme *lin-4* et *let-7* et qui seront finalement appelés alors les microARNs (Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001; Lee and Ambros, 2001). À ce jour, nous comptons plus de 1000 microARNs identifiés dans le génome humain (www.miRbase.org).

B. Biosynthèse des microARNs

1. La voie canonique

Les microARNs sont de petites séquences d'ARN simple brin non codant de 20 à 25 nucléotides produits à partir d'un précurseur double brins en forme de tige-boucle (Ambros et al., 2003). Le processus de maturation des microARNs se déroule en plusieurs étapes faisant intervenir un grand nombre d'acteurs moléculaires (Figure 6).

a. La transcription : Du gène au Pri-miARN

La transcription est la première étape aboutissant à la formation d'un pri-miARN à partir d'une séquence d'un gène. Selon leurs localisations dans le génome, les microARNs sont classés en plusieurs catégories. Il existe les microARNs introniques et exoniques. De façon majoritaire, les microARNs sont introniques et localisés dans une unité transcriptionnelle codant pour une protéine. Cependant, ils peuvent aussi être retrouvés dans des unités non codantes. Dans de rares cas, les microARNs peuvent être observés dans les exons faisant partie intégrante d'une unité transcriptionnelle codant ou non pour une protéine (Rodriguez et al., 2004) (Figure 2 (Kim et al., 2009)). Par ailleurs, approximativement la moitié des microARNs sont retrouvés à proximité d'autres microARNs. Ces « cluster » sont transcrits en un seul Pri-miARN polycistronique (Lee et al., 2002).

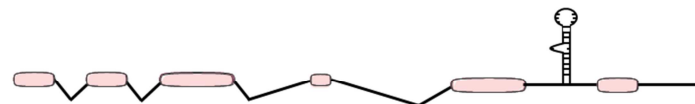
a. Unité transcriptionnelle non-codante avec un microARN intronique.



b. Unité transcriptionnelle non-codante avec un microARN exonique.



c. Unité transcriptionnelle codante avec un microARN intronique.



c. Unité transcriptionnelle codante avec un microARN exonique.

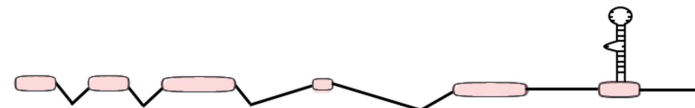


Figure 2 : Localisation des microARNs dans le génome.

Il existe quatre catégories de microARNs classés selon leurs localisations dans le génome.

De manière générale, les microARNs sont très souvent co-transcrits avec leur gène hôte (Baskerville and Bartel, 2005; Rodriguez et al., 2004). Néanmoins, de récentes études de promoteurs et d'analyse de la structure de la chromatine par immunoprécipitation montrent

que 30% des microARNs pourraient être transcrits indépendamment de leur gène hôte (Monteys et al., 2010; Oszolak et al., 2008).

L'ARN polymérase II est le complexe enzymatique responsable de la transcription de la majeure partie des pri-miARNs à partir du génome (Cai et al., 2004; Lee et al., 2004a). Cependant, un petit groupe de microARN associé à des séquences Alu répétées peuvent être transcrits par l'ARN polymérase III (Borchert et al., 2006). L'étude des microARNs dans différentes pathologies comme le cancer ont permis de montrer que certains facteurs de transcription régulant l'ARN polymérase II modifiaient le patron d'expression de certains microARNs (Lee and Dutta, 2009). La régulation des microARNs dépendante de l'ARN polymérase met en évidence la possibilité du contrôle de leur synthèse dans des conditions spécifiques et dans des types cellulaires particuliers. Une fois la transcription achevée, le pri-miARN est ensuite pris en charge par un complexe appelé microprocesseur.

b. Maturation du Pri-miARN dans le noyau

Plusieurs protéines sont impliquées dans la maturation nucléaire du pri-miARN en pre-miARN chez les animaux. Cette seconde étape est retrouvée pour la plupart des microARNs du règne animal. Le pri-miARN produit par l'ARN polymérase II est clivé à la base permettant alors de libérer un fragment d'environ 60-70 nucléotides appelé pré-miARN (Lee et al., 2002). Cette étape est initiée suite à la reconnaissance du pri-miARN par la ribonucléase III Drosha et par son partenaire protéique essentiel à la fixation sur l'ARN, DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region 8*) (Denli et al., 2004; Gregory et al., 2004; Han et al., 2004; Lee et al., 2003). L'utilisation de protéines recombinantes Drosha et DGCR8 *in vitro* montre que ce complexe est suffisant pour effectuer la maturation du pri-miARN (Gregory et al., 2004; Han et al., 2004). A l'inverse, l'absence du gène *dgcr8* dans des cellules souches embryonnaires de souris inhibe la synthèse des microARNs dans ces cellules entraînant une chute de leur prolifération et de leur différenciation (Wang et al., 2007). Les deux protéines s'associent dans le noyau pour former le microprocesseur, complexe indispensable à la maturation du pri-miARN (Gregory et al., 2004; Han et al., 2004) (Figure 3).

Globalement, les pri-miARNs sont constitués d'une tige de 33 paires de bases comportant des mésappariements, une boucle et des fragments d'ARN simple brin. Dans un premier temps, ces fragments sont reconnus par la protéine DGCR8 permettant alors sa fixation à la base du pri-miARN. Suite à cette fixation, la protéine Drosha interagit transitoirement avec le pri-

miARN et le clive de 11 paires de base. Enfin, une fois le processus de clivage terminé, le pri-miRNA devient un pré-miARN composé d'environ une vingtaine de paires de bases possédant un groupement phosphate en 5' et 2 nucléotides d'ARN simple brin en 3' (Figure 3)(Han et al., 2004; Lee et al., 2003; Zeng and Cullen, 2005).

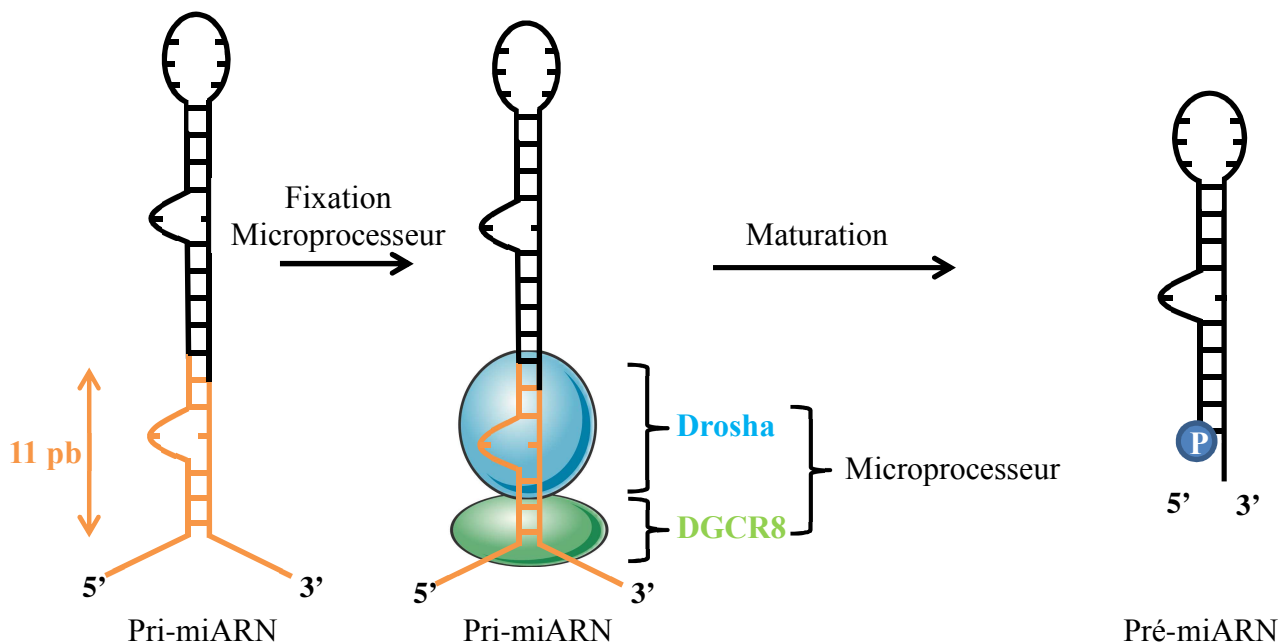


Figure 3 : Maturation du pri-miARN en pré-miARN.

Après transcription du pri-miARN, le microprocesseur composé des protéines Drosha et DGCR8 se fixe au niveau des ARNs simple brin. Cette fixation entraîne le clivage par Drosha de 11 paires de bases libérant le pré-miARN mature contenant un groupement phosphate en 5' et 2 nucléotides supplémentaires en 3'.

c. Export du Pri-miARN dans le cytoplasme

Les pré-miARNs générés par maturation dans le noyau sont ensuite exportés vers le cytoplasme afin d'achever le processus de maturation. Le transport du pré-miARN est assuré par de nombreux pores enchâssés dans la membrane nucléaire (Nakielny and Dreyfuss, 1999). Ce mécanisme de migration du noyau vers le cytoplasme est assuré par une protéine de la famille des karyophérines appelé exportine 5 (Bohnsack et al., 2004; Lund et al., 2004; Yi et al., 2003). L'exportation nucléaire du pré-miARN débute par la reconnaissance de la structure tige-boucle inférieure à 14 paires de bases, possédant 2 nucléotides non appariés à son extrémité 3'. La fixation du pré-miARN à cette protéine est dépendante d'un co-facteur nommé Ran-GTP sous sa forme GTP. Le complexe pré-miARN/exportine 5/Ran-GTP est

alors formé. L'hydrolyse de la Ran-GTP en Ran-GDP initie la dissociation et le relargage du pré-miARN dans le cytoplasme (Figure 4) (Gwizdek et al., 2003; Lund et al., 2004; Zeng and Cullen, 2004).

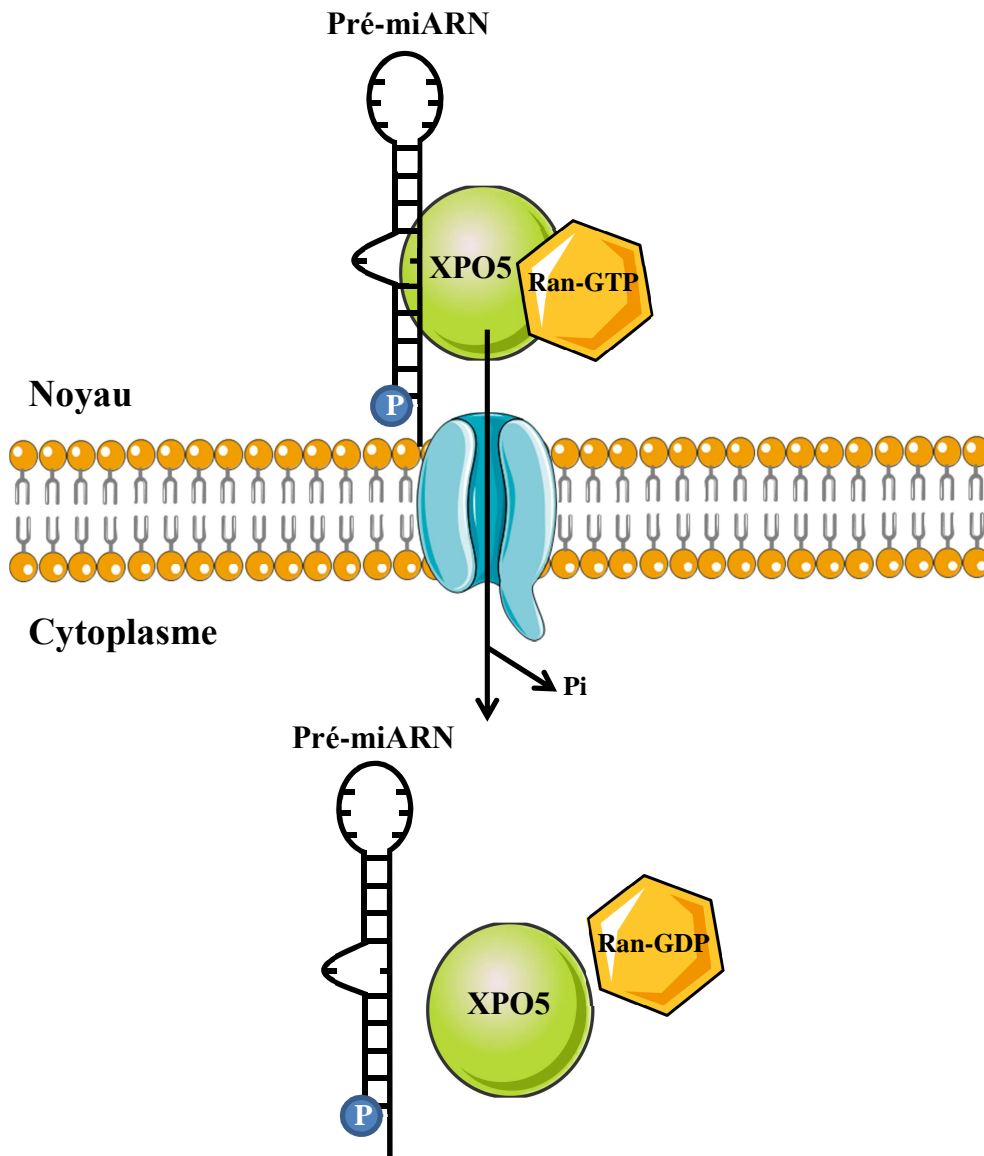


Figure 4 : Export du pré-miARN dans le cytoplasme.

L'exportine 5 (XPO 5) en Ran-GDP est indispensable au passage du prémiARN dans le cytoplasme.

d. Maturation du pré-miARN

Le clivage nucléaire initié par la protéine Drosha a défini une extrémité du microARN mature (extrémité 3' comportant 2 nucléotides). Le pré-miARN est relargué dans le

cytoplasme via l'exportine 5 pour être ensuite pris en charge par une endonucléase cytoplasmique de la famille des RNase III, Dicer (Grishok et al., 2001; Hutvagner et al., 2001; Ketting et al., 2001). Dicer est une protéine très conservée chez les mammifères qui reconnaît spécifiquement la structure double brins du pré-miARN avant d'induire son second clivage. De manière intéressante, des organismes tels que *D.melanogaster* possèdent deux protéines distincts, Dicer-1 et Dicer-2, jouant des rôles différents. Dicer-1 est requis pour la maturation des microARNs alors que Dicer-2 permet la maturation des siRNA (Lee et al., 2004b). Chez les mammifères, l'induction du clivage ne s'établit pas uniquement grâce à cette protéine. En effet, Dicer possède deux partenaires, TRBP (*HIV-1 transactivating response RNA-binding protein*) et PACT (*protein activator of PKR*), qui possèdent chacun trois domaines de liaison à l'ARN formant alors un complexe Dicer/TRBP, Dicer/PACT ou Dicer/TRBP/PACT (Chendrimada et al., 2005; Haase et al., 2005; Lee et al., 2006) (Figure 5). Ces deux protéines associées à Dicer ne semblent pas participer à l'activité de clivage en elle-même mais participeraient plutôt à la stabilité de Dicer ainsi qu'à la formation du complexe RISC (*RNA-Induced Silencing complex*) décrit ultérieurement (Chendrimada et al., 2005; Lee et al., 2006). Cependant, de récentes études montrent que la protéine TRBP participe à l'efficacité de l'activité catalytique de Dicer en régulant dans un premier temps la fixation de cette protéine au pré-miARN et dans un second temps en participant au relargage des microARNs (Fukunaga et al., 2012; Lee and Doudna, 2012).

Le clivage du pré-miARN par l'un de ces complexes se caractérise par la suppression de la boucle présente à l'extrémité de l'ARN double brins faisant apparaître un duplex imparfait miR-3p/miR-5p (Figure 5). En accord avec le modèle actuel, le duplex est incorporé dans un complexe protéique de la famille des Argonautes (1 à 4) formant alors le complexe RISC. Fréquemment, un seul microARN, appelé brin mature, est pris en charge par ce complexe alors que le brin passager (miR-5p) est dégradé. La stabilité thermodynamique relative des deux extrémités des microARNs semble déterminer la dégradation de l'un des deux brins (Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003). Cependant, dans certains cas, il est avéré que le brin passager est fonctionnel en même temps ou non que le brin miR-3p et intègre le complexe RISC (Biasiolo et al., 2011; Kuchenbauer et al., 2011; Okamura et al., 2008; Ro et al., 2007).

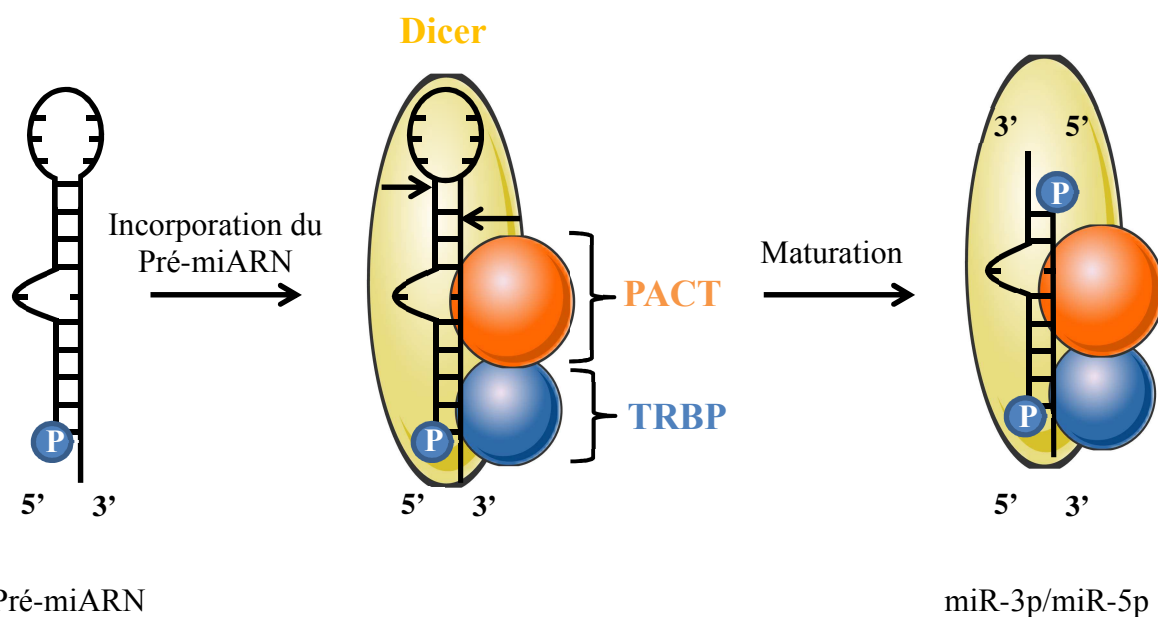


Figure 5 : Maturation du pré-miARN en un duplex miR-3p/miR-5p.

Le pré-miARN est pris en charge par la protéine Dicer associée aux protéines PACT et/ou TRBP afin de cliver la boucle pour obtenir un duplex imparfait miR-3p/miR-5p.

La protéine Dicer en association avec d'autres protéines (Argonautes, TRBP et/ou PACT) forment un complexe actif dénommé RISC loading complex ou RLC qui va permettre la mise en place du complexe effecteur, RISC, en intégrant un microARN mature dans une protéine de la famille des Argonautes. (Chendrimada et al., 2005; Gregory et al., 2005; Maniataki and Mourelatos, 2005). Les mécanismes par lesquels le RLC s'attache à l'ARN ne sont pas encore décrits mais il semblerait qu'après avoir effectué la maturation du pré-miARN, le duplex miR-3p/miR-5p est dissocié de la protéine Dicer. Par la suite, le complexe TRBP/Argonaute 2 s'établit et se fixe au niveau du futur brin mature (Preall and Sontheimer, 2005). Une étude a démontré que l'activité endonucléolytique de la protéine Argonaute 2 pouvait faciliter la séparation du brin miR-3p au brin miR-5p (Diederichs and Haber, 2007). Néanmoins, la plupart des microARNs comportent des mésappariements en leur centre empêchant alors leur séparation par la plupart des protéines Argonautes (Argonautes 1, 3 et 4). La séparation et l'élimination du brin passager n'est pas encore décrite avec précision mais il est fort probable qu'il y ait intervention d'une hélicase non encore identifiée. Enfin, le complexe RISC activé (comportant le microARN mature) se fixe sur l'ARNm cible pour induire une dégradation de cet ARN ou une répression de sa traduction (Bartel, 2004).

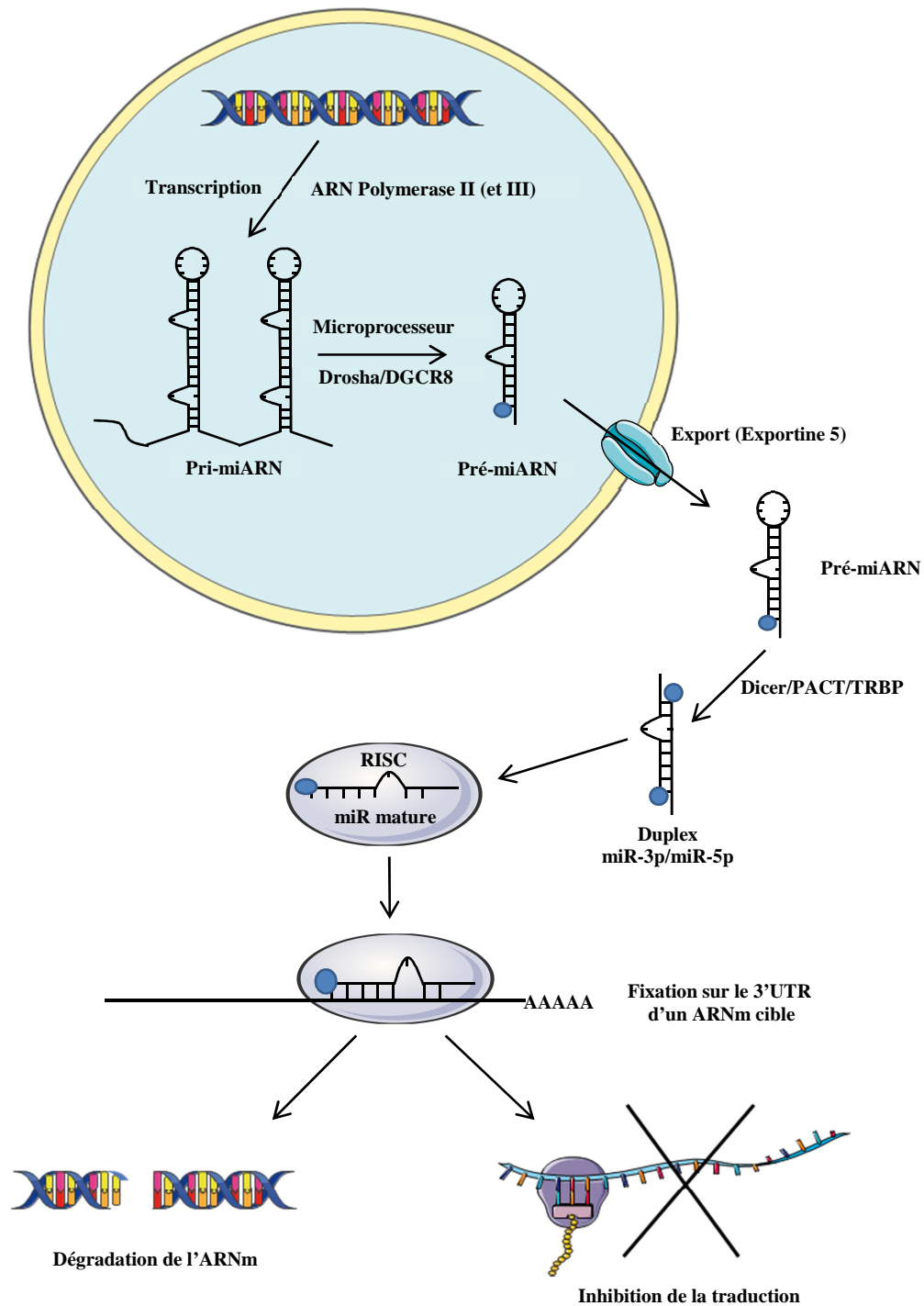


Figure 6 : Voie canonique des miRNAs.

Dans un premier temps, le pri-miARN est obtenu suite à la transcription de l'ADN génomique à partir de l'ARN polymérase II (et III dans une moindre mesure). Dans un second temps, le Pri-miARN est clivé par le microprocesseur (Drosha/DGCR8) afin d'obtenir le pré-miARN exporté alors dans le cytoplasme. Ensuite, le pré-miARN subit un second clivage par la protéine Dicer associée à TRBP et/ou PACT afin d'obtenir le duplex miR-3p/miR-5p. Enfin, le duplex est séparé et le microARN est incorporé dans le complexe RISC (protéine Argonaute 1 à 4) s'hybridant enfin sur le 3'UTR de son d'ARNm cible pour induire la dégradation de celui-ci ou l'inhibition de sa traduction.

2. Les voies non canoniques

a. Voies Drosha/DGCR8 indépendantes

- Les miRtrons

Dans le règne animal, approximativement 40% des microARNs sont transcrits à partir d'introns localisés dans une unité transcriptionnelle codant pour une protéine (Rodriguez et al., 2004). Cette particularité fait que les pri-miARNs transcrits sont très souvent des ARNm précurseurs et des pri-miARNs simultanément (Cai et al., 2004; Kim et al., 2009). L'analyse de ces petits introns étudiés chez la drosophile (aussi long qu'un pré-miARN, environ 60 nucléotides) a montré que certains d'entre eux étaient transcrits par le spliceosome en une petite séquence de 60 nucléotides en forme de tige boucle. Cette classe de petits introns, appelés miRtrons, sont épissés et débranchés de la forme lasso de l'intron afin d'obtenir la conformation du pré-miARN. Ainsi, les miRtrons contournent la voie canonique de biogenèse des microARNs en évitant le clivage par le microprocesseur (Figure 7) (Okamura et al., 2007; Ruby et al., 2007). Enfin, la voie des miRtrons et la voie canonique sont similaires à partir de l'export par l'exportine 5 du pré-miARN depuis le noyau (Okamura et al., 2007). A l'heure actuelle, environ une centaine de miRtrons ont été identifiés chez les mammifères (Ladewig et al., 2012).

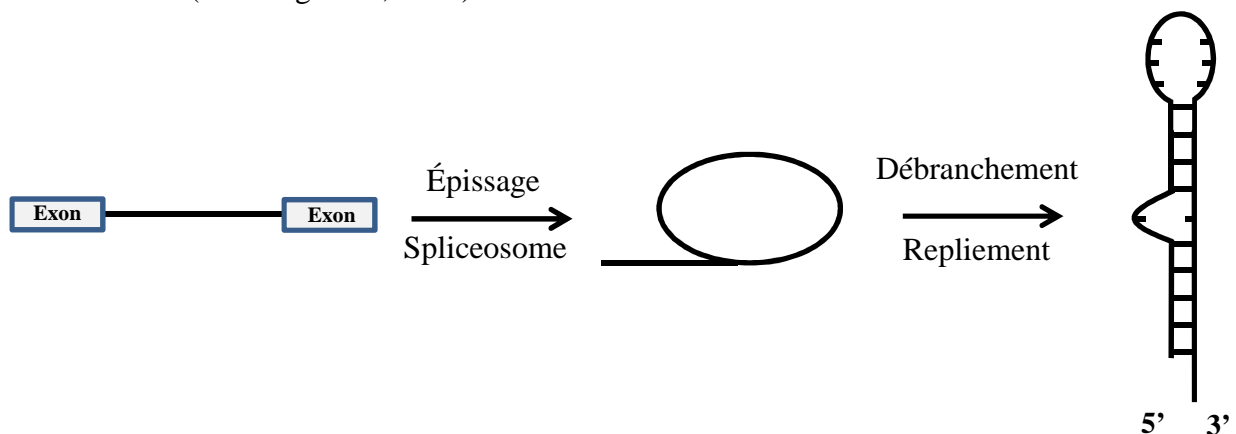


Figure 7 : Synthèse des miRtrons

Des petits introns sont épissés par le spliceosome puis débranchés de la forme lasso de l'intron pour former directement un pré-miARN.

- Les snoARNs

Certains petits ARNs nucléolaires, appelés snoRNA, peuvent aussi être à l'origine de pré-miARNs évitant ainsi le clivage par le microprocesseur (Ender et al., 2008; Saraiya and

Wang, 2008). Les snoRNAs sont des petits ARNs d'environ 70 à 200 nucléotides très conservés au cours de l'évolution permettant la formation des complexes ribonucléoprotéiques (snoRNP) assurant la maturation des ARNs ribosomiques (Matera et al., 2007). L'analyse des bases de données des petits ARNs associés aux protéines immunopurifiées Argonautes 1 et 2 humaines a montré la présence de molécules similaires aux microARNs provenant d'une classe particulière de snoRNAs possédant une structure secondaire contenant deux pré-microARNs reliés par une charnière centrale (Ender et al., 2008). Comme les miRtrons, la maturation des snoRNAs en microARN fait intervenir la protéine Dicer mais contourne le clivage par le microprocesseur.

- Les endoshARN

L'étude de cellules souches embryonnaires de souris et des cellules neuronales post-mitotiques chez le mammifère n'exprimant pas le gène *dgcr8* en parallèle de celles n'exprimant pas *dicer1* indique la présence plus faible de microARNs provenant d'une troisième origine Droscha/dgcr8 indépendante : les ARNs en épingle à cheveux endogènes (endo-shRNAs) (Babiarz et al., 2008, 2011). L'endo-shRNA identifié présente une structure secondaire possédant deux pré-miARNs reliés par une charnière centrale (Babiarz et al., 2008). Seul l'un des deux sera par la suite pris en charge par la protéine dicer indépendamment du clivage par le microprocesseur. Cependant, tout comme les snoRNAs, l'enzyme responsable du premier clivage reste inconnue.

- La voie dépendante de la tRNase Z

Certains microARNs encodés par le virus herpès γ sont transcrits par l'ARN polymérase III afin d'obtenir un pri-miARN contenant un tandem de pré-miARNs en forme de tige-boucle associés à un ARN de transfert (Bogerd et al., 2010; Pfeffer et al., 2004, 2005). La totalité des pré-miARNs encodés par ce virus proviennent du clivage en 3' de l'ARN de transfert (Bogerd et al., 2010). Dans ce cas particulier, la maturation du pri-miARN n'est pas prise en charge par la protéine Droscha mais par une endoribonucléase générant un clivage à l'extrémité 3' des ARNs de transfert, la tRNase Z. Une fois clivé, le pré-miARN obtenu intègre la voie canonique de biogenèse des microARNs durant l'export contrôlé par l'exportine 5 (Pfeffer et al., 2004, 2005). Chez les mammifères, certains ARNs de transfert sont aussi capables d'être des précurseurs de microARNs mais les mécanismes responsables de ce processus restent encore très peu connus (Babiarz et al., 2011).

- La voie des endo-siARN

Les siARNs endogènes sont des petits ARNs provenant d'ARNs double brins précurseurs. Chez la drosophile, les microARNs sont clivés par la protéine Dicer1 et intégrés à la protéine Argonaute1 alors que les endo-siARNs sont générés à partir de la protéine Dicer2 et pris en charge par Argonaute2 (Siomi and Siomi, 2009). Ces différents complexes Dicer reconnaissent les tailles des précurseurs aux microARNs et aux endo-siARNs (Miyoshi et al., 2010). Une petite partie des endo-siARNs sont synthétisés à partir de longs ARNs en forme de tige-boucle contenant de multiples mésappariements. Suite à la prise en charge par la protéine Dicer2, ces siARNs endogènes intègrent ensuite la protéine Argonaute2. En revanche, l'extrémité en forme de tige boucle contenant de nombreux mésappariements est reconnue comme un pré-miARNs et sera clivée par Dicer1 et intégrée à la protéine Argonaute1 (Miyoshi et al., 2010). Ces microARNs matures sont qualifiés dans la littérature de semiARNs.

b. Voie Dicer indépendante

Une étude récente a démontré pour la première fois une voie alternative de biogenèse des microARNs Dicer-indépendante. Pour cela, des souris mutantes exprimant une protéine argonaute 2 inactive ont été produites. Cette mutation *ago2*^{-/-} engendre une létalité post-natale accompagnée d'une importante anémie. Le séquençage des microARNs dans le foie de ces animaux mutants révèle une importante chute d'expression d'un microARN : miR-451. Afin d'analyser le rôle de la protéine Drosha sur le clivage du pri-miARN- 451, des études sur des fibroblastes embryonnaires de souris *drosha*^{-/-} ont été entreprises. L'expression de miR-451 dans ces cellules est diminuée de 20 fois par rapport aux fibroblastes sauvages soulignant alors la participation de cette protéine au cours de la maturation de ce micro-ARN. En revanche, l'inactivation du gène *dicer* par recombinaison homologue dans des cellules souches embryonnaires de souris montre que l'expression de miR-451 reste inchangée dans ce modèle (Cheloufi et al., 2010).

In vitro, la maturation du pre-miR-451 dépend de l'activité catalytique d'Argonaute2 (Cheloufi et al., 2010) . Le pré-miR-451 obtenu après clivage du complexe Drosha/DGCR8 est ainsi directement intégré à la protéine Argonaute2. En effet, la taille inhabituelle (40 nucléotides au lieu de 60) du pré-miARN n'est pas reconnue par la protéine Dicer mais permet l'intégration à Argonaute2 ce qui conduit au premier clivage du pré-miARN. Le

second clivage serait assuré par une nucléase cellulaire permettant l'obtention du microARN 451 mature (Figure 8) (Cheloufi et al., 2010).

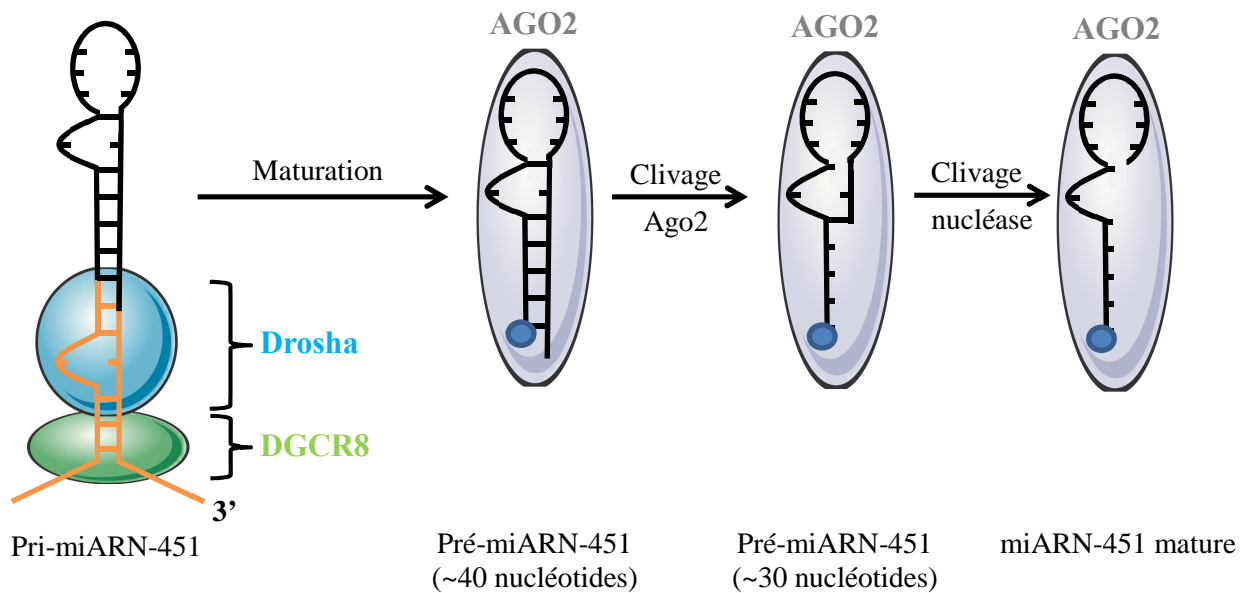


Figure 8 : Biogenèse alternative de miR-451 : Voie non-canonique Dicer-indépendante.

Le pri-miARN-451 est clivé par le complexe Drosha/DGCR8 avant d'être directement intégré à la protéine Argonaute2 (AGO2). Cette protéine génère un premier clivage du pré-microARN avant la maturation définitive de celui-ci par une nucléase encore inconnue.

3. Le « duel » miR-3p/miR-5p

Durant plusieurs années l'activité du brin passager miR-5p des différents duplex miR-3p/miR-5p a été moins étudiée que le fragment complémentaire miR-3p. En effet, selon le modèle général, la séparation d'un pré-microARN permet la formation de deux microARNs matures possédant une complémentarité partielle entre eux. Le brin majeur (miR-3p), conservé, était considéré comme le plus stable et le plus fortement exprimé par rapport au brin mineur ou passager (miR-5p) qui était lui dégradé. Le modèle précédent suggère que la sélection du brin mature se produit selon deux mécanismes à savoir la stabilité thermodynamique relative des deux extrémités des duplex ainsi que leurs propriétés structurales. Généralement, le brin comportant des paires de bases relativement instables à son extrémité 5' échappe à la dégradation. (Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003). Cependant, à ce jour, il reste impossible d'exclure définitivement le brin passager miR-5p d'être fonctionnel. En effet, plusieurs études ont démontré, à partir d'une sélection de différents duplex miR-3p/miR-5p, que le microARN-5p mature peut être fonctionnel *in vitro* et *in vivo* (Kuchenbauer et al., 2011; Okamura et al., 2008; Ro et al., 2007; Yang et al., 2011).

Par exemple, Kuchenbauer et ses collaborateurs ont montré que les deux microARNs miR 223-3p et miR 223-5p, issus du même duplex, inhibaient des cibles différentes de la voie IGFR (*Insulin Growth Factor Receptor*)/PI3K (*Phosphoinositide 3-kinase*) affectant alors la différenciation et l'apoptose des cellules myéloïdes (Kuchenbauer et al., 2011). De plus, les niveaux d'expression des miR-3p par rapport aux miR-5p varient fortement en fonction du tissu concerné, du type cellulaire ou encore de l'espèce montrant alors une fonctionnalité des microARNs complémentaires spécifiques à leur localisation (Biasiolo et al., 2011; Kuchenbauer et al., 2011; Ro et al., 2007). Enfin, la détection de certain miR-5p associés à la protéine effectrice Argonaute1 permettant l'activité inhibitrice du microARN sur un ARNm cible appuie le fait que les brins passagers possèdent une activité régulatrice (Okamura et al., 2008).

Ces différents résultats montrent que les deux microARNs complémentaires d'un même duplex peuvent agir simultanément ou non sur une même cible, sur une voie de signalisation identique ou encore indépendamment dans un type cellulaire ou un tissu donné. Il est même possible d'imaginer que la présence de certaines cibles dans un tissu spécifique initie l'expression d'un microARN et/ou de son complémentaire afin d'inhiber l'expression d'un gène en régulant la machinerie responsable de la biogenèse des microARNs.

C. Mode de régulation des microARNs

1. Appariement à l'ARNm cible

a. Sites de fixation « classiques »

- Identification des sites de fixation

Environ 60% des gènes humains codant pour une protéine sont régulés par des microARNs (Friedman et al., 2009). Les microARNs régulent spécifiquement l'expression de certains gènes grâce à leur fixation sur le 3'UTR d'un ARNm cible. Cet appariement microARN/3'UTR d'un ARNm cible s'établit au niveau d'une séquence partiellement complémentaire appelé MRE pour « *miRNA Response Element* » qui est défini selon certaines règles établies par des études expérimentales et bio-informatiques. La région localisée au niveau des nucléotides 2 à 7 en 5' du microARN appelée « seed site » représente la zone principale d'hybridation du miARN sur sa cible (Lewis et al., 2003). Cette région est très conservée chez les métazoaires et s'apparie parfaitement avec certains 3'UTRs pour

contrôler négativement l'expression du gène (Lai, 2002; Lim et al., 2003). De plus, la région complémentaire du « seed site » d'un microARN au niveau du 3'UTR d'un ARNm cible est quant à elle très conservée. La simple recherche de région conservée de 7 nucléotides au niveau des 3'UTRs de mammifères peut faire apparaître un site de fixation pour un microARN (Lewis et al., 2005). Enfin, plus de la moitié des gènes codant pour une protéine et ciblés par un microARN sont très conservés (Friedman et al., 2009).

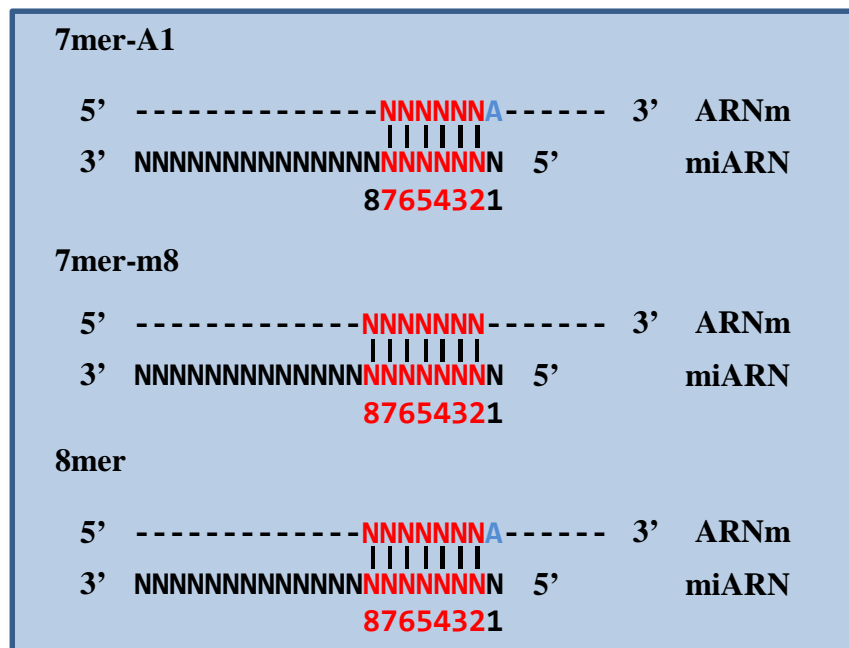
- **Les sites canoniques de fixation**

Une classification des différents sites de fixation d'un microARN sur sa cible a été établie (Bartel, 2009). Le plus fréquemment, trois types de fixation sont utilisés. Les sites 7mer-A1, 7mer-m8 et 8mer. Le site 7mer-A1 permet une hybridation parfaite selon les lois d'appariement de Watson et Crick entre les bases situées au niveau du « seed site » et celles de l'ARNm. De plus, une adénine est localisée en 3' du site de fixation sur l'ARNm cible. Le second site appelé 7mer-m8 est caractérisé par l'appariement d'une base supplémentaire entre le microARN et sa cible en 3' du « seed site ». Enfin, le site 8mer rassemble les deux particularités des sites 7mer-A1 et 7mer-m8 (Figure 9).

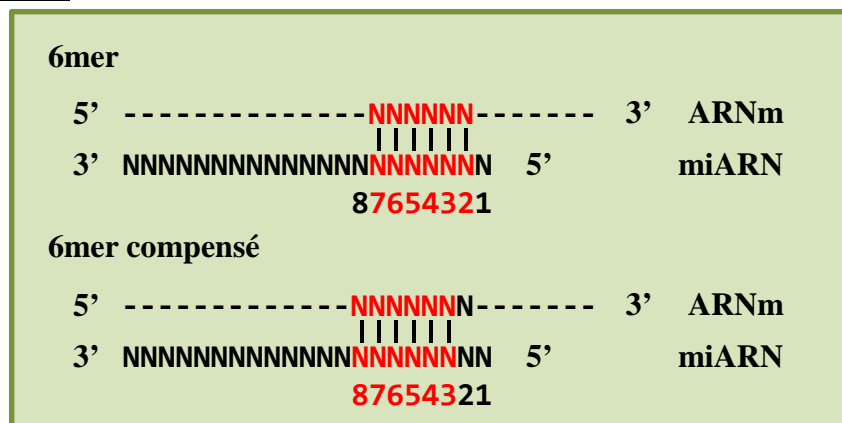
- **Les sites marginaux**

Les sites marginaux représentent eux aussi des associations possibles entre microARN et ARNm. Tout d'abord, les sites 6mer simples représentent des appariements parfaits du « seed site » d'un microARN avec le 3'UTR d'un ARNm cible sans aucune autre particularité. Le site 6mer compensé représente, quant à lui, un site 6mer décalé. C'est-à-dire, un site 6mer qui se fixe sans l'aide du nucléotide 2 en 5' du microARN mais avec la participation du nucléotide 8 en 3' (Figure 9).

Sites canoniques



Sites marginaux



Sites atypiques



Figure 9 : Caractéristiques des sites de fixation d'un microARN sur le 3'UTR d'un ARNm.
Il existe trois types d'appariement d'un microARN sur le 3'UTR d'un ARNm : Les sites canoniques, les sites marginaux et les sites atypiques. D'après Bartel, 2009.

- Les sites atypiques

Différentes expériences informatiques et expérimentales ont montré qu'il existait une région localisée majoritairement au niveau des nucléotides 13 à 16 en 3' du microARN permettant la stabilisation de la fixation du microARN sur sa cible (Brennecke et al., 2005; Grimson et al., 2007). Lorsque cet appariement microARN/ARNm de 3 à 4 nucléotides est accompagné d'une fixation parfaite au niveau du « seed site », on parle de site supplémentaire en 3' alors que si l'appariement est associé à une fixation partielle du microARN au niveau du « seed site » (un mésappariement), on parle alors de site complémentaire en 3' (Figure 9).

b. Autres voies

- Fixation au niveau du 5'UTR de l'ARNm

Dans la littérature, il a été démontré que les microARNs pouvaient également se fixer sur la région 5'UTR de l'ARNm cible induisant alors une répression ou une activation de la traduction (Lytle et al., 2007). Le premier exemple de fixation d'un microARN sur le 5'UTR d'un ARNm a été observé chez la drosophile avec le microARN miR-2 (Moretti et al., 2010). Les auteurs ont démontré *in vitro* que miR-2 pouvait induire la dégradation ou l'inhibition de la traduction d'un ARNm en se fixant sur le 5'UTR. En revanche, cette fixation sur le 5'UTR est moins efficace que celle localisée au niveau du 3'UTR (Moretti et al., 2010). Par ailleurs, il a été observé que l'association d'un microARN avec le 5'UTR pouvait induire une activation de la traduction et non une répression de celle-ci (Henke et al., 2008; Jangra et al., 2010; Jopling et al., 2005; Ørom et al., 2008). Ainsi le virus de l'hépatite C a développé un mécanisme utilisant la machinerie des microARNs afin de se répliquer. En effet, ce virus utilise le microARN miR-122 comme un régulateur positif de la réplication virale permettant une accumulation de l'ARN viral (Jopling et al., 2005) en se fixant au niveau des deux sites localisés en 5'UTR de l'ARN du virus de l'hépatite C (Jopling, 2008).

Un autre exemple de régulation positive de la traduction par un microARN a été montré par Orom et collaborateurs. Les auteurs ont démontré que miR-10a se fixe au niveau du 5'UTR de l'ARNm codant pour les protéines ribosomales à proximité du motif 5'TOP favorisant la traduction (Ørom et al., 2008). La transfection de miR-10a dans des cellules ES de souris régule positivement la synthèse de protéines ribosomales et la biogenèse du ribosome induisant alors une augmentation de 30% de la synthèse protéique.

- Fixation au niveau de la séquence codante d'un ARNm

Suite à la découverte de l'appariement des microARNs sur la région 5'UTR de certains ARNm, des études se sont focalisées sur les capacités des microARNs à réguler leurs gènes cibles en se fixant directement sur la séquence codante de leurs ARNm. Il existe aujourd'hui, quelques exemples démontrant cet appariement atypique. Tout d'abord, l'étude du microARN let-7 a montré qu'il était directement capable de se fixer sur la séquence codante de l'ARNm de Dicer régulant alors négativement la synthèse des microARNs (Forman and Collier, 2010; Forman et al., 2008). Par ailleurs, la séquence codante de l'ARNm de p16 qui code un inhibiteur de kinase cycline-dépendant a été identifiée comme une cible du microARN miR-24 qui réprime sa traduction dans des fibroblastes et des cellules de carcinomes cervicaux (Lal et al., 2008). Enfin, il existe d'autres séquences codantes comme celle de l'ARNm de Nanog, Oct4 (*Octamer-binding transcription factor 4*) ou Sox2 (*Sex determining region Y-Box 2*) qui sont des facteurs de différenciation majeurs des cellules souches embryonnaires, ciblés par des microARNs appelés miR-296, miR-470 et miR-134 respectivement (Tay et al., 2008).

Il aura donc fallu attendre 2007 pour identifier des sites de fixation pour les microARNs localisés au niveau des 5'UTRs et des séquences codantes d'ARNm cibles. Il reste à déterminer les mécanismes moléculaires mis en jeu pour réguler l'expression suite à ces fixations atypiques des microARNs. Au vue des nombreux résultats obtenus dans la régulation des différents ARNm suite à la fixation des microARNs sur leurs 3'UTR, il faut s'attendre dans les prochaines années à l'identification d'un grand nombre de microARNs régulant leurs cibles par fixation sur le 5'UTR ou la séquence codante des ARNm.

2. Régulation de l'expression de la cible

a. L'inhibition de la traduction

Le ou les mécanisme(s) exact(s) de répression de la traduction d'un ARNm cible par un microARN ne sont pas encore totalement établis à ce jour. Plusieurs hypothèses sont actuellement proposées : la répression peut se dérouler au cours de l'initiation de la traduction ou durant les stades post-initiation de la traduction. L'initiation de la traduction débute avec la reconnaissance de la coiffe à l'extrémité 5' de l'ARNm par le facteur eIF4E (*Eukaryotic initiation factor*), sous unité du complexe eIF4F (Figure 10). Ce complexe contient aussi eIF4A et eIF4G. L'interaction d'eIF4G avec un autre facteur d'initiation, eIF3, permet le recrutement de la sous unité ribosomique 40S à l'extrémité 5' de l'ARNm. Le complexe de

pré-initiation 40S interagit ensuite avec la sous unité ribosomique 60S au niveau du codon AUG de l'ARNm pour commencer l'élongation. eIF4G interagit aussi avec PABP1 (*poly(A) Binding Protein 1*) localisée sur la queue poly(A) de l'ARNm à l'extrémité 3'. L'interaction simultanée entre eIF4G-eIF4E et eIF4G-PABP1 permet de donner une conformation circulaire à l'ARNm permettant d'augmenter l'efficacité de la traduction ainsi que la protection de l'ARNm de la dégradation. Certains ARNm viraux initient leurs traductions sans l'aide de facteurs d'initiation grâce à la présence de séquence IRES (*Internal ribosome entry site*) permettant le démarrage de la traduction d'un ARNm de manière interne (Jackson, Hellen, et Pestova 2010). Deux méthodes expérimentales ont permis de déterminer à quelles étapes de la traduction se déroule l'inhibition par un microARN. La première repose sur une purification par ultracentrifugation sur gradient de sucrose des ARNm reprimés par un microARN. Lorsque ceux-ci sont copurifiés avec les polyribosomes, ils sont alors considérés comme étant réprimés après l'initiation de la traduction et donc dans les phases d'élongation ou de terminaison. Une deuxième méthode consiste à utiliser des constructions artificielles reprimées par des miRNAs et intégrant des séquences IRES qui permettent une traduction protéique sans passage par la phase d'initiation de la traduction. Lorsque la répression par le microARN est maintenue en présence de ces constructions artificielles, cette répression a donc lieu après l'initiation de la traduction. En se basant sur ces différents critères, plusieurs auteurs ont établi que les microARNs répriment l'initiation (Ding and Grosshans, 2009; Humphreys et al., 2005; Kiriakidou et al., 2007; Mathonnet et al., 2007; Pillai et al., 2005; Wakiyama et al., 2007) alors que d'autres affirment que les microARNs répriment les mécanismes post-initiation (Maroney et al., 2006; Nottrott et al., 2006; Petersen et al., 2006; Seggerson et al., 2002). Ces divergences suggèrent que la répression des microARNs se déroulerait soit au cours de l'initiation soit au cours de la post-initiation selon le microARN considéré.

- **Inhibition lors de l'initiation de la traduction**

Trois différents modèles ont été proposés pour expliquer le mécanisme de répression lors de l'initiation de la traduction.

Le premier modèle montre que le complexe miRISC (microARN mature dans le complexe RISC) peut entrer en compétition avec le complexe eIF4F, contenant le facteur eIF4E pour la fixation au niveau de la coiffe de l'ARNm à l'extrémité 5', empêchant alors l'initiation de la traduction (Figure 10-1) (Mathonnet et al., 2007). Cependant, des études

contredisent ce modèle et suggèrent la participation d'autres facteurs entrant en compétition avec eIF4E telle que la protéine GW182 interagissant avec les protéines Argonautes et jouant alors un rôle central dans la régulation négative d'expression de gène réprimé par un microARN (Eulalio et al., 2009).

Le second modèle propose que miRISC stimule la déadénylation de la queue poly(A) de l'ARNm par le complexe CCR4-NOT comprenant CCR4 (*Chemokine (C-C motif) receptor 4*), CAF-1 (*Chromatin Assembly Factor 1*) et NOT1-5 (*General negative regulator of transcription subunit 1-5*). Dans ce modèle, la traduction est réprimée car la coiffe et PAPB1, attachée à la queue poly(A), ne peuvent plus interagir et initier la circularisation de l'ARNm (Figure 10-4) (Behm-Ansmant et al., 2006; Giraldez et al., 2006; Wakiyama et al., 2007). La déadénylation dans ce modèle n'est pas juste la conséquence d'une erreur au cours de l'initiation car les ARNm contenant des séquences IRES sont aussi déadénylés bien qu'il soient résistants à la répression de la traduction par le complexe miRISC (Wakiyama et al., 2007). Comme pour le premier modèle, des études contredisent celui-ci en établissant le fait que des ARNm nonpolyadénylés peuvent voir leur traduction inhibée par des microARNs (Eulalio et al., 2009; Pillai et al., 2005; Wu et al., 2006). Cet effet serait assuré par les protéines Argonaute et GW182 car la déplétion des deux facteurs ou l'expression d'un dominant négatif de GW182 annule la répression (Eulalio et al., 2009).

Le troisième modèle suggère que l'association de miRISC inhibe l'association de la sous unité ribosomique 60S avec le complexe de pré-initiation 40S. La protéine Argonaute 2 humaine s'associe avec le facteur eIF6 et la sous unité ribosomique 60S *in vitro* (Figure 10-2) (Chendrimada et al., 2007). eIF6 est un facteur impliqué dans la biogenèse et la maturation de la sous unité ribosomique 60S et permet d'éviter une association trop précoce avec la sous unité 40S. La déplétion de ce facteur dans des cellules humaines permet de lever l'inhibition d'un microARN sur un ARNm (Chendrimada et al., 2007). En revanche, cette même déplétion réalisée dans des cellules de drosophile ne produit qu'un faible effet sur l'activité du microARN suggérant la participation de mécanismes différents dans ce modèle (Eulalio et al., 2009). Le recrutement d'eIF6 par miRISC semble réprimer la traduction d'un ARNm en empêchant l'assemblage des deux sous unités ribosomiques au niveau du codon start AUG.

- **Inhibition lors de l'élongation ou de la terminaison**

En 2006, Petersen et ses collaborateurs ont proposé un modèle selon lequel le microARN réprimait le processus d'élongation. En effet, un ARNm réprimé par un

microARN peut être associé avec des polysomes. Cependant, quand le processus d'initiation est bloqué à l'aide d'un inhibiteur d'eIF4A, les ribosomes des ARNm réprimés par un microARN sont plus rapidement détachés que ceux des ARNm contrôles suggérant un rôle des microARNs dans le détachement des ribosomes (Figure 10-5) (Petersen et al., 2006).

Au cours de la même année, l'étude de polypeptides naissant tagués en N-terminal lors de l'élongation montre qu'aucun de ces polypeptides ne peut être détectés par immunoprécipitation lorsque l'ARNm correspondant possède des sites de fixation pour un microARN (Nottrott et al., 2006). Ce résultat suggère que le complexe miRISC serait associé à une ou plusieurs protéases permettant la dégradation des polypeptides naissants. À ce jour, aucune protéase permettant un tel mécanisme n'a été identifiée (Figure 10-3).

b. La dégradation de l'ARNm

Au cours des premières études des microARNs chez les animaux, l'inhibition de la traduction ne semblait pas être associée à une dégradation de l'ARNm. Cependant, certaines associations microARN-ARNm aboutissent à une chute de la quantité totale d'ARNm causée par la dégradation de ces derniers (Bagga et al., 2005; Behm-Ansmant et al., 2006; Giraldez et al., 2006; Lim et al., 2005; Wu et al., 2006). L'augmentation de la dégradation des ARNm est rarement due à l'activité catalytique de clivage des protéines Argonautes. Majoritairement, les ARNm sont dégradés par des phénomènes de déadénylation, suppression de la coiffe et de la digestion exonucleolytique de l'ARNm (Figure 10-6) (Behm-Ansmant et al., 2006; Giraldez et al., 2006; Wu et al., 2006). Ces différents mécanismes nécessitent la participation de certaines protéines comme GW182 et les protéines Argonautes ainsi que la machinerie permettant le décoiffage (DCP1 (*Decapping Protein 1*)/DCP2 (*Decapping Protein 2*)) et la déadénylation (CCR4-NOT) de l'ARNm (Behm-Ansmant et al., 2006). Par ailleurs, plusieurs expériences suggèrent l'indépendance de la dégradation des ARNm et de l'inhibition de la traduction de ceux-ci. Par exemple, les ARNm dont la traduction est empêchée sont néanmoins déadénylés suite à la fixation du microARN sur sa séquence cible (Wakiyama et al., 2007; Wu et al., 2006). De plus, la dégradation d'un ARNm par un microARN peut s'établir *in vitro* sans une traduction active (Wakiyama et al., 2007). Actuellement, les mécanismes conduisant soit à la dégradation de l'ARNm cible par le microARN, soit à l'inhibition de sa traduction restent à élucider. Des auteurs suggèrent que le nombre, le type et la position des mésappariements dans le duplex microARN/ARNm peuvent jouer un rôle majeur dans le choix de la voie (Alemán et al., 2007).

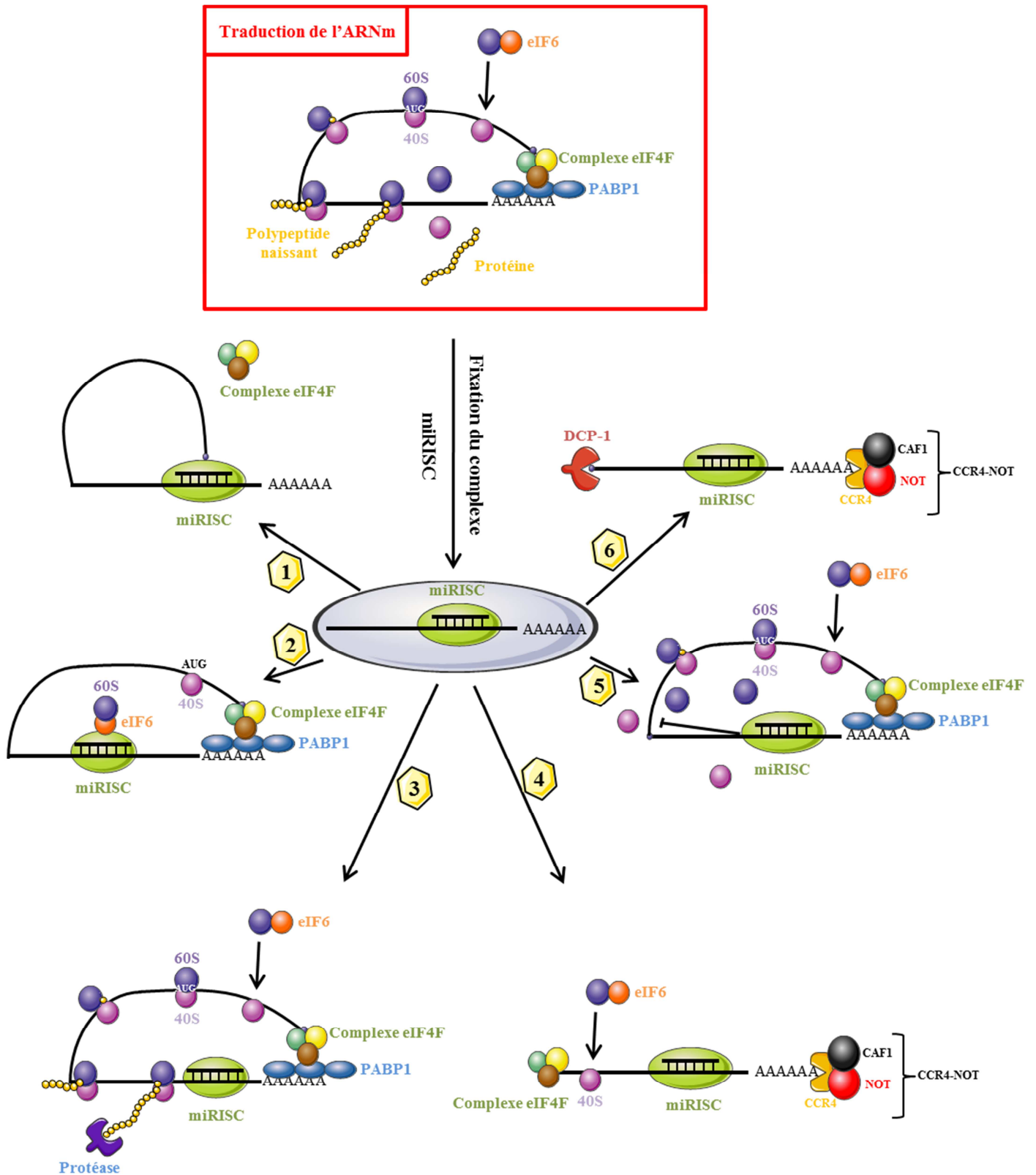


Figure 10 : Mécanismes possibles pour la répression des ARNm par les microARNs.

1 : Compétition du complexe miRISC avec le complexe eIF4F. 2 : Fixation de eIF6 sur le complexe miRISC emprisonnant la sous-unités 60S empêchant son interaction avec la sous-unité 40S. 3 : Dégradation du polypeptide naissant par une protéase. 4 : Blocage de la circularisation par déadénylation. 5 : Séparation prématurée des sous unités ribosomiques 40S et 60S. 6 : Déadénylation et décoiffage de l'ARNm.

3. Le cas particulier des microARNs circulants

Les microARNs contrôlent l'expression de leurs cibles dans le cytoplasme des cellules qui les ont générées. Cependant, certains microARNs peuvent être exportés de leurs cellules productrices pour agir à distance. Les premières observations soutenant l'hypothèse de la présence des microARNs dans le plasma sanguin et le sérum ont été réalisées en 2008 par plusieurs groupes indépendants (Chen et al., 2008; Chim et al., 2008; Lawrie et al., 2008; Mitchell et al., 2008). Plus tard, l'existence de microARNs circulants dans tous les autres fluides biologiques (salive, urine, lait maternel...) a été confirmée (Hanke et al., 2010; Kosaka et al., 2010; Park et al., 2009; Weber et al., 2010). Le mécanisme responsable de la résistance des microARNs contre les nucléases à l'extérieur de la cellule a longtemps été énigmatique. Cependant, la présence des microARNs dans des exosomes exportés par les cellules en culture était déjà connue auparavant (Valadi et al., 2007). De plus, la théorie selon laquelle les microARNs seraient protégés par encapsulation dans des vésicules a émergé lors de la détection de ces derniers dans des vésicules circulant dans la circulation sanguine (Hunter et al., 2008). Ces résultats ont alors abouti à une hypothèse majeure : Il existerait des mécanismes de communication des microARNs inter-cellulaires et inter-organes grâce à leur circulation dans les différents fluides biologiques dans des microvésicules encapsulées. Trois ans plus tard, cette théorie selon laquelle les microARNs circulants sont encapsulés dans des microvésicules est contredite par deux études de laboratoires différents qui montrent que les microARNs circulants sont à plus de 90% libres de toutes microvésicules et sont associés à une protéine de la famille des Argonautes dans le plasma sanguin, dans le sérum et dans le milieu de culture cellulaire (Arroyo et al., 2011; Turchinovich and Burwinkel, 2012). La stabilité de la protéine Argonaute2 permet d'expliquer la résistance des microARNs aux nucléases contenues dans les différents fluides biologiques (Turchinovich and Burwinkel, 2012). Après cela, un grand nombre d'études ont démontré que les microARNs extracellulaires sont protégés de la dégradation car ils sont associés à la protéine Argonaute ou encapsulés dans des corps apoptotiques, des exosomes ou des vésicules (Chen et al., 2012). Moins fréquemment, des microARNs peuvent être retrouvés associés avec des lipoprotéines à haute densité (HDL) dans le plasma humain (Vickers et al., 2011). L'existence des microARNs associés aux lipoprotéines à haute densité a été confirmée très récemment par un autre laboratoire (Wagner et al., 2013). Enfin, des expériences *in vitro* ont montré que des microARNs pouvaient être protégés de la dégradation des ribonucléases lors de l'association avec une protéine chaperonne, la nucléophosmine I (Wang et al., 2010a).

Cependant, aucune association intra-cellulaire et inter-cellulaire des microARNs avec la nucléophosmine I a été retrouvée *in vivo* (Turchinovich and Burwinkel, 2012; Wang et al., 2010a). Le mode d'action majoritaire des microARNs circulants décrit dans la littérature est une action paracrine de courte distance entre les cellules. A l'inverse de la concentration des microARNs dans les fluides biologiques, la concentration locale de microARNs circulants est suffisante pour induire des effets physiologiques d'une cellule voisine à une autre. Par exemple, des microvésicules contenant des microARNs (miR-143/145) libérées par des cellules endothéliales veineuses humaines (HUVEC) surexprimant un facteur de stress, KLF2 (*Krüppel-like factor 2*), fusionnent avec la membrane des cellules musculaires lisses voisines initiant alors la régulation de certains gènes spécifiques de ces cellules (Hergenreider et al., 2012). Par ailleurs, les microARNs circulants dans les différents fluides biologiques jouent un rôle majeur de biomarqueurs dans un très grand nombre de pathologies telles que le cancer (Allegra et al., 2012).

Chapitre 2 : Les microARNs et l'endothélium

A. Importance des microARNs dans l'endothélium

1. Leçon des inactivations de Dicer, Drosha et Argonaute

L'angiogenèse est un mécanisme au cours duquel des nouveaux vaisseaux sanguins sont formés à partir de vaisseaux pré-existants. Ce processus est indispensable au développement de l'endothélium de l'embryogenèse jusque chez l'adulte (Carmeliet and Tessier-Lavigne, 2005). L'importance des microARNs dans les cellules endothéliales et au cours de l'angiogenèse a été révélée lors de l'inactivation des deux enzymes majeures pour leurs biogenèse : La protéine Dicer et la protéine Drosha. Les lignées murines hypomorphiques pour le gène *dicer* sont caractérisées par d'importants problèmes de remodelage vasculaire au cours du développement embryonnaire de la souris ainsi qu'une angiogenèse ovarienne défectueuse (Otsuka et al., 2008; Yang et al., 2005b). De plus, les poissons zèbres mutants pour le gène *dicer* montrent de graves hémorragies (Giraldez et al., 2005). Les inactivations de *dicer* et *drosha* *in vitro* dans des cellules endothéliales humaines (HUVEC) ont démontré la participation de ces protéines au cours de différents phénomènes caractérisant l'angiogenèse *in vitro*. En effet, des expériences en matrigel ont permis de montrer que l'inactivation de *dicer* ou de *drosha* dans des cellules endothéliales aboutissait à des défauts de tubulogenèse de ces cellules. L'inactivation de *drosha* étant moins incapacitante que celle de *dicer* (Kuehbacher et al., 2007; Shilo et al., 2008; Suárez et al., 2007). Cette différence d'inhibition de la tubulogenèse est certainement provoquée par la quantité importante de voies non canoniques de biogenèse des microARNs Drosha-indépendantes décrites précédemment et par les fonctions supplémentaires de Dicer en dehors de la biogenèse des microARNs telle que le maintien de l'hétérochromatine (Kanellopoulou et al., 2005). Par ailleurs, la réduction des microARNs endothéliaux induite par la délétion spécifique de *dicer* dans l'endothélium murin réduit de manière significative l'angiogenèse post-natale en réponse à différents stimuli angiogéniques tels que le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), l'ischémie ou encore la réparation tissulaire (Suárez et al., 2008). Dans cette étude, l'inactivation de *dicer* induit une augmentation de la thrombospondine-1, un inhibiteur potentiel de l'angiogenèse. De plus, de nombreux autres régulateurs des fonctions biologiques des cellules endothéliales *in vitro* et *in vivo* tels que Tie2 (*Tyrosine kinase with Immunoglobulin and EGF homology domains 2*), Tie1 (*Tyrosine kinase with Immunoglobulin and EGF homology domains 1*), VEGFR2 (*Vascular*

Endothelial Growth Factor Receptor 2), IL-8 (*Interleukin-8*) et eNOS voient leurs expressions modulées par l'inhibition de la synthèse des microARNs (Suárez et al., 2007). Par ailleurs, l'inhibition de la protéine Argonaute2, acteur majeur de l'action des microARNs sur leurs cibles, dans des cellules endothéliales (HUVEC) induit une chute de la prolifération, une augmentation de l'apoptose et une réduction de la tubulogenèse *in vitro* (Asai et al., 2008). Très récemment, l'inhibition d'une autre protéine Argonaute, Argonaute1, dans des cellules endothéliales a induit une augmentation de la tubulogenèse en normoxie *in vitro*. Cependant, cette protéine, ciblée par des microARNs induits dans des conditions hypoxiques tels que let-7 ou miR-103/107, participerait plutôt à l'angiogenèse au cours de l'hypoxie (Chen et al., 2013). Tous ces résultats démontrent l'impact majeur des microARNs au cours de l'angiogenèse et suggèrent l'existence de microARNs spécifiques de l'endothélium.

2. Les microARNs endothéliaux

De nombreuses études ont cherché à identifier les différents microARNs exprimés dans les cellules endothéliales *in vitro* et *in vivo*. Ces différentes analyses ont permis l'identification d'environ 200 microARNs exprimés dans les cellules endothéliales. Cependant, seule une partie de ces microARNs possèdent des cibles et des fonctions identifiées (Tableau 1). Poliseno et ses collaborateurs ont décrit la présence de 27 microARNs très fortement exprimés dans les cellules endothéliales veineuses (HUVEC) régulant, pour la plupart, des facteurs importants au cours de l'angiogenèse (Poliseno et al., 2006). Les microARNs les plus fortement exprimés et identifiés dans ces différentes études sont miR-126, miR-221, miR-222, miR-130a, let-7, miR-21 et miR-27b (Urbich et al., 2008; Voellenkle et al., 2012). Le microARN miR-126 sera abordée dans une partie future qui lui sera entièrement consacrée.

MicroARNs vasculaires	Cible(s)	Fonction sur l'endothélium	Citations
Let-7	TIMP-1	Prolifération et migration des cellules endothéliales.	(Otsuka et al., 2008)
miR-10a	MAP3K7 ; β TRC	Pro-inflammation endothéliale au cours de l'athérosclérose.	(Fang et al., 2010a)
miR-15a	Bcl-2, VEGF, FGF2	Apoptose des cellules endothéliales <i>in vitro</i> , gardien de l'intégrité de la barrière hématoencéphalique <i>in vivo</i> . Anti-Angiogénique.	(Cimmino et al., 2005; Yin et al., 2010, 2012)
miR-16	VEGF, VEGFR2, FGFR1	Régule l'activité du VEGF et inhibe l'angiogenèse <i>in vivo</i> .	(Chamorro-Jorganes et al., 2011)
miR-17-92 Cluster	TSP-1 ; TIMP-1 ; ITGA5 ; Jak1 ; CTGF ; CCND1, p21 ; VEGF ; STAT3 ; HIF-1 α	Prolifération, tubulogenèse, migration <i>in vitro</i> . Neovascularisation au cours de l'ischémie du membre et amélioration des fonctions cardiaques au cours d'un infarctus du myocarde <i>in vivo</i> . Senescence.	(Bonauer et al., 2009; Dews et al., 2006; Doebele et al., 2010; Otsuka et al., 2008; Qin et al., 2010; Suárez et al., 2008)
miR-21	PPAR α ; RHOB ; HMGA2	Expression dans les cellules progénitrices endothéliales. Inflammation endothéliale.	(Sabatel et al., 2011; Zhou et al., 2011a; Zhu et al., 2013b)
miR-23/27	SPRY2 ; SEMA6A	Arrêt du cycle cellulaire suite à une augmentation du flux sanguin. Tubulogenèse <i>in vitro</i> . Angiogenèse <i>in vivo</i> .	(Urbich et al., 2012; Zhou et al., 2011b)
miR-24	GATA2 ; PAK4	Angiogenèse au cours de défaillances vasculaires <i>in vivo</i> .	(Fiedler et al., 2011)
miR-125a-5p/125b-5p	Preproendotheline-1	Homéostasie et inflammation de l'endothélium.	(Li et al., 2010)
miR-130a	GAX ; HOX5A	Prolifération, migration et tubulogenèse des cellules endothéliales.	(Chen and Gorski, 2008)
miR-132	p120RasGAP	Prolifération et tubulogenèse <i>in vitro</i> . Angiogenèse et volume tumoral <i>in vivo</i> .	(Anand et al., 2010)
miR-143/145	KLF-2 ; KLF-4 ; KLF-5	Athéroprotecteur.	(Hergenreider et al., 2012)
miR-146a	NOX4 ; BRCA-1	Sénescence des cellules endothéliales et invasion tumorale	(Vasa-Nicotera et al., 2011; Zhu et al., 2013a)
miR-155	Ets-1	Inflammation endothéliale.	(Zhu et al., 2011a)
miR-200c/miR-299	ZEB1 ; IGF-1	Sénescence des cellules endothéliales.	(Jong et al., 2013; Magenta et al., 2011)
miR-200b	Ets-1	Activité des cellules endothéliales en condition hypoxique.	(Chan et al., 2011)
miR-210	EphrinA3 ; HIF-1 α ; PTPN1	Migration et tubulogenèse des cellules endothéliales. Angiogenèse <i>in vivo</i> . Angiogénique au cours de l'hypoxie.	(Fasanaro et al., 2008; Hu et al., 2010; Ivan et al., 2008; Pulkkinen et al., 2008)
miR-34a/miR-217	Sirt1	Sénescence des cellules endothéliales.	(Ito et al., 2010; Menghini et al., 2009)
miR-218	Robo1-2 ; GLCE	Migration des cellules endothéliales. Intégrité vasculaire de la rétine de souris.	(Small et al., 2010)
miR-221/222	c-Kit ; STAT5 ; ZEB2 ; ETS-1	Tubulogenèse, migration, inflammation des cellules endothéliales et réparation tissulaire.	(Chen et al., 2010; Dentelli et al., 2010a; Polisenio et al., 2006; Zhu et al., 2011a)
miR-296	HGS	Tubulogenèse et migration <i>in vitro</i> . Angiogenèse de xélogreffes de tumeurs <i>in vivo</i> .	(Würdinger et al., 2008)
miR-320	IGF-1	Angiogenèse chez les rats diabétiques.	(Wang et al., 2009)
miR-328	CD44	Formation des capillaires <i>in vitro</i> .	(Wang et al., 2008a)
miR-424	CUL2, VEGF, VEGFR2, FGFR1	Régule l'activité du VEGF. Promeut l'angiogenèse en condition hypoxique.	(Chamorro-Jorganes et al., 2011; Ghosh et al., 2010)
miR-503	CDC25A/CCNE1, FGF2, VEGFA	Prolifération, migration et tubulogenèse des cellules endothéliales. Angiogenèse physiologique et tumorale <i>in vivo</i> .	(Caporali et al., 2011; Zhou et al., 2013)

Tableau 1 : Liste des principaux microARNs endothéliaux aux cibles connues associés à leurs rôles validés au cours de l'angiogenèse. Le microARN endothélial miR-126 sera très largement abordé dans une partie future.

3. Régulation des microARNs dans l'endothélium

Les cellules endothéliales sont sensibles à un grand nombre de signaux tels que l'hypoxie, les facteurs angiogéniques, les cytokines ou encore le flux sanguin (Figure 11). Au cours des dix dernières années, de nombreuses études ont analysé l'impact de ces différents stimuli sur la régulation d'expression des microARNs endothéliaux.

a. Par hypoxie

L'hypoxie est une condition dans laquelle un organisme entier ou une région de celui-ci est privé de la quantité nécessaire d'oxygène. Ce phénomène de privation est très souvent relié à deux conditions majeures au cours de certaines pathologies : les anémies (nombre de globules rouges diminués) et les ischémies (flux sanguin ralenti). La formation de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogenèse) est une étape essentielle au cours de l'ischémie, pour combattre les privations d'oxygène dans les tissus et maintenir une homéostasie vasculaire normale. En condition hypoxique, les cellules endothéliales sont soumises à d'importants stress et adaptent leur métabolisme en conséquence en exprimant des gènes spécifiques tel que HIF1 α (*Hypoxia inducible factor 1 alpha*) (Semenza, 2003). Ces différentes modifications géniques entraînent alors des modifications d'expression de certains microARNs endothéliaux. Par exemple, l'hypoxie module l'expression de miR-210 dans un grand nombre de cellules testées incluant les cellules endothéliales (Fasanaro et al., 2009; Kulshreshtha et al., 2007). De plus, l'expression de miR-210 est augmentée dans des modèles d'hypotrophie cardiaque, d'insuffisance cardiaque ou d'ischémie chez le rat (Wu et al., 2009). Ces différents résultats ainsi que les fonctions répertoriées de miR-210 (Tableau 1) suggèrent que ce microARN stimulé lors d'une privation d'oxygène contribue à la réponse angiogénique lors d'une ischémie. Par ailleurs, une étude récente portant sur miR-503 a démontré que l'expression de ce microARN était augmentée dans des conditions de privation mimant l'ischémie en culture dans des cellules endothéliales (peu de sérum et de facteurs de croissance) (Caporali et al., 2011). MiR-503 inhibe la prolifération, la migration et la formation de capillaires de ces cellules *in vitro* (Caporali et al., 2011). Certains microARNs présentent des fonctions spécifiques au cours de l'hypoxie qu'ils ne possèdent pas en condition normoxique. En effet, miR-424, microARN anti-angiogénique dans des conditions normales, favorise l'angiogenèse en condition hypoxique (Ghosh et al., 2010). miR-424 cible CUL2 (*Cullin 2*), protéine importante dans l'assemblage du complexe d'ubiquitines ligases,

stabilisant alors HIF-1 α qui induit une augmentation de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales en hypoxie (Ghosh et al., 2010).

b. Par les facteurs angiogéniques

La possibilité selon laquelle des facteurs angiogéniques peuvent moduler l'expression des microARNs endothéliaux a été explorée. Le VEGF est considéré comme un facteur angiogénique majeur et permet la modulation d'expression d'un grand nombre de microARNs. Afin d'évaluer le rôle du VEGF sur l'expression des microARNs, des HUVEC ont été traitées avec celui-ci et l'expression des microARNs a été quantifiée par microarray. Ces études ont permis d'identifier le cluster miR-17-92 comme étant régulé par le VEGF et impliqué dans l'angiogenèse tumorale (Dews et al., 2006). De manière intéressante, ce cluster est faiblement exprimé dans les cellules endothéliales veineuses mais son expression est augmentée après une stimulation au VEGF, suggérant un rôle de ces microARNs dans la voie de signalisation du facteur angiogénique. Par ailleurs, miR-16 et miR-424 ont été décrits comme des microARNs anti-angiogéniques grâce à leurs capacités d'inhiber le VEGFR2 (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2*), FGFR1 (*Fibroblast Growth Factor Receptor 1*) et le VEGF dans les cellules endothéliales (Chamorro-Jorganes et al., 2011). La surexpression de ces deux microARNs réduit la prolifération, la migration et inhibe la formation de capillaires en matrigel *in vitro*. A l'inverse, l'inhibition de ces deux microARNs entraîne des phénotypes opposés. *In vivo*, la surexpression de miR-16 réduit la formation des vaisseaux sanguins. MiR-16 et miR-424 sont deux très bons exemples de microARNs régulés par des facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF et le bFGF (Chamorro-Jorganes et al., 2011). Suite à leurs effets anti-angiogéniques, l'augmentation de leur expression par stimulation au VEGF ou bFGF permet alors un retrocontrôle négatif de l'angiogenèse. Un autre exemple de microARN régulé par un facteur angiogénique mais qui possède une action pro-angiogénique est celui de miR-132. Anand et collaborateurs ont montré que miR-132 participe à l'induction de la néovascularisation en réprimant l'expression de p120RasGAP, une protéine activatrice de GTPase qui diminue l'activité de p21, protéine indispensable au cycle cellulaire (Anand et al., 2010). L'expression de miR-132 est indétectable dans l'endothélium quiescent alors que son expression est très fortement augmentée dans les cellules endothéliales de certaines tumeurs et hémangiomes. Plusieurs facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF ou le bFGF permettent l'augmentation de l'expression de miR-132 à l'aide de l'activation de la protéine CREB (*C-AMP Response Element-binding protein*) dans les cellules endothéliales (Anand et al., 2010). A l'inverse de miR-16 et miR-

424, l'induction de miR-132 par le VEGF induit une augmentation de l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo* (Anand et al., 2010).

c. Par les cytokines

Les cytokines sont de petites molécules polypeptidiques de signalisation cellulaire participant activement à la communication entre les cellules au cours de processus divers tels que l'embryogenèse ou l'inflammation. Le rôle de ces cytokines sur l'expression de microARNs a été exploré. Des cellules endothéliales ont ainsi été exposées à différentes cytokines pro-inflammatoires telle que l'interleukine-3 (IL-3). La régulation de sept microARNs (miR-17-5p, miR-21, miR-126, miR-210, miR-221, miR-222 et miR-296) impliqués dans l'angiogenèse a été observée (Dentelli et al., 2010a). Les expressions de miR-296, miR-126 et miR-221/222 sont très fortement diminuées dans les cellules endothéliales après traitement à l'IL-3. La relevance biologique de ces modulations d'expression a été étudiée dans le processus d'athérosclérose, une pathologie inflammatoire. L'expression de miR-222 dans les cellules endothéliales isolées de tissus normaux est supérieure à celle détectée dans les cellules endothéliales de tissus athérosclérotiques. Cependant, au cours de la progression de l'inflammation, l'expression de miR-222 chute progressivement de manière inverse à STAT5a, cible directe de miR-222 (Tableau 1) (Dentelli et al., 2010a). À l'évidence, cette étude nous montre le rôle de miR-222 comme régulateur majeur de la biologie des cellules vasculaires au cours d'une inflammation d'un microenvironnement contenant de l'IL-3. Une étude s'est intéressée au rôle de BMPR2 (*Bone Morphogenetic Protein Receptor II*) dans le développement d'une autre pathologie inflammatoire, l'hypertension artérielle pulmonaire. Dans cette étude, le cluster miR-17-92 est modulé par l'interleukine-6, cytokine impliquée dans cette pathologie. La régulation de ce cluster de microARNs par l'interleukine-6 est rendue possible grâce à l'activation de STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*), facteur de transcription régulé par cette cytokine. À son tour, BMPR2 est directement ciblé par des microARNs appartenant à ce cluster (miR-17-5p et miR-20a), permettant alors d'établir que l'augmentation de l'interleukine-6 induit une chute d'expression de BMPR2 en passant par la voie STAT3/miR-17-92 (Brock et al., 2009).

d. Par le flux sanguin

Dans la littérature, la régulation spécifique des microARNs initiée par le flux sanguin reste très peu décrite. Néanmoins, plusieurs exemples sont déjà connus. En effet, Nicoli et collaborateurs ont découvert que l'émergence des nouveaux vaisseaux sanguins de la crosse de l'aorte était liée à l'activation d'une voie de signalisation dépendante du flux dans lequel le facteur de transcription *klf2a* (Krüppel Like Factor 2a) induisait l'expression du microARN miR-126 pour activer la voie du VEGF (Nicoli et al., 2010). Cette étude a fourni un nouveau point de vue selon lequel les microARNs des cellules endothéliales, en réponse au flux sanguin, pouvaient participer au mécanisme de l'angiogenèse à des stades très précoces. En effet, la récente analyse des microARNs exprimés dans les cellules endothéliales suite à des pulsations de milieu de culture comparés à une condition statique a démontré la modulation d'expression de 21 microARNs (8 augmentés, 13 diminués). De plus, l'analyse d'un microARN dont l'expression est augmentée, miR-23b, a montré son implication dans l'arrêt de la croissance cellulaire au cours d'une variation du flux sanguin *in vitro* (Wang et al., 2010b).

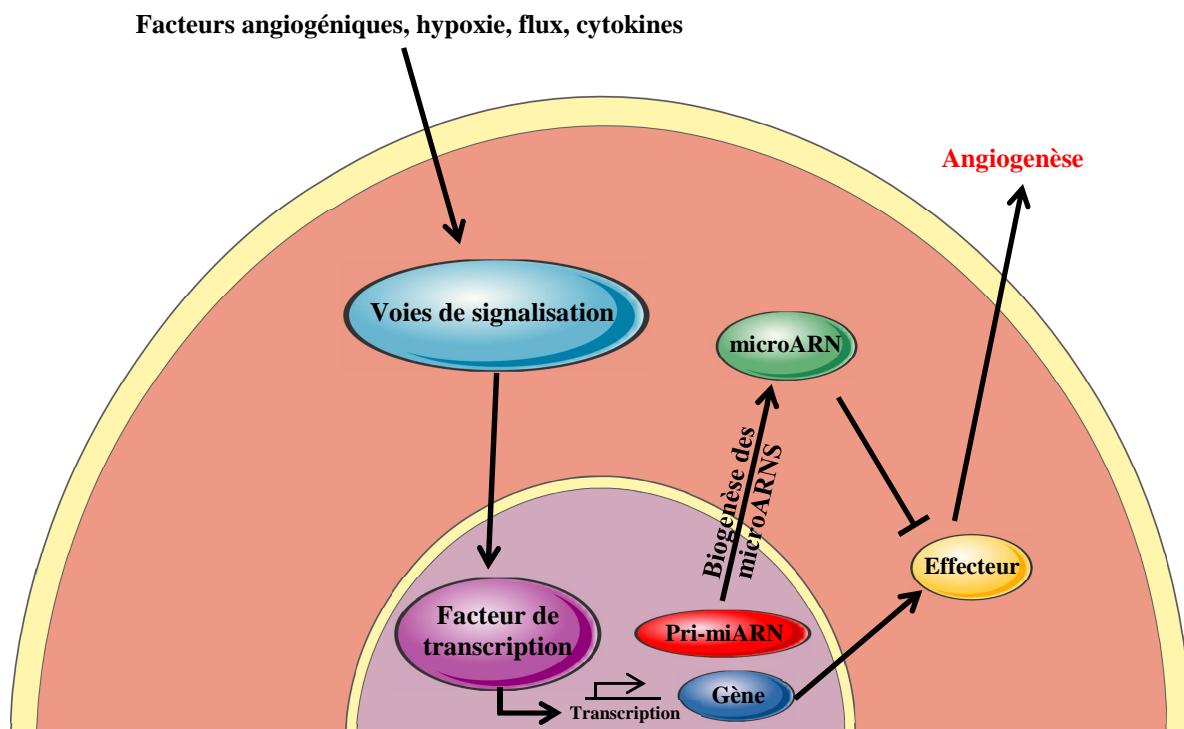


Figure 11 : Régulation des microARNs dans l'endothélium.

Les cellules endothéliales sont soumises à différents facteurs extra-endothéliaux induisant une cascade de signalisation. Cette cascade induit l'expression de facteurs de transcription et l'expression d'un certain nombre de gènes. Néanmoins, la présence de ces facteurs peut aussi induire la synthèse de microARNs spécifiques des cellules endothéliales inhibant alors les fonctions de leurs gènes cibles participant à l'angiogenèse.

B. Fonctions des microARNs dans l'endothélium

1. Fonctions des microARNs dans l'endothélium en condition physiologique

Différentes études ont démontré qu'il existait plusieurs microARNs endothéliaux participant aux mécanismes d'angiogenèse (Tableau 1) (Figure 12). L'une des premières analyses traitant des fonctions des microARNs dans l'endothélium a été réalisée sur les microARNs miR-221 et miR-222 (Poliseno et al., 2006). Poliseno et ses collaborateurs ont démontré que miR-221 et miR-222 étaient des facteurs anti-angiogéniques affectant l'expression du récepteur proto-oncogène c-Kit dans les cellules endothéliales. Par conséquent, la régulation de c-Kit par les microARNs entraîne une modulation de l'activité de son ligand SMC (Stem Cell Factor), facteur impliqué au cours de la différenciation des cellules endothéliales et de l'angiogenèse. Des expériences *in vitro* ont montré que la surexpression de miR-221 et miR-222 dans les HUVECs inhibait significativement la migration de ces cellules (Poliseno et al., 2006). Enfin, l'étude de l'inactivation de *dicer* suivie du rétablissement de l'expression du couple miR-221/miR-222 a démontré la régulation d'eNOS (*Nitric Oxide Synthase*), enzyme régulant la synthèse d'oxide nitrique, par ces microARNs (Figure 12)(Suárez et al., 2007). Dans la littérature, l'oxide nitrique est décrit comme essentiel à l'angiogenèse, à la formation de nouveaux capillaires et au remodelage vasculaire (Murohara et al., 1998; Rudic et al., 1998). D'autres microARNs sont fortement exprimés dans les cellules endothéliales et peuvent favoriser l'angiogenèse. (Urbich et al., 2008). Par exemple, miR-130a régule la boîte homéotique GAX (*Growth Arrest Homeobox*) et la boîte homéotique HoxA5 qui sont des inhibiteurs de l'angiogenèse. En effet, GAX régule négativement la prolifération, la migration et la tubulogenèse des cellules endothéliales alors que HoxA5 inhibe uniquement ce dernier mécanisme (Wang et al., 2010c). D'autre part, l'étude du cluster miR-17-92 comprenant miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1 et miR-92a dans des cellules endothéliales a permis d'identifier les fonctions pro-angiogéniques de ce cluster (Suárez et al., 2008). En effet, la surexpression des microARNs miR-17-5, miR-18a et miR-20a dans des cellules endothéliales n'exprimant plus la protéine Dicer a permis de rétablir une prolifération et une capacité d'organisation en pseudotubes normale de ces cellules (Suárez et al., 2007, 2008). À l'inverse, l'inhibition de ces microARNs induit la perte de cette capacité d'organisation en pseudotubes des cellules endothéliales stimulées par le VEGF (Suárez et al., 2008). Ces résultats sont en partie expliqués par la régulation de la thrombospondine, facteur anti-angiogénique, par miR-18a

(Suárez et al., 2008). Par ailleurs, une autre étude a indiqué que l'infertilité des souris n'exprimant plus *dicer* était causée par la formation de nouveaux capillaires anormaux dans l'ovaire (Otsuka et al., 2007, 2008). L'inhibition de l'angiogenèse dans ce modèle serait due en partie à l'absence de miR-17-5p et let7f, deux microARNs participant aux fonctions des cellules endothéliales grâce à la modulation de l'expression d'un facteur anti-angiogénique nommé TIMP-1 (*Tissue Inhibitor of metalloproteases 1*) (Figure 12) (Otsuka et al., 2008). En effet, l'injection de ces deux microARNs chez les souris *dicer*^{-/-} a permis de restaurer partiellement la vascularisation ovarienne en inhibant l'expression de TIMP-1 (Otsuka et al., 2008). Ces résultats ont donc montré que le cluster miR-17-92 possédait d'importantes fonctions favorisant l'angiogenèse. De façon intéressante, une étude plus récente a mis en évidence les propriétés anti-angiogéniques de certains membres du cluster miR-17-92 *in vitro* (Doebele et al., 2010). En effet, la surexpression individuelle des microARNs appartenant à ce cluster inhibe l'émergence de capillaires de cellules endothéliales dans des expériences de sphéroïdes en cellulose, la formation d'un réseau de capillaires et la migration de ces cellules (Doebele et al., 2010). Enfin, miR-23 et miR-27, deux microARNs du cluster miR-23-24-27 fortement exprimés dans les cellules endothéliales, participent eux aussi à l'angiogenèse physiologique. L'inhibition de ces deux microARNs réprime l'angiogenèse *in vitro* et le développement vasculaire de la rétine chez la souris (Zhou et al., 2011b). Dans les cellules endothéliales, miR-23/miR-27 répriment l'expression des protéines anti-angiogéniques Sprouty2 et sema6a favorisant ainsi le processus angiogénique. L'inhibition de ces deux gènes cibles par miR-23/miR-27 permet de maintenir la voie de signalisation RAC (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate*)/RAF (*proto-oncogene serine/threonine-protein kinase*)/ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinases*) active après une stimulation au VEGF (Urbich et al., 2012; Zhou et al., 2011b).

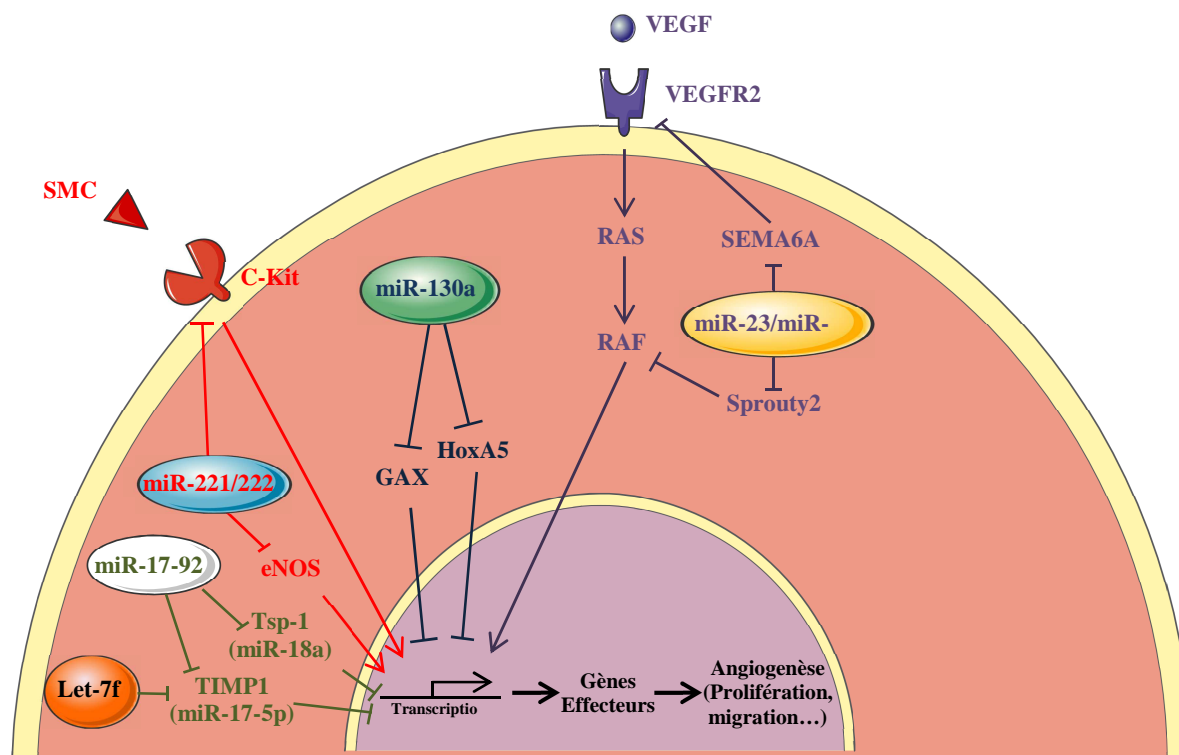


Figure 12 : Fonctions de certains microARNs endothé debateux en condition physiologique. *miR-221/222* inhibe l'angiogenèse en réprimant *eNOS* et *c-Kit*, tout deux favorisant le mécanisme d'angiogenèse. A l'inverse, *miR-23/miR-27*, *miR-130a*, la famille *let-7f* et le cluster *miR-17-92* promeut l'angiogenèse en réprimant des inhibiteurs de l'angiogenèse.

2. Fonctions des microARNs dans l'endothélium pathologique

Outre leurs implications dans l'endothélium en condition physiologique, les microARNs jouent aussi des rôles dans l'endothélium au cours de processus pathologiques.

a. MicroARNs et athérosclérose

L'athérosclérose est une pathologie grave aboutissant à d'importantes complications cardiovasculaires (Libby et al., 2011). L'origine de la maladie est très souvent due à une série de dysfonctionnements des cellules endothéliales. Les plaques athérosclérotiques retrouvées au niveau de l'endothélium sont composées d'une accumulation de particules lipidiques dans des cellules spumeuses (dérivées des macrophages), des cellules musculaires lisses ou dans la matrice extra-cellulaire. Ces plaques sont les points de repère de l'avancement des lésions athérosclérotiques dans les artères. De plus, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les cellules spumeuses sont les principaux acteurs du développement des plaques athérosclérotiques (Albiero et al., 2010; Cecchetti et al., 2011; Moore and Tabas, 2011; Onat et al., 2011). Un nombre important de gènes et de cytokines ont été identifiés comme

des facteurs de risques potentiels dans l'athérosclérose (Ait-Oufella et al., 2011; Ramsey et al., 2010). De plus, de récentes études ont suggéré une implication des microARNs dans le développement de cette pathologie (Zhang, 2008, 2010).

Afin de caractériser les microARNs impliqués dans l'athérosclérose, les souris développant des lésions athérosclérotiques spontanées n'exprimant plus nativement les gènes *ApoE* (*Apolipoprotein E*) ou *LDLR* (*Low density lipoprotein receptor*) ont été utilisées (Ishibashi et al., 1993; Plump et al., 1992). Deux études ont démontré que les niveaux d'expression de miR-143, miR-145 et miR-125b dans l'aorte étaient fortement diminués chez les souris *ApoE*^{-/-} (Elia et al., 2009; Goettsch et al., 2011). De plus, l'inactivation du cluster miR-143/miR-145 a montré un rôle majeur de ces microARNs au cours de la différenciation des cellules musculaires lisses et a donc suggéré leur participation au cours de certaines pathologies vasculaires comme l'athérosclérose (Elia et al., 2009). Par ailleurs, l'injection d'un inhibiteur de miR-33 a permis d'augmenter la quantité de HDL (High Density Lipoprotein) inversant alors en partie le phénotype hypercholestérolémique des souris dépourvues du gène *LDLR* (Rayner et al., 2011).

Bien que de nombreux microARNs impliqués dans l'athérosclérose aient été identifiés à l'aide de modèles cellulaires et murins, les bases de données humaines fournissent des informations plus proches de la véritable pathologie. À partir de ces données, un certain nombre de microARNs régulés lors de l'athérosclérose a été identifié (Tableau 1 et 2). Tout d'abord, Cipollone et ses collaborateurs ont montré que 5 microARNs (miR-100, miR-127, miR-145, miR-133a et miR-133b) étaient surexprimés dans des plaques lipidiques humaines (Cipollone et al., 2011). Ensuite, une analyse de tissus vasculaires sains versus athérosclérotiques a démontré la présence de 5 autres microARNs surexprimés (miR-21, miR-130a, miR-27b, miR-210 et let-7f) et 2 sous- exprimés (miR-221 et miR-222) dans les lésions sclérotiques (Li et al., 2011a). De plus, une dernière étude de tissus athérosclérotiques comparés à des tissus sains a confirmé la surexpression de miR-21 et miR-210 et ajouté les microARNs miR-34a, miR-146a et miR-146b-5p à la liste des microARNs déjà impliqués (Raitoharju et al., 2011). Enfin l'analyse des microARNs circulants a permis d'établir une liste de microARNs comme bio-marqueurs potentiels relargués dans la circulation sanguine au cours de l'athérosclérose. Par exemple, les expressions des microARNs miR-17, miR-92a, miR-145 et miR-155 sont diminuées alors que celles de miR-21, miR-133a, miR-146a et miR-208a sont augmentées en condition pathologique (Tableau 2) (Fichtlscherer et al., 2010; Qu et al., 2011; Yao et al., 2011).

MicroARNs humains	Expression tissu athérosclérotique/sain	MicroARNs humains circulants	Expression tissu athérosclérotique/sain
miR-21	Augmentée	miR-17	Diminuée
miR-27b	Augmentée	miR-21	Augmentée
miR-34a	Augmentée	miR-92a	Diminuée
miR-100	Augmentée	miR-133a	Augmentée
miR-127	Augmentée	miR-145	Diminuée
miR-133a	Augmentée	miR-146a	Augmentée
miR-133b	Augmentée	miR-155	Diminuée
miR-130a	Augmentée	miR-208a	Augmentée
miR-145	Augmentée		
miR-146a	Augmentée		
miR-146-5p	Augmentée		
miR-210	Augmentée		
let-7f	Augmentée		
miR-221	Diminuée		
miR-222	Diminuée		

Tableau 2 : Variations d’expression des microARNs endothéliaux lors de l’athérosclérose.

b. MicroARNs et inflammation

L’inflammation fait partie intégrante d’un grand nombre de pathologies humaines et participe à la réponse immunitaire innée en réaction à des pathogènes ou à des dommages cellulaires. L’inflammation est couramment définie comme un recrutement local de leucocytes suivi de leur activation (Pober and Cotran, 1990; Pober and Sessa, 2007). En réponse à des pathogènes ou à des cytokines inflammatoires comme l’interleukine-1 ou le TNF α (*Tumor Necrosis Factor α*), les cellules endothéliales sont alors activées et acquièrent de nouvelles capacités permettant aux leucocytes de rouler, adhérer puis transmigration à travers l’endothélium et ce afin de leur permettre de se rendre sur les sites inflammatoires (Butcher, 1991; Ley, 1996; Ley et al., 2007; Springer, 1995). En condition normale, les leucocytes n’interagissent pas avec les cellules endothéliales. En effet, ces dernières séquestrent les protéines responsables de leur interaction avec les leucocytes (P-selectin et chimiokines) dans des vésicules de sécrétion appelé les corps de Weibel-Palade (Bonfanti et al., 1989; McEver et al., 1989; Middleton et al., 1997). Dans ces mêmes conditions, les expressions des protéines d’adhérence indispensables à cette interaction (ICAM-1 (*InterCellular adhesion molecule*), VCAM-1 (*Vascular cell-adhesion molecule*) et la E-selectine) sont aussi réprimées (Bevilacqua et al., 1994; Pober, 2002).

De récentes études ont montré que certains microARNs pouvaient réguler l'inflammation (Tableau 1) (Figure 13). En effet, l'analyse plus précise de l'induction des microARNs par le TNF- α a montré la surexpression de miR-31, miR-155 et miR-17-3p. De façon intéressante, ces microARNs ciblent deux protéines d'adhérence cellulaire, la E-sélectine (miR-31) et ICAM-1 (miR-17-3p) (Suárez et al., 2010). Dans cette étude, l'inhibition de ces microARNs augmente l'adhérence des neutrophiles *in vitro* (Suárez et al., 2010). A l'inverse, l'expression du microARN miR-181b est inhibée par l'induction au TNF- α des cellules endothéliales. Ce microARN régule l'expression de l'importine α 3, protéine nécessaire à la translocation du facteur de transcription NF- κ B (Sun et al., 2012). L'activation de NF- κ B est une étape critique de l'action pro-inflammatoire du TNF- α . *In vitro* et *in vivo*, miR-181b diminue alors indirectement l'expression des gènes cibles de ce facteur de transcription tels que VCAM-1 et la E-sélectine (Sun et al., 2012). Par ailleurs, un autre microARN, miR-10a, régule négativement la cascade du NF- κ B en ciblant deux régulateurs nommés MAP3K7 (*Mitogen-Activated Kinase Kinase Kinase*) et β TRC (*β -Transducin Repeat Containing Gene*) qui contrôlent la dégradation protéasomique de I κ B α et de la translocation de p65 dans les cellules endothéliales (Fang et al., 2010a). De plus, l'expression de miR-10a diminue dans les régions athérosclérotiques là où l'expression des deux cibles MAP3K7 et β TRC est augmentée (Fang et al., 2010b). Ces résultats suggèrent que l'expression différentielle de ce microARN contribue à la régulation pro-inflammatoire du phénotype endothéliale au cours de l'initiation de l'athérosclérose. MiR-155 et miR-221/222 interviennent également dans la réponse inflammatoire en régulant négativement le facteur de transcription, Ets-1 (*v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1*) (Zhu et al., 2011a). En effet, dans des cellules endothéliales stimulées par l'angiotensine II, protéine induisant l'expression de certaines molécules d'adhérence, Ets-1 et certains de ces gènes cibles comme VCAM-1, MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant protein 1*) et FLT1 (*fms related tyrosine kinase 1*) sont surexprimés. Cet effet est partiellement réprimé par la surexpression des microARNs miR-155 ou miR-221/222. De plus, l'augmentation de l'expression de miR-155 et miR-221/222 réduit l'adhérence des leucocytes sur un tapis de cellules endothéliales veineuses (HUVECs) ainsi que la migration de ces dernières (Zhu et al., 2011a). Par ailleurs, une étude de la régulation des LDL oxydés par des microARNs a été réalisée. Les LDL oxydés favorisent l'expression de gènes pro-inflammatoires initiant alors le recrutement de monocytes sur l'endothélium et le dérèglement des cellules endothéliales (Li and Mehta, 2000). Les microARNs endothéliaux miR-125a/b-5p modulent l'expression d'un gène pro-

inflammatoire, l'*endothelin-1*, qui est surexprimé suite à l'oxydation de ces LDL suggérant un rôle de ces microARNs dans l'inflammation de l'endothélium (Li et al., 2010). D'autre part, les facteurs de transcriptions surexprimés en réponse à une lésion vasculaire, *klf2* et *klf4*, sont sous le contrôle de miR-92a, microARN appartenant au cluster miR-17-92. En effet, miR-92a réprime l'expression de KLF2 et KLF4 favorisant alors l'inflammation des cellules endothéliales. De plus, Fang et ses collaborateurs ont démontré dans la même étude que miR-92a inhibe partiellement l'adhérence des leucocytes induite par le TNF- α sur des cellules endothéliales *in vitro* (Fang and Davies, 2012). Enfin, il existe un microARN, nommé miR-663, retrouvé uniquement chez les primates participant à diverses pathologies telles que l'inflammation ou le cancer (Pan et al., 2010; Tili et al., 2010). La participation de miR-663 au cours de l'inflammation a été révélée à l'aide d'un modèle imposant des contraintes de cisaillement oscillatoire ou « *Oscillatory Shear Stress* » ou OCS induisant un phénomène inflammatoire endothélial. La contrainte de cisaillement est une force appliquée à la surface d'un solide (vaisseau sanguin) de manière parallèle (flux) et non perpendiculaire initiant alors une déformation de celui-ci. Lors de l'exposition des cellules endothéliales à cette contrainte de façon intermittente, le microARN le plus exprimé dans ces cellules est miR-663. L'inhibition de ce microARN dans les cellules endothéliales permet un blocage de l'adhérence des monocytes induite par l'OCS. Suite à ces résultats, une étude par microarray des cellules endothéliales exprimant ou non miR-663 a permis de révéler 35 cibles potentielles pour ce microARN, parmi lesquelles sont inclus des gènes et des facteurs de transcriptions impliqués dans l'inflammation comme *klf4*. Ces résultats suggèrent alors la participation de ce microARN au cours de ce processus (Ni et al., 2011).

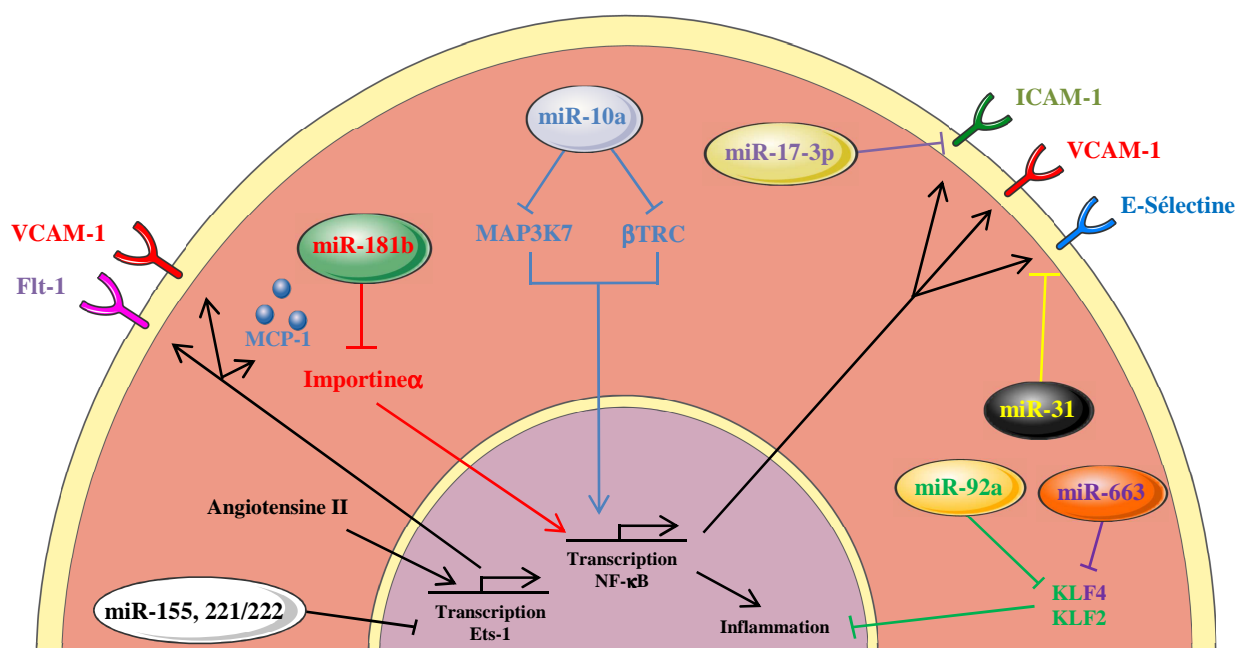


Figure 13 : Fonctions de microARNs endothéliaux en condition inflammatoire.
miR-181b, miR-10a, miR-17-3p, miR-31, miR-155, miR-221 et miR-222 répriment des facteurs favorisant l'inflammation alors que miR-92a et miR-663 répriment un ou deux inhibiteurs de la mise en place de ce mécanisme.

c. MicroARNs et ischémie vasculaire

La formation de nouveaux vaisseaux sanguins est une étape essentielle au cours d'une ischémie vasculaire, où l'interruption du flux sanguin prive les tissus d'oxygène et de nutriments nécessaires pour maintenir leurs fonctions normales. Durant une ischémie, la pauvreté en oxygène, ou hypoxie, induit également plusieurs stimuli angiogéniques (VEGF...) afin de maintenir une homéostasie tissulaire (Carmeliet and Jain, 2011). En réponse à une ischémie vasculaire, les expressions de certains microARNs ne sont pas seulement modulées mais ils participent activement à l'angiogenèse induite dans ces conditions (Tableau 1) (Figure 14). Tout d'abord, l'expression du microARN miR-210, qualifié de hypoxamiR, est augmentée lors d'une hypoxie suite à une activation du facteur de transcription HIF-1α. Fasanaro et ses collaborateurs ont montré que l'induction de ce microARN dans ces conditions accentuait la chimiotaxie des cellules endothéliales induite par le VEGF et le développement des capillaires *in vitro* (Fasanaro et al., 2008). De façon intéressante, une autre étude a montré que miR-210 induisait l'angiogenèse et inhibait l'apoptose des cellules endothéliales dans un modèle murin d'infarctus du myocarde permettant alors de rétablir partiellement les fonctions cardiaques (Hu et al., 2010). Les mécanismes pro-angiogéniques et anti-apoptotiques assurés par miR-210 sont établis suite à

la répression d'un ligand des récepteurs à activité tyrosine kinase Eph, éphrine A3 et d'une phosphatase, PTPN1 (Fasanaro et al., 2008; Hu et al., 2010). Par ailleurs, une étude récente a démontré que le microARN miR-15a était un important régulateur de l'ischémie cardiaque chez la souris (Hullinger et al., 2012). En effet, la répression de miR-15a *in vivo* réduit la taille de la région de l'infarctus, inhibe le remodelage du cœur et accroît les fonctions cardiaques en réponse à des dommages causés par une ischémie vasculaire (Hullinger et al., 2012). Yin et collaborateurs ont précédemment établi que le récepteur nucléaire PPAR δ (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor δ*) se fixait sur le site de liaison à l'ADN dans la région du promoteur de miR-15a afin de réprimer son expression (Yin et al., 2010). De plus, lors de la diminution du niveau de PPAR δ dans des cellules endothéliales cérébrales au cours d'une ischémie, une augmentation de l'apoptose de ces cellules ainsi qu'une nécrose étaient observées. A l'inverse, la surexpression de PPAR δ inhibe miR-15a initiant alors une augmentation d'une cible anti-apoptotique directe de ce microARN, Bcl-2 (*B-Cell Lymphoma 2*). *In vitro* et *in vivo*, l'induction de Bcl-2 favorise alors la réduction de l'activité de la caspase 3 et la mort cellulaire endothéliale dans le cerveau de souris après une ischémie vasculaire (Yin et al., 2010). Les mêmes auteurs ont démontré que l'action anti-angiogénique de miR-15a n'induisait pas uniquement un effet anti-apoptotique passant par la régulation de Bcl-2. En effet, miR-15a régule deux acteurs majeurs de l'angiogenèse exprimés dans les cellules endothéliales que sont le VEGF et le FGF2 (*Fibroblast Growth Factor 2*). Cette régulation directe permet alors à miR-15a de réguler les mécanismes de différenciation, migration et tubulogenèse des cellules endothéliales *in vitro* puis la formation de nouveaux vaisseaux sanguins après induction d'une ischémie du membre inférieur *in vivo* (Yin et al., 2012). D'autre part, comme cité précédemment (partie II. A. 3. a.), l'étude des cellules endothéliales dans des conditions de privation similaires à une ischémie *in vitro* a établi que l'expression du microARN miR-503 était stimulée (Caporali et al., 2011). miR-503 inhibe la prolifération, la migration et la tubulogenèse des cellules endothéliales en ciblant deux protéines impliquées dans le cycle cellulaire, CCNE1 (*Cyclin E1*) et CDC25A (*Cell Division Cycle 25*). L'injection d'un inhibiteur de ce microARN *in vivo* favorise le rétablissement du flux sanguin au cours d'une ischémie du membre chez des souris diabétiques (Caporali et al., 2011).

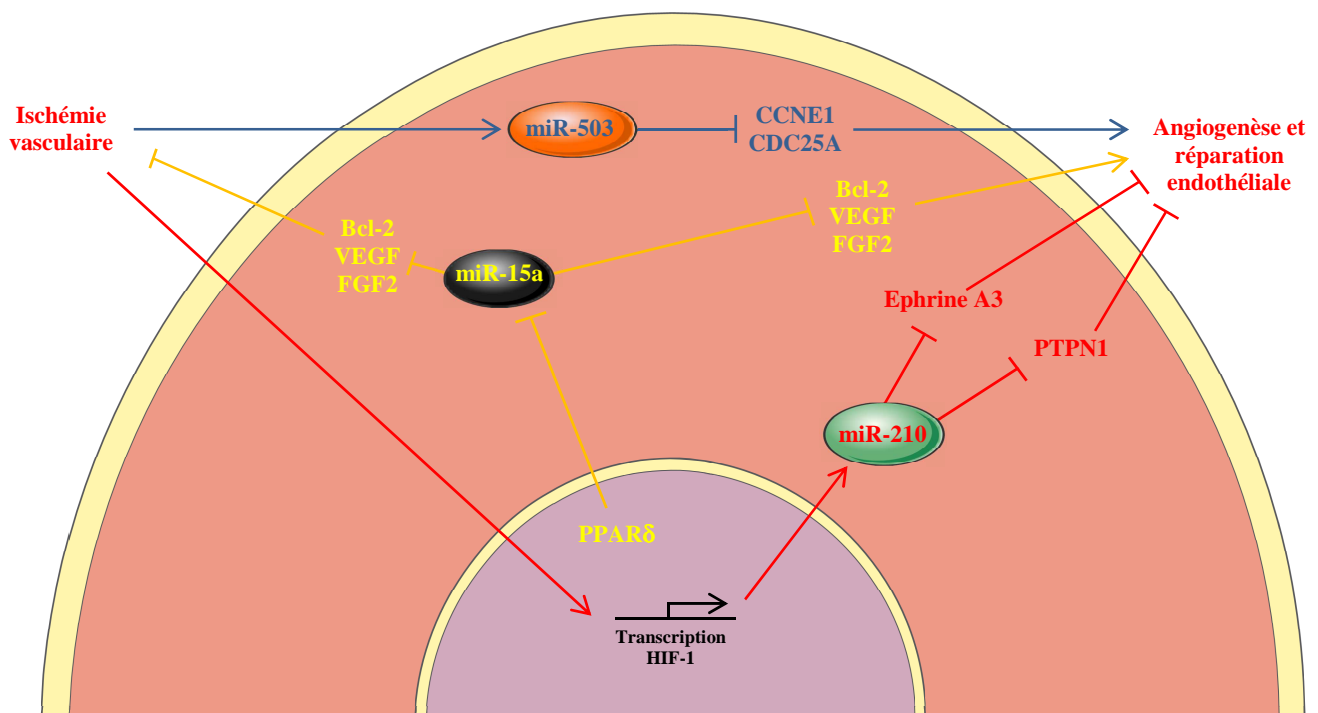


Figure 14 : Fonctions de microARNs endothéliaux au cours d'une ischémie vasculaire.

L'effet pro-angiogénique de miR-210 permet de rétablir un phénotype normal suite à une ischémie vasculaire. A l'inverse, miR-15a et miR-503 régule positivement ce mécanisme.

d. MicroARNs et Senescence

Le processus de la senescence des cellules endothéliales est impliqué dans des pathologies cardiovasculaires mais aussi neurodégénératives comme dans la maladie d'Alzheimer (Casoli et al., 2013; MiRea et al., 2012). Plusieurs microARNs sont impliqués dans ce mécanisme comme les microARNs miR-217, miR-146a, miR-34a, miR-200c, miR-299 et le cluster miR-17-92 (Tableau 1) (Figure 15). La surexpression de miR-217 induit la senescence des cellules endothéliales alors que sa répression retarde ce mécanisme (Menghini et al., 2009). Dans un modèle de lésion athérosclérotique, miR-217 est associé à une réduction d'expression d'une histone désacétylase de classe III appelé SIRT1 (*Silent Information Regulator 1*) (Menghini et al., 2009). Le blocage de SIRT1 à l'aide d'inhibiteur pharmacologique ou de siARN induit un phénotype de senescence prématurée, associé à un stress oxydatif ou à des dommages à l'ADN, dans les cellules endothéliales *in vitro*. A l'inverse, la surexpression de cette protéine empêche une senescence des cellules endothéliales induite par un puissant facteur de stress oxydatif, le peroxyde d'hydrogène (Ota

et al., 2007). Par conséquent, miR-217, en agissant comme un inhibiteur endogène de SIRT1, favorise la senescence endothéliale.

Le mécanisme de senescence répllicative, lié au raccourcissement des télomères, est associé à une forte production de ROS (*Reactive Oxygen Species*) induisant une diminution de la quantité d'un microARN, miR-146a. De plus, miR-146a régule négativement l'expression de la principale isoforme endothéliale du complexe NADPH oxydase, NOX4 (*NADPH Oxydase 4*) induisant l'inhibition de la senescence dans les cellules endothéliales *in vitro* (Vasani et al., 2011). Par ailleurs, une étude portant sur l'expression du microARN miR-34a révèle un taux élevé de ce microARN dans les cellules HUVECs sénescents, notamment dans le cœur et la rate des souris âgées. La surexpression de miR-34a dans les cellules endothéliales induit la senescence et réprime la prolifération de ces cellules en inhibant la progression du cycle cellulaire (Ito et al., 2010). Similairement à miR-146a, miR-34a cible l'ARNm de SIRT1. En effet, la surexpression de SIRT1 dans les cellules endothéliales bloque la capacité de miR-34a à induire la senescence sans jouer sur son expression (Ito et al., 2010). D'autre part, les cellules progénitrices endothéliales (CPE) jouent un rôle essentiel dans l'intégrité vasculaire en renforçant le renouvellement cellulaire dans l'endothélium. L'accélération de la senescence dans ces cellules est un mécanisme retrouvé fréquemment au cours de diverses maladies cardiovasculaires (infarctus du myocarde, arythmie, ...) (Hill et al., 2003). miR-34a est aussi exprimé dans les CPE et la surexpression de ce microARN inhibe l'angiogenèse tout en favorisant la senescence de ces cellules *in vitro* (Zhao et al., 2010). Ce dernier mécanisme est associé à une diminution de 40% de l'expression de SIRT1. Ces résultats indiquent que miR-34a réprime les capacités angiogéniques des cellules progénitrices endothéliales en induisant la senescence de celles-ci via la régulation de SIRT1. Plus récemment, Magenta et ses collaborateurs ont démontré la régulation positive des microARNs appartenant à la famille miR-200 (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 et miR-429) suite à un traitement des cellules endothéliales au peroxyde d'hydrogène mimant un stress oxydatif *in vitro* (Magenta et al., 2011). La surexpression dans les HUVECs du microARN le plus sensible au traitement, miR-200c, induit l'arrêt de la croissance, l'apoptose et la senescence de ces cellules. A l'inverse, l'induction de ces différents phénomènes, suite au traitement par le peroxyde d'hydrogène, est partiellement inhibée par l'inhibition de miR-200c. La protéine anti-apoptotique ZEB1 (*Zinc finger E-box binding homeobox*) a été identifiée comme la cible directe de ce microARN. De plus, l'inactivation de ZEB1 à l'aide de shARN récapitule les réponses observées lors de la surexpression de miR-200c. Enfin, la surexpression d'une forme tronquée de ZEB1 ne permettant plus la fixation du microARN

montre que l'action de miR-200c passe par ce gène. Enfin, l'étude des microARNs endothéliaux dans des HUVECs sénescents a permis d'identifier la chute d'expression de quelques microARNs appartenant au cluster miR-17-92 (miR-17, miR-19b, miR-20a et miR-106a) associée à une augmentation du nombre de transcrits p21, protéine inhibitrice du cycle cellulaire (Hackl et al., 2010) ainsi que l'augmentation d'expression de miR-299 accompagnée de la chute du nombre de transcrits IGF-1 (*Insulin Growth Factor-1*) (Jong et al., 2013). Les résultats suggèrent la participation de ces microARNs au cours de la sénescence.

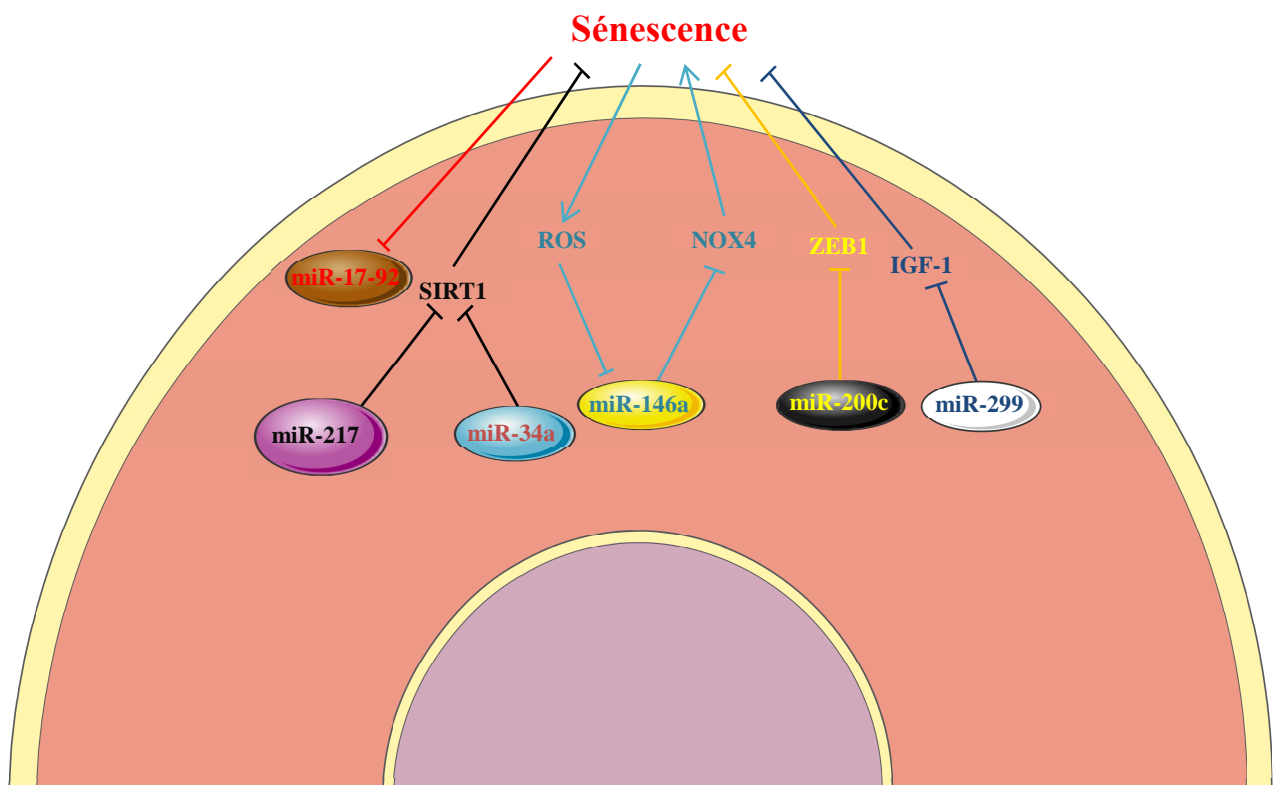


Figure 15 : Fonctions de microARNs endothéliaux au cours de la sénescence des cellules endothéliales.

miR-217, miR-34a, miR-200c et miR-299 favorise la senescence alors que miR-146a est un inhibiteur de ce mécanisme.

e. MicroARNs et angiogenèse tumorale

Certains microARNs jouant des rôles cruciaux lors de l'angiogenèse physiologique participent dans une moindre mesure à l'angiogenèse tumorale. Les rôles de miR-17-92 dans l'angiogenèse physiologique sont très largement décrits alors que ces microARNs ne semblent pas impliqués dans l'angiogenèse pathologique. Ainsi, l'inhibition des microARNs miR-17 et miR-20 dans des « plugs » de matrigel chez la souris favorise la vascularisation normale alors que la même inhibition n'affecte en aucun cas l'angiogenèse tumorale

(Doebele et al., 2010). Ces résultats montrent une fois de plus la régulation spécifique des microARNs selon le contexte cellulaire. Pourtant plusieurs microARNs endothéliaux participent à la régulation de diverses voies de signalisation au cours de l'angiogenèse tumorale (Tableau 1) (Figure 16). Ces différents microARNs peuvent être classés dans deux catégories que sont les microARNs non régulés en condition hypoxique et les microARNs régulés dans ces conditions.

- **MicroARNs indépendant de l'hypoxie**

Un grand nombre de microARNs endothéliaux appartenant à cette catégorie sont impliqués dans l'angiogenèse tumorale. Parmi eux, miR-132, miR-296, miR-378 et miR-146a. Comme décrit précédemment (II. A. 3. b), miR-132, microARN pro-angiogénique, est induit par certains facteurs de croissance tel que le VEGF (Anand et al., 2010). L'inhibition de ce microARN dans l'endothélium tumoral entraîne une chute significative de l'angiogenèse dans la tumeur (Anand et al., 2010). De plus, les cellules endothéliales de divers tissus pathologiques humains et murins incluant des tumeurs ont un niveau très faible d'expression de p120RasGAP, cible de miR-132, associée à une augmentation du niveau de ce microARN (Anand and Cheresch, 2011). miR-296 est un autre exemple de microARN impliqué dans l'angiogenèse tumorale. L'inhibition de ce microARN dans les cellules endothéliales de gliome inhibe l'angiogenèse tumorale *in vivo*, suggérant alors que miR-296 agit comme un microARN pro-angiogénique dans l'endothélium pathologique. miR-296 agirait sur l'angiogenèse tumorale de façon indirecte en régulant négativement l'expression de l'HGS (*Hepatocyte Growth Factor-regulated tyrosine kinase Substrate*), une protéine impliquée dans la dégradation de certains récepteurs aux facteurs de croissance tel que le PDGFR- β (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor β*) et le VEGFR2 (Würdinger et al., 2008). Enfin, miR-146a est un microARN possédant une forte expression dans les cellules endothéliales de carcinome hépatocellulaire. La surexpression de ce microARN induit une chute de l'ARNm de BRCA1 (*Breast Cancer 1*) entraînant une augmentation de l'expression du facteur PDGFR α (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor Alpha*). Cette induction de PDGFR α dans les cellules endothéliales est associée avec une importante invasion microvasculaire des tumeurs hépatiques (Zhu et al., 2013a).

- MicroARNs dépendant de l'hypoxie

L'hypoxie est souvent retrouvée dans certaines parties de la tumeur cancéreuse et favorise l'angiogenèse tumorale. Les microARNs induits par ce phénomène ont été identifiés dans les cellules cancéreuses et les cellules endothéliales. Dans le cadre de notre étude, nous nous intéresserons uniquement aux microARNs endothéliaux impliqués dans l'angiogenèse tumorale. L'hypoxie régule différents microARNs endothéliaux jouant un rôle majeur sur la régulation de l'angiogenèse tel que miR-424, miR-200b ou miR-503. MiR-424, par son rôle sur ses cibles tels que le VEGF, le VEGFR2, le FGF2 et CUL2, participe à l'angiogenèse tumorale suite à son augmentation en condition hypoxique (Chamorro-Jorganes et al., 2011; Ghosh et al., 2010). D'autre part, le microARN faisant partie de la famille des miR-200, miR-200b, est quant à lui inhibé lors d'une hypoxie induisant une augmentation de l'expression de sa cible Ets-1 (*E26 transformation-specific sequence*) favorisant alors l'activité angiogénique des cellules endothéliales (Chan et al., 2011). Enfin, une étude récente a démontré qu'un autre microARN inhibé en condition hypoxique et fortement exprimé dans les cellules endothéliales, miR-503, réprime directement deux facteurs pro-angiogéniques majeurs que sont FGF2 (*Fibroblast Growth Factor 2*) et le VEGFA (*Vascular Growth Factor A*) (Zhou et al., 2013). Dans ces conditions, l'expression de ce microARN est diminuée permettant alors les effets pro-angiogéniques des deux facteurs cibles. De plus, la surexpression de ce microARN dans des HUVECs ou dans des tumeurs hépatiques *in vivo* inhibe l'angiogenèse (Zhou et al., 2013).

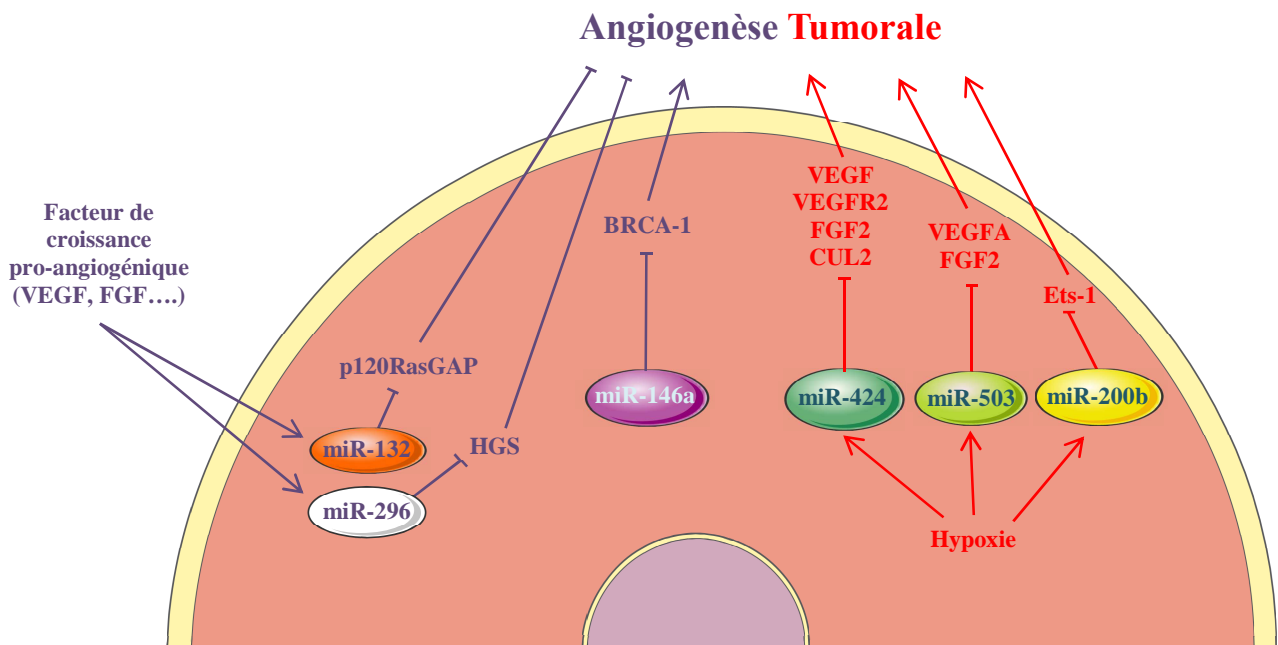


Figure 16 : Fonctions des microARNs endothéliaux au cours de l'angiogenèse tumorale.

Les microARNs participant à l'angiogenèse tumorale peuvent être classés en deux catégories que sont :

- 1) les microARNs non régulés dans des conditions hypoxiques. (Violet)*
- 2) les microARNs régulés dans ces mêmes conditions. (Rouge)*

Chapitre 3 : Le cas particulier du duplex miR-126-3p/miR-126-5p

A. Généralités sur le duplex

1. *Egfl7*, gène hôte de miR-126-3p (miR-126) /miR-126-5p (miR-126*)

Le gène de la VE-statine (*Vascular Endothelial Statin*) a été identifié au sein du laboratoire en 2003 (Soncin et al., 2003). Deux autres équipes ont ensuite décrit ce gène sous le nom d'*egfl7* (*Epidermal Growth Factor Like-domain 7*) (Fitch et al., 2004; Parker et al., 2004). Le gène *egfl7*, retrouvé respectivement sur les chromosomes 9 et 2 chez l'humain et la souris, code pour une protéine d'environ 30 kDa très conservée dans de nombreuses espèces (Soncin et al., 2003). Les transcrits du gène *egfl7* sont majoritairement retrouvés dans l'endothélium avec une très forte expression dans les cellules endothéliales au cours de l'embryogenèse et en situation de remodelage vasculaire physiologique (gestation) et pathologique (lésion artérielle, athérosclérose et cancer) (Campagnolo et al., 2005; Parker et al., 2004; Soncin et al., 2003). Chez l'adulte, l'expression de la protéine est réprimée mais reste détectable dans divers vaisseaux sanguins (poumons, reins, cœur). EGFL7 a été décrit comme une protéine sécrétée et inhibitrice de la migration induite par le PDGF-BB (*Platelet-Derived Growth Factor B*) des cellules musculaires lisses, (Soncin et al., 2003). *In vivo*, l'inhibition de l'expression d'*egfl7* par injection de morpholinos chez le poisson zèbre a montré un rôle majeur de cette protéine au cours de la tubulogenèse vasculaire (Parker et al., 2004). D'autre part, l'analyse des souris déficientes pour *egfl7* a montré un retard du développement vasculaire embryonnaire accompagné d'œdèmes et d'une létalité embryonnaire partielle (Schmidt et al., 2007). Cependant, ce phénotype a ensuite été attribué à l'inactivation simultanée d'*egfl7* et de miR-126-3p/miR-126-5p, microARNs présents dans la séquence intronique d'*egfl7* (Kuhnert et al., 2008).

Le microARN miR-126-3p ainsi que son complémentaire miR-126-5p sont hébergés dans l'intron 7 du gène *egfl7* (Figure 17). En 2002, miR-123 (miR-126-5p) et miR-126 (miR-126-3p) ont été identifiés au cours d'un screening tissu-spécifique de microARN chez la souris (Lagos-Quintana et al., 2002). Un an plus tard, il a été démontré que miR-123 et miR-126 étaient originaires du même précurseur (Landgraf et al., 2007) ce qui a conduit à renommer miR-123 en miR-126-5p. Ces deux microARNs sont très conservés entre les espèces ce qui

suggère qu'ils pourraient jouer des rôles biologiques essentiels (<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/index.shtml>).

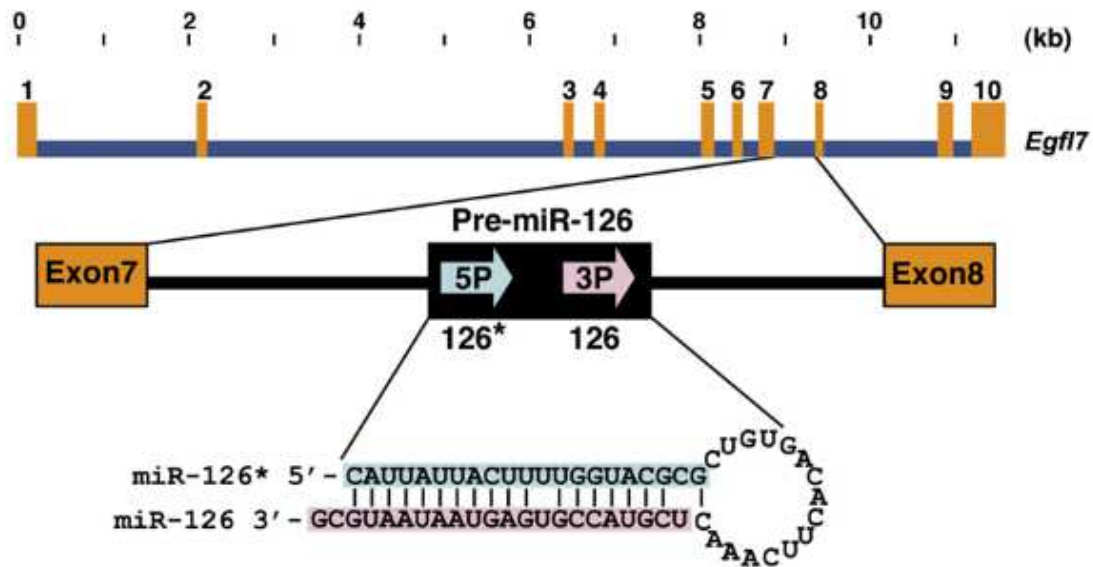


Figure 17 : Structure d'*egfl7* et de ses deux microARNs : miR-126-3p et miR-126-5p. Les deux microARNs sont localisés au niveau de l'intron 7 du gène *egfl7*. Ces deux microARNs sont très conservés entre les espèces. (Wang et al., 2008b)

2. Expression du duplex miR-126-3p/miR-126-5p

Les expressions d'EGFL7 et du duplex miR-126-3p/miR-126-5p sont majoritairement co-localisées au niveau de l'endothélium embryonnaire, pathologique et, dans une moindre mesure, chez l'adulte. En effet, en amont du locus responsable de la synthèse des deux microARNs sont localisées deux séquences de liaisons à l'ADN de type Ets très conservées au cours de l'évolution. L'analyse des différents sites Ets a permis de montrer que les fixations des facteurs de transcription Ets-1 ou Ets-2 sur ces séquences étaient nécessaires et suffisantes à la transcription spécifique de ces microARNs dans l'endothélium (Harris et al., 2010; Wang et al., 2008b). D'autre part, les analyses d'expressions de ces microARNs et de leur gène hôte suggèrent leurs co-transcriptions et leurs co-localisations dans un même tissu (Fish et al., 2008). Ainsi, les expressions de miR-126-3p et miR-126-5p sont principalement retrouvées au niveau des cellules endothéliales *in vitro* et *in vivo* (Fish et al., 2008; Harris et al., 2008; Wang et al., 2008b). Cependant, l'expression de miR-126-3p peut aussi être régulée de façon indépendante à celle d'EGFL7 (Li et al., 2009) suggérant l'existence de promoteurs distincts modulant l'expression du duplex miR-126-3p/miR-126-5p et celle d'EGFL7

(Monteys et al., 2010). L'expression de miR-126-3p, considéré comme le microARN mature et actif du duplex, a été largement décrite (Tableau 3). Ce microARN est retrouvé dans les cellules endothéliales (Fish et al., 2008; Wang et al., 2008b) et non-endothéliales telles que les cellules cancéreuses (Crawford et al., 2008; Feng et al., 2010; Hamada et al., 2012; Li et al., 2013b; Liu et al., 2009; Xu et al., 2013; Zhu et al., 2011b), les cellules épithéliales pulmonaires (Collison et al., 2011a; Mattes et al., 2009; Oglesby et al., 2010) et les cellules circulantes (cellules hématopoïétiques, lymphocytes T CD4, plaquettes, mastocytes...) (Edelstein et al., 2013; Grabher et al., 2011; Huang et al., 2011; Ishizaki et al., 2011; Shen et al., 2008; Zhao et al., 2011). D'autre part, miR-126-3p peut aussi être détecté en dehors des cellules soit dans des microvésicules telles que les corps apoptotiques (Zernecke et al., 2009) ou les exosomes (Taylor and Gercel-Taylor, 2008), ou simplement circulant associé à argonaute2 (Arroyo et al., 2011), ou à des lipoprotéines de haute densité (HDL) ou de faible densité (LDL) (Wagner et al., 2013). En ce qui concerne miR-126-5p, son expression a été décrite dans des lignées cancéreuses de la prostate (Watahiki et al., 2011), du sein (Zhang et al., 2008), de la peau (Felli et al., 2013), du poumon (Kalscheuer et al., 2008) ou encore dans certaines cellules leucémiques (Li et al., 2008). De plus, miR-126-5p a également été détecté dans les exosomes circulants (Montecalvo et al., 2012).

B. Fonctions de miR-126-3p/miR-126-5p

Les fonctions établies pour le duplex miR-126-3p/miR-126-5p concernent essentiellement miR-126-3p.

MicroARN	Expression	Cible(s)	Fonctions	Citations
miR-126-3p	Endothélium	Spred-1, PIK3R2, PAK1	Angiogenèse et intégrité vasculaire via la régulation de la cascade du VEGF et de l'angiopoïétine I.	(Fish et al., 2008; Wang et al., 2008c; Zou et al., 2011)
	Glande mammaire	PGR, β -caséine	Développement de la glande mammaire, lactation.	(Cui et al., 2011)
	Endothélium	CXCL-12	Mobilisation des cellules progénitrices endothéliales Sca-1+.	(van Solingen et al., 2011)
	Cellules souches hématopoïétiques et cellules progénitrices endothéliales	HOXA9, c-Myb, PTPN9, Spred-1	Hématopoïèse et érythropoïèse	(Grabher et al., 2011; Huang et al., 2011; Meng et al., 2012; Shen et al., 2008)
	Cellules T régulateurs	PIK3R2	Régulation de l'activité des cellules T régulateurs CD4+ Foxp3+.	(Qin et al., 2013)
	Cellules T CD4+	Dnmt1	Méthylation de l'ADN induisant une hyperactivité des lymphocytes T,B.	(Zhao et al., 2011)
	Mastocytes	Spred-1	Différentiation des mastocytes et production de cytokines.	(Ishizaki et al., 2011)
	Endothélium	RGS16	Athérosclérose.	(Zernecke et al., 2009)
	Cellules épithéliales de poumon	TOM1	Recrutement des éosinophiles et réponse immunitaire de type Th2. Mucoviscidose. Asthme.	(Collison et al., 2011a; Oglesby et al., 2010)
	Endothélium, cellules mésenchymateuses et musculaires	VCAM-1	Inflammation (adhérence des leucocytes), hétérogénéité des cellules endothéliales, hématopoïèse, polymyosite.	(Asgeirsdóttir et al., 2012; Harris et al., 2008; Kim et al., 2012; Sturgeon et al., 2012)
	colon	I κ B α	Rectocolite hémorragique.	(Feng et al., 2012)
	Coxsackievirus	Spred-1, WRCH1, LRP6	Réplication du virus.	(Ye et al., 2013)
	Cancer du poumon	VEGFA, SLC7A5, EGFL7	Invasion et angiogenèse tumorale. Prolifération des cellules tumorales.	(Liu et al., 2009; Miko et al., 2011; Sun et al., 2010)
	Cancer du sein	IRS-1, VEGF-A, PIK3R2, CXCL12, IGFBP2, PTPN9, MERTK ; CD97	Développement tumorale. Recrutement des cellules souches mésenchymateuses et des monocytes inflammatoires. Métastases.	(Lu et al., 2013; Png et al., 2012; Zhang et al., 2008, 2013a; Zhu et al., 2011b)
	Cancer du colon	Cascade RhoA/Rock, CXCR4, VEGF	Développement de la tumeur. Invasion tumorale et prolifération/migration des cellules cancéreuses. Angiogenèse tumorale.	(Li et al., 2013a, 2013b; Zhang et al., 2013b)
	Cancer de l'estomac	Sox2, Crk	Invasion tumorale et prolifération des cellules cancéreuses.	(Feng et al., 2010; Otsubo et al., 2011)
	Cancer des voies orales	VEGF-A	Métastases, angiogenèse tumorale, développement de la tumeur.	(Sasahira et al., 2012)
	Cancer du pancréas	Adam9	Invasion tumorale.	(Hamada et al., 2012)
	Mélanome	Adam9, MMP7	Invasion tumorale.	(Felli et al., 2013)
	Leucémie aigue myéloblastique (LAM)	PLK2	Participe au développement des LAM en inhibant l'apoptose et en augmentant la viabilité des cellules cancéreuses.	(Li et al., 2008)
Ostéosarcome	Sirt1	Prolifération des cellules tumorales.	(Xu et al., 2013)	
miR-126-5p	Cancer de la prostate	Prostéine	Invasion tumorale.	(Musiyenko et al., 2008)
	Mélanome	Adam9, MMP7	Invasion tumorale.	(Felli et al., 2013)
	Cancer du sein	CXCL12	Recrutement des cellules souches mésenchymateuses et des monocytes inflammatoires. Métastases.	(Zhang et al., 2013a)

Tableau 3 : Expressions et fonctions physiologiques et pathologiques du duplex miR-126-3p/miR-126-5p associées à leurs cibles directes. Participation du duplex dans le développement normal (bleu), au cours de l'hématopoïèse (rouge), de l'inflammation (vert) et du cancer (violet).

1. Fonctions physiologiques

a. Inactivations de miR-126-3p et miR-126-5p *in vivo*

La double inactivation de miR-126-3p/miR-126-5p par recombinaisons homologues chez la souris ou par injection de morpholinos chez le poisson zèbre a entraîné des défauts vasculaires embryonnaires majeurs (Figure 18). De plus, l'inhibition de miR-126-3p *in vitro* induit des défauts d'organisation du cytosquelette dans les cellules endothéliales, modifie leur capacité à former des pseudos-capillaires et module leur résistance à l'apoptose en présence de VEGF (Fish et al., 2008; Kuhnert et al., 2008; Wang et al., 2008b).

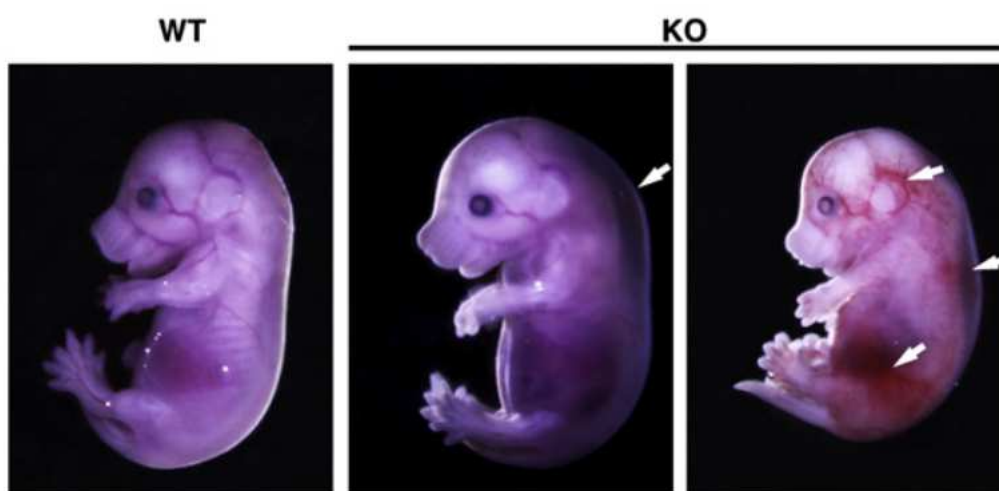


Figure 18 : Anomalies vasculaires suite à l'inactivation de miR-126-3p/miR-126-5p *in vivo*. Embryons de 15,5 jours *miR-126*^{+/+} (WT) et *miR-126*^{-/-} (KO). Les œdèmes et hémorragies induits chez les animaux n'exprimant plus *miR-126-3p* et *miR-126-5p* sont indiqués par des flèches blanches. (Wang et al., 2008)

Les défauts observés *in vitro* et *in vivo* suite à l'inhibition de miR-126-3p/miR-126-5p suggèrent que ces microARNs possèdent des rôles essentiels dans la régulation dans la réponse des cellules endothéliales aux différents stimuli angiogéniques (Tableau 3 (bleu)). En effet, la modulation d'expression de miR-126-3p entraîne une activation directe de la voie de signalisation du FGF ou du VEGF en ciblant les 3'UTRs de deux inhibiteurs de cette cascade, SPRED-1 (*Sprouty-Related EVH1 Domain Containing 1*) et PIK3R2 (*PhosphoInositide-3-Kinase Regulatory subunit 2*) (Figure 19) (Fish et al., 2008; Wang et al., 2008b). Les deux cibles sont directement associées aux phénotypes observés suite à l'inhibition de miR-126-3p. En effet, l'inhibition de SPRED1 réduit les effets de l'inactivation de miR-126-3p sur la migration des cellules endothéliales ou sur leur capacité à former des capillaires dans un modèle d'anneau aortique (Fish et al., 2008; Wang et al., 2008c). De même l'inhibition de la

sous unité de PIK3R2, ou p85 β , simultanément à la sous-expression de miR-126-3p a permis de rétablir une phosphorylation normale de la protéine AKT (*Protein Kinase B*) indiquant un contrôle de cette voie de signalisation par miR-126-3p via PIK3R2 (Figure 19) (Fish et al., 2008). D'autre part, l'analyse de l'inactivation spécifique de miR-126-3p chez le poisson zèbre a permis l'identification d'un autre gène régulé par ce microARN et participant à l'intégrité vasculaire nommé *pak1* (p21-Activated Kinase 1) (Zou et al., 2011). En effet, ce gène est impliqué dans la motilité et la perméabilité endothéliale ainsi que dans l'angiogenèse (Kiosses et al., 1999, 2002; Stockton et al., 2004). La surexpression de PAK1 chez le poisson zèbre induit d'importantes hémorragies similaires à celles observées suite à la double inactivation du duplex. Les données suggèrent alors que le faible taux de PAK1 dans les cellules endothéliales, assuré par la fixation de miR-126-3p sur le 3'UTR de son ARNm, est indispensable à l'intégrité vasculaire (Zou et al., 2011).

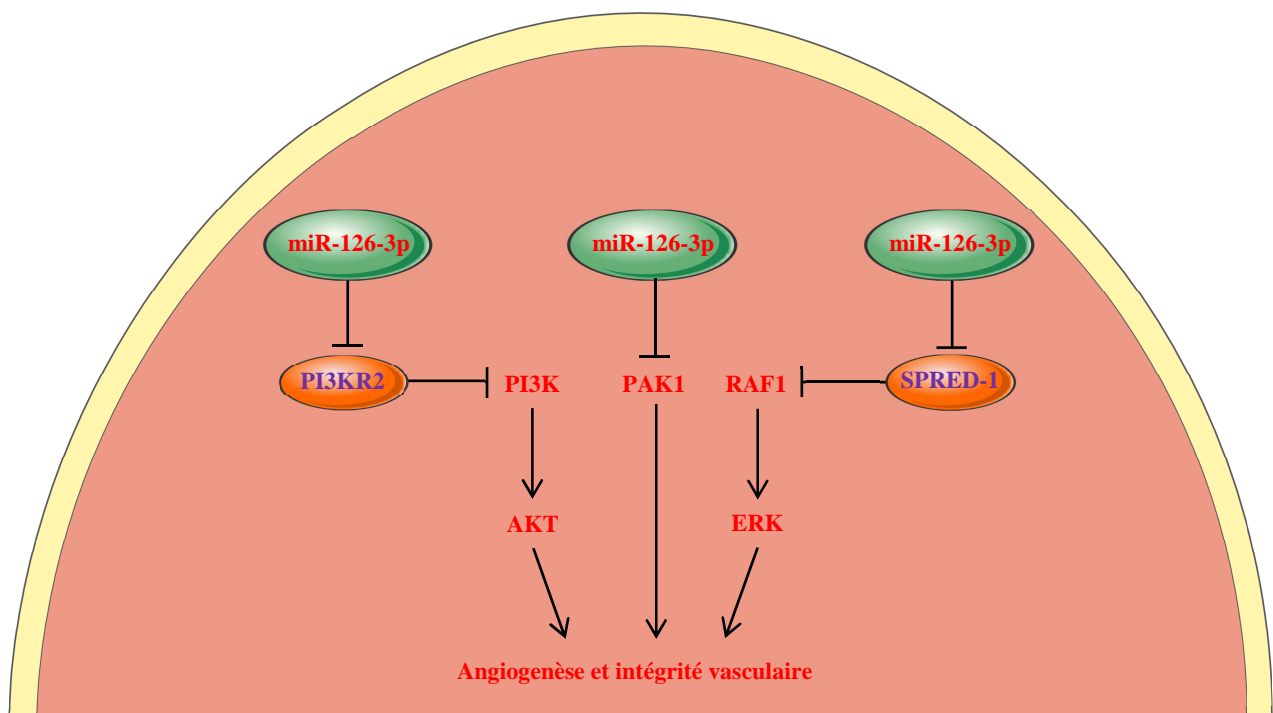


Figure 19 : Fonctions de miR-126-3p au cours de la double inactivation miR-126-3p/-5p. miR-126-3p réprime SPRED-1, PI3KR2 et PAK1, protéines participant à l'angiogenèse et l'intégrité vasculaire in vitro et in vivo.

b. MiR-126-3p/miR-126-5p dans les cellules souches hématopoïétiques et cellules progénitrices endothéliales

Les fonctions de miR-126-3p/miR-126-5p s'étendent au-delà de celles retrouvées dans l'endothélium. Comme décrit précédemment, différents types cellulaires provenant majoritairement de la moelle osseuse présentent aussi une expression de miR-126-3p/miR-126-5p (Grabher et al., 2011; Huang et al., 2011; Ishizaki et al., 2011; Shen et al., 2008). L'expression de miR-126-3p/miR-126-5p a été détectée dans les cellules souches hématopoïétiques CD34⁺ humaines et dans les cellules progénitrices endothéliales après induction de l'érythropoïèse *in vitro* (Huang et al., 2011; Yang et al., 2009) ou après stimulation de la production de cellules de la moelle osseuse à l'aide du G-CSF (*Granulocyte Colony-Stimulating Factor*) (Donahue et al., 2009). A l'inverse, l'expression de miR-126-3p est faible au cours du processus de formation des plaquettes, la mégacaryocytopoïèse (Garzon et al., 2006). La présence de miR-126-3p/miR-126-5p dans les cellules souches hématopoïétiques ainsi que dans les cellules progénitrices endothéliales suggère une fonction pour ces microARNs dans ces différents types cellulaires (Tableau 3 (rouge)) (Figure 20). Shen et ses collaborateurs ont émis l'hypothèse que miR-126-3p pouvait avoir un impact sur l'hématopoïèse en régulant la stabilité de l'ARNm de gènes contenant des boîtes homéotiques, séquences nucléotidiques codant un domaine de fixation à l'ADN (Shen et al., 2008). Cependant, seuls deux gènes contenant des boîtes homéotiques, appelés HOXA3 et HOXA9, contiennent des sites de fixation pour miR-126-3p prédits *in silico* (PicTar, miRanda). Des expériences *in vitro* ont montré que l'inhibition de ce microARN induisait une augmentation de la protéine HOXA9 dans des cellules F9 (cellules de carcinome embryonnaire). A l'inverse, la surexpression de miR-126-3p dans des cellules immortalisées de la moelle osseuse diminue fortement l'expression de la protéine. De plus, dans les lignées cellulaires leucémiques, l'expression de miR-126-3p est inversement corrélée à celle de HOXA9 (Shen et al., 2008). Ces différents résultats suggèrent un rôle pour miR-126-3p dans le contrôle de l'hématopoïèse via une régulation de l'expression de HOXA9. D'autre part, miR-126-3p ainsi que son complémentaire miR-126-5p sont enrichis dans des cellules souches hématopoïétiques humaines (lignée H1) (Huang et al., 2011). La surexpression de miR-126-3p/miR-126-5p dans ces cellules a permis de mettre en évidence la participation du duplex à l'érythropoïèse. En effet, l'analyse de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques suite à la surexpression du duplex a révélé une réduction du nombre de colonies de globules rouges suggérant alors une inhibition de ce mécanisme par le duplex.

L'induction de miR-126-3p/miR-126-5p dans les cellules souches en cours de différenciation entraîne une chute d'expression d'environ 60% de PTPN9 (*Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 9*), protéine essentielle à l'érythropoïèse. La surexpression de PTPN9 simultanément à celle du duplex permet une modeste restauration de l'érythropoïèse suggérant que PTPN9 seul n'est pas suffisant pour inhiber l'action du duplex (Huang et al., 2011). Ce dernier résultat montre que d'autres cibles directes de miR-126-3p ou miR-126-5p exprimées par les hCSH (Cellules Souches Hématopoïétiques humaines) participent à la formation des globules rouges à partir de ces cellules. De façon intéressante, l'inactivation de miR-126-3p chez le poisson zèbre a permis de mettre en évidence une autre cible présente dans les cellules souches hématopoïétiques favorisant l'érythropoïèse, c-Myb (Grabher et al., 2011). La surexpression de ce gène induite par l'inhibition de miR-126-3p *in vivo* entraîne une importante augmentation de l'érythropoïèse dans ce modèle (Grabher et al., 2011). Cependant, le rôle du microARN miR-126-3p au cours de l'érythropoïèse ne s'arrête pas uniquement aux cellules souches hématopoïétiques. En effet, une étude a proposé un modèle complexe selon lequel des cellules mésenchymateuses exprimant miR-126-3p pouvaient réguler la transition entre l'érythropoïèse primitive (processus temporaire et restreint au sac vitellin au cours du développement embryonnaire précoce) et l'érythropoïèse tardive (Sturgeon et al., 2012). Ainsi, miR-126-3p, en inhibant VCAM-1 dans les cellules mésenchymateuses non hématopoïétiques réprime l'activation des kinases src dans les mCSH (Cellules Souches Hématopoïétiques murines) et donc leur maturation en érythrocytes (Figure 20) (Sturgeon et al., 2012). Par ailleurs, Lechman et collaborateurs ont démontré que miR-126-3p participait à l'équilibre quiescence/prolifération des cellules souches hématopoïétiques (Lechman et al., 2012). En effet, l'inhibition de ce microARN induit l'expansion de ces cellules alors que son expression constitutive maintient celles-ci en quiescence et initie la prolifération des cellules progénitrices endothéliales. De plus, l'augmentation de l'expansion des CSH à l'aide de différentes cytokines (Stem Cell Factor, IL-6...) a permis d'observer une atténuation de l'activation de la voie PI3K/AKT en présence de miR-126-3p. A l'inverse, la surexpression de miR-126-3p dans les CSH est associée à une chute de l'activité PI3K/AKT et à un maintien de ces cellules en phase G0. L'activation de cette cascade de signalisation permet aux CSH de sortir de la phase G0 et de démarrer un nouveau cycle cellulaire. Ce mécanisme semble être indispensable au rôle central de miR-126-3p et passerait probablement par les cibles directes du microARN : PIK3R2 et la protéine adaptatrice, CRKII (Lechman et al., 2012). Enfin, très récemment, le niveau d'expression de ce microARN dans les cellules progénitrices endothéliales chez les patients souffrant

d'insuffisance cardiaque ou de pré-éclampsie a révélé que miR-126-3p pouvait être un biomarqueur ou une cible thérapeutique (Qiang et al., 2013; Yan et al., 2013).

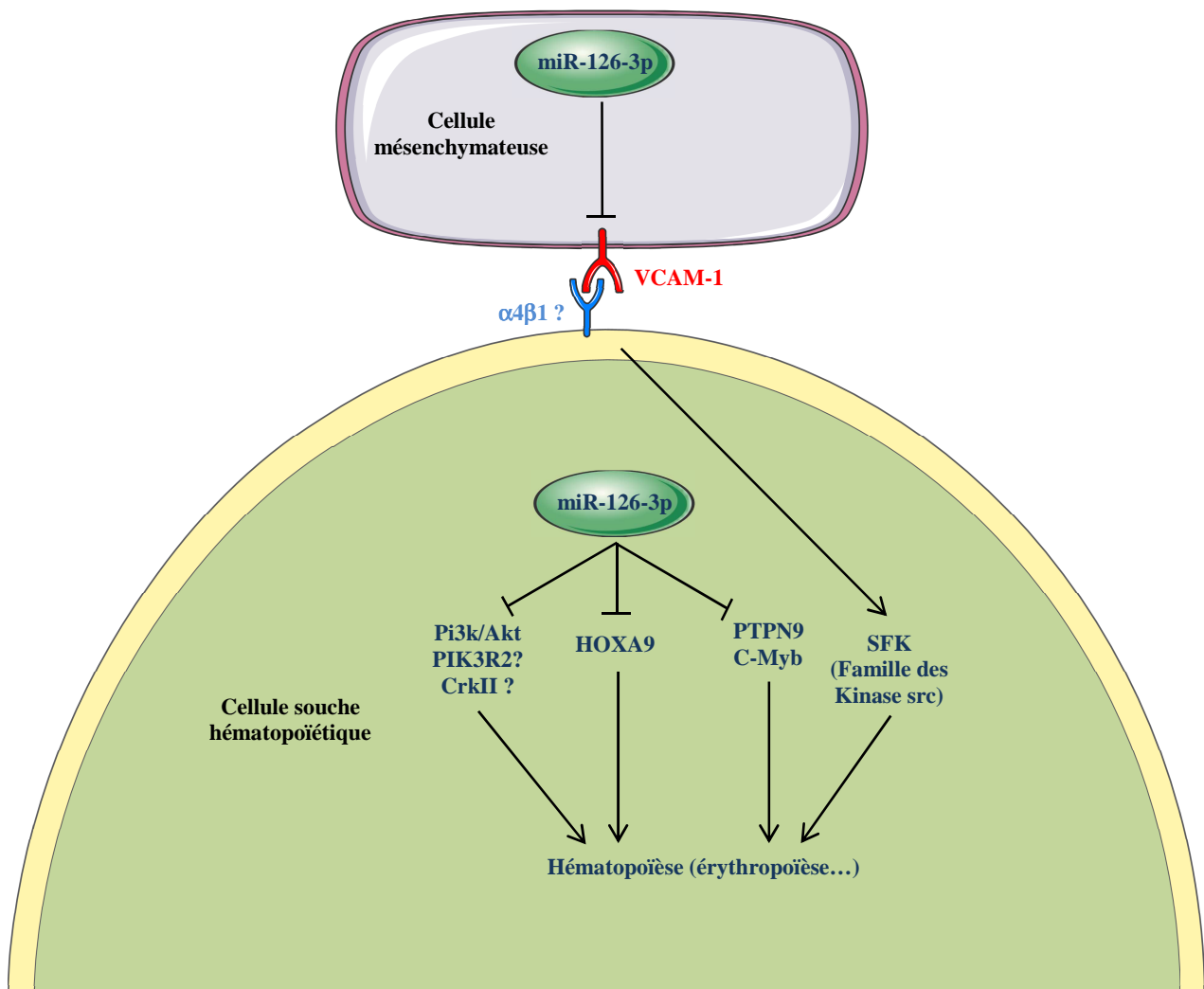


Figure 20 : Fonctions de miR-126-3p sur la physiologie des cellules souches hématopoïétiques.
Régulation des protéines participant à l'hématopoïèse par miR-126-3p.

2. Fonctions pathologiques

a. Rôles de miR-126-3p au cours de l'inflammation

miR-126-3p intervient dans un certain nombre de pathologies inflammatoires (Tableau 3 (vert)) telles que l'asthme chronique (Collison et al., 2011b), les allergies asthmatiformes (Mattes et al., 2009), l'athérosclérose (Zernecke et al., 2009), la rectocolite hémorragique (Feng et al., 2012), la mucoviscidose (Oglesby et al., 2010) et la polymyosite (Kim et al., 2012) au niveau des tissus épithéliaux, musculaires ou endothéliaux et participe au mécanisme de réponse inflammatoire endothéliale (Harris et al., 2008). Cette dernière

étude a démontré que miR-126-3p régulaît directement VCAM-1, protéine majeure de l'interaction entre les cellules endothéliales et les leucocytes (Figure 21). En effet, l'inhibition de ce microARN dans les cellules endothéliales augmente l'expression de VCAM-1 après stimulation par le TNF α , cytokine pro-inflammatoire initiant le processus d'inflammation et l'expression de plusieurs molécules d'adhérence telles que VCAM-1 et ICAM-1. La modulation d'expression de VCAM-1 permet alors une régulation positive de l'action du TNF α sur le recrutement des leucocytes à la surface d'un tapis de cellules endothéliales. A l'inverse, la surexpression de miR-126-3p au cours d'une stimulation au TNF α dans ces cellules induit une chute du recrutement leucocytaire liée à la diminution d'expression de VCAM-1 (Harris et al., 2008).

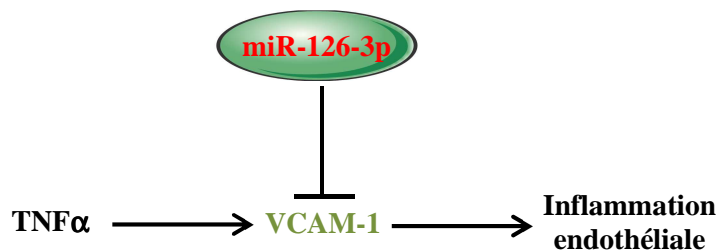


Figure 21 : Fonction de miR-126-3p au cours de l'inflammation endothéliale.

miR-126-3p inhibe l'expression de VCAM-1 induit par le TNF α dans l'endothélium.

- Athérosclérose

miR-126-3p possède un rôle athéroprotecteur en diminuant l'expression de plusieurs protéines favorisant la mise en place de l'athérosclérose (Figure 22). En effet, en considérant les rôles pro-athérogénique du VEGF (Celletti et al., 2001), l'inhibition de cette cascade de signalisation par la surexpression de miR-126-3p permettrait de réduire l'initiation de la pathologie. À cet égard, miR-126-3p régule l'augmentation de l'expression de CXCL12 (*C-X-C motif chemokine 12*) par les corps apoptotiques dérivés des cellules endothéliales (Zernecke et al., 2009). En effet, la fixation de miR-126-3p sur le 3'UTR de RGS16 (*Regulator of G-protein Signaling 16*), inhibiteur de la cascade de signalisation des récepteurs couplés aux protéines G, permet une augmentation de l'activation du récepteur CXCR4 (*Chemokine (C-X-C motif) receptor 4*) initiant une boucle de rétrocontrôle positive permettant l'induction de l'expression de son ligand CXCL12 (Zernecke et al., 2009). En

conséquence, le rôle athéroprotecteur des corps apoptotiques dérivés des cellules endothéliales est modulé par l'augmentation du taux de CXCL12 induisant le recrutement de cellules progénitrices et la protection de l'endothélium. De façon intéressante, miR-126-3p peut aussi cibler directement CXCL12 au niveau de son 3'UTR (van Solingen et al., 2011; Zhang et al., 2013a), cependant, au cours de l'athérosclérose, cette régulation ne semble pas biologiquement significative (Zernecke et al., 2009). D'autre part, le rôle de miR-126-3p sur la régulation de la molécule d'adhérence VCAM-1 (Harris et al., 2008) pourrait aussi contribuer à ce rôle athéroprotecteur en inhibant le recrutement des monocytes responsables des étapes préliminaires de l'athérogenèse. Par ailleurs, l'étude de l'expression de miR-126-3p et miR-126-5p au cours de l'athérosclérose chez l'Homme apporte des données controversées par rapport au modèle murin. En effet, l'expression de miR-126-3p n'est pas significativement modifiée dans les plaques athérosclérotiques humaines suggérant alors que miR-126-3p ne jouerait pas un rôle majeur au cours de cette pathologie. En revanche, l'expression de son complémentaire, miR-126-5p, semble être diminuée au cours des lésions de l'artère carotide (Raitoharju et al., 2011) soulignant l'éventuelle participation de miR-126-5p au cours d'un processus pathologique indépendamment de miR-126-3p.

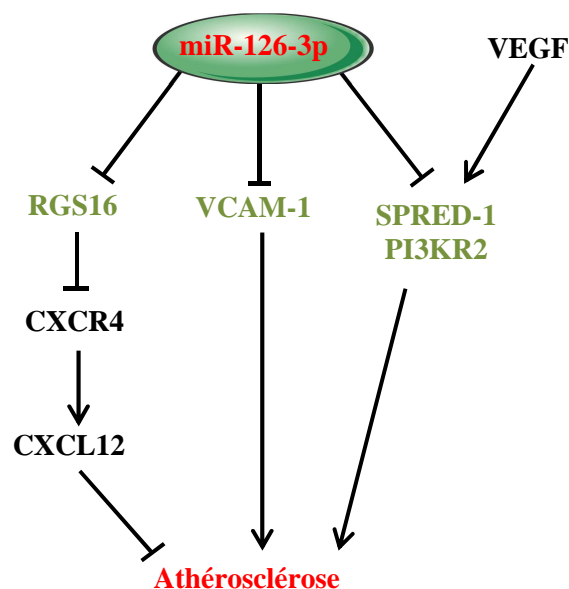


Figure 22 : Fonctions de miR-126-3p au cours de l'athérosclérose.

MiR-126-3p réprime l'expression de plusieurs protéines participant à la mise en place de l'athérosclérose.

- Asthme

miR-126-3p semble être impliqué dans la réponse immunitaire induite par l'asthme. En effet, l'expression de miR-126-3p au niveau de l'épithélium des voies aériennes augmente lorsque des souris sont traitées par l'allergène de l'acarien domestique (HDM) (Mattes et al., 2009). De plus, des injections intranasales d'un inhibiteur de miR-126-3p couplé au cholestérol diminue la réponse immunitaire de type Th2, l'hyper-sensibilité aux bronchospasmes, l'hypersécrétion de mucus, l'inflammation et le recrutement des éosinophiles (hyperéosinophilie) dans les poumons de ces animaux. Ces résultats indiquent l'implication majeure de ce microARN au cours de certaines allergies asthmatiformes (Mattes et al., 2009). D'autre part, l'inhibition de miR-126-3p réduit également l'hyperéosinophilie sanguine dans un modèle de souris souffrant d'asthme chronique. Cependant, miR-126-3p ne semble pas avoir d'impact majeur sur l'inflammation et le remodelage des voies respiratoires également induites chez ces animaux suggérant la participation d'autres régulateurs au cours de cette pathologie (Collison et al., 2011b).

- Autres pathologies inflammatoires.

Plusieurs études ponctuelles ont également mis en évidence des rôles pour miR-126-3p dans quelques pathologies inflammatoires (Tableau 3(vert)) (Figure 23). Par exemple, Feng et collaborateurs ont récemment montré que miR-126-3p et miR-21 étaient fortement exprimés dans les biopsies du colon de patients humains souffrant d'une grave inflammation colique, la rectocolite hémorragique (Feng et al., 2012). Dans cette étude, l'expression de miR-126-3p dans ces tissus est inversement corrélée à celle de $I\kappa B\alpha$, inhibiteur de l'activation de l'inflammation du colon via la voie NF- κB . Ainsi, miR-126-3p favoriserait la rectocolite hémorragique en ciblant un inhibiteur de la voie NF- κB , $I\kappa B\alpha$. Par ailleurs, l'expression de miR-126-3p est faible dans les cellules épithéliales des bronches de patients atteints de mucoviscidose par rapport aux patients sains (Oglesby et al., 2010). La diminution d'expression du microARN est inversement corrélée à celle d'une cible directe du microARN, TOM1 (*Target Of Myb 1*). TOM-1 est une protéine anti-inflammatoire connue dans la littérature pour son rôle dans l'inhibition de plusieurs voies de signalisation telles que celles du TNF- α et de l'IL-1 β (Yamakami and Yokosawa, 2004). A l'inverse de la majorité des différentes pathologies citées précédemment, l'inhibition de miR-126-3p au cours de la mucoviscidose entraîne une augmentation d'expression d'une protéine (TOM-1) ayant un impact majeur sur la protection de l'épithélium bronchique en inhibant des voies de

signalisation inflammatoires (Oglesby et al., 2010). D'autre part, miR-126-3p peut également jouer un rôle dans la polymyosite (Kim et al., 2012). Cette pathologie incurable se caractérise par une inflammation et une dégénérescence des fibres constituant les muscles squelettiques. Lors de l'initiation de celle-ci, Kim et ses collaborateurs ont observé dans des biopsies musculaires, une forte chute d'expression de miR-126-3p corrélée à une augmentation de l'expression de VCAM-1. En revanche, les taux de miR-126-3p et VCAM-1 ne varient plus entre patients malades et sains à des stades plus tardifs de la maladie (Kim et al., 2012).

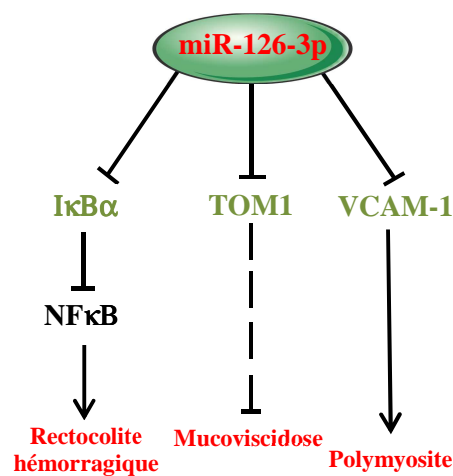


Figure 23 : Fonction de miR-126-3p au cours de diverses maladies inflammatoires.

miR-126-3p réprime l'expression de plusieurs protéines participant à la mise en place d'un certain nombre de pathologies inflammatoires.

b. Rôle de miR-126-3p au cours de la réplication virale

L'implication de miR-126-3p lors de la réplication virale du coxsackievirus B3 (CVB3) responsable d'une atteinte inflammatoire du myocarde différente d'une ischémie, ou myocardite, a été décrite récemment (Figure 24) (Ye et al., 2013). Le virus CVB3 a besoin de la machinerie cellulaire de l'hôte afin de se répliquer mais cause d'importants dommages aux cellules infectées (Hammer et al., 2010). Dans cette étude, la régulation de deux voies de signalisation essentielles pour la réplication du virus par miR-126-3p a été analysée. Tout d'abord, l'activation par CVB3 des protéines ERK1/2 entraîne la phosphorylation des facteurs de transcriptions Ets-1 et Ets-2 induisant l'expression de miR-126-3p. Comme attendu, l'inhibition du microARN ou sa surexpression modulent l'expression de Spred-1 permettant alors l'activation ou l'inhibition d'ERK1/2. Cette boucle de rétrocontrôle positive

« ERK1/2 activation → augmentation de miR-126-3p → ERK1/2 activation » permet alors la réplication du virus CVB3. En parallèle, l'expression de miR-126-3p stimule l'activité de la GSK-3 β (*Glycogen Synthase Kinase 3*), inductrice de la dégradation du coactivateur de la voie Wnt, la β -caténine, en réprimant deux cibles directes, LRP6 (*Low Density Lipoprotein Receptor-related protein 6*) et WRCH1 (*Wnt Responsive Cdc42 Homolog 1*). L'inhibition des deux nouvelles cibles de miR-126-3p sensibilise alors les cellules à la mort cellulaire induite par le virus et permet la libération de celui-ci afin d'infecter de nouvelles cellules voisines. Ces résultats montrent que la surexpression de miR-126-3p au cours d'une infection générée par CVB3 induit une inhibition de Spred-1, LRP6 et WRCH1 favorisant alors la réplication et l'infection du virus dans l'organisme hôte via les 2 voies de signalisation ERK1/2 et Wnt/ β -caténine (Ye et al., 2013).

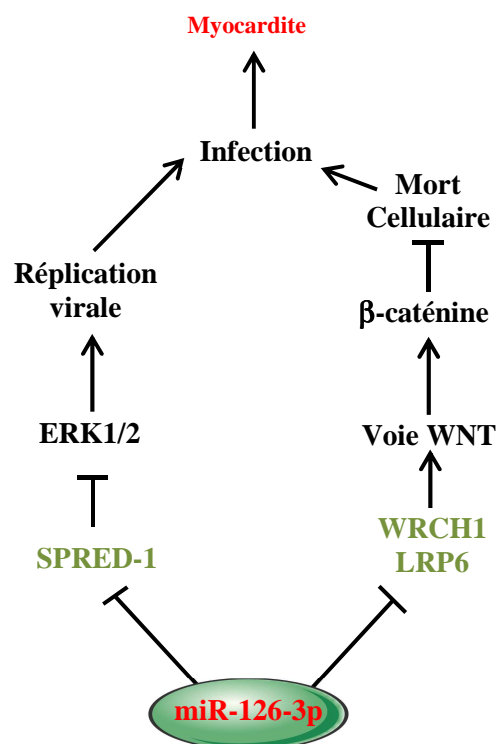


Figure 24 : Fonction de miR-126-3p au cours de la réplication virale.

miR-126-3p réprime l'expression de plusieurs gènes empêchant la mise en place de la réplication virale du coxsackievirus B3 (CVB3) et favorise l'apparition de la myocardite.

c. Rôles du duplex miR-126-3p/miR-126-5p dans le cancer

- miR-126-3p

Au cours des dix dernières années, de nombreuses analyses par microarray ont permis de révéler des différences d'expression pour les microARNs entre les tissus tumoraux et les tissus sains. miR-126-3p fait partie de ces microARNs dont l'expression varie dans les tissus tumoraux. Ce microARN a été étudié dans un premier temps chez des patientes souffrant de cancer du sein (Tavazoie et al., 2008). En effet, l'expression de ce microARN diminue fortement dans les tumeurs cancéreuses mammaires. Le rétablissement de miR-126-3p par infection rétrovirale dans des cellules cancéreuses du sein injectées chez des souris NUDE réduit la croissance tumorale et les métastases pulmonaires et osseuses (Tavazoie et al., 2008). Chez l'Homme, les patientes dont les cellules cancéreuses mammaires présentent une faible expression de miR-126-3p ont une espérance de vie réduite comparées aux patientes ayant des tumeurs cancéreuses du sein où miR-126-3p est encore fortement exprimé (Tavazoie et al., 2008). La perte de miR-126-3p a systématiquement été observée dans un grand nombre de cancers tels que le cancer du côlon (Li et al., 2011b), des poumons (Yanaihara et al., 2006), de la prostate (Saito et al., 2009), de la vessie (Saito et al., 2009), de l'estomac (Feng et al., 2010), du pancréas (Hamada et al., 2012) ou encore dans les mélanomes (Felli et al., 2013) et ostéosarcomes (Namløs et al., 2012) suggérant alors un rôle de suppresseur de tumeur pour ce microARN. Cependant dans les leucémies aigües myéloblastiques, le taux de miR-126-3p est élevé et induit une inhibition de l'apoptose et une augmentation de la viabilité des cellules leucémiques *in vitro* (Li and Chen, 2011; Li et al., 2008). De nombreuses cibles pour miR-126-3p ont été identifiées dans ces différents cancers et soulignent l'impact majeur de ce microARN dans le développement de ces pathologies (Tableau 3 (violet)). Par exemple, Liu et ses collaborateurs ont montré que miR-126-3p se fixait sur la région 3'UTR de l'ARNm du VEGF-A dans différentes lignées de cellules cancéreuses de poumon (A549, Y-90 ou SPC-A1) (Liu et al., 2009). *In vitro*, la restauration de ce microARN dans ces cellules fait chuter l'expression du VEGF-A, et inhibe leurs croissances en stoppant leurs cycles en phase G1. La réexpression forcée de miR-126-3p dans les cellules tumorales A549 réduit de 20% la masse tumorale lorsque ces cellules sont injectées chez des souris NUDE (Liu et al., 2009). De même, le rétablissement de l'expression du microARN dans des lignées cancéreuses gastriques inhibe la prolifération de ces cellules ainsi que la croissance tumorale et la formation des métastases *in vivo*. Cet effet serait régulé en partie par la fixation de miR-126-3p sur la région 3'UTR de l'ARNm de la

protéine adaptatrice CRK (*v-crk Avian sarcoma virus CT10 oncogene homolog*)(Feng et al., 2010). Par ailleurs, Png et ses collaborateurs ont montré que miR-126-3p régulait le recrutement des cellules endothéliales par les cellules métastatiques de cancer du sein *in vitro* et *in vivo* modulant alors l'invasion tumorale (Png et al., 2012). Pour cela, miR-126-3p réprime le recrutement des cellules endothéliales, l'angiogenèse et la colonisation métastatique via l'inhibition directe de l'expression de 3 nouveaux gènes pro-angiogéniques et biomarqueurs des métastases humaines, IGFBP2 (*Insulin-like Growth Factor Binding Protein 2*), PITPNC1 (*Phosphatidylinositol Transfer Protein, Cytoplasmic 1*) et MERTK (*c-Mer Tyrosine Kinase*). Les inhibitions de ces 3 gènes par shARNs chez les souris ayant reçues une injection de cellules de carcinome mammaire (cellules LM2) ont montré une diminution du nombre de métastases dans les poumons comparées aux souris contrôles. De plus, les inhibitions spécifiques par siARN de MERTK, IGFBP2 ou PITPNC1 dans des souris développant le même type de carcinome et n'exprimant plus miR-126-3p ont montré une diminution du nombre de métastases pulmonaires *in vivo* comparées aux souris contrôles. En effet, l'inhibition de miR-126-3p entraîne le clivage des récepteurs MERTK exprimés à la surface des cellules métastatiques favorisant le recrutement des cellules endothéliales en inhibant la fixation de son ligand GAS6 (*Growth Arrest-specific 6*) sur les récepteurs MERTK, inhibiteur du chimiotactisme des cellules endothéliales. D'autre part, l'inhibition de ce microARN implique la protéine sécrétée par les cellules métastatiques, IGFBP2, permettant le recrutement endothélial grâce à la modulation de l'activation du récepteur IGF1R (*Insulin Growth Factor 1 Receptor*) par son ligand IGF1 (*Insulin Growth Factor 1*). La voie de signalisation induite par l'interaction de l'IGF-1 sur son récepteur favorise le chimiotactisme et la migration des cellules endothéliales vers les cellules métastatiques. Par ailleurs, la sécrétion d'IGFBP2 est aussi régulée par la protéine de transfert PITPNC1, cible de miR-126-3p. La surexpression de ces différentes cibles suite à l'inactivation de miR-126-3p *in vivo* augmente le nombre de métastases aux poumons en favorisant : le recrutement endothélial, les interactions entre ces cellules, l'angiogenèse, l'initiation et la colonisation des métastases. Ces différents rôles permettent alors de conclure que ce microARN régule le recrutement des cellules endothéliales et la formation métastatique grâce à la fixation sur les différents 3'UTRs des ARNm cibles de PITPNC1, IGFBP2 et MERTK (Png et al., 2012).

- **miR-126-5p**

De façon identique, la perte de miR-126-5p a aussi été observée dans différents types de cancer comme cités précédemment (partie III.A.2.) (Felli et al., 2013; Kalscheuer et al.,

2008; Watahiki et al., 2011; Zhang et al., 2008) avec, comme pour son complémentaire, une unique augmentation au cours des leucémies aigües myéloblastiques (Li and Chen, 2011; Li et al., 2008). A l'inverse de miR-126-3p, les fonctions spécifiques de miR-126-5p au cours de la tumorigenèse sont très peu détaillées (Tableau 3(violet)). MiR-126-5p pourrait jouer un rôle dans des cellules cancéreuses de la prostate (LNCaP) (Musiyenko et al., 2008). Musiyenko et ses collaborateurs ont montré que la prostéine, protéine surexprimée dans les LNCaP et participant à la migration et à l'invasion de ces cellules, était une cible pour miR-126-5p. La surexpression de miR-126-5p entraîne une chute d'expression de la prostéine dans les cellules LNCaP. Cette régulation permet alors l'inhibition de la migration et de l'invasion des LNCaP suggérant un rôle de suppresseur de tumeur pour miR-126-5p dans ces cellules (Musiyenko et al., 2008). Par ailleurs, l'analyse de poumons de rats traités avec un carcinogène présent dans le tabac (NNK : 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone) a permis de mettre en évidence une chute d'expression de plusieurs microARNs incluant miR-126-5p. De plus, cette chute d'expression de miR-126-5p est associée à une augmentation de CYP2A3 (*Cytochrome P450 2A3*) ; protéine cible pour ce microARN présente dans la chaîne respiratoire de la mitochondrie et participant à la catalyse de l'hydroxylation du NNK et de ses métabolites. L'inhibition de miR-126-5p permettrait une augmentation de l'enzyme CYP2A3 initiant l'effet carcinogène du NNK chez les rats (Kalscheuer et al., 2008).

- Rôles synergiques du duplex

Très récemment, deux études indépendantes ont démontré des fonctions synergiques pour miR-126-3p et miR-126-5p sur des cibles directes identiques associées à la formation des métastases dans le cancer du sein (Zhang et al., 2013a) et dans les mélanomes (Felli et al., 2013) (Tableau 3(violet)). Il a été observé que le duplex miR-126-3p/miR-126-5p réprime indépendamment le recrutement des cellules souches mésenchymateuses et des monocytes inflammatoires dans le stroma de tumeurs cancéreuses mammaires ce qui inhibe le développement des métastases pulmonaires. L'effet du duplex 3p/5p sur le recrutement des cellules souches mésenchymateuses au sein de la tumeur primaire est dû à un contrôle direct de l'expression de la cytokine SDF-1 α (Zhang et al., 2013a) également connue sous le nom de CXCL12 ou MCP-1 (*Monocyte Chemotactic protein-1*). miR-126-3p et miR-126-5p se fixent indépendamment sur le transcrite de SDF-1 α et contrôlent alors son expression de façon synergique. Le contrôle du recrutement des monocytes inflammatoires par le duplex de

microARNs est un processus indirect dû à une régulation négative de CCL2 (Chemokine C-C motif Ligand 2) induite par l'inhibition de SDF-1 α (Zhang et al., 2013a). Le rôle du duplex dans le mélanome est assez similaire à celui précédemment décrit dans le cancer du sein. En effet, l'expression du duplex 3p/5p est faible dans les cellules de mélanome métastatiques et la réinduction de l'expression de miR-126-3p/miR-126-5p dans ces cellules inhibe leurs proliférations et leurs migration/invasion *in vitro* ainsi que leur croissance et leur dissémination *in vivo* (Felli et al., 2013). ADAM9 (*Disintegrin and metalloproteinase Domain-containing protein 9*) et MMP-7 (*Matrix Metalloproteinase-7*) ont été identifiés comme deux cibles du duplex miR-126-3p/miR-126-5p impliqués dans ce processus, ayant un site de fixation actif pour chaque microARN sur leurs 3'UTRs. ADAM9 et MMP-7 étant également mis en jeu dans le clivage protéolytique du précurseur HB-EGF (*Heparin-Binding EGF-like growth factor*), leurs inhibitions suite à l'induction du duplex empêche le clivage de l'HB-EGF ce qui conduit sans doute à une perte d'agressivité de ces cellules (Felli et al., 2013; Miyamoto et al., 2006).

Les connaissances actuelles sur le duplex miR-126-3p/miR-126-5p concernent donc essentiellement miR-126-3p. Quelques fonctions en conditions pathologiques ont été décrites pour miR-126-5p mais aucune donnée n'est actuellement disponible sur les fonctions physiologiques de ce microARN.

Mon travail de thèse a donc consisté en l'étude de l'expression et des fonctions physiologiques de miR-126-5p dans l'endothélium. Dans une première partie, je décrirai les résultats *in vitro* et *in vivo* obtenus sur les différents rôles de miR-126-5p dans les cellules endothéliales. Ensuite, je présenterai les résultats *in vivo* sur les fonctions de ce microARN au cours de la mise en place du réseau vasculaire de la rétine.

RÉSULTATS

Première partie des résultats

miR-126-5p participe au recrutement des leucocytes en régulant l'expression d'ALCAM et SetD5 dans les cellules endothéliales

Les premiers objectifs de ma thèse ont donc été d'établir si miR-126-5p pouvait également être fonctionnel tout comme miR-126-3p, son microARN complémentaire. Pour cela, nous nous sommes tout d'abord intéressés à son expression *in vivo* et *in vitro*. Par hybridation *in situ*, nous avons montré que miR-126-5p était détecté dans les vaisseaux sanguins de la tête d'embryon de souris de 10,5 jours. miR-126-5p a également été détecté dans les organes de jeunes souriceaux avec une expression préférentielle dans les poumons et le cœur. Dans ces différents organes, l'expression de miR-126-5p est majoritairement endothéliale. Nous avons de plus confirmé *in vitro* cette expression préférentiellement endothéliale dans des cellules HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cell*). Nous avons finalement établi que dans ces différents organes ou cellules, miR-126-5p est systématiquement trois fois moins exprimé que miR-126-3p. Afin d'étudier les fonctions de miR-126-5p dans les cellules endothéliales, nous avons inhibé ce microARN dans les HUVEC et analysé les phénotypes induits. Ces différentes expériences ont permis de montrer que miR-126-5p ne participe pas au contrôle de la prolifération, de la migration ou de la capacité de ces cellules à former des capillaires *in vitro*. En revanche, il s'est avéré que miR-126-5p joue un rôle dans le recrutement des leucocytes à la surface des cellules endothéliales. En effet, l'inhibition de miR-126-5p dans les HUVEC induit une chute de l'adhérence des leucocytes et une augmentation de la transmigration de ces cellules à travers un tapis de cellules endothéliales.

Afin d'élucider les voies moléculaires régulées par miR-126-5p pour contrôler ces processus cellulaires, nous avons recherché les cibles de miR-126-5p responsables des deux phénotypes observés. Cette analyse a permis d'identifier ALCAM (*Activated Leukocytes Cell Adhesion Molecule*), un gène déjà connu pour être impliqué dans la transmigration des leucocytes à travers l'endothélium *in vitro* et *in vivo*, comme une cible de miR-126-5p. Après avoir validé le fait qu'ALCAM est bien une cible de miR-126-5p, nous avons démontré que le blocage de la protéine ALCAM, lors de l'inhibition de miR-126-5p dans les cellules endothéliales, ne

permet plus d'observer le phénotype sur la transmigration des leucocytes. Par ailleurs, afin d'identifier la cible de miR-126-5p responsable de la chute d'adhérence observée lors de l'inhibition de ce microARN *in vitro*, une analyse par microarray a été réalisée. Cette étude a permis d'identifier SetD5 (*SET domain containing 5*), dont les fonctions sont inconnues, comme une cible de miR-126-5p. Après avoir validé cette nouvelle cible, nous avons démontré que le rôle joué par miR-126-5p sur l'adhérence des leucocytes était dû à un contrôle de l'expression de SetD5.

Enfin, les expressions de SetD5 et d'ALCAM ont été analysées *in vivo* suite à l'inhibition de miR-126-5p. Dans les poumons, organes où notre microARN ainsi que la protéine ALCAM sont fortement exprimés, nous avons confirmé l'inhibition de miR-126-5p et observé une augmentation d'expression de la protéine ALCAM. De façon inattendue, l'expression de SetD5 n'est pas modifiée dans les poumons suite à l'inhibition du microARN. Afin de déterminer si miR-126-5p régule SetD5 *in vivo*, nous avons inhibé miR-126-5p dans la rétine, organe où SetD5 est fortement exprimé. L'expression de SetD5 dans cet organe est augmentée lors de la chute de miR-126-5p alors que celle de la protéine ALCAM est, quant à elle, inchangée. Ces résultats démontrent que miR-126-5p régule *in vivo* les deux cibles que nous avons identifiées et que cette régulation dépend du tissu analysé.

Le recrutement des leucocytes : un processus régulé par miR-126-5p

Le recrutement des leucocytes est un mécanisme impliqué au cours d'infection, de maladies inflammatoires telles que l'athérosclérose ou au cours de certaines maladies auto-immunes (Luster et al., 2005). Ce mécanisme est constitué de quatre étapes majeures à savoir le roulement des leucocytes à la surface de l'endothélium, l'activation des leucocytes par des chimiokines, l'adhérence ferme contrôlée par des intégrines et la migration transendothéliale (Figure 25).

Le recrutement des leucocytes intervient généralement au niveau des cellules veineuses post-capillaires et débute par un rapprochement des leucocytes, nommé margination, au niveau de l'endothélium (Ley, 1996). La fonction majeure du roulement des leucocytes à la surface de l'endothélium est de freiner ces cellules. Au cours de ce processus, des interactions transitoires et réversibles, contrôlées par des liaisons faibles entre les E- (endothéliale), P- (plaquettaire) et L- (leucocytaire) sélectines et leurs ligands, s'établissent entre les leucocytes et l'endothélium (McEver, 2002). PSGL-1 (*P-Selectin Glycoprotein Ligand 1*), exprimé à la surface des leucocytes, interagit avec les E- et P- sélectines exprimées sur l'endothélium afin de permettre aux leucocytes de « rouler » à la surface des cellules endothéliales. La P-sélectine, stockée dans les corps de Weibel-Palade, a besoin de stimuli inflammatoires afin d'être délocalisée à la surface des cellules endothéliales. La E-sélectine est nouvellement synthétisée suite aux mêmes stimuli (McEver, 2002). En plus de leurs participations aux interactions transitoires et réversibles des leucocytes à l'endothélium, les associations E-sélectine/PSGL-1 et P-sélectine/PSGL-1 sont aussi impliquées dans le ralentissement de ces cellules pour aboutir à leur adhérence ferme aux cellules endothéliales (McEver and Cummings, 1997; Smith et al., 2004). En plus des sélectines, des études ont montré la participation des intégrines, et plus particulièrement l'intégrine- $\beta 2$ LFA-1 (*Lymphocyte Function Antigen-1*) dans les phases finales du processus de roulement (Salas et al., 2004; Zarbock et al., 2007).

Le mécanisme d'activation des leucocytes par des chimiokines se met ensuite en place. Ces chimiokines sont associées à l'endothélium grâce à des interactions avec des glycosaminoglycanes (Kuschert et al., 1999). Des interactions entre les chimiokines et leurs récepteurs vont induire des changements de conformation des intégrines permettant la mise en place d'une adhérence irréversible entre les cellules endothéliales et les leucocytes (Laudanna and Bolomini-Vittori, 2009). Les intégrines majoritaires présentes à la surface des leucocytes sont VLA-4 (*Very Late Antigen-4*), l'intégrine $\alpha 4\beta 7$, Mac-1 (*Macrophage-1*

Antigen) et LFA-1. Elles interagissent avec leurs récepteurs endothéliaux principaux à savoir ICAM-1, ICAM-2 et VCAM-1 (Ley et al., 2007; Yonekawa and Harlan, 2005). Alors que VLA-4 interagit avec VCAM-1, LFA-1 et Mac-1 interagissent avec ICAM-1 et ICAM-2 (Gahmberg et al., 1998; Ley et al., 2007; Yonekawa and Harlan, 2005). Lorsque l'adhérence ferme est établie, les leucocytes vont migrer lentement à la surface de l'endothélium grâce au mécanisme de reptation assuré par les intégrines Mac-1 et LFA-1 jusqu'à atteindre une zone appropriée pour la transmigration endothéliale (Phillipson et al., 2006; Schenkel et al., 2004). La transmigration endothéliale (ou diapédèse) s'établit aux jonctions intercellulaires (voie paracellulaire) ou directement à travers la cellule endothéliale (voie transcellulaire) (Carman and Springer, 2004; Nourshargh and Marelli-Berg, 2005; Shaw et al., 2004). Les paramètres favorisant une voie de transmigration plutôt qu'une autre ne sont pas totalement élucidés cependant il a été suggéré que le niveau de stimulation inflammatoire des cellules endothéliales était mis en jeu dans ce processus (Yang et al., 2005a).

En plus de leur implication dans l'adhérence des leucocytes, ICAM-1 et ICAM-2 peuvent également participer à la migration transendothéliale de ces cellules. Au cours de la diapédèse, ICAM-1 a été identifié dans des structures de type « *cup-like* » à la surface des cellules endothéliales permettant d'entourer les leucocytes afin d'assurer une migration transcellulaire (Carman and Springer, 2004). De plus, ICAM-1 est aussi localisé au niveau des jonctions endothéliales permettant également une transmigration paracellulaire (Shaw et al., 2004). D'autre part, l'implication d'ICAM-2 au cours de la diapédèse a aussi été étudiée à l'aide d'anticorps bloquant ou grâce aux souris déficientes en ICAM-2 (Huang et al., 2006).

Les jonctions adhérentes et serrées des cellules endothéliales sont les barrières majeures de la diapédèse (Bazzoni and Dejana, 2004). La protéine exprimée en majorité au niveau de cette barrière endothéliale est la VE-cadherine. Au cours de la transmigration endothéliale, la VE-cadherine disparaîtrait transitoirement des jonctions endothéliales pour favoriser la diapédèse (Shaw et al., 2001). Les molécules de jonction adhérentes (JAM) et la molécule d'adhérence sélective endothéliale (ESAM) sont également retrouvées au niveau des jonctions serrées des cellules endothéliales (Bradfield et al., 2007; Orlova and Chavakis, 2007; Weber et al., 2007). Un motif conservé contenu dans les protéines JAMs permet des interactions homophiliques (Kostrewa et al., 2001; Santoso et al., 2005). Cependant, les JAMs peuvent aussi interagir avec certaines intégrines. Ainsi, JAM-A, JAM-B et JAM-C interagissent respectivement avec LFA-1, VLA-4 et Mac-1 (Cunningham et al., 2002; Ostermann et al., 2002; Santoso et al., 2002). Les mécanismes exacts par lesquels les protéines JAMs favorisent la transmigration endothéliale requièrent des analyses plus approfondies. Au-delà des liaisons homophiliques

ou hétérophiliques qu'établissent les JAMs, ces protéines, en particulier JAM-C et ESAM, peuvent directement relocaliser la VE-cadhérine en dehors des jonctions adhérentes endothéliales en régulant des voies de signalisation impliquant des petites GTPases (RAP1 ou RhoA) (Orlova et al., 2006; Wegmann et al., 2006). Enfin, PECAM-1 (*Platelet-Derived Cell Adhesion Molecule-1*), exprimé à la surface des plaquettes et des leucocytes ainsi qu'au niveau des jonctions endothéliales (Muller, 2011), crée des interactions homophiliques pour favoriser la migration transendothéliale des leucocytes (Muller et al., 1993). PECAM-1, et probablement d'autres molécules d'adhérence, seraient intégrés à des vésicules nommées LBRC. Celles-ci migreraient vers les zones d'adhérence pour y accumuler les protéines adhérentes (Mamdouh et al., 2003, 2009). En plus des protéines classiquement impliquées dans la transmigration endothéliale, la protéine ALCAM a également été associée à ce processus.

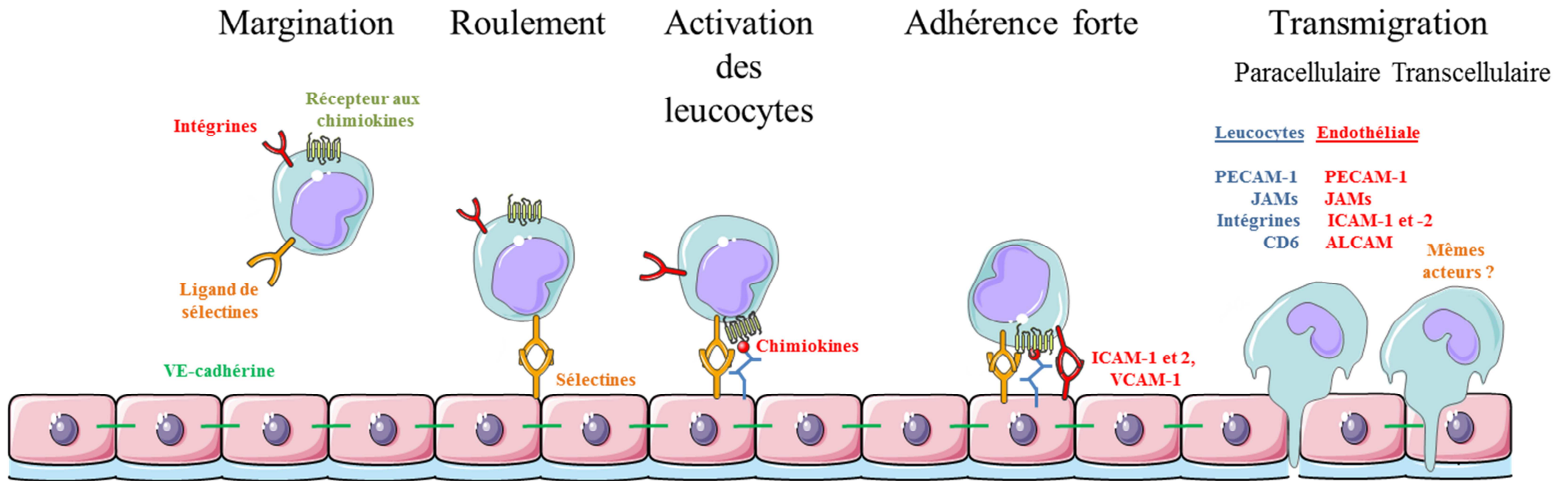


Figure 25 : Schéma général des interactions protéiques établies au cours du recrutement des leucocytes.

Les leucocytes établissent des interactions faibles afin de se déplacer à la surface de l'endothélium. Ensuite, l'activation de ces cellules par le biais de chimiokines permet l'initiation d'une adhérence forte et définitive avec les cellules endothéliales. Enfin, les leucocytes entament le processus de transmigration afin de migrer au travers de l'endothélium soit par voie paracellulaire (via les jonctions cellulaires) ou transcellulaire (directement au travers de la cellule)

ALCAM, cible de miR-126-5p participant à la transmigration des leucocytes à travers l'endothélium

ALCAM a été découvert dans de nombreux organismes et est, de ce fait, connu dans la littérature sous plusieurs dénominations incluant ALCAM/CD166 (Bowen et al., 1995), BEN (Bursal epithelium and neurons) (Pourquié et al., 1990), SC1 (Johnston et al., 1990), KG-CAM (Peduzzi et al., 1994), DM-GRASP (Burns et al., 1991), Neuroline (Paschke et al., 1992), SB10 (Bruder et al., 1998) ou encore MEMD (*Human Melanoma Metastasis clone D*) (Degen et al., 1998). Sous la dénomination BEN (*Bursal Epithelium and Neurons*), la protéine ALCAM a, tout d'abord, été identifiée chez le poulet (Pourquié et al., 1990). Pour cela, Pourquié et ses collaborateurs ont synthétisé des anticorps contre l'épithélium de la bourse de Fabricius, organe lymphoïde présent uniquement chez les oiseaux. L'épithélium de la bourse de Fabricius d'embryon de 15 jours a été séparé des cellules hématopoïétiques puis greffé dans une rate de souris âgée de 3 mois. Les splénocytes purifiés ont ensuite été fusionnés avec des cellules de myélome S2P0 et les surnageants des cultures d'hybridome ont été utilisés afin de réaliser différentes immunohistochimies. Ces dernières ont permis d'identifier une glycoprotéine membranaire de 95 à 110 kDa présente spécifiquement à la surface d'un sous-ensemble de neurones dans le système nerveux central et périphérique (Pourquié et al., 1990). Des travaux ultérieurs issus du même laboratoire ont montré que la protéine BEN était exprimée par des tissus dérivant des trois feuilletts embryonnaires (Pourquié et al., 1992). En effet, il existe une forme épithéliale de 110 kDa, une forme hématopoïétique de 100 kDa et une forme neuronale de 95 kDa (Pourquié et al., 1992). Chez la souris, ALCAM a été cloné et caractérisé comme étant un ligand transmembranaire du récepteur CD6 de la famille des SRCR (*Scavenger Receptor Cystéine-Rich*) présent à la surface de divers leucocytes (Bowen et al., 1995). La liaison d'ALCAM avec CD6 est très largement décrite dans la littérature (Bajorath et al., 1995; Bowen et al., 1996; Skonier et al., 1997; Whitney et al., 1995). Dans le système immunitaire, cette interaction est indispensable pour une activation optimale des lymphocytes T ainsi que pour l'induction de la prolifération des cellules dendritiques (Hassan et al., 2004; Zimmerman et al., 2006). Par ailleurs, de nombreuses études ont démontré qu'ALCAM est lié au cytosquelette grâce au domaine cytoplasmique de la protéine et que cette liaison est nécessaire à la formation d'interaction homophile ALCAM-ALCAM (Nelissen et al., 2000). Des travaux ultérieurs ont démontré que cette interaction homophile était associée à une activation de petites GTPases telles que RhoA (*Ras homolog gene family member A*), Rac-1 (*Ras-related C3 botulinum toxin*

substrate 1) ou encore Cdc42 (*Cell division control protein 42 homolog*) (Zimmerman et al., 2004). De plus, la protéine kinase C (PKC) participe aussi à cette interaction car son inhibition empêche la formation des liaisons homophiliques mais aussi hétérophiliques ALCAM-CD6 (Zimmerman et al., 2004). D'autre part, plusieurs études ont montré des liens fonctionnels entre ALCAM et les cadhérines, famille majeure de molécules d'adhérence décrites dans la littérature comme associées au cytosquelette via leurs partenaires intracellulaires appelés les caténines. En effet, Tomita et collaborateurs ont utilisé un panel de cellules cancéreuses de la prostate (DU-145, TSU-pr1, ALVA-31) n'exprimant pas le gène codant pour l' α -caténine afin de montrer une relocalisation d'ALCAM et de la E-cadhérine, du cytoplasme vers la membrane, suite à la surexpression d'un membre de la famille des caténines (Tomita et al., 2000). Dans des cellules endothéliales microvasculaires de poumon (PMVECs), ALCAM se co-localise avec une autre cadhérine, la VE-cadhérine (Ofori-Acquah et al., 2008). En outre, cette étude a identifié aux jonctions adhérentes des PMVECs, un complexe multi-protéique incluant ALCAM, la N-cadhérine et la VE-cadhérine. L'importance de ce complexe est démontré lors de l'administration d'anticorps dirigés contre la VE-cadhérine chez la souris entraînant le développement d'hémorragies suite, probablement, au désassemblage du complexe (Corada et al., 1999). Par ailleurs, Sayner et ses collaborateurs ont isolé des radeaux lipidiques membranaires de PMVECs contenant la N-cadhérine et la E-cadhérine associées à ALCAM (Sayner et al., 2011). En revanche, l'expression de la VE-cadhérine est exclue de ces radeaux ce qui ne s'accorde pas avec les données d'Ofori-Acquah et collaborateurs.

ALCAM est une protéine exprimée dans diverses cellules et participe donc à de nombreux processus biologiques tels que la neurogenèse (Avci et al., 2004; Diekmann and Stuermer, 2009; Laessing et al., 1994; Ott et al., 2001; Pollerberg and Mack, 1994; Sekine-Aizawa et al., 1998), l'hématopoïèse (Cortés et al., 1999; Nelissen et al., 2000; Ohneda et al., 2001), l'ostéogenèse (Arai et al., 2002; Bruder et al., 1998), la lymphangiogenèse (Iolyeva et al., 2013), la diapédèse des monocytes à travers l'endothélium (Masedunskas et al., 2006) ainsi que la tubulogenèse vasculaire (Ohneda et al., 2001). Pourtant, l'inactivation par recombinaison homologue du gène *ALCAM* chez la souris ne montre aucun phénotype majeur (Weiner et al., 2004). Néanmoins, l'étude approfondie du système nerveux de ces souris a indiqué des défauts de fasciculation des cellules ganglionnaires de la rétine et des motoneurones associés à des régions dysplasiques où se développent des invaginations et où sont anormalement détectés des photorécepteurs (Weiner et al., 2004). D'autre part,

l'inactivation du gène *ALCAM* chez le poisson zèbre a montré plusieurs anomalies dans la différenciation de la crête neurale donnant lieu à d'importantes altérations de développement du cartilage (Choudhry et al., 2011).

En plus de son implication majeure au cours de la neurogenèse, *ALCAM* participe à différents mécanismes endothéliaux. En effet, *ALCAM* contribue à la formation de la lumière des capillaires sanguins (Ohneda et al., 2001), à l'invasion des vaisseaux dans le cartilage (Arai et al., 2002) et à la transmigration endothéliale (Masedunskas et al., 2006). En effet, Masedunskas et ses collaborateurs ont montré que le blocage d'*ALCAM* à l'aide d'une protéine recombinante inhibe la transmigration des monocytes (THP-1, HL-60) à travers un tapis de PMVECs. En revanche, *ALCAM* ne joue aucun rôle dans la migration des monocytes ou dans leur adhérence aux cellules endothéliales (Masedunskas et al., 2006). De plus, l'expression d'*ALCAM* est retrouvée au niveau des jonctions des cellules endothéliales, ce qui lui confère une localisation optimale pour la régulation de la diapédèse. D'autre part, *ALCAM* joue un rôle important dans le passage des lymphocytes T CD4⁺ et des monocytes/macrophages à travers la barrière hémato-encéphalique *in vitro* et *in vivo*. En effet, *ALCAM* est retrouvé au niveau des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique et est surexprimé lors de pathologies diverses telles que la sclérose en plaques. Simultanément à la surexpression d'*ALCAM*, le nombre de leucocytes infiltrés à travers la barrière hémato-encéphalique est très fortement augmenté dans le système nerveux central. L'inhibition d'*ALCAM* dans un modèle d'encéphalomyélite permet de conclure sur son implication majeure lors de la migration des lymphocytes T CD4⁺, B CD19⁺ et des monocytes CD14⁺ à travers la barrière hémato-encéphalique (Cayrol et al., 2008).

Enfin, *ALCAM* est aussi utilisé comme marqueur des métastases cancéreuses dans plusieurs types de cancer. En effet, la protéine a tout d'abord été identifiée comme un marqueur des métastases de mélanome du fait de sa présence dans des cellules à pouvoir métastatique comparées à des cellules de mélanomes non invasives (Degen et al., 1998). L'expression d'*ALCAM* dans les cellules métastatiques a également été détectée dans le cancer de la prostate (Kristiansen et al., 2005), du sein (Davies et al., 2008; King et al., 2004), du colon (Weichert et al., 2004) ou de l'œsophage (Ofori-Acquah and King, 2008; Verma et al., 2005). Cependant, les fonctions potentielles d'*ALCAM* dans la formation des métastases restent inconnues à ce jour. Néanmoins, la formation d'interactions homophiliques *ALCAM*-*ALCAM* dans les cellules de mélanome invasives permet à ces dernières de former des petits amas cellulaires (Degen et al., 1998).

SetD5 : un gène inconnu comme cible de miR-126-5p

Les fonctions de SetD5, seconde cible identifiée pour miR-126-5p, sont totalement inconnues. Seule une étude suggère la participation de ce gène dans un syndrome très rare de délétion interstitielle sur le chromosome 3 (Kellogg et al., 2013). En effet, SETD5 est présent dans une région de délétion de 124kb du chromosome 3 tout comme deux autres gènes : THUMPD3 (*THUMP Domain 3*) et LOC440944.

L'appellation SETD5 provient directement de la présence d'un domaine SET dans ce gène. Les domaines SET, composés de 130 à 160 acides aminés, sont contenus dans de nombreuses histone lysine methyl-transférases (HKMT) (Jones and Gelbart, 1993; Stassen et al., 1995; Tschiersch et al., 1994). Ces protéines interviennent majoritairement dans la méthylation, spécifique à chaque protéine à domaine SET, de six résidus de lysine localisées sur les histones H3 et H4 avec une exception pour EZH2 (*enhancer of zeste homolog 2*) qui méthyle aussi la lysine 26 de l'histone H1 (H1K26) (Kuzmichev et al., 2004). Il existe différentes protéines humaines classées en plusieurs familles possédant une activité d'histone lysine methyl-transférase. SetD5 n'est pas encore référencé mais pourrait appartenir à la famille SetD des protéines à activité d'histone lysine méthyl transférase. Deux membres majeurs de ce groupe, nommés SETD1A (ou SET1) et SETD1B (ou SET1B), méthylent la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4) seulement si la lysine 9 du même histone (H3K9) est déjà méthylée ; Ceci afin de permettre la formation et le maintien de l'hétérochromatine (Rea et al., 2000). En plus des nombreux processus physiologiques (formation de l'hétérochromatine, régulation transcriptionnelle) régulés par la méthylation de ces résidus par les protéines à domaine SET, d'importantes pathologies comme le cancer sont aussi contrôlées par ces protéines (Schneider et al., 2002). Par exemple, les expressions d'EZH2 et MLL2 (*Histone-Lysine N-Methyltransferase*), issus de la même famille que les protéines SET1, sont augmentées dans de nombreuses lignées de cellules tumorales (Huntsman et al., 1999; Visser et al., 2001).

miR126-5p repression of ALCAM and SetD5 in endothelial cells regulates leukocyte adhesion and transmigration.

Loïc Poissonnier, Gaëlle Villain, Fabrice Soncin, and Virginie Mattot

CNRS, UMR8161, Institut de Biologie de Lille,
Institut Pasteur de Lille, Université Lille-Nord de France,
1 rue du Pr Calmette 59021 Lille Cedex, France.

Running title : miR126-5p regulates ALCAM & SetD5 in endothelial cells

Corresponding author : Virginie Mattot, CNRS, UMR8161, Institut de Biologie de Lille,
Institut Pasteur de Lille, Université Lille-Nord de France, 1 rue du Pr Calmette 59021 Lille
Cedex, France. Tel : 00 33 3 20 87 11 18 ; Fax : 00 33 3 20 87 11 11 ; e-mail :
virginie.mattot@ibl.fr

Word Count: 5750

Abstract:**Aims:**

miR126-5p is processed from the miR126-3p/-5p duplex which gives rise to the guide miR126-3p and passenger miR126-5p strands. miR126-3p has prominent roles in vascular development and diseases but the expression and physiological functions of miR126-5p are still unknown. The purpose of this study was to evaluate the expression and role of miR126-5p in blood vessel endothelial cells.

Methods and Results:

We found that miR126-5p is mostly expressed in blood vessel endothelial cells *in vivo* and *in vitro*. Gain- and loss-of-functions approaches revealed that miR126-5p promotes leukocyte adhesion and represses leukocyte transendothelial migration. ALCAM, an adhesion molecule involved in leukocyte transendothelial migration, and SetD5, a gene with previously unknown functions, were identified as two distinct target genes of miR126-5p in endothelial cells. Using either blocking antibody or target protectors which specifically disrupt the miRNA/mRNA target pairing, we showed that miR126-5p promotes leukocyte adhesion by controlling the expression of SetD5 while it represses transendothelial migration through ALCAM. Finally, we demonstrated that miR126-5p controls ALCAM and SetD5 expression *in vivo* but does not regulate both target genes simultaneously in the same tissues.

Conclusion:

miR126-5p is a functional, endothelial-enriched microRNA that participates in the control of leukocyte trafficking by regulating the expression of ALCAM and SetD5.

Keywords: miRNA, miR126-5p, endothelium, leukocyte trafficking

Introduction

The endothelium forms the interface between blood and tissues and dynamically controls the local extravasation of immune cells from the circulation into inflamed tissues. In response to inflammatory cytokines, the resting endothelium becomes activated and expresses adhesion molecules such as E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 which favour the rolling and firm adhesion of immune cells¹. Trans-endothelial migration (diapedesis) is then mediated by specific molecules located at the endothelial cell junction such as JAM, ESAM, PECAM-1, VE-cadherin and activated leucocyte cell adhesion molecule (ALCAM)². ALCAM is a cell adhesion molecule which mediates homo- and heterotypic interactions with the T-cell antigen CD6³. ALCAM is expressed by various cell types including microvascular endothelial cells⁴⁻⁶ where it participates in endothelial tube formation⁶, monocyte transendothelial migration⁵ and leukocyte trafficking across the blood brain barrier⁴.

MicroRNAs (miRNAs) are 21-23 nucleotide-long non-coding RNAs which repress protein expression by binding to a complementary sequence of their target mRNAs, leading to mRNA degradation or translation inhibition⁷. miRNA are major regulators of gene expression in most biological and pathological processes⁸ such as in vascular biology, either promoting or repressing angiogenesis⁹. miR126-3p is a key regulator of embryonic angiogenesis, as both its knockdown in zebrafish and its knockout in mice lead to significant vascular defects^{10, 11}. miRNA expression profiling identified miR126-3p as the most highly expressed miRNA in endothelial cells^{10, 12}. In addition to its involvement in physiological angiogenesis^{10, 11, 13, 14}, in ischemia-induced angiogenesis^{15, 16} and in erythropoiesis^{17, 18}, miR126-3p is also associated with several pathological processes^{12, 19-26}. miR126-3p and its complementary analog miR126-5p derive from the miR126-3p/-5p duplex which is processed from intron 7 of the *egfl7* gene^{10, 11}. It was initially assumed that among miRNAs generated from a miRNA duplex, only the strand with weaker 5'-terminal thermo-stability (guide strand, miR-3p or miR) would accumulate in cells and be functional, while the passenger strand (miR-5p or miR*) would be degraded and support no function²⁷. This initial model for miRNA maturation contributed to the very limited number of studies performed on miR126-5p^{26, 28} and led to underestimate the physiological functions of this miRNA.

Here, the goal was to evaluate whether miR126-5p is a functional endothelial miRNA, to characterize its target genes and physiological functions.

Methods:**Reagents:**

Anti-mouse ALCAM antibody, recombinant control-Fc and human ALCAM-Fc were from R&D. Mouse monoclonal anti-human ALCAM (clone MOG/07) was from Novocastra. LNA control, miR126-5p inhibitors, LNA SetD5, and ALCAM target protectors were from Exiqon (Table S1). Mimic microRNA control, 126-3p and 126-5p were from Dharmacon.

Whole mount *in situ* hybridization:

After pregnant mouse euthanasia by cervical dislocation, embryos were harvested, fixed and treated with Proteinase K. After a pre-hybridization step, embryos were incubated overnight in hybridization buffer containing miR126-3p- or miR126-5p -5' and -3' digoxigenin labelled probes. After Washes, embryos were then incubated with the alkaline phosphatase conjugated anti-Digoxigenin antibody, washed and stained with NBT and BCIP. Embryos were photographed under binoculars.

Isolation of CD31 positive cells:

Mouse lungs and hearts were harvested from mouse pups previously sacrificed by decapitation. Tissues were washed in PBS and minced before digestion with type I collagenase and DNase I. Cells were then incubated with magnetic beads previously coated with anti-CD31 antibody. CD31⁺ cells were isolated following the manufacturer's instructions. Isolated cells were centrifuged and suspended in Trizol for total RNA isolation and RT-qPCR analysis.

Cell culture and transfection:

HUVEC endothelial (Lonza), COS-7 (Cell line service) and THP-1 cells were cultured following manufacturers' instructions. Primefect siRNA (Lonza) and Dharmafect DUO (Dharmacon) transfection reagents were used to transfect HUVEC and COS-7 cells, respectively.

RNA quantification:

Relative quantification were performed using Taqman gene expression master mix and specific Taqman probes using a StepOne system. miRNA and mRNA expression levels were normalized to U6 or β actin, respectively, using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. For absolute quantification, standard curves were generated using known amounts of miRNA.

Adhesion or transendothelial migration of monocytes to endothelial cells:

Endothelial cells were seeded in opaque 96-well plates or on 3 µm pore-size HTS Fluoroblock inserts (Falcon), transfected with miRNA inhibitors and grown to confluence. THP-1 cells were labeled with calcein-AM, plated onto transfected HUVEC cell monolayers and allowed to adhere or transmigrate. Adherent or transmigrated monocytes were detected using a bottom reading fluorescent plate reader. Experiments were carried out in triplicate. Four wells were analyzed per condition in each experiment.

Inhibition of miR126-5p *in vivo*:

Cholesterol-conjugated LNA miRNA inhibitors (10mg/kg) were intraperitoneally injected daily in new born pups from OF1 mice (Charles River). Pups were sacrificed two days later by decapitation, hearts and lungs harvested and lysed in Trizol or RIPA buffer for further analysis. Experiments were performed 3 times, 4 to 8 pups were injected per experiment and per condition. Subretinal injections were performed by injecting 0.5µl of cholesterol-conjugated LNA miRNA inhibitor (1mg/ml) as described in²⁹. Six retinas were injected per experiment and per condition. VM has a level I Animal Experimentation diploma and an authorization to perform animal experiments (#59-35066) delivered by the Prefecture de la Region Nord/Pas de Calais.

Statistics:

For each experiment, data were collected at least in triplicates. The Student-t test was used to calculate the p value (*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$).

Results:

miR126-5p is expressed in the endothelium of mouse and human organs:

The expression pattern of miR126-5p in normal tissues is not known. Since miR126-3p and miR126-5p derive from a duplex embedded in the endothelial-specific *egfl7* gene^{10, 11}, we assessed whether miR126-5p was expressed in blood vessels *in vivo*. Using whole mount *in situ* hybridization, miR126-5p was detected in the major embryonic cranial vessels of 10.5 day-old mouse embryos at the same location as miR126-3p (Fig. 1A). In various mouse pup (Fig. 1B) and adult (not shown) organs, miR126-5p showed higher expression levels in lungs and the heart. Absolute quantification revealed that miR126-5p was approximately twice as less abundant than miR126-3p in these tissues (Fig. S1A, B). In order to specifically assess the levels of expression of miR126-5p in endothelial cells, CD31⁺ cells were purified from mouse hearts and lungs and analysed for miR126-5p expression. miR126-5p was enriched 20- to 24-times in CD31⁺ cells when compared to CD31⁻ cells, indicating that in these organs, miR126-5p is mostly expressed in endothelial cells (Fig. 1C). The predominant pulmonary and cardiac expression of miR126-5p was also confirmed in human adult tissues (Fig. 1D). Thus, these data show that miR126-5p is not a degraded product since it accumulates at significant levels in embryonic and adult tissues under normal conditions, mainly in endothelial cells.

miR126-5p is involved in leukocyte adhesion and trans-endothelial migration:

High expression levels of miR126-5p were maintained in endothelial cells *in vitro* when compared to other cell types (Fig. 1E). In endothelial cells, miR126-5p was 3-times less expressed than miR126-3p (Fig. S1C), in good correlation with the ratio of expression of these miRNAs measured *in vivo* (Fig S1A, B).

To study the role of miR126-5p in endothelial cells, we used gain- and loss-of-function approaches using either miRNA mimics or Locked Nucleic Acid- (LNA-) modified miRNA inhibitors. The efficiency and specificity of these tools were verified by RT-qPCR after transfection in HUVEC (Fig 1F, G). miR126-5p gain- or loss-of function did not affect the proliferation of HUVEC, neither their migration, nor their ability to form pseudo-capillaries on Matrigel *in vitro* (Fig. S2), indicating that miR126-5p does not play a major role in these endothelial functions, on the contrary to miR126-3p^{10, 11, 13}. Since *Egfl7*³⁰ and miR126-3p¹² are both involved in leukocyte trafficking, we investigated whether miR126-5p played a role in this process. Fluorescently-labelled human THP-1 monocytes were used as a model of leukocyte adhesion and trans-endothelial migration through HUVEC monolayers.

Interestingly, when miR126-5p was repressed in endothelial cells, the adhesion of monocytes decreased 38% when compared to control cells. Accordingly, miR126-5p overexpression in endothelial cells increased monocyte adhesion by 40% (Fig. 2A). On the other hand, the ability of monocytes to migrate through endothelial monolayers increased 31% when miR126-5p was repressed in endothelials while this effect was reversed when miR126-5p was overexpressed in these cells (Fig. 2B).

miR126-5p controls leukocyte transendothelial migration by regulating ALCAM:

In order to identify the mechanisms by which miR126-5p controls leukocyte trafficking across the endothelium, we searched through computer databases for potential mRNA transcripts that could be regulated by miR126-5p and which were already known to play a role in this process. ALCAM was an interesting predicted target for miR126-5p because it was previously involved in monocyte diapedesis *in vitro*⁵. A perfect pairing between nucleotides 2 to 8 of miR126-5p (seed site) and the mouse ALCAM 3'UTR was predicted (Fig. 3A) and this target site is perfectly conserved in mammals (Fig. 3B).

To establish whether miR126-5p could directly regulate ALCAM expression, a reporter vector was constructed where the mouse ALCAM 3'UTR was cloned downstream of the luciferase gene. When miR126-5p was co-transfected with this reporter vector, the luciferase activity decreased by 40% as compared to control (Fig. 3C) and mutation of the identified miR126-5p target site relieved this effect (Fig. 3D). ALCAM is specifically expressed by HUVEC at cell junctions, as revealed by RNA interference and immunofluorescence analyses (Fig. S3, AB). The knockdown of miR126-5p in HUVEC increased the expression of ALCAM protein 1.6 times while the overexpression of miR126-5p decreased ALCAM expression by 40% (Fig. 3E). In addition, inhibition of endogenous miR126-5p induced an accumulation of ALCAM at endothelial cell junctions whereas miR126-5p overexpression resulted in a strongly reduced detection of ALCAM (Fig. 3F), altogether showing that ALCAM is an endogenous target gene of miR126-5p in endothelial cells.

To determine whether ALCAM participates in the effects of miR126-5p on leukocyte trafficking, adhesion and migration of monocytes through an endothelial monolayer that had been transfected with the miR126-5p inhibitor was analysed after treatment with an ALCAM-Fc blocking antibody. Adhesion was reduced by 30% when miR126-5p was repressed in endothelial cells and this effect was not affected by the presence of the ALCAM-Fc (Fig. 4A). On the other hand, the presence of the ALCAM blocking antibody abolished the effects of

miR126-5p on leukocyte transmigration (Fig. 4B). To confirm these results, a target site protector^{31, 32} was designed for ALCAM as an LNA antisense oligonucleotide that binds to the miR126-5p target site identified in the ALCAM transcript in order to specifically protect ALCAM expression from miR126-5p. Indeed, the ALCAM target protector induced an up-regulation of ALCAM protein in HUVEC (Fig. 4C) without modifying the expression of miR126-5p or CXCL12, a recently identified target of miR126-5p²⁶ (Fig. S3C). Interestingly, when transfected in HUVEC, this ALCAM target protector did not affect the adhesion of monocytes to endothelial cells (Fig. 4D) but it did favour their transendothelial migration (Fig. 4E), confirming that the endogenous repression of ALCAM by miR126-5p in endothelial cells specifically leads to a repression of leukocyte transendothelial migration.

miR126-5p controls leukocyte adhesion to endothelium by regulating SetD5:

Except for ALCAM, computer databases did not predict any other miR126-5p target gene known to be involved in leukocyte trafficking through the endothelium. In order to identify such targets, a comparative microarray analysis was performed on HUVEC where miR126-5p had been knockdown. Of the common transcripts identified in the three cell lots used, 16 transcripts corresponding to 9 LincRNA (not shown) and 7 coding RNA had more than 1.5-fold change of expression after inhibition of miR126-5p (Fig. S4A, B). Among these, the unknown gene *SetD5* was considered to be the most interesting candidate after RT-qPCR validation, as it was the sole transcript among those tested which was consistently up-regulated in all HUVEC lots (Fig. S4C). Furthermore, when analysing the *SetD5* gene sequence, a perfect match was found between the seed site of miR126-5p described above and the 3'UTR sequence of *SetD5* (Fig. 5A). The complementary sequences between miR126-5p and the 3'UTR of *SetD5* are totally conserved from lizard to mammals, suggesting that this target site could be functional (Fig. 5B). Indeed, co-transfection of miR126-5p with a reporter vector where the 3'UTR of *SetD5* was cloned downstream the luciferase gene induced a 35% decrease of luciferase activity when compared to control (Fig. 5C). This effect was dependent on the target site recognised by miR126-5p into the 3'UTR of *SetD5* because the mutation of this site abolished the repression exerted by miR126-5p (Fig. 5C). Furthermore, in HUVEC, the inhibition of endogenous miR126-5p induced a significant up-regulation of *SetD5* expression (Fig. 5D) while overexpression of this microRNA repressed *SetD5* expression (Fig. 5E), confirming that the levels of endogenous *SetD5* transcripts are under the control of miR126-5p in endothelial cells. The repression of *SetD5* protein by miR126-5p could not be addressed in this study because of the lack of valid antibodies.

In order to determine whether miR126-5p controlled leukocyte trafficking through endothelial cells also via SetD5, we designed a target protector aimed at specifically protecting SetD5 transcripts from the effects of the miR126-5p. As expected, the SetD5 target protector induced a 40% up-regulation of SetD5 expression in HUVEC (Fig. 5F) while it did not affect the expression of ALCAM, miR126-5p or CXCL12 (Fig. S5A,B,C). Inversely, the ALCAM target protector used earlier did not alter the expression of SetD5, validating the specificity of each target protector (Fig. S5D). Interestingly, THP-1 adhesion to HUVEC transfected with the SetD5 target protector was reduced 40% when compared to control cells, indicating that miR126-5p controls leukocyte adhesion to the endothelium through a regulation of SetD5 (Fig. 5G). In contrast, THP-1 transmigration through HUVEC transfected with the SetD5 target protector was similar to that observed in control cells (Fig. 5H). In addition, when a SetD5 siRNA was simultaneously transfected with the miR126-5p inhibitor in endothelial cells, SetD5 expression was rescued to its basal level (Fig. S6) and leukocyte adhesion was not affected anymore (Fig. 5I), confirming the specific involvement of SetD5 in the control of leukocyte adhesion by miR126-5p.

Tissue-specific control of ALCAM and SetD5 expression by miR126-5p in vivo:

To establish whether miR126-5p regulates the expression of the identified target genes *in vivo*, ALCAM and SetD5 expression was analysed after inhibition of miR126-5p in mouse pups. When compared to control animals, intraperitoneal injection of the LNA-miR126-5p inhibitor induced a repression of miR-126-5p especially in heart (not shown) and lungs (Fig S7A) but did not affect miR126-5p expression in the brain and retina (not shown), probably because of the blood –brain or –retinal barrier. We therefore focused our analysis on lungs where both ALCAM and SetD5 are expressed (Fig. 6A) and where miR126-5p is also mainly detected (Fig. 1B). The levels of ALCAM protein increased in the lungs of pups injected with the miR126-5p inhibitor when compared to controls, as assessed by ELISA- (Fig. 6B) and by Western-blotting (Fig S7B), thus demonstrating that miR126-5p controls ALCAM expression *in vivo* at least in this organ. Surprisingly, SetD5 expression in the lungs was not affected by the inhibition of miR126-5p (Fig. 6C), suggesting that miR126-5p does not control both targets simultaneously in this organ.

As reported earlier, a subset of miRNA target genes can be protected from repression depending on the tissue *in vivo*³³, we thus investigated whether miR126-5p could control the levels of expression of SetD5 in other tissues. In mouse pup organs, SetD5 was predominantly detected in the heart and the retina when compared to other organs (Fig. 6A). As we found no

variation in SetD5 expression in the heart after miR126-5p inhibition (not shown), SetD5 regulation by miR126-5p was investigated in the retina. The LNA miR126-5p inhibitor was directly injected into the subretinal space in order to bypass the blood-retina barrier, leading to a silencing of endogenous miR126-5p (Fig. S7A). This induced a significant up-regulation of SetD5 expression (Fig. 6E), indicating that miR126-5p also controls SetD5 expression *in vivo*, at least in the retina. Interestingly, the inhibition of miR126-5p did not alter ALCAM expression in the retina (Fig. 6D), confirming that the expression of ALCAM and SetD5 is actually regulated in separate locations by miR126-5p *in vivo*.

Discussion:

In this study, we showed that miR126-5p is a functional microRNA which accumulates in several tissues, mainly in endothelial cells. miR126-5p takes part in the control of leukocyte trafficking by modulating the expression of two genes: ALCAM and SetD5.

miR126-5p is the passenger strand of the miR126-3p/-5p duplex and such strands were initially considered to be degraded, though no study had clearly addressed this point for miR126-5p. We show here that miR126-5p accumulates in various mouse and human tissues, together with its guide strand. This is consistent with miRNA profiling analysis which showed that both strands of a miRNA duplex may be simultaneously detected in the same tissues, at various ratios^{34, 35}. Previous studies had established the presence of miR126-5p in embryonic bodies¹⁰, in human prostate cancer³⁶ and in human breast cancer cell lines²⁶, suggesting that miR126-5p might have both physiological and pathological functions.

Despite a concomitant regulation of ALCAM and SetD5 by miR126-5p *in vitro*, our results *in vivo* show that miR126-5p does not control simultaneously the expression of ALCAM and SetD5 in the same tissues. The context-dependent miRNA target selection was also observed for miR126-3p. Indeed, Asgeirsdottir et al. showed that the inhibition of miR126-3p *in vivo* leads to an up-regulation of VCAM-1 in kidney and liver but not in lung and heart³⁷. In addition, Zhang et al. demonstrated that miR126-3p differently controls its target genes in mammary tumor cell lines²⁶, strengthening the hypothesis that the regulation of miRNA target expression depends on the cellular context. The molecular mechanism governing this miRNA target selection is not known yet, however we observed that in lungs and in the retina, miR126-5p inhibits highly expressed target genes, suggesting that a titration of the microRNA may take place in these tissues and prevent the regulation of all miR126-5p targets at the same place and time. Tissue-specific RNA-binding proteins may also interfere with the binding of miR126-5p with its targets leading to their protection from miRNA control^{38, 39}.

This tissue-specific control of miRNA targets suggests that miR126-5p independently favours leukocyte adhesion and represses diapedesis in different locations. Given that miR126-3p and its host gene *egfl7* control leukocyte adhesion to endothelial cells by inhibiting the expression of VCAM-1^{12, 30} and ICAM-1³⁰, miR126-5p may work in concert with its guide strand and host gene to control endothelial cell activation and thus, leukocyte trafficking. This hypothesis corroborates a recent report highlighting a cooperative role between miR126-5p and miR126-3p in breast tumor cells²⁶. Interestingly, the study of Zhang et al. also supports the idea that

miR126-5p may repress leukocyte trafficking, as the ectopic expression of miR126-3p/-5p in breast tumor cells represses inflammatory monocyte recruitment into the tumor mass²⁶.

We demonstrated that ALCAM is up-regulated after miR126-5p inhibition in the lung, but the role of ALCAM in lung endothelium *in vivo* is not established yet. In contrast, ALCAM is expressed in the microvascular endothelium of the central nervous system (CNS), especially during neuro-inflammation where it controls the migration of leukocytes into the CNS⁴. As our cholesterol-conjugated miRNA inhibitors do not cross the blood-brain-barrier, we were not able to analyse the phenotype induced by the inhibition of miR126-5p in the brain. The delivery of miR126-5p into the brain is a promising challenge in order to negatively regulate ALCAM expression and prevent leukocyte infiltration into the CNS, notably in patients with active multiple sclerosis lesions⁴.

Regarding SetD5, the SET domain predicted in the SetD5 protein suggests that it may take part in epigenetic regulation⁴⁰ but no data supports this hypothesis yet. It will be interesting to establish whether SetD5 controls the expression of endothelial adhesion molecules such as ICAM-1, VCAM-1 or E-selectin. In such case, SetD5 would be another new player which preserves the non-activated state of the endothelium in the absence of inflammatory stimuli, in addition to Egfl7³⁰. Further studies are now required to improve our knowledge on this new concept and possibly to identify new targets for anti-inflammatory therapy.

Fundings:

This work was supported by Fondation pour la Recherche Médicale (FRM Régionale Comité Nord-Pas de Calais 2009; VM), Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC #5071; VM), Comité du Nord de la ligue Nationale contre le Cancer (VM) and Cancéropôle Nord-Ouest (VM).

Acknowledgements:

We thank the Bioimaging Center Lille-Nord (BICel), Dr Marc Tardieu (INSERM U802, Paris) for providing microglial cells, Dr Etienne Lelièvre for discussion on ALCAM and Marie-Christine Bouchez for assistance.

Conflict of interest :

None

References:

1. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res* 2007;**100**:158-173.
2. Muller WA. Mechanisms of transendothelial migration of leukocytes. *Circ Res* 2009;**105**:223-230.
3. Bowen MA, Patel DD, Li X, Modrell B, Malacko AR, Wang WC, *et al.* Cloning, mapping, and characterization of activated leukocyte-cell adhesion molecule (ALCAM), a CD6 ligand. *J Exp Med* 1995;**181**:2213-2220.
4. Cayrol R, Wosik K, Berard JL, Dodelet-Devillers A, Ifergan I, Kebir H, *et al.* Activated leukocyte cell adhesion molecule promotes leukocyte trafficking into the central nervous system. *Nat Immunol* 2008;**9**:137-145.
5. Masedunskas A, King JA, Tan F, Cochran R, Stevens T, Sviridov D, *et al.* Activated leukocyte cell adhesion molecule is a component of the endothelial junction involved in transendothelial monocyte migration. *FEBS Lett* 2006;**580**:2637-2645.
6. Ohneda O, Ohneda K, Arai F, Lee J, Miyamoto T, Fukushima Y, *et al.* ALCAM (CD166): its role in hematopoietic and endothelial development. *Blood* 2001;**98**:2134-2142.
7. Huntzinger E, Izaurralde E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet* 2011;**12**:99-110.
8. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009;**136**:215-233.
9. Urbich C, Kuehnbacher A, Dimmeler S. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovasc Res* 2008;**79**:581-588.
10. Fish JE, Santoro MM, Morton SU, Yu S, Yeh RF, Wythe JD, *et al.* miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. *Dev Cell* 2008;**15**:272-284.
11. Wang S, Aurora AB, Johnson BA, Qi X, McAnally J, Hill JA, *et al.* The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Dev Cell* 2008;**15**:261-271.
12. Harris TA, Yamakuchi M, Ferlito M, Mendell JT, Lowenstein CJ. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;**105**:1516-1521.
13. Kuhnert F, Mancuso MR, Hampton J, Stankunas K, Asano T, Chen CZ, *et al.* Attribution of vascular phenotypes of the murine *Egfl7* locus to the microRNA miR-126. *Development* 2008;**135**:3989-3993.
14. Mocharla P, Briand S, Giannotti G, Dorries C, Jakob P, Paneni F, *et al.* AngiomiR-126 expression and secretion from circulating CD34(+) and CD14(+) PBMCs: role for proangiogenic effects and alterations in type 2 diabetics. *Blood* 2013;**121**:226-236.
15. van Solingen C, de Boer HC, Bijkerk R, Monge M, van Oeveren-Rietdijk AM, Seghers L, *et al.* MicroRNA-126 modulates endothelial SDF-1 expression and mobilization of Sca-1(+)/Lin(-) progenitor cells in ischaemia. *Cardiovasc Res* 2011;**92**:449-455.
16. van Solingen C, Seghers L, Bijkerk R, Duijs JM, Roeten MK, van Oeveren-Rietdijk AM, *et al.* Antagomir-mediated silencing of endothelial cell specific microRNA-126 impairs ischemia-induced angiogenesis. *J Cell Mol Med* 2009;**13**:1577-1585.
17. Huang X, Gschwend E, Van Handel B, Cheng D, Mikkola HK, Witte ON. Regulated expression of microRNAs-126/126* inhibits erythropoiesis from human embryonic stem cells. *Blood* 2011;**117**:2157-2165.
18. Sturgeon CM, Chicha L, Ditadi A, Zhou Q, McGrath KE, Palis J, *et al.* Primitive erythropoiesis is regulated by miR-126 via nonhematopoietic Vcam-1+ cells. *Dev Cell* 2012;**23**:45-57.

19. Collison A, Herbert C, Siegle JS, Mattes J, Foster PS, Kumar RK. Altered expression of microRNA in the airway wall in chronic asthma: miR-126 as a potential therapeutic target. *BMC Pulm Med* 2011;**11**:29.
20. Guo C, Sah JF, Beard L, Willson JK, Markowitz SD, Guda K. The noncoding RNA, miR-126, suppresses the growth of neoplastic cells by targeting phosphatidylinositol 3-kinase signaling and is frequently lost in colon cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 2008;**47**:939-946.
21. Mattes J, Collison A, Plank M, Phipps S, Foster PS. Antagonism of microRNA-126 suppresses the effector function of TH2 cells and the development of allergic airways disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;**106**:18704-18709.
22. Miko E, Margitai Z, Czimmerer Z, Varkonyi I, Dezso B, Lanyi A, *et al.* miR-126 inhibits proliferation of small cell lung cancer cells by targeting SLC7A5. *FEBS Lett* 2011;**585**:1191-1196.
23. Png KJ, Halberg N, Yoshida M, Tavazoie SF. A microRNA regulon that mediates endothelial recruitment and metastasis by cancer cells. *Nature* 2012;**481**:190-194.
24. Tavazoie SF, Alarcon C, Oskarsson T, Padua D, Wang Q, Bos PD, *et al.* Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature* 2008;**451**:147-152.
25. Zhang J, Du YY, Lin YF, Chen YT, Yang L, Wang HJ, *et al.* The cell growth suppressor, mir-126, targets IRS-1. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;**377**:136-140.
26. Zhang Y, Yang P, Sun T, Li D, Xu X, Rui Y, *et al.* miR-126 and miR-126(*) repress recruitment of mesenchymal stem cells and inflammatory monocytes to inhibit breast cancer metastasis. *Nat Cell Biol* 2013;**15**:284-294.
27. Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;**10**:126-139.
28. Musiyenko A, Bitko V, Barik S. Ectopic expression of miR-126*, an intronic product of the vascular endothelial EGF-like 7 gene, regulates protein translation and invasiveness of prostate cancer LNCaP cells. *J Mol Med* 2008;**86**:313-322.
29. Matsuda T, Cepko CL. Electroporation and RNA interference in the rodent retina in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;**101**:16-22.
30. Delfortrie S, Pinte S, Mattot V, Samson C, Villain G, Caetano B, *et al.* Eglf7 promotes tumor escape from immunity by repressing endothelial cell activation. *Cancer Res* 2011;**71**:7176-7186.
31. Choi WY, Giraldez AJ, Schier AF. Target protectors reveal dampening and balancing of Nodal agonist and antagonist by miR-430. *Science* 2007;**318**:271-274.
32. Staton AA, Giraldez AJ. Use of target protector morpholinos to analyze the physiological roles of specific miRNA-mRNA pairs in vivo. *Nat Protoc* 2011;**6**:2035-2049.
33. Mishima Y, Giraldez AJ, Takeda Y, Fujiwara T, Sakamoto H, Schier AF, *et al.* Differential regulation of germline mRNAs in soma and germ cells by zebrafish miR-430. *Curr Biol* 2006;**16**:2135-2142.
34. Kuchenbauer F, Mah SM, Heuser M, McPherson A, Ruschmann J, Rouhi A, *et al.* Comprehensive analysis of mammalian miRNA* species and their role in myeloid cells. *Blood* 2011;**118**:3350-3358.
35. Ro S, Park C, Young D, Sanders KM, Yan W. Tissue-dependent paired expression of miRNAs. *Nucleic Acids Res* 2007;**35**:5944-5953.
36. Watahiki A, Wang Y, Morris J, Dennis K, O'Dwyer HM, Gleave M, *et al.* MicroRNAs associated with metastatic prostate cancer. *PLoS One* 2011;**6**:e24950.
37. Asgeirsdottir SA, van Solingen C, Kurniati NF, Zwiers PJ, Heeringa P, van Meurs M, *et al.* MicroRNA-126 contributes to renal microvascular heterogeneity of VCAM-1

- protein expression in acute inflammation. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012;**302**:F1630-1639.
38. Kedde M, Strasser MJ, Boldajipour B, Oude Vrielink JA, Slanchev K, le Sage C, *et al.* RNA-binding protein Dnd1 inhibits microRNA access to target mRNA. *Cell* 2007;**131**:1273-1286.
 39. Kedde M, van Kouwenhove M, Zwart W, Oude Vrielink JA, Elkon R, Agami R. A Pumilio-induced RNA structure switch in p27-3' UTR controls miR-221 and miR-222 accessibility. *Nat Cell Biol* 2010;**12**:1014-1020.
 40. Dillon SC, Zhang X, Trievel RC, Cheng X. The SET-domain protein superfamily: protein lysine methyltransferases. *Genome Biol* 2005;**6**:227.

Figure legends:

Figure 1: miR126-5p is expressed in endothelial cells of mouse and human tissues:

A: miR126-5p and miR126-3p were detected in the main cranial blood vessels of 10.5 day-old mouse embryos (E10.5) using *in situ* hybridization (blue staining). No signal was observed when using a control probe (Ctrl-probe). **B:** Relative quantification of miR126-5p in P8 mouse pup organs using RT-qPCR. Levels were normalized to those in livers, arbitrarily set to 1 **C:** Relative quantification of miR126-5p in CD31⁻ and CD31⁺ cells isolated from P3 mouse hearts and lungs. **D:** Relative quantification of miR126-5p in various human organs, using RT-qPCR. **E:** Relative quantification of miR126-5p levels in human primary fibroblasts (NHDF), mammary epithelial cells (MCF10A), microglial cells (microglial) and primary endothelial cells (HUVEC), using RT-qPCR. **F:** Relative quantification using RT-qPCR of miR126-3p and miR126-5p in HUVEC transfected with the LNA control inhibitor (α miRCtrl) or with the LNA miR126-5p inhibitor (α miR126-5p), **G:** or with a control (mimic Ctrl), or a miR126-5p (mimic 126-5p) mature miRNA.

Figure 2: miR126-5p promotes monocyte adhesion to endothelial cells but represses trans-endothelial migration:

A: Fluorescent THP-1 cells were plated onto confluent monolayers of HUVEC previously transfected with α miRCtrl or with α miR126-5p inhibitors (left), or with mimic Ctrl or mimic 126-5p mature miRNA (right). Cell adhesion was determined by measuring fluorescence at 520nm using a spectrofluorimeter. Data are shown as fold of change over Ctrl. **B:** HUVEC plated in the upper chambers of fluoroblock inserts were transfected as in A and cultured for 5 days. Trans-endothelial migration was determined by plating fluorescent THP-1 monocytes onto the HUVEC confluent monolayers and measuring bottom fluorescence every 30 min at 520nm. Data are shown as fold of change over Ctrl.

Figure 3: ALCAM is a target gene of miR126-5p:

A: Sequence complementarity between miR126-5p and the predicted miR126-5p binding site in the 3'UTR of mouse ALCAM, **B:** Sequence alignment of ALCAM 3'UTR from different species. The red box corresponds to the seed site; the blue box encompasses the additional nucleotides complementary to miR126-5p. **C:** Relative luciferase activity measured in COS-7 cells transfected with the pMIR reporter vector containing the mouse 3'UTR of ALCAM (3'UTR ALCAM) and with either a control (mimic Ctrl), the miR126-3p (mimic 126-3p), or the miR126-5p (mimic 126-5p) mature miRNA. Bars represent s.d., ** p<0.01; ns: not

significant. **D:** Relative luciferase activity measured after COS-7 transfection with mimic Ctrl or mimic 126-5p miRNA and the reporter vector 3'UTR ALCAM or a miR126-5p site-mutated version of this plasmid (3'UTR ALCAM mut). Bars indicate s.d., * $p < 0.05$, ns: not significant. **E:** Immunoblot of ALCAM protein in HUVEC transfected with the LNA control inhibitor (α miRCtrl) or with the LNA miR126-5p inhibitor (α miR126-5p, left, upper panel) or with a mimic Ctrl or mimic 126-5p miRNA (left, lower panel). Actin is shown as a loading control; numbers below indicate densitometry measurements of expression relative to Ctrl. Histograms illustrate the means of ALCAM protein levels in HUVEC transfected in similar conditions in independent experiments, Bars indicate s.d. **F:** ALCAM immunofluorescence detection in confluent HUVEC previously transfected with control siRNA (siCtrl), with ALCAM siRNA (siALCAM), or with miRNA inhibitors and miRNA mimics as in E.

Figure 4: miR126-5p regulates monocyte transendothelial migration via ALCAM:

A: THP-1 cell adhesion onto confluent HUVEC transfected with the LNA control inhibitor (α miRCtrl) or with the LNA miR126-5p inhibitor (α miR126-5p) and pre-incubated with a recombinant human chimeric Fc-control (Ctrl-Fc) or a anti-ALCAM blocking antibody (ALCAM-Fc) before plating of the labelled THP-1. ** $p < 0.01$. Data are shown as fold of change over Ctrl set to 100%. **B:** THP-1 trans-endothelial migration through confluent HUVEC transfected as in A. * $p < 0.05$, ns: not significant. Data are shown as fold of change over Ctrl. **C:** upper panel, ALCAM protein expression analysed by Western Blot in HUVEC transfected with a control target blocker (Target Ctrl) or with a target blocker protecting the site recognized by miR126-5p in the 3'UTR of ALCAM (Target ALCAM). Numbers below indicate the densitometry measurements of expression. Lower panel, means of ALCAM protein levels in HUVEC transfected with Target Control or Target ALCAM in independent experiments, Bars indicate s.d. **D:** THP-1 cell adhesion measured as described above on confluent HUVEC previously transfected with Target Ctrl or with Target ALCAM. ns: not significant. **E:** THP-1 cell transmigration through HUVEC transfected with Target Ctrl or with Target ALCAM. ** $p < 0.01$.

Figure 5: SetD5 is a target gene of miR126-5p which represses monocyte adhesion:

A: Sequence complementarity of the predicted miR126-5p binding site with the 3'UTR of mouse SetD5. **B:** Sequence alignment of SetD5 3'UTR from different species. The red box corresponds to the seed site; the blue box encompasses the additional nucleotides complementary to miR126-5p. **C:** Relative luciferase activity measured after COS-7

transfection with the control (mimic Ctrl) or miR126-5p (mimic 126-5p) mature miRNA and the pMIR reporter vector containing the mouse 3'UTR of SetD5 (3'UTR SetD5) or a miR126-5p site-mutated version of this reporter (3'UTR SetD5 mut). Bars indicate s.d., * $p < 0.05$, ns: not significant. **D:** Relative quantification of SetD5 using RT-qPCR in HUVEC transfected with the LNA control inhibitor (α miRCtrl) or with the LNA miR126-5p inhibitor (α miR126-5p). * $p < 0.05$. **E:** Relative quantification of SetD5 using RT-qPCR in HUVEC transfected with mimic Ctrl or mimic 126-5p mature miRNA. ** $p < 0.01$. **F:** Relative quantification using RT-qPCR of SetD5 in HUVEC transfected with Target Ctrl or with Target SetD5, * $p < 0.05$. **G:** THP-1 cell adhesion onto confluent HUVEC transfected with the Target Ctrl or with Target SetD5, ** $p < 0.01$. **H:** THP-1 cell transmigration through confluent HUVEC transfected with Target Ctrl or with Target SetD5. **I:** THP-1 cell adhesion measured as described above on confluent HUVEC transfected either with α miRCtrl or with α miR126-5p and a control non-targeted siRNA (siCtrl) or with the siRNA directed against SetD5 (siSetD5). Data are shown as fold of change. ** $p < 0.01$; ns: not significant.

Figure 6: miR126-5p regulates ALCAM and SetD5 expression *in vivo*:

A: Relative quantification using RT-qPCR of ALCAM and SetD5 expression levels in various P8 mouse organs. Levels were normalized to those in livers. **B:** Quantification of ALCAM protein by ELISA in lungs harvested from mice injected intraperitoneally with the LNA control inhibitor (α miRCtrl) or with the LNA miR126-5p inhibitor (α miR126-5p). **C:** Relative quantification of SetD5 in lungs harvested from mice injected intraperitoneally with α miRCtrl or with α miR126-5p. **D:** Quantification of ALCAM protein by ELISA in retina dissected from mice injected in the subretinal space with α miRCtrl or with α miR126-5p. **E:** Relative quantification of SetD5 in retina dissected from mice injected in the subretinal space with α miRCtrl or with α miR126-5p. p values are indicated.

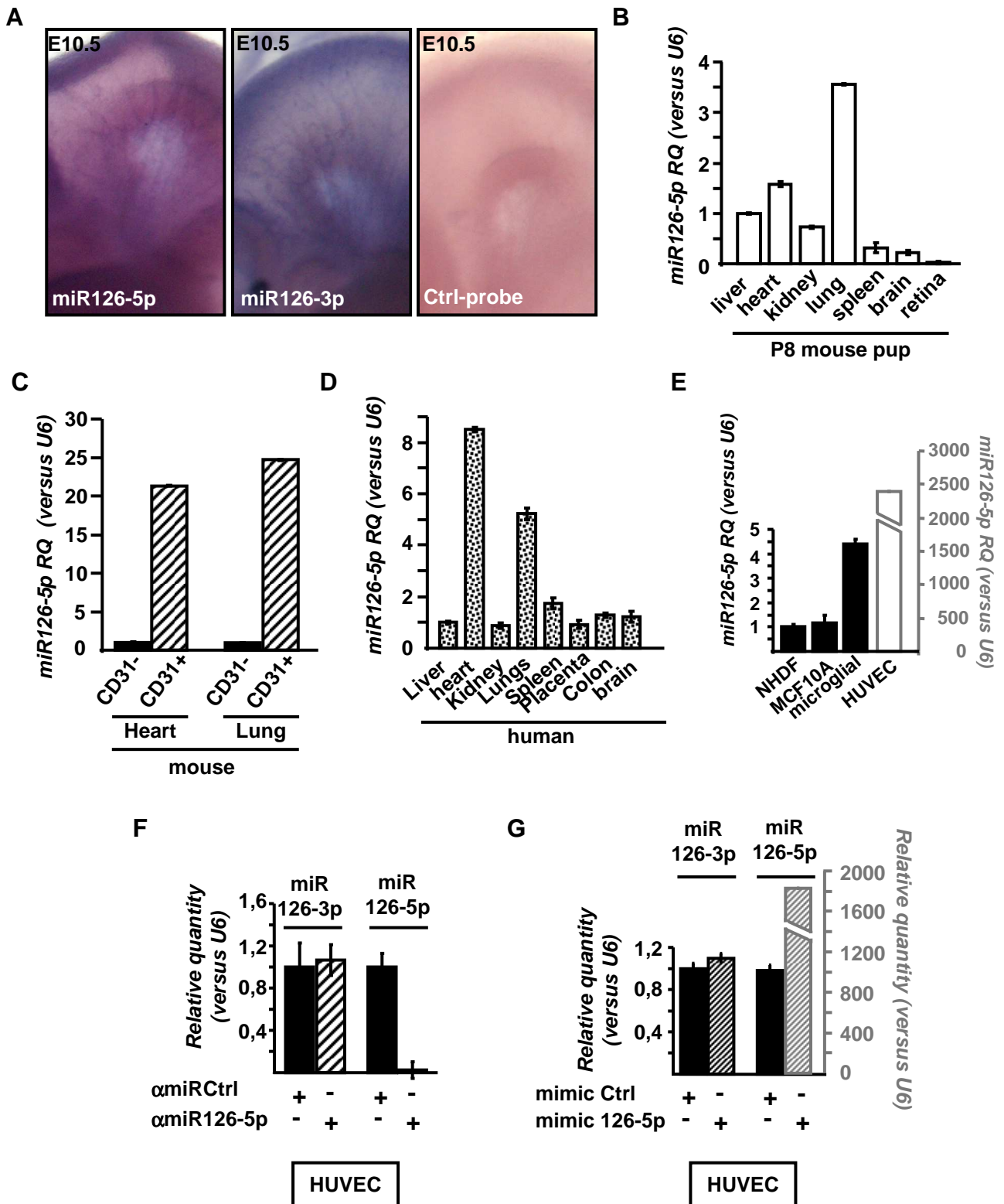
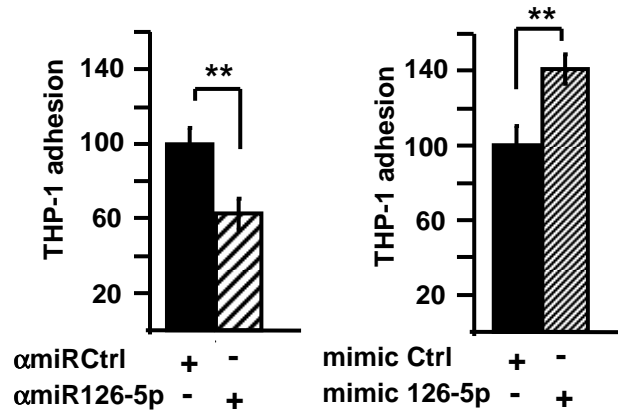


Figure 1

A



B

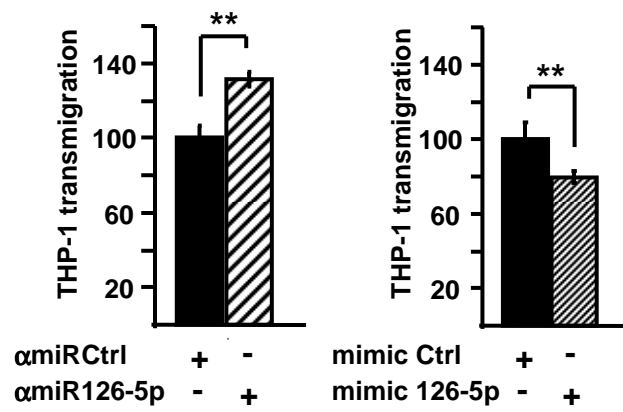
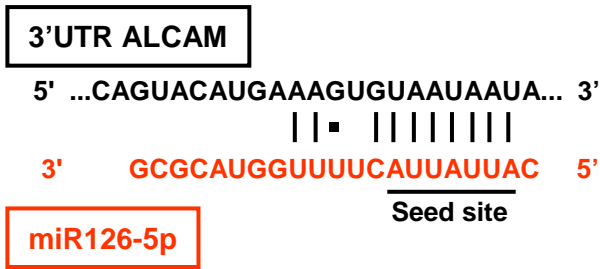


Figure 2

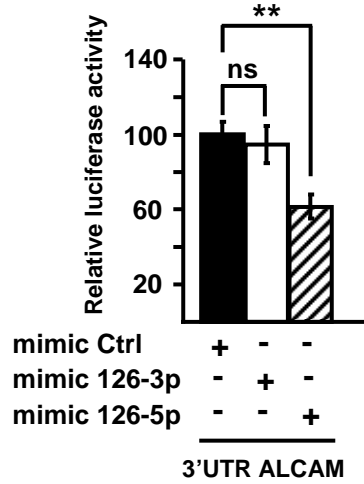
A



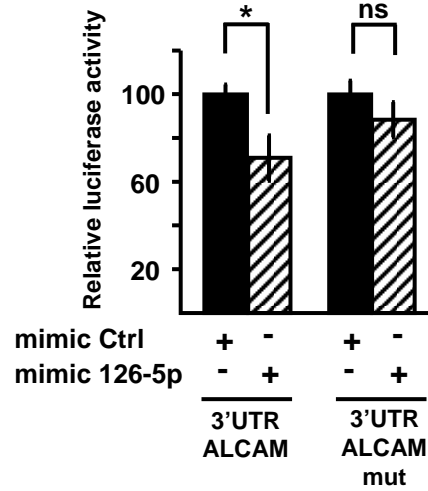
B

Mouse	AAGCAGUACAUGAAAGUGUAAUAAUAAAAU
Human	AAGCAGUACAUGAAAGUGUAAUAAUAAAAU
Rat	AAGCAGUACAUGAAAGUGUAAUAAUAAAAU
Rabbit	AAGCAGUACAUAAAAGUGUAAUAAUAAAAU
Dog	AAGCAGUACAUGAAAGUGUAAUAAUAAAAU
Cat	AAGCAGUACAUGAGAGUGUAAUAAUAAAAU
Sheep	AAGCAGUAUGUAAAAGUGUAAUAAUAAAAU

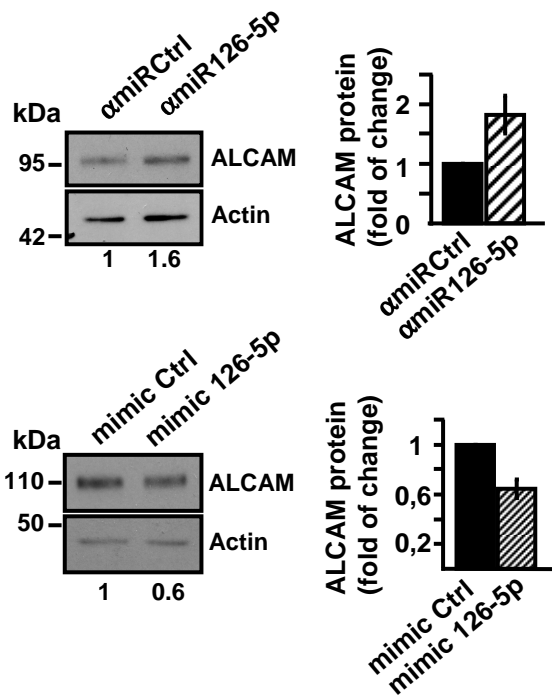
C



D



E



F

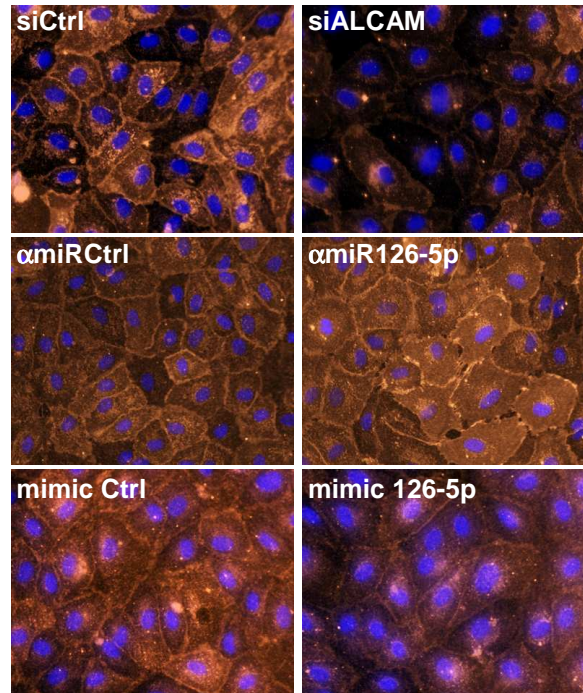


Figure 3

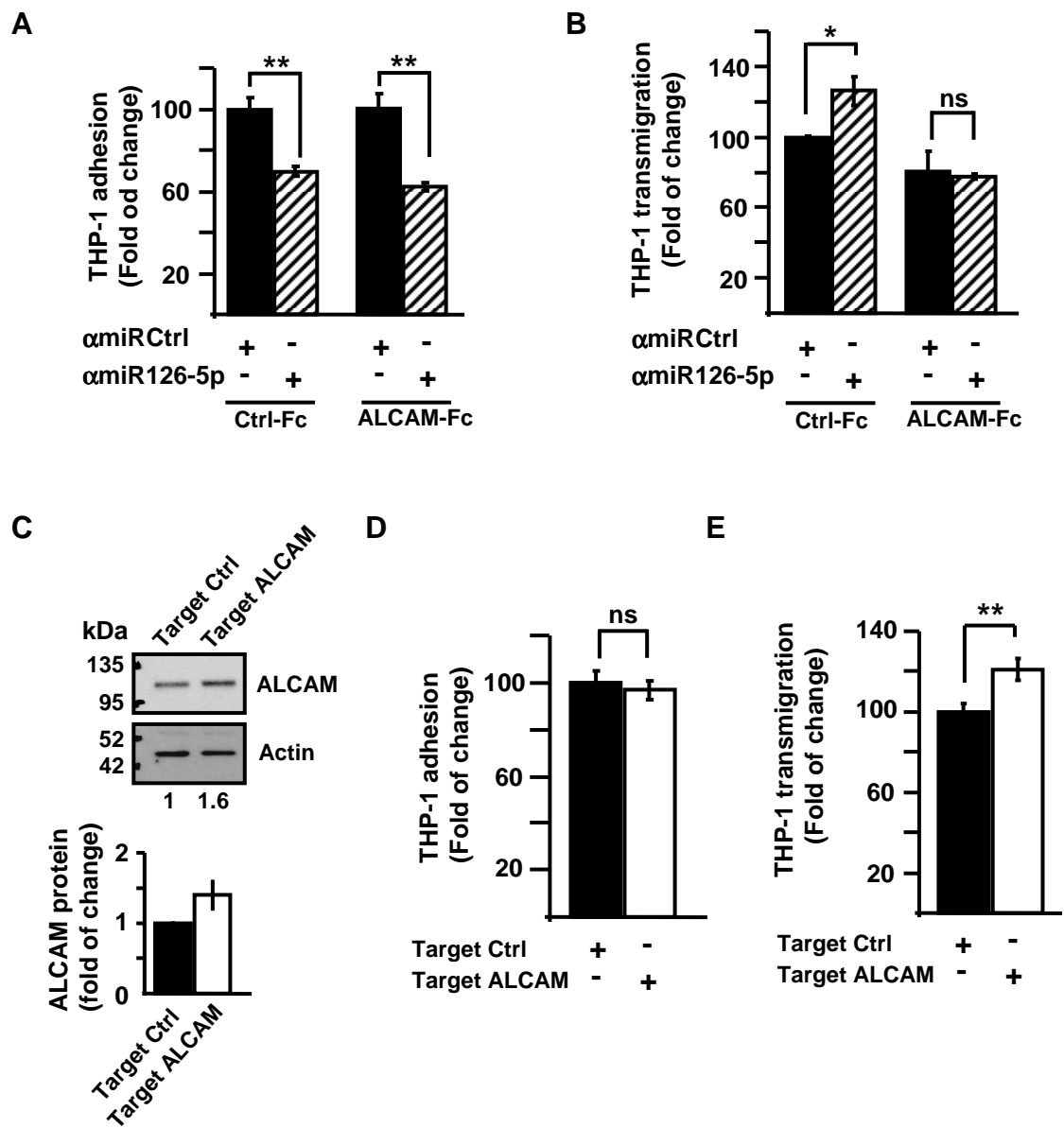
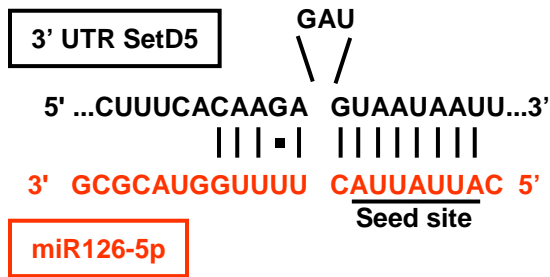


Figure 4

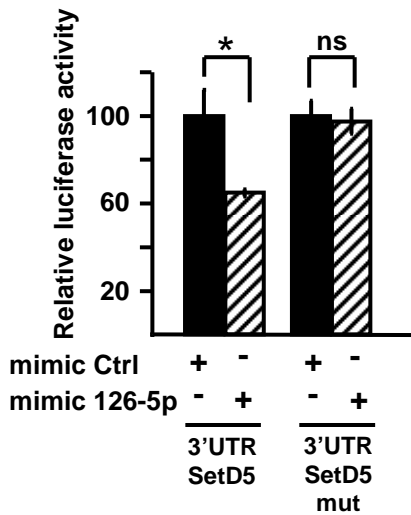
A



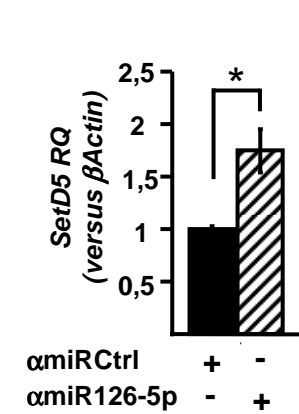
B

Human	cuuucacaagagagauguaauaauuuug
Mouse	cuuucacaagagagauguaauaauuuug
Rat	cuuucacaagagagauguaauaauuuug
Rabbit	cuuucacaagagagauguaauaauuuug
Dog	cuuucacaagagagauguaauaauuuug
Cat	cuuucacaagagagauguaauaauuuug
Horse	cuuucacaagagagauguaauaauuuug
Cow	cuuucacaagagagauguaauaauuuug
Elephant	cuuucacaaaagagauguaauaauuuug
Chicken	cuuucacaagagagauguaauaauuuug
Lizard	cuuucacaagagagauguaauaauuuug
X. Tropicalis	cuuucacaaagagauguaauaauuuug

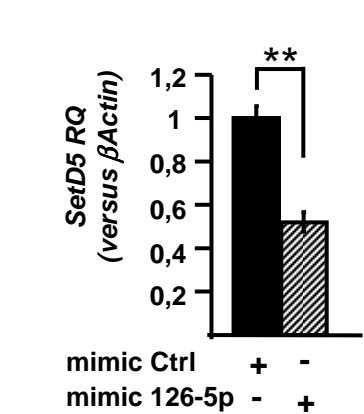
C



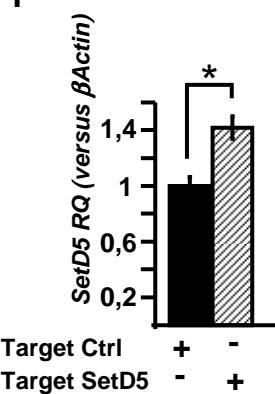
D



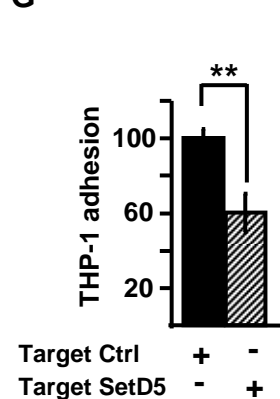
E



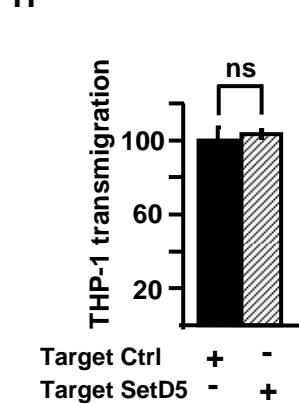
F



G



H



I

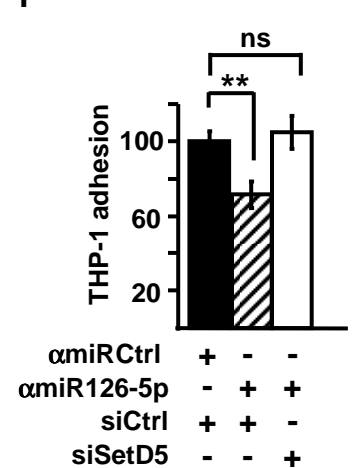


Figure 5

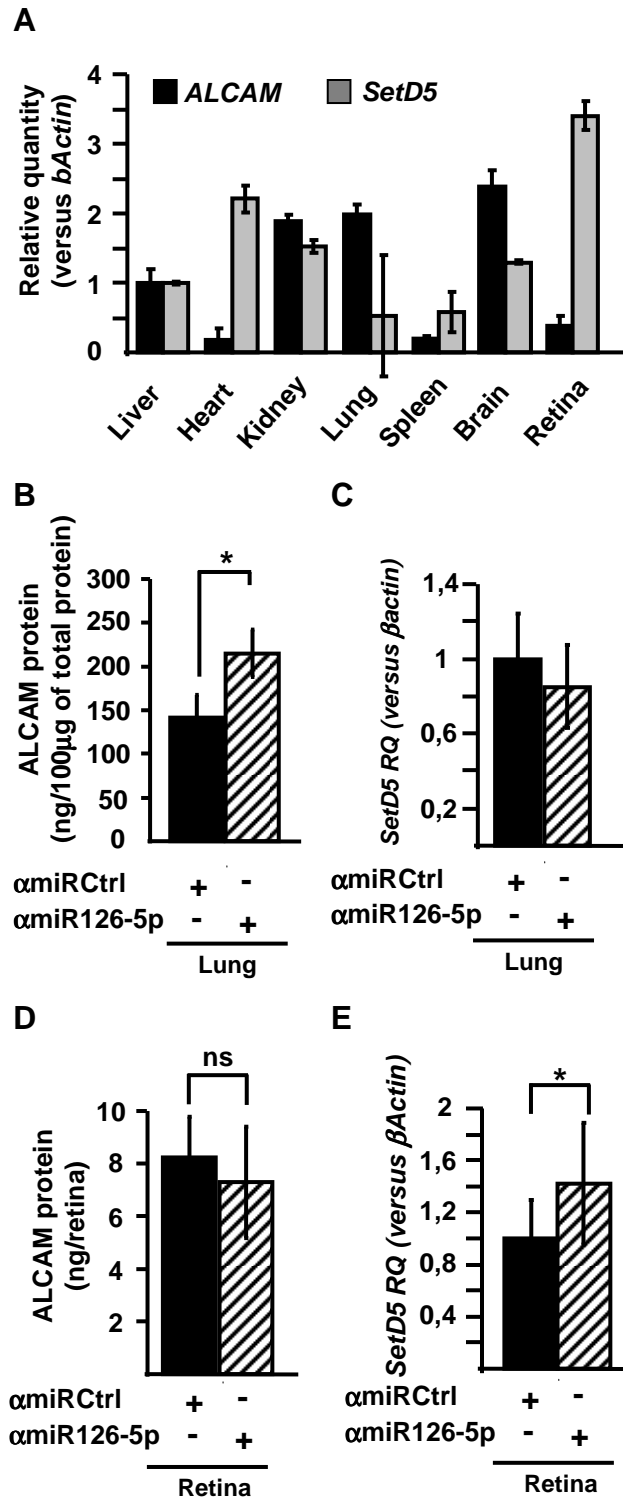


Figure 6

Supplementary Methods, Figures and tables:

Supplementary Methods:

Reagents:

Goat anti-human VE-cadherin (sc-6458), rabbit anti-human ALCAM (sc-25624) and goat anti-human actin (sc-1615) antibodies were from Santa Cruz. For *in vivo* experiments and transendothelial migration assays, LNA microRNA inhibitors were conjugated with cholesterol so as to facilitate transfection. ALCAM and SetD5 siRNA were purchased from Dharmacon.

Isolation of CD31 positive cells from organs:

Mouse lungs and hearts were harvested from 3-day old mouse pups, washed in PBS and minced before digestion with type I collagenase (2mg/mL, Life Technologies) and DNase I (10 µg/mL, Roche) in DMEM for 40 min. Homogenized samples were filtered on 70µm strainers before neutralization of collagenase. After red blood cell lysis, cells were incubated with Fc block (rat anti-mouse CD16/CD32, 1µg/10⁶ cells, Becton Dickinson) for 45min at 4°C under rocking. Cells were then incubated with magnetic Beads (Dynabeads Sheep anti-Rat IgG, Life Technologies) previously coated with 1.5 µg anti-CD31 antibody (rat anti-mouse CD31, Becton Dickinson)/25 µL of bead suspension. CD31+ cells were isolated following the manufacturer's instructions. Isolated cells were centrifuged and pellets were suspended in Trizol for qPCR analysis.

Cell culture and transfection:

Primary human umbilical vein endothelial cells (HUVEC, Lonza) were cultured in EGM-2 (Lonza) at 37°C, 5% CO₂ following the manufacturer's instructions. HUVEC were plated at 25000cells/cm² the day before transfection. Cells were transfected using Primefect siRNA transfection reagent (Lonza) following the manufacturer's instructions. COS-7 cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS (Hyclone). Cells were plated at 13.10⁴ cells/well in 24-well plates the day before transfection. Cells were co-transfected with the pMIR-REPORT luciferase, the pMIR-REPORT β-galactosidase and mimic microRNA using Dharmafect DUO (Dharmacon) in DMEM medium without serum and antibiotics and following the manufacturer's instructions. The THP-1 cell line, derived from human acute monocytic leukemia, was cultured in RPMI-1640 (Life Technologies) supplemented with 10% FBS (Hyclone) and 50µM of 2-mercaptoethanol (Sigma Aldrich). Primary normal

human dermal fibroblasts (NHDF, Lonza) and human mammary epithelial MCF10A cells (ATCC) were cultured according to the manufacturer's instructions. Human microglial cells were from Dr Marc Tardieu and were cultured as described in {Janabi, 1995 #214}.

Reverse transcription and absolute or relative quantification:

Total RNA were extracted from cells and mouse tissues using Trizol reagent (Life Technologies) and purified according to the manufacturer's instructions. Human RNAs were from Life Technologies (Firstchoice human total RNA survey panel). Human RNAs were from Life Technologies. Total RNA was reverse transcribed using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). To quantify miRNA, total RNA was reverse transcribed using Taqman microRNA Reverse Transcription Kit and U6, miR126-3p and miR126-5p specific primers (Applied Biosystems). Relative quantification were performed using Taqman gene expression master mix and specific Taqman probes (Table S2, Applied Biosystems) using a StepOne system. miRNA and mRNA expression levels were quantified using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method and normalized to U6 and β -actin levels, respectively. For absolute quantification, standard curves were generated using known amounts of miR126-3p and miR126-5p which allowed quantifying miR126-3p and miR126-5p levels of expression. Graph represents results where miR126-3p levels of expression were set to 100%.

Whole mount in situ hybridization on 10.5 day old embryos:

Embryos were fixed in PFA 4% pH 9.5 overnight at 4°C, rinsed in PBT (PBS, 0.1% Triton-X100) and treated with Proteinase K at 20 μ g/ml in PBT for 30 min at room temperature before fixation for 20 min. After pre-hybridization, embryos were hybridized overnight in hybridization buffer (50% formamide, 5X SSC, 0,1% Triton-X100, 9,2 mM citric acid, 500 μ g/mL yeast RNA and 50 μ g/mL heparin) containing 25nM of miR126-3p or miR126-5p 5' and 3' digoxigenin labelled probes (Exiqon) at 51 and 43°C respectively. Embryos were washed with 50% formamide, 5X SSC, 0,1% Triton-X100, 9,2mM citric acid (wash solution) for 15 min at their respective hybridization temperature and then with increasing amounts of 2X SSC/0.1% Triton-X100 mixed with the wash solution before final incubation in PBT at room temperature. Embryos were treated with 2% sheep serum, 20 mg/mL BSA in PBT for 3h at RT before incubation with the alkaline phosphatase conjugated anti-Digoxigenin antibody (Roche) overnight at 4°C. Embryos were finally washed in PBT containing 2 mM levamisole and stained in 100mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 9.5, 50 mM MgCl₂, 0,1 %

tween containing 4,5 μ L NBT+3,5 μ L BCIP/mL. Embryos were photographed under binocular (Nikon)

Cell migration assays:

HUVEC were plated and transfected with LNA miRNA inhibitors or mimic miRNA as described above and cultured to confluence. Cell layers were then wounded with a pipette tip and cultured for 18h in EGM-2 (Lonza) after which 4 fields/well were examined for the quantification of wound closures. Experiments were carried out in triplicate.

Cell proliferation Assay:

Endothelial cells were plated in opaque 96-well plates and transfected as described above with LNA miRNA inhibitors or mimic miRNAs. After the indicated time, endothelial cell proliferation was quantified using the MTT Assay (Sigma Aldrich) according to the manufacturer's instructions and before measuring absorbances at 570 nm and 620 nm with a Multiscan Ex photometer (Thermo Electron LED). Experiments were performed in triplicate and 5 wells per condition were analyzed in each experiment.

Tube formation Assay:

HUVEC were plated and transfected as described above with LNA miRNA inhibitors or mimic miRNAs 48h before trypsinisation. Cells were then plated at 5000 cells/well onto 10 μ l of Matrigel (Becton Dickinson) pre-gelled into an Angiogenesis μ -slide (Ibidi). Cells were incubated for 18 hours at 37°C to allow tube formation. Endothelial cords were counted using Angiogenesis Analyzer software (Carpentier G, analyzer for ImageJ). Experiments were performed in triplicate, 3 wells per condition were analyzed in each experiment.

Adhesion of monocytes to endothelial cells:

Endothelial cells were seeded in opaque 96-well plates and transfected with LNA miRNA inhibitors or mimic miRNAs as described above. Cells were grown for 3 days to confluence. THP-1 monocytes were labeled with 5 μ g/ml calcein-AM (Life Technologies) at 37°C for 30 min, and then washed twice with phenol-red free DMEM containing 10% FBS. Fluorescent THP-1 (1.10^4 to 2.10^4 cells/well) were plated onto the transfected HUVEC and allowed to adhere for 90 min at 37°C. Adherent monocytes were detected by measuring fluorescence (excitation 485 nm; emission 520 nm) using a fluorescence plate reader (Optima BMG

Labtek). Experiments were carried out in triplicate. Four wells were analyzed per condition in each experiment.

Transendothelial migration of monocytes:

Endothelial cells were seeded on 3 μm pore-size HTS Fluoroblock insert (Becton Dickinson) and transfected with cholesterol-conjugated LNA miRNA inhibitors or with mimic miRNA. Five days after transfection, THP-1 monocytes were labeled as described above and plated onto the endothelial monolayers (10^6 THP-1/Fluoroblock). Fluoroblock inserts were transferred into fresh transwells containing phenol red-free RPMI 1640 with 10ng/ml MCP-1 (R&D) to stimulate migration. Monocyte diapedesis through the endothelium was detected using a fluorescence plate reader (Optima BMG Labtek) every 30 minutes. Results are shown after either 90 or 120 min of migration. When indicated, transfected endothelial cells were pre-treated with ALCAM-Fc (12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or with Control-Fc (12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 4h before incubation with fluorescent-labeled THP-1. Experiments were performed 3 times, for each experiment, 4 inserts per condition were analyzed.

pMIR REPORT constructs:

The ALCAM 3'UTR was amplified by PCR from mouse genomic DNA using the ALCAM-Forward and ALCAM-rev primers (Table S3). The SetD5 3'UTR was amplified by PCR from SetD5 full length cDNA clone (IRAVp968H01120D, ImaGenes GmbH) using the primers SetD5-Forward and SetD5-Rev (Table S3). Both products were sequenced before cloning into the pMIR-REPORT luciferase plasmid. Mutation of the site recognized by miR126-5p in the 3'UTR of ALCAM was generated by successive PCRs using the ALCAM-miR126-5pmut-Fwd and the ALCAM-miR126-5pmut-Rev primers (Table S3) and the primers designed to amplify the wild type 3'UTR. After sequencing, the mutated 3'UTR of ALCAM was cloned into the pMIR-REPORT luciferase plasmid. The deletion of the site recognized by miR126-5p in the 3'UTR of SetD5 was generated using PCR and the SetD5-miR126-5pdel-Fwd and SetD5-miR126-5pdel-Rev primers in order to create a mutant of this site. The mutated 3'UTR of SetD5 was sequenced and cloned into the pMIR-REPORT luciferase vector.

Transactivation assay:

COS-7 cells were plated and transfected as described above. 48 h after transfection, cells were lysed in 300 μL of Reporter Lysis Buffer (Promega) before quantification of luciferase activity using Luciferase Assay Substrate (Promega) and quantification of β -galactosidase activity

using Galacto-Light™ beta-Galactosidase Reporter Gene Assay System (Tropix) according to the manufacturer's instructions. Luciferase activity was normalized to β -galactosidase activity. Experiments were performed in triplicate and 3 samples per condition were analyzed in each experiment.

Immunofluorescence:

Endothelial cells were plated on 14 mm \varnothing glass coverslips and transfected as described above. After washes with PBS containing 0.9 nM CaCl₂ and 0.5 nM MgCl₂, cells were fixed with methanol for 7 min and washed with PBS before incubation with 5% BSA in PBS for 1 h. Cells were then incubated with goat polyclonal anti-ALCAM antibody (R&D, dilution 1/150) for 2 h at room temperature. After washes with PBS, cells were incubated with Alexa Fluor 594-conjugated Donkey anti-goat IgG (Life Technologies, dilution 1/250) for 40 min at room temperature. Cells were washed, counterstained with DAPI and mounted in Mowiol. Fluorescence was examined using an AxioImager Z1-apotome microscope (Carl Zeiss). At least 3 fields were observed per coverslip. Experiments were performed in triplicate. Controls without primary antibody were performed and yield no signal.

For co-immunofluorescence experiments, VE-cadherin was detected using the Alexa fluor 488 goat Zenon® kit following the manufacturer's instructions.

Western-blotting:

HUVEC were seeded and transfected as above. Cells were lysed in RIPA containing protease inhibitors (Roche) and extracts were centrifuged at 10000g for 10min. Extracts were analysed by SDS-PAGE and proteins were transferred onto PVDF membrane (Immobilon-P, Millipore). Membranes were incubated in PBS, 0.05% Tween20, 5% non-fat dry milk for several hours at room temperature before incubation overnight at 4°C in the same buffer with antibody against ALCAM (from Novocastra for HUVEC analysis and from Santa Cruz for lung sample analysis, 1/500). Membranes were rinsed in 0.25% Tween-20 in PBS before incubation with HRP-coupled secondary antibody. Immunocomplexes were revealed using ECL Western Blotting Detection reagent (GE HealthCare) after exposure to hyperfilm ECL (GE HealthCare). Actin detection was used to confirm that equal amounts of protein were loaded on the gel. Experiments were performed 3 times on 3 distinct transfection experiments.

Microarray analysis:

3 different lots of HUVEC (#175973 (#175), #74117 (#74), 178776 (#178), Lonza) were plated and transfected with the LNA control inhibitor or with the LNA 126-5p inhibitor as described above. These 3 lots were considered as biological replicates for the array. 48hr after transfection cells were lysed in Trizol and RNAs were extracted. Expression profiling was carried out by Imaxio using Cy3 labeled probes synthesized with Low Input Quick Amp labeling kit, one color (Agilent Technologies) and human Agilent 8X60K slide (Agilent Technologies). Data were extracted using Feature Extraction 10.7. Genes with a fold of change >1.5 in HUVEC transfected with the LNA miR126-5p inhibitors were selected.

ELISA assay :

Retina and lungs were homogenized in PBS using an Ultrathurax tissue homogenizer followed by two freeze-thaw cycles. Samples were centrifuged and supernatants were used for ELISA assay. Total lung proteins were quantified with a BCA Protein Assay kit (Pierce) and 2µg of total proteins were used for analysis. Retina extracts were diluted 2-fold before used. ALCAM Elisa assay was performed according to the manufacturer's instructions (antibody-online)

Supplementary figure legends and figures:

Supplementary Figure S1: Absolute quantification of miR126-5p and miR126-3p *in vivo*

A: Absolute quantification of miR126-5p and miR126-3p in 10.5 day-old mouse embryos using RT-qPCR. miR126-3p levels of expression are set to 100%. **B:** Absolute quantification of miR126-3p and miR126-5p in P8 mouse hearts and lungs using RT-qPCR. miR126-3p levels of expression are set to 100%. **C:** Absolute quantification of miR126-3p and miR126-5p levels in HUVEC using RT-qPCR. miR126-3p levels of expression are set to 100%.

Supplementary Figure S2: miR126-5p does not affect endothelial cell proliferation, migration, nor differentiation

A: HUVEC were transfected with the LNA control inhibitor (α miRCtrl) or with the LNA miR126-5p inhibitor (α miR126-5p, left) or with the control (mimic Ctrl) or miR126-5p (mimic 126-5p) mature miRNA (right) and proliferation was measured using the MMT assay during 4 days (d1-d2-d4) after cell plating (d0). Data are shown as fold of change (absorbance dn/absorbance d0). **B:** HUVEC migration was analysed by wounding a confluent monolayer of HUVEC transfected as in A and by measuring the closure of the wound after 18h (left). Percents of wound closure were calculated from 4 scratches and illustrated as means \pm s.d. (right) **C:** Pseudo-capillaries formed by HUVEC transfected as in A and seeded for 18h on Matrigel (left). Quantification of endothelial cords is shown as the mean of 3 wells \pm s.d. (right).

Supplementary Figure S3: ALCAM expression in endothelial cell junctions, specificity of ALCAM target protector

A: Upper panel: relative quantification of ALCAM in HUVEC transfected with a control siRNA (siCtrl) or with two different siRNA directed against ALCAM transcripts (siALCAM #6 and siALCAM #7), Lower panel: Immunoblot of ALCAM protein (expected size 100-105 kDa) in HUVEC transfected with a control siRNA (siCtrl) or siRNAs targeting ALCAM (siALCAM). Actin expression is used as loading control. ALCAM levels measured by densitometry are indicated relative to actin. The siRNAs lowered the levels of ALCAM protein of 84% (siRNA #6) and 74% (siRNA #7) in transfected cells. **B:** ALCAM and VE-cadherin co-immunofluorescence performed in HUVEC transfected with siCtrl or with siALCAM. **C and D:** Relative quantification of miR126-5p (**C**) and CXCL12 (**D**) expression by RT-qPCR in HUVEC transfected with a control target blocker (Target Ctrl) or with the

target blocker protecting the site recognised by miR126-5p in the 3'UTR of ALCAM (Target ALCAM).

Supplementary Figure S4: Expression of miR126-5p in different lots of HUVEC, microarray results

A: Relative quantification of miR126-5p in the 3 different lots of HUVEC (lot#175 for 175973, Lot#74 for 74117, Lot#178 for 178776) used for the microarray analysis. **B:** List of the 7 mRNA that showed a >1.5 fold change of expression levels in the 3 lots of HUVEC after transfection of the LNA miR126-5p inhibitor when compared to HUVEC transfected with the LNA control inhibitor. Folds of up-regulation are indicated for each HUVEC lot. Three different HUVEC cell lots were used as replicates for this microarray analysis in order to avoid the identification of lot-dependent targets for miR126-5p. Genes for which the expression was modulated in all three HUVEC lots were considered as potentially valid targets for miR126-5p even when the *p* values were not significant due to the high variability between biological replicates in the amounts of miR126-5p as illustrated in A. **C:** Relative quantification of ADAM11, CNIH2, TTC16 and SetD5 in the 3 lots of HUVEC used for the microarray analysis and transfected with the LNA control inhibitor (α miRCtrl) or with the LNA miR126-5p inhibitor (α miR126-5p). Fam177B, INS and RNF222 were not detected in HUVEC, ADAM11, CNIH2 and TTC16 were detected but not up-regulated in either lot of HUVEC. SetD5 was up-regulated in the 3 lots of HUVEC.

Supplementary Figure S5: Validation of the target blockers

A, B & C: Relative quantification of ALCAM (A), CXCL12 (B) and miR126-5p (C) expression by qPCR in HUVEC transfected with a control target blocker (Target Ctrl) or with the target blocker protecting the site recognised by miR126-5p in the 3'UTR of SetD5 (Target SetD5).

D: Relative quantification of SetD5 expression by qPCR in HUVEC transfected with a control target blocker (Target Ctrl) or with the target blocker protecting the site recognised by miR126-5p in the 3'UTR of ALCAM (Target ALCAM).

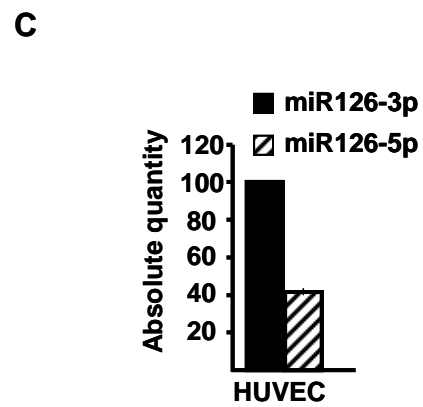
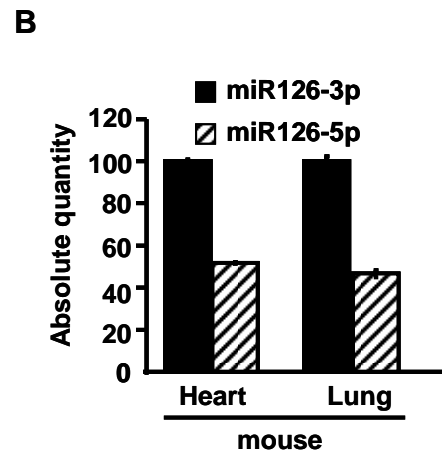
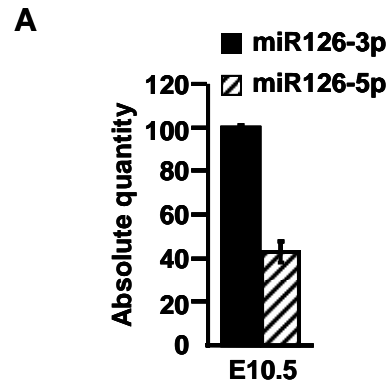
Supplementary Figure S6: Validation of the SetD5 siRNA

Relative quantification using RT-qPCR of SetD5 expression in HUVEC transfected either with the LNA control inhibitor (α miRCtrl) or with the LNA miR126-5p inhibitor (α miR126-

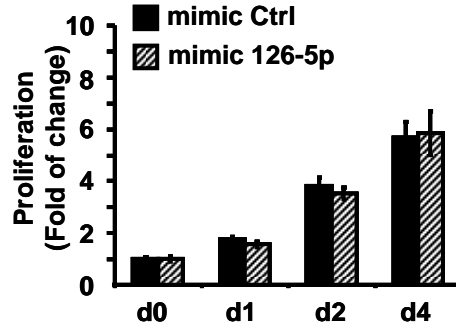
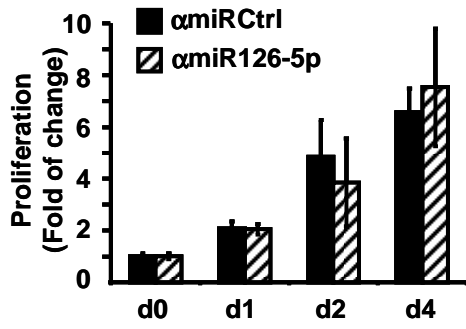
5p), and with a control non-targeted siRNA (siCtrl) or the siRNA directed against SetD5 (siSetD5).

Supplementary Figure S7: Validation of the inhibition of miR126-5p in vivo and ALCAM expression in the lung

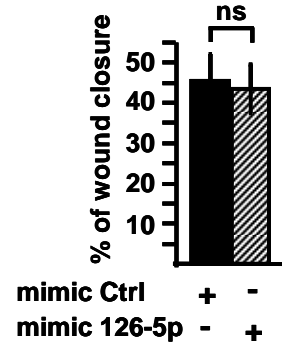
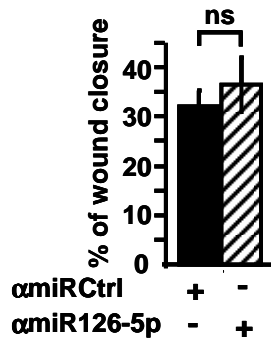
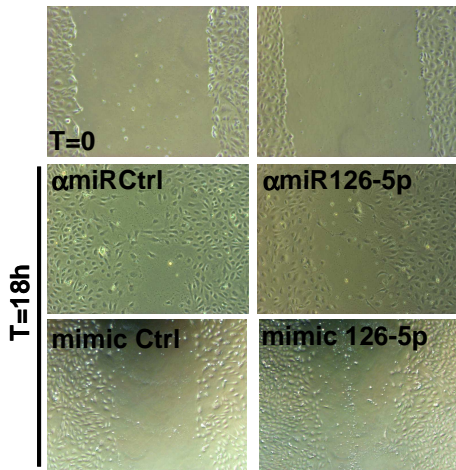
A: Relative quantification of miR126-5p in lungs (left panel) or in retina (right panel) from mice injected with the LNA control inhibitor (α miRCtrl) or with the LNA miR126-5p inhibitor (α miR126-5p) intraperitoneally or in the subretinal space, respectively. **B:** ALCAM immunoblot performed on lungs from mice injected intraperitoneally with the LNA control inhibitor (α miRCtrl) or with the LNA miR126-5p inhibitor (α miR126-5p). Left panel: Immunoblot showing 2 control lungs (α miRCtrl) and 2 lungs from pups injected with the miR126-5p inhibitor (α miR126-5p). Right panel: Relative ALCAM protein expression in lungs from control animals (α miRCtrl) or from animals injected with the miR126-5p inhibitor (α miR126-5p) as determined by densitometry analysis of the immunoblot.



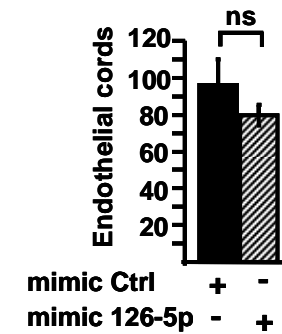
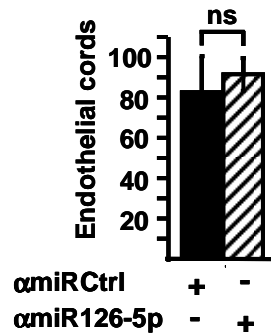
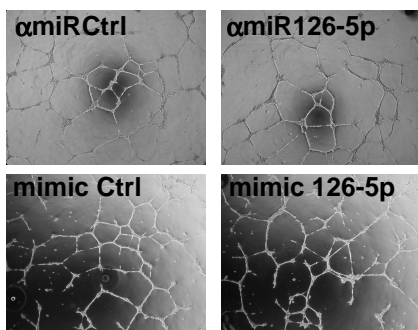
A



B

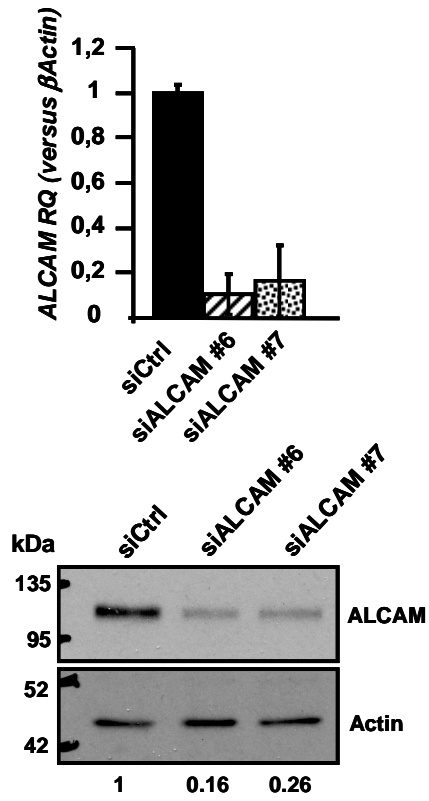


C

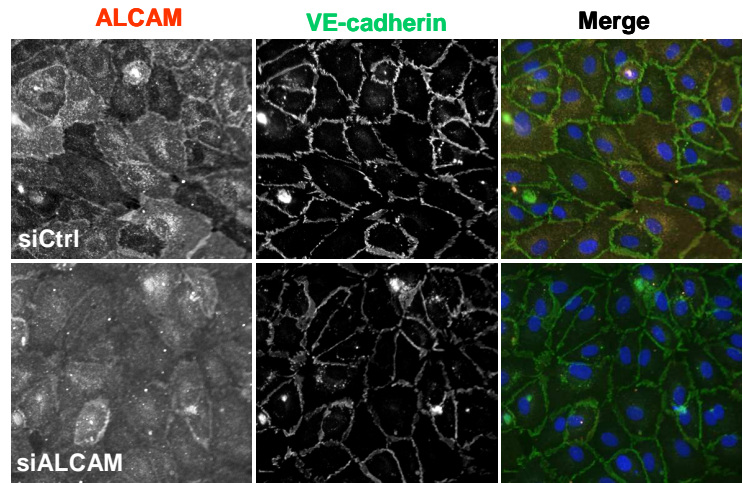


Supplementary Figure 2

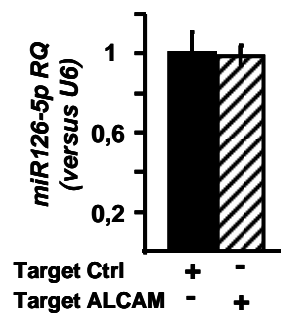
A



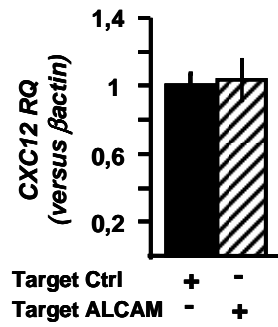
B



C

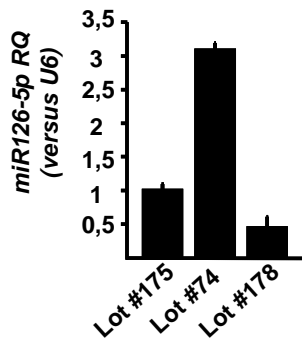


D



Supplementary Figure 3

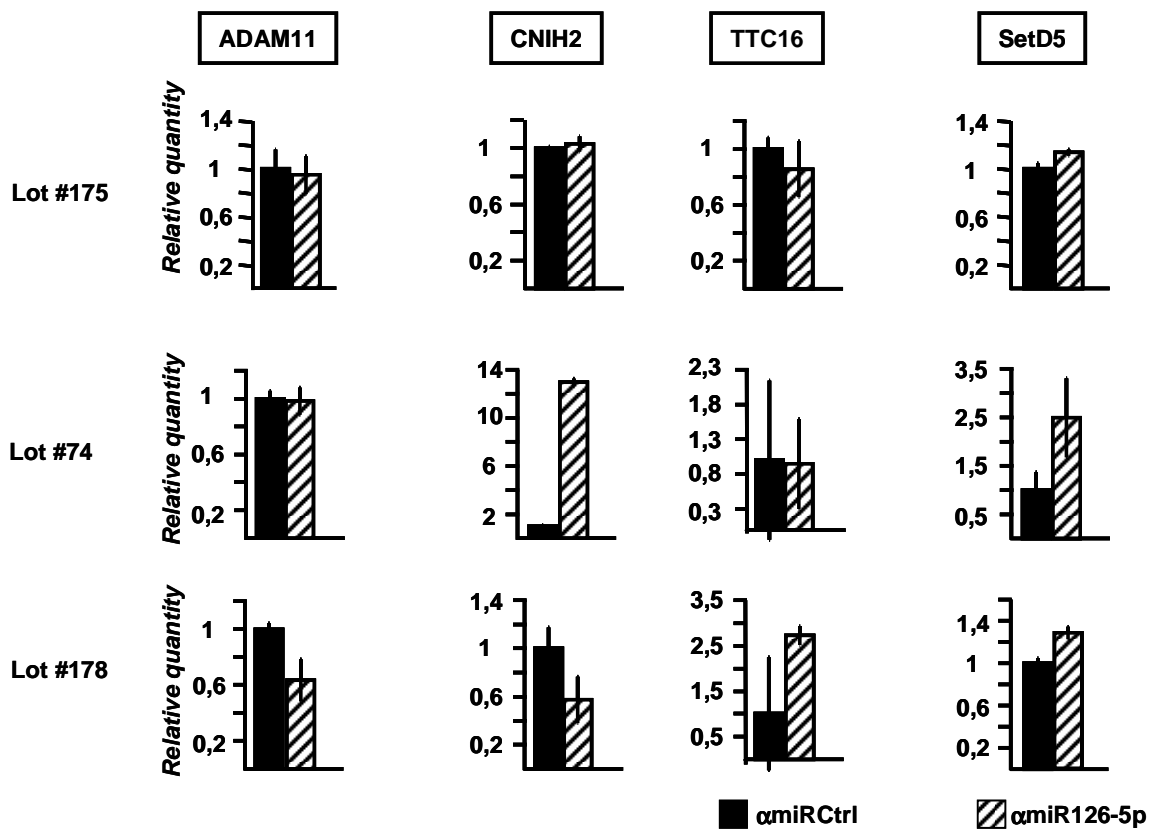
A



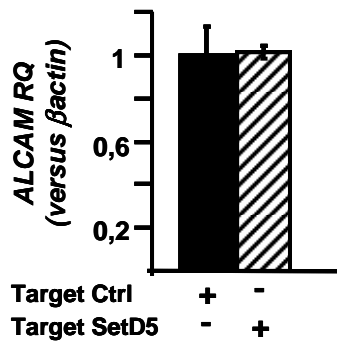
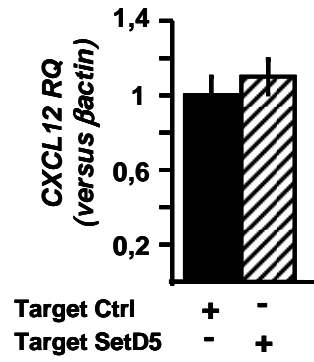
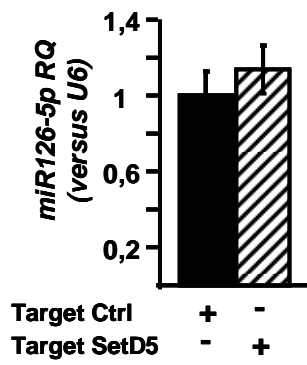
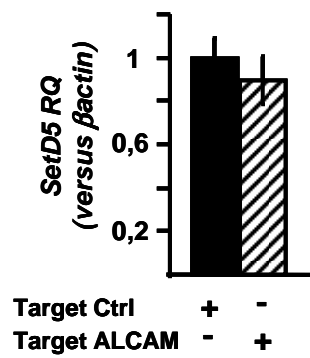
B

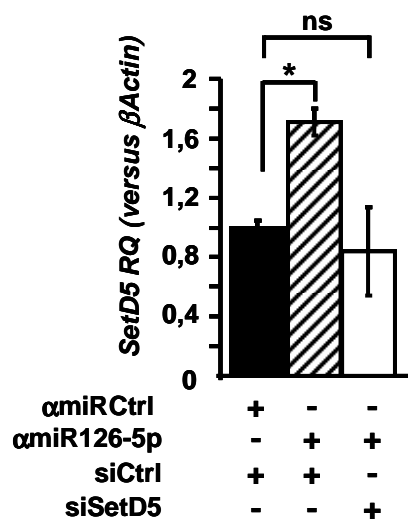
Gene name	Fold of change Lot #74	Fold of change Lot #175	Fold of change Lot #178	Gene functions
ADAM11	5.7	2.5	6.3	Adhesion molecule involved in Cell/cell or Cell/matrix interaction
CNIH2	5.1	2.9	3.2	Facilitate the secretion of HB-EGF
FAM177B	4.3	2.0	3.9	unknown
INS	2.1	1.6	1.7	Glucose metabolism
RNF222	1.5	1.5	1.9	unknown
SetD5	1.5	1.6	1.9	unknown
TTC16	3.1	1.6	3.5	unknown

C



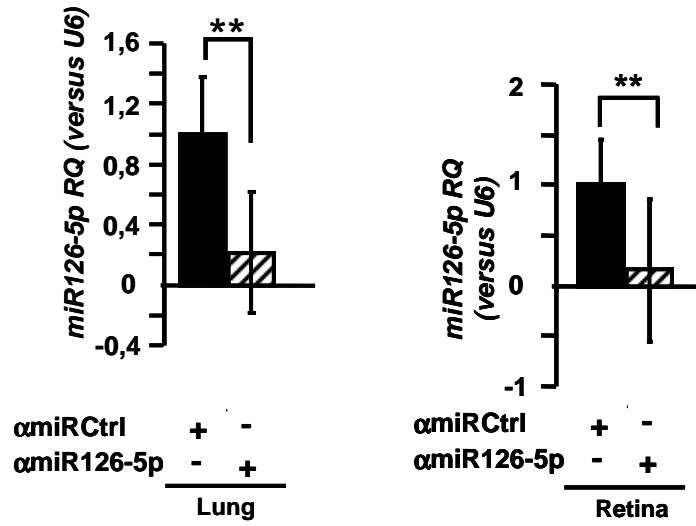
Supplementary Figure 4

A**B****C****D****Supplementary Figure 5**

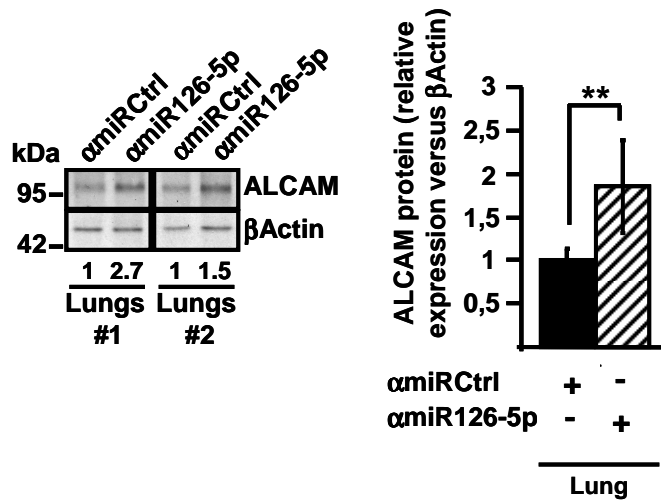


Supplementary Figure 6

A



B



Supplementary Figure 7

Supplementary Tables:

miR inhibitor or target protectors	Sequences
LNA control inhibitor #1	5' AGAGCTCCCTTCAATCCAAA 3'
LNA control inhibitor #2	5' CGCGTCAACAAAGT 3'
LNA miR126-5p inhibitor	5' CGCGTACCAAAAAGT 3'
LNA SetD5 Target protector	5' TTACATCTCTTG TG 3'
LNA Control Target protector (SetD5)	5' TTTCAAGTCTTCTG 3'
LNA ALCAM Target protector	5' TATTACACTTTCATGT 3'
LNA Control Target protector (ALCAM)	5' TATCATATTCTCATGT 3'

Table S1: Specific sequence of the LNA miR inhibitors and LNA target protectors

Taqman Assay:	reference
miR126-3p	Assay ID: 002228
miR126-5p	Assay ID: 000451
Human ALCAM	Hs00233455_m1
Mouse ALCAM	Mm00711623_m1
Human SetD5	Hs00216962_m1
Mouse SetD5	Mm00712606_m1
Human ADAM11	Hs00977706_m1
Human CNIH2	Hs00704421_s1
Human FAM177B	Hs01651959_g1
Human INS	Hs02741908_m1
Human RNF222	Hs03806118_m1
Human TTC16	Hs00376466_m1
Human CXCL12	Hs00171022_m1
U6	Assay ID: 001973
Human βActin	Assay ID: 4326315E

Table S2: References of the Taqman qPCR assays used in this study

Oligonucleotide name	Sequence
ALCAM-Forward	5' ATA AGC AAA TTG AAG CAT GAA CGT GGA TTG 3'
ALCAM-rev	5' AGG CAG ACA GCT ATG AGG GAT ATG TGA AGA 3'
SetD5-Forward	5' GGC TTC TGG ATA TGG GCA AAC T 3'
SetD5-Rev	5' TTT TTT TAT GGT TAA GAA TTT TAT TAT CAA 3'
ALCAM-miR126-5pmut-Fwd	5' AAG CAG TAC ATG AAA GTG TTT TTT TTA AAT GTC TAT 3'
ALCAM-miR126-5pmut-Rev	5' AAA GAT ACA TAG ACA TTT AAA AAA AAC ACT TTC ATG 3'
SetD5-miR126-5pdel-Fwd	5' GGC TTC TGG ATA TGG GCA AAC TGA A 3'
SetD5-miR126-5pdel-Rev	5' ATG GTT AAG AAT TTT ATT ATC AAA TGA AAG TTC AAA 3'

Table S3: Sequences of the oligonucleotides, used in this study, to clone and mutate the 3'UTR of ALCAM and SetD5 in the pMIR report plasmid.

L'étude de miR-126-5p dans les cellules endothéliales a permis de montrer son expression dans différents tissus chez la souris et son implication dans la régulation de l'adhérence et de la transmigration des leucocytes sur les cellules endothéliales. En régulant les expressions de SetD5 et d'ALCAM, miR-126-5p est alors capable de contrôler ces deux processus.

Expression de miR-126-5p dans les cellules endothéliales *in vitro* et *in vivo*

Tout comme son gène hôte (*egfl7*) ou son microARN complémentaire (miR-126-3p), miR-126-5p est majoritairement retrouvé dans l'endothélium *in vivo* et participe à différents mécanismes cellulaires endothéliaux. En effet, les expressions des deux microARNs sont retrouvés simultanément dans les endothéliums de différents organes (cœur, poumon...) et types cellulaires endothéliales (HUVECs, HUAECs...) à des ratios semblables. Des études précédentes avaient déjà démontré la présence simultanée du brin mature et du brin passager d'un duplex de microARN à des niveaux d'expression variables en fonction du tissu, du type cellulaire ou encore de l'espèce analysée (Biasiolo et al., 2011; Kuchenbauer et al., 2011; Ro et al., 2007). Ces résultats avaient permis de conclure que les deux brins complémentaires d'un duplex de microARN pouvaient être fonctionnels.

miR-126-5p contrôle négativement la diapédèse via la régulation de la protéine ALCAM

Les implications d'*egfl7*, gène hôte du duplex, et de miR-126-3p, brin mature du duplex, ont été démontrées durant le recrutement des leucocytes (Figure 26). En effet, *egfl7* régule l'expression des protéines VCAM-1, ICAM-1 ainsi que celle de la E-sélectine via des mécanismes encore inconnus à ce jour, lui conférant un rôle au cours du recrutement leucocytaire (Delfortrie et al., 2011). De plus, Harris et ses collaborateurs ont montré *in vitro* le rôle de miR-126-3p sur le recrutement des leucocytes par une régulation directe de l'expression de VCAM-1 (Harris et al., 2008). Il était alors possible d'envisager que miR-126-5p, brin passager du duplex, puisse contrôler des mécanismes biologiques similaires dans les cellules endothéliales. D'ailleurs, les deux rôles que nous avons attribués à miR-126-5p dans cette étude sont en accord avec cette hypothèse. Les variations d'expression des cibles

de miR-126-5p dans les différents organes pouvaient suggérer une action tissu-spécifique du microARN. Cette hypothèse a été confirmée dans les poumons et la rétine puisque miR-126-5p module uniquement l'expression de la protéine ALCAM dans le poumon et celle des transcrits SetD5 dans la rétine. Ces observations pourraient être expliquées par un effet dose des taux de transcrits cibles pour miR-126-5p dans chaque organe. En effet, les cibles de miR-126-5p fortement exprimées seraient plus accessibles à la répression du microARN contrairement à celle faiblement exprimées. Cependant, il n'est pas exclu que des protéines se liant à l'ARN et empêchant la fixation du microARN sur sa cible soient exprimées de façon spécifique dans certains tissus (Kedde et al., 2007). Elles moduleraient alors l'effet de miR-126-5p sur ALCAM et SetD5 uniquement dans certains tissus.

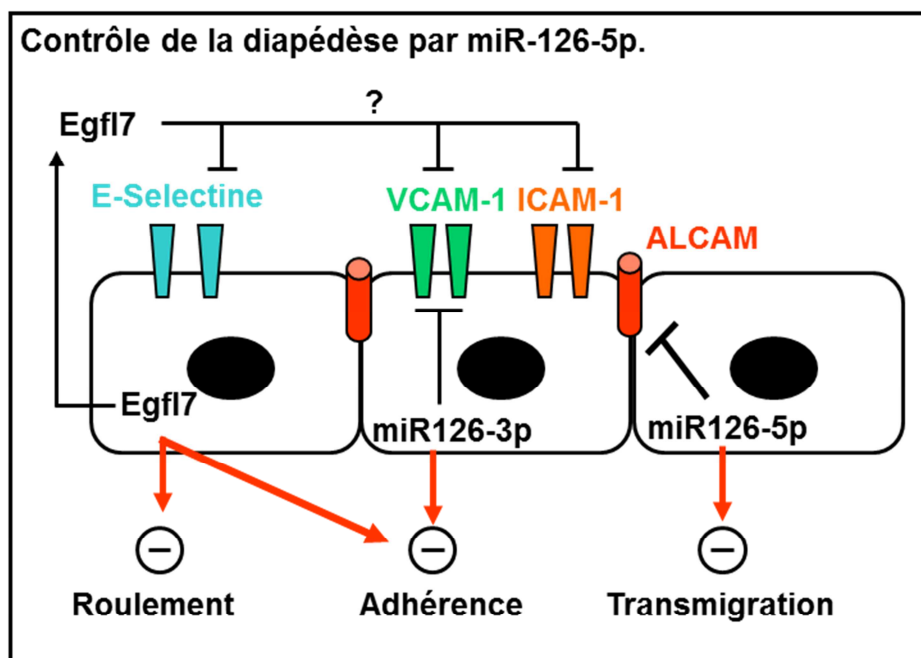


Figure 26 : Récapitulatif de l'action synergique d'egfl7 et de ses microARNs.

La répression d'ICAM-1, de VCAM-1 et de la E-sélectine par egfl7 permet la régulation du roulement et de l'adhérence des leucocytes à la surface de l'endothélium (Delfortrie et al., 2011). MiR-126-3p inhibe quant à lui l'adhérence des leucocytes via la régulation de VCAM-1 (Harris et al., 2008). Enfin, miR-126-5p réprime ALCAM et renforce l'effet de son gène hôte et de son microARN complémentaire.

ALCAM est impliqué dans de nombreux processus biologiques et en particulier dans le contrôle de la diapédèse des monocytes à travers l'endothélium grâce à sa localisation aux jonctions des cellules endothéliales *in vitro* et *in vivo* (Masedunskas et al., 2006; Ofori-Acquah et al., 2008). Dans notre étude, l'inhibition de miR-126-5p induit une augmentation d'expression de cette protéine dans les cellules endothéliales et facilite alors la transmigration

des monocytes/macrophages (THP-1) à travers le tapis de cellules endothéliales *in vitro* (Figure 26). D'autre part, les travaux de Cayrol et ses collaborateurs ont montré que la modulation de ce mécanisme a été observée *in vivo* dans l'endothélium du cerveau (Cayrol et al., 2008). Dans notre étude, il serait intéressant d'établir si miR-126-5p est capable de contrôler la transmigration des leucocytes dans les poumons. L'inhibition de miR-126-5p dans cet organe pourrait en effet conduire à une infiltration massive de leucocytes suite à l'augmentation d'expression d'ALCAM. Si tel était le cas, il serait également intéressant d'évaluer si la diapédèse est contrôlée par miR-126-5p via une modulation d'ALCAM dans les poumons. Pour cela, le blocage d'ALCAM *in vivo* permettrait de réduire l'infiltration leucocytaire due à l'inhibition de miR-126-5p.

Nos travaux viennent compléter également la notion selon laquelle il existe un maintien forcé de l'endothélium dans un état inactivé. En effet, *egfl7* (Delfortrie et al., 2011), miR-126-3p (Harris et al., 2008) ou encore miR-181b (via la régulation de la voie NF- κ B (Sun et al., 2012)) participent à ce mécanisme en maintenant l'endothélium inactivé en condition non inflammatoire. La triple inhibition *egfl7*/miR-126-3p/miR-126-5p pourrait finalement aboutir à une activation exacerbée de l'endothélium en absence de facteurs pro-inflammatoires.

En accord avec les fonctions de miR-126-5p que nous avons identifiées dans cette étude, il serait aussi intéressant d'établir si l'expression de ce microARN est sous contrôle de différentes cytokines inflammatoires (TNF- α , interleukine...). Il faut cependant noter que la régulation d'expression de miR-126-3p dans les cellules endothéliales par les cytokines inflammatoires est variable. Elle serait modulée par l'interleukine-3 (Dentelli et al., 2010b) mais serait insensible au TNF α (Harris et al., 2008).

miR-126-5p contrôle positivement l'adhérence des leucocytes via SetD5

Nous avons démontré que le contrôle de SetD5 par miR-126-5p entraînait la régulation de l'adhérence des leucocytes sur les cellules endothéliales *in vitro* (Figure 27). SetD5 ne possède actuellement aucune fonction connue mis à part un rôle potentiel au cours d'un syndrome de délétion interstitielle sur le chromosome 3 (Kellogg et al., 2013). Compte tenu de nos résultats, il serait intéressant d'établir si SetD5 contrôle les expressions de molécules d'adhérence endothéliales. Nos études préliminaires montrent que l'inhibition de SetD5 n'entraîne aucune modification d'expression des gènes endothéliaux majoritaires (VEGFR, Neuropiline, éphrine B2...). En revanche, l'inhibition de SetD5 dans les cellules endothéliales conduit à une augmentation de l'expression des transcrits d'ICAM-1, de

VCAM-1 ou encore de la E-selectine (résultats non montrés). De plus, cette régulation est aussi observée lors de la transfection du TargetBlocker SetD5 (séquence nucléotidique se fixant sur le site reconnu par miR-126-5p dans le transcrypt SetD5 pour empêcher l'effet du microARN) dans ces cellules, démontrant en plus la régulation indirecte de l'expression de ces gènes par miR-126-5p (résultats préliminaires). Ainsi, ces résultats suggèrent les premières fonctions du gène SetD5 dans le maintien de l'endothélium dans un état inactivé. Des études complémentaires permettraient d'étoffer les connaissances sur le rôle de SetD5 dans ce mécanisme. Au préalable, il faudrait vérifier que miR-126-5p, via SetD5, est bien capable *in vivo* de réguler positivement les expressions d'ICAM-1 et de VCAM-1. Actuellement, la rétine est le seul organe où ces vérifications peuvent être entreprises mais nos résultats (présentés en partie 2) ne s'orientent pas vers une régulation de ces molécules d'adhérence par miR-126-5p. Néanmoins, il n'est pas exclu que miR-126-5p soit impliqué dans la régulation des molécules d'adhérence dans d'autres organes. Enfin, les fonctions de SetD5 étant totalement inconnues, il est probable que ce gène soit aussi impliqué dans des mécanismes autres que le recrutement des leucocytes sur l'endothélium.

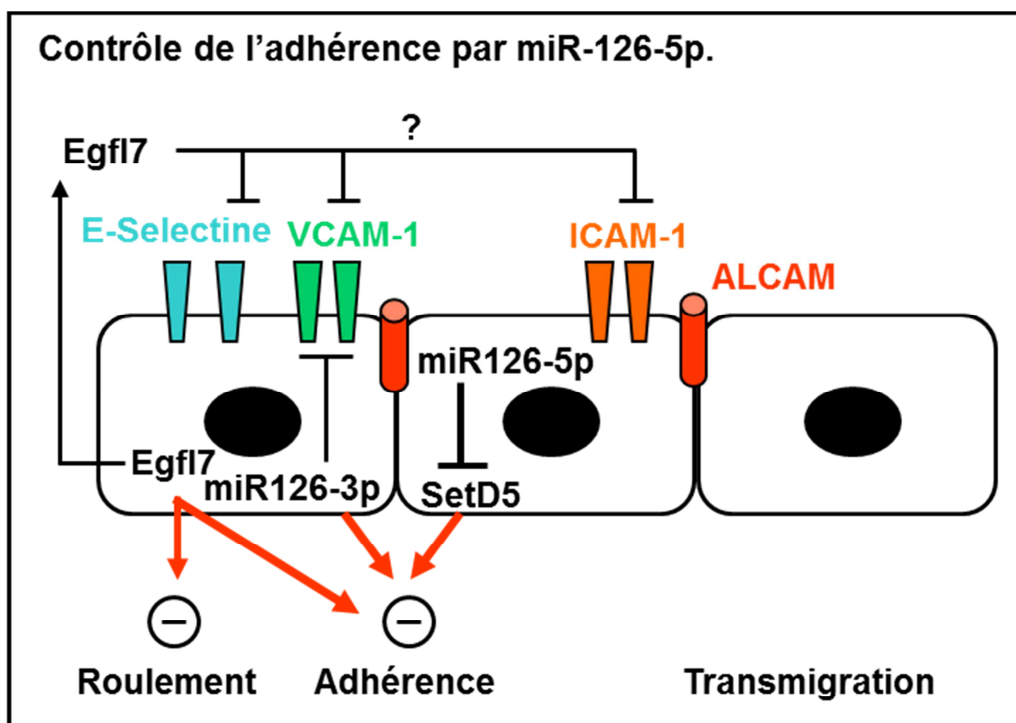


Figure 27 : Récapitulatif de l'action opposée d'egfl7 et miR-126-3p avec miR-126-5p sur l'adhérence des leucocytes.

MiR-126-5p inhibe SetD5, gène inhibiteur de l'expression des molécules d'adhérence.

Deuxième partie des résultats

Effet de l'inhibition de miR-126-5p sur le développement vasculaire de la rétine

Dans la première partie des résultats, nous avons mis en évidence un contrôle spécifique de l'expression de SetD5 par miR-126-5p dans la rétine. Il a donc semblé intéressant d'analyser les phénotypes induits par l'inhibition de miR-126-5p dans la vascularisation de la rétine afin de tenter d'établir un rôle pour ce microARN et sa cible SetD5 dans ce modèle.

La mise en place du réseau vasculaire de la rétine

La mise en place du réseau vasculaire de la rétine est un processus biologique particulièrement bien décrit d'un point de vue cellulaire et moléculaire. Au cours du développement embryonnaire de la souris, la rétine reçoit des nutriments et de l'oxygène par simple diffusion à partir du réseau hyaloïde, réseau artériel situé au niveau du corps vitré. Dès la naissance de l'animal, un réseau vasculaire propre à la rétine va se mettre en place et le réseau hyaloïde va régresser. Cette régression est assurée par différents mécanismes cellulaires et moléculaires impliquant les macrophages (Lang and Bishop, 1993), l'angiopoïétine-2 et son récepteur Tie-2 (Hackett et al., 2002) ou encore la Norrine (Luhmann et al., 2005). En effet, la régression du réseau hyaloïde est assurée, au cours de la première semaine de développement post-natal, par un recrutement de macrophages exprimant *wnt7b*. L'induction de la voie WNT canonique dans les cellules endothéliales entraîne alors la mort de celles-ci et donc la régression du réseau hyaloïde (Lobov et al., 2005). Cette commutation post-natale entre ces deux réseaux vasculaires (hyaloïde et rétinien) est spécifique à la souris. En effet, chez l'homme, elle se déroule au milieu de la gestation.

Le réseau astrocytaire

La mise en place du réseau vasculaire rétinien est précédé par une invasion astrocytaire, démarrant depuis le centre de la rétine vers la périphérie de celle-ci de manière centrifuge dès le premier jour de développement post-natal de l'animal (Fruttiger et al., 1996; Watanabe and Raff, 1988). Il existe une corrélation troublante entre la présence de ce réseau

astrocytaire et le réseau vasculaire rétinien. En effet, dans la rétine avasculaire de l'opossum ainsi que dans les zones avasculaires rétinienne chez le cheval, le lapin et les primates, les astrocytes ne sont pas non plus présents (Stone and Dreher, 1987). A l'inverse, dans toutes les zones vascularisées de ces rétines des astrocytes sont détectés. Ces observations suggèrent que la mise en place de ces deux réseaux, au cours du développement de la rétine, sont en étroite relation. Les astrocytes rétiens se différencient dans le nerf optique à partir de précurseurs astrocytaires suite à l'expression d'un facteur de transcription, Pax2 (Chu et al., 2001; Mi and Barres, 1999). Cependant, le mécanisme exact de différenciation reste aujourd'hui inconnu. En revanche, il existe un marqueur très précoce permettant de distinguer les astrocytes de la rétine par rapport à toutes autres populations cellulaires, le PDGFR α (*Platelet Derived Growth Factor alpha*). Le PDGFR α est exprimé par ces astrocytes dans le nerf optique bien avant qu'ils ne migrent et ne recouvrent la rétine. Le PDGFA (*Platelet Derived Growth Factor A*) est alors sécrété par les cellules ganglionnaires rétiennes et exerce une action mitogène sur les astrocytes de la rétine (Fruttiger et al., 2000; Mudhar et al., 1993). Les astrocytes immatures ont d'abord une forme de fuseau (allongée et bipolaire) au cours de leur migration avant d'acquérir leur morphologie finale étoilée. Ces cellules s'organisent en un réseau complexe à la surface de la rétine et expriment un faible taux de GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*) et un taux élevé de vimentine (Chu et al., 2001). Une hypoxie du tissu rétinien va permettre aux astrocytes d'exprimer fortement un facteur pro-angiogénique majeur considéré comme le stimulus principal de l'angiogenèse rétinienne, le VEGF-A (Pierce et al., 1996; Stone et al., 1995; West et al., 2005). Cette expression du VEGF-A par les astrocytes n'est pourtant pas indispensable au développement vasculaire rétinien puisque l'inactivation spécifique du VEGF dans les astrocytes par recombinaison homologue ne perturbe pas ce processus (Scott et al., 2010; Weidemann et al., 2010). Néanmoins, il a été établi que le VEGF sécrété par les astrocytes participait à d'autres mécanismes fondamentaux du maintien de l'intégrité vasculaire rétinienne comme la stabilisation des vaisseaux sanguins de la rétine (Scott et al., 2010) ou la néovascularisation suite à une ischémie vasculaire (Weidemann et al., 2010). Pourtant, l'implication majeure du réseau astrocytaire dans la migration des cellules endothéliales en condition physiologique n'est pas remise en cause. En effet, les souris n'exprimant plus les chaînes $\beta 2$ et/ou $\gamma 3$ des laminines développent un réseau astrocytaire anormal dû à un défaut de migration des astrocytes, empêchant alors le bon développement du réseau vasculaire de la rétine (Gnanaguru et al., 2013). Enfin, l'extension du réseau vasculaire rétinien sur le plexus

astrocytaire permet aux astrocytes d'acquérir un phénotype de plus en plus mature. La maturation de ces cellules est assurée par un facteur provenant des cellules endothéliales nommé LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*). La présence de LIF induit une augmentation de l'expression de GFAP, une inhibition de la vimentine et du VEGF-A ainsi qu'une morphologie étoilée caractéristique des astrocytes matures (Chu et al., 2001; Kubota and Suda, 2009; West et al., 2005). Ce processus de maturation induit un rétrocontrôle négatif limitant à la fois le nombre d'astrocytes et le nombre de vaisseaux sanguins (West et al., 2005).

Le réseau vasculaire de la rétine

La formation du réseau vasculaire dans la rétine est parfois controversée. Dans la littérature, différents auteurs soutiennent que le développement des vaisseaux rétiens est établi par vasculogénèse (Chan-Ling et al., 1990; Hughes et al., 2000) alors que d'autres soutiennent la théorie de l'angiogénèse (Fruttiger, 2002; Gerhardt et al., 2003). Selon la théorie de la vasculogénèse, les vaisseaux se différencieraient *in situ* à partir de précurseurs de cellules endothéliales alors que selon la théorie de l'angiogénèse, le nouveau réseau vasculaire bourgeonne à partir d'un réseau vasculaire existant.

Tout comme le réseau astrocytaire, la mise en place des vaisseaux sanguins débute au niveau du centre optique de la rétine et s'étend de façon centrifuge à la surface de celle-ci au cours de la première semaine après la naissance de l'animal (Figure 28). Les vaisseaux localisés à la périphérie du réseau vasculaire sont moins matures que ceux situés au centre de la rétine ce qui crée un gradient de différenciation vasculaire (Fruttiger, 2007). Le front de migration est composé de deux types de cellules endothéliales : les *tip cells* et les *stalk cells*. Les *stalk cells* sont localisées en aval des *tip cells* qui elles, sont situées aux extrémités du réseau. Les *stalk cells* présentent une morphologie similaire à celles des cellules endothéliales alors que les *tip cells* sont de formes allongées, émettent des filopodes à leurs extrémités et ne forment pas de lumière. Ces différentes cellules jouent des rôles distincts pendant l'angiogénèse. En effet, les *stalk cells* prolifèrent et permettent aux vaisseaux de s'étendre alors que les *tip cells* ne prolifèrent pas mais migrent et donc guident les vaisseaux vers la périphérie de la rétine grâce à leurs filopodes (Gerhardt et al., 2003). Au terme de la première semaine, la rétine est totalement recouverte d'un plexus vasculaire complexe mais inachevé. Afin d'obtenir un réseau de vaisseaux sanguins matures et hiérarchisé en veines (enchâssées dans un réseau dense de capillaires) et artères (associées à des zones dépourvues de capillaires), différents

mécanismes comme la différenciation artério-veineuse, la maturation vasculaire et l'élagage vont alors se mettre en place.

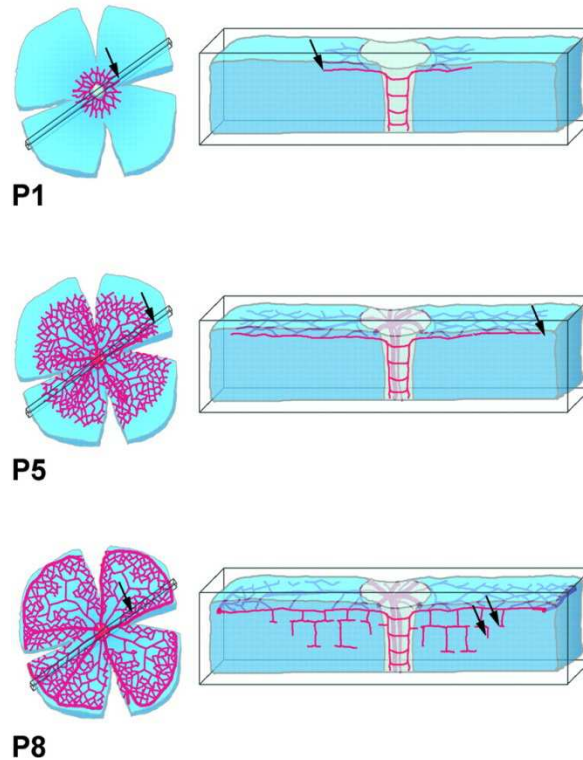


Figure 28 : Développement du réseau vasculaire superficiel de la rétine.

Le plexus vasculaire de la rétine se met en place au niveau du nerf optique au centre de la rétine et migre vers la périphérie de celle-ci au cours de la première semaine. Durant la seconde semaine, les cellules endothéliales migrent dans les différentes couches profondes de la rétine afin de les vasculariser (Gerhardt et al., 2003).

La différenciation artério-veineuses

La hiérarchisation des différents types de vaisseaux s'établit au cours des premières semaines. Cette hiérarchisation implique l'expression de différents gènes conférant aux vaisseaux leur identité. Les vaisseaux exprimant éphrineB2 deviendront à terme des artères alors que les vaisseaux qui expriment son récepteur EphB4 se différencieront en veines. L'inactivation de ces gènes est létale au bout de 9,5 jours de développement embryonnaire suite à des aberrations de la hiérarchisation du réseau vasculaire dans le sac vitellin (Adams et al., 1999; Wang et al., 1998). De plus, ces acteurs moléculaires sont impliqués dans la prolifération et la migration des cellules endothéliales (Kim et al., 2002; Steinle et al., 2002, 2003). A terme, de nouveaux marqueurs artériels comme Dll4, la neuropiline-1 et le VEGFR2 ainsi que de nouveaux marqueurs veineux tels que le VEGFR3, la neuropiline-2 et

le facteur de transcription COUP-TFII (*COUP Transcription Factor 2*) seront exprimés (Rocha and Adams, 2009).

La maturation vasculaire

Au cours de la différenciation artère/veine, la stabilisation du réseau vasculaire est prise en charge par des cellules périvasculaires spécialisées. Ces cellules sont séparées en deux groupes : les péricytes et les cellules musculaires lisses. Dans la vascularisation de la rétine, les cellules musculaires lisses se localisent au niveau des artères alors que les péricytes recouvrent l'ensemble du réseau vasculaire. Les cellules endothéliales recrutent les cellules périvasculaires par induction de cascade de signalisation. Le PDGF-B (*Platelet-Derived Growth Factor B*) est un puissant facteur chimioattractant pour les cellules musculaires lisses. Le PDGF-B, sécrété par les *tip cells*, se fixe sur son récepteur, le PDGFR β (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor β*) exprimé par les cellules musculaires lisses. L'inactivation du gène du *PDGF-B* entraîne la létalité des embryons de souris juste avant la naissance suite à de sévères hémorragies dues à l'absence de recrutement des cellules périvasculaires (Levéen et al., 1994). Les souris n'étant pas viables, il n'a pas été possible d'établir le rôle du PDGF-B dans le recrutement des cellules périvasculaires sur la stabilisation des vaisseaux sanguins rétiniens. En revanche, l'injection intraoculaire de PDGF-B conduit à un détachement des cellules murales et l'inhibition du PDGFR β grâce à un anticorps bloquant, appelé APB5 (*Anti PDGF receptor β*), empêche le recrutement de ces mêmes cellules (Uemura et al., 2002). L'injection de cet anticorps provoque par ailleurs un phénotype vasculaire spécifique où les vaisseaux présentent de plus gros diamètres (Figure 29).

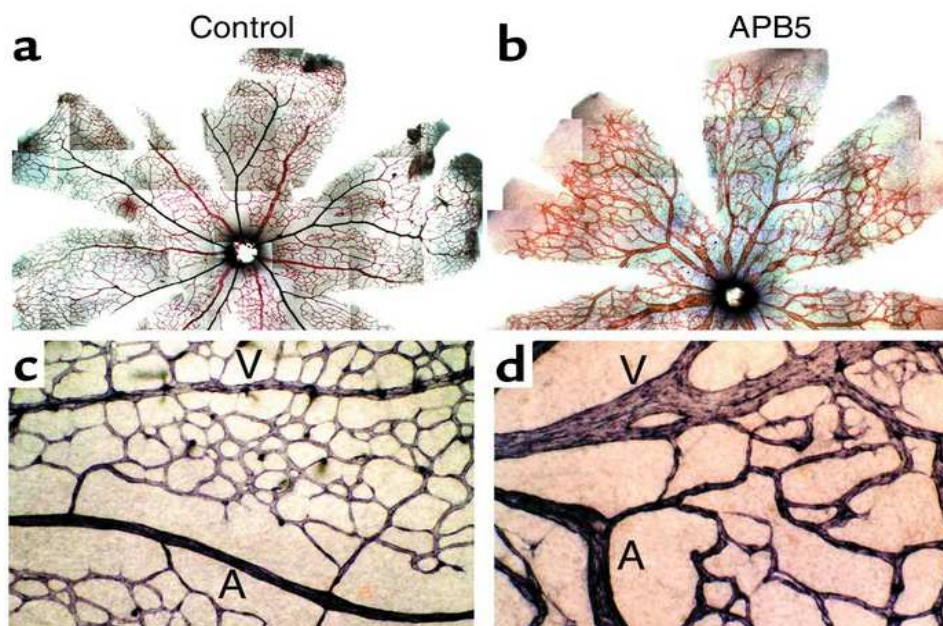


Figure 29 : Inhibition du recrutement des cellules périvasculaires suite à l'inhibition du PDGFR β .

La perte des cellules murales entraîne un élargissement du diamètre des trois types de vaisseaux sanguins présent dans la rétine : Artères (A), Veines(V) et Capillaires (Uemura et al., 2002).

Les cellules périvasculaires produisent les angiopoïétines 1 (Ang1) et 2 (Ang2) qui interagissent avec leur récepteur commun Tie2. Ces facteurs sont indispensables pour le recrutement des cellules périvasculaires des vaisseaux nouvellement formés. L'inactivation du gène *Ang1* ou *Tie2* entraîne la mort des embryons au milieu de la gestation en raison de malformations cardiovasculaires suite à un mauvais recrutement des cellules périvasculaires (Sato et al., 1995; Suri et al., 1996). Inversement, l'angiopoïétine 2 joue un rôle antagoniste à celui de l'angiopoïétine 1. En effet, la surexpression de l'angiopoïétine 2 chez des souris transgéniques aboutit au même phénotype que celui observé suite à l'inactivation du gène *Tie2* ou *Ang1* (Maisonpierre et al., 1997). Dans la rétine, des injections intravitrées d'angiopoïétine 2 ont été effectuées chez des rats adultes et ont abouti à une chute du recrutement des péricytes (Hammes et al., 2004).

Le TGF β (*Transforming Growth Factor β*) intervient aussi dans cette interaction entre les cellules périvasculaires et les cellules endothéliales. Plusieurs études montrent que le TGF β inhibe la prolifération et la migration des cellules endothéliales lorsqu'elles sont en contact avec les cellules périvasculaires (Orlidge and D'Amore, 1987; Sato and Rifkin, 1989; Sato et al., 1990). D'autres facteurs tels que ceux de la famille des sphingosine-1-phosphates (Liu et al., 2000), ceux de la famille des EphrineB (Salvucci et al., 2009), la Norrine (Zuercher et al., 2012) ou encore les récepteurs Notch (Ehling et al., 2013) participent aussi au recrutement des cellules périvasculaires pendant le développement des vaisseaux sanguins.

L'élagage vasculaire de la rétine

En aval du front de migration du réseau vasculaire rétinien, se trouve un réseau dense de capillaires qui va au fur et à mesure du développement être remodelé pour aboutir à un réseau vasculaire hiérarchisé (environ à la fin de la première semaine de développement post natal). Il sera alors possible de distinguer les veines, les artères ainsi que les capillaires par leurs aspects morphologiques. Le remodelage du réseau vasculaire passe principalement par une étape d'élagage qui donne entre autre naissance aux zones dépourvues de capillaires autour des artères. L'absence de capillaire autour des artères pourrait être due à des mécanismes de migration, de relocalisation des cellules endothéliales (Hughes et al., 2000) ou d'apoptose via le CD18 (Ishida et al., 2003). Dans cette dernière étude, le blocage du ligand de Fas (Fas-L), acteur majeur de l'apoptose des cellules endothéliales, ou celui de l'intégrine CD18, située à la membrane des lymphocytes T CD8+, augmente la densité du réseau vasculaire de la rétine. Les lymphocytes CD8+ se fixeraient sur les cellules endothéliales via une interaction CD18/ICAM-1 favorisant alors une interaction Fas/Fas-L, initiatrice de la mort cellulaire programmée des cellules endothéliales (Figure 30) (Ishida et al., 2003).

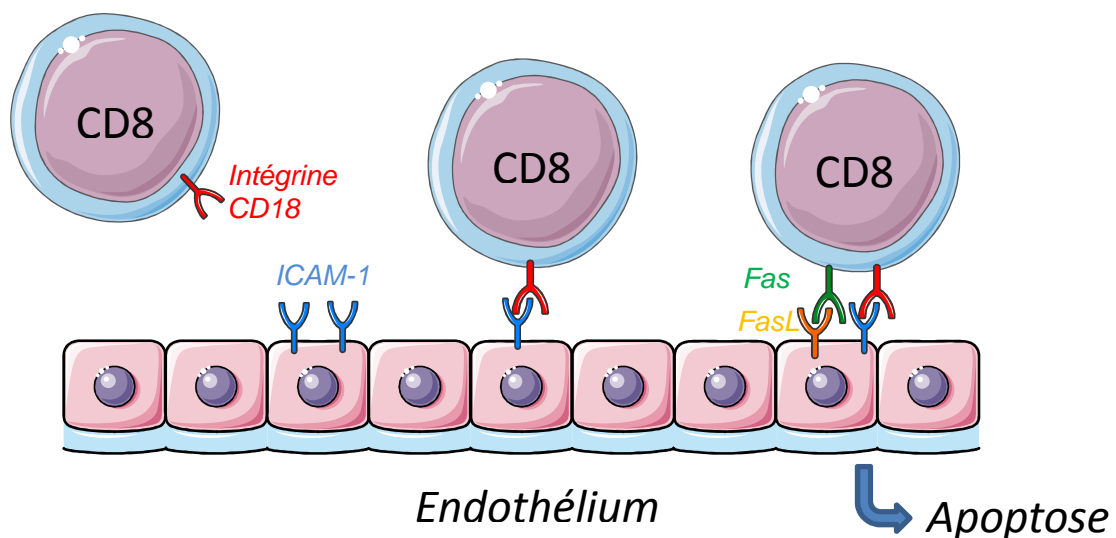


Figure 30 : Elagage vasculaire de la rétine.

Les lymphocytes CD8+ exprimant l'intégrine CD18 viennent adhérer au niveau de l'endothélium en interagissant avec ICAM-1. Cette fixation induit alors une interaction Fas/Fas-L aboutissant à l'apoptose des cellules endothéliales.

Les macrophages pourraient également participer au processus d'élagage du réseau vasculaire rétinien. Cependant, le rôle des macrophages dans la vascularisation rétinienne

semble complexe et double (Figure 31). La déplétion des macrophages par injection intraoculaire de liposomes de chlodronate aboutit à une réduction de la densité vasculaire (Checchin et al., 2006). Les macrophages favoriseraient la formation du plexus vasculaire soit en promouvant la liaison entre deux cellules endothéliales (Fantin et al., 2010) soit en sécrétant un facteur non identifié (Rymo et al., 2011). Inversement, l'activation des macrophages résidents de la rétine (microglie), provoquée par une hyperoxie, entraîne une surexpression d'interleukine 1 β et de sémaphorine 3a induisant une mort des cellules endothéliales de la rétine et donc une perte des capillaires (Rivera et al., 2013).

Le VEGF jouerait, lui aussi, un rôle de médiateur de l'élitage vasculaire de la rétine. En effet, les souris n'exprimant plus le VEGF120, la forme diffuse du VEGF-A, montre un élitage défectueux (Stalmans et al., 2002).

Vascularisation des couches profondes de la rétine

À partir de la seconde semaine de développement vasculaire rétinien, le processus angiogénique va se dérouler dans les couches profondes de la rétine. Cette progression en profondeur s'établit lorsque les cellules endothéliales ont atteint l'extrémité périphérique de la rétine. La migration des cellules endothéliales dans les différentes couches se produit à partir des veines, veinules et des capillaires proches des veines et démarrera de manière perpendiculaire au plexus primaire. Comme pour la migration des cellules endothéliales pendant la première semaine, la pénétration de ces cellules dans les couches profondes démarrera au centre de la rétine puis s'étendra vers la périphérie (Fruttiger, 2007).

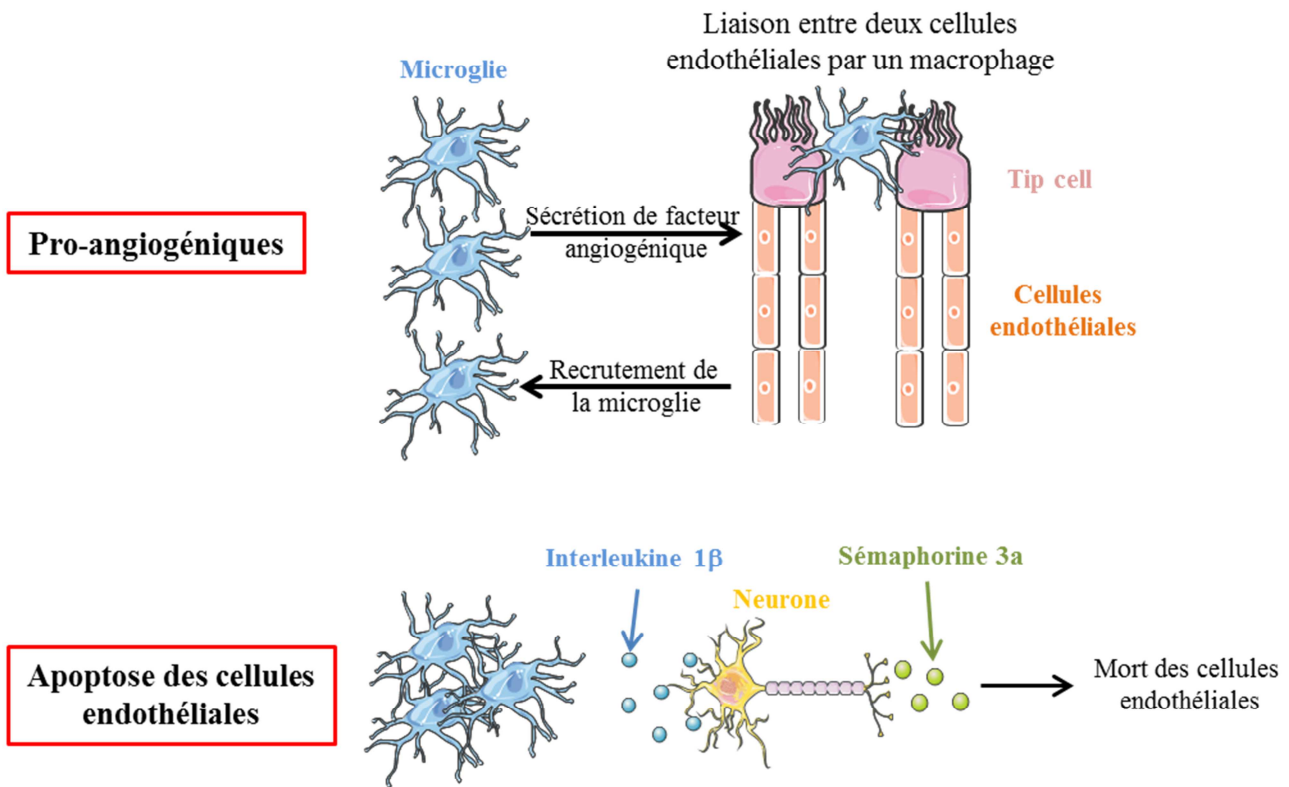


Figure 31 : Implications des macrophages au cours de la vascularisation rétinienne.

Les macrophages jouent un double rôle lors de la vascularisation rétinienne : soit ils favorisent les pontages entre deux cellules endothéliales, soit ils induisent l'apoptose de ces cellules.

Matériels :

Anticorps primaires

Anticorps primaire	Type, Hôte	Dilution	Fournisseur
Collagène IV	Polyclonal, Lapin	1/500	abcam, ab6586
CD31	Monoclonal, Rat	1/500	BD Pharmingen, 553370
Caspase 3	Monoclonal, Lapin	1/500	Cell Signaling, 5A1E
GFAP couplé au Cy3	Monoclonal, Souris	1/500	Sigma, C9205
SMA-FITC	Monoclonal, Souris	1/100	Sigma, 1A4
NG2	Polyclonal, Lapin	1/500	Chemicon, AB5320
CD45	Monoclonal, Rat	1/500	BD Pharmingen, 550539
CD8	Polyclonal, Chèvre	1/500	Santa Cruz, sc-1142
CD204	Monoclonal, Rat	1/500	AbD serotec, MCA1322T

Tableau 4 : Anticorps primaires utilisés pour les immunofluorescences

Anticorps secondaires

Anticorps secondaire	Couplage	Hôte	Fournisseur
IgG de Lapin	Alexa-594, 488, 350	Ane	Invitrogen, A21207 ; A21206 ; A10039
IgG de Rat	Alexa-594, 488	Ane	Invitrogen, A21209 ; A21208
IgG de Chèvre	Alexa-594	Ane	Invitrogen, A11058

Tableau 5 : Anticorps secondaires utilisés pour les immunofluorescences

Méthodes :

Dissection des rétines

Suite au sacrifice des animaux et à l'extraction des yeux, les rétines de souris sont disséquées. Les yeux sont fixés 5 minutes en 4% de PFA (paraformaldéhyde). La dissection est réalisée sous loupe binoculaire (Nikon SMZ 1000) à l'aide d'une fine aiguille de 26 Gauge et d'une pince dumont n°5. Grâce à l'aiguille, la cornée est percée pour y introduire l'extrémité des pinces fines. Une fois ces pinces insérées, elles permettent de délicatement écarter puis retirer la sclérotique pour isoler la rétine et le cristallin. Le cristallin et le réseau hyaloïde persistant sont finalement éliminés à l'aide de deux pinces pour ne conserver que la rétine. Cette rétine est soit fixée toute la nuit dans 4% de PFA, déshydratée au méthanol et stockée à -20°C pour les hybridations *in situ* et immunomarquages, soit congelée directement, sans fixation, en azote liquide à -80°C pour l'extraction des ARNs.

Hybridation *in situ in toto* de miR-126-3p et miR-126-5p

Les rétines sont fixées en PFA 4% toute la nuit à 4°C puis rincées avec du PBT (PBS, 0.1% Triton-X100) et traitées avec la protéinase K à 20µg/ml en PBT pendant 30 minutes à température ambiante. Après ce traitement, les échantillons sont fixés à l'aide d'une solution de PFA 4%, 0.2% glutaraldéhyde en PBT pendant 20 minutes. Après une pré-hybridation toute la nuit dans le tampon d'hybridation (50% formamide, 5X SSC, 0.1% Triton-X100, 9.2mM d'acide citrique, 500µg/mL tRNA Coli et 50µg/mL d'héparine), les rétines sont hybridées sur la nuit dans le même tampon avec 10nM de sondes miR-126-3p ou -5p marquées en 5' et 3' à la digoxigénine (miRCury LNA detection probe, Exiqon) respectivement à 51 et 43°C. Les rétines sont ensuite lavées dans un tampon de lavage (solution 2) (50% formamide, 5X SSC, 0.1% Triton-X100, 9.2mM d'acide citrique) à 51°C pour miR-126-3p et 43 °C pour miR-126-5p pendant 15 minutes. Plusieurs lavages vont ensuite être effectués à 43°C (miR-126-5p) et 51°C (miR-126-3p) avec un mélange du tampon de lavage (solution 2) et une solution contenant du 2X SSC/0.1% Triton-X100 en PBT (SSCT) pendant 15 minutes chacun (75% solution 2/25% SSCT, 50% solution 2/50% SSCT, 25% solution 2/75% SSCT, 100% SSCT puis 0.2X de SSCT). Plusieurs lavages vont être effectués ensuite à température ambiante (75% SSCT 2X/25% PBST (PBS contenant 0.1% Tween 20), 50% SSCT 2X/50% PBST, 25% SSCT 2X/75% PBST, 100% PBST) pendant 10 minutes. Les rétines sont ensuite traitées avec 2% de sérum de mouton, 2mg/ml

BSA en PBST pendant 1 heure à température ambiante avant d'être incubées avec un anticorps anti-digoxigénine couplé à la phosphatase alcaline (Roche) durant toute la nuit à 4°C. Le lendemain, les rétines sont lavées à plusieurs reprises toutes les heures à température ambiante puis toute la nuit à 4°C dans une solution contenant 2mM de levamisole en PBST. La révélation est établie dans 100mM NaCl, 100mM Tris-HCL pH 9.5, 50mM MgCl₂, 0.1% Tween 20 contenant 4.5µL de NBT + 3.5µL de BCIP/mL. Les rétines sont ensuite montées entre lame et lamelles puis observées et photographiées sous une loupe binoculaire (Nikon).

Isolement des cellules CD31 positives de la rétine

Les rétines de souriceaux de 3 jours sont prélevées, lavées puis coupées en petits morceaux avant une digestion à la collagénase de type I (2mg/mL, Life Technologies) et à la DNase I (10µg/mL, Roche) en DMEM pendant 40 minutes. Les homogénats sont filtrés (70µm) avant de neutraliser la collagénase. Après une lyse des hématies, les cellules sont incubées avec un anticorps bloquant (1µg/10⁶ cellules, Becton Dickinson) pendant 45 minutes à 4°C sous agitation. Les cellules sont ensuite incubées avec des billes magnétiques (Life Technologies) pré-incubées avec 1.5µg d'anticorps anti-CD31 (Becton Dickinson) dans 25µL de suspension de billes magnétiques. Les cellules CD31+ sont isolées selon les conditions décrites par le fournisseur. Les cellules isolées sont centrifugées et le culot est repris en Trizol pour effectuer des analyses par qPCR.

Culture cellulaire et transfection

Les cellules HUVEC (*Human umbilical vein endothelial cells*) (Lonza) et HUAEC (*Human umbilical artery endothelial cells*) (Lonza) sont cultivées dans du milieu EGM-2 (Lonza) à 37°C, 5% CO₂ et les HMVEC-L (*Human MicroVascular endothelial cells*) dans de l'EGM-2 MV à 37°C, 5% CO₂ suivant les recommandations du fournisseur. Les cellules sont transfectées avec du Primefect siRNA transfection Reagent (Lonza) en suivant les instructions du fournisseur.

Retrotranscription, quantification absolue et relative

Les ARNs totaux sont extraits des cellules et des rétines à l'aide du Trizol (Life Technologies) puis purifiés selon les instructions du fournisseur. 1µg des ARNs totaux sont retrotranscrits grâce au kit *High capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems). Dans le but de quantifier les microARNs, 10ng des ARNs totaux sont retrotranscrits à l'aide

du Taqman microRNA reverse Transcription Kit et des primers spécifiques de miR-126-3p, miR-126-5p et U6. La quantification relative est effectuée avec le Taqman gene expression master mix ainsi que des sondes Taqman (miR-126-3p (ID : 002228) miR-126-5p (ID : 000451) et VEGF-A (Mm01281449_m1) de chez Applied biosystems) utilisés sur un appareil à qPCR (StepOne). Les expressions des microARNs et des ARNm sont normalisées par rapport à U6 et l'actine en utilisant la méthode du $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Pour la quantification absolue, des courbes standards sont générées en utilisant une quantité connue de miR-126-3p et miR-126-5p et servent à établir le niveau d'expression de ces deux microARNs dans les échantillons d'intérêt. Les graphiques représentent les résultats où l'expression de miR-126-3p est considérée à 100%.

Immunofluorescence sur les rétines *in toto*

Les rétines de souris sont incubées toute la nuit dans une solution bloquante et perméabilisante contenant 1% de BSA (Sigma) et 0,5% de Triton en PBS 1X à 4°C. Des lavages de 10 minutes en PBS 1X sont réalisés avant d'incuber les rétines avec différents anticorps primaires (Tableau 4) dans une solution d'incubation contenant 0,5% de BSA (Sigma) et 0,25% de Triton en PBS 1X toute la nuit à 4°C. Il est à noter que l'anticorps primaire anti-SMA est directement couplé au FITC (Fluorescein isothiocyanate), les incubations sont alors réalisées à l'obscurité. Des lavages de 10 minutes en PBS 1X sont alors appliqués avant une incubation de 2 heures à l'obscurité avec les anticorps secondaires, (Tableau 5) dans la même solution d'incubation que précédemment à température ambiante. Trois lavages de 5 minutes au PBS 1X sont réalisés avant une fixation 5 minutes dans 4% de PFA en PBS 1X. Enfin, les rétines sont montées entre lames et lamelles en mowiol® avant observation au microscope à fluorescence (Imager.Z1, Zeiss).

Cytométrie en flux

Les cellules HUVECs sont trypsinisées, culotées puis comptées. Après plusieurs lavages en tampon TP1 (PBS + 0.1% BSA + 2mM EDTA), la suspension est reprise en tampon Annexine V (Invitrogen) à 1.10^6 cellules/mL avant d'être répartie dans plusieurs tubes à un volume de 100 μ L. 5 μ L d'anticorps anti-annexine V (Invitrogen) et 1 μ l d'iodure de propidium (Invitrogen) (100 μ g/mL) sont ensuite ajoutés pendant 30 minutes sur glace à l'obscurité avant d'ajouter 2mL de PBS et de centrifuger 5 minutes à 4°C. Le culot est enfin repris dans 500 μ L de TP1 puis analysé au cytomètre.

ELISA pour le VEGF-A

Les rétines sont disséquées sur glace sans fixation. Les rétines sont soniquées 2 fois 15 minutes dans 200µL de PBS 1X pour les dissocier totalement. La procédure expérimentale d'ELISA utilisée est celle décrite par le fournisseur (Quantikine Mouse VEGF Immunoassay, R&D).

Inhibition de miR-126-5p *in vivo*

Des injections intraoculaires d'inhibiteur de microARN (LNA, 0.5µl d'antimiR à 1mg/ml) couplé au cholestérol sont réalisées 3 jours après la naissance de l'animal (P3) pour un sacrifice à 6 jours (P6). Ces injections se déroulent en animalerie avec une seringue Hamilton de 5µl sous loupe binoculaire. Les animaux sont injectés selon le protocole de Matsuda et Cepko (Matsuda and Cepko, 2004). Le suivi de l'injection est rendu possible grâce à la présence de Fast green 1% en PBS 1X (1/10^{ème} du volume final d'injection) ajouté à la solution d'intérêt. Enfin les animaux sont replacés avec leurs mères après leur réveil.

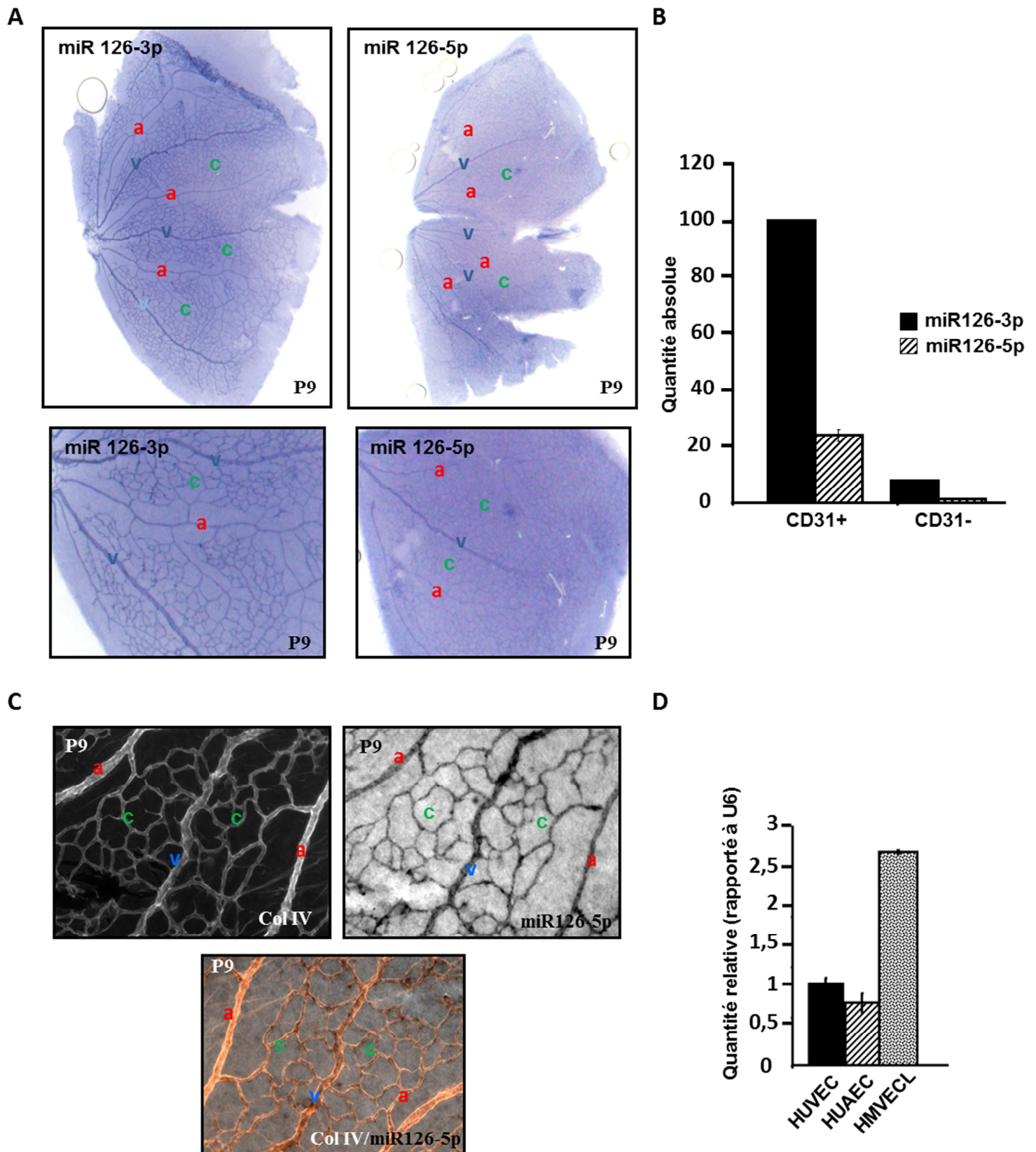


Figure 32 : miR126-5p est exprimé dans les cellules endothéliales *in vitro* et *in vivo* :

A : miR126-5p et miR126-3p sont exprimés dans l'endothélium de la rétine révélée ici grâce à une hybridation *in situ* des microARNs, **B :** qPCR des cellules endothéliales (CD31+) et non endothéliales (CD31-) de la rétine. **C :** Hybridation *in situ* de miR126-5p couplé à une immunofluorescence pour le collagène IV au cours du développement vasculaire de la rétine 9 jours après la naissance de l'animal. **D :** Quantification de miR126-5p dans trois types de cellules endothéliales : Veineuses (HUVEC), Artérielles (HUAEC), de Capillaires (HMVECL). a : artère ; v : veine ; c : capillaires

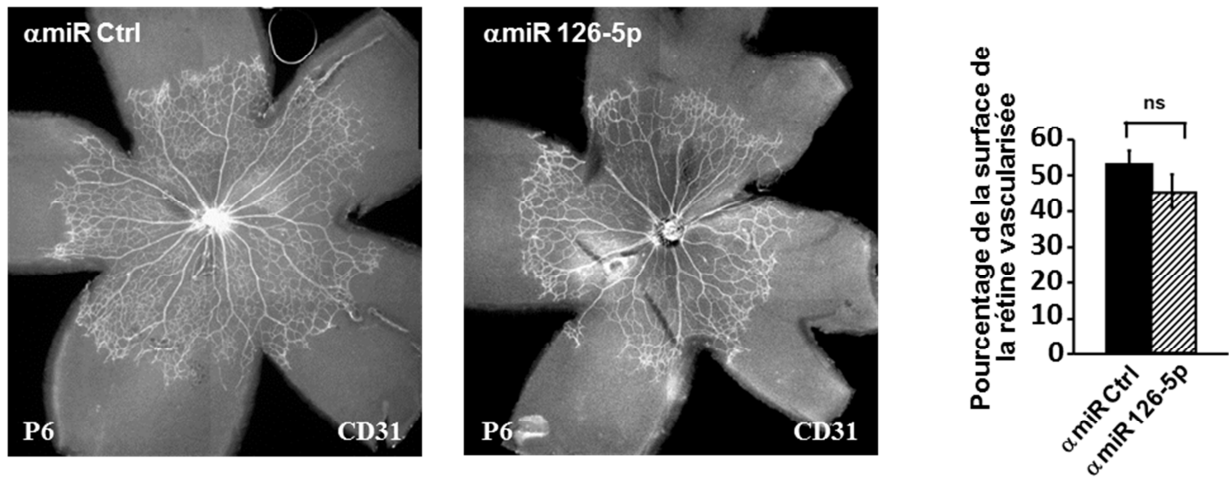
Expression de miR-126-5p dans les cellules endothéliales *in vitro* et *in vivo* :

Des expériences d'hybridation *in situ* sur des rétines de souris âgées de neuf jours (P9) ont permis de détecter miR-126-5p ainsi que son complémentaire miR-126-3p dans le réseau vasculaire de la rétine. En effet, l'expression des microARNs est majoritairement retrouvée au niveau des cellules endothéliales et il semble que miR-126-3p et -5p ne soient pas exprimés à des taux équivalents (Figure 32, A). Afin de confirmer ces résultats, une quantification absolue de ces microARNs a été réalisée dans les cellules endothéliales isolées de rétines (CD31+). miR-126-3p et miR-126-5p sont principalement exprimés dans les cellules endothéliales CD31+ isolées de rétine par rapport aux cellules CD31-. Cette quantification indique également que miR-126-3p est au moins trois fois plus exprimé que son complémentaire miR-126-5p (Figure 32, B).

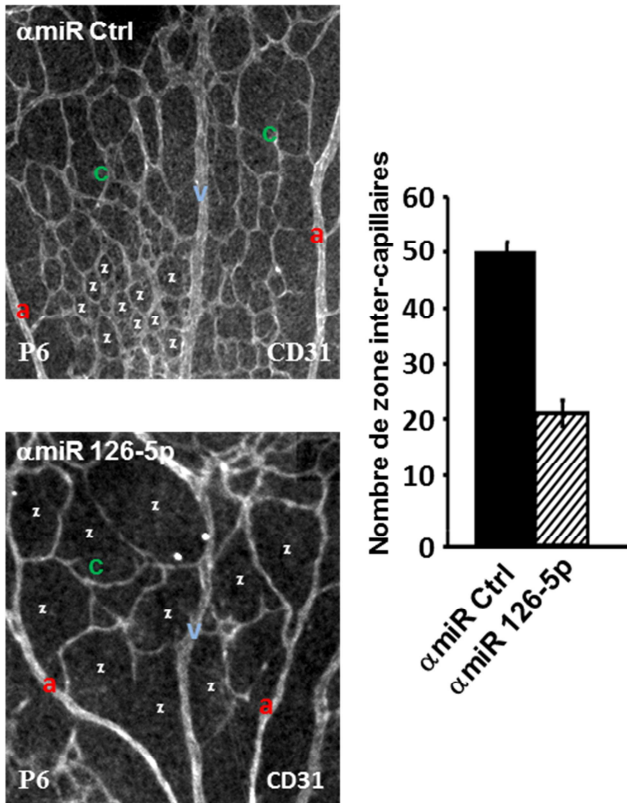
Suite à une hybridation *in situ* couplée à une immunofluorescence dirigée contre le collagène IV, un marqueur de la membrane basale, l'expression de miR-126-5p est détectée dans les artères, les veines ainsi que dans les capillaires avoisinants à P9 (Figure 32, A). L'expression de miR-126-5p s'avère homogène dans ces différents types de vaisseaux (Figure 32, C). Ces résultats sont confirmés grâce à une quantification relative de miR-126-5p par qPCR réalisée dans trois types de cellules endothéliales d'origine différentes : des cellules endothéliales veineuses (HUVEC), des cellules endothéliales artérielles (HUAEC) et des cellules endothéliales de capillaires (HMVEC-L). En effet, l'expression de miR-126-5p est détectée dans les trois types cellulaires endothéliaux. (Figure 32, D). L'ensemble de ces résultats démontre la présence de miR-126-5p au niveau de l'endothélium de la rétine.

Notre objectif a alors été de déterminer les phénotypes induits par l'inhibition de miR-126-5p sur la vascularisation rétinienne.

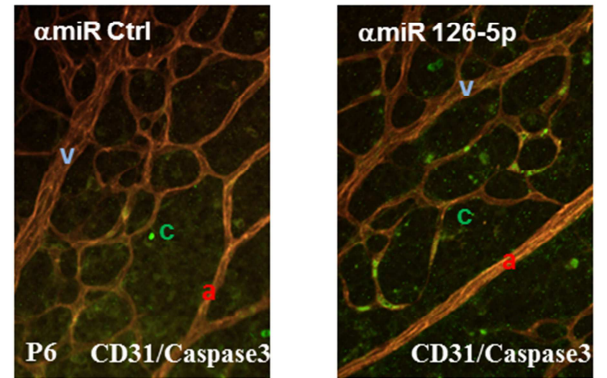
A



B



C



D

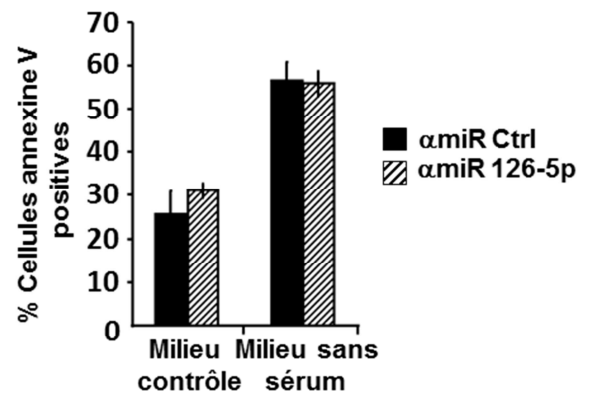


Figure 33 : L'inhibition de miR126-5p induit une perte importante du nombre de capillaires par apoptose dans la rétine :

A : Pourcentage de la rétine vascularisée 6 jours après la naissance de la souris avec (α miR 126-5p) ou sans (α miR Ctrl) inhibition de miR126-5p à l'aide d'une immunofluorescence contre le marqueur endothéliale CD31. B : Comptage du nombre de zone inter-capillaires autour des veines grâce à un immunomarquage CD31 dans les rétines P6 injectées avec l'antimiR 126-5p (α miR 126-5p) ou l'antimiR Ctrl (α miR Ctrl). C : Marquage de l'apoptose dans les rétines P6 injectées avec l'antimiR126-5p (α miR 126-5p) ou le contrôle (α miR Ctrl) à l'aide d'un co-immunomarquage CD31 (rouge) et Caspase 3(vert). D : L'apoptose des cellules endothéliales veineuses transfectées avec l'antimiR126-5p ou l'antimiR Ctrl est mesurée en milieu avec ou sans sérum à l'aide d'un marquage à l'annexine V par cytométrie en flux. a : artère ; v : veine ; c : capillaires.

Phénotype vasculaire induit par l'inhibition de miR-126-5p dans la rétine :

Suite à l'inhibition de miR-126-5p, grâce aux inhibiteurs de type LNA décrit dans l'étude de la partie I, des immunofluorescences *in toto* dirigées contre le marqueur endothélial CD31 ont été réalisées. L'inhibition de miR-126-5p n'entraîne aucune altération du réseau vasculaire dans sa globalité puisque le pourcentage de vascularisation de la rétine ne varie pas comparé à la condition contrôle (Figure 33, A). En revanche, il a été possible d'observer une chute importante du nombre de capillaires lors de cette inhibition (Figure 33, B). Ce résultat a été quantifié par comptage du nombre de zones inter-capillaires détectées autour des veines. Ces zones inter-capillaires sont réduites en nombre de moitié suite à l'inhibition de miR-126-5p (Figure 33, B). Afin de déterminer les mécanismes induisant la perte de ces capillaires, un co-marquage cellules endothéliale (anticorps dirigé contre le CD31) et cellules apoptotique (anticorps dirigé contre la caspase 3 clivée) a été entrepris suite à l'inhibition de miR-126-5p dans la rétine. Ainsi, la perte importante des capillaires chez les animaux injectés avec l'inhibiteur de miR-126-5p est associée à une forte augmentation du nombre de cellules caspase 3 clivée positives (Figure 33, C) suggérant un rôle pour notre microARN d'intérêt dans l'induction de l'apoptose des cellules endothéliales. Afin d'établir si la perte de miR-126-5p pouvait provoquer l'apoptose des cellules endothéliales, nous avons inhibé ce microARN dans des cellules HUVECs et avons induit l'apoptose de ces cellules par privation de sérum. Dans toutes les expériences de cytométrie en flux réalisées, comparé aux cellules contrôles, le taux de cellules annexine V positives, marqueur précoce de l'apoptose, ne varie pas (Figure 33, D). Ces expériences *in vitro* suggèrent que l'induction de l'apoptose dans les cellules endothéliales n'est pas directement induite par l'inhibition de miR-126-5p.

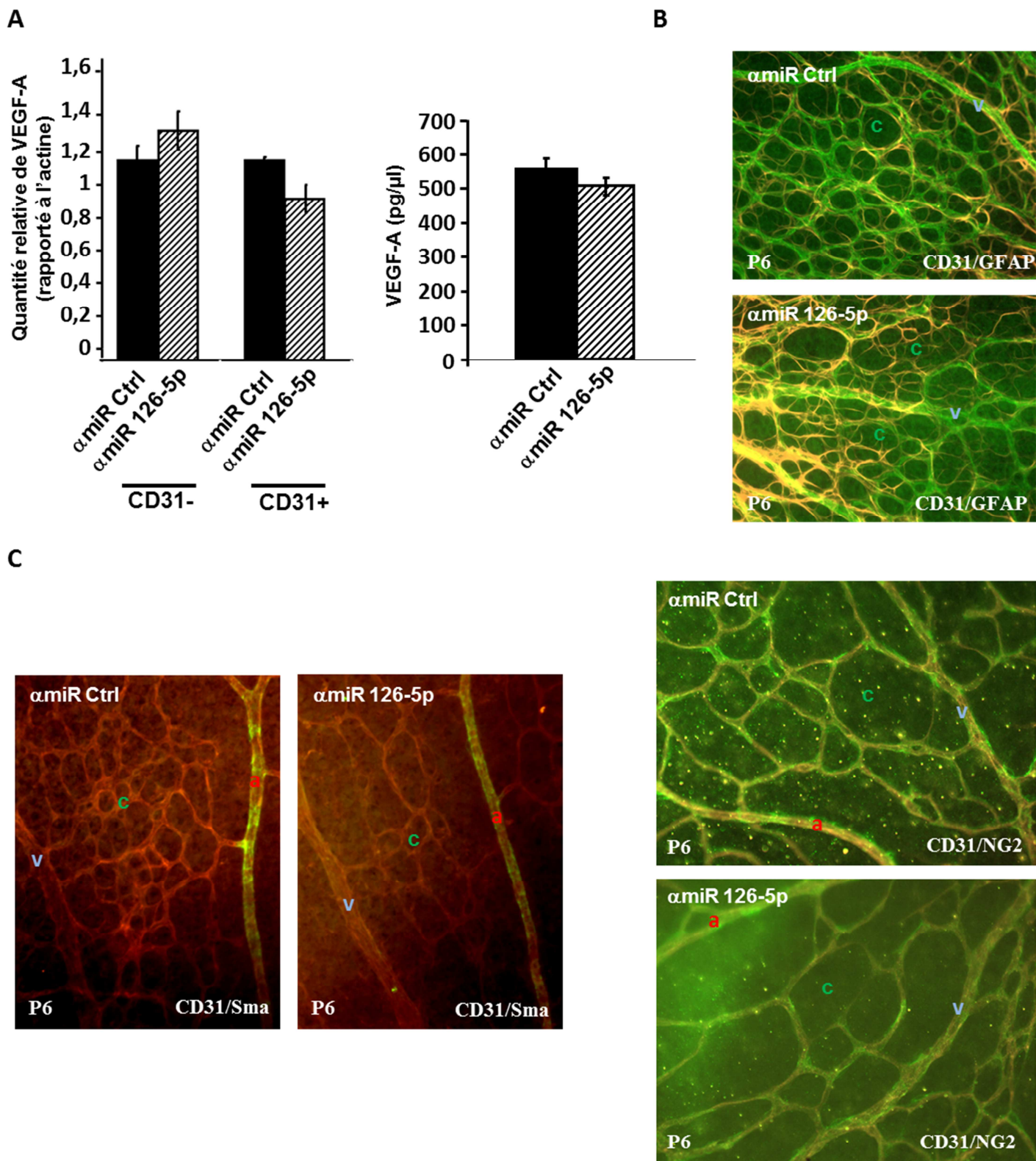


Figure 34 : La perte importante des capillaires n'est pas liée à une perturbation du VEGF-A, du réseau astrocytaire ou encore des cellules périvasculaires :

A : Quantification du taux de VEGF-A dans les rétines injectées avec (α miR 126-5p) ou sans (α miR Ctrl) l'inhibiteur de miR126-5p par qPCR sur cellules endothéliales isolées de rétines P6 ou par ELISA. B : Co-immunomarquage CD31(endothélium, vert) GFAP (réseau astrocytaire, rouge) in *toto* des rétines P6 injectées avec l'antimiR 126-5p (α miR 126-5p) ou l'antimiR Ctrl (α miR Ctrl). C : Co-immunomarquages CD31 (cellules endothéliales)/Sma (cellules musculaires lisses, vert) et CD31/NG2 (péricytes, vert) dans des rétines P6 injectées (α miR 126-5p) ou non (α miR Ctrl) avec l'inhibiteur de miR126-5p. a : artère ; v : veine ; c : capillaires.

Participation des facteurs extra-endothéliaux dans la perte des capillaires par apoptose

Afin de clarifier le rôle de miR-126-5p dans les cellules endothéliales rétiniennes, nous avons poursuivi l'analyse du phénotype induit par l'inhibition de miR-126-5p. Nous avons dans un premier temps dosé le VEGF-A dans les rétines après inhibition de miR-126-5p afin d'établir si des variations de taux de ce facteur pouvait être responsable de l'apoptose endothéliale. Des expériences par qPCR, réalisées sur cellules endothéliales isolées de rétines injectées, ainsi que des ELISA, réalisés sur des rétines totales, ont été entreprises. Ces expériences nous ont révélé que ni le nombre de transcrit VEGFA, ni la concentration de la protéine ne varie lors de l'inhibition de notre microARN d'intérêt *in vivo* (Figure 34, A).

Support du plexus vasculaire, le réseau astrocytaire participe à la stabilité de la vascularisation dans la rétine. Afin de déterminer la participation de ce réseau dans le phénotype observé, un co-immunomarquage CD31 (cellules endothéliales) et GFAP (astrocytes) a été effectué suite à l'inhibition de miR-126-5p. L'organisation du réseau astrocytaire n'est pas altérée suite à l'inhibition de ce microARN indiquant que l'apoptose endothéliale observée n'est pas reliée à une anomalie de ce réseau (Figure 34, B).

Enfin, le recrutement des cellules périvasculaires (péricytes et cellules musculaires lisses) a été vérifié sur la vascularisation rétinienne. Des immunomarquages CD31 (cellules endothéliales) / SMA (cellules musculaires lisses) et CD31 (cellules endothéliales) / NG2 (péricytes) dans nos conditions d'inhibition de miR-126-5p ont permis de mettre en évidence la présence de ces cellules associées au réseau vasculaire, et ce malgré l'inhibition de notre microARN d'intérêt (Figure 34, C).

Ces derniers résultats suggèrent que l'induction de la perte massive de capillaires par apoptose des cellules endothéliales lors de l'inhibition de miR-126-5p dans la rétine n'est pas induite par un défaut du taux de VEGF, de l'organisation du réseau astrocytaire ou de recrutement des cellules périvasculaires.

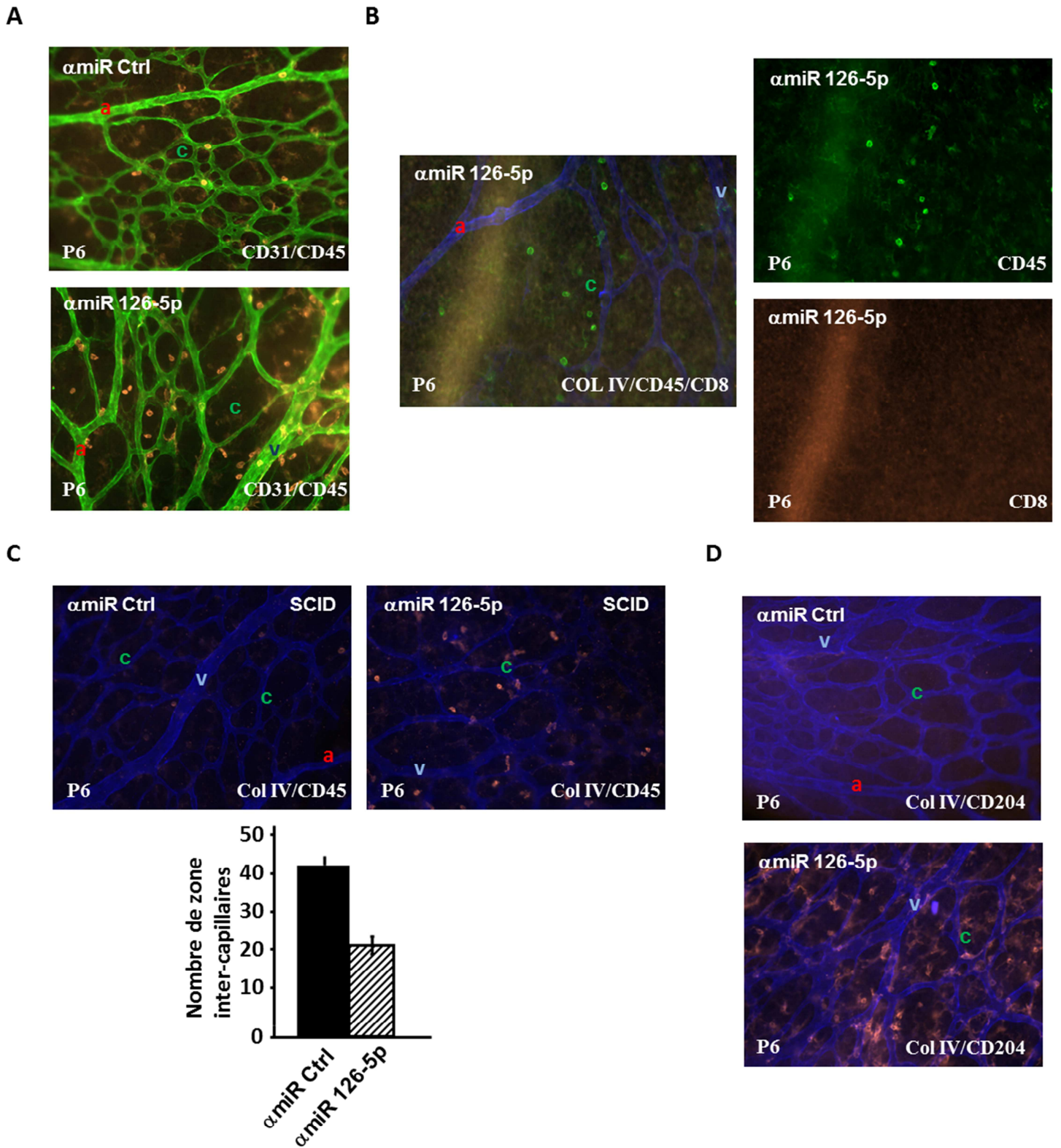


Figure 35 : Recrutement de macrophages dans les rétines lors de l'inhibition de miR126-5p.

A : Co-immunomarquage CD31(endothélium, vert)/CD45(leucocytes, rouge) dans des rétines P6 injectées avec l'antimiR126-5p (α miR 126-5p) et l'antimiR Ctrl (α miR Ctrl). **B** : L'absence de lymphocyte T CD8 lors de l'inhibition de miR126-5p (α miR 126-5p) dans des rétines P6 est mise en évidence grâce à un triple marquage Collagène IV (lame basale, bleu), CD45 (leucocytes, vert), CD8 (Lymphocyte T CD8, rouge). **C** : Observation de la perte des capillaires associée au recrutement des cellules CD45+ lors de l'inhibition de miR126-5p (α miR 126-5p) dans des rétines P6 de souris SCID marquées Collagène IV (lame basale, bleue)/CD45 (leucocytes, rouge). Comptage du nombre de zones inter-capillaires dans le réseau vasculaire des souris SCID lors de l'inhibition de miR-126-5p. **D** : Identification des leucocytes présents lors de l'inhibition de miR126-5p (α miR 126-5p) dans des rétines P6 à l'aide d'un co-immunomarquage Collagène IV(lame basale, bleue)/CD204 (Macrophages, rouge). a : artère ; v : veine ; c : capillaires.

Recrutement massif de macrophages suite à l'inhibition de miR-126-5p dans la rétine

Sachant que l'apoptose endothéliale peut être induite par des cellules T CD8⁺ recrutées sur l'endothélium (Figure 30) (Ishida et al., 2003), nous avons cherché à analyser si l'apoptose induite par l'inhibition de miR-126-5p était due à un recrutement de ces cellules. Des immunofluorescences dirigées contre l'antigène pan-leucocytaire CD45 couplées à un marquage CD31 (cellules endothéliales) ont été réalisées sur des rétines injectées avec l'inhibiteur de miR-126-5p. Un marquage massif de leucocytes CD45⁺ est observé lors de l'inhibition de miR-126-5p dans la rétine (Figure 35, A). Afin d'identifier plus précisément ces leucocytes, un triple marquage Collagène IV (membrane basale des cellules endothéliales)/CD45 (pan-leucocytaire)/CD8 (lymphocyte T CD8⁺) a été entrepris. De manière surprenante, les leucocytes recrutés suite à l'inhibition du microARN miR-126-5p n'expriment pas à leur surface l'antigène CD8 (Figure 35, B). Afin d'écartier définitivement une éventuelle participation des lymphocytes dans le phénotype endothéliale observé, l'inhibiteur de miR-126-5p a été injecté en intraoculaire chez des souris SCID (dépourvues de lymphocytes B et T). L'analyse par double marquage CD45/Collagène IV *in toto* des rétines a permis de retrouver le même phénotype vasculaire que lorsque l'inhibiteur de notre microARN d'intérêt est injecté dans des souris immunocompétentes (Figure 35, C). Ces derniers résultats suggèrent donc que l'apoptose des cellules endothéliales *in vivo* suite à l'injection de l'inhibiteur de miR-126-5p n'est pas associée à un recrutement de lymphocyte T ou B comme dans le modèle proposé par Ishida et collaborateurs (Figure 30)(Ishida et al., 2003).

Afin d'identifier les cellules CD45⁺ recrutées lors de l'inhibition de miR-126-5p dans les rétines, un double marquage Collagène IV et CD204, majoritairement exprimé à la surface des macrophages activés, a été entrepris. Ces immunofluorescences ont révélé un recrutement important de macrophages CD204⁺ lors de l'inhibition de miR-126-5p dans la rétine (Figure 35, D).

L'inhibition *in vivo* de miR-126-5p dans le modèle de la rétine induit une perte importante des capillaires par apoptose des cellules endothéliales. Cette perte de capillaires est accompagnée par un recrutement massif de leucocytes CD45+ que nous avons identifié comme étant des macrophages.

L'identification du rôle joué par les macrophages dans la disparition des capillaires de la rétine est déterminante afin de conclure quant aux fonctions de miR-126-5p *in vivo*. En effet, les macrophages peuvent, dans notre modèle, soit participer activement à l'induction de l'apoptose *in vivo* des cellules endothéliales, soit être seulement recrutés suite à cette apoptose massive. L'inhibition de miR-126-5p chez des souris op/op n'exprimant plus le gène CSF-1, indispensable au développement des macrophages et par conséquent à la mise en place de la microglie de la rétine (Kubota et al., 2009), permettra d'évaluer si les macrophages sont responsables de la perte des capillaires rétiens. Dans la littérature, les rôles des macrophages au cours du développement vasculaire de la rétine sont multiples. En effet, ces cellules, provenant majoritairement de la microglie localisée dans les couches plus profondes de la rétine, peuvent favoriser la formation de nouveaux vaisseaux sanguins en jouant un rôle de « pont » entre deux cellules endothéliales (Fantin et al., 2010). A l'inverse, au cours de la première semaine, ces cellules participent activement à la dégradation du réseau vasculaire hyaloïde en activant la voie WNT (Lobov et al., 2005) ou encore à la mort cellulaire des cellules endothéliales de la membrane pupillaire (Diez-Roux and Lang, 1997). D'autre part, une étude récente a démontré que l'activation de la microglie induite par hyperoxie chez la souris augmentait la production d'interleukine 1 β par ces cellules et la sécrétion accrue de sémaphorine 3a par les cellules ganglionnaires de la rétine. L'accumulation de cette protéine neuronale mène alors à une apoptose ciblée des cellules endothéliales (Rivera et al., 2013).

Nos études préliminaires réalisées dans la rétine ont montré que l'inhibition de miR-126-5p induisait également une augmentation de l'interleukine 1 β et de la sémaphorine 3a suggérant alors une activation de la microglie (Figure 36). Après validation de ces résultats, il serait donc intéressant dans un premier temps d'élucider l'implication de miR-126-5p et éventuellement de SetD5 dans l'activation des macrophages résidents de la rétine. Afin de répondre à cette hypothèse, nous pourrions réaliser une hybridation *in situ* de miR-126-5p ou de SetD5 couplé à un immunomarquage des macrophages afin d'établir si leurs expressions

peuvent être détectées dans les macrophages de la rétine. Si ces résultats s'avèrent concluants, il serait alors intéressant d'évaluer si miR-126-5p induit une activation de la microglie via la régulation de SetD5 en utilisant le TargetBlocker SetD5 que nous avons modélisé. Ultérieurement, nous pourrions envisager de bloquer l'interleukine 1 β et/ou la sémaphorine 3a afin de confirmer l'implication de cette voie moléculaire dans l'induction de l'apoptose des cellules endothéliales suite à l'inhibition de miR-126-5p dans la rétine.

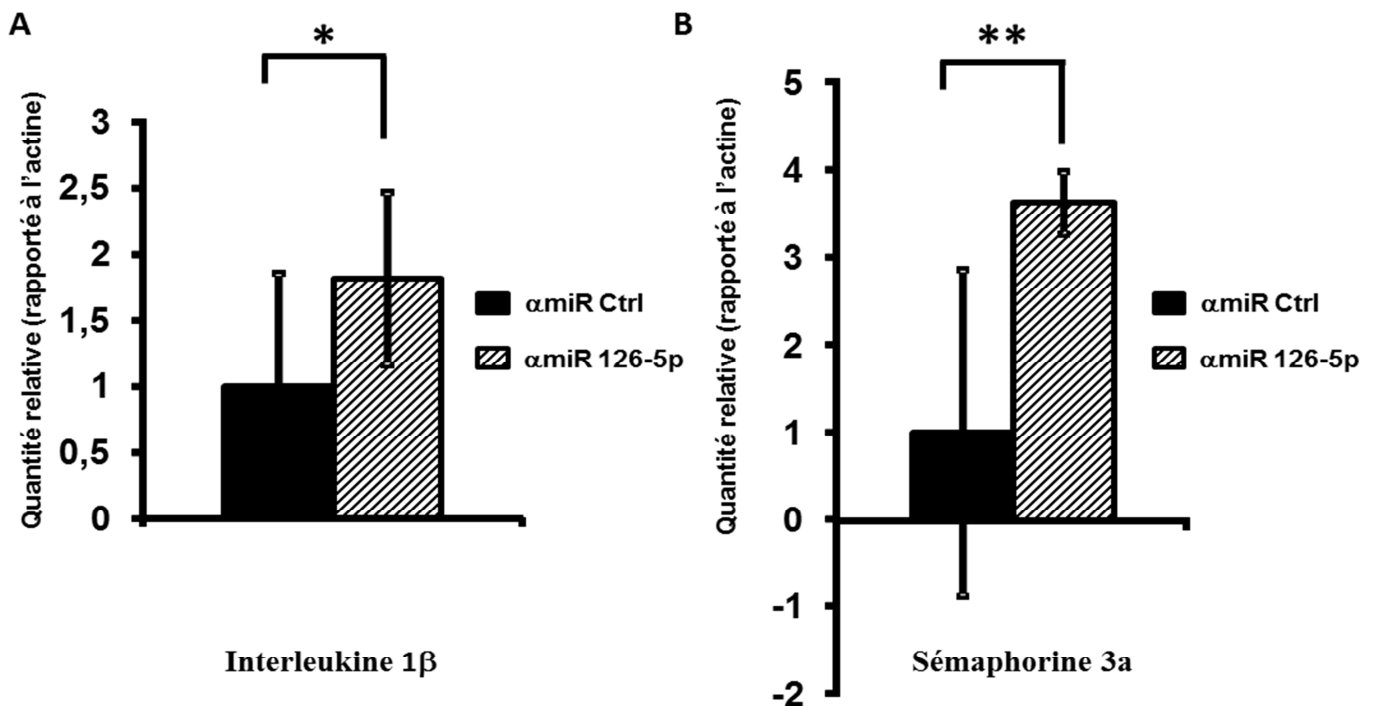


Figure 36 : Expression de l'interleukine 1 β et de la Sémaphorine 3a lors de l'inhibition de miR-126-5p dans la rétine.

A : Quantification relative d'interleukine β dans les rétines injectées avec l'inhibiteur miR-126-5p (amiR-126-5p) ou un contrôle (amiR-Ctrl). **B :** Quantification relative de la sémaphorine 3a dans les rétines injectées avec l'inhibiteur de miR-126-5p (amiR-126-5p) ou un contrôle (amiR-Ctrl).

CONCLUSION GÉNÉRALE

Conclusion générale

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont permis d'établir les toutes premières fonctions physiologiques de miR-126-5p dans les cellules endothéliales.

A l'image de son gène hôte et de son microARN complémentaire, miR-126-5p contrôle le recrutement des leucocytes. Les deux cibles que nous avons identifiées dans cette étude confèrent toutefois à miR-126-5p des fonctions opposées en ce qui concerne l'adhérence et la transmigration leucocytaire.

En régulant négativement ALCAM, miR-126-5p fonctionne de concert avec *egfl7* et miR-126-3p, et verrouille complètement le processus de recrutement tissulaire des leucocytes en empêchant la transmigration endothéliale. Les activités synergiques d'*egfl7* et de ses microARNs introniques sont en accord avec la théorie selon laquelle un gène hôte et ses microARNs participent avec cohérence à la régulation d'un même processus biologique.

Ce puissant contrôle négatif du recrutement des leucocytes par *egfl7* et ses microARNs introniques semble toutefois limité à certains tissus comme nous avons pu le constater dans les poumons des souris. Cette information rend l'ensemble de nos résultats cohérents puisqu'il apparaît que miR-126-5p ne contrôle pas simultanément positivement l'adhérence des leucocytes et négativement leur transmigration.

L'identification de SetD5 comme cible de miR-126-5p nous ouvre un champ d'investigations extraordinaire. Nos travaux *in vitro* et *in vivo* sur ce gène, dont les rôles biologiques étaient inconnus, ne semblent pas nous conduire vers l'identification d'une seule et même fonction pour SetD5. La poursuite de l'analyse du phénotype de la rétine, suite à l'inhibition de miR-126-5p, devrait nous permettre de suggérer la toute première fonction biologique de SetD5 *in vivo*.

Tout reste à établir quant à ce nouveau gène. Ses patrons d'expression au cours du développement embryonnaire et dans des situations pathologiques doivent être précisés. Il sera intéressant d'évaluer si ce gène s'exprime au cours du développement tumoral sachant que des fonctions ont été attribuées à miR-126-5p au cours de ce processus. Sa séquence protéique reste à caractériser ainsi que la localisation subcellulaire de la protéine. Il est possible que SetD5 soit localisé dans le noyau comme le suggère la présence du domaine SetD dans la séquence protéique de SetD5 préalablement établie par bioinformatique. Des anticorps dirigés contre SetD5 pourront être produits lorsque la séquence protéique de SetD5 aura été validée et permettront de mieux caractériser la protéine SetD5 (poids moléculaire,

modifications post-traductionnelles...). Enfin, l'inactivation de ce gène sera des plus informatives quant à ses fonctions. Une première inhibition chez le poisson Zèbre pourrait rapidement conduire aux premières données concernant les rôles *in vivo* de SetD5. L'inactivation de SetD5 par recombinaison homologue chez la souris sera sans doute l'étape ultime dans la caractérisation des fonctions de ce gène.

Mes travaux de thèse ont mis en évidence deux cibles pour miR-126-5p mais il est probable que les fonctions de ce microARN ne se limitent pas à ces deux cibles. Nous pourrions reprendre les données de notre analyse par microarray afin d'éventuellement valider d'autres cibles que nous n'avons pas sélectionnées dans notre premier tri. De plus, des études de protéomique pourraient également nous permettre d'identifier d'autres cibles pour ce microARN. Il est également envisageable de réaliser de nouvelles analyses par microarray ou protéomique dans d'autres types cellulaires que les cellules endothéliales puisque, dans la rétine, miR-126-5p pourrait également être fonctionnel en dehors de l'endothélium.

A terme, miR-126-5p pourrait éventuellement être considéré comme une cible thérapeutique. Quelques sociétés pharmaceutiques ont émergé dans le but de développer des outils thérapeutiques de type inhibiteurs de microARNs. Déjà, miR 208, miR15/195, miR 145 ou miR 92 sont entrés en études pré-cliniques dans le cadre de pathologies cardiovasculaires.

Il restera à déterminer si inhiber miR-126-5p au cours de pathologies particulières pourrait apporter un bénéfice dans la lutte contre celles-ci. De plus, inhiber miR-126-5p ne sera peut-être pas efficace sans envisager d'inhiber simultanément *egfl7* et miR-126-3p.

ANNEXE

***Egfl7* est spécifiquement réprimé dans les artères au cours du développement vasculaire de la rétine**

Au cours de ma thèse, j'ai également réalisé une étude comparative des expressions d'*egfl7* et de miR-126-3p au cours du développement vasculaire de la rétine. Comme précédemment décrit pour miR-126-5p dans la partie 2 des résultats du manuscrit, l'expression de miR-126-3p est détectée de façon homogène dans le réseau vasculaire rétinien puisque ce microARN est exprimé dans les cellules endothéliales des artères, des veines et des capillaires. En revanche, le patron d'expression d'*egfl7* diffère quelque peu puisque son expression est détectée dans toutes les cellules endothéliales rétinienne à 2 jours de développement post-natal mais n'est plus retrouvée que dans les cellules endothéliales des veines et des capillaires 5 jours après la naissance du souriceau. Ce différentiel d'expression d'*egfl7* est également observé à 9 jours de développement post-natal. Comme la chute d'expression d'*egfl7* coïncide parfaitement avec le recrutement des cellules musculaires lisses au niveau des artères dans ce modèle, nous avons émis l'hypothèse que le recrutement de ces cellules pouvait moduler l'expression de ce gène dans les cellules endothéliales artérielles. Des injections intraperitonéales d'anticorps bloquant pour le récepteur bêta du PDGF nous ont permis d'empêcher le recrutement des cellules périvasculaires dans la rétine de souriceaux et d'analyser les effets sur l'expression d'*egfl7*. Ces injections ont mis en évidence que le recouvrement des artères par les cellules musculaires lisses n'est pas responsable de la chute d'expression d'*egfl7*. D'autres voies de signalisation restent à explorer pour identifier le mécanisme responsable de cette modulation d'expression artérielle. De plus dans la rétine, la régulation d'expression du duplex miR-126-3p/126-5p diffère de celle de leur gène hôte, ce qui reste également à élucider.

1 ***Egfl7* is specifically repressed in arteries during retinal vascular development**

2

3

4

Loïc Poissonnier, Gaëlle Villain, Fabrice Soncin and Virginie Mattot

5

CNRS-UMR8161

6

Institut de Biologie de Lille

7

Université Lille-Nord de France

8

1 rue du Pr Calmette, 59021 Lille Cedex France

9

10

11

12

13 **Correspondence should be addressed to :**

14

Virginie MATTOT

15

CNRS-UMR8161

16

Institut de Biologie de Lille

17

Université Lille-Nord de France

18

1 rue du Pr Calmette, 59021 Lille Cedex France

19

Tel : 03 20 87 11 1 8

20

Fax : 03 20 81 11 11

21

Email : virginie.mattot@ibl.fr

22

23 **Abstract :**

24

25 The neurovascular unit of the central nervous system (CNS) is composed of vascular
26 endothelial and mural cells which interact closely with glial cells and neurons. This
27 specialized structure establishes the blood brain barrier which strictly controls the molecular
28 exchanges that take place between blood and the CNS. The development of the CNS
29 vascularisation is a unique process because it requires the contribution of specific regulators
30 in addition to the classical angiogenic factors.

31 The *egfl7* gene is mainly detected in endothelial cells during physiological and
32 pathological angiogenesis. *Egfl7* is the host gene of the microRNA miR126 which is also
33 expressed in endothelial cells and which plays major functions during blood vessel
34 development. While the expression of *egfl7* and that of miR126 were well described in
35 endothelial cells during embryonic or postnatal development, their pattern of expression
36 during the establishment of the CNS vasculature is still unknown.

37 By analysing the expression of *egfl7* and miR126 during mouse retina vascularisation,
38 we found that *egfl7* expression is progressively restricted to veins and to their neighbouring
39 capillaries while expression of miR126 is detected in all endothelia. The recruitment of mural
40 cells around retina arteries coincides with the down-regulation of *egfl7* in the arterial
41 endothelial cells, suggesting that this recruitment could be involved in the repression of *egfl7*
42 in arteries. However, the expression pattern of *egfl7* is similar when mural cell recruitment is
43 prevented by the injection of a PDGFR- β blocking antibody, suggesting that vessel
44 maturation is not responsible for *egfl7* down-regulation in retinal arteries.

45

46 **Introduction:**

47 In blood vessels, endothelial cells and mural cells, such as pericytes and smooth
48 muscle cells, are the major cellular components of the vascular wall. In the central nervous
49 system (CNS, i.e. brain, spinal cord and retina), additional cell types such as glial cells and
50 neurons interact with endothelial cells and pericytes to form the neurovascular unit [1,2]. This
51 specialized structure forms the blood brain barrier which is essential to the CNS homeostasis
52 through the selective transport of essential nutrients and the exclusion of potential toxins, to
53 the regulation of the CNS blood flow, and to neuronal activity [3]. During embryonic
54 development, the CNS is predominantly vascularised by angiogenesis, the process by which
55 new blood vessels bud from the existing vascular network [2,4]. As for the non-CNS tissues,
56 key angiogenic signalling pathways (notably VEGF, Notch, PDGF, Angiopoietin and TGF β)
57 are required for the vascularisation of the CNS [2,4]. However, specific signalling proteins are
58 involved in angiogenesis of the CNS, such as the Wnt/ β -catenin pathway [5] or the death
59 receptors DR6 and TROY [6], indicating that in the CNS, blood vessel development is a
60 specific process. The perinatal mouse vascularisation of the retina is the most extensively
61 studied model for the analysis of the vascular development of the CNS [2]. The rodent retina
62 does not have its dedicated vasculature before animal birth, when blood vessels emerge from
63 the optic nerve head [7]. These vascular sprouts spread towards the retinal periphery directed
64 by the astrocyte network and form the primary vascular plexus after one week of
65 development. During this vascular expansion, blood vessels located behind the vascular front
66 are remodelled by extensive pruning, in particular in the vicinity of arteries where capillary-
67 free zones emerge. The maturation of these vessels next occurs through the recruitment of
68 mural cells (pericytes and smooth muscle cells) and the establishment of the blood-retina-
69 barrier which may become functional approximately ten days after birth [7]. From veins and
70 neighbouring capillaries of the primary vascular network will later emerge and expand the
71 deeper vascular plexi of the retina located within the nerve fibre layer and the plexiform layer
72 which will form with the inner plexus the final retina vasculature [7].

73 *Egfl7* expression is mainly restricted to endothelial cells during physiological and
74 pathological blood vessels development [8-10]. *Egfl7* codes for a protein which is
75 predominantly associated with the extracellular matrix (ECM) as *Egfl7* is abundantly detected
76 in the ECM of *Egfl7*-producing cells and co-localises with several matrix components such as
77 fibronectin and elastin in blood vessel walls [11,12]. In vitro, *Egfl7* promotes endothelial cell
78 adhesion, though less efficiently than other ECM components such as fibronectin or collagen
79 [12]. Within its intronic sequence, the *egfl7* gene harbours the endothelial-specific miRNA

80 miR126 which functions during vascular development were clearly demonstrated [13-15].
81 The presence of miR126 in the *egfl7* gene rendered the investigation of Egfl7 functions during
82 blood vessel development quite complex and the conclusions still remain controversial [14].
83 In zebrafish, the knockdown of *egfl7* leads to an abnormal vasculature characterized by
84 tubulogenesis defects [9]. In contrast, Egfl7 deficiency in mice does not induce any clear
85 vascular phenotype [14]. Interestingly, transgenic mouse models where Egfl7 was
86 overexpressed in keratinocytes [11] or in endothelial cells [16] indicated that Egfl7 is
87 involved in vascular development and maturation by controlling the activity of lysyl oxidases,
88 the enzymes which convert tropoelastin into insoluble elastin fibers [11] and by regulating the
89 Notch signalling [16].

90 The expression patterns of *egfl7* and that of its intronic microRNA miR126 during
91 CNS vascularisation have not been described. Here, we analysed the expression pattern of
92 *egfl7* and miR126 during retinal vascular development. *egfl7* has a unique expression pattern
93 during retinal vascularisation as it appears progressively restricted to the endothelial cells
94 covering the veins and their neighbouring capillaries. In contrast, miR126 is homogenously
95 expressed in all endothelial cells of the retinal developing vasculature, regardless of venous or
96 arterial origin. The down-regulation of *egfl7* in arterial endothelial cells during artery
97 differentiation is not due to the recruitment of smooth muscle cells during maturation of these
98 new blood vessels. These results demonstrate for the first time a different expression pattern
99 for *egfl7* depending on blood vessels types and dissociate the regulation of expression of *egfl7*
100 from that of miR126.

101

102 **Materials and Methods:**

103 **Animals :**

104 OF1 pregnant mice were from Charles River. VM has a level I Animal Experimentation
105 diploma (France) and an authorization to perform animal experiments (#59-35066) delivered
106 by the Prefecture de la Region Nord/Pas de Calais. Protocols used in this study
107 (intraperitoneal injections in mice) were approved by the North of France veterinary
108 department (Direction Départementale des services vétérinaires du Nord). For whole mount
109 retina analysis, pups were sacrificed by decapitation at the indicated postnatal stage and the
110 retinal cups were separated from the eye tissues under binocular (Nikon) after a brief fixation
111 in PBS, 4% PFA.

112

113 **Cell culture:**

114 Commercial primary human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and primary human
115 umbilical artery endothelial cells (HUAEC) were from PromoCell and were cultured in
116 Endothelial cell growth medium-2 following the manufacturer's instructions. Cells were
117 plated at 20,000 cells/cm² three days before RNA extraction.

118

119 **RNA purification and quantification:**

120 Cells were lysed in Trizol (Life) and RNAs purified following the manufacturer's
121 instructions. To quantify egfl7, EphB4, EphrinB2, Dll4, Coup-TFII and β actin mRNAs, total
122 RNAs were reverse-transcribed using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit
123 (Applied Biosystems). For microRNA quantification, total RNA were reverse transcribed
124 using Taqman microRNA Reverse Transcription Kit and U6 (#001973) and miR126-3p
125 (#002228) specific primers (Applied Biosystems). Relative quantification of transcripts was
126 performed using Taqman gene expression master mix and specific Taqman probes (egfl7,
127 Hs00211952_m1; EphB4, Hs00174752_m1; EphrinB2, Hs00970627_m1; Dll4, Hs
128 00184092_m1, Coup-TFII, Hs00819630_m1 and β actin, Applied Biosystems) using a
129 StepOne system. miRNA and mRNA expression levels were quantified using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$
130 method and normalized to U6 and β actin levels, respectively.

131

132 **In situ hybridization:**

133 Egfl7 digoxigenin-labelled probe was synthesized as described in Soncin et al [10]. Dissected
134 retina were fixed in PBS, 4% PFA overnight at 4°C, rinsed in PBS, 0.1% Triton-X100 (PBT)
135 and treated with proteinase K (20 μ g/ml in PBT) for 30 min at room temperature before

136 fixation for 20 min. After pre-hybridization, retina were either hybridized overnight in 50%
137 formamide, 5X SSC, 0,1% Triton-X100, 9,2 mM citric acid, 500µg/mL yeast RNA and
138 50µg/mL heparin (hybridization buffer) containing 25nM of miR126-3p 5' and 3'
139 digoxigenin-labelled probe (Exiqon) at 51°C or in 50% formamide, 5X SSC, 0,1% Triton-
140 X100, 2% Blocking powder (Roche), 0.5% Chaps, 5mM EDTA, 500µg/mL yeast RNA and
141 50µg/mL heparin (hybridization buffer) containing 1µg/ml of digoxigenin-labelled egfl7
142 probe at 60°C. Retina were washed with 50% formamide, 5X SSC, 0,1% Triton-X100 (wash
143 solution) containing either 9,2mM citric acid (miR 126 probe) or 0.5% Chaps (egfl7 probe)
144 for 15 min at their respective hybridization temperature, then with increasing amounts of 2X
145 SSC/0.1% Triton-X100 mixed with the wash solution before final incubation in PBT at room
146 temperature. Retina were treated with 10% sheep serum, 20 mg/mL BSA in PBT for 3h at
147 room temperature before incubation with the alkaline phosphatase conjugated anti-
148 Digoxigenin antibody (Roche) overnight at 4°C. Retina were finally washed in PBT
149 containing 2 mM levamisole and stained in 100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100mM NaCl, 50 mM
150 MgCl₂, 0.1 % Tween-20 containing 4.5 µL/ml NBT and 3.5 µL/ml BCIP. When indicated,
151 retina were then treated for endothelial cell immunostaining either with isolectinB4 or with
152 anti-collagen IV antibody. Retinas were finally flat-mounted between slides and coverslips
153 and photographed under binocular (Nikon) or microscope (AxioImager Z1-apotome
154 microscope, Zeiss).

155

156 **Immunofluorescence staining:**

157 Retinas were fixed overnight in PBS, 4% PFA. After washes with PBS, retinas were treated
158 overnight with PBS, 1% BSA, 0.5% Triton X-100. When indicated, retinas were treated with
159 biotin-labelled *Griffonia simplicifolia* isolectin-B4 (isolectin-B4, Vector laboratories)
160 following the protocol described by Gerhardt and colleagues [17]. Retina were then incubated
161 with rabbit anti-chondroitin sulphate proteoglycan NG2 antibody (Millipore) and FITC-
162 labelled mouse monoclonal anti- α -smooth muscle actin antibody (Sigma) overnight in PBS,
163 0.5% BSA, 0.25% Triton X-100. After washes in PBS, retina were incubated for two hours
164 with alexa-350 streptavidin and with alexa-594 Goat anti-Rabbit antibody (Life) in PBS, 0.5%
165 BSA, 0.25% Triton X-100. After washes with PBS, retina were fixed 5 min in PBS, 4% PFA
166 and flat mounted with Mowiol. For type IV collagen staining, a similar protocol was
167 performed using Rabbit anti-type IV collagen (abcam) and alexa-594-goat anti-rabbit (Life)
168 antibodies. Retinas were photographed under microscope (AxioImager Z1-apotome
169 microscope, Zeiss).

170

171 **In vivo inhibition of mural cell recruitment:**

172 Daily intraperitoneal injections of anti-PDGFR β (ebiosciences, clone APB5, 100 μ g/pup)

173 antibody were performed from P0 to P9, as described by Uemura and colleagues [18]. Control

174 animals were injected with vehicle alone as described in [18].

175

176 **Results:**

177 ***Egfl7 is differentially expressed in arteries and veins of the retinal vasculature:***

178 The expression pattern of *egfl7* was analysed by in situ hybridization during retinal
179 vascular development at P2, P5, P9 and P14 (corresponding to two, five, nine and fourteen
180 days after birth). At P2, the retinal vascular network has just emerged from the optic nerve
181 head [7]. *Egfl7* transcripts were detected in all endothelial cells at this stage (Figure 1A and
182 supplementary figure). At P5, the retinal vasculature covers at least half of the retina surface,
183 arteries and veins alternate and are already distinguishable based on the presence of capillary
184 free zone around arteries [7]. *Egfl7* expression is low in arteries and most of the signal is
185 restricted to venous endothelial cells (Figure 1A). When type IV collagen staining was
186 combined with *egfl7* in situ hybridization, *egfl7* expression at P5 was mainly detected in veins
187 and their numerous neighbouring capillaries while it was faintly detected in arteries and in the
188 rare capillaries delimitating the capillary free zones (Figure 1B). At P9, when the vasculature
189 reaches the periphery of the retina [7], the vein specific expression pattern of *egfl7* is fully
190 conserved (Figure 1A, B) whereas at P14, *egfl7* expression somehow decreases in the retinal
191 vasculature while the remaining signal is still restricted to venous endothelial cells.

192

193 ***miR126 has a different expression pattern than its host gene in the retinal vasculature:***

194 miR126 is located within the intron 7 of the *egfl7* gene and during embryonic vascular
195 development, its expression was reported to depend on the same promoter region and to
196 correlate with that of *egfl7* in endothelial cells [13,15]. During the development of the retina
197 vasculature, the expression of miR126 strongly diverged from that of *egfl7*, as the venous-
198 specific expression of *egfl7* was not observed for miR126. Indeed, miR126 was
199 homogenously detected in the whole retinal vascular network, as illustrated at P9 in Figure
200 2A. This was true at all stages analysed (P2, P5, P9 and P14) where miR126 was constantly
201 detected in both veins and arteries, as revealed when type IV collagen staining was combined
202 with miR126 in situ hybridization (Figure 2B). In addition, miR126 is also expressed in
203 capillary endothelial cells and its expression begins to recede in these cells at P14 (Figure
204 2B).

205

206 ***The venous-specific expression of egfl7 is not preserved in arterial and venous endothelial***
207 ***cells of the umbilical cord:***

208 *Egfl7* transcript levels were measured by RT-qPCR in primary endothelial cells from
209 veins (HUVEC, human umbilical vein endothelial cells) and from arteries (HUAEC, Human

210 umbilical artery endothelial cells). While these cells still preferentially express venous
211 (COUP-TFII, EphB4) and arterial markers (EphrinB2, Dll4, Figure 3A, B), respectively, *egfl7*
212 and miR126 are similarly expressed in both cell types regardless of their vascular origin
213 (Figure 3C). This is consistent with the undifferentiated expression pattern of *egfl7* previously
214 observed in veins and arteries of non-CNS vasculature [8-10] and suggests that the venous-
215 specific expression pattern of *egfl7* may be specific to the vasculature of the CNS, such as in
216 the retina.

217

218 ***Recruitment of retinal smooth muscle cells coincides with the low expression level of egfl7***
219 ***in arterial endothelial cells but does not modulate egfl7 expression in these cells in vivo.***

220 As *egfl7* is down-regulated in arterial endothelial cells during retina vascular
221 development, we attempted to characterize the molecular mechanisms which govern this
222 down-regulation in vivo. During retina vascular development, the whole growing vasculature
223 is covered by pericytes, as revealed by chondroitin sulfate proteoglycan NG2 staining of P9
224 retina (Figure 4). In these conditions, smooth muscle cells which express smooth muscle α -
225 actin (SMA) are exclusively detected around arteries (Figure 4A). In the OF1 mouse strain,
226 the SMA-positive mural cells are first detected around retinal arteries at P5 at the vicinity of
227 the optic nerve head and they progressively cover the entire artery at P9 (Figure 4B). The
228 presence of the SMA-positive mural cells thus coincides with the down-regulation of *egfl7* in
229 arterial endothelial cells. To evaluate whether the down regulation of *egfl7* expression during
230 retina vascular development in arterial endothelial cells was due to the arrival of these SMA-
231 positive mural cells around arteries, we inhibited mural cell recruitment and thereafter
232 analysed *egfl7* expression in P9 retinas. For this purpose, an antibody directed against
233 PDGFR β was injected in pups at birth and during the following 9 days so as to interfere with
234 the recruitment of mural cells by blocking the PDGF-BB/ PDGFR β signalling [18]. As
235 expected, the PDGFR β blocking antibody prevented the recruitment of both types of mural
236 cells (pericytes and smooth muscle cells) as revealed by NG2 and SMA co-staining of P9
237 retinas (Figure 5A). In addition to the mural cell deficiency and as reported by Uemura and
238 colleagues [18], the retinal vasculature of pups injected with the PDGFR β blocking antibody
239 showed structural defects such as dilated and distorted blood vessels (Figure 5B). However,
240 as arteries still appear thinner than veins and as the capillary pruning is still somehow
241 maintained after antibody injection, veins and arteries are still distinguishable in this model.
242 Most interestingly, the deficiency of mural cells did not modify the specific expression pattern
243 of *egfl7* which was still highly expressed in veins and faintly detected in arteries (Figure 5C),

244 indicating that mural cell recruitment does not affect *egfl7* repression in arterial endothelial
245 cells.
246

247 **Discussion:**

248 In this study, we described for the first time the original expression pattern of *egfl7*
249 during retinal vascular development. Second, we showed that *egfl7* and its intronic microRNA
250 miR126 have separate expression patterns in this vasculature, unlike previously observed in
251 other vascular beds.

252 The down-regulation of *egfl7* during retinal artery differentiation differs greatly from the
253 homogenous endothelial expression of *egfl7* described previously in the non-CNS vasculature
254 [8-10]. It would be interesting to evaluate whether this down-regulation of *egfl7* expression
255 during retinal artery differentiation is found in all CNS locations, notably during the hindbrain
256 vascularisation which represents another well-characterized CNS angiogenic model [19] or
257 whether this expression pattern is specific to the retina. In the latter case, this would suggest
258 that *egfl7* displays specific endothelial functions in selective regions of the CNS. Similar
259 restrictive functions during CNS angiogenesis were reported for the Orphan G Protein-
260 coupled receptor GPR124 which deficiency induces vascular defects in the neural tube and
261 the forebrain while it does not affect angiogenesis in the embryonic diencephalon, mid-and
262 hind-brain or in the non-CNS tissues [20].

263 Vascular development of *egfl7*-deficient mice occurs normally, notably in the inner vascular
264 plexus of the retina, as described by Kuhnert and al. [14]. However, the arterio-venous
265 differentiation of the retina vasculature was not characterized in *egfl7* deficient mice neither
266 the development of the deeper retinal vascular plexi nor the establishment of the blood retina
267 barrier. Given the specific expression pattern of *egfl7* in the retina, such investigation would
268 be helpful to characterize *Egfl7* functions in retinal endothelial cells.

269 Smooth muscle cell (SMC) recruitment is not responsible for the down-regulation of
270 *egfl7* expression in arterial endothelial cells of the retina as revealed in this study. This result
271 seems coherent with the *egfl7* expression observed in the endothelial cells of the non-CNS
272 arteries [8-10]. Indeed, these vessels express *egfl7* although they are covered by smooth
273 muscle cells. In neurospheres, *egfl7* expression is up-regulated when the Notch pathway is
274 inhibited, indicating that in these cells, *egfl7* expression is controlled by the Notch pathway
275 [21]. In addition, hyperoxia decreased *egfl7* expression level in the lungs of neonatal rats or in
276 HUVEC indicating that *egfl7* expression is sensitive to the levels of oxygen [22]. The Notch
277 pathway and the levels of oxygen are two other hypotheses to explore in order to identify the
278 molecular mechanisms responsible for the down-regulation of *egfl7* in arterial endothelial
279 cells of the retina.

280

281 **Acknowledgments:**

282 We thank the Bioimaging Center Lille-Nord (BICel) and Marie-Christine Bouchez for
283 assistance.

284

285 **References:**

- 286 1. Hawkins BT, Davis TP (2005) The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and
287 disease. *Pharmacol Rev* 57: 173-185.
- 288 2. Ruhrberg C, Bautch VL (2013) Neurovascular development and links to disease. *Cell Mol*
289 *Life Sci* 70: 1675-1684.
- 290 3. Wong AD, Ye M, Levy AF, Rothstein JD, Bergles DE, et al. (2013) The blood-brain
291 barrier: an engineering perspective. *Front Neuroeng* 6: 7.
- 292 4. Eichmann A, Thomas JL (2013) Molecular parallels between neural and vascular
293 development. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3: a006551.
- 294 5. Daneman R, Agalliu D, Zhou L, Kuhnert F, Kuo CJ, et al. (2009) Wnt/beta-catenin
295 signaling is required for CNS, but not non-CNS, angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S*
296 *A* 106: 641-646.
- 297 6. Tam SJ, Richmond DL, Kaminker JS, Modrusan Z, Martin-McNulty B, et al. (2012) Death
298 receptors DR6 and TROY regulate brain vascular development. *Dev Cell* 22: 403-417.
- 299 7. Fruttiger M (2007) Development of the retinal vasculature. *Angiogenesis* 10: 77-88.
- 300 8. Fitch MJ, Campagnolo L, Kuhnert F, Stuhlmann H (2004) Egfl7, a novel epidermal growth
301 factor-domain gene expressed in endothelial cells. *Dev Dyn* 230: 316-324.
- 302 9. Parker LH, Schmidt M, Jin S, Gray AM, Beis D, et al. (2004) The endothelial-cell-derived
303 secreted factor egfl7 regulates vascular tube formation. *Nature* 428: 754-758.
- 304 10. Soncin F, Mattot V, Lionneton F, Spruyt V, Lepretre F, et al. (2003) VE-statin, an
305 endothelial repressor of smooth muscle cell migration. *EMBO J* 22: 5700-5711.
- 306 11. Lelievre E, Hinek A, Lupu F, Buquet C, Soncin F, et al. (2008) VE-statin/egfl7 regulates
307 vascular elastogenesis by interacting with lysyl oxidases. *Embo J* 27: 1658-1670.
- 308 12. Schmidt M, Paes K, De Maziere A, Smyczek T, Yang S, et al. (2007) EGFL7 regulates
309 the collective migration of endothelial cells by restricting their spatial distribution.
310 *Development* 134: 2913-2923.
- 311 13. Fish JE, Santoro MM, Morton SU, Yu S, Yeh RF, et al. (2008) miR-126 regulates
312 angiogenic signaling and vascular integrity. *Dev Cell* 15: 272-284.
- 313 14. Kuhnert F, Mancuso MR, Hampton J, Stankunas K, Asano T, et al. (2008) Attribution of
314 vascular phenotypes of the murine Egfl7 locus to the microRNA miR-126.
315 *Development* 135: 3989-3993.
- 316 15. Wang S, Aurora AB, Johnson BA, Qi X, McAnally J, et al. (2008) The endothelial-
317 specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Dev Cell*
318 15: 261-271.
- 319 16. Nichol D, Shawber C, Fitch MJ, Bambino K, Sharma A, et al. (2010) Impaired
320 angiogenesis and altered Notch signaling in mice overexpressing endothelial Egfl7.
321 *Blood* 116: 6133-6143.
- 322 17. Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, et al. (2003) VEGF
323 guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol* 161:
324 1163-1177.
- 325 18. Uemura A, Ogawa M, Hirashima M, Fujiwara T, Koyama S, et al. (2002) Recombinant
326 angiopoietin-1 restores higher-order architecture of growing blood vessels in mice in
327 the absence of mural cells. *J Clin Invest* 110: 1619-1628.
- 328 19. Fantin A, Vieira JM, Plein A, Maden CH, Ruhrberg C (2013) The embryonic mouse
329 hindbrain as a qualitative and quantitative model for studying the molecular and
330 cellular mechanisms of angiogenesis. *Nat Protoc* 8: 418-429.
- 331 20. Kuhnert F, Mancuso MR, Shamloo A, Wang HT, Choksi V, et al. (2010) Essential
332 regulation of CNS angiogenesis by the orphan G protein-coupled receptor GPR124.
333 *Science* 330: 985-989.

- 334 21. Schmidt MH, Bicker F, Nikolic I, Meister J, Babuke T, et al. (2009) Epidermal growth
335 factor-like domain 7 (EGFL7) modulates Notch signalling and affects neural stem cell
336 renewal. *Nat Cell Biol* 11: 873-880.
- 337 22. Xu D, Perez RE, Ekekezie, II, Navarro A, Truog WE (2008) Epidermal growth factor-like
338 domain 7 protects endothelial cells from hyperoxia-induced cell death. *Am J Physiol Lung*
339 *Cell Mol Physiol* 294: L17-23.
- 340

341 **Figure legends:**

342 **Figure 1: *Egfl7* expression during retinal vascular development**

343 **A:** *egfl7* expression detected by in situ hybridization (blue staining) in flat mounted retinas of
344 two- (P2), five- (P5), nine (P9) and fourteen- (P14) day old mouse pups. **B:** Combined
345 collagen IV (Coll IV) immunostaining and *egfl7* in situ hybridization in flat mounted retinas
346 of five- (P5) and nine- (P9) day old mouse pups. a, artery ; v, vein. Magnifications are
347 indicated.

348

349 **Figure 2: miR126 expression in the retinal vasculature**

350 **A:** *egfl7* transcripts and miR126 detected by in situ hybridization on flat mounted retinas of
351 nine day-old mouse pups (P9). **B:** Combined collagen IV (Coll IV) immunostaining and
352 miR126 in situ hybridization in flat mounted retinas of two- (P2), five- (P5), nine- (P9) and
353 fourteen- (P14) day old mouse pups. a, artery ; v, vein. Magnifications are indicated.

354

355 **Figure 3: *Egfl7* and miR126 expression in HUVEC and HUAEC primary endothelial**
356 **cells**

357 **A:** Relative quantification by RT-qPCR of EphrinB2 and Dll4 in venous HUVEC and arterial
358 HUAEC primary endothelial cells. Levels were normalized to those of HUVEC arbitrarily set
359 to 1. **B:** Relative quantification by RT-qPCR of COUP-TFII and EphB4 in HUVEC and
360 HUAEC primary endothelial cells. Levels were normalized to those of HUVEC arbitrarily set
361 to 1. **C:** Relative quantification by RT-qPCR of *egfl7* and miR126 in HUVEC and HUAEC
362 primary endothelial cells. Levels were normalized to those of HUVEC arbitrarily set to 1.

363

364 **Figure 4: Mural cell recruitment during OF1 mouse retina vascular development**

365 **A:** Upper panel: pericytes (NG2) and smooth muscle cells (SMA) immunostaining in flat
366 mounted retinas at P9; middle and lower panels: higher magnification of the retina co-
367 immunostained in A, whole vasculature (isolectin B4), pericytes (NG2) and smooth muscle
368 cells (SMA). **B:** Co-immunostainings of endothelial cells (isolectin B4, IsoB4) and smooth
369 muscle cells (SMA) in retinas harvested from two- (P2), five- (P5), nine (P9) and fourteen-
370 (P14) day-old mouse pups. a, artery ; v, vein. Magnifications are indicated.

371

372 **Figure 5: *Egfl7* expression in mural cell deficient retinal vasculature**

373 **A:** Co-immunodetection of pericytes (NG2) and smooth muscle cells (SMA) in P9 retina from
374 pups injected with vehicle or from pups injected with the blocking antibody directed against

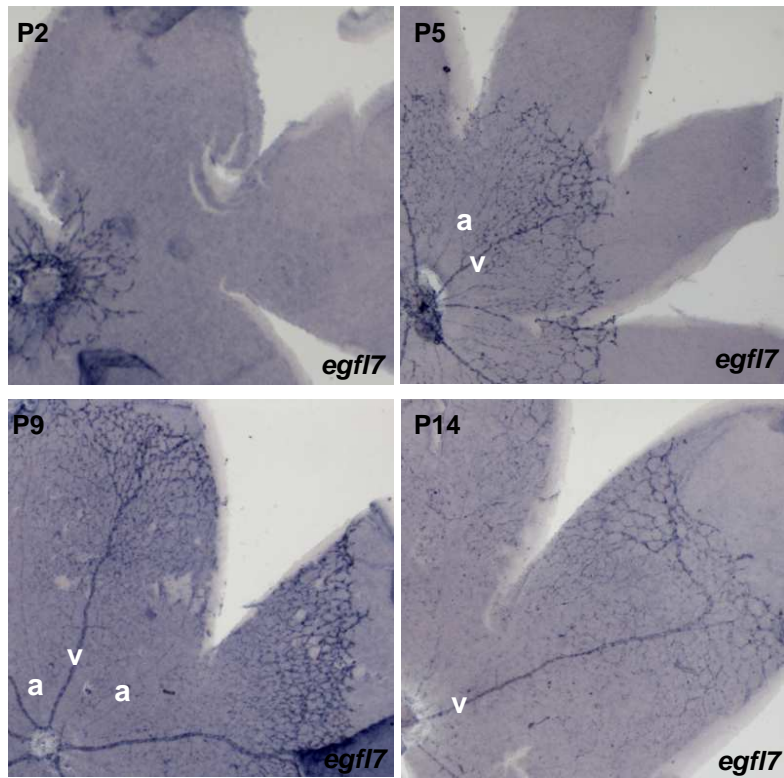
375 the PDGFR β (α PDGFR β). **B:** Type IV collagen immunostaining showing the vasculature of
376 P9 retina from pups injected with vehicle or from pups injected with the blocking antibody
377 directed against the PDGFR β (α PDGFR β). **C:** Combined collagen IV (Coll IV)
378 immunostaining and *egfl7* in situ hybridization in P9 retina from pups injected with vehicle or
379 from pups injected with the blocking antibody directed against the PDGFR β (α PDGFR β). a,
380 artery ; v, vein. Magnifications are indicated.

381

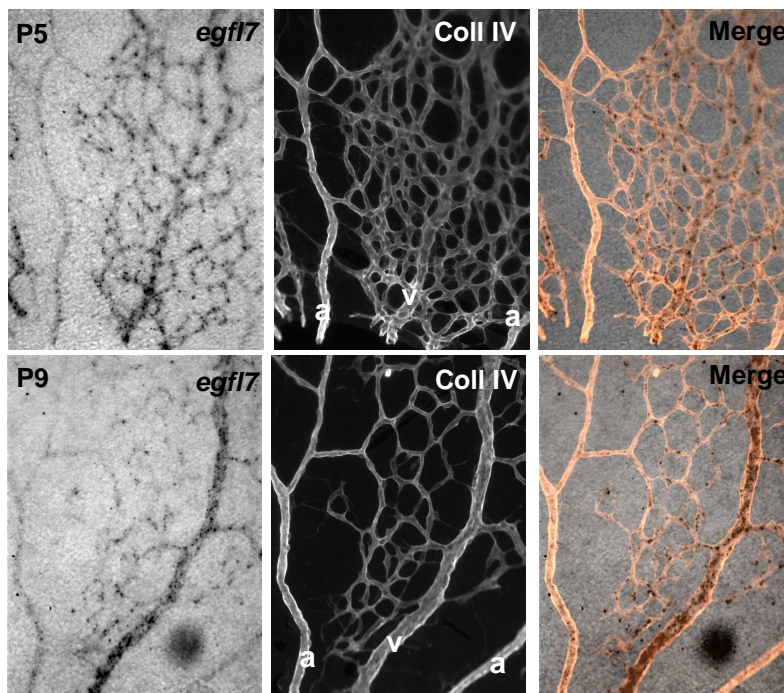
382 **Supplementary Figure 1: Homogenous expression of *egfl7* in P2 retina vasculature**

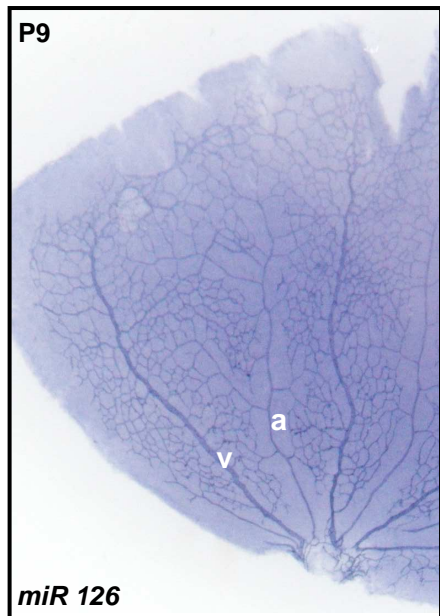
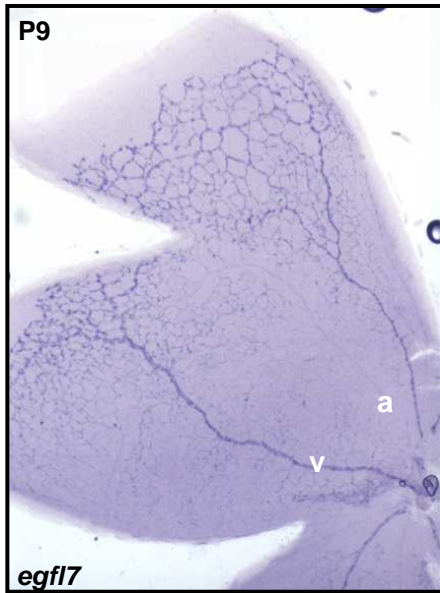
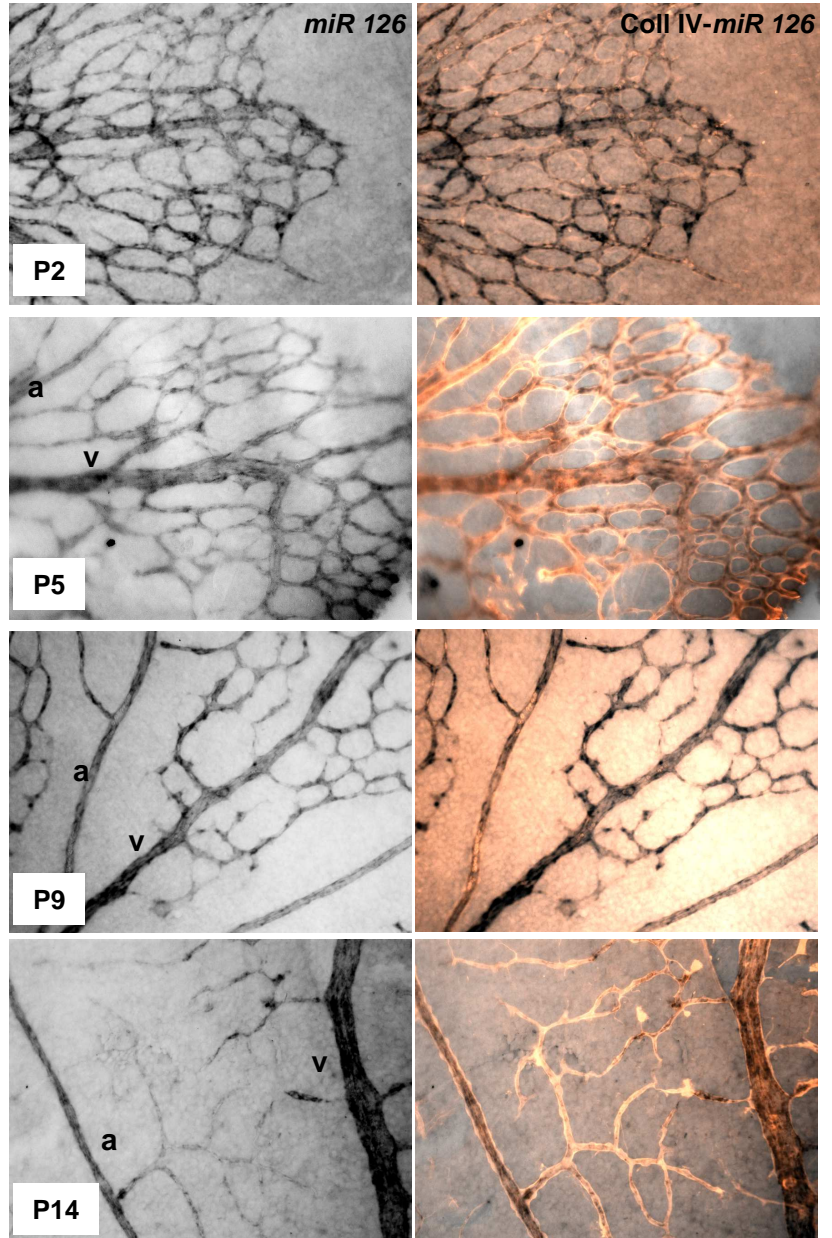
383 Combined *egfl7* (left) in situ hybridization and endothelium isolectin B4 staining (right) in
384 two day-old pup (P2) retinas.

A

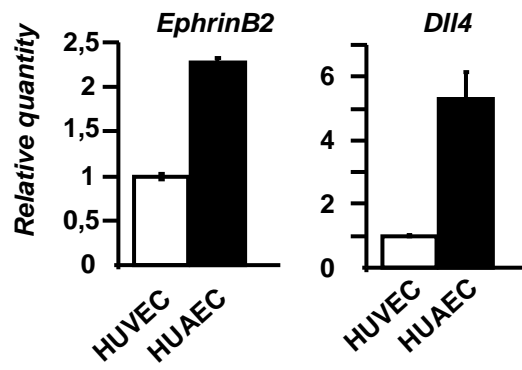


B

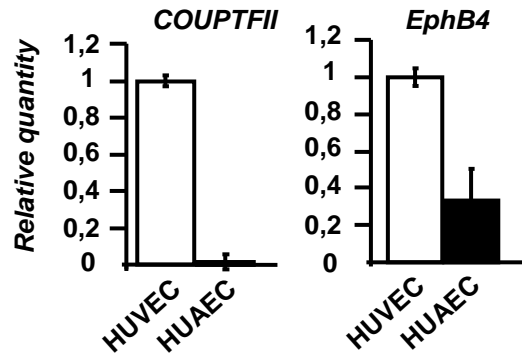


A**B**

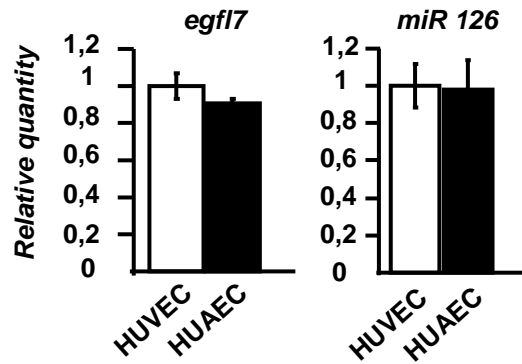
A

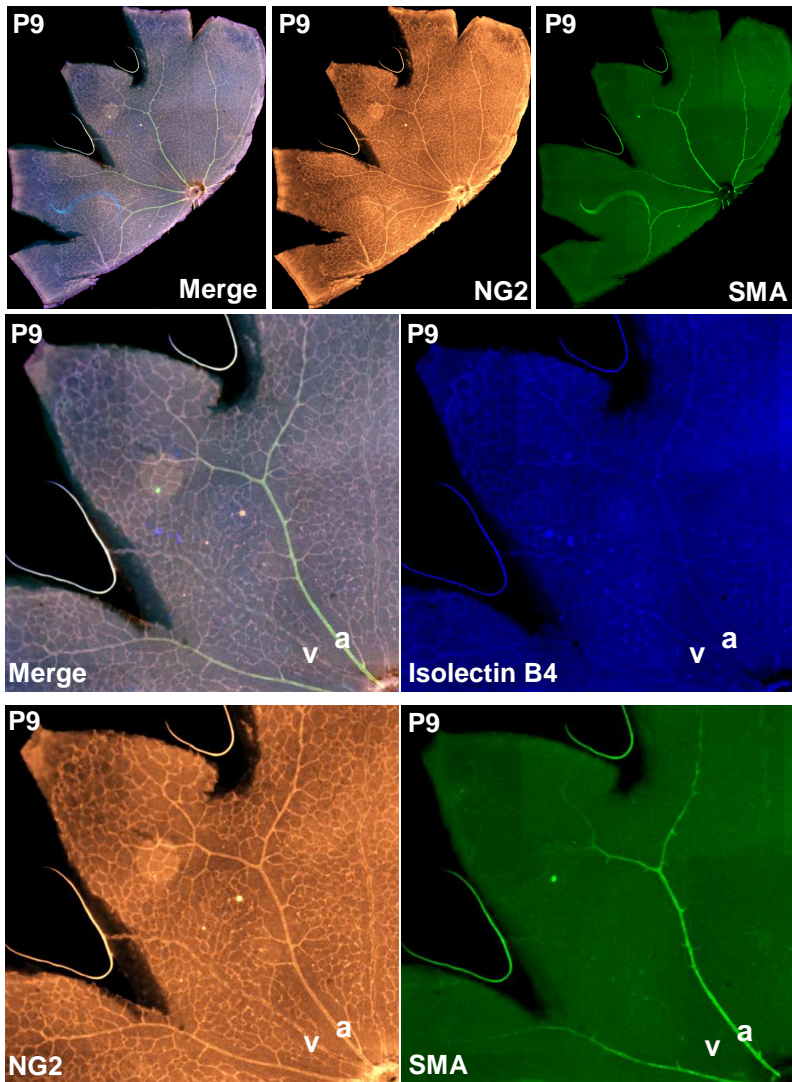
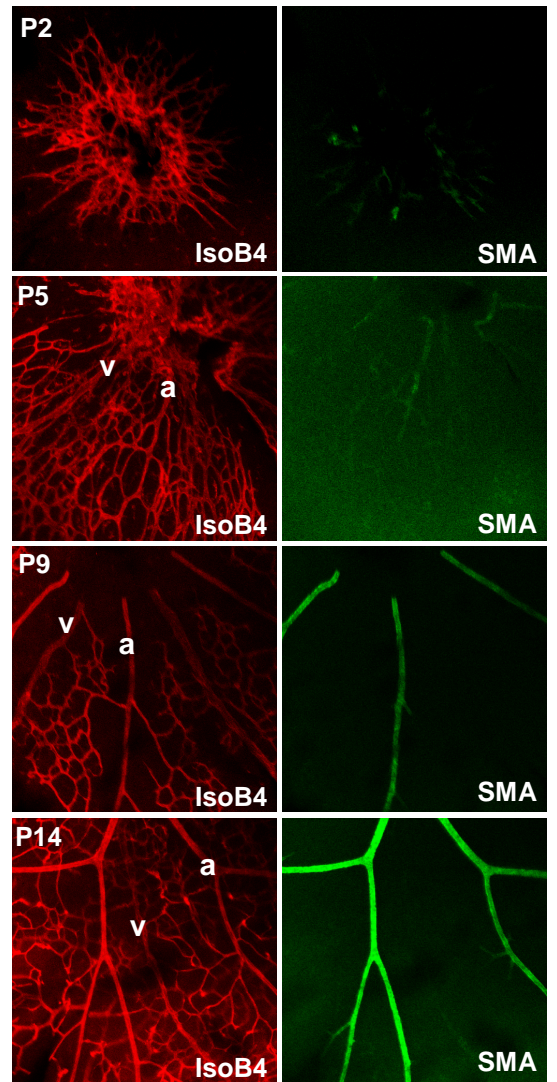


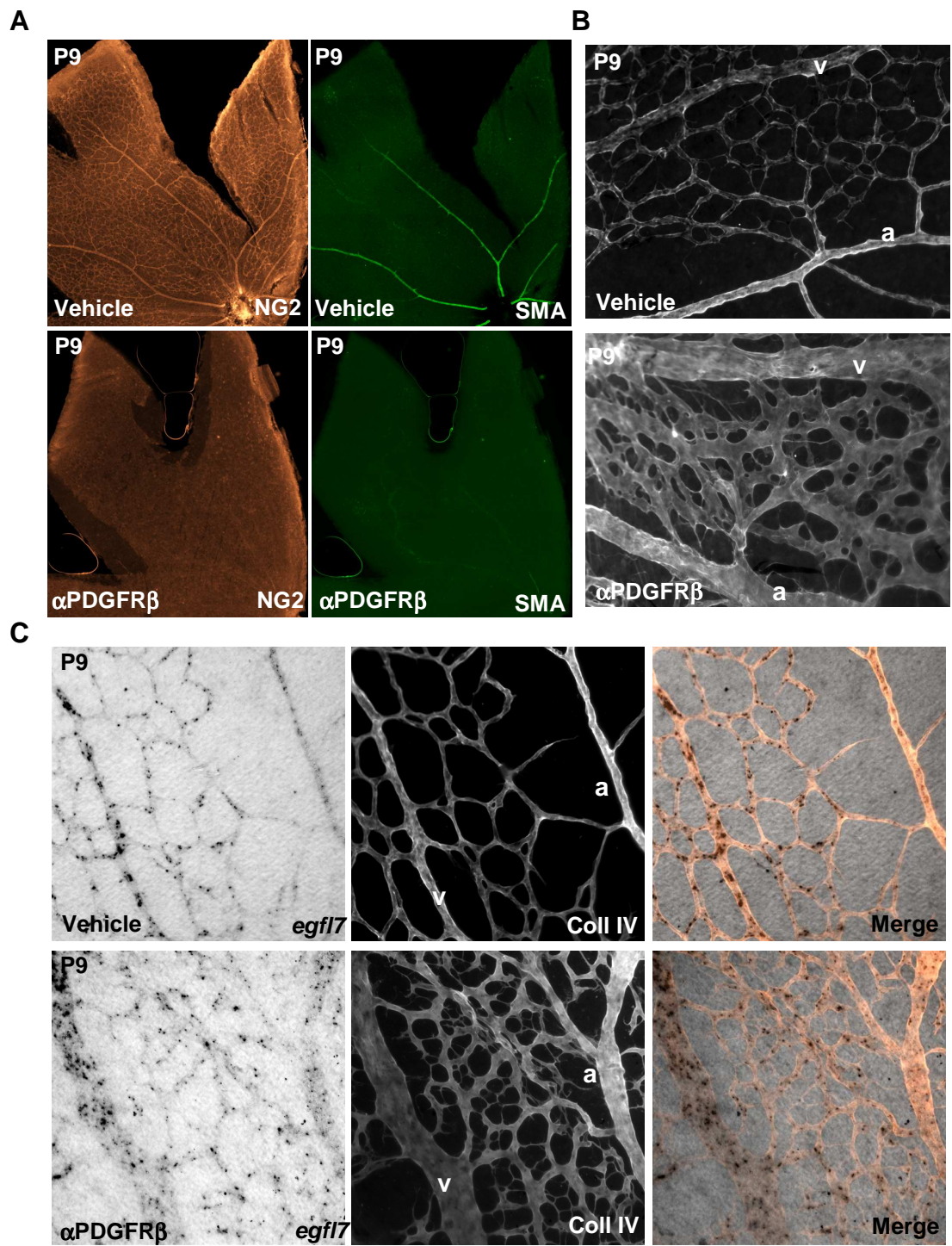
B

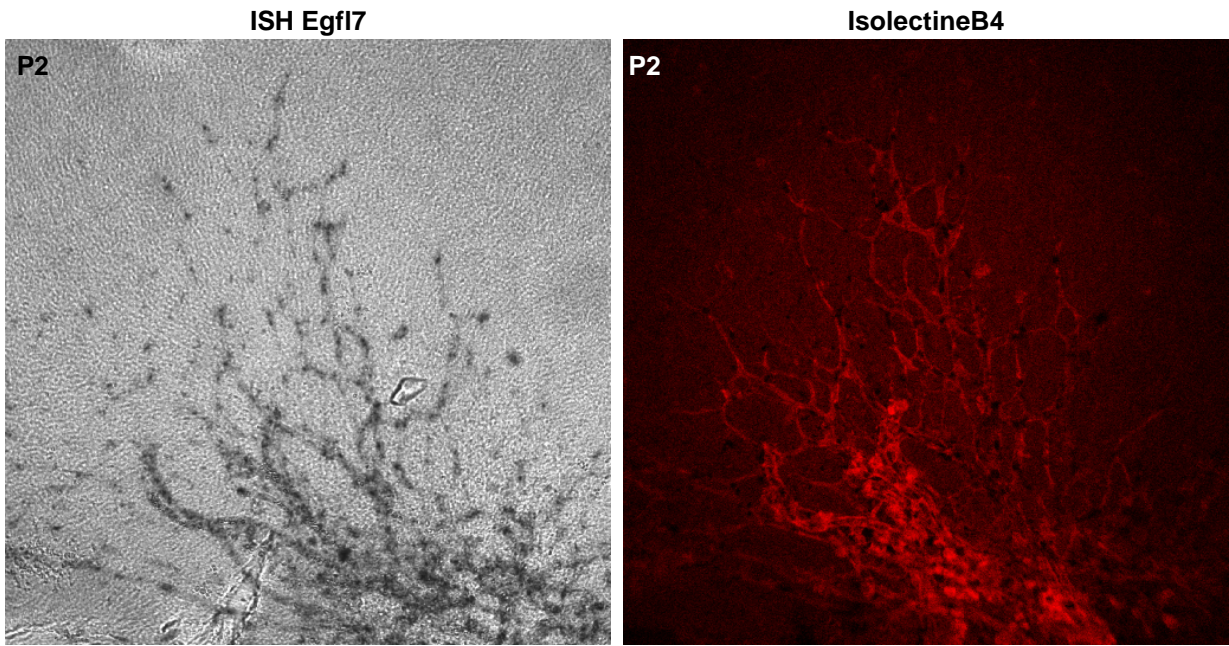


C



A**B**





RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Adams, R.H., Wilkinson, G.A., Weiss, C., Diella, F., Gale, N.W., Deutsch, U., Risau, W., and Klein, R. (1999). Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis. *Genes Dev.* *13*, 295–306.
- Albiero, M., Menegazzo, L., and Fadini, G.P. (2010). *Circulating smooth muscle progenitors and atherosclerosis.* *Trends Cardiovasc. Med.* *20*, 133–140.
- Alemán, L.M., Doench, J., and Sharp, P.A. (2007). Comparison of siRNA-induced off-target RNA and protein effects. *RNA N. Y. N* *13*, 385–395.
- Allegra, A., Alonci, A., Campo, S., Penna, G., Petrongaro, A., Gerace, D., and Musolino, C. (2012). Circulating microRNAs: new biomarkers in diagnosis, prognosis and treatment of cancer (review). *Int. J. Oncol.* *41*, 1897–1912.
- Ambros, V., Bartel, B., Bartel, D.P., Burge, C.B., Carrington, J.C., Chen, X., Dreyfuss, G., Eddy, S.R., Griffiths-Jones, S., Marshall, M., et al. (2003). A uniform system for microRNA annotation. *RNA N. Y. N* *9*, 277–279.
- Anand, S., and Cheresch, D.A. (2011). MicroRNA-mediated regulation of the angiogenic switch. *Curr. Opin. Hematol.* *18*, 171–176.
- Anand, S., Majeti, B.K., Acevedo, L.M., Murphy, E.A., Mukthavaram, R., Scheppke, L., Huang, M., Shields, D.J., Lindquist, J.N., Lapinski, P.E., et al. (2010). MicroRNA-132-mediated loss of p120RasGAP activates the endothelium to facilitate pathological angiogenesis. *Nat. Med.* *16*, 909–914.
- Arai, F., Ohneda, O., Miyamoto, T., Zhang, X.Q., and Suda, T. (2002). Mesenchymal stem cells in perichondrium express activated leukocyte cell adhesion molecule and participate in bone marrow formation. *J. Exp. Med.* *195*, 1549–1563.
- Arroyo, J.D., Chevillet, J.R., Kroh, E.M., Ruf, I.K., Pritchard, C.C., Gibson, D.F., Mitchell, P.S., Bennett, C.F., Pogosova-Agadjanyan, E.L., Stirewalt, D.L., 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*, 5003–5008.
- Asai, T., Suzuki, Y., Matsushita, S., Yonezawa, S., Yokota, J., Katanasaka, Y., Ishida, T., Dewa, T., Kiwada, H., Nango, M., et al. (2008). Disappearance of the angiogenic potential of endothelial cells caused by Argonaute2 knockdown. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *368*, 243–248.
- Asgeirsdóttir, S.A., van Solingen, C., Kurniati, N.F., Zwiers, P.J., Heeringa, P., van Meurs, M., Satchell, S.C., Saleem, M.A., Mathieson, P.W., Banas, B., et al. (2012). MicroRNA-126 contributes to renal microvascular heterogeneity of VCAM-1 protein expression in acute inflammation. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* *302*, F1630–1639.

- Avci, H.X., Zelina, P., Thelen, K., and Pollerberg, G.E. (2004). Role of cell adhesion molecule DM-GRASP in growth and orientation of retinal ganglion cell axons. *Dev. Biol.* *271*, 291–305.
- Babiarz, J.E., Ruby, J.G., Wang, Y., Bartel, D.P., and Blelloch, R. (2008). Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. *Genes Dev.* *22*, 2773–2785.
- Babiarz, J.E., Hsu, R., Melton, C., Thomas, M., Ullian, E.M., and Blelloch, R. (2011). A role for noncanonical microRNAs in the mammalian brain revealed by phenotypic differences in Dgcr8 versus Dicer1 knockouts and small RNA sequencing. *RNA N. Y. N* *17*, 1489–1501.
- Bagga, S., Bracht, J., Hunter, S., Massirer, K., Holtz, J., Eachus, R., and Pasquinelli, A.E. (2005). Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell* *122*, 553–563.
- Bajorath, J., Bowen, M.A., and Aruffo, A. (1995). Molecular model of the N-terminal receptor-binding domain of the human CD6 ligand ALCAM. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* *4*, 1644–1647.
- Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* *116*, 281–297.
- Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* *136*, 215–233.
- Baskerville, S., and Bartel, D.P. (2005). Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA N. Y. N* *11*, 241–247.
- Bazzoni, G., and Dejana, E. (2004). Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol. Rev.* *84*, 869–901.
- Behm-Ansmant, I., Rehwinkel, J., Doerks, T., Stark, A., Bork, P., and Izaurralde, E. (2006). mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev.* *20*, 1885–1898.
- Bevilacqua, M.P., Nelson, R.M., Mannori, G., and Cecconi, O. (1994). Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease. *Annu. Rev. Med.* *45*, 361–378.
- Biasiolo, M., Sales, G., Lionetti, M., Agnelli, L., Todoerti, K., Bisognin, A., Coppe, A., Romualdi, C., Neri, A., and Bortoluzzi, S. (2011). Impact of host genes and strand selection on miRNA and miRNA* expression. *PloS One* *6*, e23854.
- Bogerd, H.P., Karnowski, H.W., Cai, X., Shin, J., Pohlers, M., and Cullen, B.R. (2010). A mammalian herpesvirus uses noncanonical expression and processing mechanisms to generate viral MicroRNAs. *Mol. Cell* *37*, 135–142.
- Bohnsack, M.T., Czaplinski, K., and Gorlich, D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA N. Y. N* *10*, 185–191.

- Bonauer, A., Carmona, G., Iwasaki, M., Mione, M., Koyanagi, M., Fischer, A., Burchfield, J., Fox, H., Doebele, C., Ohtani, K., et al. (2009). MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice. *Science* 324, 1710–1713.
- Bonfanti, R., Furie, B.C., Furie, B., and Wagner, D.D. (1989). PADGEM (GMP140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *Blood* 73, 1109–1112.
- Borchert, G.M., Lanier, W., and Davidson, B.L. (2006). RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 1097–1101.
- Bowen, M.A., Patel, D.D., Li, X., Modrell, B., Malacko, A.R., Wang, W.C., Marquardt, H., Neubauer, M., Pesando, J.M., and Francke, U. (1995). Cloning, mapping, and characterization of activated leukocyte-cell adhesion molecule (ALCAM), a CD6 ligand. *J. Exp. Med.* 181, 2213–2220.
- Bowen, M.A., Bajorath, J., Siadak, A.W., Modrell, B., Malacko, A.R., Marquardt, H., Nadler, S.G., and Aruffo, A. (1996). The amino-terminal immunoglobulin-like domain of activated leukocyte cell adhesion molecule binds specifically to the membrane-proximal scavenger receptor cysteine-rich domain of CD6 with a 1:1 stoichiometry. *J. Biol. Chem.* 271, 17390–17396.
- Bradfield, P.F., Nourshargh, S., Aurrand-Lions, M., and Imhof, B.A. (2007). JAM family and related proteins in leukocyte migration (Vestweber series). *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 2104–2112.
- Brennecke, J., Stark, A., Russell, R.B., and Cohen, S.M. (2005). Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol.* 3, e85.
- Brock, M., Trenkmann, M., Gay, R.E., Michel, B.A., Gay, S., Fischler, M., Ulrich, S., Speich, R., and Huber, L.C. (2009). Interleukin-6 modulates the expression of the bone morphogenic protein receptor type II through a novel STAT3-microRNA cluster 17/92 pathway. *Circ. Res.* 104, 1184–1191.
- Bruder, S.P., Ricalton, N.S., Boynton, R.E., Connolly, T.J., Jaiswal, N., Zaia, J., and Barry, F.P. (1998). Mesenchymal stem cell surface antigen SB-10 corresponds to activated leukocyte cell adhesion molecule and is involved in osteogenic differentiation. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 13, 655–663.
- Burns, F.R., von Kannen, S., Guy, L., Raper, J.A., Kamholz, J., and Chang, S. (1991). DM-GRASP, a novel immunoglobulin superfamily axonal surface protein that supports neurite extension. *Neuron* 7, 209–220.
- Butcher, E.C. (1991). Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 67, 1033–1036.
- Cai, X., Hagedorn, C.H., and Cullen, B.R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA N. Y. N* 10, 1957–1966.
- Campagnolo, L., Leahy, A., Chitnis, S., Koschnick, S., Fitch, M.J., Fallon, J.T., Loskutoff, D., Taubman, M.B., and Stuhlmann, H. (2005). EGFL7 is a chemoattractant for endothelial cells and is up-regulated in angiogenesis and arterial injury. *Am. J. Pathol.* 167, 275–284.

- Caporali, A., Meloni, M., Völlenkle, C., Bonci, D., Sala-Newby, G.B., Addis, R., Spinetti, G., Losa, S., Masson, R., Baker, A.H., et al. (2011). Deregulation of microRNA-503 contributes to diabetes mellitus-induced impairment of endothelial function and reparative angiogenesis after limb ischemia. *Circulation* 123, 282–291.
- Carman, C.V., and Springer, T.A. (2004). A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *J. Cell Biol.* 167, 377–388.
- Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473, 298–307.
- Carmeliet, P., and Tessier-Lavigne, M. (2005). Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. *Nature* 436, 193–200.
- Casoli, T., Baliotti, M., Giorgetti, B., Solazzi, M., Scarpino, O., and Fattoretti, P. (2013). Platelets in Alzheimer's disease-associated cellular senescence and inflammation. *Curr. Pharm. Des.* 19, 1727–1738.
- Cayrol, R., Wosik, K., Berard, J.L., Dodelet-Devillers, A., Ifergan, I., Kebir, H., Haqqani, A.S., Kreymborg, K., Krug, S., Moumdjian, R., et al. (2008). Activated leukocyte cell adhesion molecule promotes leukocyte trafficking into the central nervous system. *Nat. Immunol.* 9, 137–145.
- Cecchetti, A., Rocchiccioli, S., Boccardi, C., and Citti, L. (2011). Vascular smooth-muscle-cell activation: proteomics point of view. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 288, 43–99.
- Celletti, F.L., Waugh, J.M., Amabile, P.G., Brendolan, A., Hilfiker, P.R., and Dake, M.D. (2001). Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nat. Med.* 7, 425–429.
- Chalfie, M., Horvitz, H.R., and Sulston, J.E. (1981). Mutations that lead to reiterations in the cell lineages of *C. elegans*. *Cell* 24, 59–69.
- Chamorro-Jorganes, A., Araldi, E., Penalva, L.O.F., Sandhu, D., Fernández-Hernando, C., and Suárez, Y. (2011). MicroRNA-16 and microRNA-424 regulate cell-autonomous angiogenic functions in endothelial cells via targeting vascular endothelial growth factor receptor-2 and fibroblast growth factor receptor-1. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 2595–2606.
- Chan, Y.C., Khanna, S., Roy, S., and Sen, C.K. (2011). miR-200b targets Ets-1 and is down-regulated by hypoxia to induce angiogenic response of endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 286, 2047–2056.
- Chan-Ling, T.L., Halasz, P., and Stone, J. (1990). Development of retinal vasculature in the cat: processes and mechanisms. *Curr. Eye Res.* 9, 459–478.
- Checchin, D., Sennlaub, F., Levavasseur, E., Leduc, M., and Chemtob, S. (2006). Potential role of microglia in retinal blood vessel formation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 3595–3602.
- Cheloufi, S., Dos Santos, C.O., Chong, M.M.W., and Hannon, G.J. (2010). A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature* 465, 584–589.

- Chen, Y., and Gorski, D.H. (2008). Regulation of angiogenesis through a microRNA (miR-130a) that down-regulates antiangiogenic homeobox genes GAX and HOXA5. *Blood* *111*, 1217–1226.
- Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K., Guo, J., Zhang, Y., Chen, J., Guo, X., et al. (2008). Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.* *18*, 997–1006.
- Chen, X., Liang, H., Zhang, J., Zen, K., and Zhang, C.-Y. (2012). Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication. *Trends Cell Biol.* *22*, 125–132.
- Chen, Y., Banda, M., Speyer, C.L., Smith, J.S., Rabson, A.B., and Gorski, D.H. (2010). Regulation of the expression and activity of the antiangiogenic homeobox gene GAX/MEOX2 by ZEB2 and microRNA-221. *Mol. Cell. Biol.* *30*, 3902–3913.
- Chen, Z., Lai, T.-C., Jan, Y.-H., Lin, F.-M., Wang, W.-C., Xiao, H., Wang, Y.-T., Sun, W., Cui, X., Li, Y.-S., et al. (2013). Hypoxia-responsive miRNAs target argonaute 1 to promote angiogenesis. *J. Clin. Invest.* *123*, 1057–1067.
- Chendrimada, T.P., Gregory, R.I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., and Shiekhattar, R. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* *436*, 740–744.
- Chendrimada, T.P., Finn, K.J., Ji, X., Baillat, D., Gregory, R.I., Liebhaber, S.A., Pasquinelli, A.E., and Shiekhattar, R. (2007). MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature* *447*, 823–828.
- Chim, S.S.C., Shing, T.K.F., Hung, E.C.W., Leung, T.-Y., Lau, T.-K., Chiu, R.W.K., and Lo, Y.M.D. (2008). Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clin. Chem.* *54*, 482–490.
- Choudhry, P., Joshi, D., Funke, B., and Trede, N. (2011). Alcama mediates Edn1 signaling during zebrafish cartilage morphogenesis. *Dev. Biol.* *349*, 483–493.
- Chu, Y., Hughes, S., and Chan-Ling, T. (2001). Differentiation and migration of astrocyte precursor cells and astrocytes in human fetal retina: relevance to optic nerve coloboma. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *15*, 2013–2015.
- Cimmino, A., Calin, G.A., Fabbri, M., Iorio, M.V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Aqeilan, R.I., Zupo, S., Dono, M., et al. (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 13944–13949.
- Cipollone, F., Felicioni, L., Sarzani, R., Uchino, S., Spigonardo, F., Mandolini, C., Malatesta, S., Bucci, M., Mammarella, C., Santovito, D., et al. (2011). A unique microRNA signature associated with plaque instability in humans. *Stroke J. Cereb. Circ.* *42*, 2556–2563.
- Collison, A., Herbert, C., Siegle, J.S., Mattes, J., Foster, P.S., and Kumar, R.K. (2011a). Altered expression of microRNA in the airway wall in chronic asthma: miR-126 as a potential therapeutic target. *BMC Pulm. Med.* *11*, 29.

- Collison, A., Herbert, C., Siegle, J.S., Mattes, J., Foster, P.S., and Kumar, R.K. (2011b). Altered expression of microRNA in the airway wall in chronic asthma: miR-126 as a potential therapeutic target. *BMC Pulm. Med.* *11*, 29.
- Corada, M., Mariotti, M., Thurston, G., Smith, K., Kunkel, R., Brockhaus, M., Lampugnani, M.G., Martin-Padura, I., Stoppacciaro, A., Ruco, L., et al. (1999). Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 9815–9820.
- Cortés, F., Deschaseaux, F., Uchida, N., Labastie, M.C., Frieria, A.M., He, D., Charbord, P., and Péault, B. (1999). HCA, an immunoglobulin-like adhesion molecule present on the earliest human hematopoietic precursor cells, is also expressed by stromal cells in blood-forming tissues. *Blood* *93*, 826–837.
- Crawford, M., Brawner, E., Batte, K., Yu, L., Hunter, M.G., Otterson, G.A., Nuovo, G., Marsh, C.B., and Nana-Sinkam, S.P. (2008). MicroRNA-126 inhibits invasion in non-small cell lung carcinoma cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *373*, 607–612.
- Cui, W., Li, Q., Feng, L., and Ding, W. (2011). MiR-126-3p regulates progesterone receptors and involves development and lactation of mouse mammary gland. *Mol. Cell. Biochem.* *355*, 17–25.
- Cunningham, S.A., Rodriguez, J.M., Arrate, M.P., Tran, T.M., and Brock, T.A. (2002). JAM2 interacts with alpha4beta1. Facilitation by JAM3. *J. Biol. Chem.* *277*, 27589–27592.
- Davies, S.R., Dent, C., Watkins, G., King, J.A., Mokbel, K., and Jiang, W.G. (2008). Expression of the cell to cell adhesion molecule, ALCAM, in breast cancer patients and the potential link with skeletal metastasis. *Oncol. Rep.* *19*, 555–561.
- Degen, W.G., van Kempen, L.C., Gijzen, E.G., van Groningen, J.J., van Kooyk, Y., Bloemers, H.P., and Swart, G.W. (1998). MEMD, a new cell adhesion molecule in metastasizing human melanoma cell lines, is identical to ALCAM (activated leukocyte cell adhesion molecule). *Am. J. Pathol.* *152*, 805–813.
- Delfortrie, S., Pinte, S., Mattot, V., Samson, C., Villain, G., Caetano, B., Lauridant-Philippin, G., Baranzelli, M.-C., Bonnetterre, J., Trottein, F., et al. (2011). Eglf7 promotes tumor escape from immunity by repressing endothelial cell activation. *Cancer Res.* *71*, 7176–7186.
- Denli, A.M., Tops, B.B.J., Plasterk, R.H.A., Ketting, R.F., and Hannon, G.J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* *432*, 231–235.
- Dentelli, P., Rosso, A., Orso, F., Olgasi, C., Taverna, D., and Brizzi, M.F. (2010a). microRNA-222 controls neovascularization by regulating signal transducer and activator of transcription 5A expression. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *30*, 1562–1568.
- Dentelli, P., Rosso, A., Orso, F., Olgasi, C., Taverna, D., and Brizzi, M.F. (2010b). microRNA-222 controls neovascularization by regulating signal transducer and activator of transcription 5A expression. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *30*, 1562–1568.
- Dews, M., Homayouni, A., Yu, D., Murphy, D., Seignani, C., Wentzel, E., Furth, E.E., Lee, W.M., Enders, G.H., Mendell, J.T., et al. (2006). Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. *Nat. Genet.* *38*, 1060–1065.

- Diederichs, S., and Haber, D.A. (2007). Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell* *131*, 1097–1108.
- Diekmann, H., and Stuermer, C.A.O. (2009). Zebrafish neurolin-a and -b, orthologs of ALCAM, are involved in retinal ganglion cell differentiation and retinal axon pathfinding. *J. Comp. Neurol.* *513*, 38–50.
- Diez-Roux, G., and Lang, R.A. (1997). Macrophages induce apoptosis in normal cells in vivo. *Dev. Camb. Engl.* *124*, 3633–3638.
- Ding, X.C., and Grosshans, H. (2009). Repression of *C. elegans* microRNA targets at the initiation level of translation requires GW182 proteins. *EMBO J.* *28*, 213–222.
- Doebele, C., Bonauer, A., Fischer, A., Scholz, A., Reiss, Y., Urbich, C., Hofmann, W.-K., Zeiher, A.M., and Dimmeler, S. (2010). Members of the microRNA-17-92 cluster exhibit a cell-intrinsic antiangiogenic function in endothelial cells. *Blood* *115*, 4944–4950.
- Donahue, R.E., Jin, P., Bonifacino, A.C., Metzger, M.E., Ren, J., Wang, E., and Stroncek, D.F. (2009). Plerixafor (AMD3100) and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) mobilize different CD34+ cell populations based on global gene and microRNA expression signatures. *Blood* *114*, 2530–2541.
- Edelstein, L.C., McKenzie, S.E., Shaw, C., Holinstat, M.A., Kunapuli, S.P., and Bray, P.F. (2013). MicroRNAs in platelet production and activation. *J. Thromb. Haemost. JTH 11 Suppl 1*, 340–350.
- Ehling, M., Adams, S., Benedito, R., and Adams, R.H. (2013). Notch controls retinal blood vessel maturation and quiescence. *Dev. Camb. Engl.* *140*, 3051–3061.
- Elia, L., Quintavalle, M., Zhang, J., Contu, R., Cossu, L., Latronico, M.V.G., Peterson, K.L., Indolfi, C., Catalucci, D., Chen, J., et al. (2009). The knockout of miR-143 and -145 alters smooth muscle cell maintenance and vascular homeostasis in mice: correlates with human disease. *Cell Death Differ.* *16*, 1590–1598.
- Ender, C., Krek, A., Friedländer, M.R., Beitzinger, M., Weinmann, L., Chen, W., Pfeffer, S., Rajewsky, N., and Meister, G. (2008). A human snoRNA with microRNA-like functions. *Mol. Cell* *32*, 519–528.
- Eulalio, A., Triteschler, F., and Izaurralde, E. (2009). The GW182 protein family in animal cells: new insights into domains required for miRNA-mediated gene silencing. *RNA N. Y. N* *15*, 1433–1442.
- Fang, Y., and Davies, P.F. (2012). Site-specific microRNA-92a regulation of Kruppel-like factors 4 and 2 in atherosusceptible endothelium. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *32*, 979–987.
- Fang, Y., Shi, C., Manduchi, E., Civelek, M., and Davies, P.F. (2010a). MicroRNA-10a regulation of proinflammatory phenotype in athero-susceptible endothelium in vivo and in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 13450–13455.

Fang, Y., Shi, C., Manduchi, E., Civelek, M., and Davies, P.F. (2010b). MicroRNA-10a regulation of proinflammatory phenotype in athero-susceptible endothelium in vivo and in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 13450–13455.

Fantin, A., Vieira, J.M., Gestri, G., Denti, L., Schwarz, Q., Prykhozhiy, S., Peri, F., Wilson, S.W., and Ruhrberg, C. (2010). Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood* *116*, 829–840.

Fasanaro, P., D'Alessandra, Y., Di Stefano, V., Melchionna, R., Romani, S., Pompilio, G., Capogrossi, M.C., and Martelli, F. (2008). MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3. *J. Biol. Chem.* *283*, 15878–15883.

Fasanaro, P., Greco, S., Lorenzi, M., Pescatori, M., Brioschi, M., Kulshreshtha, R., Banfi, C., Stubbs, A., Calin, G.A., Ivan, M., et al. (2009). An integrated approach for experimental target identification of hypoxia-induced miR-210. *J. Biol. Chem.* *284*, 35134–35143.

Felli, N., Felicetti, F., Lustrì, A.M., Errico, M.C., Bottero, L., Cannistraci, A., De Feo, A., Petrini, M., Pedini, F., Biffoni, M., et al. (2013). miR-126 and miR-126* restored expressions play a tumor suppressor role by directly regulating ADAM9 and MMP7 in melanoma. *PLoS One* *8*, e56824.

Feng, R., Chen, X., Yu, Y., Su, L., Yu, B., Li, J., Cai, Q., Yan, M., Liu, B., and Zhu, Z. (2010). miR-126 functions as a tumour suppressor in human gastric cancer. *Cancer Lett.* *298*, 50–63.

Feng, X., Wang, H., Ye, S., Guan, J., Tan, W., Cheng, S., Wei, G., Wu, W., Wu, F., and Zhou, Y. (2012). Up-regulation of microRNA-126 may contribute to pathogenesis of ulcerative colitis via regulating NF-kappaB inhibitor Ikb α . *PLoS One* *7*, e52782.

Fichtlscherer, S., De Rosa, S., Fox, H., Schwietz, T., Fischer, A., Liebetrau, C., Weber, M., Hamm, C.W., Röxe, T., Müller-Ardogan, M., et al. (2010). Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circ. Res.* *107*, 677–684.

Fiedler, J., Jazbutyte, V., Kirchmaier, B.C., Gupta, S.K., Lorenzen, J., Hartmann, D., Galuppo, P., Kneitz, S., Pena, J.T.G., Sohn-Lee, C., et al. (2011). MicroRNA-24 regulates vascularity after myocardial infarction. *Circulation* *124*, 720–730.

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

Fitch, M.J., Campagnolo, L., Kuhnert, F., and Stuhlmann, H. (2004). Eglf7, a novel epidermal growth factor-domain gene expressed in endothelial cells. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *230*, 316–324.

Forman, J.J., and Collier, H.A. (2010). The code within the code: microRNAs target coding regions. *Cell Cycle Georget. Tex* *9*, 1533–1541.

- Forman, J.J., Legesse-Miller, A., and Collier, H.A. (2008). A search for conserved sequences in coding regions reveals that the let-7 microRNA targets Dicer within its coding sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 14879–14884.
- Friedman, R.C., Farh, K.K.-H., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* *19*, 92–105.
- Fruttiger, M. (2002). Development of the mouse retinal vasculature: angiogenesis versus vasculogenesis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *43*, 522–527.
- Fruttiger, M. (2007). Development of the retinal vasculature. *Angiogenesis* *10*, 77–88.
- Fruttiger, M., Calver, A.R., Krüger, W.H., Mudhar, H.S., Michalovich, D., Takakura, N., Nishikawa, S., and Richardson, W.D. (1996). PDGF mediates a neuron-astrocyte interaction in the developing retina. *Neuron* *17*, 1117–1131.
- Fruttiger, M., Calver, A.R., and Richardson, W.D. (2000). Platelet-derived growth factor is constitutively secreted from neuronal cell bodies but not from axons. *Curr. Biol. CB* *10*, 1283–1286.
- Fukunaga, R., Han, B.W., Hung, J.-H., Xu, J., Weng, Z., and Zamore, P.D. (2012). Dicer partner proteins tune the length of mature miRNAs in flies and mammals. *Cell* *151*, 533–546.
- Gahmberg, C.G., Valmu, L., Fagerholm, S., Kotovuori, P., Ihanus, E., Tian, L., and Pessa-Morikawa, T. (1998). Leukocyte integrins and inflammation. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *54*, 549–555.
- Garzon, R., Pichiorri, F., Palumbo, T., Iuliano, R., Cimmino, A., Aqeilan, R., Volinia, S., Bhatt, D., Alder, H., Marcucci, G., et al. (2006). MicroRNA fingerprints during human megakaryocytopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 5078–5083.
- Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., Jeltsch, M., Mitchell, C., Alitalo, K., Shima, D., et al. (2003). VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J. Cell Biol.* *161*, 1163–1177.
- Ghosh, G., Subramanian, I.V., Adhikari, N., Zhang, X., Joshi, H.P., Basi, D., Chandrashekar, Y.S., Hall, J.L., Roy, S., Zeng, Y., et al. (2010). Hypoxia-induced microRNA-424 expression in human endothelial cells regulates HIF- α isoforms and promotes angiogenesis. *J. Clin. Invest.* *120*, 4141–4154.
- Giraldez, A.J., Cinalli, R.M., Glasner, M.E., Enright, A.J., Thomson, J.M., Baskerville, S., Hammond, S.M., Bartel, D.P., and Schier, A.F. (2005). MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. *Science* *308*, 833–838.
- Giraldez, A.J., Mishima, Y., Rihel, J., Grocock, R.J., Van Dongen, S., Inoue, K., Enright, A.J., and Schier, A.F. (2006). Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science* *312*, 75–79.
- Gnanaguru, G., Bachay, G., Biswas, S., Pinzón-Duarte, G., Hunter, D.D., and Brunken, W.J. (2013). Laminins containing the β 2 and γ 3 chains regulate astrocyte migration and angiogenesis in the retina. *Dev. Camb. Engl.* *140*, 2050–2060.

- Goettsch, C., Rauner, M., Pacyna, N., Hempel, U., Bornstein, S.R., and Hofbauer, L.C. (2011). miR-125b regulates calcification of vascular smooth muscle cells. *Am. J. Pathol.* *179*, 1594–1600.
- Grabher, C., Payne, E.M., Johnston, A.B., Bolli, N., Lechman, E., Dick, J.E., Kanki, J.P., and Look, A.T. (2011). Zebrafish microRNA-126 determines hematopoietic cell fate through c-Myb. *Leukemia* *25*, 506–514.
- Gregory, R.I., Yan, K.-P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* *432*, 235–240.
- Gregory, R.I., Chendrimada, T.P., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2005). Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* *123*, 631–640.
- Grimson, A., Farh, K.K.-H., Johnston, W.K., Garrett-Engle, P., Lim, L.P., and Bartel, D.P. (2007). MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol. Cell* *27*, 91–105.
- Grishok, A., Pasquinelli, A.E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., Baillie, D.L., Fire, A., Ruvkun, G., and Mello, C.C. (2001). Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* *106*, 23–34.
- Gwizdek, C., Ossareh-Nazari, B., Brownawell, A.M., Doglio, A., Bertrand, E., Macara, I.G., and Dargemont, C. (2003). Exportin-5 mediates nuclear export of minihelix-containing RNAs. *J. Biol. Chem.* *278*, 5505–5508.
- Haase, A.D., Jaskiewicz, L., Zhang, H., Lainé, S., Sack, R., Gatignol, A., and Filipowicz, W. (2005). TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO Rep.* *6*, 961–967.
- Hackett, S.F., Wiegand, S., Yancopoulos, G., and Campochiaro, P.A. (2002). Angiopoietin-2 plays an important role in retinal angiogenesis. *J. Cell. Physiol.* *192*, 182–187.
- Hackl, M., Brunner, S., Fortschegger, K., Schreiner, C., Micutkova, L., Mück, C., Laschober, G.T., Lepperdinger, G., Sampson, N., Berger, P., et al. (2010). miR-17, miR-19b, miR-20a, and miR-106a are down-regulated in human aging. *Aging Cell* *9*, 291–296.
- Hamada, S., Satoh, K., Fujibuchi, W., Hirota, M., Kanno, A., Unno, J., Masamune, A., Kikuta, K., Kume, K., and Shimosegawa, T. (2012). MiR-126 acts as a tumor suppressor in pancreatic cancer cells via the regulation of ADAM9. *Mol. Cancer Res. MCR* *10*, 3–10.
- Hammer, E., Phong, T.Q., Steil, L., Klingel, K., Salazar, M.G., Bernhardt, J., Kandolf, R., Kroemer, H.K., Felix, S.B., and Völker, U. (2010). Viral myocarditis induced by Coxsackievirus B3 in A.BY/SnJ mice: analysis of changes in the myocardial proteome. *Proteomics* *10*, 1802–1818.
- Hammes, H.-P., Lin, J., Wagner, P., Feng, Y., Vom Hagen, F., Krzizok, T., Renner, O., Breier, G., Brownlee, M., and Deutsch, U. (2004). Angiopoietin-2 causes pericyte dropout in the normal retina: evidence for involvement in diabetic retinopathy. *Diabetes* *53*, 1104–1110.

- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.-H., Kim, Y.-K., Jin, H., and Kim, V.N. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* *18*, 3016–3027.
- Hanke, M., Hoefig, K., Merz, H., Feller, A.C., Kausch, I., Jocham, D., Warnecke, J.M., and Sczakiel, G. (2010). A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer. *Urol. Oncol.* *28*, 655–661.
- Harris, T.A., Yamakuchi, M., Ferlito, M., Mendell, J.T., and Lowenstein, C.J. (2008). MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 1516–1521.
- Harris, T.A., Yamakuchi, M., Kondo, M., Oettgen, P., and Lowenstein, C.J. (2010). Ets-1 and Ets-2 regulate the expression of microRNA-126 in endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *30*, 1990–1997.
- Hassan, N.J., Barclay, A.N., and Brown, M.H. (2004). Frontline: Optimal T cell activation requires the engagement of CD6 and CD166. *Eur. J. Immunol.* *34*, 930–940.
- He, L., and Hannon, G.J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.* *5*, 522–531.
- Henke, J.I., Goergen, D., Zheng, J., Song, Y., Schüttler, C.G., Fehr, C., Jünemann, C., and Niepmann, M. (2008). microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J.* *27*, 3300–3310.
- Hergenreider, E., Heydt, S., Tréguer, K., Boettger, T., Horrevoets, A.J.G., Zeiher, A.M., Scheffer, M.P., Frangakis, A.S., Yin, X., Mayr, M., et al. (2012). Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. *Nat. Cell Biol.* *14*, 249–256.
- Hill, J.M., Zalos, G., Halcox, J.P.J., Schenke, W.H., Waclawiw, M.A., Quyyumi, A.A., and Finkel, T. (2003). Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N. Engl. J. Med.* *348*, 593–600.
- Hu, S., Huang, M., Li, Z., Jia, F., Ghosh, Z., Lijkwan, M.A., Fasanaro, P., Sun, N., Wang, X., Martelli, F., et al. (2010). MicroRNA-210 as a novel therapy for treatment of ischemic heart disease. *Circulation* *122*, S124–131.
- Huang, M.-T., Larbi, K.Y., Scheiermann, C., Woodfin, A., Gerwin, N., Haskard, D.O., and Nourshargh, S. (2006). ICAM-2 mediates neutrophil transmigration in vivo: evidence for stimulus specificity and a role in PECAM-1-independent transmigration. *Blood* *107*, 4721–4727.
- Huang, X., Gschwend, E., Van Handel, B., Cheng, D., Mikkola, H.K.A., and Witte, O.N. (2011). Regulated expression of microRNAs-126/126* inhibits erythropoiesis from human embryonic stem cells. *Blood* *117*, 2157–2165.
- Hughes, S., Yang, H., and Chan-Ling, T. (2000). Vascularization of the human fetal retina: roles of vasculogenesis and angiogenesis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *41*, 1217–1228.

- Hullinger, T.G., Montgomery, R.L., Seto, A.G., Dickinson, B.A., Semus, H.M., Lynch, J.M., Dalby, C.M., Robinson, K., Stack, C., Latimer, P.A., et al. (2012). Inhibition of miR-15 protects against cardiac ischemic injury. *Circ. Res.* *110*, 71–81.
- Humphreys, D.T., Westman, B.J., Martin, D.I.K., and Preiss, T. (2005). MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 16961–16966.
- Hunter, M.P., Ismail, N., Zhang, X., Aguda, B.D., Lee, E.J., Yu, L., Xiao, T., Schafer, J., Lee, M.-L.T., Schmittgen, T.D., et al. (2008). Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PloS One* *3*, e3694.
- Huntsman, D.G., Chin, S.F., Muleris, M., Batley, S.J., Collins, V.P., Wiedemann, L.M., Aparicio, S., and Caldas, C. (1999). MLL2, the second human homolog of the *Drosophila* trithorax gene, maps to 19q13.1 and is amplified in solid tumor cell lines. *Oncogene* *18*, 7975–7984.
- Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A.E., Bálint, E., Tuschl, T., and Zamore, P.D. (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* *293*, 834–838.
- Iolyeva, M., Karaman, S., Willrodt, A.-H., Weingartner, S., Vigl, B., and Halin, C. (2013). Novel role for ALCAM in lymphatic network formation and function. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *27*, 978–990.
- Ishibashi, S., Brown, M.S., Goldstein, J.L., Gerard, R.D., Hammer, R.E., and Herz, J. (1993). Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J. Clin. Invest.* *92*, 883–893.
- Ishida, S., Yamashiro, K., Usui, T., Kaji, Y., Ogura, Y., Hida, T., Honda, Y., Oguchi, Y., and Adamis, A.P. (2003). Leukocytes mediate retinal vascular remodeling during development and vaso-obliteration in disease. *Nat. Med.* *9*, 781–788.
- Ishizaki, T., Tamiya, T., Taniguchi, K., Morita, R., Kato, R., Okamoto, F., Saeki, K., Nomura, M., Nojima, Y., and Yoshimura, A. (2011). miR126 positively regulates mast cell proliferation and cytokine production through suppressing *Spred1*. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* *16*, 803–814.
- Ito, T., Yagi, S., and Yamakuchi, M. (2010). MicroRNA-34a regulation of endothelial senescence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *398*, 735–740.
- Ivan, M., Harris, A.L., Martelli, F., and Kulshreshtha, R. (2008). Hypoxia response and microRNAs: no longer two separate worlds. *J. Cell. Mol. Med.* *12*, 1426–1431.
- Jacob, F., and Monod, J. (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* *3*, 318–356.
- Jangra, R.K., Yi, M., and Lemon, S.M. (2010). Regulation of hepatitis C virus translation and infectious virus production by the microRNA miR-122. *J. Virol.* *84*, 6615–6625.

- Johnston, I.G., Paladino, T., Gurd, J.W., and Brown, I.R. (1990). Molecular cloning of SC1: a putative brain extracellular matrix glycoprotein showing partial similarity to osteonectin/BM40/SPARC. *Neuron* 4, 165–176.
- Jones, R.S., and Gelbart, W.M. (1993). The *Drosophila* Polycomb-group gene *Enhancer of zeste* contains a region with sequence similarity to *trithorax*. *Mol. Cell. Biol.* 13, 6357.
- Jong, H.-L., Mustafa, M.R., Vanhoutte, P.M., AbuBakar, S., and Wong, P.-F. (2013). MicroRNA 299-3p modulates replicative senescence in endothelial cells. *Physiol. Genomics* 45, 256–267.
- Jopling, C.L. (2008). Regulation of hepatitis C virus by microRNA-122. *Biochem. Soc. Trans.* 36, 1220–1223.
- Jopling, C.L., Yi, M., Lancaster, A.M., Lemon, S.M., and Sarnow, P. (2005). Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* 309, 1577–1581.
- Kalscheuer, S., Zhang, X., Zeng, Y., and Upadhyaya, P. (2008). Differential expression of microRNAs in early-stage neoplastic transformation in the lungs of F344 rats chronically treated with the tobacco carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Carcinogenesis* 29, 2394–2399.
- Kanellopoulou, C., Muljo, S.A., Kung, A.L., Ganesan, S., Drapkin, R., Jenuwein, T., Livingston, D.M., and Rajewsky, K. (2005). Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes Dev.* 19, 489–501.
- Kedde, M., Strasser, M.J., Boldajipour, B., Oude Vrielink, J.A.F., Slanchev, K., le Sage, C., Nagel, R., Voorhoeve, P.M., van Duijse, J., Ørom, U.A., et al. (2007). RNA-binding protein Dnd1 inhibits microRNA access to target mRNA. *Cell* 131, 1273–1286.
- Kellogg, G., Sum, J., and Wallerstein, R. (2013). Deletion of 3p25.3 in a patient with intellectual disability and dysmorphic features with further definition of a critical region. *Am. J. Med. Genet. A.* 161, 1405–1408.
- Ketting, R.F., Fischer, S.E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G.J., and Plasterk, R.H. (2001). Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev.* 15, 2654–2659.
- Khvorova, A., Reynolds, A., and Jayasena, S.D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115, 209–216.
- Kim, E., Cook-Mills, J., Morgan, G., Sredni, S.T., and Pachman, L.M. (2012). Increased expression of vascular cell adhesion molecule 1 in muscle biopsy samples from juvenile dermatomyositis patients with short duration of untreated disease is regulated by miR-126. *Arthritis Rheum.* 64, 3809–3817.
- Kim, I., Ryu, Y.S., Kwak, H.J., Ahn, S.Y., Oh, J.-L., Yancopoulos, G.D., Gale, N.W., and Koh, G.Y. (2002). EphB ligand, ephrinB2, suppresses the VEGF- and angiopoietin 1-induced Ras/mitogen-activated protein kinase pathway in venous endothelial cells. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 16, 1126–1128.

- Kim, V.N., Han, J., and Siomi, M.C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 126–139.
- King, J.A., Ofori-Acquah, S.F., Stevens, T., Al-Mehdi, A.-B., Fodstad, O., and Jiang, W.G. (2004). Activated leukocyte cell adhesion molecule in breast cancer: prognostic indicator. *Breast Cancer Res. BCR* *6*, R478–487.
- Kiosses, W.B., Daniels, R.H., Otey, C., Bokoch, G.M., and Schwartz, M.A. (1999). A role for p21-activated kinase in endothelial cell migration. *J. Cell Biol.* *147*, 831–844.
- Kiosses, W.B., Hood, J., Yang, S., Gerritsen, M.E., Cheresh, D.A., Alderson, N., and Schwartz, M.A. (2002). A dominant-negative p65 PAK peptide inhibits angiogenesis. *Circ. Res.* *90*, 697–702.
- Kiriakidou, M., Tan, G.S., Lamprinaki, S., De Planell-Saguer, M., Nelson, P.T., and Mourelatos, Z. (2007). An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell* *129*, 1141–1151.
- Kosaka, N., Izumi, H., Sekine, K., and Ochiya, T. (2010). microRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk. *Silence* *1*, 7.
- Kostrewa, D., Brockhaus, M., D’Arcy, A., Dale, G.E., Nelboeck, P., Schmid, G., Mueller, F., Bazzoni, G., Dejana, E., Bartfai, T., et al. (2001). X-ray structure of junctional adhesion molecule: structural basis for homophilic adhesion via a novel dimerization motif. *EMBO J.* *20*, 4391–4398.
- Kristiansen, G., Pilarsky, C., Wissmann, C., Kaiser, S., Bruemmendorf, T., Roepcke, S., Dahl, E., Hinzmann, B., Specht, T., Pervan, J., et al. (2005). Expression profiling of microdissected matched prostate cancer samples reveals CD166/MEMD and CD24 as new prognostic markers for patient survival. *J. Pathol.* *205*, 359–376.
- Kubota, Y., and Suda, T. (2009). Feedback mechanism between blood vessels and astrocytes in retinal vascular development. *Trends Cardiovasc. Med.* *19*, 38–43.
- Kubota, Y., Takubo, K., Shimizu, T., Ohno, H., Kishi, K., Shibuya, M., Saya, H., and Suda, T. (2009). M-CSF inhibition selectively targets pathological angiogenesis and lymphangiogenesis. *J. Exp. Med.* *206*, 1089–1102.
- Kuchenbauer, F., Mah, S.M., Heuser, M., McPherson, A., Rüschemann, J., Rouhi, A., Berg, T., Bullinger, L., Argiropoulos, B., Morin, R.D., et al. (2011). Comprehensive analysis of mammalian miRNA* species and their role in myeloid cells. *Blood* *118*, 3350–3358.
- Kuehbacher, A., Urbich, C., Zeiher, A.M., and Dimmeler, S. (2007). Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis. *Circ. Res.* *101*, 59–68.
- Kuhnert, F., Mancuso, M.R., Hampton, J., Stankunas, K., Asano, T., Chen, C.-Z., and Kuo, C.J. (2008). Attribution of vascular phenotypes of the murine *Egfl7* locus to the microRNA miR-126. *Dev. Camb. Engl.* *135*, 3989–3993.
- Kulshreshtha, R., Ferracin, M., Wojcik, S.E., Garzon, R., Alder, H., Agosto-Perez, F.J., Davuluri, R., Liu, C.-G., Croce, C.M., Negrini, M., et al. (2007). A microRNA signature of hypoxia. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 1859–1867.

- Kuschert, G.S., Coulin, F., Power, C.A., Proudfoot, A.E., Hubbard, R.E., Hoogewerf, A.J., and Wells, T.N. (1999). Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses. *Biochemistry (Mosc.)* 38, 12959–12968.
- Kuzmichev, A., Jenuwein, T., Tempst, P., and Reinberg, D. (2004). Different EZH2-containing complexes target methylation of histone H1 or nucleosomal histone H3. *Mol. Cell* 14, 183–193.
- Ladewig, E., Okamura, K., Flynt, A.S., Westholm, J.O., and Lai, E.C. (2012). Discovery of hundreds of mirtrons in mouse and human small RNA data. *Genome Res.* 22, 1634–1645.
- Laessing, U., Giordano, S., Stecher, B., Lottspeich, F., and Stuermer, C.A. (1994). Molecular characterization of fish neurolin: a growth-associated cell surface protein and member of the immunoglobulin superfamily in the fish retinotectal system with similarities to chick protein DM-GRASP/SC-1/BEN. *Differ. Res. Biol. Divers.* 56, 21–29.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294, 853–858.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2002). Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr. Biol. CB* 12, 735–739.
- Lai, E.C. (2002). Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat. Genet.* 30, 363–364.
- Lal, A., Kim, H.H., Abdelmohsen, K., Kuwano, Y., Pullmann, R., Jr, Srikantan, S., Subrahmanyam, R., Martindale, J.L., Yang, X., Ahmed, F., et al. (2008). p16(INK4a) translation suppressed by miR-24. *PloS One* 3, e1864.
- Landgraf, P., Rusu, M., Sheridan, R., Sewer, A., Iovino, N., Aravin, A., Pfeffer, S., Rice, A., Kamphorst, A.O., Landthaler, M., et al. (2007). A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* 129, 1401–1414.
- Lang, R.A., and Bishop, J.M. (1993). Macrophages are required for cell death and tissue remodeling in the developing mouse eye. *Cell* 74, 453–462.
- Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G., and Bartel, D.P. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 858–862.
- Laudanna, C., and Bolomini-Vittori, M. (2009). Integrin activation in the immune system. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 1, 116–127.
- Lawrie, C.H., Gal, S., Dunlop, H.M., Pushkaran, B., Liggins, A.P., Pulford, K., Banham, A.H., Pezzella, F., Boulwood, J., Wainscoat, J.S., et al. (2008). Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* 141, 672–675.
- Lechman, E.R., Gentner, B., van Galen, P., Giustacchini, A., Saini, M., Boccalatte, F.E., Hiramatsu, H., Restuccia, U., Bachi, A., Voisin, V., et al. (2012). Attenuation of miR-126 activity expands HSC in vivo without exhaustion. *Cell Stem Cell* 11, 799–811.

- Lee, H.Y., and Doudna, J.A. (2012). TRBP alters human precursor microRNA processing in vitro. *RNA N. Y. N* 18, 2012–2019.
- Lee, R.C., and Ambros, V. (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 862–864.
- Lee, Y.S., and Dutta, A. (2009). MicroRNAs in cancer. *Annu. Rev. Pathol.* 4, 199–227.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843–854.
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.-T., Kim, S., and Kim, V.N. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* 21, 4663–4670.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S., et al. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415–419.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S.H., and Kim, V.N. (2004a). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 23, 4051–4060.
- Lee, Y., Hur, I., Park, S.-Y., Kim, Y.-K., Suh, M.R., and Kim, V.N. (2006). The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J.* 25, 522–532.
- Lee, Y.S., Nakahara, K., Pham, J.W., Kim, K., He, Z., Sontheimer, E.J., and Carthew, R.W. (2004b). Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell* 117, 69–81.
- Levéen, P., Pekny, M., Gebre-Medhin, S., Swolin, B., Larsson, E., and Betsholtz, C. (1994). Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. *Genes Dev.* 8, 1875–1887.
- Lewis, B.P., Shih, I., Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., and Burge, C.B. (2003). Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 115, 787–798.
- Lewis, B.P., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120, 15–20.
- Ley, K. (1996). Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process. *Cardiovasc. Res.* 32, 733–742.
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., and Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 678–689.
- Li, D., and Mehta, J.L. (2000). Antisense to LOX-1 inhibits oxidized LDL-mediated upregulation of monocyte chemoattractant protein-1 and monocyte adhesion to human coronary artery endothelial cells. *Circulation* 101, 2889–2895.
- Li, Z., and Chen, J. (2011). In vitro functional study of miR-126 in leukemia. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 676, 185–195.

- Li, D., Yang, P., Xiong, Q., Song, X., Yang, X., Liu, L., Yuan, W., and Rui, Y.-C. (2010). MicroRNA-125a/b-5p inhibits endothelin-1 expression in vascular endothelial cells. *J. Hypertens.* 28, 1646–1654.
- Li, N., Tang, A., Huang, S., Li, Z., Li, X., Shen, S., Ma, J., and Wang, X. (2013a). MiR-126 suppresses colon cancer cell proliferation and invasion via inhibiting RhoA/ROCK signaling pathway. *Mol. Cell. Biochem.* 380, 107–119.
- Li, T., Cao, H., Zhuang, J., Wan, J., Guan, M., Yu, B., Li, X., and Zhang, W. (2011a). Identification of miR-130a, miR-27b and miR-210 as serum biomarkers for atherosclerosis obliterans. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 412, 66–70.
- Li, X., Shen, Y., Ichikawa, H., Antes, T., and Goldberg, G.S. (2009). Regulation of miRNA expression by Src and contact normalization: effects on nonanchored cell growth and migration. *Oncogene* 28, 4272–4283.
- Li, X.-M., Wang, A.-M., Zhang, J., and Yi, H. (2011b). Down-regulation of miR-126 expression in colorectal cancer and its clinical significance. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* 28, 1054–1057.
- Li, Z., Lu, J., Sun, M., Mi, S., Zhang, H., Luo, R.T., Chen, P., Wang, Y., Yan, M., Qian, Z., et al. (2008). Distinct microRNA expression profiles in acute myeloid leukemia with common translocations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 15535–15540.
- Li, Z., Li, N., Wu, M., Li, X., Luo, Z., and Wang, X. (2013b). Expression of miR-126 suppresses migration and invasion of colon cancer cells by targeting CXCR4. *Mol. Cell. Biochem.*
- Libby, P., Ridker, P.M., and Hansson, G.K. (2011). Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 473, 317–325.
- Lim, L.P., Lau, N.C., Weinstein, E.G., Abdelhakim, A., Yekta, S., Rhoades, M.W., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2003). The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev.* 17, 991–1008.
- Lim, L.P., Lau, N.C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J.M., Castle, J., Bartel, D.P., Linsley, P.S., and Johnson, J.M. (2005). Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433, 769–773.
- Liu, B., Peng, X.-C., Zheng, X.-L., Wang, J., and Qin, Y.-W. (2009). MiR-126 restoration down-regulate VEGF and inhibit the growth of lung cancer cell lines in vitro and in vivo. *Lung Cancer Amst. Neth.* 66, 169–175.
- Liu, Y., Wada, R., Yamashita, T., Mi, Y., Deng, C.X., Hobson, J.P., Rosenfeldt, H.M., Nava, V.E., Chae, S.S., Lee, M.J., et al. (2000). Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J. Clin. Invest.* 106, 951–961.
- Lobov, I.B., Rao, S., Carroll, T.J., Vallance, J.E., Ito, M., Ondr, J.K., Kurup, S., Glass, D.A., Patel, M.S., Shu, W., et al. (2005). WNT7b mediates macrophage-induced programmed cell death in patterning of the vasculature. *Nature* 437, 417–421.

- Lu, Y.Y., Sweredoski, M.J., Huss, D., Lansford, R., Hess, S., and Tirrell, D.A. (2013). Prometastatic GPCR CD97 Is a Direct Target of Tumor Suppressor microRNA-126. *ACS Chem. Biol.*
- Luhmann, U.F.O., Lin, J., Acar, N., Lammel, S., Feil, S., Grimm, C., Seeliger, M.W., Hammes, H.-P., and Berger, W. (2005). Role of the Norrie disease pseudoglioma gene in sprouting angiogenesis during development of the retinal vasculature. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *46*, 3372–3382.
- Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E., and Kutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science* *303*, 95–98.
- Luster, A.D., Alon, R., and von Andrian, U.H. (2005). Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat. Immunol.* *6*, 1182–1190.
- Lytle, J.R., Yario, T.A., and 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*, 9667–9672.
- Magenta, A., Cencioni, C., Fasanaro, P., Zaccagnini, G., Greco, S., Sarra-Ferraris, G., Antonini, A., Martelli, F., and Capogrossi, M.C. (2011). miR-200c is upregulated by oxidative stress and induces endothelial cell apoptosis and senescence via ZEB1 inhibition. *Cell Death Differ.* *18*, 1628–1639.
- Maisonpierre, P.C., Suri, C., Jones, P.F., Bartunkova, S., Wiegand, S.J., Radziejewski, C., Compton, D., McClain, J., Aldrich, T.H., Papadopoulos, N., et al. (1997). Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* *277*, 55–60.
- Mamdouh, Z., Chen, X., Pierini, L.M., Maxfield, F.R., and Muller, W.A. (2003). Targeted recycling of PECAM from endothelial surface-connected compartments during diapedesis. *Nature* *421*, 748–753.
- Mamdouh, Z., Mikhailov, A., and Muller, W.A. (2009). Transcellular migration of leukocytes is mediated by the endothelial lateral border recycling compartment. *J. Exp. Med.* *206*, 2795–2808.
- Maniataki, E., and Mourelatos, Z. (2005). A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes Dev.* *19*, 2979–2990.
- Maroney, P.A., Yu, Y., Fisher, J., and Nilsen, T.W. (2006). Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *13*, 1102–1107.
- Masedunskas, A., King, J.A., Tan, F., Cochran, R., Stevens, T., Sviridov, D., and Ofori-Acquah, S.F. (2006). Activated leukocyte cell adhesion molecule is a component of the endothelial junction involved in transendothelial monocyte migration. *FEBS Lett.* *580*, 2637–2645.
- Matera, A.G., Terns, R.M., and Terns, M.P. (2007). Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 209–220.

- Mathonnet, G., Fabian, M.R., Svitkin, Y.V., Parsyan, A., Huck, L., Murata, T., Biffo, S., Merrick, W.C., Darzynkiewicz, E., Pillai, R.S., et al. (2007). MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science* *317*, 1764–1767.
- Matsuda, T., and Cepko, C.L. (2004). Electroporation and RNA interference in the rodent retina in vivo and in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 16–22.
- Mattes, J., Collison, A., Plank, M., Phipps, S., and Foster, P.S. (2009). Antagonism of microRNA-126 suppresses the effector function of TH2 cells and the development of allergic airways disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 18704–18709.
- McEver, R.P. (2002). Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow. *Curr. Opin. Cell Biol.* *14*, 581–586.
- McEver, R.P., and Cummings, R.D. (1997). Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J. Clin. Invest.* *100*, S97–103.
- McEver, R.P., Beckstead, J.H., Moore, K.L., Marshall-Carlson, L., and Bainton, D.F. (1989). GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J. Clin. Invest.* *84*, 92–99.
- Meng, S., Cao, J.-T., Zhang, B., Zhou, Q., Shen, C.-X., and Wang, C.-Q. (2012). Downregulation of microRNA-126 in endothelial progenitor cells from diabetes patients, impairs their functional properties, via target gene Spred-1. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *53*, 64–72.
- Menghini, R., Casagrande, V., Cardellini, M., Martelli, E., Terrinoni, A., Amati, F., Vasa-Nicotera, M., Ippoliti, A., Novelli, G., Melino, G., et al. (2009). MicroRNA 217 modulates endothelial cell senescence via silent information regulator 1. *Circulation* *120*, 1524–1532.
- Mi, H., and Barres, B.A. (1999). Purification and characterization of astrocyte precursor cells in the developing rat optic nerve. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *19*, 1049–1061.
- Middleton, J., Neil, S., Wintle, J., Clark-Lewis, I., Moore, H., Lam, C., Auer, M., Hub, E., and Rot, A. (1997). Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells. *Cell* *91*, 385–395.
- Miko, E., Margitai, Z., Czimmerer, Z., Várkonyi, I., Dezso, B., Lányi, A., Bacsó, Z., and Scholtz, B. (2011). miR-126 inhibits proliferation of small cell lung cancer cells by targeting SLC7A5. *FEBS Lett.* *585*, 1191–1196.
- Mirea, O., Donoiu, I., and Pleșea, I.E. (2012). Arterial aging: a brief review. *Romanian J. Morphol. Embryol. Rev. Roum. Morphol. Embryol.* *53*, 473–477.
- Mitchell, P.S., Parkin, R.K., Kroh, E.M., Fritz, B.R., Wyman, S.K., Pogosova-Agadjanyan, E.L., Peterson, A., Noteboom, J., O’Briant, K.C., Allen, A., et al. (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 10513–10518.
- Miyamoto, S., Yagi, H., Yotsumoto, F., Kawarabayashi, T., and Mekada, E. (2006). Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor as a novel targeting molecule for cancer therapy. *Cancer Sci.* *97*, 341–347.

- Miyoshi, K., Miyoshi, T., Hartig, J.V., Siomi, H., and Siomi, M.C. (2010). Molecular mechanisms that funnel RNA precursors into endogenous small-interfering RNA and microRNA biogenesis pathways in *Drosophila*. *RNA N. Y. N* *16*, 506–515.
- Montecalvo, A., Larregina, A.T., Shufesky, W.J., Stolz, D.B., Sullivan, M.L.G., Karlsson, J.M., Baty, C.J., Gibson, G.A., Erdos, G., Wang, Z., et al. (2012). Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood* *119*, 756–766.
- Monteys, A.M., Spengler, R.M., Wan, J., Tecedor, L., Lennox, K.A., Xing, Y., and Davidson, B.L. (2010). Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. *RNA N. Y. N* *16*, 495–505.
- Moore, K.J., and Tabas, I. (2011). Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell* *145*, 341–355.
- Moretti, F., Thermann, R., and Hentze, M.W. (2010). Mechanism of translational regulation by miR-2 from sites in the 5' untranslated region or the open reading frame. *RNA N. Y. N* *16*, 2493–2502.
- Mudhar, H.S., Pollock, R.A., Wang, C., Stiles, C.D., and Richardson, W.D. (1993). PDGF and its receptors in the developing rodent retina and optic nerve. *Dev. Camb. Engl.* *118*, 539–552.
- Muller, W.A. (2011). Mechanisms of leukocyte transendothelial migration. *Annu. Rev. Pathol.* *6*, 323–344.
- Muller, W.A., Weigl, S.A., Deng, X., and Phillips, D.M. (1993). PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J. Exp. Med.* *178*, 449–460.
- Murohara, T., Asahara, T., Silver, M., Bauters, C., Masuda, H., Kalka, C., Kearney, M., Chen, D., Symes, J.F., Fishman, M.C., et al. (1998). Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J. Clin. Invest.* *101*, 2567–2578.
- Musiyenko, A., Bitko, V., and Barik, S. (2008). Ectopic expression of miR-126*, an intronic product of the vascular endothelial EGF-like 7 gene, regulates prostein translation and invasiveness of prostate cancer LNCaP cells. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* *86*, 313–322.
- Nakielny, S., and Dreyfuss, G. (1999). Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus. *Cell* *99*, 677–690.
- Namløs, H.M., Meza-Zepeda, L.A., Barøy, T., Østensen, I.H.G., Kresse, S.H., Kuijjer, M.L., Serra, M., Bürger, H., Cleton-Jansen, A.-M., and Myklebost, O. (2012). Modulation of the osteosarcoma expression phenotype by microRNAs. *PloS One* *7*, e48086.
- Napoli, C., Lemieux, C., and Jorgensen, R. (1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* *2*, 279–289.
- Nelissen, J.M., Peters, I.M., de Grooth, B.G., van Kooyk, Y., and Figdor, C.G. (2000). Dynamic regulation of activated leukocyte cell adhesion molecule-mediated homotypic cell adhesion through the actin cytoskeleton. *Mol. Biol. Cell* *11*, 2057–2068.

- Ni, C.-W., Qiu, H., and Jo, H. (2011). MicroRNA-663 upregulated by oscillatory shear stress plays a role in inflammatory response of endothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *300*, H1762–1769.
- Nicoli, S., Standley, C., Walker, P., Hurlstone, A., Fogarty, K.E., and Lawson, N.D. (2010). MicroRNA-mediated integration of haemodynamics and Vegf signalling during angiogenesis. *Nature* *464*, 1196–1200.
- Nottrott, S., Simard, M.J., and Richter, J.D. (2006). Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *13*, 1108–1114.
- Nourshargh, S., and Marelli-Berg, F.M. (2005). Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function. *Trends Immunol.* *26*, 157–165.
- Ofori-Acquah, S.F., and King, J.A. (2008). Activated leukocyte cell adhesion molecule: a new paradox in cancer. *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.* *151*, 122–128.
- Ofori-Acquah, S.F., King, J., Voelkel, N., Schaphorst, K.L., and Stevens, T. (2008). Heterogeneity of barrier function in the lung reflects diversity in endothelial cell junctions. *Microvasc. Res.* *75*, 391–402.
- Oglesby, I.K., Bray, I.M., Chotirmall, S.H., Stallings, R.L., O’Neill, S.J., McElvaney, N.G., and Greene, C.M. (2010). miR-126 is downregulated in cystic fibrosis airway epithelial cells and regulates TOM1 expression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *184*, 1702–1709.
- Ohneda, O., Ohneda, K., Arai, F., Lee, J., Miyamoto, T., Fukushima, Y., Dowbenko, D., Lasky, L.A., and Suda, T. (2001). ALCAM (CD166): its role in hematopoietic and endothelial development. *Blood* *98*, 2134–2142.
- Okamura, K., Hagen, J.W., Duan, H., Tyler, D.M., and Lai, E.C. (2007). The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell* *130*, 89–100.
- Okamura, K., Phillips, M.D., Tyler, D.M., Duan, H., Chou, Y., and Lai, E.C. (2008). The regulatory activity of microRNA* species has substantial influence on microRNA and 3’ UTR evolution. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *15*, 354–363.
- Onat, D., Brillon, D., Colombo, P.C., and Schmidt, A.M. (2011). Human vascular endothelial cells: a model system for studying vascular inflammation in diabetes and atherosclerosis. *Curr. Diab. Rep.* *11*, 193–202.
- Orlidge, A., and D’Amore, P.A. (1987). Inhibition of capillary endothelial cell growth by pericytes and smooth muscle cells. *J. Cell Biol.* *105*, 1455–1462.
- Orlova, V.V., and Chavakis, T. (2007). Regulation of vascular endothelial permeability by junctional adhesion molecules (JAM). *Thromb. Haemost.* *98*, 327–332.
- Orlova, V.V., Economopoulou, M., Lupu, F., Santoso, S., and Chavakis, T. (2006). Junctional adhesion molecule-C regulates vascular endothelial permeability by modulating VE-cadherin-mediated cell-cell contacts. *J. Exp. Med.* *203*, 2703–2714.
- Ørom, U.A., Nielsen, F.C., and Lund, A.H. (2008). MicroRNA-10a binds the 5’UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol. Cell* *30*, 460–471.

- Ostermann, G., Weber, K.S.C., Zerneck, A., Schröder, A., and Weber, C. (2002). JAM-1 is a ligand of the beta(2) integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes. *Nat. Immunol.* *3*, 151–158.
- Ota, H., Akishita, M., Eto, M., Iijima, K., Kaneki, M., and Ouchi, Y. (2007). Sirt1 modulates premature senescence-like phenotype in human endothelial cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *43*, 571–579.
- Otsubo, T., Akiyama, Y., Hashimoto, Y., Shimada, S., Goto, K., and Yuasa, Y. (2011). MicroRNA-126 inhibits SOX2 expression and contributes to gastric carcinogenesis. *PloS One* *6*, e16617.
- Otsuka, M., Jing, Q., Georgel, P., New, L., Chen, J., Mols, J., Kang, Y.J., Jiang, Z., Du, X., Cook, R., et al. (2007). Hypersusceptibility to vesicular stomatitis virus infection in Dicer1-deficient mice is due to impaired miR24 and miR93 expression. *Immunity* *27*, 123–134.
- Otsuka, M., Zheng, M., Hayashi, M., Lee, J.-D., Yoshino, O., Lin, S., and Han, J. (2008). Impaired microRNA processing causes corpus luteum insufficiency and infertility in mice. *J. Clin. Invest.* *118*, 1944–1954.
- Ott, H., Diekmann, H., Stuermer, C.A., and Bastmeyer, M. (2001). Function of Neurolin (DM-GRASP/SC-1) in guidance of motor axons during zebrafish development. *Dev. Biol.* *235*, 86–97.
- Ait-Oufella, H., Taleb, S., Mallat, Z., and Tedgui, A. (2011). Recent advances on the role of cytokines in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *31*, 969–979.
- Ozsolak, F., Poling, L.L., Wang, Z., Liu, H., Liu, X.S., Roeder, R.G., Zhang, X., Song, J.S., and Fisher, D.E. (2008). Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes Dev.* *22*, 3172–3183.
- Pan, J., Hu, H., Zhou, Z., Sun, L., Peng, L., Yu, L., Sun, L., Liu, J., Yang, Z., and Ran, Y. (2010). Tumor-suppressive mir-663 gene induces mitotic catastrophe growth arrest in human gastric cancer cells. *Oncol. Rep.* *24*, 105–112.
- Park, N.J., Zhou, H., Elashoff, D., Henson, B.S., Kastratovic, D.A., Abemayor, E., and Wong, D.T. (2009). Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *15*, 5473–5477.
- Parker, L.H., Schmidt, M., Jin, S.-W., Gray, A.M., Beis, D., Pham, T., Frantz, G., Palmieri, S., Hillan, K., Stainier, D.Y.R., et al. (2004). The endothelial-cell-derived secreted factor Eglf7 regulates vascular tube formation. *Nature* *428*, 754–758.
- Paschke, K.A., Lottspeich, F., and Stuermer, C.A. (1992). Neurolin, a cell surface glycoprotein on growing retinal axons in the goldfish visual system, is reexpressed during retinal axonal regeneration. *J. Cell Biol.* *117*, 863–875.
- Pasquinelli, A.E., Reinhart, B.J., Slack, F., Martindale, M.Q., Kuroda, M.I., Maller, B., Hayward, D.C., Ball, E.E., Degnan, B., Müller, P., et al. (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* *408*, 86–89.

- Peduzzi, J.D., Irwin, M.H., and Geisert, E.E., Jr (1994). Distribution and characteristics of a 90 kDa protein, KG-CAM, in the rat CNS. *Brain Res.* *640*, 296–307.
- Petersen, C.P., Bordeleau, M.-E., Pelletier, J., and Sharp, P.A. (2006). Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol. Cell* *21*, 533–542.
- Pfeffer, S., Zavolan, M., Grässer, F.A., Chien, M., Russo, J.J., Ju, J., John, B., Enright, A.J., Marks, D., Sander, C., et al. (2004). Identification of virus-encoded microRNAs. *Science* *304*, 734–736.
- Pfeffer, S., Sewer, A., Lagos-Quintana, M., Sheridan, R., Sander, C., Grässer, F.A., van Dyk, L.F., Ho, C.K., Shuman, S., Chien, M., et al. (2005). Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat. Methods* *2*, 269–276.
- Phillipson, M., Heit, B., Colarusso, P., Liu, L., Ballantyne, C.M., and Kubes, P. (2006). Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J. Exp. Med.* *203*, 2569–2575.
- Pierce, E.A., Foley, E.D., and Smith, L.E. (1996). Regulation of vascular endothelial growth factor by oxygen in a model of retinopathy of prematurity. *Arch. Ophthalmol.* *114*, 1219–1228.
- Pillai, R.S., Bhattacharyya, S.N., Artus, C.G., Zoller, T., Cougot, N., Basyuk, E., Bertrand, E., and Filipowicz, W. (2005). Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science* *309*, 1573–1576.
- Plump, A.S., Smith, J.D., Hayek, T., Aalto-Setälä, K., Walsh, A., Verstuyft, J.G., Rubin, E.M., and Breslow, J.L. (1992). Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* *71*, 343–353.
- Png, K.J., Halberg, N., Yoshida, M., and Tavazoie, S.F. (2012). A microRNA regulon that mediates endothelial recruitment and metastasis by cancer cells. *Nature* *481*, 190–194.
- Pober, J.S. (2002). Endothelial activation: intracellular signaling pathways. *Arthritis Res.* *4 Suppl 3*, S109–116.
- Pober, J.S., and Cotran, R.S. (1990). The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation* *50*, 537–544.
- Pober, J.S., and Sessa, W.C. (2007). Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 803–815.
- Poliseno, L., Tuccoli, A., Mariani, L., Evangelista, M., Citti, L., Woods, K., Mercatanti, A., Hammond, S., and Rainaldi, G. (2006). MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. *Blood* *108*, 3068–3071.
- Pollerberg, G.E., and Mack, T.G. (1994). Cell adhesion molecule SC1/DMGRASP is expressed on growing axons of retina ganglion cells and is involved in mediating their extension on axons. *Dev. Biol.* *165*, 670–687.

- Pourquié, O., Coltey, M., Thomas, J.L., and Le Douarin, N.M. (1990). A widely distributed antigen developmentally regulated in the nervous system. *Dev. Camb. Engl.* *109*, 743–752.
- Pourquié, O., Corbel, C., Le Caer, J.P., Rossier, J., and Le Douarin, N.M. (1992). BEN, a surface glycoprotein of the immunoglobulin superfamily, is expressed in a variety of developing systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 5261–5265.
- Preall, J.B., and Sontheimer, E.J. (2005). RNAi: RISC gets loaded. *Cell* *123*, 543–545.
- Pulkkinen, K., Malm, T., Turunen, M., Koistinaho, J., and Ylä-Herttuala, S. (2008). Hypoxia induces microRNA miR-210 in vitro and in vivo ephrin-A3 and neuronal pentraxin 1 are potentially regulated by miR-210. *FEBS Lett.* *582*, 2397–2401.
- Qiang, L., Hong, L., Ningfu, W., Huaihong, C., and Jing, W. (2013). Expression of miR-126 and miR-508-5p in endothelial progenitor cells is associated with the prognosis of chronic heart failure patients. *Int. J. Cardiol.*
- Qin, A., Wen, Z., Zhou, Y., Li, Y., Li, Y., Luo, J., Ren, T., and Xu, L. (2013). MicroRNA-126 regulates the induction and function of CD4(+) Foxp3(+) regulatory T cells through PI3K/AKT pathway. *J. Cell. Mol. Med.* *17*, 252–264.
- Qin, X., Wang, X., Wang, Y., Tang, Z., Cui, Q., Xi, J., Li, Y.-S.J., Chien, S., and Wang, N. (2010). MicroRNA-19a mediates the suppressive effect of laminar flow on cyclin D1 expression in human umbilical vein endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 3240–3244.
- Qu, H., Xu, W., Huang, Y., and Yang, S. (2011). Circulating miRNAs: promising biomarkers of human cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* *12*, 1117–1125.
- Raitoharju, E., Lyytikäinen, L.-P., Levula, M., Oksala, N., Mennander, A., Tarkka, M., Klopp, N., Illig, T., Kähönen, M., Karhunen, P.J., et al. (2011). miR-21, miR-210, miR-34a, and miR-146a/b are up-regulated in human atherosclerotic plaques in the Tampere Vascular Study. *Atherosclerosis* *219*, 211–217.
- Ramsey, S.A., Gold, E.S., and Aderem, A. (2010). A systems biology approach to understanding atherosclerosis. *EMBO Mol. Med.* *2*, 79–89.
- Rayner, K.J., Sheedy, F.J., Esau, C.C., Hussain, F.N., Temel, R.E., Parathath, S., van Gils, J.M., Rayner, A.J., Chang, A.N., Suarez, Y., et al. (2011). Antagonism of miR-33 in mice promotes reverse cholesterol transport and regression of atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* *121*, 2921–2931.
- Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D., et al. (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* *406*, 593–599.
- Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R., and Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* *403*, 901–906.
- Rivera, J.C., Sitaras, N., Noueihed, B., Hamel, D., Madaan, A., Zhou, T., Honoré, J.-C., Quiniou, C., Joyal, J.-S., Hardy, P., et al. (2013). Microglia and interleukin-1 β in ischemic

retinopathy elicit microvascular degeneration through neuronal semaphorin-3A. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *33*, 1881–1891.

Ro, S., Park, C., Young, D., Sanders, K.M., and Yan, W. (2007). Tissue-dependent paired expression of miRNAs. *Nucleic Acids Res.* *35*, 5944–5953.

Rocha, S.F., and Adams, R.H. (2009). Molecular differentiation and specialization of vascular beds. *Angiogenesis* *12*, 139–147.

Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J.L., and Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.* *14*, 1902–1910.

Ruby, J.G., Jan, C.H., and Bartel, D.P. (2007). Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* *448*, 83–86.

Rudic, R.D., Shesely, E.G., Maeda, N., Smithies, O., Segal, S.S., and Sessa, W.C. (1998). Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *J. Clin. Invest.* *101*, 731–736.

Rymo, S.F., Gerhardt, H., Wolfhagen Sand, F., Lang, R., Uv, A., and Betsholtz, C. (2011). A two-way communication between microglial cells and angiogenic sprouts regulates angiogenesis in aortic ring cultures. *PloS One* *6*, e15846.

Sabatel, C., Malvaux, L., Bovy, N., Deroanne, C., Lambert, V., Gonzalez, M.-L.A., Colige, A., Rakic, J.-M., Noël, A., Martial, J.A., et al. (2011). MicroRNA-21 exhibits antiangiogenic function by targeting RhoB expression in endothelial cells. *PloS One* *6*, e16979.

Saito, Y., Friedman, J.M., Chihara, Y., Egger, G., Chuang, J.C., and Liang, G. (2009). Epigenetic therapy upregulates the tumor suppressor microRNA-126 and its host gene EGFL7 in human cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *379*, 726–731.

Salas, A., Shimaoka, M., Kogan, A.N., Harwood, C., von Andrian, U.H., and Springer, T.A. (2004). Rolling adhesion through an extended conformation of integrin alphaLbeta2 and relation to alpha I and beta I-like domain interaction. *Immunity* *20*, 393–406.

Salvucci, O., Maric, D., Economopoulou, M., Sakakibara, S., Merlin, S., Follenzi, A., and Tosato, G. (2009). EphrinB reverse signaling contributes to endothelial and mural cell assembly into vascular structures. *Blood* *114*, 1707–1716.

Santoso, S., Sachs, U.J.H., Kroll, H., Linder, M., Ruf, A., Preissner, K.T., and Chavakis, T. (2002). The junctional adhesion molecule 3 (JAM-3) on human platelets is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1. *J. Exp. Med.* *196*, 679–691.

Santoso, S., Orlova, V.V., Song, K., Sachs, U.J., Andrei-Selmer, C.L., and Chavakis, T. (2005). The homophilic binding of junctional adhesion molecule-C mediates tumor cell-endothelial cell interactions. *J. Biol. Chem.* *280*, 36326–36333.

Saraiya, A.A., and Wang, C.C. (2008). snoRNA, a novel precursor of microRNA in *Giardia lamblia*. *PLoS Pathog.* *4*, e1000224.

- Sasahira, T., Kurihara, M., Bhawal, U.K., Ueda, N., Shimomoto, T., Yamamoto, K., Kirita, T., and Kuniyasu, H. (2012). Downregulation of miR-126 induces angiogenesis and lymphangiogenesis by activation of VEGF-A in oral cancer. *Br. J. Cancer* *107*, 700–706.
- Sato, Y., and Rifkin, D.B. (1989). Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: activation of a latent transforming growth factor-beta 1-like molecule by plasmin during co-culture. *J. Cell Biol.* *109*, 309–315.
- Sato, T.N., Tozawa, Y., Deutsch, U., Wolburg-Buchholz, K., Fujiwara, Y., Gendron-Maguire, M., Gridley, T., Wolburg, H., Risau, W., and Qin, Y. (1995). Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* *376*, 70–74.
- Sato, Y., Tsuboi, R., Lyons, R., Moses, H., and Rifkin, D.B. (1990). Characterization of the activation of latent TGF-beta by co-cultures of endothelial cells and pericytes or smooth muscle cells: a self-regulating system. *J. Cell Biol.* *111*, 757–763.
- Sayner, S.L., Balczon, R., Frank, D.W., Cooper, D.M.F., and Stevens, T. (2011). Filamin A is a phosphorylation target of membrane but not cytosolic adenylyl cyclase activity. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* *301*, L117–124.
- Schenkel, A.R., Mamdouh, Z., and Muller, W.A. (2004). Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation. *Nat. Immunol.* *5*, 393–400.
- Schmidt, M., Paes, K., De Mazière, A., Smyczek, T., Yang, S., Gray, A., French, D., Kasman, I., Klumperman, J., Rice, D.S., et al. (2007). EGFL7 regulates the collective migration of endothelial cells by restricting their spatial distribution. *Dev. Camb. Engl.* *134*, 2913–2923.
- Schneider, R., Bannister, A.J., and Kouzarides, T. (2002). Unsafe SETs: histone lysine methyltransferases and cancer. *Trends Biochem. Sci.* *27*, 396–402.
- Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., and Zamore, P.D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* *115*, 199–208.
- Scott, A., Powner, M.B., Gandhi, P., Clarkin, C., Gutmann, D.H., Johnson, R.S., Ferrara, N., and Fruttiger, M. (2010). Astrocyte-Derived Vascular Endothelial Growth Factor Stabilizes Vessels in the Developing Retinal Vasculature. *PLoS ONE* *5*, e11863.
- Seggerson, K., Tang, L., and Moss, E.G. (2002). Two genetic circuits repress the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-28* after translation initiation. *Dev. Biol.* *243*, 215–225.
- Sekine-Aizawa, Y., Omori, A., and Fujita, S.C. (1998). MuSC, a novel member of the immunoglobulin superfamily, is expressed in neurons of a subset of cranial sensory ganglia in the mouse embryo. *Eur. J. Neurosci.* *10*, 2810–2824.
- Semenza, G.L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* *3*, 721–732.
- Shaw, S.K., Bamba, P.S., Perkins, B.N., and Luscinskas, F.W. (2001). Real-time imaging of vascular endothelial-cadherin during leukocyte transmigration across endothelium. *J. Immunol. Baltim. Md* *167*, 2323–2330.

Shaw, S.K., Ma, S., Kim, M.B., Rao, R.M., Hartman, C.U., Froio, R.M., Yang, L., Jones, T., Liu, Y., Nusrat, A., et al. (2004). Coordinated redistribution of leukocyte LFA-1 and endothelial cell ICAM-1 accompany neutrophil transmigration. *J. Exp. Med.* *200*, 1571–1580.

Shen, W.-F., Hu, Y.-L., Uttarwar, L., Passegue, E., and Largman, C. (2008). MicroRNA-126 regulates HOXA9 by binding to the homeobox. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 4609–4619.

Shilo, S., Roy, S., Khanna, S., and Sen, C.K. (2008). Evidence for the involvement of miRNA in redox regulated angiogenic response of human microvascular endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *28*, 471–477.

Siomi, H., and Siomi, M.C. (2009). On the road to reading the RNA-interference code. *Nature* *457*, 396–404.

Skonier, J.E., Bodian, D.L., Emswiler, J., Bowen, M.A., Aruffo, A., and Bajorath, J. (1997). Mutational analysis of the CD6 ligand binding domain. *Protein Eng.* *10*, 943–947.

Slack, F.J., Basson, M., Liu, Z., Ambros, V., Horvitz, H.R., and Ruvkun, G. (2000). The lin-41 RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the let-7 regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. *Mol. Cell* *5*, 659–669.

Small, E.M., Sutherland, L.B., Rajagopalan, K.N., Wang, S., and Olson, E.N. (2010). MicroRNA-218 regulates vascular patterning by modulation of Slit-Robo signaling. *Circ. Res.* *107*, 1336–1344.

Smith, M.L., Olson, T.S., and Ley, K. (2004). CXCR2- and E-selectin-induced neutrophil arrest during inflammation in vivo. *J. Exp. Med.* *200*, 935–939.

Van Solingen, C., de Boer, H.C., Bijkerk, R., Monge, M., van Oeveren-Rietdijk, A.M., Seghers, L., de Vries, M.R., van der Veer, E.P., Quax, P.H.A., Rabelink, T.J., et al. (2011). MicroRNA-126 modulates endothelial SDF-1 expression and mobilization of Sca-1(+)/Lin(-) progenitor cells in ischaemia. *Cardiovasc. Res.* *92*, 449–455.

Soncin, F., Mattot, V., Lionneton, F., Spruyt, N., Lepretre, F., Begue, A., and Stehelin, D. (2003). VE-statin, an endothelial repressor of smooth muscle cell migration. *EMBO J.* *22*, 5700–5711.

Springer, T.A. (1995). Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu. Rev. Physiol.* *57*, 827–872.

Stalmans, I., Ng, Y.-S., Rohan, R., Fruttiger, M., Bouché, A., Yuce, A., Fujisawa, H., Hermans, B., Shani, M., Jansen, S., et al. (2002). Arteriolar and venular patterning in retinas of mice selectively expressing VEGF isoforms. *J. Clin. Invest.* *109*, 327–336.

Stassen, M.J., Bailey, D., Nelson, S., Chinwalla, V., and Harte, P.J. (1995). The *Drosophila* trithorax proteins contain a novel variant of the nuclear receptor type DNA binding domain and an ancient conserved motif found in other chromosomal proteins. *Mech. Dev.* *52*, 209–223.

Steinle, J.J., Meininger, C.J., Forough, R., Wu, G., Wu, M.H., and Granger, H.J. (2002). Eph B4 receptor signaling mediates endothelial cell migration and proliferation via the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J. Biol. Chem.* *277*, 43830–43835.

Steinle, J.J., Meininger, C.J., Chowdhury, U., Wu, G., and Granger, H.J. (2003). Role of ephrin B2 in human retinal endothelial cell proliferation and migration. *Cell. Signal.* *15*, 1011–1017.

Stockton, R.A., Schaefer, E., and Schwartz, M.A. (2004). p21-activated kinase regulates endothelial permeability through modulation of contractility. *J. Biol. Chem.* *279*, 46621–46630.

Stone, J., and Dreher, Z. (1987). Relationship between astrocytes, ganglion cells and vasculature of the retina. *J. Comp. Neurol.* *255*, 35–49.

Stone, J., Itin, A., Alon, T., Pe'er, J., Gnessin, H., Chan-Ling, T., and Keshet, E. (1995). Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *15*, 4738–4747.

Sturgeon, C.M., Chicha, L., Ditadi, A., Zhou, Q., McGrath, K.E., Palis, J., Hammond, S.M., Wang, S., Olson, E.N., and Keller, G. (2012). Primitive erythropoiesis is regulated by miR-126 via nonhematopoietic Vcam-1+ cells. *Dev. Cell* *23*, 45–57.

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

Suárez, Y., Fernández-Hernando, C., Yu, J., Gerber, S.A., Harrison, K.D., Pober, J.S., Iruela-Arispe, M.L., Merkenschlager, M., and Sessa, W.C. (2008). Dicer-dependent endothelial microRNAs are necessary for postnatal angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 14082–14087.

Suárez, Y., Wang, C., Manes, T.D., and Pober, J.S. (2010). Cutting edge: TNF-induced microRNAs regulate TNF-induced expression of E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 on human endothelial cells: feedback control of inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *184*, 21–25.

Sun, X., Icli, B., Wara, A.K., Belkin, N., He, S., Kobzik, L., Hunninghake, G.M., Vera, M.P., MICU Registry, Blackwell, T.S., et al. (2012). MicroRNA-181b regulates NF- κ B-mediated vascular inflammation. *J. Clin. Invest.* *122*, 1973–1990.

Sun, Y., Bai, Y., Zhang, F., Wang, Y., Guo, Y., and Guo, L. (2010). miR-126 inhibits non-small cell lung cancer cells proliferation by targeting EGFL7. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *391*, 1483–1489.

Suri, C., Jones, P.F., Patan, S., Bartunkova, S., Maisonpierre, P.C., Davis, S., Sato, T.N., and Yancopoulos, G.D. (1996). Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* *87*, 1171–1180.

Tavazoie, S.F., Alarcón, C., Oskarsson, T., Padua, D., Wang, Q., Bos, P.D., Gerald, W.L., and Massagué, J. (2008). Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature* *451*, 147–152.

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

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

Tili, E., Michaille, J.-J., Adair, B., Alder, H., Limagne, E., Taccioli, C., Ferracin, M., Delmas, D., Latruffe, N., and Croce, C.M. (2010). Resveratrol decreases the levels of miR-155 by upregulating miR-663, a microRNA targeting JunB and JunD. *Carcinogenesis* *31*, 1561–1566.

Tomita, K., van Bokhoven, A., Jansen, C.F., Bussemakers, M.J., and Schalken, J.A. (2000). Coordinate recruitment of E-cadherin and ALCAM to cell-cell contacts by alpha-catenin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *267*, 870–874.

Tschiersch, B., Hofmann, A., Krauss, V., Dorn, R., Korge, G., and Reuter, G. (1994). The protein encoded by the *Drosophila* position-effect variegation suppressor gene *Su(var)3-9* combines domains of antagonistic regulators of homeotic gene complexes. *EMBO J.* *13*, 3822.

Turchinovich, A., and Burwinkel, B. (2012). Distinct AGO1 and AGO2 associated miRNA profiles in human cells and blood plasma. *RNA Biol.* *9*, 1066–1075.

Uemura, A., Ogawa, M., Hirashima, M., Fujiwara, T., Koyama, S., Takagi, H., Honda, Y., Wiegand, S.J., Yancopoulos, G.D., and Nishikawa, S.-I. (2002). Recombinant angiopoietin-1 restores higher-order architecture of growing blood vessels in mice in the absence of mural cells. *J. Clin. Invest.* *110*, 1619–1628.

Urbich, C., Kuehbacher, A., and Dimmeler, S. (2008). Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovasc. Res.* *79*, 581–588.

Urbich, C., Kaluza, D., Frömel, T., Knau, A., Bennewitz, K., Boon, R.A., Bonauer, A., Doebele, C., Boeckel, J.-N., Hergenreider, E., et al. (2012). MicroRNA-27a/b controls endothelial cell repulsion and angiogenesis by targeting semaphorin 6A. *Blood* *119*, 1607–1616.

Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J.J., and Lötvall, J.O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* *9*, 654–659.

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

Verma, A., Shukla, N.K., Deo, S.V.S., Gupta, S.D., and Ralhan, R. (2005). MEMD/ALCAM: a potential marker for tumor invasion and nodal metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology* *68*, 462–470.

- Vickers, K.C., Palmisano, B.T., Shoucri, B.M., Shamburek, R.D., and Remaley, A.T. (2011). MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat. Cell Biol.* *13*, 423–433.
- Visser, H.P., Gunster, M.J., Kluin-Nelemans, H.C., Manders, E.M., Raaphorst, F.M., Meijer, C.J., Willemze, R., and Otte, A.P. (2001). The Polycomb group protein EZH2 is upregulated in proliferating, cultured human mantle cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* *112*, 950–958.
- Voellenkle, C., Rooij, J. van, Guffanti, A., Brini, E., Fasanaro, P., Isaia, E., Croft, L., David, M., Capogrossi, M.C., Moles, A., et al. (2012). Deep-sequencing of endothelial cells exposed to hypoxia reveals the complexity of known and novel microRNAs. *RNA N. Y. N* *18*, 472–484.
- Wagner, J., Riwanto, M., Besler, C., Knau, A., Fichtlscherer, S., Röxe, T., Zeiher, A.M., Landmesser, U., and Dimmeler, S. (2013). Characterization of levels and cellular transfer of circulating lipoprotein-bound microRNAs. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *33*, 1392–1400.
- Wakiyama, M., Takimoto, K., Ohara, O., and Yokoyama, S. (2007). Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system. *Genes Dev.* *21*, 1857–1862.
- Wang, C.-H., Lee, D.Y., Deng, Z., Jeyapalan, Z., Lee, S.-C., Kahai, S., Lu, W.-Y., Zhang, Y., and Yang, B.B. (2008a). MicroRNA miR-328 regulates zonation morphogenesis by targeting CD44 expression. *PLoS One* *3*, e2420.
- Wang, H.U., Chen, Z.F., and Anderson, D.J. (1998). Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell* *93*, 741–753.
- Wang, K., Zhang, S., Weber, J., Baxter, D., and Galas, D.J. (2010a). Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* *38*, 7248–7259.
- Wang, K.-C., Garmire, L.X., Young, A., Nguyen, P., Trinh, A., Subramaniam, S., Wang, N., Shyy, J.Y.J., Li, Y.-S., and Chien, S. (2010b). Role of microRNA-23b in flow-regulation of Rb phosphorylation and endothelial cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 3234–3239.
- Wang, S., Aurora, A.B., Johnson, B.A., Qi, X., McAnally, J., Hill, J.A., Richardson, J.A., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2008b). The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Dev. Cell* *15*, 261–271.
- Wang, S., Aurora, A.B., Johnson, B.A., Qi, X., McAnally, J., Hill, J.A., Richardson, J.A., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2008c). The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Dev. Cell* *15*, 261–271.
- Wang, X.-C., Tian, L.-L., Wu, H.-L., Jiang, X.-Y., Du, L.-Q., Zhang, H., Wang, Y.-Y., Wu, H.-Y., Li, D.-G., She, Y., et al. (2010c). Expression of miRNA-130a in nonsmall cell lung cancer. *Am. J. Med. Sci.* *340*, 385–388.
- Wang, X.H., Qian, R.Z., Zhang, W., Chen, S.F., Jin, H.M., and Hu, R.M. (2009). MicroRNA-320 expression in myocardial microvascular endothelial cells and its relationship with

insulin-like growth factor-1 in type 2 diabetic rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 36, 181–188.

Wang, Y., Medvid, R., Melton, C., Jaenisch, R., and Belloch, R. (2007). DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nat. Genet.* 39, 380–385.

Watahiki, A., Wang, Y., Morris, J., Dennis, K., O'Dwyer, H.M., Gleave, M., Gout, P.W., and Wang, Y. (2011). MicroRNAs associated with metastatic prostate cancer. *PloS One* 6, e24950.

Watanabe, T., and Raff, M.C. (1988). Retinal astrocytes are immigrants from the optic nerve. *Nature* 332, 834–837.

Weber, C., Fraemohs, L., and Dejana, E. (2007). The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 467–477.

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

Wegmann, F., Petri, B., Khandoga, A.G., Moser, C., Khandoga, A., Volkery, S., Li, H., Nasdala, I., Brandau, O., Fässler, R., et al. (2006). ESAM supports neutrophil extravasation, activation of Rho, and VEGF-induced vascular permeability. *J. Exp. Med.* 203, 1671–1677.

Weichert, W., Knösel, T., Bellach, J., Dietel, M., and Kristiansen, G. (2004). ALCAM/CD166 is overexpressed in colorectal carcinoma and correlates with shortened patient survival. *J. Clin. Pathol.* 57, 1160–1164.

Weidemann, A., Krohne, T.U., Aguilar, E., Kurihara, T., Takeda, N., Dorrell, M.I., Simon, M.C., Haase, V.H., Friedlander, M., and Johnson, R.S. (2010). Astrocyte hypoxic response is essential for pathological but not developmental angiogenesis of the retina. *Glia* 58, 1177–1185.

Weiner, J.A., Koo, S.J., Nicolas, S., Fraboulet, S., Pfaff, S.L., Pourquié, O., and Sanes, J.R. (2004). Axon fasciculation defects and retinal dysplasias in mice lacking the immunoglobulin superfamily adhesion molecule BEN/ALCAM/SC1. *Mol. Cell. Neurosci.* 27, 59–69.

West, H., Richardson, W.D., and Fruttiger, M. (2005). Stabilization of the retinal vascular network by reciprocal feedback between blood vessels and astrocytes. *Dev. Camb. Engl.* 132, 1855–1862.

Whitney, G.S., Starling, G.C., Bowen, M.A., Modrell, B., Siadak, A.W., and Aruffo, A. (1995). The membrane-proximal scavenger receptor cysteine-rich domain of CD6 contains the activated leukocyte cell adhesion molecule binding site. *J. Biol. Chem.* 270, 18187–18190.

Wightman, B., Ha, I., and Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75, 855–862.

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

- Wu, L., Fan, J., and Belasco, J.G. (2006). MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 4034–4039.
- Würdinger, T., Tannous, B.A., Saydam, O., Skog, J., Grau, S., Soutschek, J., Weissleder, R., Breakefield, X.O., and Krichevsky, A.M. (2008). miR-296 regulates growth factor receptor overexpression in angiogenic endothelial cells. *Cancer Cell* *14*, 382–393.
- Xu, J.-Q., Liu, P., Si, M.-J., and Ding, X.-Y. (2013). MicroRNA-126 inhibits osteosarcoma cells proliferation by targeting Sirt1. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.*
- Yamakami, M., and Yokosawa, H. (2004). Tom1 (target of Myb 1) is a novel negative regulator of interleukin-1- and tumor necrosis factor-induced signaling pathways. *Biol. Pharm. Bull.* *27*, 564–566.
- Yan, T., Liu, Y., Cui, K., Hu, B., Wang, F., and Zou, L. (2013). MicroRNA-126 regulates EPCs function: Implications for a role of miR-126 in preeclampsia. *J. Cell. Biochem.* *114*, 2148–2159.
- Yanaihara, N., Caplen, N., Bowman, E., Seike, M., Kumamoto, K., Yi, M., Stephens, R.M., Okamoto, A., Yokota, J., Tanaka, T., et al. (2006). Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* *9*, 189–198.
- Yang, G.-H., Wang, F., Yu, J., Wang, X.-S., Yuan, J.-Y., and Zhang, J.-W. (2009). MicroRNAs are involved in erythroid differentiation control. *J. Cell. Biochem.* *107*, 548–556.
- Yang, J.-S., Phillips, M.D., Betel, D., Mu, P., Ventura, A., Siepel, A.C., Chen, K.C., and Lai, E.C. (2011). Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA* species. *RNA N. Y. N* *17*, 312–326.
- Yang, L., Froio, R.M., Sciuto, T.E., Dvorak, A.M., Alon, R., and Luscinskas, F.W. (2005a). ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow. *Blood* *106*, 584–592.
- Yang, W.J., Yang, D.D., Na, S., Sandusky, G.E., Zhang, Q., and Zhao, G. (2005b). Dicer is required for embryonic angiogenesis during mouse development. *J. Biol. Chem.* *280*, 9330–9335.
- Yao, R., Ma, Y., Du, Y., Liao, M., Li, H., Liang, W., Yuan, J., Ma, Z., Yu, X., Xiao, H., et al. (2011). The altered expression of inflammation-related microRNAs with microRNA-155 expression correlates with Th17 differentiation in patients with acute coronary syndrome. *Cell. Mol. Immunol.* *8*, 486–495.
- Ye, X., Hemida, M.G., Qiu, Y., Hanson, P.J., Zhang, H.M., and Yang, D. (2013). MiR-126 promotes coxsackievirus replication by mediating cross-talk of ERK1/2 and Wnt/ β -catenin signal pathways. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS.*
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., and Cullen, B.R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* *17*, 3011–3016.
- Yin, K.-J., Deng, Z., Hamblin, M., Xiang, Y., Huang, H., Zhang, J., Jiang, X., Wang, Y., and Chen, Y.E. (2010). Peroxisome proliferator-activated receptor delta regulation of miR-15a in

ischemia-induced cerebral vascular endothelial injury. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *30*, 6398–6408.

Yin, K.-J., Olsen, K., Hamblin, M., Zhang, J., Schwendeman, S.P., and Chen, Y.E. (2012). Vascular endothelial cell-specific microRNA-15a inhibits angiogenesis in hindlimb ischemia. *J. Biol. Chem.* *287*, 27055–27064.

Yonekawa, K., and Harlan, J.M. (2005). Targeting leukocyte integrins in human diseases. *J. Leukoc. Biol.* *77*, 129–140.

Zarbock, A., Lowell, C.A., and Ley, K. (2007). Spleen tyrosine kinase Syk is necessary for E-selectin-induced alpha(L)beta(2) integrin-mediated rolling on intercellular adhesion molecule-1. *Immunity* *26*, 773–783.

Zeng, Y., and Cullen, B.R. (2004). Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Res.* *32*, 4776–4785.

Zeng, Y., and Cullen, B.R. (2005). Efficient processing of primary microRNA hairpins by Drosha requires flanking nonstructured RNA sequences. *J. Biol. Chem.* *280*, 27595–27603.

Zernecke, A., Bidzhekov, K., Noels, H., Shagdarsuren, E., Gan, L., Denecke, B., Hristov, M., Köppel, T., Jahantigh, M.N., Lutgens, E., et al. (2009). Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci. Signal.* *2*, ra81.

Zhang, C. (2008). MicroRNAs: role in cardiovascular biology and disease. *Clin. Sci. Lond. Engl.* *1979* *114*, 699–706.

Zhang, C. (2010). MicroRNAs in vascular biology and vascular disease. *J Cardiovasc. Transl. Res.* *3*, 235–240.

Zhang, J., Du, Y., Lin, Y., Chen, Y., Yang, L., Wang, H., and Ma, D. (2008). The cell growth suppressor, mir-126, targets IRS-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *377*, 136–140.

Zhang, Y., Yang, P., Sun, T., Li, D., Xu, X., Rui, Y., Li, C., Chong, M., Ibrahim, T., Mercatali, L., et al. (2013a). miR-126 and miR-126* repress recruitment of mesenchymal stem cells and inflammatory monocytes to inhibit breast cancer metastasis. *Nat. Cell Biol.* *15*, 284–294.

Zhang, Y., Wang, X., Xu, B., Wang, B., Wang, Z., Liang, Y., Zhou, J., Hu, J., and Jiang, B. (2013b). Epigenetic silencing of miR-126 contributes to tumor invasion and angiogenesis in colorectal cancer. *Oncol. Rep.* *30*, 1976–1984.

Zhao, S., Wang, Y., Liang, Y., Zhao, M., Long, H., Ding, S., Yin, H., and Lu, Q. (2011). MicroRNA-126 regulates DNA methylation in CD4+ T cells and contributes to systemic lupus erythematosus by targeting DNA methyltransferase 1. *Arthritis Rheum.* *63*, 1376–1386.

Zhao, T., Li, J., and Chen, A.F. (2010). MicroRNA-34a induces endothelial progenitor cell senescence and impedes its angiogenesis via suppressing silent information regulator 1. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *299*, E110–116.

Zhou, B., Ma, R., Si, W., Li, S., Xu, Y., Tu, X., and Wang, Q. (2013). MicroRNA-503 targets FGF2 and VEGFA and inhibits tumor angiogenesis and growth. *Cancer Lett.* *333*, 159–169.

Zhou, J., Wang, K.-C., Wu, W., Subramaniam, S., Shyy, J.Y.-J., Chiu, J.-J., Li, J.Y.-S., and Chien, S. (2011a). MicroRNA-21 targets peroxisome proliferators-activated receptor- α in an autoregulatory loop to modulate flow-induced endothelial inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 10355–10360.

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

Zhu, K., Pan, Q., Zhang, X., Kong, L.-Q., Fan, J., Dai, Z., Wang, L., Yang, X.-R., Hu, J., Wan, J.-L., et al. (2013a). MiR-146a enhances angiogenic activity of endothelial cells in hepatocellular carcinoma by promoting PDGFRA expression. *Carcinogenesis* *34*, 2071–2079.

Zhu, N., Zhang, D., Chen, S., Liu, X., Lin, L., Huang, X., Guo, Z., Liu, J., Wang, Y., Yuan, W., et al. (2011a). Endothelial enriched microRNAs regulate angiotensin II-induced endothelial inflammation and migration. *Atherosclerosis* *215*, 286–293.

Zhu, N., Zhang, D., Xie, H., Zhou, Z., Chen, H., Hu, T., Bai, Y., Shen, Y., Yuan, W., Jing, Q., et al. (2011b). Endothelial-specific intron-derived miR-126 is down-regulated in human breast cancer and targets both VEGFA and PIK3R2. *Mol. Cell. Biochem.* *351*, 157–164.

Zhu, S., Deng, S., Ma, Q., Zhang, T., Jia, C., Zhuo, D., Yang, F., Wei, J., Wang, L., Dykxhoorn, D.M., et al. (2013b). MicroRNA-10A* and MicroRNA-21 modulate endothelial progenitor cell senescence via suppressing high-mobility group A2. *Circ. Res.* *112*, 152–164.

Zimmerman, A.W., Nelissen, J.M.D.T., van Emst-de Vries, S.E., Willems, P.H.G.M., de Lange, F., Collard, J.G., van Leeuwen, F.N., and Figdor, C.G. (2004). Cytoskeletal restraints regulate homotypic ALCAM-mediated adhesion through PKC α independently of Rho-like GTPases. *J. Cell Sci.* *117*, 2841–2852.

Zimmerman, A.W., Joosten, B., Torensma, R., Parnes, J.R., van Leeuwen, F.N., and Figdor, C.G. (2006). Long-term engagement of CD6 and ALCAM is essential for T-cell proliferation induced by dendritic cells. *Blood* *107*, 3212–3220.

Zou, J., Li, W.-Q., Li, Q., Li, X.-Q., Zhang, J.-T., Liu, G.-Q., Chen, J., Qiu, X.-X., Tian, F.-J., Wang, Z.-Z., et al. (2011). Two functional microRNA-126s repress a novel target gene p21-activated kinase 1 to regulate vascular integrity in zebrafish. *Circ. Res.* *108*, 201–209.

Zuercher, J., Fritzsche, M., Feil, S., Mohn, L., and Berger, W. (2012). Norrin stimulates cell proliferation in the superficial retinal vascular plexus and is pivotal for the recruitment of mural cells. *Hum. Mol. Genet.* *21*, 2619–2630.

Résumé

Expression et fonctions du microARN miR-126-5p dans les cellules endothéliales.

Le gène *Egfl7* codant une protéine majoritairement sécrétée par les cellules endothéliales a été découvert au sein du laboratoire. Ce gène a la particularité d'héberger dans sa séquence intronique deux microARNs complémentaires nommés miR126-3p et miR-126-5p. Les microARNs sont de petites séquences de 20 à 25 nucléotides régulant l'expression de leurs cibles en se fixant sur leurs ARNm pour induire leur dégradation ou l'inhibition de leur traduction. L'expression endothéliale et les fonctions du microARN miR126-3p (microARN principal du duplex miR126-3p/126-5p) ont déjà été très largement abordées alors que celles de miR126-5p (microARN secondaire du duplex) restent inconnues. Les objectifs de notre étude ont donc été d'établir le patron d'expression de miR-126-5p lors du développement vasculaire et de caractériser ses fonctions dans les cellules endothéliales. Par hybridation *in situ*, miR-126-5p a été détecté dans les vaisseaux sanguins embryonnaires de souris principalement dans les cellules endothéliales. Cette spécificité endothéliale a été retrouvée dans différents organes tels que le cœur et les poumons et est maintenue *in vitro*. L'inhibition et la surexpression de miR-126-5p dans des cellules endothéliales veineuses (HUVEC) *in vitro* n'affectent pas les capacités de prolifération, de migration ou d'organisation en pseudocapillaires de ces cellules. En revanche, l'inhibition de miR-126-5p dans les HUVECs entraîne une répression de l'adhérence des leucocytes à la surface d'un tapis de cellules endothéliales ainsi qu'une augmentation de la transmigration de monocytes à travers une monocouche endothéliale. A l'inverse, sa surexpression génère des phénotypes opposés. Des analyses *in silico* de recherche de cibles pour miR-126-5p en lien avec le recrutement leucocytaire ont permis d'identifier une protéine participant à la transmigration des leucocytes *in vitro* et *in vivo* nommée ALCAM. A l'aide de test de transactivation, nous avons pu démontrer que miR-126-5p était capable de se fixer au 3'UTR de l'ARNm d'ALCAM afin de réprimer l'expression de la protéine. De plus, l'augmentation de la transmigration induite par la chute d'expression de miR-126-5p dans les cellules endothéliales est inhibée suite au blocage direct de la protéine ALCAM montrant ainsi que l'effet répresseur de miR-126-5p sur ce mécanisme est établi via ALCAM. Une étude par microarray, réalisée sur des HUVECs où miR-126-5p a été inhibé, a permis d'identifier une seconde cible pour miR-126-5p nommée SetD5 pour laquelle aucune fonction n'est connue à ce jour. Des tests de transactivation ont permis de confirmer que SetD5 était une cible de miR-126-5p. De plus, l'effet de miR-126-5p sur l'adhérence des leucocytes aux cellules endothéliales est directement lié à la modulation d'expression de ce gène. Enfin, l'analyse de l'inhibition de miR-126-5p *in vivo* a permis de montrer que notre microARN d'intérêt contrôle effectivement les expressions d'ALCAM et de SetD5. Cependant, alors que miR-126-5p régule uniquement l'expression d'ALCAM dans les poumons, celle de SetD5 est sous le contrôle de miR-126-5p dans la rétine.

Nos travaux ont donc permis de mettre en évidence l'expression endothéliale de miR-126-5p et d'identifier deux de ses cibles lui permettant de jouer un rôle dans le recrutement des leucocytes au niveau de l'endothélium.