



HAL
open science

VEGF : un biomarqueur potentiel dans la physiopathologie cardiovasculaire

Abdelsalam Saleh

► **To cite this version:**

Abdelsalam Saleh. VEGF : un biomarqueur potentiel dans la physiopathologie cardiovasculaire. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2015. Français. NNT : 2015LORR0017 . tel-01751394

HAL Id: tel-01751394

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01751394v1>

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Ecole Doctorale BioSE (Biologie- Santé- Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention: « Sciences de la Vie et de la Santé »

Par: **Abdelsalam SALEH**

**VEGF: Un biomarqueur potentiel dans la physiopathologie
cardiovasculaire**

Le 23 Mars 2015

Membres du jury:

Rapporteurs :	Mme. Janja MARC	Professeur, University of Ljubljana, Faculty of Pharmacy, Ljubljana, Slovenia
	M. Maurizio SIMMACO	Professeur, Department of Neurosciences, Mental Health and Sensory Organs, Faculty of Medicine and Psychology, Sapienza University of Rome
Examineurs :	M. Jean Louis MERLIN	PU-PH, Université de Lorraine, Faculté de Pharmacie, CRAN, Institut de Cancérologie de Lorraine, Vandoeuvre les Nancy, France
	M. Ingolf CASCORBI	Professeur, University Hospital Schleswig, Holstein Institute of Experimental and Clinical Pharmacology, Kiel, Germany
	Mme. Sophie VISVIKIS-SIEST	DR2 INSERM, UMR INSERM U1122 ; IGE-PCV, Université de Lorraine, France, Directeur de thèse
	Mme. Maria STATHOPOULOU	IR INSERM, UMR INSERM U1122 ; IGE-PCV, Université de Lorraine, France , Co-encadrant

A qui je dois tout le bien de ma vie...

À mes parents

À ma femme

À mes enfants

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de thèse, Madame le Docteur. Sophie Visvikis-Siest, Directeur de recherche de l'équipe UMR INSERM U1122; IGE-PCV, pour la confiance qu'elle m'a accordée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral, pour ses multiples conseils et pour toutes les heures qu'elle a consacré à diriger cette recherche. J'aimerais également lui dire à quel point j'ai apprécié sa grande disponibilité. Elle m'a toujours témoigné son soutien lors des moments difficiles.

Qu'elle trouve ici l'expression de ma reconnaissance!

J'adresse également mes remerciements à mon Co-encadrant académique, Mademoiselle le Dr Maria Stathopoulou pour m'avoir accompagné durant mes travaux de recherche et pour sa gentillesse, sa disponibilité et ses explications scientifiques.

Je remercie sincèrement Monsieur Pr. Gérard Siest pour l'intérêt qu'il a toujours porté à ce travail et pour ses précieux conseils.

Je tiens à remercier Mademoiselle Ndeye Coumba NDIAYE, maître de conférences à l'université de Lorraine pour son aide et ses conseils.

Je remercie Christine Masson qui a été toujours à mes côtés pour le travail technique et pour la correction du présent manuscrit.

Je tiens à remercier mon pays pour m'avoir alloué une bourse de thèse de 4 ans ; ce qui m'a permis de mener ce projet avec sérénité.

Je remercie tous les membres de l'équipe « IGE-PCV », présents et passés: Brigitte, Patricia, Laurence, Michèle, Mohsen, Said, Bernard, Daniel, Marc, Payman, Alex-Ander, Alexandros, Jerome, Ting.

Et à tous ceux que j'aurais oubliés, mille excuses et mille mercis.

Toute ma gratitude va également aux membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail.

Enfin, je remercie l'INSERM et la Région Lorraine, pour nous avoir alloué les moyens financiers; ce qui m'a permis de mener ce projet avec sérénité.

Résumé

Le VEGF-A est impliqué dans plusieurs pathologies, dont les maladies cardiovasculaires et plusieurs types de cancer. L'existence de voies de signalisation communes entre le VEGF-A, les molécules d'adhésion cellulaire et des molécules de l'inflammation pourrait permettre d'expliquer la large gamme de fonctions du VEGF-A dans les différentes situations pathologiques.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons développé une approche intégrative pour l'étude du VEGF-A et de son positionnement au sein de plusieurs voies métaboliques. Cette approche associe les études d'identification des variants génétiques associés au VEGF-A et leur fonctionnalité biologique par une approche transcriptomique.

Ainsi, le but général de cette thèse est d'investiguer les relations complexes des polymorphismes liés au VEGF-A, des taux plasmatiques et de l'expression du VEGF-A avec les molécules d'adhésion cellulaire et les molécules de l'inflammation, les lipides plasmatiques, les gènes candidats *NOS3*, *CD14*, *MMP3* et *IL4*, et avec les facteurs de risque cardiovasculaires (obésité, pression artérielle) chez des individus en bonne santé.

Pour la réalisation de ces études, nous avons utilisé des sous-groupes de populations de la cohorte STANISLAS et autres populations du Centre de Ressources Biologiques IGE-PCV. L'expérimentation transcriptomique est réalisée avec des cellules mononucléaires du sang périphérique.

Parmi les résultats obtenus nous avons montré :

- Une association entre l'isoforme *VEGF-A₁₄₅* et l'ARNm d'*ICAM-1*, de *sélectine L* et de *TNF- α* .
- Une association entre les taux du VEGF-A et les taux d'*ICAM-1* et de la sélectine E.
- Des interactions épistatiques entre les variants du VEGF-A pour les taux de la sélectine E, du *TNF- α* , de l'*ICAM-1* et de l'*IL-6*.
- Une association significative entre rs4416670 et les niveaux de l'ARNm de la sélectine-L
- Une association entre le variant rs6921438 et les niveaux de HDL-C et LDL-C.
- Une interaction entre rs4416670 et hypertension pour la variation interindividuelle de l'apolipoprotéine E.
- Des associations significatives entre l'expression de l'isoforme *VEGF-A₁₄₅* et les polymorphismes de *NOS3*, *CD14*, *MMP3*, *IL4R*, et *IL4*.

- Des interactions épistatiques significatives entre les variants génétiques de *NOS3*, *CD14*, *MMP3*, *IL4R*, et *IL4* et les quatre polymorphismes liés au VEGF-A sur les taux plasmatiques de VEGF-A.
- Des interactions significatives entre le rs1800779 de *NOS3* et HDL-C, les triglycérides et l'obésité ainsi que l'interaction de rs6921438 avec l'hypertension pour les niveaux plasmatique de VEGF-A
- Des associations significatives et interactions gène × lipides du sang entre tous les variants génétiques de *VEGF-A* et les phénotypes d'obésité.
- Une association significative entre le rs4416670 et la pression pulsée.
- Une interaction épistatique entre le rs6921438 et le rs10738760 pour la pression pulsée.
- Des associations significatives entre le variant rs10738760 de *VEGF-A* et le risque de syndrome métabolique.

Les résultats de cette thèse montrent le rôle central du VEGF-A dans la régulation des différents processus physiologiques et permettant de proposer le *VEGF-A* comme un nouveau biomarqueur potentiel des maladies cardiovasculaires à évaluer cliniquement.

Abstract

VEGF-A is involved in several diseases, including cardiovascular disease and several types of cancer. The existence of common signaling between the VEGF-A, cell adhesion molecules and inflammatory molecules may help to explain the wide range of functions of VEGF-A in different pathological situations. As part of this thesis, we have developed an integrative approach to study of VEGF-A and its position in several metabolic pathways. This approach involves the identification of genetic variants associated with VEGF-A and their biological function by a transcriptomic approach.

Thus, the general aim of this thesis is to investigate the complex relationships between four polymorphisms associated with VEGF-A, its plasma levels and its expression with cell adhesion molecules, inflammatory molecules, plasma lipids, candidate genes (*NOS3*, *CD14*, *MMP3* and *IL-4*) and with cardiovascular risk factors (obesity and blood pressure) in healthy individuals. For our studies, we used a subgroup of the STANISLAS Family Study and other populations available in the Biological Resources Center IGE-PCV. Our transcriptomics experiments have been performed with peripheral blood mononuclear cells.

The results showed:

- An association between *VEGF-A*₁₄₅ isoform with the levels of *ICAM-1* mRNA, *L-selectin* mRNA and *TNF- α* mRNA.
- An association between the levels of VEGF-A and the levels of ICAM-1 and E selectin.
- An epistatic interactions between the VEGF-A related variants for the levels of E selectin, TNF- α , ICAM-1 and IL-6.
- An association of rs4416670 with levels of mRNA of *L selectin*.
- An association between rs6921438 and levels of HDL-C and LDL-C.
- An interaction between rs4416670 and hypertension for the interindividual variation of apolipoprotein E.
- Significant associations between the expression of *VEGF-A* with *NOS3*, *CD14*, *MMP3*, *IL4R* and *IL-4* polymorphisms.
- Significant epistatic interactions between genetic variants of *NOS3*, *CD14*, *MMP3*, *IL4R*, and *IL4* and the four polymorphisms related to VEGF-A on the plasma levels of VEGF-A.

- Significant interactions between rs1800779 in *NOS3* and HDL-C, triglycerides, and obesity, as well as interactions of rs6921438 with hypertension on plasma levels of VEGF-A.
- Significant associations and gene \times blood lipids interactions between all genetic variants of VEGF-A with obesity traits.
- A significant association between rs4416670 and pulse pressure.
- An epistatic interaction between rs6921438 and rs10738760 on pulse pressure.
- Significant associations between the rs10738760 variant of VEGF-A and the risk of metabolic syndrome.

The results of this thesis indicate the central role of VEGF-A in the regulation of various physiological processes and offer VEGF-A as a potential novel biomarker for cardiovascular disease to be further evaluated clinically.

Liste des abréviations

ADNc: acide désoxyribonucléique complémentaire
CD14 : cluster of differentiation 14
CHD : coronary heart disease
CRB : Centre de Ressources Biologique,
CRP : Protéine C-réactive
EGIR: European Group for the Study of Insulin Resistance
GWAS: genome-wide association studies
HCY : homocystéine
HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol
HIF : facteur hypoxiainductible
HTA : hypertension artérielle
HVG : hypertrophie ventriculaire gauche
ICAM-1: inter-cellular adhesion molecule 1
ICC : insuffisance cardiaque congestive
IGE-PCV : Interactions Gène-Environnement en Physiopathologie Cardio-Vasculaire
IL-4: interleukin 4
IL-6: interleukin 6
IMC : indice de masse corporelle
LDL : low-density lipoprotein
LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol
MAF: fréquence de l'allèle mineur
MCV : maladies cardiovasculaire
mmHg: millimètre de mercure
MMP3 : matrix metalloproteinase-3
MTHFR : méthylènetétrahydrofolate réductase
NCEP : programme National Cholesterol Education
NCEP-ATPIII: National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III
NO: oxyde nitrique
NOS3 : nitric oxide synthase 3
OMS : Organisation mondiale de la santé
PA : pression artérielle
PAS: pression artérielle systolique

pb: paire de bases

PBMC: peripheral blood mononuclear cells

PCR: polymerase chain reaction

PIGF : Facteur de croissance placentaire

RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction

SAA : sérum amyloïde A

SELE: E-selectin

SELP: P-selectin

SNPs : Single Nucleotide Polymorphisms

STANISLAS: Suivi Temporaire Annuel Non Invasif de la Santé des Lorrains Assurés
Sociaux

TaqPolymérase: polymerase isolée à partir de la bactérie *Thermus aquaticus*

TG : triglycérides

TNF α : facteur de nécrose tumorale alpha

VCAM-1: vascular cell adhesion molecule-1

VEGF : facteur de croissance l'endothélium vasculaire

VEGFR : facteur de croissance l'endothélium vasculaire récepteur

Table des matières

Liste des tableaux.....	14
Liste des figures.....	15
Avant-Propos.....	16
Liste des publications.....	19
I. Introduction.....	20
I.1. La physiopathologie des maladies cardiovasculaires.....	21
I.1.1. Les facteurs de risque classiques des maladies cardiovasculaires.....	21
I.1.1.1. Le sexe et l'âge.....	22
I.1.1.2. Les antécédents familiaux.....	23
I.1.1.3. Le tabagisme.....	23
I.1.1.4. L'hypertension artérielle.....	23
I.1.1.5. La dyslipidémie.....	24
I.1.1.5.1. Le cholestérol total et le LDL-cholestérol.....	24
I.1.1.5.2. HDL-cholestérol.....	25
I.1.1.5.3. Les triglycérides.....	26
I.1.1.6. Le diabète.....	27
I.1.1.7. L'obésité.....	27
I.1.1.8. Les facteurs nutritionnels.....	29
I.1.1.9. La sédentarité.....	29
I.1.1.10. Le syndrome métabolique.....	29
I.1.2. Les facteurs de risque émergents des maladies cardiovasculaires.....	31
I.1.2.1. L'hyperhomocystéinémie.....	31
I.1.2.2. Les facteurs psychosociaux et environnementaux.....	32
I.1.2.3. Les facteurs thrombogéniques.....	33
I.1.2.3.1. Le fibrinogène.....	33
I.1.2.3.2. Le facteur VII.....	34
I.1.2.3.3. La fibrinolyse.....	34
I.1.2.4. Les marqueurs de l'inflammation et d'adhésion.....	34
I.1.2.4.1. Protéine C-réactive (CRP).....	36
I.1.2.4.2. Le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF α).....	36
I.1.2.4.3. L'interleukine-6 (IL-6).....	37
I.1.2.4.4. Les autres cytokines.....	37
I.1.2.6. Le VEGF-A.....	38

I.2. La composante génétique des maladies cardiovasculaires	39
I.3. Les systèmes biologiques, les interactions gène x gène x environnement et les études de fonctionnalité dans les MCV.....	42
I.4. La famille des VEGF	45
I.4.1. La famille des VEGF _{xxx} angiogéniques.....	45
I.4.1.1. Le VEGF-A	46
I.4.1.2. Le VEGF-B.....	47
I.4.1.3. Le VEGF-C.....	48
I.4.1.4. Le VEGF-D	49
I.4.1.5. Le VEGF-E.....	50
I.4.1.6. Le facteur de croissance placentaire (PlGF)	50
I.4.2. Les récepteurs du VEGF.....	51
I.4.2.1. Le VEGFR-1.....	51
I.4.2.2. Le VEGFR2.....	52
I.4.2.3. Le VEGFR3	52
I.4.3. La famille des VEGF _{xxx} b	53
I.4.3.1. La découverte et l'expression dans des conditions physiologiques normales.....	53
I.4.3.2. Le VEGF _{xxx} b dans des conditions pathologiques: la régulation ou la surexpression ..	54
I.4.3.3. Le mécanisme d'action du VEGF _{xxx} b	56
I.4.4. Régulation de l'expression du VEGF-A.....	56
I.4.4.1. Par l'hypoxie.....	57
I.4.4.2. Les cytokines	57
I.4.5. Les cellules et les tissus sécrétant le VEGF-A.....	58
I.4.6. Mécanismes moléculaires du VEGF-A et de ses isoformes dans l'angiogenèse.....	59
I.4.6.1. Rôle du VEGF-A dans l'angiogenèse.....	59
I.4.6.1.1. Dans l'angiogenèse physiologique	59
I.4.6.1.1.1. Dans le développement embryonnaire.....	59
I.4.6.1.1.2. Chez l'adulte	59
I.4.6.1.2. Rôle du VEGF-A dans l'angiogenèse pathologique	60
I.4.6.2. Rôles des isoformes du VEGF-A dans l'angiogenèse	61
I.4.6.2.1. Dans l'angiogenèse physiologique	61
I.4.6.2.1.1. Le VEGF-A ₁₂₁	61
I.4.6.2.1.2. Le VEGF-A ₁₄₅	61
I.4.6.2.1.3. Le VEGF-A ₁₆₅	62
I.4.6.2.1.4. Le VEGF-A ₁₈₉	62
I.4.6.2.2. Dans l'angiogenèse pathologique	63

I.4.6.2.2.1. Le VEGF-A ₁₂₁	63
I.4.6.2.2.2. Le VEGF-A ₁₄₅	63
I.4.6.2.2.3. Le VEGF-A ₁₆₅	64
I.4.6.2.2.4. Le VEGF-A ₁₈₉	64
I.5. Le gène du <i>VEGF</i> , ses polymorphismes et les maladies associées.....	65
II. Hypothèses et objectifs	67
III. Matériel et méthodes.....	71
III.1. Populations.....	72
III.1.1. La cohorte STANISLAS	72
III.1.2. La population ApoEurope.....	74
III.1.3. La population Iranienne	74
III.2. Mesures des molécules d'adhésion et d'inflammation (pour toutes les études)	74
III.3. Génotypage	74
III.4. Transcriptomique	76
III.4.1. Extraction des ARN totaux	76
III.4.2. Rétrotranscription des ARN totaux.....	77
III.4.3. PCR en temps réel.....	78
III.4.3.1. Principe de l'amplification par PCR en temps réel.....	78
III.4.3.2. Amplification par PCR en temps réel	79
III.4.3.3. Vérification de la spécificité des produits de PCR.....	80
III.4.3.3.1. Courbe de fusion	80
III.4.4. Gels de polyacrylamide à 10 %.....	82
III.4.5. Purification des acides nucléiques	82
III.4.6. Etapes de mise en place des gammes étalon	82
III.4.6.1. Dosage des produits de PCR.....	82
III.4.6.2. La gamme étalon.....	83
III.5. Analyses.....	84
III.5.1. Test de l'équilibre de Hardy-Weinberg.....	84
III.5.2. Analyses statistiques	85
IV. Résultats et discussions.....	86
Publication N°1	87
Association du VEGF-A à des molécules d'adhésion et de l'inflammation dans une population saine.	87
Publication N°2.....	91
Un variant commun hautement associé aux niveaux plasmatiques de VEGF-A et qui contribue également à la variation à la fois du LDL-C et du HDL-C et une interaction épistatique expliquant la	

variabilité de l' APO-E.	91
Publication N°3.....	96
Les gènes <i>NOS3</i> , <i>CD14</i> , <i>MMP3</i> et <i>IL4R</i> liés à l'angiogenèse sont associés à l'expression génique et à la concentration plasmatique de VEGF-A dans des conditions physiologiques.....	96
Publication N°4.....	102
Les variants génétiques liés au VEGF-A et identifiés par GWAS sont associés au risque de l'obésité dans une population en bonne santé: interactions avec les lipides sanguins.....	102
Publication N°5.....	106
Les déterminants génétiques liés au VEGF-A sont impliqués dans la régulation de la pression artérielle.	106
Publication N°6.....	111
Association des variants génétiques du VEGF-A agissant en <i>cis</i> et en <i>trans</i> avec le syndrome métabolique et ses composants.	111
V. Discussion général, conclusions et perspectives.....	114
VI. Références bibliographiques.....	120

Liste des tableaux

Tableau 1: Classification de surpoids et l'obésité, en pourcentage de graisse corporelle indice de masse corporelle (IMC), le tour de taille, et les maladies associées risquent.....	28
Tableau 2: Classification du tour de taille. Source : Lignes directrices canadiennes pour la classification du poids chez les adultes.....	29
Tableau 3: Définitions classification du syndrome métabolique.....	31
Tableau 4: Les cytokines sont impliquées dans la régulation des processus inflammatoires.	37
Tableau 5: Estimation de l'héritabilité des accidents vasculaires cérébraux, des affections coronariennes et des principaux facteurs de risque cardiovasculaire.....	41
Tableau 6: Localisation chromosomique, taille majeure d'ARNm et la taille de protéines majeures des ligands de VEGF.....	46
Tableau 7: Etudes rapportant l'association entre polymorphisme du VEGF, maladies cardiovasculaires et leurs complications.....	66
Tableau 8: Caractéristiques des polymorphismes étudiés.....	75

Liste des figures

Figure 1: Transport reverse du cholestérol et autres propriétés du HDL-C.....	26
Figure 2: Le métabolisme de l'homocystéine repose sur 2 voies principales: reméthylation et transsulfuration. Les folates et la vitamine B12 constituent des co-facteurs de certaines étapes métaboliques.....	32
Figure 3: Profils de variation de concentration plasmatique des protéines de la phase aiguë de l'inflammation à la suite d'un stimulus modéré	35
Figure 4: Les sources cellulaires du TNF α	36
Figure 5: Modèle d'interactions gène-gène-environnement impliquées dans la physiopathologie des maladies cardiovasculaires.....	40
Figure 6: Structure des principaux variants d'épissage du VEGF-A chez l'homme.....	47
Figure 7: La famille du VEGF et ses récepteurs.....	53
Figure 8: Représentation du gène du <i>VEGF-A</i> et les deux sous-exons 8a et 8b.....	54
Figure 9: Représentation les isoformes du VEGFxxx et VEGFxxx _b par les deux sous-exons 8a et 8b.....	55
Figure 10: Sac vitellin chez des embryons de souris E10,5 VEGF ^{+/+} ou VEGF ^{+/-}	59
Figure 11: Phases de recrutement de la cohorte STANISLAS.....	72
Figure 12: Etapes de l'extraction des ARN totaux (MagNa Pure LC, Roche).....	77
Figure 13: Thermocycler classique pour synthèse des ARN totaux.....	78
Figure 14: Courbe d'amplification d'un gène cible par PCR en temps réel.....	78
Figure 15: Mécanismes des phases de la PCR en temps réel avec la technologie SYBR Green.....	79
Figure 16 : Courbe de fusion du gène amplifié par PCR en temps réel.....	81
Figure 17a : Représentation schématique de la gamme étalon.....	83
Figure 17b : Représentation schématique de La droite d'étalonnage moyenne.....	84
Figure 18 : Représentation schématique des effets des 4 variants liés au VEGF-A.....	117

Avant-Propos

L'angiogenèse est un processus complexe qui conduit au développement et à la croissance de nouvelles structures vasculaires à partir du réseau vasculaire pré-existant. Son rôle est déterminant dans diverses situations physiologiques telles que le développement embryonnaire, la cicatrisation tissulaire et osseuse et la réponse à l'activité physique. Les vaisseaux sanguins sont nécessaires pour une croissance et une régénération tissulaires optimales mais des anomalies de l'angiogenèse sont associées à diverses maladies. Une angiogenèse insuffisante ou excédentaire est ainsi retrouvée dans un nombre important de maladies courantes bien que complexes, dont des maladies vasculaires comme l'infarctus du myocarde, ou bien le diabète, les maladies neurodégénératives et reproductives, le cancer, les maladies auto-immunes et inflammatoires, la bronchopneumopathie chronique obstructive et les ulcères. L'angiogenèse est régulée par diverses molécules dont les cytokines et les facteurs de croissance. Parmi ces régulateurs, le VEGF-A (communément désigné comme VEGF) est le facteur angiogénique le plus puissant et est considéré comme une molécule de maintien de l'ordre à la fois pour l'angiogenèse physiologique et pathologique.

Cette thèse est fondée sur des données existantes provenant une étude d'association pangénomique concluante menée sur le VEGF-A par notre équipe, qui avait également montré que la composante héréditaire du VEGF-A est supérieure à 60 %. Jusqu'à la moitié de cette héritabilité est expliquée par les quatre variants génétiques identifiés par l'étude d'association pangénomique. Grâce à cette composante génétique exceptionnelle et largement caractérisée, le VEGF-A représente un biomarqueur potentiel pour les maladies cardiovasculaires.

Le but de cette thèse était d'étudier l'implication du VEGF-A dans la physiopathologie des maladies cardiovasculaires par des études d'association avec des facteurs de risque tels que le taux de cholestérol, la pression artérielle et les molécules inflammatoires, qui sont évalués dans la plupart des programmes de prévention de ces pathologies. Ces associations sont sous l'influence aussi de facteurs de risque environnementaux des maladies cardiovasculaires, d'où la possibilité de contrôler leur effet au moyen de stratégies de prévention.

En raison de l'existence d'un très grand nombre d'isoformes de transcription du gène VEGF-A, il nous a paru intéressant d'étudier la spécificité du VEGF-A entre les différents facteurs de risque des maladies cardiovasculaires. L'épissage alternatif du VEGF-A pourrait permettre de distinguer l'implication de la molécule dans différentes voies métaboliques. Ainsi, les déterminants moléculaires des isoformes du VEGF-A pourraient apporter des éclaircissements sur la spécificité et la susceptibilité aux maladies cardiovasculaires.

Cette thèse repose d'une part sur la disponibilité de cohortes internationalement reconnues extensivement génotypées et phénotypées, et d'autre part sur le développement d'une approche transcriptomique.

Liste des publications

Articles originaux faisant partie de la thèse :

Stathopoulou MG*, Bonnefond A*, Ndiaye NC, Azimi-Nezhad M, El Shamieh S, **Saleh A**, Rancier M, Siest G, Lamont J, Fitzgerald P, Visvikis-Siest S. A common variant highly associated with plasma VEGFA levels also contributes to the variation of both LDL-C and HDL-C. *J Lipid Res* 2013;54: 535-41. * co-premiers auteurs

Azimi-Nezhad M*, Stathopoulou MG*, Bonnefond A, Rancier M, **Saleh A**, Lamont J, Fitzgerald P, Ndiaye NC, Visvikis-Siest S. Associations of vascular endothelial growth factor (VEGF) with adhesion and inflammation molecules in a healthy population. *Cytokine* 2013;61: 602-7. * co-premiers auteurs

Saleh A*, Stathopoulou MG*, Azimi-Nezhad M, Ndiaye NC, Murray H, Masson C, Lamont J, Fitzgerald P, Visvikis-Siest S, Angiogenesis related genes NOS3, CD14, MMP3 and IL4R are associated to VEGF gene expression and circulating levels in physiological conditions. *Manuscrit soumis: BMC Med Genet.* * co-premiers auteurs

Saleh A*, Stathopoulou MG*, Ndiaye NC, Murray H, Masson C, Lamont J, Fitzgerald P, Visvikis-Siest S, GWAS-identified VEGF-related variants are associated with obesity risk in a healthy population: interactions with blood lipids. *Manuscrit soumis: Int J Obes.* * co-premiers auteurs

Saleh A*, Stathopoulou MG*, Chatelin J, Ndiaye NC, El Shamieh S, Siest G, Murray H, Masson C, Lamont J, Fitzgerald P, Visvikis-Siest S, VEGF genetic determinants are involved in blood *pressure regulation*. *Manuscrit soumis: Hypertension.* * co-premiers auteurs

Azimi-Nezhad M*, Stathopoulou MG*, Murray H, Mirhafez, Ndiaye NC, **Saleh A**, Rancier M, Bahrami A, Varasteh A, Bonnefond A, Masson C, Herbeth B, Lamont J, Fitzgerald P, Chayour-Mobarhan M, Visvikis-Siest S. Association of Vascular Endothelial Growth Factor Trans- and Cis-acting Genetic Variants with Metabolic Syndrome. *Manuscrit soumis: Gene.*

I. Introduction

1. I.1. La physiopathologie des maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires (MCV) correspondent à différentes pathologies chroniques ou événements ayant en commun une physiopathologie liée à l'athérosclérose. Il s'agit des : maladies coronariennes (angor d'effort, angor instable, infarctus du myocarde, mort subite); accidents vasculaires cérébraux (hémorragiques ou ischémiques, transitoires ou constitués); pathologies vasculaires périphériques (artériopathie oblitérante des membres inférieurs, anévrisme aortique, insuffisance rénale par néphro-angiosclérose. La maladie coronarienne (coronary artery disease, CAD) est universellement l'une des principales causes de décès et l'une des maladies chroniques les plus répandues dans le monde [1].

L'endothélium vasculaire est une barrière physique entre le sang et la structure vasculaire. Il s'agit également d'une source d'enzymes qui active et désactive les hormones cardiovasculaires et peut produire des facteurs relaxants, des facteurs endothéliaux, des facteurs de croissance, et des facteurs d'inhibition de la prolifération et des médiateurs inflammatoires [2]. Ces facteurs dérivés de l'endothélium contribuent à affiner le contrôle de la circulation, l'homéostasie et l'inflammation par l'endocrine, l'autocrine et une activité du paracrine [3]. L'activation de l'endothélium vasculaire due à des facteurs de risque cardiovasculaire tels qu'une augmentation des niveaux de lipoprotéines de petite densité (low-density lipoprotein, LDL), une hypertension artérielle (HTA), une élévation de la glycémie et le tabagisme sont responsables d'un dysfonctionnement dans les fonctions endothéliales par différents biais. Ces affections sont dites multifactorielles car elles sont la résultante de l'association synergique de plusieurs facteurs de risque 'se rapportant à des attributs, caractéristiques ou expositions d'un individu, associés à une incidence accrue de l'affection' (lien de causalité entre le facteur et la maladie).

I.1.1. Les facteurs de risque classiques des maladies cardiovasculaires

Les facteurs de risque classiques et donc validés des MCV sont l'âge et le sexe, les antécédents familiaux, le tabagisme, l'HTA, les dyslipidémies, le diabète, l'obésité, les facteurs nutritionnels et la sédentarité.

I.1.1.1. Le sexe et l'âge

Le risque d'évènements coronariens augmente avec l'âge. L'âge est un facteur de risque en ce qu'il reflète la durée d'exposition d'un individu aux autres facteurs de risque. Il a été démontré que le fait d'être une femme jeune était un facteur favorable vis-à-vis du développement de la maladie coronarienne (coronary heart disease, CHD) : son incidence parmi les hommes est trois à cinq fois plus élevée que chez les femmes [4].

Dans les deux sexes, le risque de la CHD augmente avec l'âge. Dans la plupart des populations, le cholestérol augmente avec l'âge. Chez les hommes, il augmente habituellement par paliers entre 45 et 50 ans, alors que chez les femmes, l'augmentation est continue et linéaire jusqu'à l'âge de 60 à 65 ans [5]. Tout comme le cholestérol, la pression sanguine augmente également avec l'âge, et de façon plus proéminente chez les femmes que chez les hommes. L'augmentation de la pression sanguine et ses différentes relations liées à l'âge des hommes et des femmes sont probablement explicables en partie par l'obésité [6, 7].

Une étude de la cohorte Framingham basé sur l'évolution du taux de morbidité et mortalité coronarien [8] analysaient le rôle des facteurs de risques cardiovasculaires selon la différence des sexes, cela conduit à un décalage chez la femme d'environ 10 ans par rapport à l'homme. En plus, le rapport de cette étude entre les hommes et les femmes est plus important pour les infarctus non mortels que pour les décès coronaires, suggérant une gravité plus importante de la maladie chez les femmes.

Au début des années 1990, Larsson et al. [9] ont analysé la probabilité que la différence de sexe, le cholestérol total, la pression sanguine, et l'indice de masse corporelle (l'IMC) pouvaient expliquer ces différences d'incidences des CHD entre les hommes et femmes suédois de 54 ans. Leur conclusion était que ces différences expliquaient la différence sexuelle dans le risque de coronaropathie et que d'autres facteurs de risque étaient inclus dans les analyses. Cette différence phénoménale entre les hommes et les femmes est déterminée par les chromosomes X ou Y. Pendant la période fœtale, les phénotypes mâles et femelles sont développés à travers l'action des hormones. Chez les femmes, les œstrogènes sont l'hormone la plus prédominante. Le déclin des œstrogènes se passe après la ménopause et change complètement le métabolisme de la femme vers une forme plus athérogénique par le biais du déclin du cholestérol HDL et par l'augmentation du cholestérol LDL et du cholestérol total, des triglycérides et des lipoprotéines [10, 11]. En plus de cela, les œstrogènes peuvent avoir des effets de protection du cœur par le biais du métabolisme du glucose et du système hémostatique, et il a peut-être un effet direct sur les cellules endothéliales [12, 13].

I.1.1.2. Les antécédents familiaux

Les antécédents familiaux cardiovasculaires sont à considérer car il existe de plus en plus de preuves scientifiques établissant l'origine génétique de certaines maladies cardiovasculaires. Ainsi, les antécédents d'infarctus du myocarde ou de mort subite avant l'âge de 55 ans chez le père et/ou 65 ans chez la mère doivent faire considérer la personne ayant une hypertension artérielle comme à risque cardiovasculaire élevé. Il en est de même en ce qui concerne les accidents vasculaires cérébraux précoces survenus chez un membre de la famille au premier degré avant l'âge de 45 ans. Il a été démontré, notamment par une étude prospective au sein de la cohorte Framingham que la survenue d'un décès d'origine coronarienne chez un parent augmentait de 30% le risque de maladie coronarienne chez ses enfants, hommes ou femmes, avec une probabilité plus forte qu'elle s'installe avant 60 ans [14, 15]. Les auteurs concluent que s'enquérir des antécédents familiaux cardiovasculaires de manière systématique permet d'identifier un plus grand nombre de personnes chez qui le risque cardiovasculaire est élevé pour lesquels une stratégie de prévention spécifique est nécessaire.

I.1.1.3. Le tabagisme

Le tabagisme peut entraîner une augmentation de sept fois du risque de maladie artérielle périphérique [16] et au moins une augmentation de deux fois le risque de maladie coronarienne [17, 18]. Ces deux principales formes de maladies cardiovasculaires associées au tabagisme sont les séquelles de l'athéromatose. Ainsi, il a été démontré chez les fumeurs une augmentation des taux plasmatiques de facteur de von Willebrand (un marqueur de la dysfonction endothéliale) [19], du fibrinogène plasmatique (le précurseur de la fibrine) et de l'hématocrite [20, 21] avec des profils de lipides sanguins et de lipoprotéines altérés et une réduction de la circulation d'antioxydants [22].

I.1.1.4. L'hypertension artérielle

L'hypertension artérielle est définie par : - une pression artérielle systolique ≥ 140 mmHg et / ou - une pression artérielle diastolique ≥ 90 mmHg

L'hypertension est un facteur de risque essentiel pour les MCV, et peut être une conséquence d'un dysfonctionnement de la croissance vasculaire, résultant en partie d'une régulation anormale du facteur de croissance des cellules endothéliales. L'HTA favorise la formation de plaques athéromateuses au niveau des gros troncs coronariens, générant ainsi une authentique insuffisance coronarienne organique. L'HTA contribue, en collaboration avec divers facteurs neuro-hormonaux, à l'apparition d'une hypertrophie ventriculaire gauche (HVG) associant hypertrophie myocytaire et expansion du tissu de soutien. Cette HVG pathologique s'associe à des anomalies structurelles et fonctionnelles des petites artères (< 300 µm) et des artéioles (<50 µm) coronaires, responsables de la diminution de la réserve coronaire et donc d'une insuffisance coronarienne « fonctionnelle ». Belgore's et al. [23] ont indiqué que les niveaux de facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (Vascular endothelial growth factor, VEGF-A plasmatiques sont d'une grande importance et hautement augmentés dans le cas de patients sous hypertendus mais sans complications lorsque nous comparons avec les normes de contrôle de la tension, et le traitement réduit de façon importante les niveaux de VEGF-A plasmatiques. D'une façon très intéressante, Tsai et al. [24] ont montré que le VEGF-A est plus haut dans le cas de patients ayant une tension élevée avec une rétinopathie plutôt que dans le cas de patients avec de l'hypertension sans rétinopathie ou des sujets dans les normes. Dans cette optique, Ebinç et al. [25] ont rapporté que le VEGF-A peut augmenter la perméabilité de la filtration et mener à une micro albuminurie dans le cas d'hypertension essentielle. Ces études suggèrent que le VEGF-A peut être un marqueur pour les problèmes micro-vasculaires dans le cas de l'hypertension. De plus, Zorena et al. [26] ont démontré que la pression systolique est un facteur indépendant influençant la concentration de VEGF-A chez les enfants et les adolescents souffrant de diabète type 1.

I.1.1.5. La dyslipidémie

Les lipides sont un groupe très hétérogène de composés, et leur influence sur le métabolisme va bien au-delà des méfaits qui leurs sont attribués. La dyslipidémie est la cause majeure de MCV, et des niveaux élevés de cholestérol total comptent pour un tiers des décès associés aux cardiopathies ischémiques (Organisation mondiale de la santé, OMS).

I.1.1.5.1. Le cholestérol total et le LDL-cholestérol

De nombreuses études cliniques ont montré que la relation entre l'hypercholestérolémie et l'athérosclérose est particulièrement bien établie, essentiellement pour les pathologies coronariennes. Ces études indiquent que les concentrations de LDL-C sont importantes, même si elles étaient bien plus faibles que les concentrations cible du programme National Cholesterol Education (NCEP) de 130 mg / dL. Une étude qui a examiné des individus sans droits compensateurs au départ a montré que le LDL-C était un prédicteur indépendant de la maladie coronarienne, même lorsque les composants du syndrome de dyslipidémie ont été pris en compte. Le rapport de risque indique qu'une augmentation de 10 mg / dL des niveaux de LDL-C conduirait à une augmentation de 12% du risque de MCV. (Plus récemment, plusieurs études cliniques sur la prévention primaire et secondaire de la maladie coronarienne ont souligné l'importance de la fraction LDL (Bureau d'information des lipides ILIB International, 2002) [27] . En fait, le risque de chaque patient peut être déterminé par taux de LDL-cholestérol plutôt que son taux de cholestérol total, ce qui explique pourquoi les normes internationales pour le traitement de la dyslipidémie ont été orientées vers la liste des seuils de risque et objectifs de traitement en fonction des concentrations plasmatiques de cette lipoprotéine.

I.1.1.5.2. HDL-cholestérol

Les HDL-C sont des lipoprotéines de haute densité qui ont été surnommé bon cholestérol du fait, de la capacité des particules de HDL à éliminer les molécules de cholestérol en excès des cellules périphériques (ceux dans les plaques d'athérosclérose incluses) via le foie (Figure1). Les études épidémiologiques montrent clairement que les niveaux de HDL-C sont inversement associés avec le risque de maladie coronarienne et de ses complications thrombotiques. C'est donc sa diminution qui constitue un facteur de risque cardiovasculaire comme cela a été démontré dans de nombreuses études épidémiologiques : une augmentation du HDL-C de 0,026 mmol/L s'accompagne d'une diminution du risque coronarien de 2% chez l'homme et de 3% chez la femme [28]. Cependant, dans une étude récente, Voight et al. [29]. ont testé l'hypothèse que l'augmentation de HDL-C plasmatique est un facteur de protection de l'infarctus du myocarde (IM) en examinant la relation entre les variations génétiques associées à des niveaux élevés de HDL-C plasmatiques et le risque d'infarctus du myocarde. Les auteurs ont conclu que certains mécanismes génétiques qui augmentent le HDL-C plasmatique ne sont pas nécessairement baissés pas le risque d'infarctus du myocarde et que

les résultats ont contesté la notion d'augmentation de HDL-C plasmatique uniformément traduite par une réduction du risque d'infarctus du myocarde.

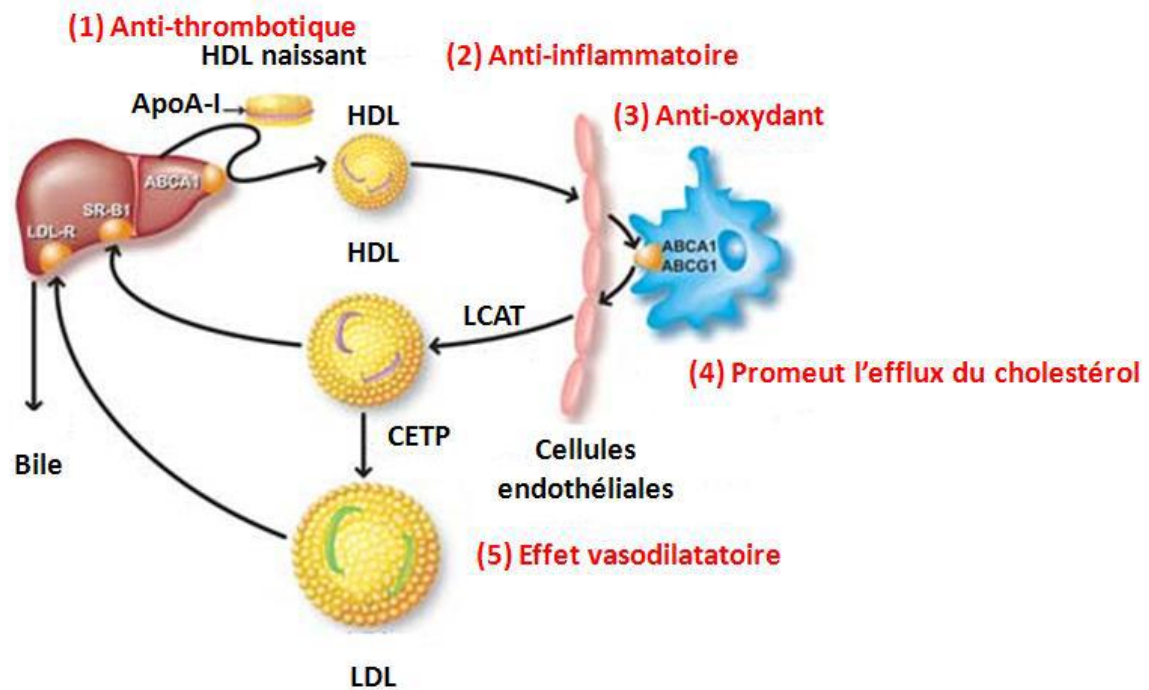


Figure 1: Transport reverse du cholestérol et autres propriétés du HDL-cholestérol

I.1.1.5.3. Les triglycérides

L'élévation des niveaux des triglycérides (TG) dans le plasma a longtemps été associée à un risque accru de maladie cardiovasculaire. Une étude cas-contrôle [30] a montré que le taux de triglycérides à jeun était augmenté chez les patients atteints de la maladie de l'artère coronaire par rapport aux sujets témoins. La première étude prospective des TG en lien la maladie ischémique a montré une incidence accrue de maladies cardiaques ischémiques chez les hommes avec des niveaux élevés de TG à l'inclusion par rapport aux hommes contrôles. Cependant, même dans cette première étude, les chercheurs ont émis l'hypothèse que l'association des TG ne peut pas être indépendante des autres lipides plasmatiques [31]. L'étude de TG en relation avec la cardiopathie ischémique a montré une incidence accrue de maladies cardiaques ischémiques chez les hommes avec des niveaux élevés de TG à l'inclusion par rapport aux hommes ayant des niveaux inférieurs. La méta-analyse des données d'études prospectives basées sur la population a démontré que l'augmentation de TG

plasmatiques est associée à une augmentation de 32% du risque de MCV chez les hommes et une augmentation de 76% du risque de MCV chez les femmes [32].

I.1.1.6. Le diabète

Un grand nombre de données épidémiologiques et pathologiques ont montré que le diabète est un facteur de risque indépendant pour la santé cardiovasculaire chez les hommes et les femmes. Les MCV sont répertoriées comme étant la cause de 65% des décès des personnes atteintes de diabète. Le diabète agit comme un facteur de risque indépendant pour plusieurs formes de MCV. Le diabète de type 1 et le diabète de type 2 sont des facteurs de risque indépendants de la maladie coronarienne. En outre, l'ischémie myocardique due à l'athérosclérose coronaire se produit généralement sans symptômes chez les patients atteints de diabète. En conséquence, l'athérosclérose multivaisseaux est souvent présente avant que les symptômes ischémiques n'apparaissent et avant l'instauration du traitement [33]. Une des raisons de mauvais pronostic chez les patients atteints à la fois de diabète et de maladie cardiaque ischémique semble être une dysfonction myocardique accru conduisant à une défaillance cardiaque accéléré (cardiomyopathie diabétique) Ainsi, les patients atteints de diabète sont particulièrement sujets à l'insuffisance cardiaque congestive. Plusieurs facteurs expliquent probablement la cardiomyopathie diabétique: l'athérosclérose coronarienne sévère, l'hypertension prolongée, l'hyperglycémie chronique, la maladie microvasculaire, la glycosylation des protéines du myocarde, et une neuropathie autonome [34].

I.1.1.7. L'obésité

L'obésité devient une épidémie mondiale. Au cours des dix dernières années, il y a eu une augmentation spectaculaire de l'obésité chez les enfants et les adultes. Actuellement, le surpoids et l'obésité sont classés selon l'IMC. Chez les adultes, le surpoids est défini comme un IMC de 25,0 à 29,9 kg / m², [33] (Tableau 1)

Tableau 1 : Classification de surpoids et l'obésité, en pourcentage de graisse corporelle, indice de masse corporelle (IMC), le tour de taille, et les maladies associées risquent [33].

Classification	IMC	Hommes ≤102 cm	Hommes > 102 cm
----------------	-----	----------------	-----------------

	(kg/m ²)	Femmes ≤ 88 cm	Femmes > 88 cm
Maigreux extrême	< 16	Élevé	
Maigreux	< 18,5	Accru	
Poids normal	18,5 - 24,9	Faible	
Embonpoint	25,0 - 29,9	Accru	élevé
Obésité, classe 1	30,0 - 34,9	Élevé	Très élevé
Obésité, classe 2	35,0 - 39,9	Très élevé	Très élevé
Obésité, classe 3 (obésité morbide)	≥ 40	Extrêmement élevé	Extrêmement élevé

L'obésité est un facteur majeur de la prévalence des MCV dans le monde développé. Ceux-ci peuvent être liées indirectement par l'intermédiaire de facteurs de risque associés au syndrome métabolique comme la dyslipidémie, l'hypertension et l'intolérance au glucose [35, 36]. Le SM est associé à l'obésité abdominale ou centrale (Tableau 2), avec une répartition de la matière grasse principalement dans les viscères abdominaux, plutôt que les extrémités. Beaucoup d'adipokines et d'autres médiateurs chimiques comme le facteur de nécrose tumorale- α , l'interleukine-6, la résistine, la lipoprotéine lipase, les oestrogènes, la leptine et l'angiotensinogène sont présents avec des concentrations plus élevées chez les patients obèses, celles-ci ont divers effets néfastes sur le système cardiovasculaire par la création d'un état pro-inflammatoire et pro-thrombotique ainsi que par l'apparition de lésions endothéliales et d'hypertrophie vasculaire [37, 38]. Il existe, cependant, aussi bien des effets directs de l'obésité sur le cœur et le système cardiovasculaire comme l'augmentation du volume sanguin, du débit cardiaque élevé, une hypertrophie ventriculaire gauche, et une dysfonction ventriculaire gauche diastolique, jouant un rôle dans l'apparition de l'insuffisance cardiaque. L'obésité est un facteur prédictif indépendant de maladie de l'artère coronaire [39].

Tableau 2: Classification du tour de taille. Source : Lignes directrices canadiennes pour la classification du poids chez les adultes.

Risque de MCV, diabète et HTA	Hommes	Femmes
Faible	< 94 cm	< 80 cm
Accru	> 94 cm	> 80 cm
Considérablement accru	> 102 cm	> 88 cm

I.1.1.8. Les facteurs nutritionnels

Parmi les facteurs de risque cardiovasculaire conventionnels, l'alimentation représente un défi particulier pour la recherche. En ce qui concerne la CAD, un élément clé du changement de régime alimentaire est une augmentation de la consommation de graisses animales saturées et de graisses végétales hydrogénées, qui contiennent des acides gras trans athérogènes, avec une diminution de la consommation d'aliments à base de plantes et une augmentation de glucides simples [40, 41]. Des études comparatives multi-ethnique portant sur les habitudes alimentaires caractérisé par une forte consommation de matières grasses ajoutées, de viandes transformées, a été associée à un risque accru d'incident cardiovasculaire, bien que, les autres habitudes alimentaires (légumes et poissons, haricots, tomates et céréales raffinés) aient été associées à une diminution du risque de MCV [42, 43].

I.1.1.9. La sédentarité

La sédentarité est devenue un problème majeur de santé publique. Elle est également associée à un risque accru de morbidité ou d'aggravation de nombreuses maladies chroniques comme l'insuffisance cardiaque congestive, les accidents vasculaires cérébraux, certains cancers, l'ostéoporose, l'obésité, le diabète de type 2 et l'hypertension [44]. Plusieurs études de cohorte ont démontré que la sédentarité multipliait par 1,9 le risque de décès d'origine coronarienne après ajustement sur les autres facteurs de risque [45].

Alors que l'activité physique régulière permet de réduire le poids, de réguler les taux de cholestérol et de lipides sanguins, la tension artérielle et le diabète, et d'atténuer ainsi le risque cardiovasculaire global.

I.1.1.10. Le syndrome métabolique

Le syndrome métabolique (SM) est un ensemble de facteurs les plus dangereux de risque de crise cardiaque: diabète et glycémie élevée à jeun, obésité abdominale, taux élevé de cholestérol et hypertension artérielle [46]. On estime que près de 20-25 pour cent de la

population adulte dans le monde est atteinte de SM et ils sont deux fois plus susceptibles de mourir et trois fois plus susceptibles d'avoir une crise cardiaque ou un accident vasculaire cérébral par rapport aux personnes sans syndrome. En outre, les personnes atteintes du SM ont cinq fois plus de risques de développer un diabète de type 2 [47]. Le regroupement des facteurs de risque de MCV qui caractérise le SM est maintenant considéré comme le moteur d'une nouvelle épidémie de MCV. Il en existe plusieurs définitions. L'importance clinique du syndrome a été soulignée par Reaven et al. [48] en 1988 qui ont décrit l'existence d'un groupe de troubles métaboliques, de résistance à l'insuline comme le facteur central dans la physiopathologie, le syndrome X. Depuis le SM a été officiellement défini la première fois par un groupe de travail de l'OMS et l'European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR) en 1999 [49] puis par le National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III (NCEP-ATPIII) en 2001 [40]. La reconnaissance de ces caractéristiques du SM chez les personnes ayant un métabolisme au glucose et un diabète de type 2 revêt une importance particulière, mais un consensus relatif existait sur les facteurs à prendre en compte : l'insulinorésistance était la fonction de base, la dyslipidémie, l'hypertension et l'obésité abdominale comme un élément clé (Tableau 3).

Tableau 3 : Définitions classification du syndrome métabolique.

Phénotypes	OMS (1999)	EGIR (1999)	NCEP-ATPIII (2001)	IDF (2005)
Insulinorésistance	Clamp < Q1	IAJ > Q4	-	-
Intolérance au glucose	GAJ \geq 6,1 et/ou G2h \geq 6,1	GAJ \geq 6,1	GAJ \geq 6,1	GAJ \geq 5,6 ou DT2
Dyslipidémie	TG \geq 1,7 et/ou HDL-C < 0,9 H, 1 F	TG \geq 2 et/ou HDL-C < 1	TG \geq 1,7 et HDL-C < 0,9 H, 1 F	TG \geq 1,7 et HDL-C < 1,03 H, 1,29 F
Hypertension	PAS/PAD \geq 140/90	PAS/PAD \geq 140/90	PAS/PAD \geq 130/85	PAS/PAD \geq 130/85
Obésité	RTH > 0,90 H,0,85 F et/ou IMC > 30	TT \geq 94 H, 80 F	TT \geq 102 H, 88 F	TT \geq 94 H, 80 F
Microalbuminurie	EUA > 20 ou Alb/créat \geq 30	-	-	-
Syndrome Métabolique	IR et/ou ITG + au moins 2 critères	IAJ+ au moins 2 critères	Au moins 3 critères	Obésité+au moins 2 critères

IAJ : insulinémie à jeun ; GAJ : glycémie à jeun (mmol/L) ; G2h : glycémie 2 heures après charge glucosée ; TG (mmol/L) HDL-C (mmol/L) ; PAS/PAD (mmHg) ; EUA : excrétion urinaire d'albumine (μ g/min)

I.1.2. Les facteurs de risque émergents des maladies cardiovasculaires

I.1.2.1. L'hyperhomocystéinémie

L'homocystéine (HCY) est un acide aminé qui fonctionne comme un précurseur pour la synthèse de la L-méthionine et qui est associée avec le métabolisme de l'acide folique et la vitamine B1 [50]. L'augmentation de l'HCY, c'est à dire, l'hyperhomocystéinémie, pourrait

entraîner l'altération de la fonction endothéliale, une augmentation du stress oxydatif et des troubles du métabolisme des lipides [51, 52] et est largement considéré comme un facteur de risque d'accident vasculaire cérébral [53, 54]. Physiologiquement, la concentration plasmatique d'homocystéine est en moyenne de 10 $\mu\text{mol/l}$, elle est plus élevée chez les hommes que chez les femmes. En outre, l'augmentation de 15 $\mu\text{mol/L}$ en homocystéine est associée à un risque accru d'artériosclérose [55]. Les causes les plus fréquentes sont un mode de vie malsain, une faible consommation de vitamines, une malabsorption gastro-intestinale de vitamines, des défauts enzymatiques et d'interactions médicamenteuses. L'acide folique, la vitamine B12 et la pyridoxine sont les co-facteurs essentiels dans le métabolisme des HCY et sont déterminants des concentrations d'HCY plasmatique connues [56, 57]. Il est bien établi que, la carence en HCY l'abaissement des vitamines telles que la vitamine B12, l'acide folique et la pyridoxine est la principale cause de l'hyperhomocystéinémie. De plus, plusieurs études ont rapporté que les polymorphismes de la méthylène-tétrahydrofolate réductase (MTHFR) est également un facteur de risque provoquant l'hyperhomocystéinémie et les complications associées (Figure 2) [58, 59].

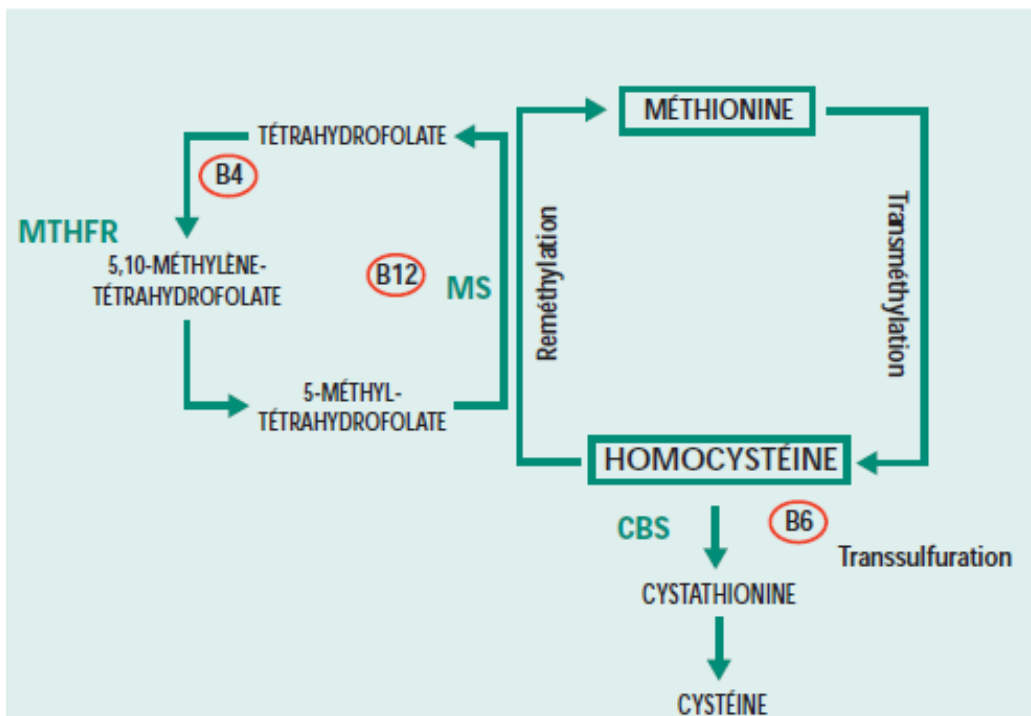


Figure 2 : Le métabolisme de l'homocystéine repose sur 2 voies principales: reméthylation et transsulfuration. Les folates et la vitamine B12 constituent des co-facteurs de certaines étapes métaboliques.

I.1.2.2. Les facteurs psychosociaux et environnementaux

Les facteurs psychosociaux tels que le stress, la dépression, le désespoir, et autres semblent associés à la santé, en particulier les MCV [60, 61]. Au cours des dernières décennies, les conditions psychosociales et la vie inadéquates ont également été liés aux MCV [61, 62]. Les conditions individuelles comme le faible statut socio-économique, le faible soutien social, la dépression, et la résidence dans les quartiers défavorisés peuvent contribuer à des inégalités socio-économiques en matière de santé cardiovasculaire [63]. Leurs rôles, cependant, ne sont pas encore tout à fait clairs et, dans certains cas, pas pris en considération car il existe peu d'études qui ont évalué l'effet des facteurs psycho-sociaux. Certaines études ont montrées que les facteurs de risque d'accident vasculaire cérébral classique sont susceptibles d'être plus fréquentes parmi les groupes socio-économiquement défavorisés [64]. Le stress psychologique a la capacité de montrer des réactions physiologiques indésirables, y compris augmentation du rythme cardiaque et les niveaux de cortisol. Quand le stress est chronique, ces effets indésirables pourraient se traduire par une augmentation de la morbidité et de la mortalité [65]. Certaines études récentes ont montrées une association forte entre le stress et toutes causes de la mortalité cardio-vasculaire [66]. Du point de vue environnemental, il a été observé, notamment par l'étude MONICA, que la température journalière moyenne était inversement proportionnelle au taux d'infarctus et que la pollution atmosphérique avait également un impact cardiovasculaire [67].

I.1.2.3. Les facteurs thrombogéniques

Un grand nombre de facteurs prothrombotiques ont été individualisés au cours de ces dernières années.

I.1.2.3.1. Le fibrinogène

Une méta-analyse a analysé les études publiées sur les facteurs thrombogéniques, Elle suggère que l'augmentation du fibrinogène plasmatique serait liée de manière indépendante au risque d'accident coronarien comme le cholestérol. Le fibrinogène augmente la thrombogénicité par différents mécanismes : fixation spécifique aux récepteurs GPIIb-IIIa entraînant l'agrégation plaquettaire, catalyse de la formation de fibrine et augmentation de la viscosité sanguine. Cette augmentation est associée au tabagisme, à un faible niveau d'activité physique et à une triglycéridémie basse [68] .

I.1.2.3.2. Le facteur VII

Hoffman et al. [69] ont montré que l'augmentation de l'activité du facteur VII permet de prédire la survenue d'un événement cardiaque avec un risque relatif de 1,8 pour le décès et de 1,4 pour l'infarctus non fatal.

I.1.2.3.3. La fibrinolyse

L'inhibiteur de type 1 des activateurs du plasminogène (PAI-1) joue un rôle essentiel dans la régulation de la fibrinolyse intra- et extravasculaire en inhibant la formation de plasmine à partir du plasminogène. Chez des patients victimes d'un MI avant 45 ans, le dosage plasmatique de PAI-1, inhibiteur de l'activité fibrinolytique physiologique, est étroitement corrélé avec la survenue à 3 ans d'un nouvel infarctus [70].

I.1.2.4. Les marqueurs de l'inflammation et d'adhésion

L'inflammation fait intervenir des cellules, des vaisseaux, des modifications de la matrice extracellulaire et de nombreux médiateurs chimiques qui peuvent être pro ou anti-inflammatoires et qui peuvent modifier ou entretenir la réponse inflammatoire. Il a clairement été établi que le processus inflammatoire se situait au cœur de nombreuses pathologies et l'opportunité d'utiliser la quantification des marqueurs de l'inflammation. Lors de l'inflammation, il y a augmentation des taux de la plupart des protéines tel que le fibrinogène, la procalcitonine, le sérum amyloïde A (SAA), les protéines de la phase aiguë ou les protéines de la Réaction Inflammatoire (PRI) (Figure 3).

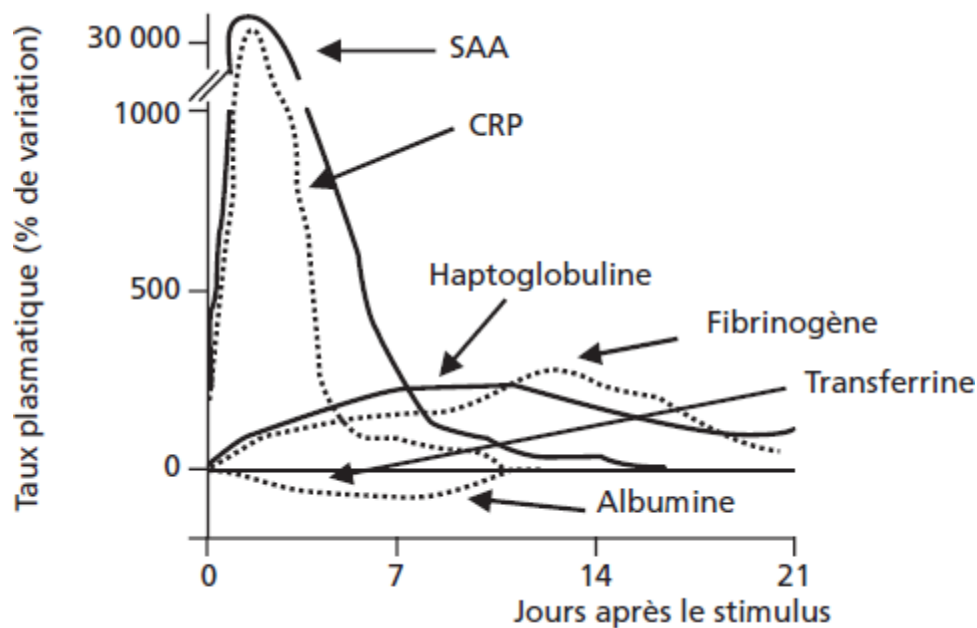


Figure 3: Profils de variation de concentration plasmatique des protéines de la phase aiguë de l'inflammation à la suite d'un stimulus modéré [69].

Les protéines de la phase aiguë de l'inflammation sont définies empiriquement comme des protéines dont la concentration plasmatique évolue au cours d'une réaction inflammatoire. Les Protéines dont la concentration plasmatique augmente sont appelées Protéines de la Réaction Inflammatoire positives (PRI+) et celles dont la concentration plasmatique diminue Protéines de la Réaction Inflammatoire négative (PRI-). Chez l'Homme, les PRI+ sont l' α 1 glycoprotéine acide, l' α 1 protéase inhibiteur, l' α 1 antichymotrypsine, l'haptoglobine, la céruloplasmine, la CRP et l'Amyloïde A protéine. Les principales fonctions des PRI résultent d'une interaction des protéines avec des ligands d'origine diverse, et de la formation de complexes dont l'épuration est assurée soit par le système réticuloendothélial, soit par l'hépatocyte. Il s'ensuivra l'inactivation des protéases, la neutralisation de molécules toxiques tels l'hémoglobine et les ions superoxydes, l'évacuation de débris membranaires, leucocytaires ou cellulaires et de débris nucléaires tels que la chromatine. La chute de la concentration plasmatique des PRI au cours d'une réaction inflammatoire, entraîne une augmentation de la fraction libre de certains ligands (acides gras, hormones, vitamines, oligoéléments).

Beaucoup de maladies chroniques avec des activations des processus inflammatoires immunitaires sont accompagnées par une incidence élevée de MCV. L'athérosclérose est une maladie de stockage des lipides. Des dépôts lipidiques sont formés sur la surface des artères et bloquent éventuellement l'apport sanguin aux tissus, résultant en un événement cardiovasculaires, comme l'IM.

I.1.2.4.1. Protéine C-réactive (CRP)

La CRP est une protéine de la phase aiguë de la réaction inflammatoire qui interagit avec les autres cytokines au niveau de l'endothélium et favoriserait le développement des plaques athéromateuses. L'augmentation de la CRP est associée à un risque accru d'évènements cardiovasculaires (en particulier insuffisance coronaire, accident vasculaire cérébral ischémique et mortalité vasculaire) [71]. La plupart du CRP circulant est produit dans le foie et interagit avec les cellules endothéliales par l'intermédiaire de divers mécanismes, qui contribuent à la dysfonction endothéliale. Ce dysfonctionnement se caractérise par une altération endothélium, une relaxation dépendante en association avec une dérégulation des voies de signalisation cellulaire, des modifications dans les voies thrombotiques / anti thrombotiques et une augmentation de la perméabilité de la cellule [72, 73].

I.1.2.4.2. Le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF α)

Les TNF α sont des molécules produites par le système immunitaire jouant un rôle important dans le déclenchement d'une réaction inflammatoire et sont produits par des cellules qui participent à l'inflammation, plusieurs types cellulaires sont capables de synthétiser du TNF α (Figure 4).

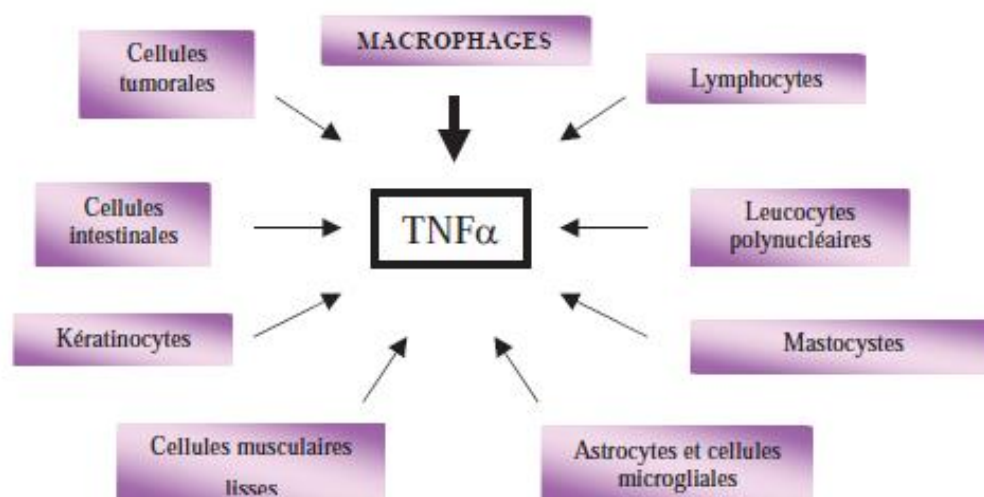


Figure 4: Les sources cellulaires du TNF α .

Tous les types de cellules nucléées sont capables de répondre au TNF α par deux récepteurs membranaires, en particulier, les cellules endothéliales qui expriment les deux types de

récepteurs, d'autres cellules comme les monocytes expriment l'un ou l'autre des récepteurs. Le TNF α joue un rôle important dans les désordres inflammatoires pathogènes, il est impliqué dans les processus inflammatoires [74].

I.1.2.4.3. L'interleukine-6 (IL-6)

L'IL-6 est synthétisée par une grande variété de cellules parmi lesquelles les phagocytes mononucléaires qui représentent la source la plus importante. Généralement, les taux d'IL-6 élevés dans la majorité des maladies inflammatoires chroniques et d'insuffisance cardiaque congestive (ICC) [75]. Son rôle dans les maladies inflammatoires chroniques n'est pas bien déterminé.

I.1.2.4.4. Les autres cytokines

Les autres cytokines (Tableau 4) qui ont des effets biologiques et qui sont impliquées dans la régulation des processus inflammatoires sont décrits dans le tableau suivant.

Tableau 4 : Les cytokines sont impliquées dans la régulation des processus inflammatoires.

Cytokine	Sources cellulaires majeures	Effets biologiques majeurs dans l'inflammation
INF- γ	Lymphocytes Th1, B.	Activation des macrophages, prolifération des lymphocytes B, inhibition de la prolifération des lymphocytes Th2
IL-2	Lymphocytes Th1.	Prolifération des lymphocytes T, libération de TNF- α , IL-1 β et IFN- γ par les leucocytes.
IL-4	Lymphocytes Th2.	Inhibition de la libération des cytokines pro-inflammatoires par les monocytes/macrophages. Stimulation de la prolifération des lymphocytes T.
IL-10	Lymphocytes Th2, Monocytes, macrophages	Inhibition de la libération des cytokines par les lymphocytes Th1, activité anti-inflammatoire générale.
IL-12	Monocytes, macrophages, Lymphocytes B.	Libération d'IL-2 et d'IFN- γ par les lymphocytes Th1
IL-13	Lymphocytes T CD8.	Régulation de l'activité des monocytes et macrophages, inhibition de la libération des cytokines inflammatoires
IL-15	Monocytes, macrophages.	Prolifération des lymphocytes T
IL-17	Lymphocytes Th1.	Production de métalloprotéases par les macrophages, Libération d'IL-6, IL-8 et PGE2 par les fibroblastes
IL-18	Monocytes, macrophages.	Croissance, différenciation et activation des lymphocytes Th1, libération d'IL-8 par les fibroblastes synoviaux.

Les changements dans le micro-environnement affecte les cellules endothéliales qui expriment les molécules d'adhésion (VCAM-1: molécules d'adhésion vasculaire-1, ICAM-1: molécules d'adhésion intracellulaire-1, E et P sélectine). Ils sont des molécules de surface cellulaire collantes qui facilitent la liaison et la communication intercellulaire. Elles règlent les interactions cellule-cellule et sont nécessaires pour le développement embryonnaire, la croissance et la différenciation cellulaire, la détection de pathogènes, de l'inflammation, et la réparation de la plaie. D'autre part, des molécules d'adhésion jouent un rôle essentiel dans le développement de l'inflammation. En général, les molécules d'adhésions jouent un rôle important dans la physiopathologie des maladies cardio-vasculaires, néoplasiques, infectieuses et de la peau. Certaines maladies cardiovasculaires sont associées à une altération pathologique de la structure et la fonction des cellules endothéliales avec l'apparition d'un dysfonctionnement endothélial [74].

I.1.2.6. Le VEGF-A

Il est bien établi que les facteurs de risque de maladie cardiovasculaire sont associés à la dysfonction endothéliale. Le VEGF-A a été reconnu comme étant un facteur de croissance majeur spécifique de la cellule endothéliale. Il s'agit d'une glycoprotéine dimérique essentielle pour les processus angiogéniques dans les conditions normales ou pathologiques, tels que la vascularisation des tumeurs [76, 77]. L'angiogenèse physiologique a lieu pendant le développement du fœtus et, chez l'adulte, lors de la croissance osseuse, la grossesse et la cicatrisation ainsi que dans des contextes inflammatoires, de greffe tissulaire ou d'ischémie [78]. Les vaisseaux sanguins sont nécessaires pour une croissance tissulaire et une régénération normales mais des anomalies de l'angiogénèses sont associées à diverses maladies. Un développement vasculaire insuffisant conduit à des MCV (infarctus du myocarde), des pathologies ulcéreux et neurodégénératifs, alors qu'une angiogenèse accrue est observée dans des maladies inflammatoires et le cancer [79]. Plus particulièrement pour le cancer, l'angiogenèse représente un besoin fondamental pour la croissance d'une tumeur car celle-ci doit recevoir un apport d'oxygène et de nutriments au fur et à mesure qu'elle se développe [80]. Il a été démontré chez l'homme que jusqu'à 60 % de tumeurs expriment le gène du VEGF-A [81]. En raison de son rôle primordial dans l'angiogenèse, le VEGF-A a été largement étudié et de ce fait associé à diverses maladies telles que celles citées précédemment. Une mise en application intéressante des études sur le VEGF-A dans la

stratégie de lutte contre le cancer est la production d'inhibiteurs du VEGF-A. Cependant, l'absence de réponse de certains types de cancers soulève encore la question du mode d'action du VEGF-A. De plus, des effets indésirables importants ont été observés lors des traitements anti-VEGF et incluent des effets cardiaques sévères tels que l'hypertension, l'ischémie cardiaque, des événements thromboemboliques artériels (p. ex. l'infarctus du myocarde et l'infarctus cérébral) et l'altération de la fonction ventriculaire gauche. Même si les mécanismes sous-jacents aux effets cardiaques indésirables de ces traitements ne sont pas encore bien compris, ces observations renforcent encore plus le lien entre le VEGF-A et les MCV [78].

Les traitements par le VEGF-A ont fait l'objet de plusieurs essais cliniques randomisés, notamment chez les patients souffrant de coronaropathies, mais avec peu de résultats cliniques [82]. Des taux de VEGF-A plus élevés ont été observés chez les patients souffrant de pathologies vasculaires, mais il n'est toujours pas clair si cette sur-régulation du VEGF-A correspond à une adaptation à l'ischémie ou est impliquée dans la survenue de ces maladies [23, 83-89]. De la même manière, le rôle du VEGF-A dans le processus d'athérosclérose est contradictoire. Dans des études *in vitro* et chez l'animal, il a été établi que le VEGF-A favorise la néovascularisation et a un effet proinflammatoire, ce qui conduit à une progression de l'athérosclérose et à l'instabilité de la plaque [90-95]. À l'inverse, les résultats des essais cliniques avec du VEGF-A chez l'homme [82] et des expériences de thérapie génique chez l'animal [96, 97], ne sont pas concluants quant à un effet positif du VEGF-A sur la progression de l'athérosclérose. Il semblerait donc que la relation entre le VEGF-A et les MCV soit complexe, d'une part à cause de la complexité de ces maladies polygéniques et d'autre part en raison des effets pléiotropiques du VEGF-A.

I.2. La composante génétique des maladies cardiovasculaires

La physiopathologie des MCV est donc extrêmement complexe et implique plusieurs facteurs de risque bien documentés, notamment : l'âge, le sexe, l'hypertension, l'hyperlipidémie, les antécédents familiaux, le diabète, dont ou encore méconnus. Ces facteurs n'expliquent qu'une partie seulement de l'incidence des MCV, et d'autres facteurs font intervenir des composantes génétiques très complexes dans des interactions gène-gène et gène- environnement impliquées dans le développement des pathologies multifactorielles en

général et cardiovasculaires en particulier (Figure 5). La physiopathologie cardiovasculaire comporte une grande partie d'héritabilité (Tableau 5).

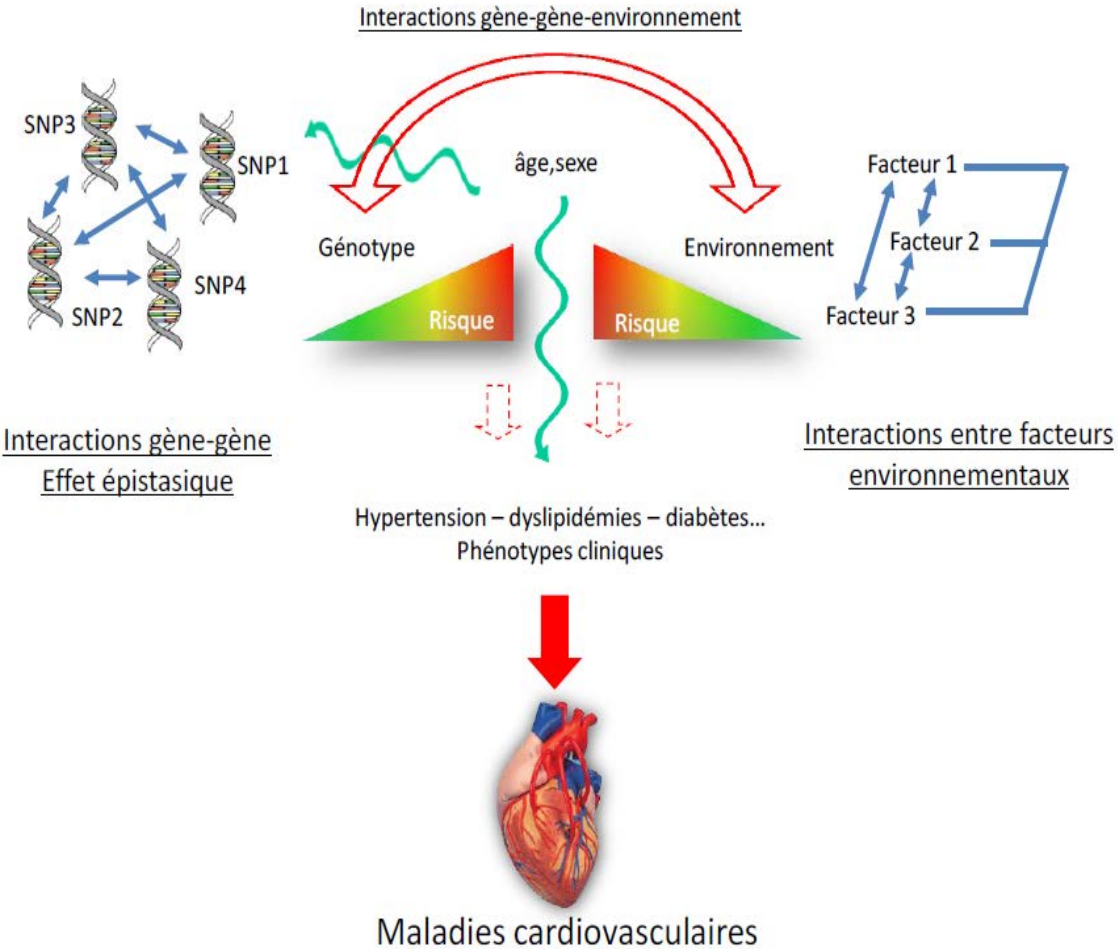


Figure 5 : Modèle d'interactions gène-gène-environnement impliquées dans la physiopathologie des maladies cardiovasculaires

Tableau 5: Estimation de l'héritabilité génétique des accidents vasculaires cérébraux, des affections coronariennes et des principaux facteurs de risque cardiovasculaire.

Traits	Héritabilité	Références
Diabète de type 2 Glycémie Insulinémie	24-85%	Poulsen et al. 1999[98] Hanson et al. 2001[99] McQueen et al. 2003[100] Mills et al. 2004[101] Souren et al. 2007[102]
Syndrome métabolique	38-61%	McQueen et al. 2003[100] Bayoumi et al. 2007[103]
Obésité IMC	31-94%	O'Connell et al. 1988[104] Brown et al. 2003[105] McQueen et al. 2003[100] Mills et al. 2004[101] Souren et al. 2007[102]
Hypertension Pression artérielle	17-49%	Brown et al. 2003[105] McQueen et al. 2003[100] Mills et al. 2004[101]
Cholestérol total	32-75%	O'Connell et al. 1988[104] Heller et al. 1993[106] Mills et al. 2004[101] Souren et al. 2007[102]
Triglycérides	28-72%	Heller et al. 1993[106] McQueen et al. 2003[100] Mills et al. 2004[101]
LDL-cholestérol	43-78%	O'Connell et al. 1988[104] Mills et al. 2004[101] Souren et al. 2007[102]
HDL-cholestérol	42-79%	O'Connell et al. 1988[104] Heller et al. 1993[106] McQueen et al. 2003[100] Mills et al. 2004[101] Souren et al. 2007[102]
Apolipoprotéine B	51-78%	Heller et al. 1993[106]
Homocystéine	0-66%	Reed et al. 1991[107] Berg et al. 1992[108] Cesari et al. 2000[109] Siva et al. 2007[110] Bathum et al. 2007[111] Nilsson et al. 2009[112]
FVII	38-40%	Freeman et al. 2002[113] Vossen et al. 2007[114]
PAI-1	28%	Freeman et al. 2002[113]
Affections coronariennes Athérosclérose	5-84%	Zdravkovic et al. 2002[115] Fischer et al. 2005[116] Wienke et al. 2005[117] Cassidy-Bushrow et al. 2007[118]
Accidents vasculaires cérébraux	17-32%	Bak et al. 2002[119]

Après une vingtaine d'années focalisés sur l'étude de gènes candidats susceptibles d'expliquer l'héritabilité génétique des facteurs de risque cardiovasculaire, depuis 2007, des études

d'association pangénomique ou *genome-wide association studies* (GWAS) utilisent des cartes denses de polymorphismes génétiques ponctuels (SNPs) ou *Single nucleotide polymorphisms* localisés sur l'ensemble du génome humain (sauf le chromosome Y) afin de rechercher des associations entre ces différents variants génétiques et le phénotype étudié. Contrairement à l'approche gène candidat qui cible un ensemble de gènes potentiels, les GWAS investigent une grande partie du génome sans aucun *a priori* sur l'identité des gènes impliqués. Cette approche présente l'avantage de permettre la découverte de nouvelles connaissances sur les SNPs causaux non identifiés auparavant. Le concept des GWAS est basé sur l'idée suivante : 'une maladie commune, des variants génétiques communs', ce qui implique que les maladies complexes communes sont gouvernées par plusieurs SNPs présents chez plus de 1-5% de la population étudiée. Le nombre de SNPs que nous pouvons étudier simultanément grâce à des puces d'ADN a rapidement augmenté ces dernières années et, actuellement, un million de SNPs sont génotypés simultanément dans les GWAS. Ainsi, les GWAS ont permis un grand pas en avant par rapport aux études de liaison génétiques, car elles ont été conduites sur des milliers d'individus ethniquement homogènes, en identifiant des centaines de milliers de SNPs à la fois. Quant aux GWAS, une valeur de P inférieure à 0,05 (seuil habituellement utilisé en statistique) entre un SNP et un trait testé, ne suffit pas pour être considérée comme significative. Celle-ci doit avoir une valeur inférieure au seuil Bonferroni, et donc $P \text{ value} \leq 5 \times 10^{-8}$.

I.3. Les systèmes biologiques, les interactions gène x gène x environnement et les études de fonctionnalité dans les MCV

Avec le séquençage du génome, le défi des sciences biomédicales actuelles est maintenant d'enquêter et de décrire la fonction biologique des gènes individuels, des voies de transmission, et plus généralement, des réseaux biologiques menant à des phénotypes complexes, incluant des maladies humaines communes. L'identification de gènes pour des maladies communes a été largement accélérée ces dernières décennies. Avec l'accès au séquence complet du génome et ce, pour une grande diversité d'espèces, des cartes à large spectre d'haplotype, des technologies capables de dépister des polymorphismes génétiques et une activité génétique sans précédent, ainsi que la disponibilité de cohortes humaines bien caractérisées, l'identification des gènes expliquant un risque non négligeable pour un certain nombre de maladies communes humaines a été réalisable [120]. Des exemples éminents sont

le TCF7L2, une maladie de grande importance dont le gène a comme forme commune le T2D [121, 122]; INSIG2, un gène relatif au gène de l'obésité pouvant potentiellement expliquer les 4% de l'IMC dans la population humaine [123] et l'ALOX5, un gène identifié dans les populations humaines et animales qui prédispose à un certain nombre de traits pouvant induire une maladie dont l'athérosclérose [124], un anévrisme aortique dépendant de l'hyperlipidémie, l'obésité et les phénotypes des os [120]. Bien que les exemples mentionnés représentent seulement un faible taux d'enquêtes effectuées ces dernières années, ils expliquent comment l'exploitation à large spectre, grâce à de nouvelles technologies génétiques et fonctionnelles, tout cela ajouté à une population humaine et animale bien caractérisée, peut nous guider directement vers l'identification d'éléments clefs de la maladie.

Cependant, malgré l'identification d'un grand nombre de gènes prédisposant à des facteurs de risque, les progrès sur la découverte des mécanismes par lesquels ces gènes engendrent la maladie sont plus lents. Même dans les cas où les gènes sont mis en cause comme responsables de la maladie et ce par le biais d'un processus bien connu.

Bien que la physiologie des maladies telles que l'athérosclérose commence à être mieux comprise, l'immensité du réseau des interactions moléculaires à l'intérieur des cellules et des tissus liée à la maladie n'a pas encore été totalement exploitée. Le schéma 2 montre qu'il y a une diversité de réseaux moléculaires fonctionnant dans n'importe quel type de tissu, y compris des réseaux génomique, des réseaux de codage et de non codage des ARN, l'interaction des réseaux concernant les protéines, l'état du réseau des protéines, le signalment des réseaux, et des réseaux de métabolites. En plus, ces réseaux n'agissent pas de façon indépendante à l'intérieur de chaque cellule, mais ils interagissent les uns avec les autres vers une forme complexe. Il existe des réseaux moléculaires géants à l'intérieur et entre lesquels les cellules régulent l'activité des différents tissus, et même toute signalisation entre les tissus. Les variations de l'ADN et de l'environnement mènent à des modifications de ces réseaux moléculaires qui, à leur tour, induisent des procédés physiologiques compliqués qui peuvent se manifester comme une maladie [120].

Il est communément admis que le développement de la plupart des maladies courantes chez l'homme peut être expliqué par des facteurs génétiques et environnementaux, ainsi que les interactions entre ces facteurs [125]. Les interactions gène x environnement (GxE) sont considérées comme des éléments clés contrôlant la physiopathologie cardiovasculaire. L'intégration gène × environnement dans les GWAS pourrait aider à mettre en évidence de

nouveaux loci modifiant le risque cardiovasculaire. Cette stratégie nécessite la mise en place de grands consortiums. Au-delà des difficultés habituelles soulevées par les GWAS, une étude GWAS-GxE doit essentiellement prendre en compte la taille de l'échantillon, l'évaluation et l'hétérogénéité de l'exposition. Ainsi, les GWAS-GxE nécessitent de très larges populations. Bien que difficile, l'étude des interactions GxE nous aiderait à mieux comprendre les résultats d'associations génétiques contradictoires dus à l'exposition hétérogène. L'analyse de ces interactions est limitée lors de la réalisation d'études GWAS [126], par contre des résultats intéressants ont été obtenus par le biais d'études gène-candidat [127-129].

L'épistasie est définie comme une interaction entre deux ou plusieurs loci. Elle est importante, du fait que son existence peut modifier ou même masquer l'effet d'un locus. L'épistasie peut également identifier des gènes non trouvés par l'approche consensuelle à locus unique. Ce concept a été largement revu par les méthodes paramétriques et non paramétriques qui ont été développées au cours de ces dernières années pour détecter ce type d'interactions. Selon la littérature, les interactions épistasiques jouent un rôle dans la prédisposition au cancer et aux maladies auto-immunes. Cependant, leur investigation à l'échelle génomique (*genome-wide coverage*), y compris l'étude de tous les SNPs imaginables, reste un défi crucial en absence de logiciels adaptés et d'une large population.

De plus, malgré que le génome humain contient un ensemble complet des gènes nécessaires à la construction d'un être humain fonctionnel il n'est qu'une source d'information. Pour fonctionner, il doit être exprimé. La transcription d'un gène pour produire l'ARN constitue la première étape de l'expression génique. Le transcriptome est donc l'ensemble des transcrits d'ARN produits par le génome à un moment donné. Contrairement au génome, le transcriptome est extrêmement dynamique. La plupart de nos cellules contient un génome identique quels que soient le type cellulaire, le stade de développement ou les conditions environnementales. Inversement, le transcriptome varie considérablement dans des circonstances différentes en raison de différents modèles d'expression génique. L'étude du transcriptome est donc une manière globale de regarder les profils d'expression génique dans les maladies complexes.

Un SNP peut modifier l'expression d'un ou plusieurs transcrits conduisant au changement d'un phénotype donné. Malgré leurs avantages, les études d'associations SNP-ARNm pourront avoir des résultats discordants, ou même contradictoires. L'approche transcriptomique apporterait une information intermédiaire entre des gènes et leurs protéines,

une étape essentielle pour identifier des cibles physiopathologiques d'intérêt thérapeutique dans les MCVs.

Les cellules mononuclées du sang périphérique (*Peripheral Blood Mononuclear Cells* – PBMCs) sont intéressantes vue grâce à leur accessibilité [130]. De plus, elles interagissent avec l'intégralité des organes via la circulation sanguine. Une interaction qui pourrait fournir un message des organes non accessibles [130].

Les PBMCs sont composées de deux types cellulaires, majoritairement des lymphocytes (97%), et des monocytes (2,5%) et produisent de très nombreuses cytokines pro-inflammatoires. L'ensemble de ces observations, font de ce type cellulaire un modèle intéressant pour l'étude du rôle de l'inflammation dans les MCVs [130].

I.4. La famille des VEGF

I.4.1. La famille des VEGF_{xxx} angiogéniques

Le VEGF a d'abord été identifié par des équipes indépendantes à la fin des années quatre-vingt comme un facteur de croissance ou de la perméabilité des cellules endothéliales [131-137]. Il est principalement impliqué dans l'angiogenèse, la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux pré-existants, dans des situations physiologiques comme la grossesse, la cicatrisation mais aussi dans plusieurs pathologies comme la rétinopathie diabétique, la polyarthrite rhumatoïde, les MCV et le cancer. Le VEGF appartient à une famille de facteurs de croissance de cellules endothéliales vasculaires et lymphatiques qui comprennent VEGF B, C, D et le facteur de croissance placentaire (PlGF) (Tableau 6). Le VEGF exerce son action par la stimulation des récepteurs de la tyrosine kinase du VEGF qui incluent les récepteurs 1 et 2 (VEGFR1 et VEGFR2) et le co-récepteur neuropiline. Celui-ci est dépourvu d'activité enzymatique intrinsèque. La liaison du VEGF à ses récepteurs stimule les voies RAS / RAF / MEK / ERK et PI3 kinase / AKT / mTOR qui sont impliquées dans la prolifération cellulaire et la survie. La voie VEGF / VEGFR a différents niveaux de complexité en raison des différentes isoformes du VEGF qui peuvent être présentes selon le type de cellule et de la situation physiologique / pathologique. L'angiogenèse dépend du VEGF (le VEGF produit par des cellules épithéliales ou des cellules stromales stimulent les cellules endothéliales pour promouvoir l'angiogenèse). Cela génère des boucles autocrines qui induisent une production supplémentaire de VEGF. Enfin, les isoformes d'épissage

spécifiques de VEGF peuvent ralentir l'angiogenèse [138]. Ainsi, à partir d'un seul gène, les différents variants du VEGF jouent un rôle clé dans la régulation de l'équilibre angiogénique.

Tableau 6: Localisation chromosomique, taille majeure d'ARNm et la taille des protéines des membres de la famille du VEGF.

Gènes	Localisation chromosomique	Taille majeure d'ARNm (kb)	La taille des protéines majeures (kDa)
VEGF-A	6p23.1	3.7, 4.5	21
VEGF-B	11q13	1.4	21, 30
VEGF-C	4q34	2.4	20-21
VEGF-D	Xp22.31	2.2	20-21
PlGF	14q24	1.7, 1.2	38, 30

I.4.1.1. Le VEGF-A

Le VEGF-A (également dénommé VEGF) a été identifié par Senger et al., en tant que facteur de perméabilité vasculaire sécrété par les cellules tumorales [133]. Il est le mieux caractérisé et le plus étudié des membres de la famille du VEGF. Il s'agit d'une cytokine avec une importance critique dans l'angiogenèse à la fois normale et associée à une tumeur [139]. Le gène du *VEGF*, qui est situé sur le bras court du chromosome 6, se compose de huit exons et est transcrit de façon différentielle par épissage pour donner quatre isoformes matures (VEGF-A₁₂₁, VEGF-A₁₆₅, VEGF-A₁₈₉ et VEGF-A₂₀₆) (Figure 6) [140]. La désignation numérique des isoformes désigne le nombre d'acides aminés dans la molécule. En outre, certaines isoformes moins fréquemment exprimées ont été identifiées (VEGF-A₁₄₅ et VEGF-A₁₈₃) [141]. Le VEGF-A₁₆₅ est l'isoforme dominante, il est sur-exprimé dans une variété de tumeurs solides. Récemment, il a été montré que le VEGF-A₁₆₅ pouvait être un indicateur biologique important du caractère invasif de récurrence postopératoire du carcinome hépatocellulaire. Le VEGF-A₁₈₉ est considéré comme le plus puissant de la vascularisation dans différents cancers [142]. Le VEGF-A exerce son effet biologique par interaction avec des récepteurs de surface cellulaire. Ces récepteurs sont transmembranaires comprennent le VEGFR-1 (VEGFR-1, Flt-1), un récepteur (récepteur d'insertion de kinase domain containing / Flk-1) et le VEGFR-2, sélectivement exprimé sur des cellules endothéliales vasculaires, et les récepteurs de la neuropiline (NP-1 et NP-2), exprimés sur l'endothélium vasculaire et les neurones. Le VEGF-A est la protéine pro-angiogénique la plus puissante décrite à ce jour. Il

induit la prolifération, la germination et la formation du tube de cellules endothéliales [77]. C'est également un facteur de survie puissant pour les cellules endothéliales et a été associé à une induction de l'expression de protéines anti-apoptotiques dans ces cellules [143, 144]. Le VEGF-A provoque également une induction de la vasodilatation par l'oxyde nitrique synthase endothéliale et donc une augmentation de la production d'oxyde nitrique [145]. De nombreuses cytokines, y compris le facteur de croissance dérivé des plaquettes, le facteur de croissance des fibroblastes, le facteur de croissance épidermique et de facteurs de croissance de transformation induisent l'expression de VEGF-A dans les cellules [146, 147].

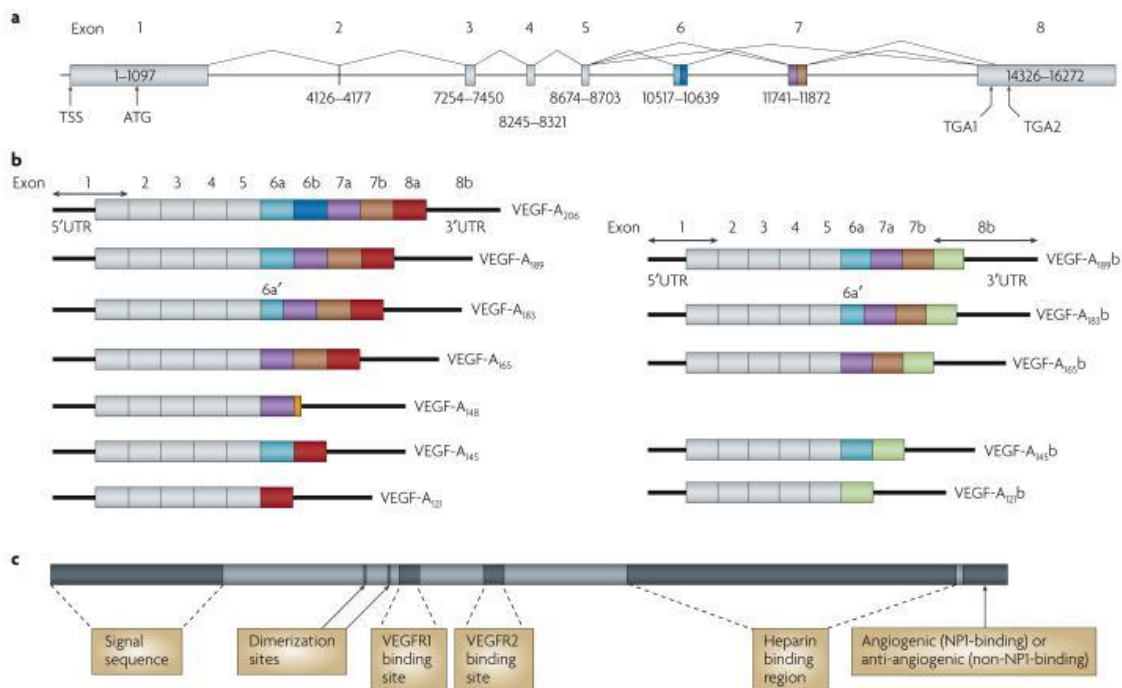


Figure 6 : Structure des principaux variants d'épissage du VEGF-A chez l'homme [147].

1.4.1.2. Le VEGF-B

Le gène VEGF-B humain s'étend sur environ 4000 pb, contient huit exons et six introns, et est situé sur le chromosome 11, bande q13 [148, 149]. Le VEGF-B est à l'origine de deux formes de polypeptides, VEGF-B₁₆₇ et VEGF-B₁₈₆ par l'épissage alternatif. La région du promoteur de VEGF-B contient des différences importantes par rapport à celles de VEGF-A, et ceux-ci sont susceptibles d'expliquer les différences de régulation par des stimuli physiologiques [150]. Le promoteur du VEGF-B contient Egr-1, mais il lui manque les sites inductibles par l'hypoxie du facteur-1 et AP-1 présent dans le promoteur du VEGF-A. En conséquence, l'hypoxie [151], ce qui peut induire l'expression du VEGF-A, ne semble pas

réglementer les niveaux de VEGF-B. À ce jour, les mécanismes moléculaires qui régulent l'expression de VEGF-B ne sont encore pas clairs. VEGF-B se lie à VEGFR-1, mais pas le VEGFR-2 ou le VEGFR-3, et l'activation de ce récepteur induit un signal mitogène pour les cellules endothéliales pauvres qui suggère que le VEGF-B est un mitogène des cellules endothéliales inefficaces [152]. Le VEGF-B₁₆₇ et Le VEGF-B₁₈₆ diffèrent dans la séquence et la longueur de la partie C-terminale de la molécule, les deux isoformes VEGF-B₁₆₇ et VEGF-B₁₈₆ contiennent un acide aminé identique 116 de la région N-terminale de la protéine mature. Cette région N-terminale contenant le domaine de liaison au récepteur du VEGF-B [153], est homologue aux régions correspondantes de VEGF-A et PlGF [154, 155]. Les régions distinctes C-terminales de VEGF-B₁₆₇ et VEGF-B₁₈₆ ont des propriétés différentes qui affectent la répartition de VEGF-B dans le corps. Le VEGF-B₁₆₇ dispose d'un C-terminal de liaison à l'héparine, ainsi il s'associe avec de l'héparine à la surface cellulaire associée comme glycosaminoglycanes qui aident à ancrer cette isoforme dans la matrice extracellulaire [156]. En revanche, la région C-terminale du VEGF-B₁₈₆ ne lie pas l'héparine, elle est donc susceptible de circuler librement [156]. Plusieurs éléments de preuve indiquent que le VEGF-B peut moduler la prolifération cellulaire et la croissance des vaisseaux. Le milieu conditionné provenant des cellules transfectées exprimant le VEGF-B stimule la synthèse d'ADN dans les cellules endothéliales [156]. Les niveaux de VEGF-B augmentent à la fois au cours du développement et après la naissance, en corrélation étroite avec la progression de l'angiogenèse cardiaque [157].

I.4.1.3. Le VEGF-C

Le VEGF-C fait partie du facteur de croissance dérivé des plaquettes, il est un ligand pour le VEGFR-2 et le VEGFR-3 [158]. Le VEGF-C est produit sous forme d'une protéine précurseur, [158, 159]. Le VEGFR-3 sécrète 31/29 kDa de sous-unités de VEGF-C de liaison liées ensemble par des ponts disulfures, mais le facteur est en outre protéolysé dans l'environnement extracellulaire par la plasmine et d'autres protéases pour produire une protéine homodimère lié non disulfure de 21 kDa avec une forte affinité à la fois pour VEGFR-2 et VEGFR-3. La forme mature de VEGF-C induit la mitogenèse, la migration et le survie des cellules endothéliales [160]. Au cours du développement, le VEGF-C est exprimé avec son récepteur VEGFR-3 principalement dans les régions où les vaisseaux lymphatiques se développent [161, 162]. Le VEGF-C est également chimiotactique pour les macrophages,

et son récepteur VEGFR-3 est exprimé par une fraction de monocytes de sang périphérique et les macrophages tissulaires activés [160, 163]. L'expression diminue ensuite dans la plupart des tissus, mais reste élevée dans les ganglions lymphatiques [164]. La transcription de l'ARNm du VEGF-C a été induite en cellules endothéliales en réponse à des cytokines pro-inflammatoires (interleukine-1beta). La régulation de la transcription de l'ARNm du VEGF-C par ces cytokines indique que le VEGF-C pourrait réguler la fonction des vaisseaux lymphatiques pendant une inflammation, ce qui reflète le rôle du système vasculaire lymphatique dans le contrôle de la fonction immunitaire et le trafic des leucocytes. Le promoteur du gène VEGF-C a été trouvé pour contenir des sites putatifs de liaison de NF-kB [165]. La présence de sites NF-kB dans le gène VEGF-C indique que NF-kB peut être impliquée dans l'induction de l'ARNm du VEGF-C du facteur de nécrose tumorale- α et de l'interleukine [166].

I.4.1.4. Le VEGF-D

Le VEGF-D humain est traité dans son extrémité N-terminale et C-terminale. La forme mature se lie et active le VEGFR-2 et le VEGFR-3, elle est mitogène pour les cellules endothéliales et angiogéniques ainsi que lymphangiogénique in vivo [167]. Le VEGF-D est étroitement lié au VEGF-C en raison de la présence unique d'extensions N- et C-terminales que d'autres membres de la famille du VEGF. VEGFD stimule la croissance de cellules endothéliales vasculaires et lymphatiques par la signalisation par les récepteurs de la tyrosine kinase KDR (VEGFR-2) et Flt-4 (VEGFR-3) [168]. Il a été récemment montré que le développement vasculaire entraîné par hypoxie nécessite l'activité de VEGF-D. VEGF-D est présent dans la plupart des tissus humains, le plus abondamment dans les poumons et la peau au cours de l'embryogenèse. Le VEGF-D est exprimé par de nombreux types de tumeurs et il a son rôle dans l'angiogenèse tumorale et la lymphangiogenèse dans le mélanome [169], le cancer du pancréas, de l'œsophage carcinome à cellules squameuses, le cancer du sein et les cancers du poumon a été proposé [170].

I.4.1.5. Le VEGF-E

Le VEGF-E est un autre membre de la famille des VEGF. C'est le moins étudié des facteurs. Le membre VEGF-E montrent 20% à 25% d'identité d'acides aminés avec le VEGF-A. Une nouvelle isoforme de VEGF-E est le VEGF-ENZ-7 qui est codée par le génome du virus Orf [171]. Le VEGF-E se lie spécifiquement à haute affinité et active le VEGFR-2 qui entraîne l'autophosphorylation du récepteur et de l'élévation de la concentration de Ca^{2+} libre intracellulaire. Le VEGF-E est un facteur angiogénique puissant et certaines données indiquent fortement que l'activation du VEGFR-2 seul ne peut pas efficacement stimuler l'angiogenèse [172]. Deux autres membres de la famille du VEGF-E: VEGF-E-ENZ-2 et VEGF-ED1701 ont également été isolés, à la fois avec essentiellement la même activité que celle de VEGF-ENZ-7. Une caractéristique importante du VEGF-ENZ-7 est sa très forte affinité pour le VEGFR-2, malgré une faible homologie d'acides aminés avec VEGF-A. Kiba et al. ont trouvé que la coopération entre la boucle-1 et la boucle-3 du VEGF-E ou du VEGF-A est importante pour la structure tertiaire appropriée nécessaire pour la liaison à VEGFR-2 [173].

I.4.1.6. Le facteur de croissance placentaire (PlGF).

Le PlGF a été découvert dans le placenta. Le PlGF est exprimé dans le placenta, le cœur et les poumons. Les homodimères PlGF se lient au VEGFR-1 et au NP-1, tandis que l'hétérodimérisation de PlGF avec le VEGF-A peut également se produire. L'activation de VEGFR-1, soit par PlGF soit par VEGF-A induisent différents profils d'expression génique et la phosphorylation de résidus de tyrosine distinctes dans le domaine tyrosine kinase de VEGFR-1 [174], tandis que l'administration combinée de ces facteurs améliore l'angiogenèse conduite par le VEGF. Quatre isoformes humaines de PlGF (PlGF-1, -2, -3 et -4) ont été rapportés jusqu'ici, et ils diffèrent en taille et en affinité de liaison. Seulement PlGF-2 se lie aux protéoglycanes héparane sulfate [175]. La perte de PlGF affecte l'angiogenèse, la croissance durant l'ischémie, la cicatrisation des plaies, l'inflammation et le cancer [176]. L'augmentation de PlGF a été trouvée dans plusieurs conditions associée à l'angiogenèse pathologique. La surexpression de PlGF dans la peau de souris transgéniques aboutit à une

augmentation significative du nombre et la taille des vaisseaux sanguins de la peau ainsi que dans une meilleure perméabilité vasculaire [177, 178]. Inversement, la carence en PlGF a entraîné une diminution de la réponse inflammatoire et abrégée, avec une réduction de l'angiogenèse inflammatoire et la formation d'œdème [177, 178].

I.4.2. Les récepteurs du VEGF

I.4.2.1. Le VEGFR-1

Le VEGFR1, également appelé FLT-1 (fms-like tyrosyl kinase-1) se lie au VEGF, au PlGF, et au VEGF-B (Figure 7) [179, 180]. Il a un poids moléculaire d'environ 210 kDa et a des fonctions variables qui dépendent du stade de développement et de l'emplacement des cellules endothéliales qui produisent le récepteur [181]. Peters et al. ont utilisé l'hybridation in situ pour montrer que, chez la souris adulte, le VEGFR1 est exprimé dans les cellules endothéliales [182]. En outre, le VEGFR1 est exprimé dans les populations de cellules embryonnaires. Le VEGFR1 a une plus grande affinité pour le VEGF à VEGFR2 (≈ 10 pM par rapport 75-750 pM) [180, 181, 183]. Contrairement au VEGFR2, le VEGFR1 a une faible activité tyrosine kinase phosphorylation après la stimulation par le VEGF. L'activation du VEGFR1 n'a pas d'effets prolifératifs ou du cytosquelette direct [180]. Cependant, l'activation du VEGFR1 est impliquée dans l'expression accrue de l'urokinase de type d'activateur de plasminogène et l'inhibiteur-1 d'activateur du plasminogène dans les cellules endothéliales [156]. Ces molécules jouent un rôle dans la dégradation de la matrice extracellulaire et la migration cellulaire. En outre, le VEGFR1 joue un rôle dans le chimiotactisme des monocytes [184]. Le gène VEGFR1 humain, qui contient 30 exons, est situé sur le chromosome 13q12. L'épissage alternatif de l'ARNm pré-VEGFR1 produit une isoforme du récepteur soluble (sVEGFR1) qui peut se lier à et inhiber l'action du VEGF [185]. Après que le peptide signal soit clivé, le sVEGFR1 contient 661 acides aminés correspondant aux six des sept premiers domaines extracellulaires d'immunoglobulines.

I.4.2.2. Le VEGFR2

Le VEGFR2 est plus connu sous le nom de KDR (pour kinase insert domain receptor), et il est appelé FLK1 (pour fetal liver kinase 1). Chez l'homme, le gène *kdr* est situé sur le chromosome 4 (4q11-q12). Il se lie à des formes de poids moléculaire plus bas que le VEGF (de 110 à 165 résidus d'acides aminés), au VEGF-E, et aux formes entièrement transformées de VEGF-C et VEGF-D. le VEGFR2, qui a un poids moléculaire d'environ 210 kDa [180]. Il est le médiateur prédominant du VEGF qui stimule la migration des cellules endothéliales, la prolifération, la survie et une meilleure perméabilité vasculaire [186, 187]. Bien que le VEGFR2 ait une plus faible affinité pour le VEGF que pour le VEGFR1, le VEGFR2 présente une activité de protéine tyrosine kinase robuste en réponse à ses ligands. Takahashi et al. ont démontré que Tyr1175 et Tyr1214 sont les deux principaux sites de phosphorylation du VEGFR2 [187]. D'autres sites d'autophosphorylation de la tyrosine comprennent les résidus 951, 1054, et 1059 [188-190].

I.4.2.3. Le VEGFR3

Le VEGFR3, également appelé FLT4 (pour *fms*-related tyrosine kinase 4), est codé par le gène *flt4* porté par le chromosome 5 (5q35.3). Le VEGFR3, qui a un poids moléculaire d'environ 170 kDa, est le troisième membre de cette famille de récepteurs [191, 192]. Le VEGFR3 joue un rôle clé dans le remodelage du plexus capillaire primaire dans l'embryon et contribue à l'angiogenèse et la lymphangiogenèse chez l'adulte. Ce récepteur se produit dans les cellules endothéliales vasculaires embryonnaires où sa production diminue au cours du développement, elle est ensuite limitée aux vaisseaux lymphatiques après leur formation [193]. L'inactivation des mutations dans la boucle catalytique du domaine kinase de VEGFR3 plomb à lymphœdème héréditaire humaine (maladie de Milroy) est caractérisée par un gonflement chronique et défigurant des extrémités en raison de vaisseaux lymphatiques cutanées défectueux. Le VEGFR3 est le seul récepteur du VEGF pour lesquelles des mutations naturelles ont été trouvées [194]. Le VEGFR3 est soumis à un clivage protéolytique dans le sixième domaine d'immunoglobuline; les deux composantes de la chaîne d'origine restent liées par un pont disulfure [191]. L'hypoxie augmente l'expression du VEGFR3 dans la différenciation des cellules souches embryonnaires en culture [194].

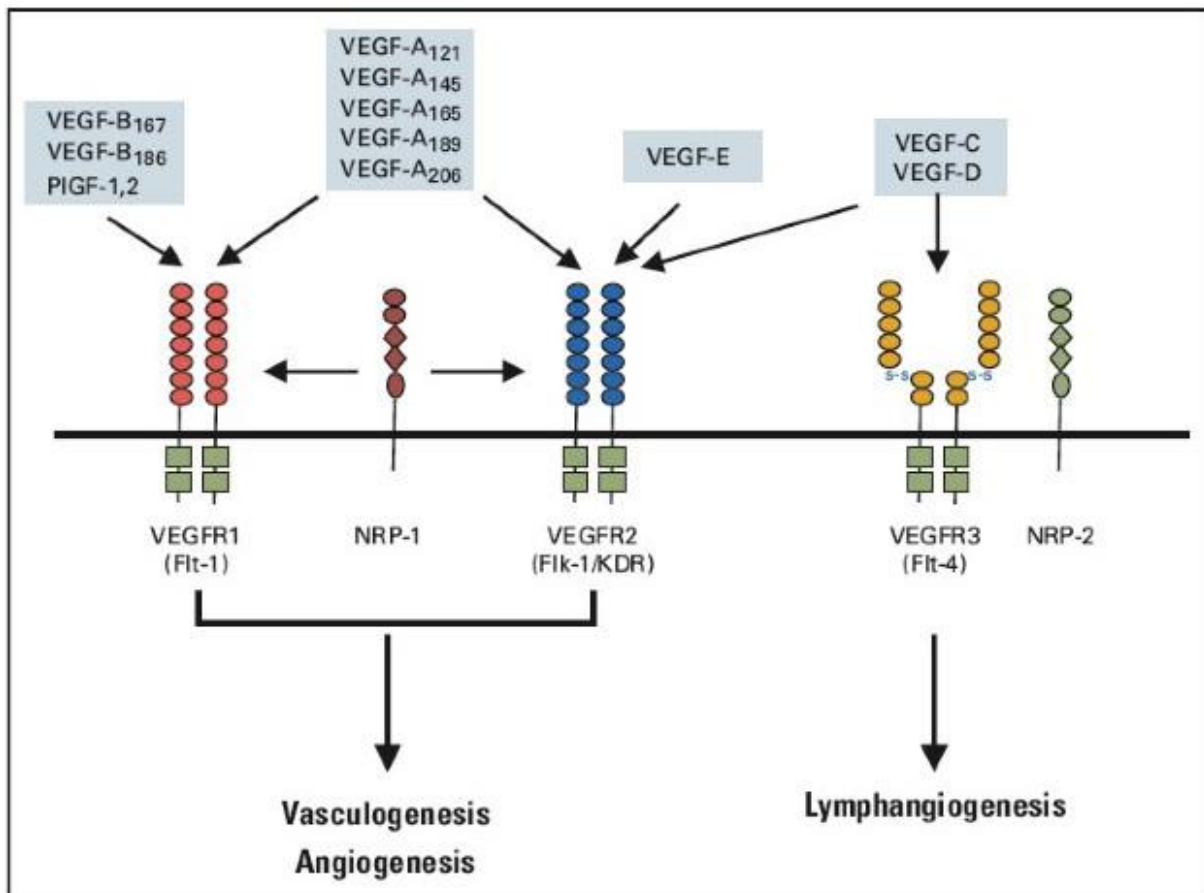


Figure 7 : La famille du VEGF et ses récepteurs.

I.4.3. La famille des VEGF_{xxx}b

I.4.3.1. La découverte et l'expression dans des conditions physiologiques normales

Le niveau de complexité de la biologie du VEGF-A a été renforcé par la découverte d'un nouveau variant du VEGF-A, dans lequel les deux sous-exons 8a et 8b ont été épissés alternativement (Figure 8) [195]. Ces nouvelles isoformes ont été nommés VEGF_{xxx}b (XXX est le nombre d'acides aminés présents dans les protéines, tel que décrit ci-dessus, le VEGF-A₁₆₅ étant la plus représentée). Actuellement, la forme VEGF-A_{165b} et ses propriétés ont été étudiées en particulier. Cependant, en théorie, toutes les isoformes de l'ARNm du VEGF pro-angiogéniques pourraient avoir un exon alternatif 8b dans leur extrémité 3', mais à ce jour seules les isoformes VEGF-A_{121b}, VEGF-A_{165b}, VEGF-A_{145b}, et VEGF-A_{189b} ont été décrites comme ayant cette addition [196]. Cet événement d'épissage modifie la partie C-terminale de la protéine VEGF de CDKPRR (VEGF_{xxx}) à SLTRKD (VEGF_{xxx}b). La cystéine 160 dans

la partie C-terminale forme une liaison disulfure avec la cystéine 146 de l'exon 7. Ainsi la perte dans l'isoforme VEGF_{xxx}b modifie la structure tertiaire de la protéine [197]. La modification de la charge globale (RR chargée positivement par rapport à neutre KD) et la présence d'un résidu d'arginine à la place d'une proline participe à la structure générale de ce domaine C-terminal.

Lorsque l'on considère la présence de ces nouvelles isoformes du VEGF-A, de nombreuses publications doivent être considérées avec prudence et de nouvelles études chez l'homme devraient aborder le rôle du VEGF et du VEGF_{xxx}b en parallèle. Les anticorps spécifiques dirigés contre ces dernières isoformes sont des outils précieux pour de telles études [198]. Dans la plupart des tissus normaux non angiogéniques, le VEGF_{xxx}b constitue 50% ou plus du VEGF total exprimé alors que dans les tissus non angiogéniques le VEGF_{xxx}b représente une faible proportion [80, 199]. Dans les cellules non cancéreuses primaires, les isoformes du VEGF_{xxx}b sont également exprimées de manière significative [198, 200]. Lorsque l'on considère cette observation frappante, Les isoformes du VEGF_{xxx}b ont été suggérées comme étant anti-angiogénique. Un argument fort en faveur de cette hypothèse est venu d'un modèle de souris transgénique exprimant VEGF-A_{165b} dans la glande mammaire. La surexpression de ces formes a considérablement diminué le développement des vaisseaux sanguins, la couverture alvéolaire l'altération du coussinet adipeux, et la production de lait significativement réduite [201].

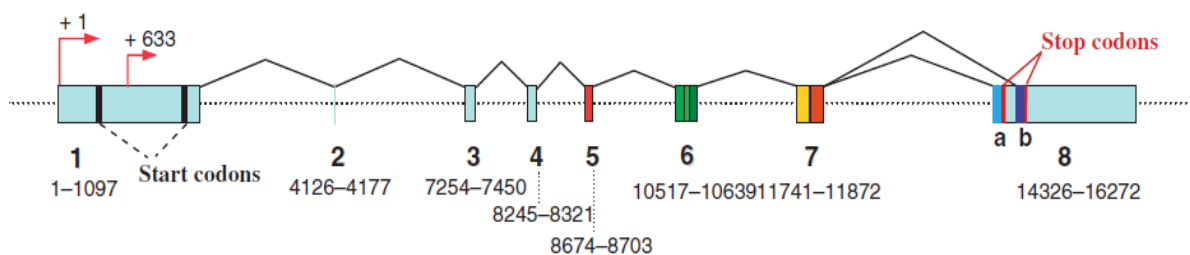


Figure 8 : Représentation du gène du VEGF et les deux sous-exons 8a et 8b [195].

I.4.3.2. Le VEGF_{xxx}b dans des conditions pathologiques: la régulation ou la surexpression

Selon Bates et al., les isoformes du VEGF_{xxx}b ont été identifiées grâce au hasard dans le rein où elles ont montré une régulation négative dans le tissu tumoral par rapport à la contrepartie normale (Figure 9) [195]. Une telle régulation à la baisse a été confirmée dans

différents types de cancer, y compris la prostate et les cancers du côlon, et le mélanome [202, 203].

Les isoformes du VEGF_{xxx}b sont également l'objet d'une régulation négative dans les pathologies avec l'angiogenèse exacerbée, y compris la rétinopathie diabétique, la pré-éclampsie [204, 205] et le syndrome de Denys-Drash [206]. Dans le syndrome de Denys-Drash le VEGF-A_{165b} est réduit en raison d'un manque de WT1 à médiation de la répression transcriptionnelle du facteur d'épissage Kinase (SRPK1) [207]. En revanche, le VEGF_{xxx}b a un rôle de la régulation négative dans des conditions de conduite avec facultés angiogenèse, y compris un modèle de rat du glaucome [208] et chez les patients atteints de sclérose systémique [209]. L'expression du VEGF_{xxx}b a été régulée à la baisse après stimulation des cellules épithéliales de la rétine ou de rein primaires avec le facteur de croissance insulinique, le PDGF, il est facteur de nécrose tumorale-alpha et a une régulation négative après stimulation par le facteur de croissance transformant bêta. Une telle régulation est médiée par modulation de l'activité des facteurs d'épissage ASF / SF2, SRp40 et SRp55 par les kinases SRPK, CLK et p38 MAP kinase [200].

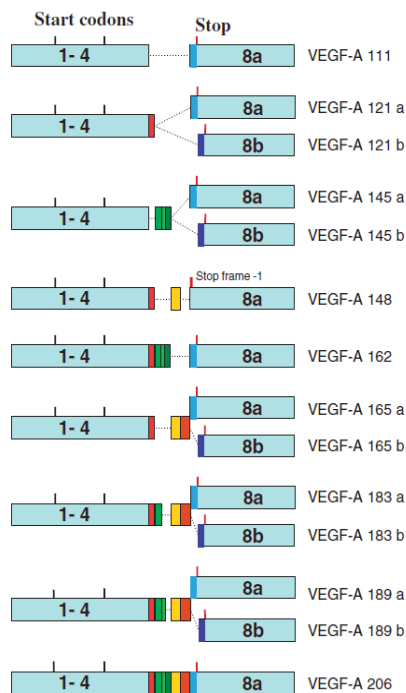


Figure 9 : Représentation les isoformes du VEGF_{xxx} et VEGF_{xxx}b par les deux sous-exons 8a et 8b [195]

I.4.3.3. Le mécanisme d'action du VEGFxxx_b

Le VEGF_{165b} peut déplacer le 125I-VEGF₁₆₅ pour se lier aux cellules HUVEC avec la même affinité que le VEGF-A₁₆₅ [203]. Par conséquent, le VEGF-A_{165b} peut être considéré comme un inhibiteur compétitif de VEGF-A₁₆₅. Le VEGF-A_{165b} se lie au VEGFR1 et au VEGFR2, mais pas au co-récepteur du VEGFR2 NP-1 [210]. Cependant, le VEGF-A_{165b} est considérablement moins efficace que le VEGF-A₁₆₅ pour induire la phosphorylation du site régulateur positif Y1052, ce qui est essentiel pour VEGFR2 dépendant de l'angiogénèse [211]. La capacité inférieure du VEGF-A_{165b} à induire la phosphorylation de VEGFR2 Y1052 est due à son incapacité à induire la rotation optimale du domaine intracellulaire du récepteur. Par conséquent, l'autophosphorylation du récepteur suivant sa dimérisation de liaison à un ligand est considérablement réduite [212]. Y1052 réduit la phosphorylation et induit une inactivation rapide des domaines de kinase du récepteur d'où une faible activation du RAS / RAF / MEK / ERK et PI3 kinase / AKT / mTOR voies de signalisation. Malgré le rôle de VEGF-A_{165b} comme un antagoniste de VEGF-A₁₆₅, il a été montré que VEGF-A_{165b} et VEGF-A_{121b} peuvent stimuler la prolifération des cellules endothéliales et l'activation d'ERK ultérieure, même s'il était moins puissant que celle induite par le VEGF-A₁₆₅. Ainsi les formes VEGFxxx_b ne sont pas anti-angiogéniques mais faiblement angiogénique du VEGF [213].

I.4.4. Régulation de l'expression du VEGF-A

La présence du VEGF-A peut être mise en valeur par des facteurs environnementaux tels que l'hypoxie, l'acidose, le stress oxydatif et la production irrégulière de plusieurs facteurs de croissance, la cytokine tels que la croissance du facteur de l'insuline, le facteur-1, le facteur de croissance des hépatocytes, le facteur de croissance fibroblastique, la croissance épidermique, le facteur de croissance vasculaire endothélial, le facteur de croissance des plaquettes sanguines [214]. Beaucoup d'autres stimuli peuvent moduler la présence du VEGF-A, y compris des chélation ferriques, un dysfonctionnement en glucose, les prostaglandines, un sérum contre la famine, des rayonnements ionisants et des rayons ultraviolets. Il devrait être mentionné que le VEGF-A induit par ces signaux peut agir non pas comme un facteur angiogénique mais plutôt comme un élément de survie pour des vaisseaux préexistant et des cellules endothéliales [214].

I.4.4.1. Par l'hypoxie

En réponse à l'hypoxie (diminution de la pO_2), les eucaryotes supérieurs ont développé des mécanismes coordonnés, tant au niveau de transcription et de traduction, pour faire face à ce stress. La transcription de gènes contrôlant la glycolyse, le transport du glucose, la survie et la mort cellulaire, l'angiogenèse et l'érythropoïèse, sont activées par le facteur hypoxia-inducible factor (HIF) pour faciliter la survie des cellules et restaurer l'homéostasie de l' O_2 [215]. Fait intéressant, l'hypoxie, via l'activation de HIF-1, est un acteur majeur de l'expression de VEGF-A, donc des gradients VEGF-A, reflétant les besoins nutritionnels des cellules, d'attirer et de guider des néo-vaisseaux aux zones les plus dépourvues d'oxygène dans les tissus. Forsythe et al. [216] ont été les premiers à identifier un élément de réponse à l'hypoxie fonctionnelle (HRE hypoxia response element). Dans la région flanquante 5', deux le promoteur du VEGF-A humain, où plus tard l'hétérodimère HIF-1 α / HIF-1 ont été trouvés. Cependant, une région supplémentaire, en amont du site de liaison de HIF, est essentielle à la médiation d'une activation de la transcription complète en réponse à l'hypoxie dans les cellules glioblastomes. Toutes les conditions connues pour activer HIF-1 auront un impact sur l'expression de VEGF-A. L'hypoxie active HIF-1 par la stabilisation de la sous-unité limitante, HIF-1 α . Cette action est déclenchée par l'inhibition de HIF prolyl-4 hydroxylase 2 ou PHD2 [217], l'enzyme clé impliquée dans l'instabilité de HIF-1 α . En outre, ces stimulus majeurs, une variété de facteurs de croissance et des cytokines, y compris l'EGF, l'héréguline, le FGF2, l'insuline, IGF-1 et 2 et l'IL-1 augmentent les niveaux de protéine HIF-1 et induit des gènes de HIF-1 dépendante dans des conditions non hypoxiques [218].

I.4.4.2. Les cytokines

Le facteur de nécrose tumorale-alpha (TNF- α) est une cytokine inflammatoire avec un large spectre d'activité biologique, y compris l'angiogenèse. Elle influe sur la formation de nouveaux vaisseaux indirectement plutôt que directement par la promotion de la pousse des cellules endothéliales et de leur croissance. La libération de molécules angiogéniques (par exemple, le bFGF, le PAF, le VEGF-A, et VEGF-C), et la régulation positive des systèmes protéolytiques (par exemple, uPA) sont apparemment des événements biologiques déclenchés par le TNF- α . En outre, il a été démontré que le TNF- α augmente également la transcription du gène VEGFR-2 dans les cellules endothéliales vasculaires et il a été postulé que la régulation positive de transcription Sp-1 par le TNF- α entraîne une augmentation de la liaison

de ce facteur à l'Sp -1 site de liaison de la région de promoteur VEGFR-2. Cela expliquerait l'augmentation de l'expression de VEGFR-2. TNF- α augmente probablement la transcription de la neuropiline-1. L'expression augmentée de la neuropiline-1 et VEGFR-2, après la stimulation du TNF- α , représente la migration accrue des cellules endothéliales et la stimulation de la cicatrisation des plaies par le VEGF-A₁₆₅ [151, 219].

I.4.5. Les cellules et les tissus sécrétant le VEGF-A

Le VEGF-A est sécrété dans des conditions normales par les cellules endothéliales, les plaquettes et les cellules musculaires lisses, macrophages, monocytes, les cellules épithéliales pulmonaires, les cellules épithéliales de rein (podocytes), les cellules folliculaires de l'hypophyse, les cellules du corps jaune, les cellules souches adipeuses, les cellules de stroma adipeuses. Il est aussi sécrété dans des conditions anormales par toutes les cellules mentionnées et l'épilon des adipocytes, les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien, les cellules synoviales et par plusieurs cellules tumorales in vivo et in vitro. La régulation des niveaux du VEGF-A a été observée prenant place à des niveaux transcriptionnels, translationnels, et à des niveaux de post-traduction. La régulation transcriptionnelle du VEGF-A a été étudiée de façon intensive, à cause des effets des facteurs génétiques et épigénétiques du VEGF-A, induits par la régulation de la transcription du gène. L'ARNm du VEGF-A est exprimé dans plusieurs tissus humains normaux y compris les poumons, le rein, le foie, le mucus gastrique et à un niveau plus faible dans les tissus mammaires [220]. Plusieurs preuves indiquent que les cellules mononuclées du sang périphérique humain, les macrophages circulants, les macrophages tissulaires (le macrophage péritonéal), les monocytes, les fibroblastes CCD 18, les mastocytes et les adipocytes expriment le gène du *VEGF-A* également [220].

I.4.6. Mécanismes moléculaires du VEGF-A et de ses isoformes dans l'angiogenèse

I.4.6.1. Rôle du VEGF-A dans l'angiogenèse

I.4.6.1.1. Dans l'angiogenèse physiologique

I.4.6.1.1.1. Dans le développement embryonnaire

Deux études indépendantes [221, 222] ont généré une preuve directe pour le rôle joué par le VEGF-A dans la vasculogenèse embryonnaire et l'angiogenèse. L'inactivation d'un seul allèle de VEGF-A chez la souris conduit à une létalité embryonnaire entre 11 et 12 jours. Les embryons hétérozygotes présentent des anomalies diverses du développement (Figure 10), associées à des défauts de vascularisation et une forte réduction du nombre de globules rouges. Des défauts importants dans le système vasculaire d'autres tissus et organes, y compris le placenta et le système nerveux, ont été observés.

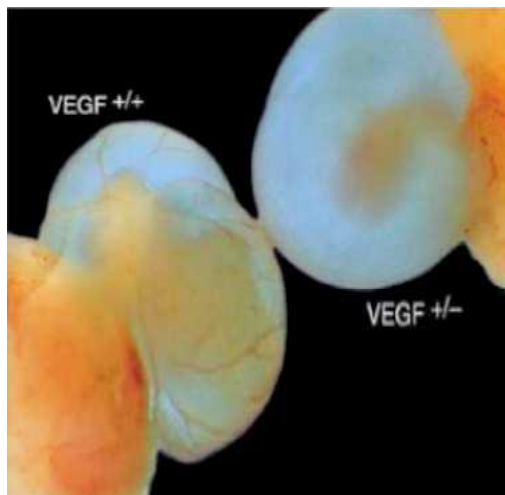


Figure 10. Sac vitellin chez des embryons de souris E10,5 VEGF+/+ ou VEGF +/- (49).

Il n'existe pas de réseau vasculaire apparent chez les embryons hétérozygotes, non viables.

I.4.6.1.1.2. Chez l'adulte

D'un point de vue physiologique, pendant la grossesse, le VEGF-A est impliqué dans la construction du placenta. Cela vaut la peine de mentionner son rôle en réponse à l'ovulation. De même, il a un rôle dominant dans le processus de fracture des os. Brièvement, nous discuterons ici du rôle du VEGF-A dans le procédé de guérison des blessures comme une des

activités physiologiques tout comme les aspects cliniques importants du VEGF-A et sa contribution dans les MCV.

Il a un rôle dominant dans le processus de guérison des plaies qui commence immédiatement après la blessure et est constitué de trois phases: l'inflammation, la prolifération, et la maturation. Ces phases agissent avec une interaction compliquée mais bien organisée entre les différents tissus et les cellules. La blessure peut détruire les vaisseaux sanguins et créer un environnement hypoxique à cause d'une mauvaise perfusion, et cependant fournir un environnement approprié pour le facteur de stabilisation de l'hypoxie. Pendant la première étape de la blessure, l'hypoxie induit mène à une rapide infiltration des cellules inflammatoires y compris les neutrophiles, les mastocytes, les lymphocytes, et les macrophages. La formation du tissu de granulation, qui est nécessairement la dernière phase de la guérison de la blessure, commence lorsque la blessure date d'environ quatre jours. De nombreux nouveaux capillaires dotent le nouveau stroma d'une apparence granuleuse. Les macrophages, les fibroblastes, et les cellules endothéliales se déplacent dans l'espace de la blessure en même temps. Les macrophages non seulement n'augmentent pas les réponses inflammatoires mais également sécrètent le VEGF-A, finalement promouvant l'angiogenèse [223].

I.4.6.1.2. Rôle du VEGF-A dans l'angiogenèse pathologique

Il y a des preuves considérables que le VEGF-A est un facteur majeur de l'angiogenèse tumorale. Il existe un vaste ensemble de données démontrant que l'inhibition de l'activité du VEGF-A bloque la croissance d'une grande variété de lignées de cellules tumorales dans des modèles murins [224-226]. Le VEGF-A est impliqué dans de nombreuses maladies inflammatoires, dans les rétinopathies, et dans le cancer du fait de sa capacité à stimuler la néo vascularisation.

Le VEGF-A régule les multiples réactions de stress cellulaire, y compris la survie, la prolifération, la migration et la différenciation. Plusieurs études ont montré que le VEGF-A pourrait faciliter la régénération des cardiomyocytes et les protéger contre l'apoptose liée à l'activation de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI-3K) et à la régulation de l'expression de Bcl-2 [227]. Récemment, Izumiya et al. ont démontré que la séquestration de VEGF-A endogène altère l'hypertrophie cardiaque adaptative en réduisant nettement la densité capillaire, augmente la fibrose myocardique et régule l'expression du gène du collagène [228]. En outre, Zisa et al. ont démontré que l'injection intramusculaire de VEGF-A humain

recombinant stimule la régénération des cardiomyocytes, la production de facteurs de croissance, et la mobilisation de cellules progénitrices, aboutissant à une atténuation de la progression de la maladie et à une réparation robuste du cœur défaillant [229].

I.4.6.2. Rôles des isoformes du VEGF-A dans l'angiogenèse

Le VEGF-A est un paradigme de la régulation des gènes. La diversité de ses isoformes démontre que les mécanismes d'épissage sont à l'origine d'une variété de fonctions, selon le type de cellules, les tissus, les organes et les conditions physiologiques et pathologiques. Le rôle des différentes isoformes de VEGF-A a été étudié dans différentes situations physiologiques et pathologiques. Toutefois, ces résultats doivent être interprétés avec prudence, car la présence d'isoformes spécifiques a été étudiée par analyse par RT-PCR spécifique utilisant des amorces spécifiques. Par conséquent, on ne sait pas vraiment si la présence de l'ARN est strictement en corrélation avec la présence de la protéine correspondante.

I.4.6.2.1. Dans l'angiogenèse physiologique

I.4.6.2.1.1. Le VEGF-A₁₂₁

Le VEGF-A₁₂₁ est abondant dans les reins, les poumons et le ligament croisé antérieur [230, 231]. C'est un facteur de croissance puissant pour les cellules endothéliales vasculaires. Il favorise la perméabilité vasculaire et l'angiogenèse [232]. Environ 50% des souris exprimant exclusivement l'isoforme VEGF-A₁₂₀ (équivalent au VEGF-A₁₂₁ humain) meurent juste après la naissance ou après quelques jours de l'angiogenèse myocardique avec facultés affaiblies et cardiomyopathie ischémique. Chez la souris le VEGF-A_{120 / 120} présente aussi un défaut dans l'angiogenèse au cours de l'embryogenèse [233] et une excroissance vasculaire rétinienne anormale [234].

I.4.6.2.1.2. Le VEGF-A₁₄₅

Le VEGF-A₁₄₅ se distingue par la présence d'un peptide de 21 acides aminés codée par l'exon 6. Ces acides aminés comprennent un deuxième site indépendant de fixation de

l'héparine et également des éléments qui permettent la liaison du VEGF-A₁₄₅ à la matrice extracellulaire. Il induit la prolifération des cellules endothéliales dans l'angiogenèse [235]. Bien que l'activité biologique de VEGF-A₁₄₅ reste encore mal connue, des niveaux significatifs de cette isoforme ont été signalés dans les tissus liés à l'appareil reproducteur féminin et masculin. Des niveaux élevés de VEGF-A₁₄₅ ont été décrits dans le placenta humain [236].

I.4.6.2.1.3. Le VEGF-A₁₆₅

Le VEGF-A₁₆₅ induit l'angiogenèse et la perméabilité vasculaire dans différents modèles *in vivo* (des dosages de matrigel, la poche cornéenne de l'oeil, la membrane chorio-allantoïde de poussin). Différents processus physiologiques dépendent aussi du VEGF-A₁₆₅ y compris l'implantation embryonnaire [237], le cycle reproducteur féminin [237, 238], la cicatrisation des plaies et la réparation des tissus. En outre, il joue un rôle essentiel en tant que facteur de croissance ou de survie sur les cellules non endothéliales, y compris les lymphocytes et les cellules hématopoïétiques, les cellules pigmentaires de la rétine, les neurones et les cellules de Schwann, et les podocytes [239]. Les souris n'exprimant que le VEGF-A₁₆₄ sont normales, alors que l'inactivation de cette isoforme cause une létalité embryonnaire avec les principaux défauts de vascularisation dans de nombreux organes [76, 240]. Il est évident que les différentes isoformes d'épissage du VEGF-A ne démontrent pas la même fonction.

I.4.6.2.1.4. Le VEGF-A₁₈₉

Le VEGF-A₁₈₉ est également fortement exprimé dans le tissu vasculaire et cardiaque, bien qu'à un degré moindre que le VEGF-A₁₆₅ et le VEGF-A₁₂₁ [241]. Le VEGF-A₁₈₉ peut jouer un rôle important lors des phases d'angiogénique inférieure. Son effet sur la prolifération cellulaire endothéliale semble être spécifique des cellules. Il supporte l'adhésion cellulaire et la survie par l'intermédiaire d'alpha (v) beta3 intégrine [242]. Les souris n'exprimant que le VEGF-A₁₈₈ affichent une excroissance veinulaire normale mais un développement artériel altéré dans les rétines, un nanisme, un développement perturbé des plaques de croissance et des centres d'ossification secondaires, et une dysplasie articulaire du genou. VEGF-A₁₈₉ est préférentiellement exprimé dans des conditions de tension accrue cellulaire induite par

l'étirement, où il est pensé pour jouer un rôle dans la vascularisation lors de la réparation de l'os [242].

I.4.6.2.2. Dans l'angiogenèse pathologique

L'angiogenèse anormale est une caractéristique commune du psoriasis, de la polyarthrite rhumatoïde, de la rétinopathie diabétique et le cancer. Les différentes isoformes du VEGF-A jouent un rôle central dans ces pathologies [243].

I.4.6.2.2.1. Le VEGF-A₁₂₁

Le VEGF-A₁₂₁ s'est révélé être l'isoforme la plus tumorigène dans des modèles expérimentaux de cancers du sein [244]. Son expression est élevée par rapport au VEGF-A₁₆₅ dans les cancers du côlon et de la prostate maligne et elle est en corrélation avec l'angiogenèse augmenté. Le VEGF-A₁₂₁ promeut la lymphangiogenèse chez les patients atteints de cancer du poumon par la production de VEGF-C [245]. Le VEGF-A₁₂₁ recombinant adénoviral ou de livraison de l'hypertension et le VEGF-A₁₂₁ atténué améliore la réparation rénale dans un modèle de pré-éclampsie [246] de rat ou de souris. L'administration intra-myocardique d'un vecteur adénoviral exprimant (AAV) l'ADNc du VEGF-A₁₂₁ pour le traitement de la maladie coronarienne a également montré des résultats prometteurs. Le VEGF-A₁₂₁ protège les rats de nécrose rénale induite par des micro-angiopathies thrombotiques et a été principalement détectée dans les échelles psoriasiques [244].

I.4.6.2.2.2. Le VEGF-A₁₄₅

L'expression de VEGF-A₁₄₅ a été décrite dans des tumeurs solides, comme le cancer du côlon humain, où il joue un rôle dans l'angiogenèse proliférative [247]. Des niveaux élevés de VEGF-A₁₄₅ ont également été signalés dans l'ensemble des lignées cellulaires de carcinome de l'endomètre et de plusieurs autres types de cellules tumorigènes en provenance de l'appareil reproducteur féminin [235].

I.4.6.2.2.3. Le VEGF-A₁₆₅

Le VEGF-A₁₆₅ induit la néovascularisation dans la rétinopathie diabétique et dans la maladie rétinienne ischémique. La démonstration claire de l'importance de la médiation de VEGF-A₁₆₅ de la néovascularisation rétinienne est venue d'un modèle de souris transgénique [248]. Le VEGF-A₁₆₅ promeut des effets favorables angiogéniques mais aussi des structures vasculaires aberrantes dans les muscles squelettiques des membres postérieurs du lapin normal. Fait important, les quantités de matrice extracellulaire accrues avec un grand nombre de macrophages et de la fibrose dans l'AAV-VEGF-A muscles transduites ont été observées. Il a été démontré que l'électroporation d'ADN plasmidique codant pour le VEGF-A₁₆₅ favorise la cicatrisation des lambeaux de peau dans un modèle de rat de la chirurgie reconstructive de la peau, soutient VEGF-A₁₆₅ libération à partir d'une biomatrice ischémique de fibrine pulvérisée et la fourniture de l'AAV-VEGF-A₁₆₅ ont empêché une ischémie tissulaire et amélioration de la survie des volets en chirurgie réparatrice [249]. L'augmentation de la transfection du VEGF-A₁₆₅ provoque une amélioration subséquente de la cicatrisation anastomotique dans un modèle cliniquement pertinente de la chirurgie gastro-intestinale. Le transfert de gène lié par des liposomes peut soulager une maladie aiguë ischémique des membres inférieurs et la destruction de microbulles ultrasonore portant des plasmides induits l'artériogénèse thérapeutique dans le cadre de l'ischémie chronique sévère [250]. Les greffes de cellules sécrétant de VEGF-encapsulées ont montré des effets neuroprotecteurs et angiogéniques sur l'ischémie cérébrale focale chez le rat [251]. Malgré les effets positifs du VEGF-A₁₆₅ dans les différentes situations décrites ci-dessus, aucun avantage du VEGF-A₁₆₅ n'a été observé dans un modèle préclinique d'ischémie / reperfusion [252] ou chez les patients atteints de maladie cardiaque ischémique chronique [253]. Le VEGF-A₁₆₅ est également surexprimé dans les tumeurs solides et hématologiques et en corrélation avec l'agressivité tumorale [254].

I.4.6.2.2.4. Le VEGF-A₁₈₉

Le rôle du VEGF-A₁₈₉ a été traité chez les patients cancéreux. Tokunaga et al. ont classé les modèles d'isoformes de l'ARNm du VEGF-A dans les cancers humains en trois groupes: le type 1, VEGF-A₁₂₁; type 2, VEGF-A₁₂₁ + VEGF-A₁₆₅; et le type 3, VEGF-A₁₂₁ + A₁₆₅ + VEGF-VEGF-A₁₈₉ [255]. L'isoforme de type 3 indique un type de tumeur pire en raison de la présence de métastases hépatiques des cancers du côlon [255], de mauvais pronostic du

carcinome rénal de cellules et le carcinome hépatocellulaire, et de mauvais pronostic et la rechute post-opératoire du cancer du poumon [256, 257]. Le VEGF-A₁₈₉ a été suggéré pour induire une boucle autocrine de prolifération sur les cellules du sein et de cancer rénal par NP-1 [258, 259]. Le rôle localisé du VEGF-A₁₈₉ dans le microenvironnement de la tumeur semble être essentiel pour la diffusion des cellules tumorales plus agressives. En plus de son rôle essentiel dans le développement tumoral, le VEGF-A₁₈₉ a été récemment associée à la transmigration choroïde des cellules endothéliales à travers l'épithélium rétinien épithéliale suggérant un rôle essentiel dans le WAMD [260].

I.5. Le gène du VEGF, ses polymorphismes et les maladies associées.

Plusieurs polymorphismes nucléotidiques dans le gène du VEGF-A ont été associés avec le taux plasmatique du VEGF-A et/ou avec différentes maladies comme les MCV, les maladies rhumatologiques ou des dysfonctionnements du système immunitaire et les cancers [261, 262]. L'association de ces maladies peut indirectement refléter l'effet de la variation génétique sur le taux de VEGF-A. Parmi les polymorphismes mono nucléotidiques, ceux fréquemment associés avec le cancer et les MCV sont : rs699947, rs833061, rs1570360, rs2010963, rs3025039 et rs25648 [262]. Dans le tableau 7, figurent les polymorphismes qui ont été associés le plus souvent aux MCV.

Tableau 7: Etudes rapportant l'association entre polymorphisme du VEGF, maladies cardiovasculaires et leurs complications.

Evènements cliniques ou maladies	SNPs	Ref
Coronaropathie	rs2010963, rs699947	[263]
Infarctus du myocarde	rs2010963, rs699947	[264]
Insuffisance cardiaque chronique	rs2010963	[265]
Insuffisance cardiaque après infarctus du myocarde	rs2010963	[266]
Mort après pontage coronarien	rs2010963	[267]
Rétinopathie diabétique	rs2010963, rs3025039	[268]
Hypertension	rs2010963	[269]
Néphropathie hypertensive	rs1570360, rs3025039	[270]
Dégénérescence maculaire néo vasculaire liée à l'âge	rs833061, rs2010963, rs1413711, rs735286, rs2146323, rs3025021, rs3025024, rs3025039	[271, 272]
Pré éclampsie sévère	rs699947	[273]
Coronaropathie chez les diabétiques	rs2010963, rs699947	[263]
Rétinopathie sévère dans le diabète de type 1	rs3025021	[274]

II. Hypothèses et objectifs

Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire A (Vascular Endothelial Growth Factor A, VEGF-A ou VEGF) est une cytokine multifonctionnelle qui possède des fonctions importantes dans l'angiogenèse, la lymphangiogenèse, la perméabilité vasculaire, et l'hématopoïèse. De plus, une augmentation des taux circulants de VEGF-A a été observée dans diverses pathologies comme le syndrome métabolique, le diabète de type 2, l'hypertension, les troubles inflammatoires et dans plusieurs types de cancer. Le VEGF-A joue un rôle clé au cours de la vascularisation du follicule ovarien et du corps jaune humain, et dans le métabolisme osseux et la cicatrisation des plaies. Plus de 14 isoformes, regroupées dans deux familles principales, sont exprimées à partir du gène du *VEGF-A* par épissage différentiel du pré-ARNm. Les familles VEGF_{xxx} et VEGF_{xxx}b possèdent le même nombre d'acides aminés, mais diffèrent au niveau de la séquence des 6 acides aminés de l'extrémité C-terminale. Cela se traduit par des différences significatives au niveau de la structure conformationnelle, de l'interaction avec les récepteurs et des fonctions. La conséquence de cette différence est que les isoformes VEGF_{xxx} sont pro-angiogéniques (favorisent l'angiogenèse) alors que les isoformes VEGF_{xxx}b sont anti-angiogéniques. Ces propriétés inverses peuvent expliquer la variété des effets du VEGF.

Depuis 2007 au sein de notre Unité, une révolution technologique a conduit au développement des approches pangénomiques (genome-wide association studies, GWAS) qui permettent l'investigation de milliers de variants génétiques (Single Nucleotide Polymorphisms ou SNPs) chez des milliers d'individus pour identifier ceux qui sont impliqués dans la susceptibilité aux maladies polygéniques telles que les (MCV). Cependant, l'ensemble des SNPs identifiés aujourd'hui ne sont pas en mesure d'expliquer la relation génétique et l'héritabilité génétique estimée des facteurs de risque cardiovasculaire (« héritabilité manquante »).

La recherche des interactions épistatiques et gène × environnement non encore identifiées pourrait expliquer cette observation. En effet, l'importance des interactions entre les gènes est aujourd'hui de plus en plus mise en avant. L'épistasie est un phénomène par lequel l'effet d'un SNP est affecté par un autre SNP contrairement aux effets strictement additifs. De plus, l'importance des interactions gène × environnement augmente la possibilité de détection de gènes ayant de faibles effets individuels, d'autant plus si le gène n'a d'effet que dans un sous-groupe de patients donné, défini par une exposition environnementale précise. Ces interactions ne sont pas encore intégrées aux approches pangénomiques. En outre, même si un grand nombre de variants de GWAS est identifié leur fonctionnalité reste méconnue.

Ainsi, dans cette thèse, nous avons émis l'hypothèse que la compréhension des voies métaboliques du VEGF-A dans des processus physiologiques et pathologiques, surtout dans les MCV, est conditionnée par la nécessité de mettre en œuvre des designs intégrés. De plus, l'existence de voies métaboliques communes entre VEGF-A et les facteurs de risque cardiovasculaires pourrait probablement expliquer cette large gamme de fonctions du VEGF-A dans les maladies cardiovasculaires.

Nous avons développé dans notre équipe une approche intégrative pour l'étude du VEGF-A. Cette approche combine les études pangénomiques d'identification des variants génétiques associés au VEGF-A, l'étude de leurs relations avec les phénotypes intermédiaires des MCV et leur validation par une approche transcriptomique.

Quatre variants génétiques situés dans trois régions chromosomiques distinctes ont récemment été associés avec le VEGF-A, et expliquent 48% de sa variabilité. Nous avons utilisé ces polymorphismes pour une étude effectuée sur un échantillon d'adultes issus de la cohorte « STANISLAS Family study » et des populations de répliques issues du Centre de Ressources Biologique, « Interactions Gène-Environnement en Physiopathologie Cardio-Vasculaire » (CRB IGE-PCV).

Le but général de cette thèse est d'investiguer les relations complexes des polymorphismes liés au VEGF-A, des taux plasmatiques et de l'expression des isoformes du VEGF-A ainsi que des polymorphismes de gènes angiogéniques (*NOS3*, *CD14*, *MMP3* et *IL4*) avec les phénotypes intermédiaires des MCV, surtout les molécules d'adhésion cellulaire, les molécules de l'inflammation, les lipides plasmatiques, l'obésité et la pression artérielle au niveau génétique et transcriptomique en tenant compte les interactions gène × gène et gène × environnement.

Il est intéressant d'étudier ces relations chez l'individu sain en l'absence de toute manifestation pathologique afin de recueillir des informations importantes concernant les interactions physiologiques entre ces molécules à l'état normal avant tout développement d'une maladie donnée. Cela pourra permettre de mieux comprendre les rôles biologiques du VEGF-A.

Nous avons donc poursuivi cinq objectifs majeurs :

- 1-Investiguer les relations entre les polymorphismes liés au VEGF-A (rs6921438, rs4416670, rs6993770 et rs10738760) et les molécules d'adhésion cellulaire (CAM) et les molécules d'inflammation au niveau de leur expression génique et de leurs taux circulants.
- 2-Evaluer la contribution de ces quatre nouveaux SNPs liés au VEGF-A sur la variation interindividuelle des taux de lipides sanguins.
- 3-Examiner les éventuelles relations entre l'expression des quatre isoformes du gène *VEGF-A* (*VEGF-A*₁₂₁, *VEGF-A*₁₄₅, *VEGF-A*₁₆₅ et *VEGF-A*₁₈₉) et sa concentration plasmatique et les polymorphismes des gènes candidats angiogéniques *NOS3*, *CD14*, *MMP3* et *IL4*.
- 4-Evaluer les effets de polymorphismes liés au VEGF-A sur les traits de l'obésité chez les individus en bonne santé.
- 5- Examiner l'association entre les polymorphismes liés au VEGF-A avec la pression artérielle (PA).
- 6- Evaluer les possibles associations entre le SM et ses composants liés au métabolisme du glucose avec les taux de VEGF-A circulant et les SNP associés au VEGF-A dans une population en bonne santé

III. Matériel et méthodes

III.1. Populations

III.1.1. La cohorte STANISLAS

L'étude familiale STANISLAS est une étude longitudinale sur 10 ans qui inclut 1 006 familles résidant à Vandoeuvre-lès-Nancy (France) entre 1993 et 1995 [275, 276]. Les critères d'exclusion comprenaient la présence de troubles chroniques (comme les maladies cardiovasculaires ou le cancer) et des antécédents individuels de maladie cardiovasculaire. Le protocole de l'étude a été approuvé par le comité d'éthique local de Nancy et tous les participants ont donné leur consentement éclairé écrit. Le recrutement initial a eu lieu de 1993 à 1995 (t_0) et a permis d'inclure 1 006 familles biparentales (4 455 sujets) d'origine française avec au moins deux enfants de plus de six ans. Tous les individus inclus étaient supposés sains, c'est-à-dire exempts de maladies aiguës et/ou chroniques. 75% des familles initialement recrutées ont participé à la seconde visite (1998-2000, t_5) et 375 familles à la troisième (2003-2005, t_{10}) (Figure 11). Quatre cent trois adultes non apparentés recrutés lors de la deuxième visite de l'étude familiale STANISLAS ont été sélectionnés en raison de la disponibilité d'informations complètes.

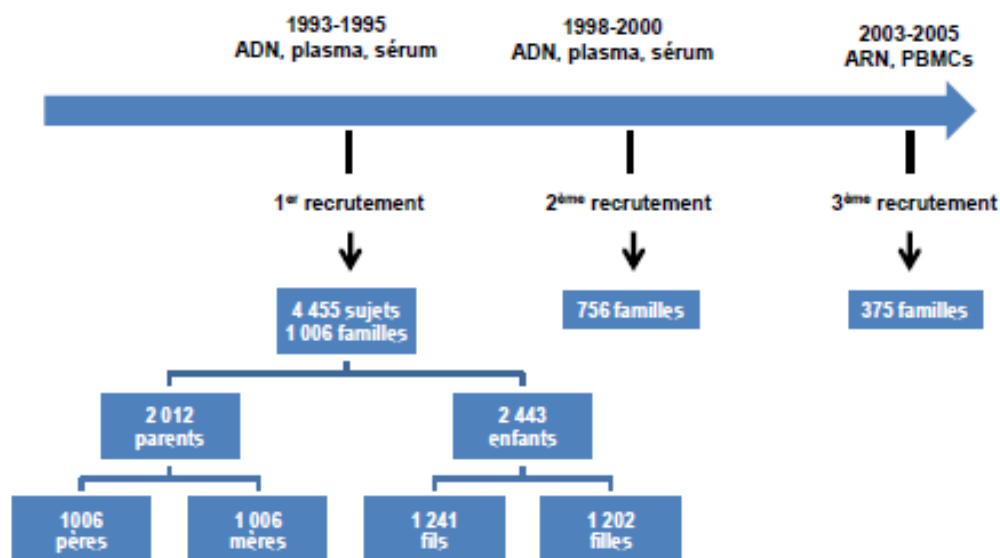


Figure 11 : Phases de recrutement de la cohorte STANISLAS

Les prélèvements sanguins ont été effectués sur les participants à jeun depuis 12 heures au niveau d'une veine antécubitale, en position allongée.

Deux types de tubes de sang modèle Vacutainer® (Becton Dickinson, Grenoble, France) ont été prélevés :

- Des tubes secs (sans anticoagulant) contenant un gel séparateur de sérum pour l'extraction de molécules contenues dans le sérum. Ces tubes ont été centrifugés à 1000 g pendant 15 minutes à température ambiante. Une partie du sérum ainsi récupéré était immédiatement analysée pour les dosages biochimiques et une autre partie stockée sous forme de paillettes dans l'azote liquide à - 196°C. Ce tube surnuméraire a servi au dosage ultérieur de l'insuline, de l'Apolipoprotéine C-III (ApoC-III) et des molécules d'adhésion.

- Des tubes d'acide Ethylenediaminetetraacetic (EDTA) pour ADN et plasma (où l'IL-6 et le TNFa sont dosés). Après avoir centrifugé le sang frais total recueilli dans des tubes EDTA à 1000 g à température ambiante pendant 10 minutes, le buffy coat formé entre le plasma et les globules rouges a été prélevé puis fractionné en paillettes stockées à - 196°C. Le plasma a également été conservé dans des paillettes à - 196°C.

Les concentrations en cholestérol total, TG et glucose ont été enzymatiquement déterminées grâce à un automate AU 640 (Olympus, Rungis, France).

La concentration en HDL-C a été mesurée dans le surnageant par la même technique enzymatique que pour le cholestérol total sur un automate COBAS-Mira analyser (Roche Diagnostics, Bâle, Suisse) après précipitation des lipoprotéines contenant l'ApoB (chylomicrons, VLDL et LDL) par phosphotungstate et chlorure de magnésium (méthode PTA).

Les concentrations en LDL-C ont été calculées selon la formule de Friedewald [277] lorsque la concentration en TG était inférieure à 4,56 mmol/L et en l'absence de chylomicrons :

En g/L LDL-C = (cholestérol total) – (HDL-C) – TG/5

En mmol/L LDL-C = (cholestérol total) – (HDL-C) – TG/2,18

Les concentrations en ApoA-I et en apolipoprotéine B (ApoB) ont été dosées par immunonéphélométrie sur un automate Behring Nephelometer Analyser II ou BNII (Dade Behring, Marburg, Allemagne).

Les concentrations en ApoC-III et en apolipoprotéine E (ApoE) ont été mesurées par immunoturbidimétrie sur un automate COBAS-Mira (Roche Diagnostics, Bâle, Suisse).

Les concentrations en CRP, haptoglobine, orosomucoïde ont été mesurées par immunonéphélométrie sur un automate BNII (Dade Behring, Marburg, Allemagne).

Les concentrations en insuline ont été dosées grâce à un kit de dosage d'immunoenzymologie microparticulaire (Microparticular Enzymatic ImmunoAssay ou MEIA) sur un automate IMx (Abbott laboratories, Abbott Park, IL, USA).

III.1.2. La population ApoEurope

La cohorte ApoEurope regroupe 1145 participants saines, sans relation familiale, issus de différentes zones géographiques de l'Europe : Nancy (France); Crète (Grèce); Barcelone (Spain) et Lisbonne (Portugal). Ce projet a été effectué avec des sujets ne prenant pas de médicaments antihypertenseurs. Le recueil des prélèvements et des données et les mesures biologiques ont été effectués par chaque centre de recrutement avec des protocoles standardisés et des méthodes comparables à celles utilisées pour la cohorte STANISLAS.

III.1.3. La population Iranienne

L'étude MASHAD est une étude prospective des facteurs de risque cardiovasculaire, menée par l'Université de Mashhad des sciences médicales (en nord-est de l'Iran). Les personnes atteintes de maladies aiguës ou chroniques reconnues tels qu'accidents vasculaires cérébraux, infarctus du myocarde, les maladies de l'inflammation systémique ou d'infection, les anomalies endocriniennes, la maladie cardiaque congestive, les maladies rénales, ou le cancer ont été exclus. La cohorte est composée de 357 individus sains, sans relation familiale dont l'âge moyen est de 51,11 ans. Le recueil des prélèvements et des données et les mesures biologiques ont été effectués par le centre de recrutement avec des méthodes comparables à celles utilisées pour la cohorte STANISLAS.

III.2. Mesures des molécules d'adhésion et d'inflammation (pour toutes les études)

Les concentrations en VEGF-A, en E, L et P-sélectines , en ICAM-I , en IL-6 et en TNF α ont été dosées grâce à des kits commercialisés par Randox Ltd (Crumlin, UK) [278].

III.3. Génotypage

Les polymorphismes rs2569190, rs2243250, rs2010963, rs3918226, rs1799983, rs1800779, rs3025058, rs1805015 et rs1801275 des gènes *NOS3*, *CD14*, *MMP3*, *IL4R* et *IL4* (tableau 8) ont été génotypés à l'aide des tests de génotypage multilocus déjà décrits [279,

280]. Les polymorphismes d'un seul nucléotide (SNP) rs6921438, rs4416670, rs6993770 et rs10738760, précédemment démontrés comme étant associés aux taux de VEGF-A [281], ont été génotypés par une biopuce spécifique à ces polymorphismes était effectué par Randox Ltd (Crumlin,UK) [282]

Tableau 8: Caractéristiques des polymorphismes étudiés.

Chr	SNPs	Allèle mineur	Allèle majeur	Gène	Fréquence d'allèle majeur
5	rs2569190	G	A	<i>CD14</i>	0.48
5	rs2243250	T	C	<i>IL4</i>	0.15
6	rs4416670	C	C	<i>MGC45491 et MRPL14</i>	0.47
6	rs2010963	C	G	<i>VEGF-A</i>	0.35
6	rs6921438	A	G	<i>MGC45491 et MRPL14</i>	0.4
7	rs3918226	T	C	<i>NOS3</i>	0.09
7	rs1799983	T	G	<i>NOS3</i>	0.35
7	rs1800779	G	A	<i>NOS3</i>	0.4
8	rs6993770	T	A	<i>ZFPM2</i>	0.28
9	rs10738760	G	A	<i>VLDLR et KCNV2</i>	0.48
11	rs3025058	-	T	<i>MMP3</i>	0.48
16	rs1805015	C	T	<i>IL4R</i>	0.13
16	rs1801275	G	A	<i>IL4R</i>	0.18

III.4. Transcriptomique

III.4.1. Extraction des ARN totaux

Le principe est illustré dans la figure 12

Les ARN totaux provenant des PBMC de la cohorte STANISLAS ont été extraits en utilisant l'automate « MagNA Pure LC le kit *MagNA Pure LC RNA Isolation KIT-High Performance* et (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Les échantillons de PBMC ($2 \cdot 10^6$ cellules/mL) sont stockés dans 200 μ L de tampon de lyse Instapure à -80°C et subissent une lyse complémentaire par ajout de 520 μ L de *Lysis/Binding Buffer* du kit d'extraction et un passage au vortex. (Figure 12A). Les échantillons ont ensuite été placés dans la plaque *Sample* de 32 puits de l'appareil et l'extraction est faite selon le protocole *External Lysis* de l'appareil qui utilise le principe des billes de Silice. Dans l'automate, l'ajout du tampon de lyse (*Lysis/Binding Buffer*) complète la lyse des cellules ainsi que de la RNase et permet de libérer l'ARN de la cellule en évitant ainsi sa dégradation par la RNase. De plus, la protéinase K permet de digérer les protéines cellulaires (Figure 12B). Les ARN se lient aux particules magnétiques grâce à la silice présente à la surface de ces billes et grâce aux conditions physico-chimiques imposées par les différents réactifs. En effet l'isopropanol ainsi que le « *Lysis/Binding Buffer* » entraîne une force ionique élevée permettant l'adhésion de l'ARN aux billes magnétiques (Figure 12C). L'ajout de DNase permet de lyser tout l'ADN génomique présent dans le tube et assure ainsi la pureté de l'ARN (Figure 12D). L'ARN est à nouveau lié aux particules magnétiques grâce à l'isopropanol. Ces billes sont maintenues dans la pipette grâce à un aimant et tous les résidus d'ADN, de protéines, de cellules sont éliminés par des lavages permettant de ne garder que l'ARN. Le complexe billes-ARN est lavé grâce au wash Buffer (Figure 12E et 12F). Les résidus sont éliminés dans un tube et l'ARN est maintenu dans la pipette grâce à l'aimant (Figure 12G). L'ARN ainsi purifié est séparé des billes magnétiques donc élué grâce au tampon d'éluion (Figure 12H).

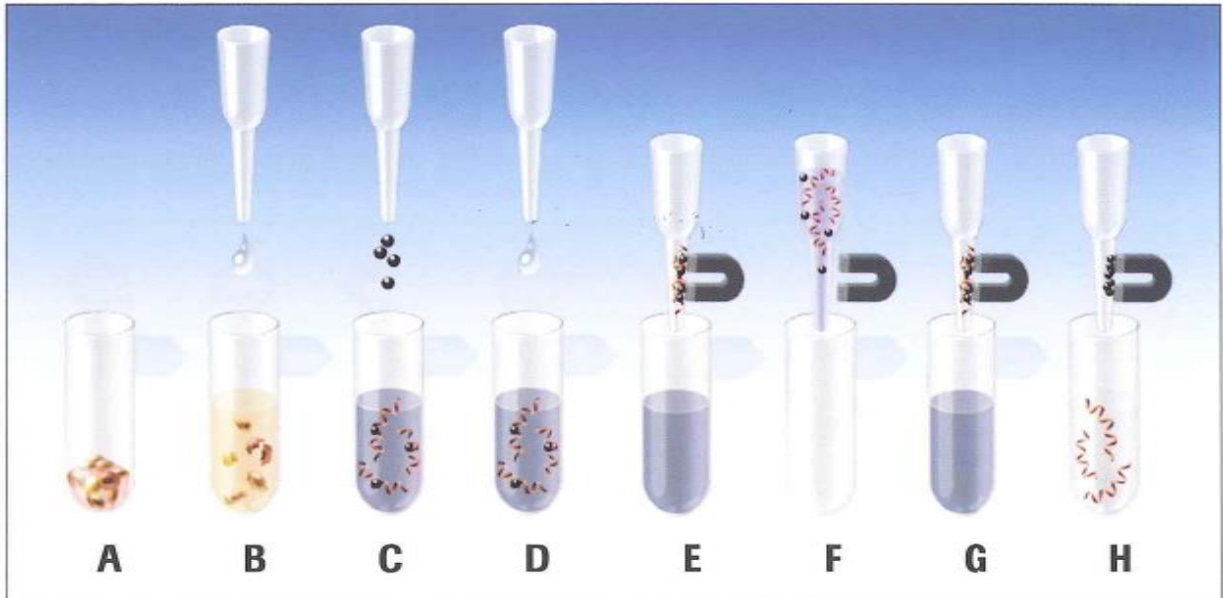


Figure 12: Etapes de l'extraction des ARN totaux (MagNa Pure LC, Roche)

III.4.2. Rétrotranscription des ARN totaux

Les ARN totaux des échantillons de PBMC de la cohorte STANISLAS ont été rétrotranscrits grâce à l'appareil Thermocycler classique (Figure 13). Cette technique permet de créer l'ADNc via de l'ARN. Cette synthèse est catalysée par des enzymes, les transcriptases reverses capable d'utiliser comme matrice l'ARN. Pour initier la synthèse d'un d'ADN, ces enzymes ont besoin d'une amorce qui peut être une séquence poly T (oligodTs) non spécifique d'un ARNm ou bien plus précisément une amorce spécifique permettant d'initier la synthèse d'un brin d'ADN à partir d'un ARNm donné.

Lors de cette transcription reverse, la toute première étape consiste à rendre l'ARNm linéaire (ouverture des liaisons à l'intérieur des molécules et suppression des structures secondaires). Cette dénaturation se fait à 70°C pendant 5 min. dans la deuxième étape, l'ARN est hybridé, c'est-à-dire que l'amorce polyT (oligodTs) va se fixer sur la queue polyA et grâce à la transcriptase inverse et aux désoxyribonucléotides, il y a formation d'ADNc par élongation. Cette deuxième étape se fait à 42°C pendant 1h. Puis l'appareil se met automatiquement sur 4°C indéfiniment pour préserver l'ADNc. Les ADNc ont ensuite été aliquotés et conservés à -20°C.



Figure 13: Thermocycler classique pour synthèse des ARN totaux.

III.4.3. PCR en temps réel

III.4.3.1. Principe de l'amplification par PCR en temps réel

La polymerase chain reaction (PCR) en temps réel permet, comme tout type de PCR de doubler une séquence voulue à chaque cycle d'amplification. La spécificité du temps réel est la mesure de la quantité de cette séquence (de façon plus ou moins spécifique selon la technologie utilisée) à chacun de ces cycles. Ainsi, l'intensité d'émission de fluorescence est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits. La quantité d'ADN est estimée au point d'inflexion avec le cycle seuil C_t des courbes de quantification (Figure 14). Nous utilisons une technique de SYBR Green pour les amplifications, ces molécules de SYBR Green se fixent sur l'ADN double brin et qui émettent ainsi leur fluorescence (Figure 14)

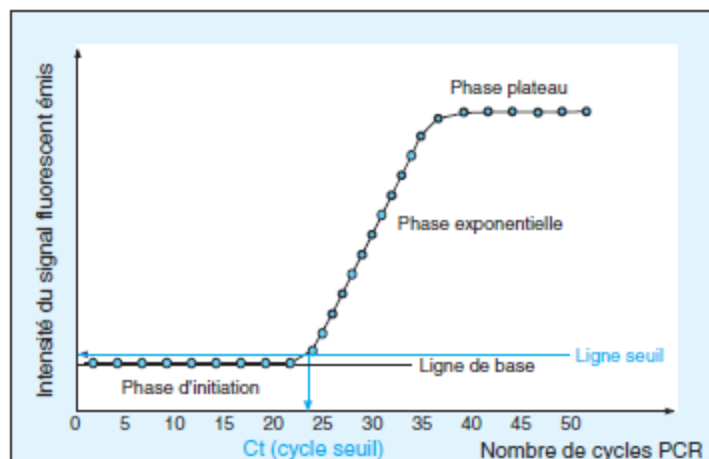


Figure 14 : Courbe d'amplification d'un gène cible par PCR en temps réel.

La quantification d'un échantillon par PCR en temps réel est déterminée grâce à la courbe de quantification. Cette courbe détermine le nombre de cycles à partir duquel

l'ADN double brin synthétisé est détectable. Le moment d'apparition du signal seuil au niveau du point d'inflexion, nommé cycle seuil Ct, est dépendant de la quantité de matrice initialement présente dans l'échantillon amplifié : plus l'échantillon est concerné, plus le moment d'apparition du signal est rapide.

La figure 15 montre les phases de la PCR en temps réel avec la technologie SYBR Green.

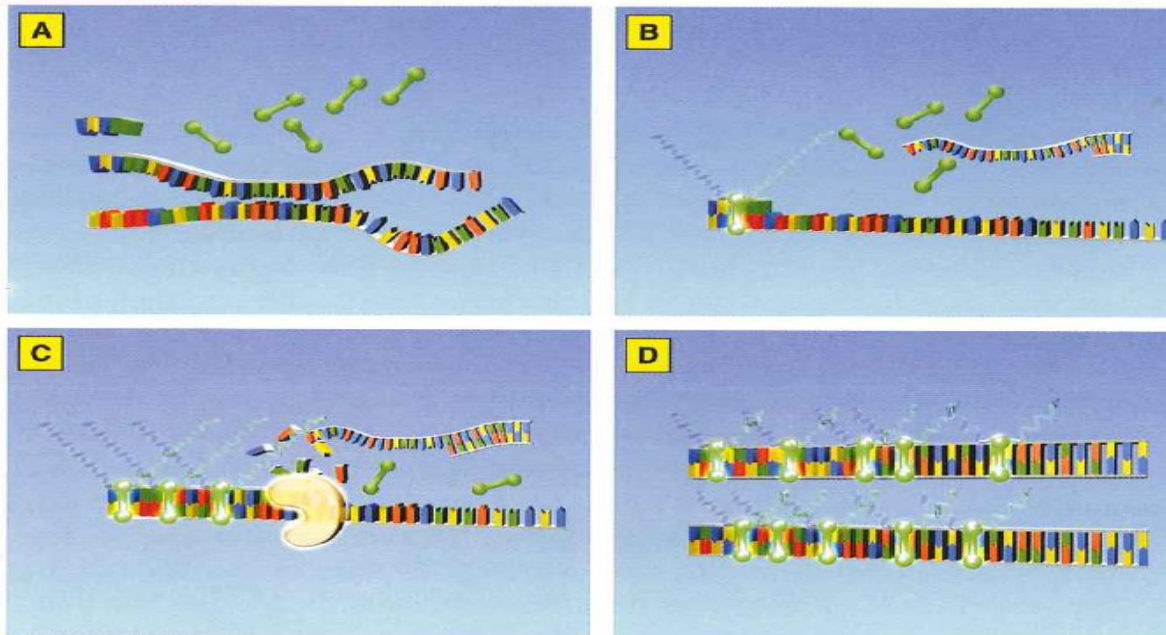


Figure 15: Mécanismes des phases de la PCR en temps réel avec la technologie SYBR Green

- A- L'amplification débute par une phase de dénaturation au cours de laquelle le mélange réactionnel contient de l'ADN dénaturé, les amorces et le fluorophore SYBR Green libre.
- B- Phase d'hybridation caractérisée par une hybridation spécifique des amorces. Le fluorophore se lie à l'ADN double brin synthétisé, la liaison se traduit par une augmentation de la fluorescence.
- C- Au cours de la phase d'élongation, le nombre des molécules des fluorophore lié à l'ADN double brin synthétisé, augmente, ce qui se traduit par une augmentation de la fluorescence.
- D- Phase d'élongation finale : à la fin de cette phase tout l'ADN est sous forme double brin. Une quantité maximale de fluorophore est liée à l'ADN.

III.4.3.2. Amplification par PCR en temps réel

Les PCR quantitatives de l'expression des gènes ont été réalisées au moyen de l'appareil Roche LightCycler 1.X en utilisant le kit *LightCycler FastStart DNA Master PLUS SYBR Green 1* (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) contenant une solution d'enzyme TaqPolymérase et un mélange réactionnel de dNTP, chlorure de magnésium ($MgCl_2$), tampon d'enzyme et le fluorophore SYBR Green. La solution enzymatique et le mélange réactionnel sont préalablement mélangés selon les consignes du kit.

Un second mélange de 15 μ L/capillaire est effectué avec 4 μ L/capillaire de la solution réactionnelle du kit (1^{er} mélange) ainsi qu'avec les amorces (concentration finale de 0,5 μ M), le tout complété avec de l'eau qualité BioMol. Enfin, 5 μ L d'ADN de chaque sujet sont ajoutés dans chaque capillaire.

III.4.3.3. Vérification de la spécificité des produits de PCR

III.4.3.3.1. Courbe de fusion

Pour la technologie SYBR Green, l'identification de la spécificité des séquences amplifiées est réalisée grâce à la courbe de fusion. En effet, chaque séquence d'ADN double brin se caractérise par un T_m propre. L'augmentation progressive de la température permet d'atteindre cette température et d'observer une chute de fluorescence due à la dissociation des deux brins d'ADN conduisant également à la séparation des molécules de SYBR Green de la molécule nucléotidique. Cette séparation entraîne un arrêt de l'émission de fluorescence de ces molécules de SYBR Green qui n'est donc plus mesurée par l'appareil (Figure 16A). La dérivée de cette courbe permet d'obtenir un unique pic (Figure 16B) si l'amplification est spécifique. Ce pic correspond au T_m de la molécule d'ADN double brin amplifié. La présence de plusieurs pics signifie qu'il y a plusieurs séquences différentes d'ADN double brins.

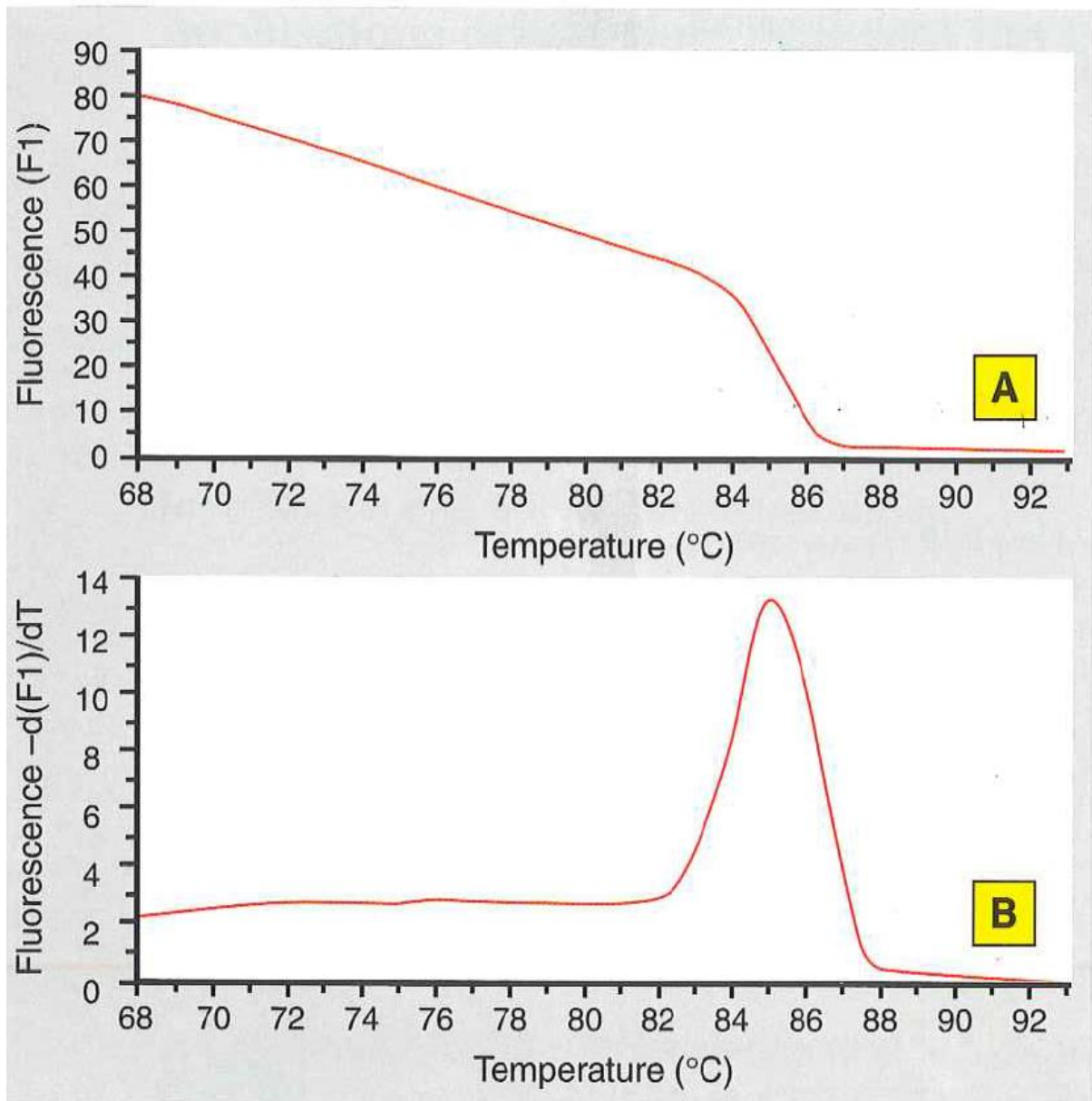


Figure 16 : Courbe de fusion du gène amplifié par PCR en temps réel

La courbe de fusion A représente l'intensité de fluorescence en fonction de la température °C. La dérivée B de la courbe de fusion montre l'existence d'un seul pic de fusion, qui correspond sur l'axe des températures au point de fusion du fragment d'intérêt. Chaque produit d'ADN double brin synthétisé possède une température de fusion (*melting temperature- T_m*) spécifique, définie comme étant la température à partir de laquelle 50% de l'ADN est sous forme double brin et 50 % sous forme simple brin.

III.4.4. Gels de polyacrylamide à 10 %

Suite aux expérimentations de PCR par technologie SYBR Green et TaqMan, une vérification de la taille des séquences amplifiées est nécessaire. Ainsi une migration sur gel de polyacrylamide à 10% des produits de PCR est effectuée permettant de vérifier une amplification spécifique et la taille du fragment amplifié.

Les gels de polyacrylamide à 10% étaient composés de 3,15 mL d'eau ultra pure, 1,125 mL d'Acrylamide/bis-acrylamide 40%, 450 µL de Tris-Borate-EDTA, 45 µL de Persulfate de Sodium à 10% et 4,5 µL de Tétraméthyléthylène-diamine.

La migration a été effectuée à 100 V et 400 mA pendant une heure avec l'appareil BioRad PowerPac 300 (Marnes-la Coquette, France).

III.4.5. Purification des acides nucléiques

Les purifications ont été faites avec le kit "QIAquick PCR Purification Kit" (QIAGEN, Courtaboeuf, France). Le protocole du kit utilise une centrifugeuse et des colonnes avec une membrane de Silice retenant les acides nucléiques grâce au Binding Buffer. Après le lavage de la membrane avec le tampon adéquat, les acides nucléiques sont élués avec le tampon d'éluion.

Les ADN provenant des échantillons grecs avaient été purifiés avant d'être dosés, puis dilués à 5ng/µL, et enfin aliquotes et stockés à -80°C. Les produits de PCR obtenus pour chaque gène ont également été purifiés afin d'être dosés pour établir les gammes étalons utilisées pour la quantification.

III.4.6. Etapes de mise en place des gammes étalon

III.4.6.1. Dosage des produits de PCR

Le dosage des produits de PCR est fait pour pouvoir établir les gammes étalon pour chaque gène d'intérêt. Il a été effectué avec le NanoDrop 1000 Spectrophotometer.

L'appareil permet d'obtenir la concentration en ng/ μ L ainsi que la pureté des acides nucléiques.

Nous pouvons ensuite calculer le nombre de copies par μ L avec la formule suivante :

Nombre de copies/ μ L = (Concentration de la solution mère (g/ μ L) \times (A_{0A})/(Masse molaire de l'amplicon (g/mol))

$N_A = 6,023 \cdot 10^{23}$ est le nombre d'Avogadro

La masse molaire de l'amplicon est nombre de paire de base multiplié par 660g/mol (masse molaire moyenne d'une paire de base).

III.4.6.2. La gamme étalon

Suite à la purification et au dosage des produits de PCR, des dilutions en cascade en puissance de 10 allant de 10^7 à 10^1 copies/ μ L sont effectuées. Chaque dilution est amplifiée par PCR en temps réel (Figure 17A).

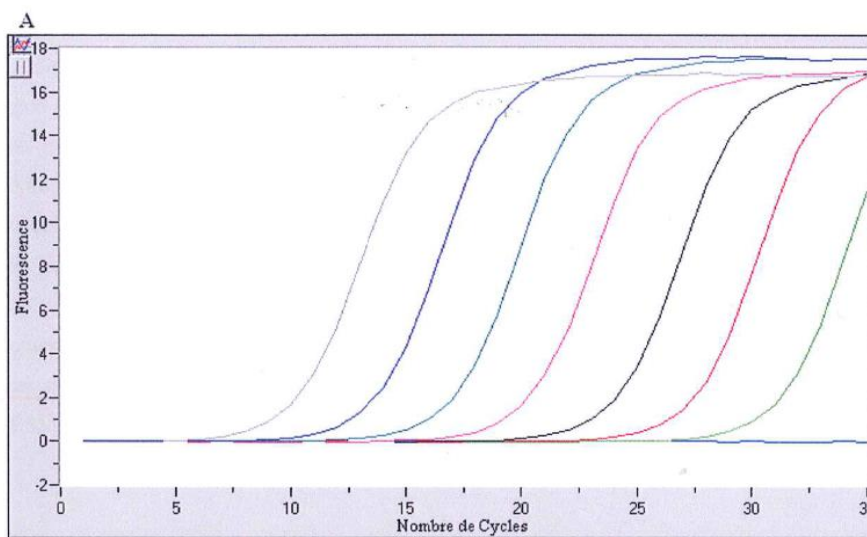


Figure 17A: Représentation schématique de la gamme étalon.

Une droite est ainsi obtenue représentant le nombre de cycle en fonction du logarithme de base 10 de la concentration du nombre de copies (Figure 17B). La pente de cette droite doit s'approcher d'environ -3,332. En effet, cette pente permet de calculer l'efficacité de PCR (E) l'amplification des différents points de gamme (A) permet, avec les cycles seuils, d'obtenir une droite (B) représentant le nombre de cycles par rapport au logarithme de base 10 (Log) de la concentration en nombre de copies. La pente de cette droite permet de déterminer l'efficacité (E) de la PCR pour l'amplification concernée.

Log : logarithme de base 10 qui est égale à $10^{-1/\text{pente}}$ et doit être comprise entre 1,5 et 2,2. 2 est la valeur idéale de E, et correspond à une amplification théorique de l'amplicon de deux fois par cycle.

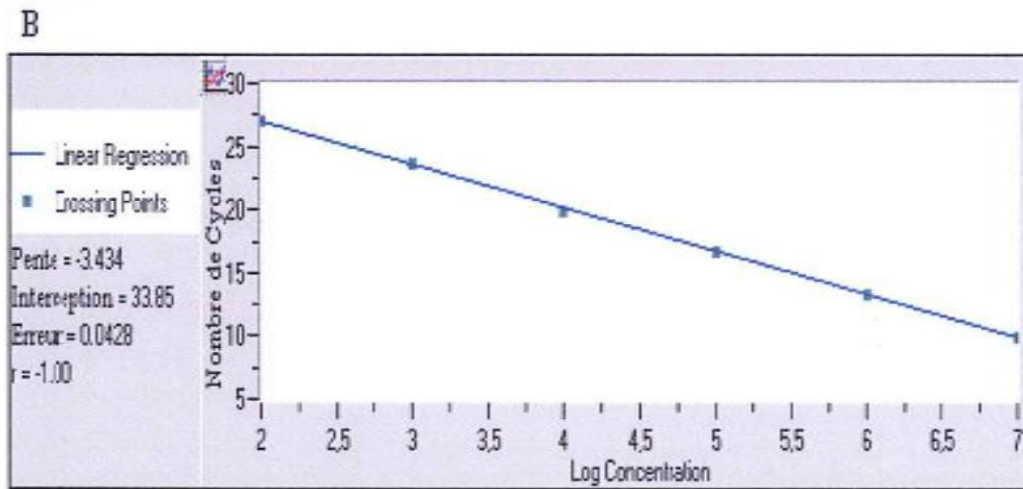


Figure 17B: Représentation schématique de La droite d'étalonnage moyenne

III.5. Analyses

III.5.1. Test de l'équilibre de Hardy-Weinberg.

L'HWE ou équilibre panmictique, est le modèle théorique central de la génétique des populations. La notion d'équilibre dans le modèle de Hardy-Weinberg est soumise à des hypothèses définissant une population idéale :

- 1/ Une population panmictique c'est-à-dire où les couples se forment au hasard (panmixie), et leurs gamètes se rencontrent au hasard (pangamie) ;
 - 2/ Une population 'infinie' minimisant les variations d'échantillonnage ;
 - 3/ Pas de perte ou de gain d'allèle : ni sélection, ni mutation, ni migration ;
 - 4/ Et pas de croisement entre générations différentes : générations successives discrètes.
- Ceci permet de maintenir la diversité génétique de la population et tend vers un équilibre stable de la distribution génotypique. Les fréquences alléliques restent également stables de génération en génération dans une population diploïde idéale et ne dépendent que des fréquences de la génération initiale. De plus, les fréquences génotypiques ne dépendent que des fréquences alléliques.

Ainsi, dans une population idéale de taille n et avec comme allèles du même locus A et a, p la fréquence de l'allèle A et q=1-p. Les fréquences des génotypes en HWE sont :

$$f(AA) = p^2$$

$$f(aa) = q^2 = (1-p)^2$$

$f(Aa) = 2pq = 2p(1-p)$ et elles sont constantes au fil des générations.

Ainsi, la formule de calcul de la fréquence allélique p dans une population donnée est :

$$p = (2 n_{AA} + n_{Aa}) / 2n$$

L'équilibre de Hardy-Weinberg a été testé à l'aide du test de Khi carré.

III.5.2. Analyses statistiques

Les concentrations plasmatiques en VEGF-A et les valeurs d'ARNm ont été transformées avant d'être analysées afin de normaliser leur distribution.

Les associations entre les SNPs et les concentrations plasmatiques de molécules et le taux d'expression de l'ARNm du *VEGF-A* ont été évaluées par régression linéaire ajustée pour l'âge, le sexe et autres facteurs de risque cardiovasculaire en appliquant des modèles additifs où l'allèle mineur est l'allèle de référence.

Les interactions épistatiques pour les concentrations plasmatiques de molécules ont été analysées en ajoutant aux modèles de régression précédemment décrits un terme d'interaction sous la forme d'une combinaison 2 x 2 entre les SNP étudiés. Pour les interactions gène x environnement la même stratégie a été utilisée (ajout d'un terme d'interaction dans les modèles de régression). Les facteurs environnementaux utilisés comprenaient le tabagisme, le taux de lipides dans le sang, l'obésité et l'hypertension. Les interactions n'ont pas été déterminées pour les données de l'expression génique du *VEGF-A* en raison de la taille limitée de l'échantillon. Les analyses ont été réalisées à l'aide des logiciels d'analyse statistique PLINK 1.07 (<http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink>) [283] et SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, États-Unis). Le seuil de signification bilatéral était défini à $P = 0,05$.

IV. Résultats et discussions

Publication N°1

Association du VEGF-A à des molécules d'adhésion et de l'inflammation dans une population saine.

Azimi-Nezhad M*, Stathopoulou MG*, Bonnefond A, Rancier M, Saleh A, Lamont J, Fitzgerald P, Ndiaye NC, Visvikis-Siest S.

*Co-premiers auteurs

Cytokine. 2013;61: 602-7.

Le VEGF-A est un facteur de croissance majeur intervenant dans les processus de la vasculogenèse et de l'angiogenèse. L'existence de voies de signalisation communes entre le VEGF-A, les CAM et les molécules d'inflammation pourrait permettre d'expliquer la large gamme de fonctions du VEGF-A dans différentes situations pathologiques. En effet, des relations complexes entre le VEGF-A, les CAM et les marqueurs de l'inflammation ont été décrites dans de nombreuses maladies, particulièrement dans les phénotypes cardiovasculaires. Par exemple, certaines études ont signalé l'implication des sélectines E, P et L, VCAM-1, ICAM-1 et IL-6 dans l'angiogenèse [284]. Il a également été démontré que les taux circulants de VEGF-A, d'IL-6, de sélectine E et d'ICAM-1 augmentent dans une situation d'hypoglycémie chez des individus sains et chez les patients souffrant de diabète de type 1 [285]. Par ailleurs, il est intéressant que plusieurs travaux ont établi un lien entre l'angiogenèse et l'inflammation, et soulignent le rôle clé du TNF- α et de la CRP [286, 287].

Objectif

Investiguer les relations entre les polymorphismes liés au VEGF-A (rs6921438, rs4416670, rs6993770 et rs10738760) et les CAM et les molécules d'inflammation au niveau de leur expression génique et de leurs taux circulants.

Méthodes- Populations

Dans cette étude nous avons utilisé quatre cent trois adultes d'origine française de la cohorte STANISLAS qui ont été sélectionnés en raison de la disponibilité d'informations complètes.

Résultats

Associations entre les taux plasmatiques de VEGF-A, les CAM et les molécules inflammatoires

Les taux plasmatiques de VEGF-A étaient associés aux concentrations d'ICAM-1 ($\beta = 0,043$, $P = 0,023$) et de sélectine E ($\beta = 0,085$, $P = 0,039$).

Associations entre l'ARNm des isoformes du VEGF-A et l'expression des gènes des CAM et des molécules inflammatoires

Lors de l'analyse de l'association d'ARNm des quatre isoformes du VEGF-A (rs6921438, rs4416670, rs6993770 et rs10738760) et de l'expression génétique d'ICAM-1, des sélectines E, L et P, de TNF- α et d'IL-6 dans les PBMC, nous avons trouvé que l'isoforme VEGF-A₁₄₅ était associée de manière significative avec l'ARNm d'ICAM-1 ($\beta = 0,353$, $P = 0,021$), l'ARNm de la sélectine L ($\beta = 0,611$, $P = 0,001$) et l'ARNm du TNF- α ($\beta = 0,616$, $P = 0,001$).

Associations des rs6921438, rs4416670, rs6993770, rs10738760 et leurs interactions épistatiques avec les taux plasmatiques et le niveau de transcription des CAM et des molécules inflammatoires

Des interactions épistatiques significatives ont été identifiées pour les concentrations de sélectine E, de TNF- α , d'ICAM-1 et d'IL-6. Une association significative était observée entre rs4416670 et les niveaux de l'ARNm de la sélectine L ($\beta = 0,196$, $P = 0,039$).

Discussion

Dans cette étude, nous avons évalué la relation entre le *VEGF-A* et les CAM et les molécules de l'inflammation à l'état sain par une approche pluridimensionnelle: associations plasmatiques, expression génique dans les PBMC, déterminants génétiques communs et effets fonctionnels éventuels de ces déterminants sur l'expression génétique. Des résultats significatifs ont été constatés à tous les niveaux et pourraient permettre d'expliquer les interactions physiologiques entre ces molécules. Une étude a montré que l'ICAM a un rôle central dans l'angiogenèse [288], une autre que l'ICAM régule l'angiogenèse à la fois directement et indirectement [289]. Parmi les molécules d'adhésion solubles, la sélectine E et l'ICAM-1 se sont révélées être directement angiogéniques [290]. Par conséquent, les associations observées de ces molécules

d'adhésion avec le VEGF-A pourraient s'expliquer par des activités communes angiogéniques présentes à l'état sain.

Il a été démontré que la CRP n'est pas associée aux niveaux de VEGF-A dans une population en bonne santé [291]. Dans la présente étude, nous avons confirmé cette constatation. Ainsi, une relation éventuelle entre les marqueurs de l'inflammation et le VEGF-A peut être due à une pathologie, impliquant un dysfonctionnement vasculaire (par exemple chez les personnes atteintes de diabète sucré) [292]. L'absence d'associations du VEGF-A avec les autres marqueurs de l'inflammation étudiés permet de soutenir davantage cette hypothèse.

Nos résultats ont confirmé que l'isoforme VEGF-A₁₆₅ est la plus abondante [77, 146] et ont montré que l'ARNm de l'isoforme VEGF-A₁₄₅ est associé positivement avec l'ICAM-1, la sélectine L et le TNF- α . Nowak et al. [200] ont rapporté que le TNF- α induit une régulation significative du taux circulant de VEGF-A. Par conséquent, nous pouvons supposé que le TNF- α a un effet sur la liaison du VEGF-A à son récepteur (VEGFR2). Ces associations pourraient indiquer l'existence de facteurs transcriptionnels communs ou d'autres mécanismes moléculaires régulant l'expression de ces molécules dans les PBMC dans des situations non pathologiques. La régulation des taux du VEGF-A se produit au niveau de la transcription génique, de translation, et lors de la liaison du VEGF-A à son récepteur (VEGFR2) dans les cellules endothéliales. Des preuves indiquent que l'activation de NF-kB induit l'expression d'ICAM-1 dans les cellules endothéliales [293-295]. Kim et al. [296] ont examiné les mécanismes de transduction du signal par lequel VEGF-A induit des molécules d'adhésion dans les cellules humaines ombilicales veineuses endothéliales (HUVEC). En effet, ils ont montré que l'expression d'ICAM-1 induite par le VEGF-A est médiée principalement par l'activation de NF-kB. Il a également été montré que NF-kB est en partie responsable de la régulation de l'expression de l'ARNm du VEGF-A en réponse au TNF- α [297]. Notre étude a révélé que l'ARNm de l'isoforme du VEGF-A₁₄₅ est associée positivement à la sélectine-L. Hao et al. [298] ont montré que le VEGF-A par l'intermédiaire du VEGFR2 induit la production de certaines cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 dans les cellules endothéliales mais pas dans les leucocytes. Cela pourrait expliquer l'absence d'association entre VEGF-A et l'expression d'IL-6 dans les PBMC. Ainsi, l'absence d'expression commune entre VEGF-A et la sélectine P pourrait aussi être expliquée dans l'état non pathologique. Il est intéressant de noter, que l'ARNm de VEGF-A₁₄₅ a été associé avec l'expression des molécules CAM / inflammation. Le VEGF-A₁₄₅ se lie à

l'héparine mais se comporte comme VEGF-A₁₂₁ en ce qui concerne sa capacité de reconnaissance du récepteur. En outre, parmi les isoformes du VEGF-A, VEGF-A₁₄₅ est exprimé de façon prédominante dans les tissus reproducteurs et dans plusieurs lignées de cellules tumorales dérivées d'organes reproducteurs féminins ainsi que dans les PBMC de patients atteints de leucémie aiguë myéloïde [235, 299]. Ces résultats sont intéressants car le VEGF-A₁₄₅ dans les deux maladies vasculaires et malignes et en combinaison avec nos résultats dans la population en bonne santé, donne de nouvelles orientations pour poursuivre les recherches sur l'implication de VEGF-A dans le développement de pathologies cancéreuses.

En conclusion, nous avons identifié et évalué les liens entre le VEGF-A, les CAM et des molécules inflammatoires à l'état sain au moyen d'une approche pluridimensionnelle : associations des taux plasmatiques, de l'expression génique dans les PBMC, des déterminants génétiques communs et effets fonctionnels éventuels de ces déterminants sur l'expression génétique. Des résultats significatifs ont été constatés à tous les niveaux et pourraient permettre d'expliquer les interactions physiologiques entre ces molécules. Les taux plasmatiques de VEGF-A étaient associés positivement à l'ICAM-1 et à la E-sélectine. Pour autant que nous sachions, notre étude est la première à démontrer un lien entre le VEGF-A, le principal facteur angiogénique et l'ICAM-1, qui permet une adhésion solide des leucocytes aux cellules endothéliales.

Publication N°2

Un variant commun hautement associé aux niveaux plasmatiques de VEGF-A et qui contribue également à la variation à la fois du LDL-C et du HDL-C et une interaction épistatique expliquant la variabilité de l'APO-E.

Stathopoulou MG*, Bonnefond A*, Ndiaye NC*, Azimi-Nezhad M, El Shamieh S, Saleh A, Rancier M, Siest G, Lamont J, Fitzgerald P, Visvikis-Siest S.

*Co-premiers auteurs

J Lipid Res 2013;54: 535-41.

Le VEGF-A est un des régulateurs les plus importants de la biologie vasculaire. Particulièrement, VEGF-A stimule l'angiogenèse dans un large éventail de processus normaux et pathologiques. En raison de ce rôle marqué sur l'homéostasie des vaisseaux sanguins, la contribution de VEGF-A aux MCV, et sur l'athérogenèse a été largement étudiée au cours des dernières années. Il est intéressant d'évaluer l'effet du VEGF-A (qui est exprimé dans tous les tissus des vaisseaux sanguins, y compris le cœur, le foie et les reins) sur les facteurs de risque cardiovasculaire, comme les paramètres lipidiques, chez des populations supposées saines, car cela pourrait expliquer en partie les effets de VEGF-A dans la physiopathologie des maladies cardiovasculaires. En particulier, les taux d'HDL-C et d'LDL-C sont considérés comme des facteurs de risque indépendants pour le développement des maladies cardiovasculaires. Des augmentations des niveaux circulants de VEGF-A ont été trouvées chez des sujets atteints d'hyperlipidémie et un résultat similaire a été observé dans une étude pilote chez des patients qui souffrent de cholestérol élevé. Une association significative a été trouvée entre les niveaux de HDL-C et de VEGF-A dans une population en bonne santé supposée du Japon. Les études génétiques peuvent être très utiles dans l'identification des associations inédites entre voies métaboliques distinctes impliquant des facteurs de risque d'une physiopathologie commune.

Objectif

Evaluer la contribution des quatre SNPs liés au VEGF-A et identifiés par GWAS sur la variation interindividuelle des taux des lipides sanguins.

Méthodes- Populations

Nous avons utilisé deux populations pour effectuer cette étude. Quatre cent trois adultes d'origine française de la cohorte STANISLAS, sélectionnés en raison de la disponibilité d'informations complètes ont composé la population de découverte. La population de la réplication faisait partie de la cohorte ApoEurope qui regroupe 1145 participants sains issus de différentes zones géographiques de l'Europe : Nancy (France); Crète (Grèce); Barcelone (Spain) et Lisbonne (Portugal).

Résultats

Associations des polymorphismes liés au VEGF-A avec les niveaux de HDL-C et LDL-C

Dans la population de découverte, des associations significatives ont été observées entre le rs6921438 et le rs6993770, et les niveaux de HDL-C ($\beta=-0.09\text{mmol/l}$, $P=1.2\times 10^{-4}$ et $\beta=-0.01\text{ mmol/l}$, $P=8.3\times 10^{-3}$ respectivement) et entre le rs6921438 et les concentrations plasmatiques de LDL-C ($\beta=0.14\text{mmol/l}$, $P=6.7\times 10^{-3}$). Spécifiquement, l'allèle mineur A du rs6921438 est associé avec une diminution des taux du HDL-C et avec une augmentation des taux de LDL-C, alors que l'allèle mineur T du rs6993770 est associé avec l'augmentation des niveaux du HDL-C. Ces associations significatives étaient seulement confirmées pour le SNP rs6921438 dans la population de réplication ($\beta=-0.07\text{mmol/l}$, $P=2.7\times 10^{-4}$ et $\beta=0.12\text{mmol/l}$, $P=8.4\times 10^{-3}$ for HDL-C et LDL-C respectivement). Des analyses conditionnelles incluant à la fois le rs6993770 et le rs6921438 ont révélé que le rs6921438 était le seul SNP ayant un effet significatif direct sur les niveaux de HDL-C dans les populations de découverte et de réplication ($\beta=-0.09\text{mmol/l}$, $P=1.2\times 10^{-4}$ et $\beta=-0.07\text{mmol/l}$, $P=2.7\times 10^{-4}$, respectivement). Ces résultats restent significatifs dans les deux types de populations après des ajustements à la fois pour le tabagisme et l'hypertension. Le SNP rs6921438 expliquait 1% de la variabilité du HDL-C et 0.2% de celle du LDL-C dans les deux populations. La méta-analyse des résultats des deux populations a démontré des associations hautement significatives entre le rs6921438 et à la fois les niveaux de HDL-C et de LDL-C ($\beta=-0.08\text{mmol/l}$, $P=1.2\times 10^{-7}$ et $\beta=0.13\text{mmol/l}$, $P=1.5\times 10^{-4}$ pour le HDL-C et le LDL-C). Le SNP rs6993770 n'était pas associé de façon significative avec les niveaux de HDL-C dans les deux populations. La méta-analyse de l'analyse conditionnelle vérifiait que le rs6921438 est le seul déterminant des niveaux des HDL-C ($\beta=-0.08\text{mmol/l}$, $P=1.2\times 10^{-7}$)

Interactions entre les polymorphismes liés au VEGF-A et l'hypertension

Une association avec une significativité importante entre l'interaction rs4416670 × hypertension et la variation de l'APO-E a également été identifiée ($P=3.5 \times 10^{-3}$, 1.6×10^{-3} , et 1.7×10^{-5} respectivement dans les populations de découverte, de réplique et de méta-analyse). L'allèle mineur du polymorphisme a été associée avec des niveaux plus faibles d'APO-E dans le cas de patients hypertendus ($\beta=-0.71\text{mg/l}$, -0.75mg/l , et -0.73mg/l respectivement).

Dans le but de tester une association directe du rs4416670 sur l'hypertension, des analyses complémentaires ont été effectuées dans les deux populations. L'interaction SNP × hypertension que nous démontrons n'est pas due à une relation directe entre les deux composants de cette interaction. Aucune association significative n'a été observée entre le même SNP et l'hypertension ($P=0.576$ pour la découverte et $P=0.592$ pour la réplique de la population).

Interactions épistatiques entre les polymorphismes liés au VEGF-A

Concernant les interactions épistatiques, nous avons trouvé que le SNP rs6921438 interagissait avec le rs6993770 pour des niveaux de HDL-C ($\beta=0.05\text{mmol/l}$, $P=2.4 \times 10^{-3}$). Bien que cette interaction ne soit pas significative dans la population de réplique ($\beta=0.02\text{mmol/l}$, $P=0.035$), cela l'a été dans la méta-analyse des résultats ($\beta=0.03\text{mmol/l}$, $P=2.6 \times 10^{-3}$).

Discussion

Dans cette étude nous avons évalué l'effet de 4 SNPs liés au VEGF-A sur les paramètres lipidiques sanguins et nous avons trouvé des associations significatives et des interactions dans deux populations indépendantes d'Européens en bonne santé et sans aucun lien de parenté.

En particulier, le SNP rs6921438 a été associé fortement avec les niveaux plasmatiques des HDL-C et des LDL-C. Ce SNP est localisé dans le chromosome 6 p 21.1, à 171kb en aval du gène *VEGF-A*. Plus précisément, ce SNP est localisé entre le LOC100132354 (un gène d'ARN non-codant) et le gène *C6orf223* (codant une protéine non caractérisée).

Nous avons montré précédemment [281] que l'allèle mineur du rs6921438 est associé avec des niveaux de VEGF-A faibles (expliquant 41% de la variabilité de VEGF-A plasmatique). Il semble que le rs6921438 pourrait avoir un effet négatif sur le système

cardio-vasculaire par le biais d'une augmentation des HDL-C et des LDL-C et avec, en même temps, une baisse des taux de VEGF-A.

Il devrait être mentionné, qu'à notre connaissance, c'est la première étude concernant les effets des 4 SNPs liés au VEGF-A sur les lipides dans le sang. De même que le rs6921438 n'a été identifié dans aucune GWAS des taux de HDL-C et de LDL-C [300-309] incluant une large méta-analyse de GWAS avec plus de 100 000 participants [307]. La raison de cette disparité peut être due aux différences des populations étudiées.

De plus, les GWAS existants ont réussi à expliquer un petit pourcentage de la variabilité des lipides dans le sang (par exemple, pour le HDL-C, il s'étend de 0.6 à 10%), donc d'autres variants génétiques restent à être trouvés. Néanmoins, dans l'étude actuelle, le rs6921438 explique 1% de la variabilité du HDL-C et 0.2% de celle du LDL-C.

Dans la présente étude, une approche gène candidat a été utilisée en se basant sur les 4 SNPs identifiés à partir d'un GWAS des taux du VEGF-A. L'utilisation d'un SNP identifié par GWAS comme candidat pour expliquer d'autres types de variation, pourrait aider à élucider les relations génétiques entre phénotypes et à identifier de nouveaux mécanismes biologiques associés aux pathologies. Nos résultats qui suggèrent une régulation génétique commune des lipides et du VEGF-A, peut supporter cette approche. Les taux plasmatiques du VEGF-A peuvent avoir une implication indirecte dans le métabolisme des lipides, au moins chez des individus censés être en bonne santé. Blann et al. [310] ont démontré que des sujets avec hyperlipémie comparés à des contrôles sains avaient des taux élevés de VEGF-A même si les auteurs n'ont trouvé aucune corrélation entre le VEGF-A et les niveaux de lipides. En plus, des résultats similaires ont été observés par Belgore et al. [311] dans une petite étude pilote sur des patients souffrant d'hypercholestérolémie. Dans l'étude de Kimura et al. [312], les niveaux de sérum de VEGF-A ont été négativement corrélés avec les niveaux de HDL-C, chez des adultes sains, cependant, cette corrélation a été observée seulement dans une population de sexe masculin. De plus, Sandhofer et al. [313] ont montré que les niveaux de plasma de VEGF-A étaient associés de façon négative avec les taux de TC et de LDL-C dans un échantillon féminin sain. Bien que la population de cette étude soit plus large que notre population de découverte, l'échantillon féminin est de façon significative plus âgé comparé aux nôtres. Comme observé précédemment [314], les niveaux de VEGF-A augmentent avec l'âge, notamment chez les femmes. Dans son ensemble, il semble que dans les populations supposées saines, le VEGF-A n'est pas associé avec les niveaux de lipides dans le sang. Donc, bien qu'un environnement génétique commun existe entre le

VEGF-A et les lipides sanguins, notamment le HDL-C et le LDL-C, une association de type 'clinique' ne peut pas être détectée dans des situations physiologiques. Cependant, la fonctionnalité de ces SNPs et l'éclaircissement des voies moléculaires qui sont impliquées devraient être déterminants pour d'autres études fonctionnelles y compris l'analyse transcriptomique de certaines protéines. L'hypertension est parmi les risques majeurs de MCV [27]. La présence de niveaux de lipides altérés et de l'hypertension sont des manifestations très fréquentes chez les sujets ayant des maladies cardiovasculaires. De plus, comme l'est un facteur communément présent chez les patients ayant des niveaux de lipides 'pathologiques', les effets des interactions avec des variables génétiques pourrait avoir une importance clinique. Ici, nous avons identifié un nouveau variant génétique qui a un effet sur les niveaux d'APO-E par le biais d'une interaction avec l'hypertension. L'interaction SNP \times hypertension que nous démontrons n'est pas due à une relation directe entre les deux composants de cette interaction. Plus précisément, nous avons identifié un effet significatif de l'interaction entre le rs4416670 et l'hypertension sur la diminution des niveaux d'APO-E. Les niveaux de APO-E sont connus pour être associés au polymorphisme commun d'APO-E; en particulier, nous avons précédemment montré que le génotype *APO-E* 2/2 contribue à des niveaux élevés d'APO-E et l'*APO-E* 4/4 à de faibles niveaux d'APO-E [315].

En conclusion, cette étude est la première dont le but était d'identifier une régulation génétique commune entre le VEGF-A et les lipides dans le sang. La sélection de populations en bonne santé est importante pour la compréhension de ces relations, le profil clinique, à la fois des lipides dans le sang et du VEGF-A, étant affecté par beaucoup de facteurs liés à la maladie ce qui complique la situation et ne permet pas l'obtention de résultats exploratoires. Un autre point fort de cette étude est la réplication des résultats les plus significatifs, sur une population indépendante, de même que l'utilisation de méta-analyses, ce qui a permis de valider ces résultats.

Enfin, l'identification d'une interaction pour les taux d'APO-E pourrait être importante pour la compréhension des mécanismes complexes qui définissent les phénotypes des MCV.

Publication N°3

Les gènes NOS3, CD14, MMP3 et IL4R liés à l'angiogenèse sont associés à l'expression génique et à la concentration plasmatique de VEGF-A dans des conditions physiologiques.

Saleh A*, Stathopoulou MG*, Azimi-Nezhad M, Ndiaye NC, Murray H, Masson C, Lamont J, Fitzgerald P, Visvikis-Siest S.

*Co-premiers auteurs

Manuscrit soumis: BMC Med Genet

Le VEGF-A est produit par différents types cellulaires dont les neutrophiles, les macrophages, les fibroblastes, les PBMC et les cellules endothéliales. Il s'agit d'un des régulateurs les plus puissants de l'angiogenèse et des concentrations élevées de VEGF-A dans le sang ont été associées à plusieurs types de cancer et d'autres maladies chroniques, telles que les maladies cardiovasculaires (cardiopathie ischémique, insuffisance cardiaque, accident vasculaire cérébral) et le diabète, ainsi qu'à des troubles du système immunitaire et des états inflammatoires [316]. La NOS3 produit localement et de manière continue de l'oxyde nitrique (NO). Le NO est un agent médiateur et/ou effecteur de l'angiogenèse qui a également un effet sur la fonction endothéliale ; il est donc impliqué dans la tonicité vasculaire, la résistance à l'insuline, le développement d'athérosclérose et le diabète de type 2 [317]. Le CD14 est un récepteur multifonctionnel impliqué dans plusieurs processus biologiques et physiopathologiques différents dont l'apoptose, les maladies inflammatoires, l'angiogenèse et le développement tumoral. De ce fait, il a été démontré que le CD14 constituait un candidat pour le développement de médicaments anticancéreux dirigés contre le développement tumoral et l'angiogenèse [318]. Les MMP sont des protéases dépendantes du zinc capables de dégrader d'autres enzymes [285]. Elles jouent un rôle dans certaines situations pathologiques caractérisées par une dégradation excessive de la matrice extracellulaire, par exemple lors de la métastase tumorale ou de l'artériosclérose. Plusieurs études ont mis en évidence des associations entre des MMP et le VEGF-A ainsi qu'une relation entre les MMP et l'angiogenèse [317]. L'IL4 est une glycoprotéine sécrétée par les lymphocytes T activés, les basophiles et les mastocytes [319]. Des études antérieures ont indiqué l'implication d'IL4 dans l'angiogenèse [320, 321].

Objectif

Examiner les éventuelles relations entre l'expression des quatre isoformes du gène *VEGF-A* (*VEGF-A*₁₂₁, *VEGF-A*₁₄₅, *VEGF-A*₁₆₅ et *VEGF-A*₁₈₉) et sa concentration plasmatique et les polymorphismes des gènes candidats angiogéniques *NOS3*, *CD14*, *MMP3* et *IL4* ainsi que leurs interactions épistatiques avec les polymorphismes liés au *VEGF-A*.

Méthodes- Populations

Quatre cent trois adultes d'origine française de la cohorte STANISLAS ont été sélectionnés en raison de la disponibilité d'informations complètes

Résultats

Association des polymorphismes étudiés sur les gènes NOS3, CD14, MMP3, IL-4R et IL4 avec l'expression génique et la concentration plasmatique en VEGF-A.

Après ajustement sur l'âge, le sexe et l'IMC, une association significative a été constatée entre le rs1799983 sur le gène *NOS3* et la concentration en ARNm du *VEGF-A*₁₄₅ ($\beta = 0,17$, $P = 0,033$ respectivement).

Aucun des polymorphismes sur les gènes *NOS3*, *CD14*, *MMP3*, *IL-4R* et *IL4* n'était associé avec la concentration plasmatique du *VEGF-A*.

Interactions épistatiques entre NOS3, CD14, MMP3, IL4R, IL4 et les polymorphismes associés au VEGF-A pour la concentration plasmatique en VEGF-A.

Des interactions épistatiques agissant sur la régulation de la concentration plasmatique du *VEGF-A* ont été observées pour six variants génétiques, rs1800779 et rs3918226 (*NOS3*), rs2569190 (*CD14*), rs3025058 (*MMP3*), rs1801275 (*IL4R*) et rs6921438 (*VEGF-A*). Plus précisément, le SNP rs1800779 sur *NOS3* interagit avec le rs3918226 sur le même gène ($\beta = 0,17$, $P = 0,022$) ainsi qu'avec le rs2569190 sur *CD14* ($\beta = -0,06$, $P = 0,042$), les deux interactions aboutissant à un effet inverse sur la concentration plasmatique du *VEGF-A* (respectivement une augmentation et une diminution). De plus, le rs1801275 sur *IL-4R* interagit avec le SNP associé au *VEGF-A* rs6921438, ce qui conduit à une augmentation de la concentration plasmatique du *VEGF-A* ($\beta = 0,07$, $P = 0,042$), ainsi qu'avec le rs3025058 sur *MMP3* pour donner l'effet inverse ($\beta = -0,09$, $P = 0,010$). Enfin, l'interaction entre le rs2569190 sur *CD14* et le rs3025058 sur *MMP3*

était associée à une augmentation significative de la concentration plasmatique du VEGF-A ($\beta = 0,07$, $P = 0,019$).

Effets des interactions SNP \times facteurs environnementaux sur la concentration plasmatique en VEGF-A.

Des interactions significatives ont été observées entre le SNP rs1800779 sur *NOS3* et HDL-C, triglycérides et obésité. L'interaction entre le rs1800779 et l'obésité et les triglycérides conduit à une diminution de la concentration plasmatique du VEGF-A ($\beta = -0,11$, $P = 0,018$, $\beta = 0,04$, $P = 0,043$ respectivement), alors que l'interaction entre ce même SNP et le HDL-C est associée à une augmentation de la concentration plasmatique du VEGF-A ($\beta = 0,12$, $P = 0,005$). Par ailleurs, le polymorphisme associé au VEGF-A rs6921438 interagit avec l'hypertension pour réduire la concentration du VEGF-A ($\beta = -0,18$, $P = 0,028$).

Discussion

Dans cette étude, nous avons mis en évidence des associations significatives entre les variants génétiques de *NOS3* et l'expression génique du *VEGF-A* dans une population d'individus en bonne santé. De plus, nous avons identifié des interactions épistatiques et gène \times environnement significatives impliquant des polymorphismes situés sur les gènes *NOS3*, *CD14*, *MMP3*, *IL4R* et *IL4*, ainsi que des polymorphismes associés au VEGF-A, qui agissent sur la concentration plasmatique en VEGF-A.

De nombreux SNPs ont été identifiés sur le gène *NOS3*. Parmi ces SNP, le variant commun G984T (rs1799983) situé sur l'exon 7 du gène modifie la séquence codante et entraîne la substitution d'un acide glutamique par un acide aspartique à la position 298 de la protéine, ce qui pourrait modifier l'activité enzymatique de cette dernière [322, 323]. Plusieurs études distinctes ont démontré que ce SNP est lié à un risque de spasme coronarien, de coronaropathie et d'infarctus du myocarde aigu [324-328].

Dans la présente étude, nous avons observé une association significative entre ce SNP et le niveau d'expression du *VEGF-A* (ARNm total du VEGF-A et expression de l'isoforme VEGF-A₁₄₅) ; l'allèle mineur de ce SNP étant associé à des niveaux plus élevés d'ARNm du VEGF-A. Cette association pourrait suggérer l'existence d'une voie de régulation de la transcription du *VEGF-A* impliquant *NOS3* dans les PBMC dans un contexte non pathologique, et de ce fait un nouveau lien moléculaire entre le VEGF-A et le NO. Il est à noter que lors d'une étude antérieure portant sur la même population, nous avons mis

en évidence des associations significatives entre l'isoforme VEGF-A₁₄₅ et l'expression de molécules impliquées dans l'adhésion cellulaire et l'inflammation (*ICAM-1*, *sélectine L* et *TNF-α*) [127]. Les présents résultats soulignent encore plus l'importance de cette isoforme dans la physiologie cardiovasculaire et son rôle en tant que molécule clé dans différentes pathologies. Par contre, aucun lien n'a été trouvé entre l'expression génique et/ou la concentration plasmatique en *VEGF-A* et les polymorphismes situés sur les gènes *CD14*, *MMP3*, *IL4R* et *IL4* dans notre population en bonne santé.

Dans la présente étude, nous rapportons également une interaction épistatique entre le SNP rs1800779 sur le gène *NOS3* et le SNP rs2569190 sur le gène *CD14* qui aboutit à une diminution significative de la concentration plasmatique en VEGF-A. Le SNP rs1800779 est situé en amont du gène dans la région promotrice et pourrait conduire à une production et une biodisponibilité moindres du NO. De la même façon, le SNP rs2569190 sur *CD14* est situé à la position -159 du gène et il a été lié à une augmentation de l'expression et de l'activité transcriptionnelle de *CD14* [329].

Par ailleurs, nous avons démontré que l'interaction entre deux SNPs situés sur le gène *NOS3*, rs1800779 et rs3918226, est associée à une augmentation significative de la concentration plasmatique en VEGF-A. Tout comme rs1800779, rs3918226 est situé dans la région promotrice du gène *NOS3* et bien qu'aucune étude fonctionnelle n'ait encore jamais porté sur ce SNP, plusieurs publications ont rapporté la présence d'un site de liaison de facteurs de transcription de la famille ETS à proximité de rs3918226, ce qui suggère qu'il pourrait éventuellement moduler l'expression de *NOS3* [330].

Il convient également de constater que dans la population en bonne santé étudiée dans cette étude, l'interaction épistatique entre le SNP rs1801275 sur *IL-4R* et le SNP rs6921438 associé au VEGF-A est associée à une augmentation significative de la concentration plasmatique en VEGF-A. L'action biologique de l'IL-4 est déclenchée lors de sa liaison aux récepteurs IL-4 qui à leur tour activent des voies de signalisation intracellulaires [331]. Le SNP rs1801275 sur le gène *IL-4R* conduit à la substitution d'une arginine en position 576 de la protéine par une glutamine, ce qui a pour résultat une suractivation des voies de signalisation de ce récepteur. De son côté, le SNP associé au VEGF-A rs6921438 est situé dans une région intergénique à 171 kb en aval du gène *VEGF-A* sur le chromosome 6p21.1. Lors d'une étude pangénomique antérieure, il a été démontré que l'allèle mineur de ce polymorphisme est associé à une baisse de la concentration en VEGF-A [281].

Des liens complexes ont été observés entre l'IL4 et le VEGF-A dans plusieurs contextes pathologiques. L'IL4 présente des propriétés pro-angiogéniques et pro-inflammatoires dans les poumons lors d'une exposition à une hypoxie chronique et il a été démontré que ces propriétés dépendaient de l'activation induite par l'hypoxie de la voie de signalisation du VEGF-A [332]. À l'inverse, il a été démontré que l'IL4 a une action anti-angiogénique dans plusieurs modèles de cancer où le taux d'expression du VEGF-A est élevé [333]. De même, chez des patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde, l'IL4 inhibe la production de VEGF-A par les fibroblastes synoviaux [334]. Les résultats de notre étude viennent étayer cette notion d'interactions/interférences entre le VEGF-A et l'IL4.

Un autre résultat de cette étude indique qu'il existe une interaction épistatique entre le SNP rs1801275 du gène *IL4R* et le SNP rs3025058 du gène *MMP3* qui est associée à une diminution significative de la concentration plasmatique en VEGF-A. Le SNP du gène *MMP3* est situé dans sa région promotrice. Un des allèles comporte une série de six adénosines (6A) à la position 1171 alors que l'autre n'en comporte que cinq (5A) [335]. Il a été démontré que les MMP interviennent dans différentes étapes du processus d'angiogenèse et qu'elles jouent un rôle important dans le développement des vaisseaux sanguins et de l'extension du réseau vasculaire tumoral [336]. De plus, les MMP peuvent augmenter la biodisponibilité du VEGF-A [337] et plusieurs études ont démontré que l'association entre les MMP et le VEGF-A contribue au développement de situations pathologiques (p. ex. l'invasion cancéreuse) [338-340]. Au vu des possibles interactions entre le VEGF-A et aussi bien l'IL4 que les MMP, il n'est pas surprenant que cette étude a permis de mettre en évidence des interactions significatives entre des SNP situés sur les gènes *IL4R* et *MMP3* et la concentration plasmatique en VEGF-A.

Pour l'analyse des interactions, nous avons retenu comme facteurs environnementaux l'hypertension, le tabagisme, le taux de lipides et l'obésité car ce sont les facteurs de risque dont l'impact environnemental est le plus important pour un grand nombre de maladies.

Nous avons observé des interactions entre le SNP rs1800779 sur le gène *NOS3* et le HDL-C, les triglycérides et l'obésité. Ces interactions sont associées à des concentrations plasmatiques en VEGF-A plus élevées pour le HDL-C, et plus faibles pour les triglycérides et l'obésité.

Loebig et al. [341] ont signalé une corrélation positive entre la concentration plasmatique en VEGF-A et l'IMC et des niveaux élevés de VEGF-A chez des individus en surpoids lorsque comparés à des personnes de poids normal ou faible. Sandhofer et al. [313] ont rapporté l'existence d'une corrélation positive entre la concentration plasmatique en VEGF-A et l'IMC chez les hommes, et une corrélation négative avec la graisse viscérale chez les femmes [313].

En conclusion, nos résultats impliquent NOS3, CD14, MMP3, IL4R, IL4 et les polymorphismes associés au VEGF-A dans la régulation du VEGF-A ouvrant de nouvelles perspectives de recherche dans le domaine des maladies chroniques dans lesquelles ces molécules sont impliquées.

Publication N°4

Les variants génétiques liés au VEGF-A et identifiés par GWAS sont associés au risque de l'obésité dans une population en bonne santé: interactions avec les lipides sanguins

Saleh A*, Stathopoulou MG*, Ndiaye NC, Chatelin J, Murray H, Masson C, Lamont J, Fitzgerald P, Visvikis-Siest S.

*Co-premiers auteurs

Manuscrit soumis: Int J Obesity

L'obésité est un des problèmes de santé les plus courants, elle est devenue une source de préoccupation pour la santé publique, en raison de ses effets négatifs sur la morbidité et la mortalité à des âges différents dans les pays développés et les pays en développement. L'obésité est associée à un risque accru de nombreux problèmes de santé, notamment les maladies cardiovasculaires, l'hypertension et le diabète de type 2. La diversité des formes de l'adiposité et l'obésité sont probablement produites par des interactions complexes entre le patrimoine génétique, l'alimentation et l'activité physique. L'angiogenèse est un processus complexe qui consiste en la croissance de vaisseaux sanguins à partir du système vasculaire existant. De nombreuses molécules angiogéniques ont été identifiées par ce processus. Parmi les principales molécules identifiées le VEGF-A est nécessaire pour l'initiation de la formation de vaisseaux immatures au cours du développement et chez l'adulte, et il est hautement spécifique d'un mitogène pour les cellules endothéliales. Qi et Claesson-Welsh [342] ont montré que le VEGF-A induit la migration cellulaire par des facteurs d'activation tels que la kinase d'adhésion focale (FAK) et Paxillin, également par la voie PI3 kinase / Akt. L'activation de FAK est liée à la région C-terminale de VEGF-R2. Le VEGF-A joue un rôle dans la voie p38 / MAPK stress qui est également impliquée dans la migration cellulaire et les inhibiteurs de p38 diminuent la migration cellulaire. Des études antérieures [258] ont démontré que l'angiogenèse a un rôle essentiel dans la modulation de l'adipogenèse et l'obésité en contrôlant le nombre des vaisseaux du tissu adipeux. Cependant, le rôle du VEGF-A et des polymorphismes associés n'a pas été étudié par rapport au développement de l'obésité.

Objectif

Evaluer les effets de polymorphismes liés au VEGF-A sur les traits de l'obésité chez les individus en bonne santé.

Méthodes- Populations

Quatre cent trois adultes d'origine française de la cohorte STANISLAS ont été sélectionnés en raison de la disponibilité d'informations complètes

Résultats

Associations de polymorphismes liés au VEGF-A avec l'IMC, le tour de taille, l'obésité centrale et l'obésité.

Des associations significatives avec l'obésité ont été observées pour le rs4416670 lié au VEGF-A (OR=0.738, $P=0.038$). L'allèle mineur de ce polymorphisme a été associé à une diminution du risque d'obésité. Aussi, il était significativement associée à une diminution du tour de taille ($\beta = -0.007$, $P = 0,023$). Aucune association significative n'a été trouvée pour les autres polymorphismes testés et aucun variant n'a eu d'effet direct significatif sur l'IMC et l'obésité centrale.

Interactions entre les polymorphismes liés au VEGF-A avec les lipides sanguins pour l'IMC, le tour de taille, l'obésité centrale et l'obésité

Des interactions significatives avec les triglycérides ont été observées pour l'IMC. Trois SNPs liés au VEGF-A ont été impliqués dans ces interactions: rs6921438, rs4416670 et rs10738760 ($\beta = 0.017$, $P=2.954 \times 10^{-5}$, $\beta = 0.012$, $P=0.001$, $\beta = -0.017$, $P=3.966 \times 10^{-6}$ respectivement).

Les interactions des rs6921438 et rs4416670 avec des triglycérides ont augmenté le risque d'obésité (OR=1.584, $P=0.002$; OR=1.476, $P=0.009$), tandis que le rs10738760 était associée à une diminution du risque de l'obésité (OR=0.668, $P=0.002$).

De très fortes interactions avec les triglycérides étaient présentes pour le tour de taille. Les interactions impliquant les rs6921438 et rs4416670 mais aussi le rs6993770 avaient un effet d'augmentation du tour de taille ($\beta = 0.014$, $P=1.5 \times 10^{-6}$, $\beta = 0.011$, $P=5.5 \times 10^{-5}$, $\beta = 0.009$, $P=0.029$ respectivement). Le SNP rs10738760 interagissait avec des triglycérides pour diminuer les niveaux de tour de taille ($\beta = -0.015$, $P=2.14 \times 10^{-8}$).

Des résultats similaires ont été observés pour les interactions avec les triglycérides et les SNPs ci-dessus pour l'obésité centrale, à l'exception de rs4416670 (rs6921438, OR=1.720, $P=0.008$; rs10738760, OR=0.677, $P=0.032$).

En outre, deux autres interactions significatives ont été observées. Une augmentant le risque d'obésité entre le rs4416670 et le cholestérol total (OR=1.497, $P=0.01$) et une diminuant le risque entre rs1799983 de *NOS3* et HDL-C (OR=0.274, $P=0.006$). En outre, l'interaction rs4416670 avec TC a augmenté de manière significative le tour de taille ($\beta = 0.006$, $P = 0,042$).

Discussion

L'obésité est une maladie multifactorielle résultant de l'interaction entre facteurs génétiques et environnementaux. Elle est devenue un problème de santé publique, mais reste un défi clinique majeur. Les phénotypes liés à l'obésité sont associés à un risque cardiovasculaire et à de nombreux autres problèmes de santé.

Nous avons trouvé clairement et de façon intéressante, que les variants liés au VEGF-A sont associés avec différents phénotypes liés à l'obésité directement ou par des interactions significatives avec des niveaux de lipides sanguins.

Le rs4416670 a montré un rôle protecteur contre le tour de taille et l'obésité. Cet effet a été inversé par une interaction avec les triglycérides et le cholestérol total. Ces interactions ont augmenté l'IMC, le tour de taille et le risque d'obésité générale. Ce SNP est intergénique entre *LOC100132354* (produisant un ARN non codant) et le gène *C6orf223* (codant pour une protéine non caractérisée) sur le chromosome 6p21.1, à 171 kb, et diminue les taux de VEGF-A [281].

Deux autres polymorphismes liés au VEGF-A (rs6921438 et rs10738760) ont interagi avec des triglycérides pour modifier les niveaux d'IMC, le risque d'obésité centrale et l'obésité générale (positivement pour rs6921438 et négativement pour rs10738760). Le SNP rs6921438 est un variant intergénique situé sur le chromosome 6p21.1, à 171 kb et il a été associé à une diminution des niveaux de VEGF-A circulant. D'autre part, le rs10738760 est un variant intergénique entre *KCNV2* et *VLDLR* sur le chromosome 6p21.1, et a été associé avec une augmentation des niveaux de VEGF-A circulant [281].

Une interaction significative a été décrite entre les triglycérides et rs6993770 pour l'augmentation du tour de taille. Le SNP rs6993770 présente l'association la plus significative avec les taux de VEGF-A [12]. Ce SNP est localisé dans le gène *ZFPM2*, à une distance de 980,4 kb sur le chromosome 8q23.1 [281].

En ce qui concerne les implications cliniques que nous avons constatées, à savoir, que les variants liés au VEGF-A montraient des associations significatives avec l'obésité et ses phénotypes, il serait intéressant d'évaluer si les personnes obèses réagissent

différemment aux programmes de perte de poids selon ces variants. Une telle découverte pourrait conduire à une gestion spécifique des sous-populations définies en fonction de leurs SNPs liés au VEGF-A. De plus, savoir que certains polymorphismes pourraient exposer à un risque plus ou moins grand d'obésité pourrait aider à donner des conseils plus individualisés. Le praticien pourrait alors les adapter à chaque patient et fournir un accompagnement personnalisé à la place de communiquer des recommandations générales.

En outre, des interactions significatives entre trois SNP liés au VEGF-A (rs6921438, rs4416670, rs107387760) avec des triglycérides pour l'obésité et de l'IMC, plaide pour un grand intérêt des régimes basés sur les triglycérides dans cette population pour prévenir l'obésité, tout en choisissant entre régimes faibles en graisses et faibles en glucides.

De plus, des interactions significatives ont été décrites entre des niveaux élevés de triglycérides avec rs6921438, rs6993770 et rs4416670 pour augmenter le tour de taille, tandis que, l'interaction entre rs10738760 avec les triglycérides réduisait le tour de taille. Comme mentionné précédemment, SNP rs10738760 est localisé très près du gène *VLDLR* et du gène *KCNV2*. Nous pourrions émettre l'hypothèse d'une interaction de ce SNP avec le gène *VLDLR*, qui a pour conséquence de diminuer l'entrée des triglycérides dans les adipocytes et donc le risque d'obésité.

En conclusion, l'ensemble des résultats de cette partie de thèse plaide pour influences génétiques des variants liés à VEGF-A sur la composition corporelle et le risque cardiovasculaire par les voies métaboliques impliquant le VEGF-A. Nos résultats pourraient être traduits dans la pratique clinique personnalisée.

Publication N°5

Les déterminants génétiques liés au VEGF-A sont impliqués dans la régulation de la pression artérielle.

Saleh A*, Stathopoulou MG*, Chatelin J, Ndiaye NC, El Shamieh S, Siest G, Masson C, Murray H, Kurth MJ, Lamont J, Fitzgerald P, Visvikis-Siest S

*Co-premiers auteurs

Manuscrit soumis: Hypertension

Le VEGF-A est un puissant facteur d'augmentation de la perméabilité vasculaire agissant principalement au niveau de la microvascularisation. L'HTA est caractérisée par une dysfonction endothéliale et une réduction de la vasodilatation médiée par l'endothélium [26] démontrées chez des patients ainsi que chez des modèles animaux [243]. L'HTA est une maladie multifactorielle résultant d'interactions complexes entre les composantes génétiques et environnementales [343]. La contribution génétique dans l'HTA essentielle se présente sous la forme de plusieurs allèles (de nombre et nature inconnus) qui pourront altérer la fonction et/ou l'expression des protéines codées, et par conséquent créer des phénotypes intermédiaires qui se compliqueraient en HTA [344].

Objectif

Examiner l'association entre les polymorphismes liés au *VEGF-A* et la PA.

Méthodes- Populations

Nous avons utilisé deux populations pour effectuer cette étude. Quatre cent trois adultes de la cohorte STANISLAS et 380 participants de la cohorte ApoEurope. Ce projet a été effectué avec des sujets ne prenant pas de médicaments antihypertenseurs.

Résultats

Associations de polymorphismes liés au VEGF-A avec les niveaux de pression artérielle :

Dans les deux populations, après ajustement pour l'âge, le sexe et l'IMC, une association significative a été observée entre rs4416670 de VEGF-A avec la pression pulsée (PP) ($\beta = 0,010$, $P = 0,048$ et $\beta = 0,010$, $P = 0,042$ respectivement).

Interactions gène \times gène avec la pression artérielle:

En ce qui concerne les interactions épistatiques, dans la population de découverte tous les variants génétiques ont été impliqués. Parmi ceux-ci, une interaction épistatique entre rs6921438 et rs10738760 était significative pour la PP dans les deux populations ($\beta_{\text{int}}=-0.01$, $P_{\text{int}}=0.026$ et $\beta_{\text{int}}=-0.01$, $P_{\text{int}}=0.043$ pour la population découverte et de réplification respectivement).

Discussion

Il est établi que de multiples déterminants génétiques et facteurs environnementaux contribuent à la régulation de la pression artérielle [345]. Cependant, les mécanismes synergiques en cause sont peu connus. L'étude d'association pangénomique la plus large menée à ce jour (réunissant près de 200 000 sujets) [346], a permis la mise en évidence de 29 loci associés à la pression artérielle systolique, diastolique et/ou à l'hypertension artérielle. Le score génétique construit à partir de ces 29 loci n'a néanmoins permis d'expliquer que 0,9% de la variabilité phénotypique de la pression artérielle [346]. L'observation d'une telle héritabilité manquante pourrait être expliquée par la non prise en compte de phénomènes épistatiques (interactions gène*gène) [347]. Dans la présente étude, nous avons démontré que des variants génétiques connus pour intervenir dans la régulation du VEGF-A étaient également impliqués dans la régulation de la pression artérielle. De plus, nous avons pu mettre en évidence l'existence d'interactions gène*gène significatives, renforçant ainsi l'intérêt de leur effet dans la régulation des traits associés à des pathologies humaines communes comme ici pour la pression artérielle.

Précisément, une association significative entre le SNP rs4416670C et la pression pulsée a été observée dans les populations initiale et de réplification de notre étude : l'allèle mineur de ce variant été associé à une augmentation significative de la pression pulsée alors que ce même allèle avait été associé avec une diminution du niveau de VEGF-A dans notre précédente étude d'association pangénomique [281]. Le SNP rs4416670 est localisé sur le chromosome 6p21.1 à 171 kb entre *LOC100132354* (dont l'ARN est non codant) et *C6orf223* (codant pour une protéine non caractérisée) en aval du gène *VEGF-A*. Certaines données d'expression du gène *C6orf223* ont montré une activation de l'hypoxie, ce qui augmente également la production de VEGF-A [146].

De plus, nous avons observé une interaction épistatique significative entre deux SNPs précédemment associés au VEGF-A (rs6921438G>A et rs10738760T>C) ayant un effet sur la pression pulsée dans les mêmes populations. Le SNP rs6921438G>A est un

variant intergénique localisé sur le chromosome 6p21.1, à 171kb en aval du gène *VEGF-A* qui a un effet délétère sur le système cardiovasculaire. Il diminue les niveaux de VEGF-A, augmente les lipoprotéines à basse densité et diminue les lipoprotéines à haute densité en conditions physiologiques [129, 281]. Cependant, la présente étude a montré que son interaction avec le SNP rs10738760 T>C, dont l'allèle mineur est associé avec une diminution des niveaux de VEGF-A, induit une diminution de la pression pulsée, démontrant ainsi que la combinaison de ces deux variants mène à profil cardiovasculaire plus favorable.

Une injection de fortes doses de VEGF-A chez le lapin induit une vasodilatation systémique causant une chute immédiate de la pression artérielle pouvant être inhibée par des inhibiteurs de l'oxyde nitrique synthase (NOS) [348]. Le VEGF-A, agissant à travers VEGFR2, active l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS) à travers AKT26, résultant par une augmentation de la production de NO vasodilatateur [349]. Les données évoquées ci-dessus démontrent l'intérêt d'exposer le fait que les variants impliqués dans une diminution des niveaux de VEGF-A étaient associés avec une augmentation de la pression pulsée dans deux populations Européennes indépendantes d'adultes non apparentés en conditions physiologiques.

L'angiogenèse joue un rôle central dans divers processus physiologiques. Des études chez l'animal ont montré que la délétion d'un allèle du gène *VEGF-A* induisait une angiogenèse immature et une insuffisance cardiaque menant à une létalité embryonnaire. Il est à noter que la perte d'un unique allèle au sein d'un gène mène rarement à la létalité chez les mammifères. Cette observation plaide pour l'importance de ce gène dans l'homéostasie angiogénique et le système cardiovasculaire [221, 222].

En condition hypoxique, les facteurs de croissance et les hormones telles que les œstrogènes activent l'expression de *VEGF-A* [146]. D'après les résultats obtenus par des études KO, VEGFR2 est le transducteur principal du message VEGF-A [350]. Le VEGF-A est sécrété dans les cellules déciduales, qui possèdent des récepteurs à progestérone, et est également impliqué pendant la grossesse dans l'angiogenèse déciduale et dans la remodelisation vasculaire de l'utérus en rapide croissance puis régression [351]. Dans la rétinopathie diabétique, la persistance de hauts niveaux glycémiques, avec la production de produits de glycation avancée, cause des dommages au lit capillaire rétinien et des ischémies rétiniennes qui aboutissent à la production de VEGF-A [352]. L'hypoxie mène à la production d'*Hypoxia Inducible Factors 1* (HIF-1) stimulant l'expression de VEGF-A et la néovascularisation oculaire [133, 353]. La

dégénérescence vasculaire liée à l'âge (DMLA) est devenue la cause la plus importante de perte de vision sévère et irréversible après 55 ans dans les pays développés, la néovascularisation choroïdienne étant responsable de la plus part des pertes sévères de vision liées à la DMLA, avec encore une fois l'implication du VEGF-A [354].

Dans le cas des cancers, la croissance de la tumeur nécessite une néovascularisation. Des études sur le VEGF-A ont mené au développement d'inhibiteurs de la tyrosine kinase (TKIs) ayant pour cible les récepteurs à VEGF-A (VEGFR) en partant du principe que le VEGF était d'avantage nécessaire à la croissance tumorale qu'à la maintenance de l'angiogenèse. Les essais cliniques en sont à leurs débuts mais il reste encore à évaluer l'intérêt de différentes thérapies anti-angiogéniques dans divers cancers.

Les traitements anti VEGFR ont fait leurs preuves dans différents types de néoplasmes solides comme le carcinome de la cellule rénale [355-358], le cancer colorectal métastatique [359-361] et pour d'autres maladies cancéreuses comme le cancer de l'œsophage, le glioblastome, le gliome malin, le cancer ovarien, le cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC), les tumeurs neuro-endocrines du pancréas ou de l'intestin ou les mélanomes [362-374].

Il est très important de noter que, dans les études cliniques chez l'animal et l'humain, les traitements anti VEGFR ont été associés à l'hypertension [375]. Leur prescription mène à une pression artérielle systolique, diastolique et pulsée augmentée, ces effets s'annulant totalement en cas d'interruption du traitement. S'ajoutant à la nécessité de traitement antihypertenseurs, ceci pourrait avoir des conséquences cliniques. Premièrement, les cliniciens devraient considérer le développement de l'hypertension comme un signe indirect de compliance au traitement. De plus, une hypertension sous anti VEGFR a été considérée puis confirmée comme un prédicteur potentiel de leur efficacité contre le cancer. Par exemple, une étude de Rautolia et al. a montré que parmi les patients traités par sunitinib, un anti VEGFR, 33% développaient une hypertension au-delà du stade 2. Cet effet indésirable a été associé avec une plus longue survie sans progression de tumeur [376]. Cependant, il est important de noter que les patients traités pour le cancer sont en général âgés, et souffrent très souvent d'hypertension ou sont sous traitement antihypertenseurs, ce qui souligne l'importance de l'implémentation de protocoles personnalisés adaptés.

Nos résultats démontrent tous deux une relation entre le SNP rs4416670 et les tendances à l'hypertension ainsi que le lien entre hypertension et pronostic d'un traitement anti VEGFR. Nous pouvons formuler l'hypothèse selon laquelle une susceptibilité

pharmacogénomique aurait des effets sur l'efficacité des anti VEGFR sur le développement du cancer. L'allèle mineur du SNP rs4416670 est associé à une diminution du niveau plasmatique du VEGF-A et ce SNP est responsable de 1,5% de la variabilité génétique du VEGF-A plasmatique [281]. En comparaison, l'allèle majeur est responsable d'une augmentation du niveau plasmatique de VEGF-A et d'une pression pulsée diminuée.

De plus, une étude de Minardi et al. [377] a suggéré une potentielle utilisation de l'expression de VEGF-A dans les cellules tumorales comme un marqueur pronostic de survie sans métastase distante ou de survie générale en réponse au sunitinib chez les patients avec cellules rénales claires métastatiques mais le niveau de VEGF-A plasmatique n'apparaissait pas comme un marqueur prometteur de bonne réponse au traitement. L'expression en VEGF-A de cellules tumorales pourrait être aussi élevée que ses niveaux plasmatiques génétiquement hérités, et ainsi, à la lumière de nos résultats, l'hypothèse selon laquelle l'information génomique venant du VEGF-A pourrait interférer dans les traitements anti VEGFR du cancer devrait être sérieusement investiguée. Ceci dans le but de choisir le traitement et/ou ses doses dans de futures approches pharmacogénomiques.

En conclusion, des associations significatives ainsi que des interactions gène*gène ont été observées pour la pression pulsée et ont démontré le rôle complexe de l'angiogenèse dans la régulation de la pression artérielle. Nos résultats vont dans le sens de l'existence d'une relation entre le gène *VEGF-A* et la pression artérielle en conditions physiologiques. La compréhension de ces associations pourrait promouvoir la connaissance des mécanismes moléculaires et des processus de médiation de la régulation de la pression artérielle et apporter des perspectives pour l'utilisation clinique de ces associations génétiques dans la réponse aux traitements anticancéreux avec agents anti-VEGF-A.

Publication N°6

Association des variants génétiques du VEGF-A agissant en cis et en trans avec le syndrome métabolique et ses composants.

Azimi-Nezhad M*, Stathopoulou MG*, Murray H, Mirhafez, Ndiye NC, **Saleh A**, Rancier M, Bahrami A, Varasteh A, Bonnefond A, Masson C, Herbeth B, Lamont J, Fitzgerald P, Chayour-Mobarhan M, Visvikis-Siest S.

*Co-premiers auteurs.

Manuscrit soumis: Gene

Le syndrome métabolique, étroitement lié à l'obésité, est un ensemble de facteurs de risque interdépendants associés à une altération de l'angiogenèse et semble promouvoir directement le développement de MCV [378-380]. Plusieurs publications et nos travaux précédents ont signalé la corrélation positive entre le VEGF-A, l'indice de masse corporelle et l'obésité viscérale [381, 382]. Des études épidémiologiques ont pu montrer qu'une accumulation de graisse viscérale, et non de graisse sous-cutanée, représente le principal facteur déterminant des taux de VEGF-A circulant [382, 383]. Des associations significatives ont été également trouvées entre les taux de HDL-C et de VEGF-A. Ainsi, le VEGF-A pourrait constituer une molécule clé reliant l'obésité, l'inflammation, le SM et ses composants associés. Les publications traitant de la relation entre le VEGF-A et le SM ainsi que ses composants associés sont peu nombreuses [379, 384].

Objectif

Évaluer les possibles associations du SM et de ses composants liés au métabolisme du glucose avec les taux de VEGF-A circulant et les SNPs associés au VEGF-A dans deux populations en bonne santé.

Méthodes- Populations

Nous avons utilisé deux populations pour effectuer cette étude. Quatre cent trois adultes de la cohorte STANISLAS et 357 individus sains de la cohorte Iranienne (MASHAD Study).

Résultats

Association entre les taux plasmatiques du VEGF-A et le syndrome métabolique

Aucune association statistiquement significative n'a été observée entre les taux plasmatiques de VEGF-A, le SM ainsi que ses composantes liés au métabolisme du glucose dans les deux populations.

Associations de polymorphismes liés au VEGF-A avec le syndrome métabolique

Le rs10738760 était significativement associé avec le SM. La présence de l'allèle mineur A de rs10738760 a été associée à une diminution du risque de SM (OR=0.47, $P=0.010$). En ce qui concerne l'effet des variants dans la population de réplication, il y a une association entre rs6993770 et le SM (OR=1.5, $P=0.028$). La méta-analyse des résultats des deux populations concernant l'effet des polymorphismes sur le SM a été réalisée et ses résultats ont confirmé l'effet protecteur significatif de l'allèle mineur A de la rs10738760 ($P = 0,03$, OR = 0,73). Par contre, aucun polymorphisme n'était associé avec les composantes du SM.

Discussion

Dans cette étude, nous avons examiné les associations du syndrome métabolique, de ses composants et de certains facteurs de risque des maladies cardiovasculaires avec les niveaux de VEGF-A et les variants génétiques liés au VEGF-A. Nous rapportons une association significative de rs10738760 avec le syndrome métabolique. Les études épidémiologiques montrent que l'accumulation de graisse viscérale est une des causes du SM [385]. Un des facteurs déterminants est les taux circulants de VEGF-A [258]. Une preuve très récente indique que l'augmentation du tissu adipeux de l'angiogenèse induite par le VEGF-A est un phénomène de protection contre l'hypoxie induite par l'obésité et, par conséquent, la résistance à l'insuline [386]. Dans cette étude, nous n'avons pas obtenu une relation significative entre le SM (ou ses composants) et les niveaux de VEGF-A plasmatiques observés par Lieb et al. [387]. Il semble qu'un certain nombre de différences entre nos populations et les leurs telle que l'indice de l'obésité pourraient expliquer ces écarts. Tarantino et al. [388], dans une étude cas témoins, a trouvé un taux de VEGF-A circulant élevé chez les individus avec un SM par rapport aux sujets sains. Les taux plasmatiques de VEGF-A sont augmentés chez les individus atteints d'hyperlipidémie, d'obésité et les patients diabétiques de type 2 avec ou sans athérosclérose établie. Les lipides ainsi que l'abaissement du glucose soit avec la fluvastatine ou le fénofibrate et la metformine se traduisent par une réduction significative des taux de VEGF-A [310, 389]. Par conséquent, il n'est pas clair si les

niveaux de VEGF-A élevés sont un facteur délétère et/ou une réponse physiologique de rétroaction négative empêchant la progression de l'ischémie dans l'état métabolique ischémique [378] ainsi que dans le SM [379, 387]. L'allèle mineur du rs10738760 a été associé à SM, montrant un effet protecteur dans la cohorte d'étude. Le SNP 10738760 est situé en 9p24.2, il est intergénique, près du gène du récepteur au *VLDLR* et du gène *KCNV2* de la famille des canaux potassiques voltage-dépendants [281] Récemment, nous avons rapporté que rs10738760 up-régule et explique environ 5% de la variation des taux circulants de VEGF-A [281]. Plus avant, nos analyses des voies métaboliques impliquées nous ont fait estimer plausibles, dans l'étude mentionnée, des liens biologiques au niveau des locus entre les gènes du *VEGF-A* et du récepteur du VLDL. Le gène du récepteur du VLDL code pour un récepteur de lipoprotéines qui est un membre de la famille des LDLR et joue un rôle important dans le métabolisme des VLDL et des triglycérides [390]. Cependant, nous avons fait état d'une absence d'association entre rs6921438 et rs10738760 et la glycémie à jeun, l'insulinémie à jeun, le risque de diabète de type 2, la néphropathie diabétique et la rétinopathie. Ces résultats sont également observés dans l'étude actuelle, où aucune association des SNPs associés au VEGF-A n'est observée pour les traits constitutifs du SM liés au métabolisme du glucose. Concernant les traits du métabolisme lipidique, nous avons également montré précédemment l'association de rs6921438 avec le LDL-C et le HDL-C, mais encore une fois le rs10738760 n'était pas significativement associé à des phénotypes lipidiques [129]. Cette constatation confirme les résultats de la présente étude; rs10738760 a un effet direct sur le risque de syndrome métabolique, qui est indépendant de ses composantes. Ce SNP est un nouveau polymorphisme associé au risque de SM car il n'a pas été identifié dans le précédent GWAS sur ce domaine.

En conclusion, dans ce travail nous avons identifié un nouveau biomarqueur de risque de SM impliquant l'angiogenèse.

V. Discussion général, conclusions et perspectives

Notre équipe d'accueil, UMR U1122 ; « Interactions Gène-Environnement en Physiopathologie Cardio-Vasculaire » (CRB IGE-PCV), a une longue expérience dans l'étude de la génétique des MCV et a pu mettre en évidence de nombreux variants et phénotypes intermédiaires impliqués dans la susceptibilité à ces maladies polygéniques qui sont dues à de multiples facteurs de susceptibilité génétiques et environnementaux qui peuvent interagir entre eux. D'autre part le développement du système vasculaire est un processus hautement régulé et se compose de deux processus successifs : la vasculogénèse et l'angiogénèse dans lequel VEGF-A joue un rôle central.

Comme évoqué précédemment, du fait de la complexité de sa biologie et de son importance dans le développement et le traitement de maladies complexes comme les pathologies cardiovasculaires et le cancer, le VEGF-A a fait l'objet d'une approche intégrée détaillée.

Ainsi, les chercheurs de notre équipe ont précédemment estimé que l'héritabilité génétique additive des taux de VEGF-A dans le plasma était de 60,5 % de la variance totale du trait dans un échantillon de familles de la cohorte STANISLAS [291]. Des valeurs de base pour le déterminant biologique et des valeurs de référence ont également été établies, et indiquent que l'âge, la numération plaquettaire et l'activité aminotransférase sont des facteurs à prendre en compte chez les enfants et les adultes [314].

L'étape suivante a été consacrée à la réalisation d'une grande étude GWAS incluant un échantillon de familles de la cohorte STANISLAS. Elle a permis d'identifier les déterminants génétiques des taux de VEGF-A dans le sang [281]. En effet, les progrès très importants réalisés depuis 2007 dans notre Unité, dans les modèles génétiques, la connaissance de la structure du génome humain et dans les techniques de génotypage ont permis la réalisation de cette étude d'association pangénomique qui a constitué un outil précieux pour étudier la base génétique du VEGF-A.

Quatre polymorphismes mononucléotidiques localisés sur 3 chromosomes, parmi 25 SNPs génotypés, étaient associés de manière significative et indépendante à la concentration en VEGF-A et ont permis d'expliquer environ 50 % de l'héritabilité de ce phénotype [281]. Dans la même étude, une approche transcriptomique menée sur les (PBMCs) de sujets de la cohorte STANISLAS a également conduit à l'identification de 6 SNPs associés de manière significative aux niveaux de l'ARNm du VEGF-A₁₂₁. L'annotation des SNPs et l'utilisation d'un logiciel d'analyse des voies métaboliques a permis d'identifier un réseau putatif de gènes fonctionnels [281].

Au vu du fort pourcentage d'héritabilité du VEGF-A expliqué par les SNPs ainsi identifiés, dans le cadre de cette thèse, nous avons retenu ces polymorphismes pour une analyse plus approfondie des éventuelles relations moléculaires entre le VEGF-A et d'autres endophénotypes cardiovasculaires dans le but d'étudier les voies physiologiques qui interviennent dans le développement des MCV. Parmi ces endophénotypes, l'hypertension artérielle, l'hypercholestérolémie, le syndrome métabolique et l'obésité sont des facteurs de risque classiques et bien connus. On a ajouté à ces facteurs les molécules pro-inflammatoires tels que l'IL4, l'IL6, et les TNF- α , les molécules d'adhésion cellulaire (VCAM-1, ICAM-1 et sélectines S).

Nous avons poursuivi un intéressant axe de recherche, basé notamment sur la transcriptomique, pour mettre en évidence l'implication des médiateurs inflammatoires, lipidiques, de la pression artérielle, des gènes candidats angiogéniques, de l'obésité et du syndrome métabolique, dans la prédisposition à la MCV.

Plus particulièrement, nous avons réussi à:

A-Identifier des associations et des interactions épistasiques avec les molécules d'adhésion et d'inflammation et démontrer ainsi l'existence de voies de signalisation communes entre le VEGF-A, les molécules d'adhésion cellulaire et les molécules d'inflammation qui pourraient permettre d'expliquer la large gamme de fonctions du VEGF-A dans différentes situations pathologiques.

B-Identifier des associations significatives avec les taux de lipides sanguins et des interactions gène \times environnement indiquant qu'il existe un lien biologique entre le VEGF-A et les lipides dans le sang.

C-Identifier des associations, et des interactions gène \times environnement et des interactions épistasiques avec des gènes d'angiogénèse (*NOS3*, *CD14*, *MMP3*) et proposer ainsi des nouveaux liens moléculaires suggérant l'existence des voies de régulation communes de ces molécules.

D-Identifier des associations et des interactions gène \times environnement avec l'obésité indiquant qu'elle dépendrait des taux de VEGF-A dans une large cohorte de participants hommes et femmes avec poids normal et différents états métaboliques.

E-Identifier des associations significatives et des interactions épistasiques avec l'hypertension et proposer un lien génétique entre le VEGF-A et l'hypertension qui pourrait aboutir à de nouvelles cibles médicamenteuses.

F-Identifier des associations avec le SM et proposer un nouveau polymorphisme associé avec le syndrome métabolique.

Nous avons également pu obtenir des résultats très intéressants impliquant les quatre SNPs étudiés. Une synthèse de ces résultats est représentée dans la (Figure 18).

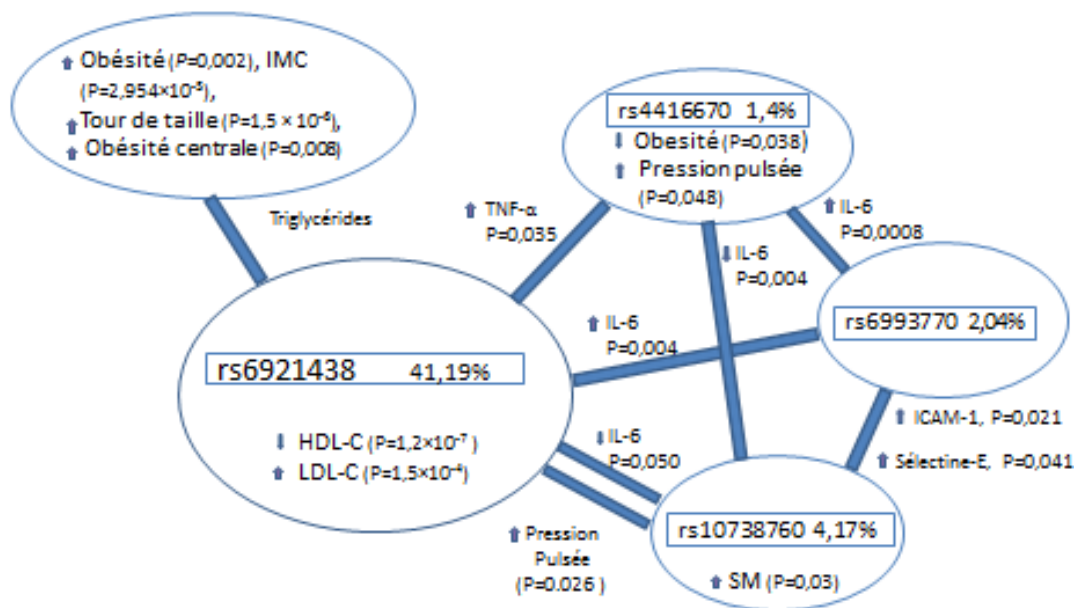


Figure 18: Représentation schématique des effets des 4 variants liés au VEGF-A.

Pour le SNP rs6921438, expliquant 41% de la variabilité interindividuelle du taux du VEGFA, l'allèle mineur est fortement associé avec les plus faibles niveaux de VEGFA. Le rs6921438 pourrait avoir un effet négatif sur le système cardiovasculaire par le biais d'une diminution des HDL-C, une augmentation des niveaux de LDLC, avec en même temps une baisse des niveaux du VEGFA.

De plus, des interactions significatives ont été observées entre ce SNP et les triglycérides pour l'IMC, l'obésité, le tour de taille et l'obésité centrale.

Au niveau d'interaction gène \times gène, des interactions épistatiques significatives ont été identifiées entre ce SNP et rs4416670, rs6993770 et rs10738760 pour les concentrations en TNF- α , IL-6 et la pression pulsée.

Pour le rs10738760 (expliquant 4,17% de la variabilité du VEGF) une association significative a été identifiée entre ce SNP et le syndrome métabolique.

Au niveau d'interaction gène \times gène, des interactions épistatiques significatives supplémentaires ont été identifiées entre ce SNP et rs6993770 et rs4416670 pour les concentrations de sélectine E, d'ICAM-1 et d'IL-6.

Pour le rs6993770 (expliquant 2,04 % de la variabilité du VEGF) une interaction épistatique significative supplémentaire a été identifiée entre ce SNP et le rs4416670 pour la concentration d'IL-6.

Pour le rs4416670 (expliquant 1,04% de la variabilité du VEGF) une association significative a été identifiée entre ce SNP et la pression pulsée, l'obésité et le tour de taille.

En conclusion, dans cette thèse, nous avons appliqué une stratégie intégrative pour l'étude du VEGF-A et plus particulièrement pour l'investigation des mécanismes d'interaction gène-gène-environnement.

Les quatre SNPs identifiés par l'étude GWAS ont été analysés pour des éventuelles associations avec les taux de molécules d'adhésion et inflammatoires dans le sang, avec les taux de lipides et la présence du SM chez des adultes supposés sains. Des résultats probants ont été obtenus et suggèrent une régulation génétique commune du VEGF-A et de ces endophénotypes cardiovasculaires.

En plus de l'approche génétique, nos travaux incluaient des approches fonctionnelles. Des données transcriptomiques ont été utilisées pour évaluer l'influence des quatre SNPs et de l'expression des isoformes du VEGF-A (concentrations d'ARNm) sur l'expression des molécules d'adhésion et d'inflammation dans les PBMCs.

Cela a permis de mettre en évidence des associations significatives, soutenant l'hypothèse que ces molécules s'inter-régulent significativement dans des conditions physiologiques.

Cependant, les résultats de nos travaux nécessitent d'être validés cliniquement mais sans aucun doute, l'intégration des interactions gène-gène et gène-environnement à l'échelle pangénomique, permettra de dévoiler une grande partie de la part d'ombre de l'héritabilité génétique des endophénotypes cardiovasculaires.

Dans l'avenir, il faut prendre en compte le fait que les GWAS présentent des limitations importantes. Par exemple le manque de logiciels statistiques adéquats pour l'analyse des interactions et la couverture incomplète des variants génétiques et phénotypiques empêchant la mise en évidence des associations génétiques et les qualités de réplication. Il est probable que certaines de ces limitations seront surmontées avec les nouvelles technologies essentiellement basées sur l'étude du génome entier [391].

Par les résultats de notre thèse il ressort qu'une étude approfondie et une compréhension des interactions gène-gène-environnement sont indispensables pour la proposition de nouveaux biomarqueurs, en particulier dans des maladies très complexes.

Ces biomarqueurs permettaient d'améliorer le diagnostic et le pronostic de ces maladies, de mettre en place des différentes stratégies de prévention et de thérapeutique adaptée et de comprendre comment certains médicaments produisent des effets inverses dans différentes situations pathologiques.

VI. Références bibliographiques

- [1] Golia E, Limongelli G, Natale F, Fimiani F, Maddaloni V, Pariggiano I, et al. Inflammation and cardiovascular disease: from pathogenesis to therapeutic target. *Current atherosclerosis reports*. 2014;16:435.
- [2] Luscher TF, Tanner FC, Tschudi MR, Noll G. Endothelial dysfunction in coronary artery disease. *Annual review of medicine*. 1993;44:395-418.
- [3] Morganti M, Carpi A, Nicolini A, Gorini I, Glaviano B, Fini M, et al. Atherosclerosis and cancer: common pathways on the vascular endothelium. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2002;56:317-24.
- [4] Tuomilehto J, Tanskanen A, Salonen JT, Nissinen A, Koskela K. Effects of smoking and stopping smoking on serum high-density lipoprotein cholesterol levels in a representative population sample. *Preventive medicine*. 1986;15:35-45.
- [5] Jousilahti P, Vartiainen E, Tuomilehto J, Puska P. Twenty-year dynamics of serum cholesterol levels in the middle-aged population of eastern Finland. *Annals of internal medicine*. 1996;125:713-22.
- [6] National High Blood Pressure Education Program Working Group report on primary prevention of hypertension. *Archives of internal medicine*. 1993;153:186-208.
- [7] Jousilahti P, Tuomilehto J, Vartiainen E, Valle T, Nissinen A. Body mass index, blood pressure, diabetes and the risk of anti-hypertensive drug treatment: 12-year follow-up of middle-aged people in eastern Finland. *Journal of human hypertension*. 1995;9:847-54.
- [8] Johnson A. Sex differentials in coronary heart disease: the explanatory role of primary risk factors. *Journal of health and social behavior*. 1978;18:46-54.
- [9] Larsson B, Bengtsson C, Bjorntorp P, Lapidus L, Sjostrom L, Svardsudd K, et al. Is abdominal body fat distribution a major explanation for the sex difference in the incidence of myocardial infarction? The study of men born in 1913 and the study of women, Goteborg, Sweden. *American journal of epidemiology*. 1992;135:266-73.
- [10] Bonithon-Kopp C, Scarabin PY, Darne B, Malmejac A, Guize L. Menopause-related changes in lipoproteins and some other cardiovascular risk factors. *International journal of epidemiology*. 1990;19:42-8.
- [11] Matthews KA, Meilahn E, Kuller LH, Kelsey SF, Caggiula AW, Wing RR. Menopause and risk factors for coronary heart disease. *The New England journal of medicine*. 1989;321:641-6.
- [12] Grady D, Rubin SM, Petitti DB, Fox CS, Black D, Ettinger B, et al. Hormone therapy to prevent disease and prolong life in postmenopausal women. *Annals of internal medicine*. 1992;117:1016-37.
- [13] Shahar E, Folsom AR, Salomaa VV, Stinson VL, McGovern PG, Shimakawa T, et al. Relation of hormone-replacement therapy to measures of plasma fibrinolytic activity. *Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study Investigators. Circulation*. 1996;93:1970-5.
- [14] Anderson KM. A nonproportional hazards Weibull accelerated failure time regression model. *Biometrics*. 1991;47:281-8.
- [15] Anderson KM, Odell PM, Wilson PW, Kannel WB. Cardiovascular disease risk profiles. *American heart journal*. 1991;121:293-8.
- [16] Heliövaara M, Karvonen MJ, Vilhunen R, Punsar S. Smoking, carbon monoxide, and atherosclerotic diseases. *British medical journal*. 1978;1:268-70.
- [17] Doll R, Gray R, Hafner B, Peto R. Mortality in relation to smoking: 22 years' observations on female British doctors. *British medical journal*. 1980;280:967-71.
- [18] Doll R, Peto R. Mortality in relation to smoking: 20 years' observations on male British doctors. *British medical journal*. 1976;2:1525-36.
- [19] Smith FB, Lowe GD, Fowkes FG, Rumley A, Rumley AG, Donnan PT, et al. Smoking, haemostatic factors and lipid peroxides in a population case control study of peripheral arterial disease. *Atherosclerosis*. 1993;102:155-62.
- [20] Meade TW, Imeson J, Stirling Y. Effects of changes in smoking and other characteristics on clotting factors and the risk of ischaemic heart disease. *Lancet*. 1987;2:986-8.
- [21] Ogston D, Bennett NB, Ogston CM. The influence of cigarette smoking on the plasma fibrinogen concentration. *Atherosclerosis*. 1970;11:349-52.
- [22] Craig WY, Palomaki GE, Haddow JE. Cigarette smoking and serum lipid and lipoprotein concentrations: an analysis of published data. *BMJ (Clinical research ed)*. 1989;298:784-8.
- [23] Belgore FM, Blann AD, Li-Saw-Hee FL, Beevers DG, Lip GY. Plasma levels of vascular endothelial growth factor and its soluble receptor (SFlt-1) in essential hypertension. *The American journal of cardiology*. 2001;87:805-7, A9.

- [24] Tsai WC, Li YH, Huang YY, Lin CC, Chao TH, Chen JH. Plasma vascular endothelial growth factor as a marker for early vascular damage in hypertension. *Clinical science (London, England : 1979)*. 2005;109:39-43.
- [25] Ayerden Ebinc F, Haksun E, Ulver DB, Koc E, Erten Y, Reis Altok K, et al. The relationship between vascular endothelial growth factor (VEGF) and microalbuminuria in patients with essential hypertension. *Internal medicine (Tokyo, Japan)*. 2008;47:1511-6.
- [26] Zorena K, Mysliwska J, Mysliwiec M, Rybarczyk-Kapturska K, Malinowska E, Wisniewski P, et al. Association between vascular endothelial growth factor and hypertension in children and adolescents type I diabetes mellitus. *Journal of human hypertension*. 2010;24:755-62.
- [27] Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*. 2002;106:3143-421.
- [28] Stamler J, Neaton JD. The Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT)--importance then and now. *Jama*. 2008;300:1343-5.
- [29] Voight BF, Peloso GM, Orho-Melander M, Frikke-Schmidt R, Barbalic M, Jensen MK, et al. Plasma HDL cholesterol and risk of myocardial infarction: a mendelian randomisation study. *Lancet*. 2012;380:572-80.
- [30] Werner C, Filmer A, Fritsch M, Groenewold S, Graber S, Bohm M, et al. Risk prediction with triglycerides in patients with stable coronary disease on statin treatment. *Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society*. 2014;103:984-97.
- [31] Arsenault BJ, Lemieux I, Despres JP, Wareham NJ, Kastelein JJ, Khaw KT, et al. The hypertriglyceridemic-waist phenotype and the risk of coronary artery disease: results from the EPIC-Norfolk prospective population study. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*. 2010;182:1427-32.
- [32] Di Angelantonio E, Sarwar N, Perry P, Kaptoge S, Ray KK, Thompson A, et al. Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease. *Jama*. 2009;302:1993-2000.
- [33] Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults--The Evidence Report. National Institutes of Health. *Obesity research*. 1998;6 Suppl 2:51S-209S.
- [34] Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet*. 1998;352:837-53.
- [35] Malik S, Wong ND, Franklin SS, Kamath TV, L'Italien GJ, Pio JR, et al. Impact of the metabolic syndrome on mortality from coronary heart disease, cardiovascular disease, and all causes in United States adults. *Circulation*. 2004;110:1245-50.
- [36] Shamsuzzaman AS, Winnicki M, Lanfranchi P, Wolk R, Kara T, Accurso V, et al. Elevated C-reactive protein in patients with obstructive sleep apnea. *Circulation*. 2002;105:2462-4.
- [37] Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*. 1995;95:2409-15.
- [38] Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R, Simsolo RB. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *The Journal of clinical investigation*. 1995;95:2111-9.
- [39] Rabkin SW, Mathewson FA, Hsu PH. Relation of body weight to development of ischemic heart disease in a cohort of young North American men after a 26 year observation period: the Manitoba Study. *The American journal of cardiology*. 1977;39:452-8.
- [40] Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *Jama*. 2001;285:2486-97.
- [41] Lichtenstein AH, Appel LJ, Brands M, Carnethon M, Daniels S, Franch HA, et al. Diet and lifestyle recommendations revision 2006: a scientific statement from the American Heart Association Nutrition Committee. *Circulation*. 2006;114:82-96.
- [42] Nettleton JA, Steffen LM, Mayer-Davis EJ, Jenny NS, Jiang R, Herrington DM, et al. Dietary patterns are associated with biochemical markers of inflammation and endothelial activation in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *The American journal of clinical nutrition*. 2006;83:1369-79.
- [43] Nettleton JA, Steffen LM, Palmas W, Burke GL, Jacobs DR, Jr. Associations between microalbuminuria and animal foods, plant foods, and dietary patterns in the Multiethnic Study of Atherosclerosis. *The American journal of clinical nutrition*. 2008;87:1825-36.
- [44] Kesaniemi YK, Danforth E, Jr., Jensen MD, Kopelman PG, Lefebvre P, Reeder BA. Dose-response issues concerning physical activity and health: an evidence-based symposium. *Medicine and science in sports and exercise*. 2001;33:S351-8.

- [45] Berlin JA, Colditz GA. A meta-analysis of physical activity in the prevention of coronary heart disease. *American journal of epidemiology*. 1990;132:612-28.
- [46] Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2006;23:469-80.
- [47] Stern MP, Williams K, Gonzalez-Villalpando C, Hunt KJ, Haffner SM. Does the metabolic syndrome improve identification of individuals at risk of type 2 diabetes and/or cardiovascular disease? *Diabetes care*. 2004;27:2676-81.
- [48] Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988;37:1595-607.
- [49] Balkau B, Charles MA. Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 1999;16:442-3.
- [50] Sen U, Mishra PK, Tyagi N, Tyagi SC. Homocysteine to hydrogen sulfide or hypertension. *Cell biochemistry and biophysics*. 2010;57:49-58.
- [51] Abahji TN, Nill L, Ide N, Keller C, Hoffmann U, Weiss N. Acute hyperhomocysteinemia induces microvascular and macrovascular endothelial dysfunction. *Archives of medical research*. 2007;38:411-6.
- [52] Weiss N. Mechanisms of increased vascular oxidant stress in hyperhomocysteinemia and its impact on endothelial function. *Current drug metabolism*. 2005;6:27-36.
- [53] Iso H, Moriyama Y, Sato S, Kitamura A, Tanigawa T, Yamagishi K, et al. Serum total homocysteine concentrations and risk of stroke and its subtypes in Japanese. *Circulation*. 2004;109:2766-72.
- [54] Wierzbicki AS. Homocysteine and cardiovascular disease: a review of the evidence. *Diabetes & vascular disease research : official journal of the International Society of Diabetes and Vascular Disease*. 2007;4:143-50.
- [55] Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *Jama*. 1995;274:1049-57.
- [56] Katre P, Bhat D, Lubree H, Otiv S, Joshi S, Joglekar C, et al. Vitamin B12 and folic acid supplementation and plasma total homocysteine concentrations in pregnant Indian women with low B12 and high folate status. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*. 2010;19:335-43.
- [57] Selhub J, Jacques PF, Wilson PW, Rush D, Rosenberg IH. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *Jama*. 1993;270:2693-8.
- [58] Verkleij-Hagoort A, Blik J, Seyed-Tabatabaei F, Ursem N, Steegers E, Steegers-Theunissen R. Hyperhomocysteinemia and MTHFR polymorphisms in association with orofacial clefts and congenital heart defects: a meta-analysis. *American journal of medical genetics Part A*. 2007;143A:952-60.
- [59] Yajnik CS, Deshpande SS, Lubree HG, Naik SS, Bhat DS, Uradey BS, et al. Vitamin B12 deficiency and hyperhomocysteinemia in rural and urban Indians. *The Journal of the Association of Physicians of India*. 2006;54:775-82.
- [60] Greenwood DC, Muir KR, Packham CJ, Madeley RJ. Coronary heart disease: a review of the role of psychosocial stress and social support. *Journal of public health medicine*. 1996;18:221-31.
- [61] Hemingway H, Marmot M. Evidence based cardiology: psychosocial factors in the aetiology and prognosis of coronary heart disease. Systematic review of prospective cohort studies. *BMJ (Clinical research ed)*. 1999;318:1460-7.
- [62] Diez Roux AV. Residential environments and cardiovascular risk. *Journal of urban health : bulletin of the New York Academy of Medicine*. 2003;80:569-89.
- [63] Eller NH, Netterstrom B, Gyntelberg F, Kristensen TS, Nielsen F, Steptoe A, et al. Work-related psychosocial factors and the development of ischemic heart disease: a systematic review. *Cardiology in review*. 2009;17:83-97.
- [64] Kerr GD, Slavin H, Clark D, Coupar F, Langhorne P, Stott DJ. Do vascular risk factors explain the association between socioeconomic status and stroke incidence: a meta-analysis. *Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)*. 2011;31:57-63.
- [65] Heraclides A, Chandola T, Witte DR, Brunner EJ. Psychosocial stress at work doubles the risk of type 2 diabetes in middle-aged women: evidence from the Whitehall II study. *Diabetes care*. 2009;32:2230-5.
- [66] Arnold SV, Smolderen KG, Buchanan DM, Li Y, Spertus JA. Perceived stress in myocardial infarction: long-term mortality and health status outcomes. *Journal of the American College of Cardiology*. 2012;60:1756-63.
- [67] Bener A, Dogan M, Ehlayel MS, Shanks NJ, Sabbah A. The impact of air pollution on hospital admission for respiratory and cardiovascular diseases in an oil and gas-rich country. *European annals of allergy and clinical immunology*. 2009;41:80-4.

- [68] Ernst E, Resch KL. Fibrinogen as a cardiovascular risk factor: a meta-analysis and review of the literature. *Annals of internal medicine*. 1993;118:956-63.
- [69] Hoffman CJ, Miller RH, Lawson WE, Hultin MB. Elevation of factor VII activity and mass in young adults at risk of ischemic heart disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 1989;14:941-6.
- [70] Hamsten A, Wiman B, de Faire U, Blomback M. Increased plasma levels of a rapid inhibitor of tissue plasminogen activator in young survivors of myocardial infarction. *The New England journal of medicine*. 1985;313:1557-63.
- [71] Descamps-Latscha B, Herbelin A, Nguyen AT, Roux-Lombard P, Zingraff J, Moynot A, et al. Balance between IL-1 beta, TNF-alpha, and their specific inhibitors in chronic renal failure and maintenance dialysis. Relationships with activation markers of T cells, B cells, and monocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1995;154:882-92.
- [72] Szmítko PE, Wang CH, Weisel RD, Jeffries GA, Anderson TJ, Verma S. Biomarkers of vascular disease linking inflammation to endothelial activation: Part II. *Circulation*. 2003;108:2041-8.
- [73] Verma S, Buchanan MR, Anderson TJ. Endothelial function testing as a biomarker of vascular disease. *Circulation*. 2003;108:2054-9.
- [74] Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105:1135-43.
- [75] Tsutamoto T, Hisanaga T, Wada A, Maeda K, Ohnishi M, Fukai D, et al. Interleukin-6 spillover in the peripheral circulation increases with the severity of heart failure, and the high plasma level of interleukin-6 is an important prognostic predictor in patients with congestive heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*. 1998;31:391-8.
- [76] Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000;407:249-57.
- [77] Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature medicine*. 2003;9:669-76.
- [78] Amini A, Masoumi Moghaddam S, Morris DL, Pourgholami MH. The critical role of vascular endothelial growth factor in tumor angiogenesis. *Current cancer drug targets*. 2012;12:23-43.
- [79] Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 2011;473:298-307.
- [80] Ladomery MR, Harper SJ, Bates DO. Alternative splicing in angiogenesis: the vascular endothelial growth factor paradigm. *Cancer letters*. 2007;249:133-42.
- [81] Medinger M, Fischer N, Tzankov A. Vascular endothelial growth factor-related pathways in hematolymphoid malignancies. *Journal of oncology*. 2010;2010:729725.
- [82] Yla-Herttuala S, Rissanen TT, Vajanto I, Hartikainen J. Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *Journal of the American College of Cardiology*. 2007;49:1015-26.
- [83] Blann AD, Belgore FM, McCollum CN, Silverman S, Lip PL, Lip GY. Vascular endothelial growth factor and its receptor, Flt-1, in the plasma of patients with coronary or peripheral atherosclerosis, or Type II diabetes. *Clinical science (London, England : 1979)*. 2002;102:187-94.
- [84] Chin BS, Chung NA, Gibbs CR, Blann AD, Lip GY. Vascular endothelial growth factor and soluble P-selectin in acute and chronic congestive heart failure. *The American journal of cardiology*. 2002;90:1258-60.
- [85] Eaton CB, Gramling R, Parker DR, Roberts MB, Lu B, Ridker PM. Prospective association of vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) with coronary heart disease mortality in southeastern New England. *Atherosclerosis*. 2008;200:221-7.
- [86] Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, Boersma E, Zeiher AM, Simoons ML. Prognostic significance of angiogenic growth factor serum levels in patients with acute coronary syndromes. *Circulation*. 2003;107:524-30.
- [87] Hojo Y, Ikeda U, Zhu Y, Okada M, Ueno S, Arakawa H, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in patients with acute myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2000;35:968-73.
- [88] Nakajima K, Tabata S, Yamashita T, Kusuhara M, Arakawa K, Ohmori R, et al. Plasma vascular endothelial growth factor level is elevated in patients with multivessel coronary artery disease. *Clinical cardiology*. 2004;27:281-6.
- [89] Slevin M, Krupinski J, Slowik A, Kumar P, Szczudlik A, Gaffney J. Serial measurement of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta1 in serum of patients with acute ischemic stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2000;31:1863-70.
- [90] Celletti FL, Waugh JM, Amabile PG, Brendolan A, Hilfiker PR, Dake MD. Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nature medicine*. 2001;7:425-9.
- [91] Inoue M, Itoh H, Ueda M, Naruko T, Kojima A, Komatsu R, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerotic lesions: possible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis. *Circulation*. 1998;98:2108-16.

- [92] Khurana R, Zhuang Z, Bhardwaj S, Murakami M, De Muinck E, Yla-Herttuala S, et al. Angiogenesis-dependent and independent phases of intimal hyperplasia. *Circulation*. 2004;110:2436-43.
- [93] Lemstrom KB, Krebs R, Nykanen AI, Tikkanen JM, Sihvola RK, Aaltola EM, et al. Vascular endothelial growth factor enhances cardiac allograft arteriosclerosis. *Circulation*. 2002;105:2524-30.
- [94] Moulton KS, Vakili K, Zurakowski D, Soliman M, Butterfield C, Sylvain E, et al. Inhibition of plaque neovascularization reduces macrophage accumulation and progression of advanced atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100:4736-41.
- [95] Rutanen J, Leppanen P, Tuomisto TT, Rissanen TT, Hiltunen MO, Vajanto I, et al. Vascular endothelial growth factor-D expression in human atherosclerotic lesions. *Cardiovascular research*. 2003;59:971-9.
- [96] Laitinen M, Zachary I, Breier G, Pakkanen T, Hakkinen T, Luoma J, et al. VEGF gene transfer reduces intimal thickening via increased production of nitric oxide in carotid arteries. *Human gene therapy*. 1997;8:1737-44.
- [97] Leppanen P, Koota S, Kholova I, Koponen J, Fieber C, Eriksson U, et al. Gene transfers of vascular endothelial growth factor-A, vascular endothelial growth factor-B, vascular endothelial growth factor-C, and vascular endothelial growth factor-D have no effects on atherosclerosis in hypercholesterolemic low-density lipoprotein-receptor/apolipoprotein B48-deficient mice. *Circulation*. 2005;112:1347-52.
- [98] Poulsen P, Kyvik KO, Vaag A, Beck-Nielsen H. Heritability of type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and abnormal glucose tolerance--a population-based twin study. *Diabetologia*. 1999;42:139-45.
- [99] Hanson RL, Imperatore G, Narayan KM, Roumain J, Fagot-Campagna A, Pettitt DJ, et al. Family and genetic studies of indices of insulin sensitivity and insulin secretion in Pima Indians. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2001;17:296-303.
- [100] McQueen MB, Bertram L, Rimm EB, Blacker D, Santangelo SL. A QTL genome scan of the metabolic syndrome and its component traits. *BMC genetics*. 2003;4 Suppl 1:S96.
- [101] Mills GW, Avery PJ, McCarthy MI, Hattersley AT, Levy JC, Hitman GA, et al. Heritability estimates for beta cell function and features of the insulin resistance syndrome in UK families with an increased susceptibility to type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2004;47:732-8.
- [102] Souren NY, Paulussen AD, Loos RJ, Gielen M, Beunen G, Fagard R, et al. Anthropometry, carbohydrate and lipid metabolism in the East Flanders Prospective Twin Survey: heritabilities. *Diabetologia*. 2007;50:2107-16.
- [103] Bayoumi RA, Al-Yahyaee SA, Albarwani SA, Rizvi SG, Al-Hadabi S, Al-Ubaidi FF, et al. Heritability of determinants of the metabolic syndrome among healthy Arabs of the Oman family study. *Obesity (Silver Spring, Md)*. 2007;15:551-6.
- [104] O'Connell DL, Heller RF, Roberts DC, Allen JR, Knapp JC, Steele PL, et al. Twin study of genetic and environmental effects on lipid levels. *Genetic epidemiology*. 1988;5:323-41.
- [105] Brown WM, Beck SR, Lange EM, Davis CC, Kay CM, Langefeld CD, et al. Age-stratified heritability estimation in the Framingham Heart Study families. *BMC genetics*. 2003;4 Suppl 1:S32.
- [106] Heller DA, de Faire U, Pedersen NL, Dahlen G, McClearn GE. Genetic and environmental influences on serum lipid levels in twins. *The New England journal of medicine*. 1993;328:1150-6.
- [107] Reed T, Malinow MR, Christian JC, Upson B. Estimates of heritability of plasma homocyst(e)ine levels in aging adult male twins. *Clinical genetics*. 1991;39:425-8.
- [108] Berg K, Malinow MR, Kierulf P, Upson B. Population variation and genetics of plasma homocyst(e)ine level. *Clinical genetics*. 1992;41:315-21.
- [109] Cesari M, Burlina AB, Narkiewicz K, Sartori MT, Sacchetto A, Rossi GP. Are fasting plasma homocyst(e)ine levels heritable? A study of normotensive twins. *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research*. 2000;48:351-8.
- [110] Siva A, De Lange M, Clayton D, Monteith S, Spector T, Brown MJ. The heritability of plasma homocysteine, and the influence of genetic variation in the homocysteine methylation pathway. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*. 2007;100:495-9.
- [111] Bathum L, Petersen I, Christiansen L, Konieczna A, Sorensen TI, Kyvik KO. Genetic and environmental influences on plasma homocysteine: results from a Danish twin study. *Clinical chemistry*. 2007;53:971-9.
- [112] Nilsson SE, Read S, Berg S, Johansson B. Heritabilities for fifteen routine biochemical values: findings in 215 Swedish twin pairs 82 years of age or older. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 2009;69:562-9.
- [113] Freeman MS, Mansfield MW, Barrett JH, Grant PJ. Genetic contribution to circulating levels of hemostatic factors in healthy families with effects of known genetic polymorphisms on heritability. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2002;22:506-10.
- [114] Vossen CY, Callas PW, Hasstedt SJ, Long GL, Rosendaal FR, Bovill EG. A genetic basis for the interrelation of coagulation factors. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2007;5:1930-5.

- [115] Zdravkovic S, Wienke A, Pedersen NL, Marenberg ME, Yashin AI, De Faire U. Heritability of death from coronary heart disease: a 36-year follow-up of 20 966 Swedish twins. *Journal of internal medicine*. 2002;252:247-54.
- [116] Fischer M, Broeckel U, Holmer S, Baessler A, Hengstenberg C, Mayer B, et al. Distinct heritable patterns of angiographic coronary artery disease in families with myocardial infarction. *Circulation*. 2005;111:855-62.
- [117] Wienke A, Herskind AM, Christensen K, Skytthe A, Yashin AI. The heritability of CHD mortality in danish twins after controlling for smoking and BMI. *Twin research and human genetics : the official journal of the International Society for Twin Studies*. 2005;8:53-9.
- [118] Cassidy-Bushrow AE, Bielak LF, Sheedy PF, 2nd, Turner ST, Kullo IJ, Lin X, et al. Coronary artery calcification progression is heritable. *Circulation*. 2007;116:25-31.
- [119] Bak S, Gaist D, Sindrup SH, Skytthe A, Christensen K. Genetic liability in stroke: a long-term follow-up study of Danish twins. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2002;33:769-74.
- [120] Schadt EE, Lum PY. Thematic review series: systems biology approaches to metabolic and cardiovascular disorders. Reverse engineering gene networks to identify key drivers of complex disease phenotypes. *Journal of lipid research*. 2006;47:2601-13.
- [121] Florez JC, Jablonski KA, Bayley N, Pollin TI, de Bakker PI, Shuldiner AR, et al. TCF7L2 polymorphisms and progression to diabetes in the Diabetes Prevention Program. *The New England journal of medicine*. 2006;355:241-50.
- [122] Grant SF, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Manolescu A, Sainz J, et al. Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nature genetics*. 2006;38:320-3.
- [123] Herbert A, Gerry NP, McQueen MB, Heid IM, Pfeufer A, Illig T, et al. A common genetic variant is associated with adult and childhood obesity. *Science (New York, NY)*. 2006;312:279-83.
- [124] Dwyer JH, Allayee H, Dwyer KM, Fan J, Wu H, Mar R, et al. Arachidonate 5-lipoxygenase promoter genotype, dietary arachidonic acid, and atherosclerosis. *The New England journal of medicine*. 2004;350:29-37.
- [125] Hunter DJ. Gene-environment interactions in human diseases. *Nature reviews Genetics*. 2005;6:287-98.
- [126] Marian AJ. Elements of 'missing heritability'. *Current opinion in cardiology*. 2012;27:197-201.
- [127] Azimi-Nezhad M, Stathopoulou MG, Bonnefond A, Rancier M, Saleh A, Lamont J, et al. Associations of vascular endothelial growth factor (VEGF) with adhesion and inflammation molecules in a healthy population. *Cytokine*. 2013;61:602-7.
- [128] El Shamieh S, Ndiaye NC, Stathopoulou MG, Murray HA, Masson C, Lamont JV, et al. Functional epistatic interaction between rs6046G>A in F7 and rs5355C>T in SELE modifies systolic blood pressure levels. *PloS one*. 2012;7:e40777.
- [129] Stathopoulou MG, Bonnefond A, Ndiaye NC, Azimi-Nezhad M, El Shamieh S, Saleh A, et al. A common variant highly associated with plasma VEGFA levels also contributes to the variation of both LDL-C and HDL-C. *Journal of lipid research*. 2013;54:535-41.
- [130] Visvikis-Siest S, Marteau JB, Samara A, Berrahmoune H, Marie B, Pfister M. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs): a possible model for studying cardiovascular biology systems. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC*. 2007;45:1154-68.
- [131] Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, Olander JV, Eppley BL, Delfino JJ, et al. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *The Journal of clinical investigation*. 1989;84:1470-8.
- [132] Connolly DT, Olander JV, Heuvelman D, Nelson R, Monsell R, Siegel N, et al. Human vascular permeability factor. Isolation from U937 cells. *The Journal of biological chemistry*. 1989;264:20017-24.
- [133] Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 1989;161:851-8.
- [134] Gospodarowicz D, Abraham JA, Schilling J. Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989;86:7311-5.
- [135] Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, et al. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science (New York, NY)*. 1989;246:1309-12.
- [136] Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science (New York, NY)*. 1989;246:1306-9.
- [137] Plouet J, Schilling J, Gospodarowicz D. Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. *The EMBO journal*. 1989;8:3801-6.

- [138] Bates DO, Cui TG, Doughty JM, Winkler M, Sugiono M, Shields JD, et al. VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer research*. 2002;62:4123-31.
- [139] Rini BI, Small EJ. Biology and clinical development of vascular endothelial growth factor-targeted therapy in renal cell carcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23:1028-43.
- [140] Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *The Journal of biological chemistry*. 1991;266:11947-54.
- [141] Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1999;13:9-22.
- [142] Nishi M, Abe Y, Tomii Y, Tsukamoto H, Kijima H, Yamazaki H, et al. Cell binding isoforms of vascular endothelial growth factor-A (VEGF189) contribute to blood flow-distant metastasis of pulmonary adenocarcinoma. *International journal of oncology*. 2005;26:1517-24.
- [143] Benjamin LE, Keshet E. Conditional switching of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in tumors: induction of endothelial cell shedding and regression of hemangioblastoma-like vessels by VEGF withdrawal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94:8761-6.
- [144] Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273:13313-6.
- [145] Hood JD, Meininger CJ, Ziche M, Granger HJ. VEGF upregulates ecNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. *The American journal of physiology*. 1998;274:H1054-8.
- [146] Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine reviews*. 2004;25:581-611.
- [147] Harper SJ, Bates DO. VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? *Nature reviews Cancer*. 2008;8:880-7.
- [148] Grimmond S, Lagercrantz J, Drinkwater C, Silins G, Townson S, Pollock P, et al. Cloning and characterization of a novel human gene related to vascular endothelial growth factor. *Genome research*. 1996;6:124-31.
- [149] Paavonen K, Horelli-Kuitunen N, Chilov D, Kukk E, Pennanen S, Kallioniemi OP, et al. Novel human vascular endothelial growth factor genes VEGF-B and VEGF-C localize to chromosomes 11q13 and 4q34, respectively. *Circulation*. 1996;93:1079-82.
- [150] Silins G, Grimmond S, Egerton M, Hayward N. Analysis of the promoter region of the human VEGF-related factor gene. *Biochemical and biophysical research communications*. 1997;230:413-8.
- [151] Ristimaki A, Narko K, Enholm B, Joukov V, Alitalo K. Proinflammatory cytokines regulate expression of the lymphatic endothelial mitogen vascular endothelial growth factor-C. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273:8413-8.
- [152] Nash AD, Baca M, Wright C, Scotney PD. The biology of vascular endothelial growth factor-B (VEGF-B). *Pulmonary pharmacology & therapeutics*. 2006;19:61-9.
- [153] Scotney PD, MacKenzie A, Maccarone P, Fabri LJ, Scrofani SD, Gooley PR, et al. Human vascular endothelial growth factor B: characterization of recombinant isoforms and generation of neutralizing monoclonal antibodies. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2002;29:1024-9.
- [154] Christinger HW, Fuh G, de Vos AM, Wiesmann C. The crystal structure of placental growth factor in complex with domain 2 of vascular endothelial growth factor receptor-1. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279:10382-8.
- [155] Wiesmann C, Fuh G, Christinger HW, Eigenbrot C, Wells JA, de Vos AM. Crystal structure at 1.7 Å resolution of VEGF in complex with domain 2 of the Flt-1 receptor. *Cell*. 1997;91:695-704.
- [156] Olofsson B, Pajusola K, von Euler G, Chilov D, Alitalo K, Eriksson U. Genomic organization of the mouse and human genes for vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) and characterization of a second splice isoform. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271:19310-7.
- [157] Bellomo D, Headrick JP, Silins GU, Paterson CA, Thomas PS, Gartside M, et al. Mice lacking the vascular endothelial growth factor-B gene (*Vegfb*) have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature, and impaired recovery from cardiac ischemia. *Circulation research*. 2000;86:E29-35.
- [158] Joukov V, Sorsa T, Kumar V, Jeltsch M, Claesson-Welsh L, Cao Y, et al. Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. *The EMBO journal*. 1997;16:3898-911.
- [159] Siegfried G, Basak A, Cromlish JA, Benjannet S, Marcinkiewicz J, Chretien M, et al. The secretory proprotein convertases furin, PC5, and PC7 activate VEGF-C to induce tumorigenesis. *The Journal of clinical investigation*. 2003;111:1723-32.

- [160] Schoppmann SF, Birner P, Stockl J, Kalt R, Ullrich R, Caucig C, et al. Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. *The American journal of pathology*. 2002;161:947-56.
- [161] Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, et al. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nature immunology*. 2004;5:74-80.
- [162] Kukkk E, Lymboussaki A, Taira S, Kaipainen A, Jeltsch M, Joukov V, et al. VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development (Cambridge, England)*. 1996;122:3829-37.
- [163] Skobe M, Hamberg LM, Hawighorst T, Schirner M, Wolf GL, Alitalo K, et al. Concurrent induction of lymphangiogenesis, angiogenesis, and macrophage recruitment by vascular endothelial growth factor-C in melanoma. *The American journal of pathology*. 2001;159:893-903.
- [164] Lymboussaki A, Olofsson B, Eriksson U, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-C show overlapping binding sites in embryonic endothelia and distinct sites in differentiated adult endothelia. *Circulation research*. 1999;85:992-9.
- [165] Chilov D, Kukkk E, Taira S, Jeltsch M, Kaukonen J, Palotie A, et al. Genomic organization of human and mouse genes for vascular endothelial growth factor C. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272:25176-83.
- [166] Neufeld G, Tessler S, Gitay-Goren H, Cohen T, Levi BZ. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Progress in growth factor research*. 1994;5:89-97.
- [167] Saharinen P, Tammela T, Karkkainen MJ, Alitalo K. Lymphatic vasculature: development, molecular regulation and role in tumor metastasis and inflammation. *Trends in immunology*. 2004;25:387-95.
- [168] Akahane M, Akahane T, Matheny SL, Shah A, Okajima E, Thorgeirsson UP. Vascular endothelial growth factor-D is a survival factor for human breast carcinoma cells. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2006;118:841-9.
- [169] Achen MG, Williams RA, Minekus MP, Thornton GE, Stenvers K, Rogers PA, et al. Localization of vascular endothelial growth factor-D in malignant melanoma suggests a role in tumour angiogenesis. *The Journal of pathology*. 2001;193:147-54.
- [170] Ishii H, Yazawa T, Sato H, Suzuki T, Ikeda M, Hayashi Y, et al. Enhancement of pleural dissemination and lymph node metastasis of intrathoracic lung cancer cells by vascular endothelial growth factors (VEGFs). *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*. 2004;45:325-37.
- [171] Lyttle DJ, Fraser KM, Fleming SB, Mercer AA, Robinson AJ. Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus. *Journal of virology*. 1994;68:84-92.
- [172] Meyer M, Clauss M, Lepple-Wienhues A, Waltenberger J, Augustin HG, Ziche M, et al. A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *The EMBO journal*. 1999;18:363-74.
- [173] Kiba A, Yabana N, Shibuya M. A set of loop-1 and -3 structures in the novel vascular endothelial growth factor (VEGF) family member, VEGF-ENZ-7, is essential for the activation of VEGFR-2 signaling. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278:13453-61.
- [174] Autiero M, Waltenberger J, Communi D, Kranz A, Moons L, Lambrechts D, et al. Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nature medicine*. 2003;9:936-43.
- [175] Nagy JA, Dvorak AM, Dvorak HF. VEGF-A(164/165) and PlGF: roles in angiogenesis and arteriogenesis. *Trends in cardiovascular medicine*. 2003;13:169-75.
- [176] Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, De Mol M, et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nature medicine*. 2001;7:575-83.
- [177] Odorisio T, Schietroma C, Zaccaria ML, Cianfarani F, Tiveron C, Tatangelo L, et al. Mice overexpressing placenta growth factor exhibit increased vascularization and vessel permeability. *Journal of cell science*. 2002;115:2559-67.
- [178] Oura H, Bertoncini J, Velasco P, Brown LF, Carmeliet P, Detmar M. A critical role of placental growth factor in the induction of inflammation and edema formation. *Blood*. 2003;101:560-7.
- [179] Olofsson B, Korpelainen E, Pepper MS, Mandriota SJ, Aase K, Kumar V, et al. Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95:11709-14.
- [180] Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269:26988-95.

- [181] de Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science (New York, NY)*. 1992;255:989-91.
- [182] Peters KG, De Vries C, Williams LT. Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggests a role in endothelial differentiation and blood vessel growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90:8915-9.
- [183] Quinn TP, Peters KG, De Vries C, Ferrara N, Williams LT. Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90:7533-7.
- [184] Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood*. 1996;87:3336-43.
- [185] Kendall RL, Thomas KA. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90:10705-9.
- [186] Gille H, Kowalski J, Li B, LeCouter J, Moffat B, Zioncheck TF, et al. Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276:3222-30.
- [187] Takahashi T, Yamaguchi S, Chida K, Shibuya M. A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *The EMBO journal*. 2001;20:2768-78.
- [188] Bernatchez PN, Soker S, Sirois MG. Vascular endothelial growth factor effect on endothelial cell proliferation, migration, and platelet-activating factor synthesis is Flk-1-dependent. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274:31047-54.
- [189] Matsumoto T, Bohman S, Dixelius J, Berge T, Dimberg A, Magnusson P, et al. VEGF receptor-2 Y951 signaling and a role for the adapter molecule TSAd in tumor angiogenesis. *The EMBO journal*. 2005;24:2342-53.
- [190] Shibuya M, Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Experimental cell research*. 2006;312:549-60.
- [191] Galland F, Karamysheva A, Pebusque MJ, Borg JP, Rottapel R, Dubreuil P, et al. The FLT4 gene encodes a transmembrane tyrosine kinase related to the vascular endothelial growth factor receptor. *Oncogene*. 1993;8:1233-40.
- [192] Pajusola K, Aprelikova O, Korhonen J, Kaipainen A, Pertovaara L, Alitalo R, et al. FLT4 receptor tyrosine kinase contains seven immunoglobulin-like loops and is expressed in multiple human tissues and cell lines. *Cancer research*. 1992;52:5738-43.
- [193] Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, van Hinsbergh VW, Fang GH, Dumont D, et al. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92:3566-70.
- [194] Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2006;7:359-71.
- [195] Arcondeguy T, Lacazette E, Millevoi S, Prats H, Tourniol C. VEGF-A mRNA processing, stability and translation: a paradigm for intricate regulation of gene expression at the post-transcriptional level. *Nucleic acids research*. 2013;41:7997-8010.
- [196] Qiu Y, Hoareau-Aveilla C, Oltean S, Harper SJ, Bates DO. The anti-angiogenic isoforms of VEGF in health and disease. *Biochemical Society transactions*. 2009;37:1207-13.
- [197] Claffey KP, Senger DR, Spiegelman BM. Structural requirements for dimerization, glycosylation, secretion, and biological function of VPF/VEGF. *Biochimica et biophysica acta*. 1995;1246:1-9.
- [198] Varey AH, Rennel ES, Qiu Y, Bevan HS, Perrin RM, Raffy S, et al. VEGF 165 b, an antiangiogenic VEGF-A isoform, binds and inhibits bevacizumab treatment in experimental colorectal carcinoma: balance of pro- and antiangiogenic VEGF-A isoforms has implications for therapy. *British journal of cancer*. 2008;98:1366-79.
- [199] Perrin RM, Konopatskaya O, Qiu Y, Harper S, Bates DO, Churchill AJ. Diabetic retinopathy is associated with a switch in splicing from anti- to pro-angiogenic isoforms of vascular endothelial growth factor. *Diabetologia*. 2005;48:2422-7.
- [200] Nowak DG, Woolard J, Amin EM, Konopatskaya O, Saleem MA, Churchill AJ, et al. Expression of pro- and anti-angiogenic isoforms of VEGF is differentially regulated by splicing and growth factors. *Journal of cell science*. 2008;121:3487-95.
- [201] Qiu Y, Bevan H, Weeraperuma S, Wrattling D, Murphy D, Neal CR, et al. Mammary alveolar development during lactation is inhibited by the endogenous antiangiogenic growth factor isoform, VEGF165b. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2008;22:1104-12.

- [202] Pritchard-Jones RO, Dunn DB, Qiu Y, Varey AH, Orlando A, Rigby H, et al. Expression of VEGF(xxx)b, the inhibitory isoforms of VEGF, in malignant melanoma. *British journal of cancer*. 2007;97:223-30.
- [203] Woolard J, Wang WY, Bevan HS, Qiu Y, Morbidelli L, Pritchard-Jones RO, et al. VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer research*. 2004;64:7822-35.
- [204] Bates DO, MacMillan PP, Manjaly JG, Qiu Y, Hudson SJ, Bevan HS, et al. The endogenous anti-angiogenic family of splice variants of VEGF, VEGF_{xxx}b, are down-regulated in pre-eclamptic placentae at term. *Clinical science (London, England : 1979)*. 2006;110:575-85.
- [205] Bills VL, Salmon AH, Harper SJ, Overton TG, Neal CR, Jeffery B, et al. Impaired vascular permeability regulation caused by the VEGF(1)(6)(5)b splice variant in pre-eclampsia. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*. 2011;118:1253-61.
- [206] Schumacher VA, Jeruschke S, Eitner F, Becker JU, Pitschke G, Ince Y, et al. Impaired glomerular maturation and lack of VEGF165b in Denys-Drash syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2007;18:719-29.
- [207] Amin EM, Oltean S, Hua J, Gammons MV, Hamdollah-Zadeh M, Welsh GI, et al. WT1 mutants reveal SRPK1 to be a downstream angiogenesis target by altering VEGF splicing. *Cancer cell*. 2011;20:768-80.
- [208] Ergorul C, Ray A, Huang W, Darland D, Luo ZK, Grosskreutz CL. Levels of vascular endothelial growth factor-A165b (VEGF-A165b) are elevated in experimental glaucoma. *Molecular vision*. 2008;14:1517-24.
- [209] Manetti M, Guiducci S, Romano E, Ceccarelli C, Bellando-Randone S, Conforti ML, et al. Overexpression of VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, leads to insufficient angiogenesis in patients with systemic sclerosis. *Circulation research*. 2011;109:e14-26.
- [210] Cebe Suarez S, Pieren M, Cariolato L, Arn S, Hoffmann U, Bogucki A, et al. A VEGF-A splice variant defective for heparan sulfate and neuropilin-1 binding shows attenuated signaling through VEGFR-2. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2006;63:2067-77.
- [211] Kawamura H, Li X, Harper SJ, Bates DO, Claesson-Welsh L. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A165b is a weak in vitro agonist for VEGF receptor-2 due to lack of coreceptor binding and deficient regulation of kinase activity. *Cancer research*. 2008;68:4683-92.
- [212] Ruch C, Skinotis G, Steinmetz MO, Walz T, Ballmer-Hofer K. Structure of a VEGF-VEGF receptor complex determined by electron microscopy. *Nature structural & molecular biology*. 2007;14:249-50.
- [213] Catena R, Larzabal L, Larrayoz M, Molina E, Hermida J, Agorreta J, et al. VEGF(1)(2)(1)b and VEGF(1)(6)(5)b are weakly angiogenic isoforms of VEGF-A. *Molecular cancer*. 2010;9:320.
- [214] Xie K, Wei D, Shi Q, Huang S. Constitutive and inducible expression and regulation of vascular endothelial growth factor. *Cytokine & growth factor reviews*. 2004;15:297-324.
- [215] Mazure NM, Brahim-Horn MC, Berta MA, Benizri E, Bilton RL, Dayan F, et al. HIF-1: master and commander of the hypoxic world. A pharmacological approach to its regulation by siRNAs. *Biochemical pharmacology*. 2004;68:971-80.
- [216] Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Molecular and cellular biology*. 1996;16:4604-13.
- [217] Berra E, Benizri E, Ginouves A, Volmat V, Roux D, Pouyssegur J. HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 α in normoxia. *The EMBO journal*. 2003;22:4082-90.
- [218] Semenza G. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochemical pharmacology*. 2002;64:993-8.
- [219] Giraudo E, Primo L, Audero E, Gerber HP, Koolwijk P, Soker S, et al. Tumor necrosis factor- α regulates expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 and of its co-receptor neuropilin-1 in human vascular endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273:22128-35.
- [220] Berse B, Brown LF, Van de Water L, Dvorak HF, Senger DR. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Molecular biology of the cell*. 1992;3:211-20.
- [221] Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertszenstein M, et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*. 1996;380:435-9.
- [222] Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*. 1996;380:439-42.
- [223] Fong GH. Mechanisms of adaptive angiogenesis to tissue hypoxia. *Angiogenesis*. 2008;11:121-40.
- [224] Ferrara N, Alitalo K. Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nature medicine*. 1999;5:1359-64.

- [225] Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine reviews*. 1997;18:4-25.
- [226] Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature*. 1993;362:841-4.
- [227] Zhou L, Ma W, Yang Z, Zhang F, Lu L, Ding Z, et al. VEGF165 and angiopoietin-1 decreased myocardium infarct size through phosphatidylinositol-3 kinase and Bcl-2 pathways. *Gene therapy*. 2005;12:196-202.
- [228] Izumiya Y, Shiojima I, Sato K, Sawyer DB, Colucci WS, Walsh K. Vascular endothelial growth factor blockade promotes the transition from compensatory cardiac hypertrophy to failure in response to pressure overload. *Hypertension*. 2006;47:887-93.
- [229] Zisa D, Shabbir A, Mastro M, Suzuki G, Lee T. Intramuscular VEGF repairs the failing heart: role of host-derived growth factors and mobilization of progenitor cells. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2009;297:R1503-15.
- [230] Hofstaetter JG, Saad FA, Sunk IG, Bobacz K, Friehs I, Glimcher MJ. Age-dependent expression of VEGF isoforms and receptors in the rabbit anterior cruciate ligament. *Biochimica et biophysica acta*. 2007;1770:997-1002.
- [231] Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clinical science (London, England : 1979)*. 2005;109:227-41.
- [232] Kondo S, Matsumoto T, Yokoyama Y, Ohmori I, Suzuki H. The shortest isoform of human vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF121) produced by *Saccharomyces cerevisiae* promotes both angiogenesis and vascular permeability. *Biochimica et biophysica acta*. 1995;1243:195-202.
- [233] Ruhrberg C, Gerhardt H, Golding M, Watson R, Ioannidou S, Fujisawa H, et al. Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis. *Genes & development*. 2002;16:2684-98.
- [234] Stalmans I, Ng YS, Rohan R, Fruttiger M, Bouche A, Yuce A, et al. Arteriolar and venular patterning in retinas of mice selectively expressing VEGF isoforms. *The Journal of clinical investigation*. 2002;109:327-36.
- [235] Poltorak Z, Cohen T, Sivan R, Kandelis Y, Spira G, Vlodaysky I, et al. VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272:7151-8.
- [236] Anthony FW, Wheeler T, Elcock CL, Pickett M, Thomas EJ. Short report: identification of a specific pattern of vascular endothelial growth factor mRNA expression in human placenta and cultured placental fibroblasts. *Placenta*. 1994;15:557-61.
- [237] Hoozemans DA, Schats R, Lambalk CB, Homburg R, Hompes PG. Human embryo implantation: current knowledge and clinical implications in assisted reproductive technology. *Reproductive biomedicine online*. 2004;9:692-715.
- [238] Lam PM, Haines C. Vascular endothelial growth factor plays more than an angiogenic role in the female reproductive system. *Fertility and sterility*. 2005;84:1775-8.
- [239] Foster RR, Saleem MA, Mathieson PW, Bates DO, Harper SJ. Vascular endothelial growth factor and nephrin interact and reduce apoptosis in human podocytes. *American journal of physiology Renal physiology*. 2005;288:F48-57.
- [240] Zygalki E, Kaklamanis L, Nikolaou NI, Kyrzopoulos S, Houris M, Kyriakides Z, et al. Expression profile of total VEGF, VEGF splice variants and VEGF receptors in the myocardium and arterial vasculature of diabetic and non-diabetic patients with coronary artery disease. *Clinical biochemistry*. 2008;41:82-7.
- [241] Hutchings H, Ortega N, Plouet J. Extracellular matrix-bound vascular endothelial growth factor promotes endothelial cell adhesion, migration, and survival through integrin ligation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2003;17:1520-2.
- [242] Faure C, Linossier MT, Malaval L, Lafage-Proust MH, Peyroche S, Vico L, et al. Mechanical signals modulated vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) alternative splicing in osteoblastic cells through actin polymerisation. *Bone*. 2008;42:1092-101.
- [243] Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature medicine*. 1995;1:27-31.
- [244] Zhang Y, Matsuo H, Morita E. Vascular endothelial growth factor 121 is the predominant isoform in psoriatic scales. *Experimental dermatology*. 2005;14:758-64.
- [245] Kawai H, Minamiya Y, Ito M, Saito H, Ogawa J. VEGF121 promotes lymphangiogenesis in the sentinel lymph nodes of non-small cell lung carcinoma patients. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*. 2008;59:41-7.

- [246] Li Z, Zhang Y, Ying Ma J, Kapoun AM, Shao Q, Kerr I, et al. Recombinant vascular endothelial growth factor 121 attenuates hypertension and improves kidney damage in a rat model of preeclampsia. *Hypertension*. 2007;50:686-92.
- [247] Uthoff SM, Duchrow M, Schmidt MH, Broll R, Bruch HP, Strik MW, et al. VEGF isoforms and mutations in human colorectal cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2002;101:32-6.
- [248] Lai CM, Dunlop SA, May LA, Gorbatov M, Brankov M, Shen WY, et al. Generation of transgenic mice with mild and severe retinal neovascularisation. *The British journal of ophthalmology*. 2005;89:911-6.
- [249] Zacchigna S, Papa G, Antonini A, Novati F, Moimas S, Carrer A, et al. Improved survival of ischemic cutaneous and musculocutaneous flaps after vascular endothelial growth factor gene transfer using adeno-associated virus vectors. *The American journal of pathology*. 2005;167:981-91.
- [250] Leong-Poi H, Kuliszewski MA, Lekas M, Sibbald M, Teichert-Kuliszewska K, Klibanov AL, et al. Therapeutic arteriogenesis by ultrasound-mediated VEGF165 plasmid gene delivery to chronically ischemic skeletal muscle. *Circulation research*. 2007;101:295-303.
- [251] Yano A, Shingo T, Takeuchi A, Yasuhara T, Kobayashi K, Takahashi K, et al. Encapsulated vascular endothelial growth factor-secreting cell grafts have neuroprotective and angiogenic effects on focal cerebral ischemia. *Journal of neurosurgery*. 2005;103:104-14.
- [252] Guerrero M, Athota K, Moy J, Mehta LS, Laguens R, Crottogini A, et al. Vascular endothelial growth factor-165 gene therapy promotes cardiomyogenesis in reperfused myocardial infarction. *Journal of interventional cardiology*. 2008;21:242-51.
- [253] Ripa RS, Wang Y, Jorgensen E, Johnsen HE, Hesse B, Kastrup J. Intramyocardial injection of vascular endothelial growth factor-A165 plasmid followed by granulocyte-colony stimulating factor to induce angiogenesis in patients with severe chronic ischaemic heart disease. *European heart journal*. 2006;27:1785-92.
- [254] Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Seminars in oncology*. 2002;29:15-8.
- [255] Tokunaga T, Oshika Y, Abe Y, Ozeki Y, Sadahiro S, Kijima H, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA isoform expression pattern is correlated with liver metastasis and poor prognosis in colon cancer. *British journal of cancer*. 1998;77:998-1002.
- [256] Oshika Y, Nakamura M, Tokunaga T, Ozeki Y, Fukushima Y, Hatanaka H, et al. Expression of cell-associated isoform of vascular endothelial growth factor 189 and its prognostic relevance in non-small cell lung cancer. *International journal of oncology*. 1998;12:541-4.
- [257] Yuan A, Yu CJ, Kuo SH, Chen WJ, Lin FY, Luh KT, et al. Vascular endothelial growth factor 189 mRNA isoform expression specifically correlates with tumor angiogenesis, patient survival, and postoperative relapse in non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2001;19:432-41.
- [258] Cao Y. Angiogenesis modulates adipogenesis and obesity. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117:2362-8.
- [259] Herve MA, Buteau-Lozano H, Vassy R, Bieche I, Velasco G, Pla M, et al. Overexpression of vascular endothelial growth factor 189 in breast cancer cells leads to delayed tumor uptake with dilated intratumoral vessels. *The American journal of pathology*. 2008;172:167-78.
- [260] Wang H, Geisen P, Wittchen ES, King B, Burrridge K, D'Amore PA, et al. The role of RPE cell-associated VEGF(1)(8)(9) in choroidal endothelial cell transmigration across the RPE. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2011;52:570-8.
- [261] Chen Y, Dawes PT, Packham JC, Matthey DL. Interaction between smoking and polymorphism in the promoter region of the VEGFA gene is associated with ischemic heart disease and myocardial infarction in rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*. 2011;38:802-9.
- [262] Ruggiero D, Dalmasso C, Nutile T, Sorice R, Dionisi L, Aversano M, et al. Genetics of VEGF serum variation in human isolated populations of cilento: importance of VEGF polymorphisms. *PloS one*. 2011;6:e16982.
- [263] Lin TH, Su HM, Wang CL, Voon WC, Shin SJ, Lai WT, et al. Vascular endothelial growth factor polymorphisms and extent of coronary atherosclerosis in Chinese population with advanced coronary artery disease. *American journal of hypertension*. 2010;23:960-6.
- [264] Licastro F, Chiappelli M, Porcellini E, Campo G, Buscema M, Grossi E, et al. Gene-gene and gene-clinical factors interaction in acute myocardial infarction: a new detailed risk chart. *Current pharmaceutical design*. 2010;16:783-8.
- [265] van der Meer P, De Boer RA, White HL, van der Steege G, Hall AS, Voors AA, et al. The VEGF +405 CC promoter polymorphism is associated with an impaired prognosis in patients with chronic heart failure: a MERIT-HF substudy. *Journal of cardiac failure*. 2005;11:279-84.

- [266] Douvaras P, Antonatos DG, Kekou K, Patsilnakos S, Chouliaras G, Christou A, et al. Association of VEGF gene polymorphisms with the development of heart failure in patients after myocardial infarction. *Cardiology*. 2009;114:11-8.
- [267] Pastuszczak M, Branicka A, Jakiela B, Stepień E, Jaworek AK, Wojas-Pelc A, et al. The +405 GG variant of vascular endothelial growth factor polymorphism is associated with poor prognosis in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej*. 2009;119:719-25.
- [268] Kim HW, Ko GJ, Kang YS, Lee MH, Song HK, Kim HK, et al. Role of the VEGF 936 C/T polymorphism in diabetic microvascular complications in type 2 diabetic patients. *Nephrology (Carlton, Vic)*. 2009;14:681-8.
- [269] Kim JJ, Vaziri SA, Rini BI, Elson P, Garcia JA, Wirka R, et al. Association of VEGF and VEGFR2 single nucleotide polymorphisms with hypertension and clinical outcome in metastatic clear cell renal cell carcinoma patients treated with sunitinib. *Cancer*. 2012;118:1946-54.
- [270] Yang JW, Hutchinson IV, Shah T, Fang J, Min DI. Gene polymorphism of vascular endothelial growth factor -1154 G>A is associated with hypertensive nephropathy in a Hispanic population. *Molecular biology reports*. 2011;38:2417-25.
- [271] Churchill AJ, Carter JG, Lovell HC, Ramsden C, Turner SJ, Yeung A, et al. VEGF polymorphisms are associated with neovascular age-related macular degeneration. *Human molecular genetics*. 2006;15:2955-61.
- [272] Janik-Papis K, Zaras M, Krzyzanowska A, Wozniak K, Blasiak J, Szaflik J, et al. Association between vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and age-related macular degeneration in a Polish population. *Experimental and molecular pathology*. 2009;87:234-8.
- [273] Banyasz I, Szabo S, Bokodi G, Vannay A, Vasarhelyi B, Szabo A, et al. Genetic polymorphisms of vascular endothelial growth factor in severe pre-eclampsia. *Molecular human reproduction*. 2006;12:233-6.
- [274] Al-Kateb H, Mirea L, Xie X, Sun L, Liu M, Chen H, et al. Multiple variants in vascular endothelial growth factor (VEGFA) are risk factors for time to severe retinopathy in type 1 diabetes: the DCCT/EDIC genetics study. *Diabetes*. 2007;56:2161-8.
- [275] Siest G, Visvikis S, Herbeth B, Gueguen R, Vincent-Viry M, Sass C, et al. Objectives, design and recruitment of a familial and longitudinal cohort for studying gene-environment interactions in the field of cardiovascular risk: the Stanislas cohort. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC*. 1998;36:35-42.
- [276] Visvikis-Siest S, Siest G. The STANISLAS Cohort: a 10-year follow-up of supposed healthy families. Gene-environment interactions, reference values and evaluation of biomarkers in prevention of cardiovascular diseases. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC*. 2008;46:733-47.
- [277] Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical chemistry*. 1972;18:499-502.
- [278] Fitzgerald SP, Lamont JV, McConnell RI, Benchikh el O. Development of a high-throughput automated analyzer using biochip array technology. *Clinical chemistry*. 2005;51:1165-76.
- [279] Cheng S, Pallaud C, Grow MA, Scharf SJ, Erlich HA, Klitz W, et al. A multilocus genotyping assay for cardiovascular disease. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC*. 1998;36:561-6.
- [280] Hoppe C, Klitz W, Cheng S, Apple R, Steiner L, Robles L, et al. Gene interactions and stroke risk in children with sickle cell anemia. *Blood*. 2004;103:2391-6.
- [281] Debette S, Visvikis-Siest S, Chen MH, Ndiaye NC, Song C, Destefano A, et al. Identification of cis- and trans-acting genetic variants explaining up to half the variation in circulating vascular endothelial growth factor levels. *Circulation research*. 2011;109:554-63.
- [282] Ehrich M, Bocker S, van den Boom D. Multiplexed discovery of sequence polymorphisms using base-specific cleavage and MALDI-TOF MS. *Nucleic acids research*. 2005;33:e38.
- [283] Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American journal of human genetics*. 2007;81:559-75.
- [284] Yukami T, Hasegawa M, Matsushita Y, Fujita T, Matsushita T, Horikawa M, et al. Endothelial selectins regulate skin wound healing in cooperation with L-selectin and ICAM-1. *Journal of leukocyte biology*. 2007;82:519-31.
- [285] Gogitidze Joy N, Hedrington MS, Briscoe VJ, Tate DB, Ertl AC, Davis SN. Effects of acute hypoglycemia on inflammatory and pro-atherothrombotic biomarkers in individuals with type 1 diabetes and healthy individuals. *Diabetes care*. 2010;33:1529-35.
- [286] Liu N, Liu J, Ji Y, Lu P. Toll-like receptor 4 signaling mediates inflammatory activation induced by C-reactive protein in vascular smooth muscle cells. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2010;25:467-76.

- [287] Szekanez Z, Besenyei T, Paragh G, Koch AE. Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Autoimmunity*. 2009;42:563-73.
- [288] Krieglstein CF, Granger DN. Adhesion molecules and their role in vascular disease. *American journal of hypertension*. 2001;14:44S-54S.
- [289] Rabquer BJ, Amin MA, Teegala N, Shaheen MK, Tsou PS, Ruth JH, et al. Junctional adhesion molecule-C is a soluble mediator of angiogenesis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2010;185:1777-85.
- [290] Koch AE, Halloran MM, Haskell CJ, Shah MR, Polverini PJ. Angiogenesis mediated by soluble forms of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1. *Nature*. 1995;376:517-9.
- [291] Berrahmoune H, Herbeth B, Lamont JV, Masson C, Fitzgerald PS, Visvikis-Siest S. Heritability for plasma VEGF concentration in the Stanislas family study. *Annals of human genetics*. 2007;71:54-63.
- [292] Xu J, Zou MH. Molecular insights and therapeutic targets for diabetic endothelial dysfunction. *Circulation*. 2009;120:1266-86.
- [293] Boyle EM, Jr., Kovacich JC, Canty TG, Jr., Morgan EN, Chi E, Verrier ED, et al. Inhibition of nuclear factor-kappa B nuclear localization reduces human E-selectin expression and the systemic inflammatory response. *Circulation*. 1998;98:II282-8.
- [294] Ledebur HC, Parks TP. Transcriptional regulation of the intercellular adhesion molecule-1 gene by inflammatory cytokines in human endothelial cells. Essential roles of a variant NF-kappa B site and p65 homodimers. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270:933-43.
- [295] Wrighton CJ, Hofer-Warbinek R, Moll T, Eytner R, Bach FH, de Martin R. Inhibition of endothelial cell activation by adenovirus-mediated expression of I kappa B alpha, an inhibitor of the transcription factor NF-kappa B. *The Journal of experimental medicine*. 1996;183:1013-22.
- [296] Kim I, Moon SO, Kim SH, Kim HJ, Koh YS, Koh GY. Vascular endothelial growth factor expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), and E-selectin through nuclear factor-kappa B activation in endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276:7614-20.
- [297] Suh J, Rabson AB. NF-kappaB activation in human prostate cancer: important mediator or epiphenomenon? *Journal of cellular biochemistry*. 2004;91:100-17.
- [298] Hao Q, Wang L, Tang H. Vascular endothelial growth factor induces protein kinase D-dependent production of proinflammatory cytokines in endothelial cells. *American journal of physiology Cell physiology*. 2009;296:C821-7.
- [299] Mourah S, Porcher R, Lescaille G, Rousselot P, Podgorniak MP, Labarchede G, et al. Quantification of VEGF isoforms and VEGFR transcripts by qRT-PCR and their significance in acute myeloid leukemia. *The International journal of biological markers*. 2009;24:22-31.
- [300] Aulchenko YS, Ripatti S, Lindqvist I, Boomsma D, Heid IM, Pramstaller PP, et al. Loci influencing lipid levels and coronary heart disease risk in 16 European population cohorts. *Nature genetics*. 2009;41:47-55.
- [301] Heid IM, Boes E, Muller M, Kollerits B, Lamina C, Coassin S, et al. Genome-wide association analysis of high-density lipoprotein cholesterol in the population-based KORA study sheds new light on intergenic regions. *Circulation Cardiovascular genetics*. 2008;1:10-20.
- [302] Kathiresan S, Melander O, Guiducci C, Surti A, Burt NP, Rieder MJ, et al. Six new loci associated with blood low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol or triglycerides in humans. *Nature genetics*. 2008;40:189-97.
- [303] Kathiresan S, Willer CJ, Peloso GM, Demissie S, Musunuru K, Schadt EE, et al. Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia. *Nature genetics*. 2009;41:56-65.
- [304] Kraja AT, Vaidya D, Pankow JS, Goodarzi MO, Assimes TL, Kullo IJ, et al. A bivariate genome-wide approach to metabolic syndrome: STAMPEED consortium. *Diabetes*. 2011;60:1329-39.
- [305] Ridker PM, Pare G, Parker AN, Zee RY, Miletich JP, Chasman DI. Polymorphism in the CETP gene region, HDL cholesterol, and risk of future myocardial infarction: Genomewide analysis among 18 245 initially healthy women from the Women's Genome Health Study. *Circulation Cardiovascular genetics*. 2009;2:26-33.
- [306] Sabatti C, Service SK, Hartikainen AL, Pouta A, Ripatti S, Brodsky J, et al. Genome-wide association analysis of metabolic traits in a birth cohort from a founder population. *Nature genetics*. 2009;41:35-46.
- [307] Teslovich TM, Musunuru K, Smith AV, Edmondson AC, Stylianou IM, Koseki M, et al. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature*. 2010;466:707-13.
- [308] Waterworth DM, Ricketts SL, Song K, Chen L, Zhao JH, Ripatti S, et al. Genetic variants influencing circulating lipid levels and risk of coronary artery disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010;30:2264-76.
- [309] Willer CJ, Sanna S, Jackson AU, Scuteri A, Bonnycastle LL, Clarke R, et al. Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease. *Nature genetics*. 2008;40:161-9.

- [310] Blann AD, Belgore FM, Constans J, Conri C, Lip GY. Plasma vascular endothelial growth factor and its receptor Flt-1 in patients with hyperlipidemia and atherosclerosis and the effects of fluvastatin or fenofibrate. *The American journal of cardiology*. 2001;87:1160-3.
- [311] Belgore FM, Lip GY, Blann AD. Successful therapy reduces levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) in patients with hypertension and patients with hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2000;151:599.
- [312] Kimura K, Hashiguchi T, Deguchi T, Horinouchi S, Uto T, Oku H, et al. Serum VEGF--as a prognostic factor of atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2007;194:182-8.
- [313] Sandhofer A, Tatarczyk T, Kirchmair R, Iglseder B, Paulweber B, Patsch JR, et al. Are plasma VEGF and its soluble receptor sFlt-1 atherogenic risk factors? Cross-sectional data from the SAPHIR study. *Atherosclerosis*. 2009;206:265-9.
- [314] Berrahmoune H, Lamont JV, Herbeth B, FitzGerald PS, Visvikis-Siest S. Biological determinants of and reference values for plasma interleukin-8, monocyte chemoattractant protein-1, epidermal growth factor, and vascular endothelial growth factor: Results from the STANISLAS cohort. *Clinical chemistry*. 2006;52:504-10.
- [315] Vincent-Viry M, Schiele F, Gueguen R, Bohnet K, Visvikis S, Siest G. Biological variations and genetic reference values for apolipoprotein E serum concentrations: results from the STANISLAS cohort study. *Clinical chemistry*. 1998;44:957-65.
- [316] Fernandez Pujol B, Lucibello FC, Gehling UM, Lindemann K, Weidner N, Zuzarte ML, et al. Endothelial-like cells derived from human CD14 positive monocytes. Differentiation; research in biological diversity. 2000;65:287-300.
- [317] Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ihling C, Technau-Ihling K, et al. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nature medicine*. 2003;9:1370-6.
- [318] Song M. CS. CD14 Acts as an Angiogenic Factor by Inducing Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF). *Bull Korean Chem Soc*. 2007;28:1613-4.
- [319] Carr C, Aykent S, Kimack NM, Levine AD. Disulfide assignments in recombinant mouse and human interleukin 4. *Biochemistry*. 1991;30:1515-23.
- [320] Faffe DS, Flynt L, Bourgeois K, Panettieri RA, Jr., Shore SA. Interleukin-13 and interleukin-4 induce vascular endothelial growth factor release from airway smooth muscle cells: role of vascular endothelial growth factor genotype. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2006;34:213-8.
- [321] Haas CS, Amin MA, Allen BB, Ruth JH, Haines GK, 3rd, Woods JM, et al. Inhibition of angiogenesis by interleukin-4 gene therapy in rat adjuvant-induced arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2006;54:2402-14.
- [322] Ryk C, Wiklund NP, Nyberg T, de Verdier PJ. Polymorphisms in nitric-oxide synthase 3 may influence the risk of urinary-bladder cancer. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society*. 2011;25:338-43.
- [323] Venturelli E, Villa C, Fenoglio C, Clerici F, Marcone A, Ghidoni R, et al. The NOS3 G894T (Glu298Asp) polymorphism is a risk factor for frontotemporal lobar degeneration. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies*. 2009;16:37-42.
- [324] Colombo MG, Andreassi MG, Paradossi U, Botto N, Manfredi S, Masetti S, et al. Evidence for association of a common variant of the endothelial nitric oxide synthase gene (Glu298-->Asp polymorphism) to the presence, extent, and severity of coronary artery disease. *Heart (British Cardiac Society)*. 2002;87:525-8.
- [325] Hibi K, Ishigami T, Tamura K, Mizushima S, Nyui N, Fujita T, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction. *Hypertension*. 1998;32:521-6.
- [326] McNamara DM, Holubkov R, Postava L, Ramani R, Janosko K, Mathier M, et al. Effect of the Asp298 variant of endothelial nitric oxide synthase on survival for patients with congestive heart failure. *Circulation*. 2003;107:1598-602.
- [327] Marray B, Goldenberg I, Moss AJ, Zareba W, Ryan D, McNitt S, et al. Polymorphisms in the paraoxonase and endothelial nitric oxide synthase genes and the risk of early-onset myocardial infarction. *The American journal of cardiology*. 2007;99:1100-5.
- [328] Rios DL, D'Onofrio LO, Souza JK, Queiroz AM, Raduy-Marón L, Silva-Neto N, et al. Smoking-dependent and haplotype-specific effects of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms on angiographically assessed coronary artery disease in Caucasian- and African-Brazilians. *Atherosclerosis*. 2007;193:135-41.
- [329] LeVan TD, Bloom JW, Bailey TJ, Karp CL, Halonen M, Martinez FD, et al. A common single nucleotide polymorphism in the CD14 promoter decreases the affinity of Sp protein binding and enhances transcriptional activity. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2001;167:5838-44.

- [330] Salvi E, Kutalik Z, Glorioso N, Benaglio P, Frau F, Kuznetsova T, et al. Genomewide association study using a high-density single nucleotide polymorphism array and case-control design identifies a novel essential hypertension susceptibility locus in the promoter region of endothelial NO synthase. *Hypertension*. 2012;59:248-55.
- [331] Roger T, Froidevaux C, Le Roy D, Reymond MK, Chanson AL, Mauri D, et al. Protection from lethal gram-negative bacterial sepsis by targeting Toll-like receptor 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106:2348-52.
- [332] Yamaji-Kegan K, Su Q, Angelini DJ, Johns RA. IL-4 is proangiogenic in the lung under hypoxic conditions. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2009;182:5469-76.
- [333] Saleh M, Wiegman A, Malone Q, Styli SS, Kaye AH. Effect of in situ retroviral interleukin-4 transfer on established intracranial tumors. *Journal of the National Cancer Institute*. 1999;91:438-45.
- [334] Hong KH, Cho ML, Min SY, Shin YJ, Yoo SA, Choi JJ, et al. Effect of interleukin-4 on vascular endothelial growth factor production in rheumatoid synovial fibroblasts. *Clinical and experimental immunology*. 2007;147:573-9.
- [335] Ye S, Eriksson P, Hamsten A, Kurkinen M, Humphries SE, Henney AM. Progression of coronary atherosclerosis is associated with a common genetic variant of the human stromelysin-1 promoter which results in reduced gene expression. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271:13055-60.
- [336] Nguyen M, Arkell J, Jackson CJ. Human endothelial gelatinases and angiogenesis. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2001;33:960-70.
- [337] Liutkeviciene R, Zaliaduonyte-Peksiene D, Zaliuniene D, Gustiene O, Jasinskas V, Lesauskaite V, et al. Does matrix metalloproteinase-3 polymorphism play a role in age-related macular degeneration in patients with myocardial infarction? *Medicina (Kaunas, Lithuania)*. 2012;48:404-9.
- [338] Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nature cell biology*. 2000;2:737-44.
- [339] Chang C, Werb Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends in cell biology*. 2001;11:S37-43.
- [340] Zhou Z, Apte SS, Soininen R, Cao R, Baakli GY, Rauser RW, et al. Impaired endochondral ossification and angiogenesis in mice deficient in membrane-type matrix metalloproteinase I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97:4052-7.
- [341] Loebig M, Klement J, Schmoller A, Betz S, Heuck N, Schweiger U, et al. Evidence for a relationship between VEGF and BMI independent of insulin sensitivity by glucose clamp procedure in a homogenous group healthy young men. *PloS one*. 2010;5:e12610.
- [342] Qi JH, Claesson-Welsh L. VEGF-induced activation of phosphoinositide 3-kinase is dependent on focal adhesion kinase. *Experimental cell research*. 2001;263:173-82.
- [343] Lifton RP, Gharavi AG, Geller DS. Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell*. 2001;104:545-56.
- [344] Chang YP, Liu X, Kim JD, Ikeda MA, Layton MR, Weder AB, et al. Multiple genes for essential-hypertension susceptibility on chromosome 1q. *American journal of human genetics*. 2007;80:253-64.
- [345] Whelton PK, He J, Appel LJ, Cutler JA, Havas S, Kotchen TA, et al. Primary prevention of hypertension: clinical and public health advisory from The National High Blood Pressure Education Program. *Jama*. 2002;288:1882-8.
- [346] Ehret GB, Munroe PB, Rice KM, Bochud M, Johnson AD, Chasman DI, et al. Genetic variants in novel pathways influence blood pressure and cardiovascular disease risk. *Nature*. 2011;478:103-9.
- [347] Ndiaye NC, Azimi Nehzad M, El Shamieh S, Stathopoulou MG, Visvikis-Siest S. Cardiovascular diseases and genome-wide association studies. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2011;412:1697-701.
- [348] Yang R, Thomas GR, Bunting S, Ko A, Ferrara N, Keyt B, et al. Effects of vascular endothelial growth factor on hemodynamics and cardiac performance. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 1996;27:838-44.
- [349] Horowitz JR, Rivard A, van der Zee R, Hariawala M, Sheriff DD, Esakof DD, et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor produces nitric oxide-dependent hypotension. Evidence for a maintenance role in quiescent adult endothelium. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1997;17:2793-800.
- [350] Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*. 1995;376:62-6.
- [351] Kim M, Park HJ, Seol JW, Jang JY, Cho YS, Kim KR, et al. VEGF-A regulated by progesterone governs uterine angiogenesis and vascular remodelling during pregnancy. *EMBO molecular medicine*. 2013;5:1415-30.
- [352] Crawford TN, Alfaro DV, 3rd, Kerrison JB, Jablon EP. Diabetic retinopathy and angiogenesis. *Current diabetes reviews*. 2009;5:8-13.

- [353] Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*. 1992;359:843-5.
- [354] Solomon SD, Lindsley K, Vedula SS, Krzystolik MG, Hawkins BS. Anti-vascular endothelial growth factor for neovascular age-related macular degeneration. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2014;8:CD005139.
- [355] Escudier B, Pluzanska A, Koralewski P, Ravaud A, Bracarda S, Szczylik C, et al. Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. *Lancet*. 2007;370:2103-11.
- [356] Flaherty KT, Rosen MA, Heitjan DF, Gallagher ML, Schwartz B, Schnall MD, et al. Pilot study of DCE-MRI to predict progression-free survival with sorafenib therapy in renal cell carcinoma. *Cancer biology & therapy*. 2008;7:496-501.
- [357] Heng DY, Xie W, Regan MM, Warren MA, Golshayan AR, Sahi C, et al. Prognostic factors for overall survival in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with vascular endothelial growth factor-targeted agents: results from a large, multicenter study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27:5794-9.
- [358] Tsavachidou-Fenner D, Tannir N, Tamboli P, Liu W, Petillo D, Teh B, et al. Gene and protein expression markers of response to combined antiangiogenic and epidermal growth factor targeted therapy in renal cell carcinoma. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2010;21:1599-606.
- [359] Emmanouilides C, Pegram M, Robinson R, Hecht R, Kabbinavar F, Isacoff W. Anti-VEGF antibody bevacizumab (Avastin) with 5FU/LV as third line treatment for colorectal cancer. *Techniques in coloproctology*. 2004;8 Suppl 1:s50-2.
- [360] Jayson GC, Mulatero C, Ranson M, Zweit J, Jackson A, Broughton L, et al. Phase I investigation of recombinant anti-human vascular endothelial growth factor antibody in patients with advanced cancer. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2005;41:555-63.
- [361] Kabbinavar FF, Hambleton J, Mass RD, Hurwitz HI, Bergsland E, Sarkar S. Combined analysis of efficacy: the addition of bevacizumab to fluorouracil/leucovorin improves survival for patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23:3706-12.
- [362] Ahn JS, Lee KH, Sun JM, Park K, Kang ES, Cho EK, et al. A randomized, phase II study of vandetanib maintenance for advanced or metastatic non-small-cell lung cancer following first-line platinum-doublet chemotherapy. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*. 2013;82:455-60.
- [363] Berruti A, Fazio N, Ferrero A, Brizzi MP, Volante M, Nobili E, et al. Bevacizumab plus octreotide and metronomic capecitabine in patients with metastatic well-to-moderately differentiated neuroendocrine tumors: the XELBEVOCT study. *BMC cancer*. 2014;14:184.
- [364] Corrie PG, Marshall A, Dunn JA, Middleton MR, Nathan PD, Gore M, et al. Adjuvant bevacizumab in patients with melanoma at high risk of recurrence (AVAST-M): preplanned interim results from a multicentre, open-label, randomised controlled phase 3 study. *The Lancet Oncology*. 2014;15:620-30.
- [365] Dutton SJ, Ferry DR, Blazeby JM, Abbas H, Dahle-Smith A, Mansoor W, et al. Gefitinib for oesophageal cancer progressing after chemotherapy (COG): a phase 3, multicentre, double-blind, placebo-controlled randomised trial. *The Lancet Oncology*. 2014;15:894-904.
- [366] Fuchs CS, Tomasek J, Yong CJ, Dumitru F, Passalacqua R, Goswami C, et al. Ramucirumab monotherapy for previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (REGARD): an international, randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2014;383:31-9.
- [367] Gilbert MR, Dignam JJ, Armstrong TS, Wefel JS, Blumenthal DT, Vogelbaum MA, et al. A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *The New England journal of medicine*. 2014;370:699-708.
- [368] Gold PJ, Goldman B, Iqbal S, Leichman LP, Zhang W, Lenz HJ, et al. Cetuximab as second-line therapy in patients with metastatic esophageal adenocarcinoma: a phase II Southwest Oncology Group Study (S0415). *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2010;5:1472-6.
- [369] Mahalingam D, Malik L, Beeram M, Rodon J, Sankhala K, Mita A, et al. Phase II study evaluating the efficacy, safety, and pharmacodynamic correlative study of dual antiangiogenic inhibition using bevacizumab in combination with sorafenib in patients with advanced malignant melanoma. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2014;74:77-84.
- [370] Penson RT, Moore KM, Fleming GF, Braly P, Schimp V, Nguyen H, et al. A phase II study of ramucirumab (IMC-1121B) in the treatment of persistent or recurrent epithelial ovarian, fallopian tube or primary peritoneal carcinoma. *Gynecologic oncology*. 2014;134:478-85.

- [371] Schilder RJ, Sill MW, Lankes HA, Gold MA, Mannel RS, Modesitt SC, et al. A phase II evaluation of motesanib (AMG 706) in the treatment of persistent or recurrent ovarian, fallopian tube and primary peritoneal carcinomas: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecologic oncology*. 2013;129:86-91.
- [372] Tamiya M, Tamiya A, Yamadori T, Nakao K, Asami K, Yasue T, et al. Phase 2 study of bevacizumab with carboplatin-paclitaxel for non-small cell lung cancer with malignant pleural effusion. *Medical oncology (Northwood, London, England)*. 2013;30:676.
- [373] Wiestler B, Radbruch A, Osswald M, Combs SE, Jungk C, Winkler F, et al. Towards optimizing the sequence of bevacizumab and nitrosoureas in recurrent malignant glioma. *Journal of neuro-oncology*. 2014;117:85-92.
- [374] Yap TA, Arkenau HT, Camidge DR, George S, Serkova NJ, Gwyther SJ, et al. First-in-human phase I trial of two schedules of OSI-930, a novel multikinase inhibitor, incorporating translational proof-of-mechanism studies. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2013;19:909-19.
- [375] Milan A, Puglisi E, Ferrari L, Bruno G, Losano I, Veglio F. Arterial hypertension and cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2014;134:2269-77.
- [376] Rautiola J, Donskov F, Peltola K, Joensuu H, Bono P. Sunitinib-induced hypertension, neutropenia and thrombocytopenia as predictors of good prognosis in metastatic renal cell carcinoma patients. *BJU international*. 2014.
- [377] Minardi D, Lucarini G, Santoni M, Mazzucchelli R, Burattini L, Pistelli M, et al. VEGF expression and response to sunitinib in patients with metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Anticancer research*. 2013;33:5017-22.
- [378] Schiekofer S, Galasso G, Sato K, Kraus BJ, Walsh K. Impaired revascularization in a mouse model of type 2 diabetes is associated with dysregulation of a complex angiogenic-regulatory network. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2005;25:1603-9.
- [379] Wada H, Satoh N, Kitaoka S, Ono K, Morimoto T, Kawamura T, et al. Soluble VEGF receptor-2 is increased in sera of subjects with metabolic syndrome in association with insulin resistance. *Atherosclerosis*. 2010;208:512-7.
- [380] Yilmaz MB, Biyikoglu SF, Akin Y, Guray U, Kisacik HL, Korkmaz S. Obesity is associated with impaired coronary collateral vessel development. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2003;27:1541-5.
- [381] Miyazawa-Hoshimoto S, Takahashi K, Bujo H, Hashimoto N, Saito Y. Elevated serum vascular endothelial growth factor is associated with visceral fat accumulation in human obese subjects. *Diabetologia*. 2003;46:1483-8.
- [382] Silha JV, Krsek M, Sucharda P, Murphy LJ. Angiogenic factors are elevated in overweight and obese individuals. *International journal of obesity (2005)*. 2005;29:1308-14.
- [383] Dandona P, Aljada A, Chaudhuri A, Mohanty P, Garg R. Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. *Circulation*. 2005;111:1448-54.
- [384] Jialal I, Fadini GP, Pollock K, Devaraj S. Circulating levels of endothelial progenitor cell mobilizing factors in the metabolic syndrome. *The American journal of cardiology*. 2010;106:1606-8.
- [385] Grundy SM. Metabolic syndrome: a multiplex cardiovascular risk factor. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2007;92:399-404.
- [386] Elias I, Franckhauser S, Ferre T, Vila L, Tafuro S, Munoz S, et al. Adipose tissue overexpression of vascular endothelial growth factor protects against diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2012;61:1801-13.
- [387] Lieb W, Safa R, Benjamin EJ, Xanthakis V, Yin X, Sullivan LM, et al. Vascular endothelial growth factor, its soluble receptor, and hepatocyte growth factor: clinical and genetic correlates and association with vascular function. *European heart journal*. 2009;30:1121-7.
- [388] Tarantino G, Lobello R, Scopacasa F, Contaldo F, Pasanisi F, Cirillo M, et al. The contribution of omental adipose tissue to adipokine concentrations in patients with the metabolic syndrome. *Clinical and investigative medicine Medecine clinique et experimentale*. 2007;30:E192-9.
- [389] Ersoy C, Kiyici S, Budak F, Oral B, Guclu M, Duran C, et al. The effect of metformin treatment on VEGF and PAI-1 levels in obese type 2 diabetic patients. *Diabetes research and clinical practice*. 2008;81:56-60.
- [390] McIlroy SP, Vahidassr MD, Savage DA, Patterson CC, Lawson JT, Passmore AP. Risk of Alzheimer's disease is associated with a very low-density lipoprotein receptor genotype in Northern Ireland. *American journal of medical genetics*. 1999;88:140-4.
- [391] Abecasis GR, Altshuler D, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Gibbs RA, et al. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*. 2010;467:1061-73.

VII.Publications



Associations of vascular endothelial growth factor (VEGF) with adhesion and inflammation molecules in a healthy population

Mohsen Azimi-Nezhad^{a,1}, Maria G. Stathopoulou^{a,1}, Amélie Bonnefond^a, Marc Rancier^a, Abdelsalam Saleh^a, John Lamont^b, Peter Fitzgerald^b, Ndeye Coumba Ndiaye^a, Sophie Visvikis-Siest^{a,*}

^a“Cardiovascular Genetics” Research Unit, EA4373, University of Lorraine, F-54000 Nancy, France

^bRadox Laboratories, Crumlin, United Kingdom

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 July 2012

Received in revised form 23 October 2012

Accepted 25 October 2012

Available online 30 November 2012

Keywords:

VEGF

ICAM1

E-selectin

TNF- α

IL-6

ABSTRACT

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is implicated in numerous pathologies through complex relationships with cellular adhesion molecules (CAMs) and inflammation markers. These have not been assessed in non-pathological conditions. Our aim was the evaluation of associations between VEGF and CAM/inflammation molecules in a healthy population, and of possible genomic interplays in order to better apprehend the underlying mechanisms leading to the pathology. We examined the associations between VEGF and ICAM-1, VCAM-1, E-, L-, P-selectins, TNF- α , CRP and IL-6 plasma levels in 403 healthy individuals. Gene expression of CAM/inflammation molecules and VEGF isoforms (121, 145, 165, and 189) were quantified in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). The effect of four genetic variants (explaining ~50% of the heritability of circulating VEGF levels) and of their interactions on plasma and mRNA levels of CAM/inflammation molecules was examined. VEGF was associated with ICAM-1 and E-selectin in plasma. In PBMCs, VEGF₁₄₅ mRNA was associated with ICAM-1, L-selectin and TNF- α expression. Interactions of the genetic variants were shown to affect ICAM-1, E-selectin, IL-6 and TNF- α plasma levels, while rs4416670 was associated with L-selectin expression. These findings propose a biological connection between VEGF and CAM/inflammation markers. Common genetic and transcriptional mechanisms may link these molecules and control their effect in healthy conditions.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a multifunctional cytokine that shows distinguished functions in angiogenesis, lymphangiogenesis, vascular permeability, and hematopoiesis [1]. VEGF has been linked with a number of vascular pathologies including cardiovascular diseases (ischemic heart disease, heart failure, stroke). VEGF is a highly conserved, disulfide-bonded dimeric glycoprotein of 34–45 kDa and it is produced by several cell types including fibroblasts, neutrophils, endothelial cells and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and macrophages [2]. Six isoforms of human VEGF, which range from 121 to 206 amino acid residues, have been identified. VEGF₁₄₅, and VEGF₂₀₆ have a key role during the angiogenesis of the human ovarian as well as in bone and wound healing [1,3,4]. VEGF₁₈₃ also has a broad tissue expression and may have not been easily detected earlier due to confusion with VEGF₁₈₉ [5].

Elevated circulating VEGF levels have been also observed in several types of cancer and in various other disorders, for example: ischemic heart disease, diabetes, reproductive, immune-inflammatory disorders [6,7].

The expression of the VEGF isoforms regulate the gene expression of cellular adhesion molecules (CAMs) and inflammation markers. Cellular adhesion molecules (CAMs) are cell membrane receptors that mediate several interactions known to play a key role in a variety of physiological and pathological conditions related to traffic and interactions between cells, cell-matrix contact and in determining the specificity of cell–cell binding [8]. Their participation in the development of the atherogenic plaque is well described [9]. Furthermore, atherosclerosis is characterized by chronic inflammation and inflammation markers have been associated with cardiovascular pathologies [10].

Indeed, complex relationships have been observed between VEGF, CAM and inflammation markers in many diseases and especially in cardiovascular-related phenotypes. For instance, some studies reported the involvement of E-, P- and L-selectin, vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM), intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and interleukin 6 (IL-6) in angiogenesis [11]. Also, hypoglycemia has been shown to increase circulating levels of

* Corresponding author. Address: “Cardiovascular Genetics” Research Unit, EA4373, University of Lorraine, 30 Rue lionnois, F-54000 Nancy, France. Tel.: +33 (0)6.07.60.25.69; fax: +33 (0)3.83.32.13.22.

E-mail address: Sophie.Visvikis-Siest@inserm.fr (S. Visvikis-Siest).

¹ Equal first authors.

VEGF, IL-6, E-selectin and ICAM-1 in healthy individuals and in patients with type 1 diabetes [12]. Moreover, it is noteworthy that several reports linked angiogenesis and inflammation, highlighting a key role of TNF- α (tumor necrosis factor- α) and CRP (C-reactive protein) [13–15]. Other important inflammation marker is interleukin 6 (IL-6). This anti- and pro-inflammatory cytokine is a primary determinant of the hepatic production of CRP [16]. Recent studies indicated the simultaneous increasing of IL-6 and VEGF circulating levels in some pathological conditions such as ovarian hyperstimulation syndrome induced ascites, diabetes, visceral obesity, cancer and hypertension [17–21]. Furthermore, IL-6 seems to induce VEGF expression in diabetic nephropathy and rheumatoid arthritis [22,23]. Serum levels of soluble adhesion molecules have also been correlated with serum levels of some acute phase proteins such as CRP in individuals with breast cancer [24]. In addition, in patients with hepatic cancer, the levels of soluble P-selectin have been associated with plasma levels of VEGF₁₆₅ [25].

The assessment of these relationships in different pathologies is progressing; however, due to the complexity of the pathophysiological mechanisms implicated in a disease, the origin of these biological connexions is difficult to be interpreted. Therefore, their investigation in the healthy state, where there is no implication of evident pathology, could offer important information concerning the physiological connexions between these molecules before the development of a specific disease. This could also be the key for the better understanding of the VEGF biological roles. However, to our knowledge, there is no published study of the link between VEGF and both CAM and inflammation markers in a healthy population.

Therefore, the aim of this study was to examine the associations between VEGF and ICAM-1, VCAM-1, E-, L- and P-selectins, TNF- α , IL-6 and CRP in plasma of supposed healthy individuals. Furthermore, we seek to investigate whether there is a relationship in expression profile of these molecules in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Finally, we thought to assess possible genetic links between these molecules. We have recently identified four single nucleotide polymorphisms (SNPs) (rs6921438, rs4416670, rs6993770 and rs10738760) explaining ~50% of VEGF circulating levels heritability [7]. Thus, we aimed to determine possible associations of these SNPs with plasma levels of CAM/inflammation markers, as well as their effect on gene expression in PBMCs.

2. Materials and methods

2.1. Study population

The STANISLAS Family Study (SFS) is a 10-year longitudinal survey involving 1006 volunteer families from Vandoeuvre-lès-Nancy, France between 1993 and 1995 [26]. Individuals with chronic disorders (cardiovascular diseases or cancer) or having a personal history of cardiovascular disease were not included, as the aim of the study was the assessment of genetic susceptibility factors on the variability of intermediate phenotypes in physiological conditions without the influence of any long term medication and disease. The study protocol was approved by the Local Ethics Committee of Nancy and all subjects gave written informed consent for their participation in the study. Four hundred and three unrelated adults collected during the second examination of the SFS were involved in the present study for which all data were available.

2.2. Laboratory measurements

Blood samples were collected after overnight fasting. Sodium EDTA-plasma was separated by centrifugation at 2000g for

15 min at 4 °C and stored at –196 °C in liquid nitrogen until analysis. Circulating plasma levels quantification was performed by Randox Ltd. (Crumlin, UK) using a biochip array analyzer (Evidence[®]) [27].

Plasma IL-6, TNF- α , ICAM-1, E-, L- and P-selectins were determined by a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (R&D Systems, UK) according to the manufacturer's instruction. Concentrations of plasma CRP were determined using the BN II nephelometer (Germany).

Before the quantification of CAM and inflammation molecules, we tested the effect of the procedures of storage and sample collection on their concentrations. Fresh and frozen state had no significant effect on the concentration of the different molecules except from VCAM-1, which was less stable. Thus it was not included in the analyses of the present study.

2.3. Gene expression analysis

PBMCs were isolated by centrifugation on a density gradient of Ficoll [28] (Ficoll-Paque™ PLUS; Amersham BioSciences). Total RNAs were extracted from PBMCs with a MagNaPure automate, using the MagNA Pure LC RNA HP isolation kit and RNA HP Blood External lysis protocol (Roche Diagnostics, France) in short period of time after cell isolation. Reverse transcription of total RNAs were performed using 200 units of M-MuLV Reverse Transcriptase with 0.25 μ g of oligos (dT) (Promega, France) according to a previously described protocol [29]. Quantification of the transcripts coding for the VEGF isoforms (VEGF121 [antisense: 5'-CTCggCTTgTCACATTTTC-3' and probe: 5'-TgCagACCAAagAAAagATagCAAgACA], VEGF145 [antisense: 5'-CTTgTCACATACgCTCCAggAC-3' and probe: 5'AAACgAAAagCgCAAagAAATCCcgTA-3'], VEGF165 [antisense: 5'-GCTTCTCCgCTC TgAgCA-3' and probe: 5'-AgCAAgACAagAAAATCCCTgTgggCC-3'], VEGF189 [antisense: 5'-CCACAgggAACgCTCCAggAC-3' and probe: 5'-AgCAAagACAagAAAAAAATCagITCgAggAAA-3']), ICAM-1, E-, L-, P-selectins, TNF- α , IL-6 and the beta 2 microglobulin (β 2M) control gene were performed using TaqMan[®] and LightCycler technologies (LC TaqMan Master Kit, Roche Diagnostics, France). It should be mentioned that a common VEGF forward primer (5'-gAgCTTCTACagCA CAACAAA-3') was designed based on the fact that all VEGF isoforms share exons 1–5. All experiments were performed in duplicate. RT-PCR optimization and specificity of Real Time-PCR products were conducted using SYBR[®] Green technology (LC FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I kit, Roche Diagnostic, France), melting curves analysis and agarose gel electrophoresis of the PCR amplicons, as previously described [29]. VEGF₁₈₃, VEGF₂₀₆, E-selectin and CRP expression in PBMCs were not quantified due to their insufficient expression in this cell type. In total, available mRNA data existed for a subsample of 65 subjects. All mRNA levels were normalized to the mRNA levels of β 2M gene. Total VEGF mRNA was calculated as the sum of the ratio of the four isoforms present in PBMCs.

2.4. Genotyping

SNPs rs6921438, rs4416670, rs6993770, and rs10738760 were genotyped by Genoscreen (<http://genoscreen.fr>), using a Sequenom iPLEX Gold assay–Medium Throughput Genotyping Technology [30]. The significant results of this study were compared to previous findings in the literature (previous GWAS) by imputation analyses using Plink. SNPs with a correlation coefficient $\geq 80\%$ were considered in linkage disequilibrium (LD).

2.5. Statistical analysis

Continuous variables are presented as mean value \pm standard deviation and categorical variables are given in percentages. Hardy–Weinberg equilibrium was tested using the chi-square test.

All molecules blood concentrations were log-transformed to normalize their distribution. Similar transformation was performed for mRNA values for all variables with exception of VEGF₁₆₅ and VEGF₁₈₉ whose values were normally distributed and IL-6 whose values were ln-transformed to achieve normal distribution.

Linear regression models adjusted for age, gender and body mass index (BMI) were used to test possible associations between VEGF related SNPs and plasma levels of the adhesion/inflammation molecules. Similar linear regression models adjusted for age and gender and BMI were applied for the assessment of associations between VEGF mRNA levels and mRNA levels of these molecules and between the four SNPs and blood levels and mRNA levels of the assessed markers.

For the SNPs associations analyses an additive model was used. Results are presented using the minor allele as reference allele.

The assessment of gene * gene epistatic interactions was tested using all possible 2 × 2 combinations between the four SNPs. In the regression models adjusted for age, gender and BMI, two SNPs and their interactions term were added in order to test the association of these interactions with adhesion/inflammation molecules plasma levels only. Epistatic interactions were not assessed for associations with mRNA levels due to the small sample size with available transcriptomic data and the low statistical power to assess this type of interactions.

All analyses were performed using PLINK 1.07 (<http://pnu.g.harvard.edu/purcell/plink>) [31] and the SPSS 16.0 (SPSS, Inc, Chicago, Illinois) statistical software. Significance was determined at a two-tailed $P = 0.05$ level.

3. Results

The general characteristics of the studied population and of the four VEGF-related SNPs are presented in Tables 1–3 respectively.

3.1. Associations of VEGF plasma levels with plasma levels of CAM and inflammation molecules

VEGF plasma levels were associated with ICAM-1 levels in regression models adjusted for age, gender and BMI ($\beta = 0.043$, $P = 0.023$) and with E-selectin ($\beta = 0.085$, $P = 0.039$) (Table 4).

3.2. Associations of VEGF isoforms mRNA and gene expression of CAM and inflammation molecules

We then assessed the association between total and four VEGF isoforms and gene expression of ICAM-1, P- and L-selectin, TNF- α , and IL-6 in PBMCs. VEGF₁₆₅ mRNA was the most abundant expressed isoform by PBMCs. In regression models adjusted for age, gender and BMI, total VEGF mRNA was associated with TNF- α mRNA levels ($\beta = 0.412$, $P = 0.015$), while VEGF₁₄₅ isoform was

significantly associated with ICAM-1 mRNA ($\beta = 0.353$, $P = 0.021$), L-selectin mRNA ($\beta = 0.611$, $P = 0.001$) and TNF- α mRNA ($\beta = 0.616$, $P = 0.001$) (Table 4). The other VEGF isoforms were not significantly associated with gene expression of the assessed molecules.

3.3. Associations of rs6921438, rs4416670, rs6993770, rs10738760 and their epistatic interactions with plasma levels and transcripts of CAM and inflammation molecules

Significant epistatic interactions were identified for plasma VEGF, E-selectin, TNF- α , ICAM-1 and IL-6 levels (Table 5, Supplementary Table 1). In particular, an interaction between rs6993770 (TA genotype and T allele) and rs10738760 (G allele) was associated with increased levels of ICAM-1 and E-selectin. The T allele of rs6993770 interacts with the C allele of rs4416670 and the A allele of rs6921438 to increase IL-6 levels, while a decrease in IL-6 levels were observed due to an interaction between rs10738760 (A allele) and T allele of rs4416670 and the G allele of rs6921438. Moreover, the A allele of rs6921438 was associated with increased VEGF levels when combined with the A allele of rs10738760 and increased levels of TNF- α in the presence of the C allele of rs4416670.

A significant association was observed between rs4416670 and mRNA levels of L-selectin ($\beta = 0.196$, $P = 0.039$). No other significant association of the genetic variants with mRNA levels was observed.

4. Discussion

In the present study, we assessed the relationship between VEGF and CAM and inflammation molecules in healthy state conditions and by a multi-dimensional approach: associations in plasma, in gene expression in PBMCs, common genetic determinants and possible functional effects of these determinants on gene expression. In all these levels, significant results that may explain the physiological relationships between these molecules were observed.

VEGF plasma levels were positively associated with ICAM-1 and E-selectin. To the best of our knowledge, this is the first study to report a relationship between VEGF, the main angiogenic factor, ICAM-1, the mediator of leukocytes firm- adhesion to endothelial cells and E-selectin, the mediator of leukocytes rolling on vascular endothelium [31]. CAMs have a pivotal role in angiogenesis [8]. They regulate angiogenesis both indirectly and directly [32]. Among the soluble adhesion molecules, E-selectin and ICAM-1, have been shown to be directly angiogenic [33]. Therefore, the observed association of these adhesion molecules with VEGF could be explained by common angiogenic activities present already in healthy conditions.

In contrary, no association was found with L- and P-selectins and with any of the inflammatory markers and VEGF. Unlike E-selectin which is transcriptionally regulated in endothelial cells, P-selectin is translocated within minutes after the inflammation stimuli from intracellular granules and promotes the immediate reattachment and quick rolling of leukocytes over vascular surfaces [34]. Also, L-selectin is cleaved rapidly from the surface of activated leukocytes [35]. Therefore, in a healthy state, where inflammation process is not evident, these two molecules may not have an important role in the physiological interconnections, with VEGF. The absence of associations of VEGF with inflammation markers, further support this hypothesis. CRP has been previously shown not to be associated with VEGF levels in a healthy population [36]. In the current study we confirmed this finding and extent it to other inflammation molecules as well. These results could be

Table 1
Characteristics of study population ($n = 403$).

Variable	Mean ^a	SD
Age (years)	44.460	4.885
Gender (%) male	50.4	
Body mass index (kg/m ²)	24.9	3.9
Vascular endothelial growth factor (pg/ml)	42.748	43.330
Interleukin 6 (pg/ml)	1.376	1.695
Tumor necrosis factor α (pg/ml)	2.320	4.535
E-selectin (mg/l)	53.159	25.882
L-selectin (mg/l)	1060.693	407.889
P-selectin (mg/l)	138.917	42.891
C-reactive protein (mg/l)	1.794	3.426
Intercellular adhesion molecule-1 (mg/l)	263.023	69.486

^a Mean values for continuous variables and percentages for categorical variables.

Table 2
Gene expression levels of study population (n = 65).

Variable	Mean ^a	SD	Range
Vascular endothelial growth factor isoform 121	50.0	21.9	18.9–120.0
Vascular endothelial growth factor isoform 145	49.4	27.1	5.99–105.7
Vascular endothelial growth factor isoform 165	258.9	135.3	41.4–615.3
Vascular endothelial growth factor isoform 189	15.0	7.16	3.4–32.3
Total vascular endothelial growth factor	2547.9	1641.6	739.3–5821.5
Interleukin 6	5.7	7.3	0.8–28.1
Tumor necrosis factor α	849.4	942.6	165.3–1905.7
L-selectin	11,338.5	10,317.2	2635.5–36,065.2
P-selectin	2990.4	3737.5	316.7–9686.1
Intercellular adhesion molecule-1	153.5	183.1	59.8–410.0

^a Mean values are presented as normalized ratio with the beta 2 microglobulin (β 2M) control gene.

Table 3
SNPs characteristics.

Chromosome	SNP	Function	Closed to/on gene	Minor allele	Common allele	Minor allele frequency
6	rs6921438	Intergenic	MGC45491 and MRPL14 (near VEGF)	A	G	0.445
6	rs4416670	Intergenic	MGC45491 and MRPL14 (near VEGF)	C	T	0.476
8	rs6993770	Intronic	ZFPM2	T	A	0.283
9	rs10738760	Intergenic	VLDLR and KCNV2	A	G	0.491

SNP: single nucleotide polymorphism, MGC: Ancient (alternative) acronym of C6orf223 (chromosome 6 open reading frame 223), MRPL14: mitochondrial ribosomal protein L14, ZFPM2: zinc finger protein, multitype 2, VLDLR: very low density lipoprotein receptor, KCNV2: potassium channel, subfamily V, member 2.

Table 4
Association between plasma VEGF and its isoforms transcripts and adhesion and inflammation molecules, adjusted for age, gender, and BMI.

VEGF	ICAM-1		L-selectin		E-selectin		TNF- α	
	mRNA	Protein	mRNA	Protein	mRNA	Protein	mRNA	Protein
mRNA								
Total VEGF							0.412 (P=0.015)	
VEGF ₁₂₁	–	–	–	–	–	–	–	–
VEGF ₁₄₅	0.353 (P=0.018)	–	0.611 (P=0.001)	–	–	–	0.616 (P=0.001)	–
VEGF ₁₆₅	–	–	–	–	–	–	–	–
VEGF ₁₈₉	–	–	–	–	–	–	–	–
Plasma levels								
VEGF	–	0.043*	–	–	–	0.085*	–	–

The values corresponding to beta coefficient (P-value)

Table 5
Epistatic interactions of SNPs on blood levels of VEGF, E-selectin, TNF- α , ICAM-1 and IL6 (regression models adjusted for age, gender and BMI).

SNPs	rs6921438	rs 4416670	rs 6993770	rs 10738760
rs 6921438				VEGF (P=0.01)
rs 4416670	TNF- α (P=0.035)			
rs 6993770	IL-6 (P=0.004)	IL-6 (P=0.0008)		E-selectin (P=0.041)
rs 10738760	IL-6 (P=0.050)	IL-6 (P=0.004)	ICAM-1 (P=0.021)	

explained by the fact that the study population is healthy, thus, the relationship between VEGF and inflammation markers could be consequence of the pathology, such as vascular dysfunction (e.g. in individuals with diabetes mellitus) [37].

Apart from the associations in the level of plasma concentrations, we examined possible similarities in the expression profile of CAM/inflammation molecules in PBMCs with VEGF. This cell type is easily accessible and contain cell types (lymphocytes and monocytes) that interact with different tissues, thereby probably acting as 'sensors' differentiating individuals with CVDs risk, especially for the pro-inflammatory state [38,39]. Our results confirmed this fact that VEGF₁₆₅ is the most abundant VEGF isoform [1,3] as we found that VEGF₁₆₅ mRNA is one that prevails in PBMCs. We demonstrated that VEGF₁₄₅ isoform mRNA is positively associated with ICAM-1, L-selectin and TNF- α expression while total VEGF mRNA is associated with TNF- α . Nowak et al. [40] have reported

that TNF- α induces a significant up regulation of circulating total VEGF. Therefore, we could hypothesize that TNF has an effect on VEGF splicing.

These associations could indicate the existence of common transcriptional factors or other molecular mechanisms that regulate the expression of these molecules in PBMCs in non-pathological situations.

The regulation of VEGF levels occurs at the gene transcriptional, translational, and post-translation levels. Upon binding of VEGF to its corresponding receptor (VEGFR2) in endothelial cells, three main pathways promote cell proliferation, migration, survival and nitric oxide production [31]. These pathways included the PI 3'-kinase (phosphoinositide)/Akt (protein kinase b) cascade, the tyrosine phosphorylation of PLC gamma (phospholipase c), and the MAPK/ERK (mitogen-activated protein kinase/extracellular-regulated kinase) cascade. Among these regulatory pathways the stimulation

of PLC gamma activates the protein kinase C (PKC) [29] and then leads to activation of NF- κ B transcription factor [41]. A growing body of evidence indicates that the activation of NF- κ B induces expression of ICAM-1 transcripts in endothelial cells [42–44]. In agreement with this concept, Kim and colleagues [31] have examined the signal transduction mechanisms by which VEGF induces adhesion molecules in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). Indeed, they have shown that VEGF-induced expression of ICAM-1 is mediated mainly through NF- κ B activation. Interestingly, Kiriakidis and colleagues [2] have documented the involvement of the transcriptional factor NF- κ B in the up-regulation of VEGF in human macrophages to lipopolysaccharide-induced response. Also, it regulates many of the genes involved in immune and inflammatory responses [45]. Concerning TNF- α , it has been shown to induce VEGF production via the stimulation of its corresponding transcription factor, HIF-1 α [46]. Westra and colleagues [47] have shown that blocking of TNF- α reduces TNF- α induced VEGF production. Further studies have documented that TNF- α up regulates VEGF production by synovial membrane cells and PBMCs of patients with rheumatoid arthritis [48,49]. It has also been shown that NF- κ B is partly responsible for the up-regulation of VEGF mRNA expression in response to TNF- α [50]. Our study revealed that VEGF₁₄₅ isoform mRNA is positively associated with L-selectin.

Concerning IL-6, Hao and colleagues [51] have illustrated that VEGF; via vascular endothelial growth factor receptor 2-protein kinase D (VEGFR2-PKD) axis induces the production of some proinflammatory cytokines such as IL-6 in endothelial cells but not in leukocytes. This could probably explain the lack of association between VEGF and IL-6 expression in PBMCs. Also, as mentioned before, P-selectin's reaction in inflammation is not transcriptionally regulated [34]. Thus, the absence of common expression profile between VEGF and P-selectin could be explained in non-pathological state.

It is important also to mention that the expression of a gene in one cell type does not reflect the total concentration in plasma. Therefore, the associations between VEGF, L-selectin and TNF- α mRNA levels are not expected to be necessarily present in plasma. Our transcriptomic approach showed the utility of this epidemiological model in identifying unsuspected until now relationships of these molecules in healthy conditions.

Furthermore, very interestingly, only VEGF₁₄₅ isoform mRNA showed associations with the CAM/inflammation molecules expression. VEGF₁₄₅ binds to heparin but behaves like VEGF₁₂₁ with regard to its receptor recognition ability. It also has angiogenic effects similar to VEGF₁₂₁ and VEGF₁₆₅. Also, among VEGF isoforms, VEGF₁₄₅ is predominantly expressed in reproductive tissues and in several tumor cell lines derived from female reproductive organs as well as in PBMCs of acute myeloid leukemia patients [52,53]. These findings highlight the importance of VEGF₁₄₅ in both vascular and malignant diseases and in combination with our results in healthy population, may give new directions for further research concerning the implication of this isoform in the development of cancer pathologies.

Finally, as we have previously identified four SNPs that explain a large percentage of VEGF plasma levels heritability in healthy individuals, we sought to examine whether these SNPs could have an effect on CAM/inflammation traits and whether they could be associated with their gene expression in PBMCs. Significant epistatic interactions were revealed. In particular, an interaction between rs6993770 (TA genotype and T allele) and rs10738760 (G allele) was associated with increased levels of ICAM-1 and E-selectin. This result further supports the associations of VEGF with these molecules (especially ICAM-1) in plasma and expression levels. We also demonstrated multiple epistatic interactions between the VEGF-related SNPs and IL-6 plasma levels. Specifically, the T allele of rs6993770 interacts with the C allele of rs4416670 and the A allele of rs6921438 to increase IL-6 levels.

These two latter SNPs show a similar positive interaction with rs10738760. A complex but common genetic regulation between VEGF and IL-6 is thus speculated. However, as no association was found for IL-6 and VEGF in plasma concentrations and in expression levels, the effect of SNPs on IL-6 is likely to be independent from VEGF. Moreover, a significant interaction was detected between rs4416670 and rs6921438 with a positive effect on TNF- α plasma levels.

It should be mentioned that these SNPs have not been previously associated with any of the CAM/inflammation assessed traits. Therefore, these interactions may indicate novel genetic markers for these molecules. However, replication of these findings is needed before the establishment of a conclusion.

Finally, we examined whether these genetic polymorphisms had a functional effect on the traits in terms of gene expression modification. A positive association was identified only for the C allele of rs4416670 with L-selectin mRNA. Nevertheless, this SNP was not associated with L-selectin levels; therefore a direct effect of the SNP cannot be speculated. rs4416670 could have a functionality in L-selectin gene expression modification, indirectly, possibly through a transcriptional factor or a more complex mechanism. As VEGF₁₄₅ mRNA was positively associated with L-selectin expression, this mechanism could be the common link between the two molecules and rs4416670.

The multi-dimensional approach used in this study can be considered as a strong point of this work in the assessment, validation and explanation of the relations between VEGF and adhesion/inflammation molecules in healthy individuals, thus giving new perspectives and hypotheses for further studies in order to identify the exact molecular mechanisms of VEGF implication in the development of specific diseases.

In conclusion, we have addressed in this study for the first time the associations of VEGF with adhesion molecules and a number of inflammation cytokines in a healthy population. We have found significant associations of VEGF with ICAM-1 and E-selectin in plasma concentrations and common expression profiles for VEGF and ICAM-1, L-selectin, and TNF- α in PBMCs. Finally, epistatic interactions between VEGF-related SNPs were shown to affect the levels of ICAM-1, E-selectin, IL-6 and TNF- α and the expression of L-selectin. These findings support the existence of complex relationships between angiogenic, adhesion and inflammation molecules that exist even in non-pathological situations, which should be taken into account in future studies concerning the implication of VEGF in related pathologies. Their understanding may promote the knowledge of the molecular mechanisms and the understanding of the processes that mediate complex pathologies such as cardiovascular diseases and cancer.

Disclosures

None.

Acknowledgments

We are deeply grateful for the cooperation of the families participating in the STANISLAS Cohort. We acknowledge the management, reception, preclinical, laboratory and medical staff of the Center for Preventive Medicine of Vandoeuvre-lès-Nancy (France). Data make part of the Biological Resources Center (BRC), Interactions Gène-Environment en Physiopathologie Cardio-Vasculaire (IGE-PCV). The study was supported by the "BioIntelligence" project.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2012.10.024>.

Reference

- [1] Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9(6):669–76.
- [2] Kiriakidis S, Andreacos E, Monaco C, Foxwell B, Feldmann M, Paleolog E. VEGF expression in human macrophages is NF-kappaB-dependent: studies using adenoviruses expressing the endogenous NF-kappaB inhibitor IkkappaBalpha and a kinase-defective form of the IkkappaB kinase 2. *J Cell Sci* 2003;116(Pt 4):665–74.
- [3] Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004;25(4):581–611.
- [4] Laitinen M, Ristimäki A, Honkasalo M, Narko K, Paavonen K, Ritvos O. Differential hormonal regulation of vascular endothelial growth factors VEGF, VEGF-B, and VEGF-C messenger ribonucleic acid levels in cultured human granulosa-luteal cells. *Endocrinology* 1997;138(11):4748–56.
- [5] Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol* 2002;20(21):4368–80.
- [6] Debette S, Visvikis-Siest S, Chen MH, Ndiaye NC, Song C, Destefano A, et al. Identification of cis- and trans-acting genetic variants explaining up to half the variation in circulating vascular endothelial growth factor levels. *Circ Res* 2011;109(5):554–63.
- [7] Blann AD, Belgore FM, McCollum CN, Silverman S, Lip PL, Lip GY. Vascular endothelial growth factor and its receptor, Flt-1, in the plasma of patients with coronary or peripheral atherosclerosis, or type II diabetes. *Clin Sci (Lond)* 2002;102(2):187–94.
- [8] Krieglstein CF, Granger DN. Adhesion molecules and their role in vascular disease. *Am J Hypertens* 2001;14(6 Pt 2):445–54S.
- [9] Galkina E, Ley K. Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27(11):2292–301.
- [10] Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med* 2011;17(11):1410–22.
- [11] Yukami T, Hasegawa M, Matsushita Y, Fujita T, Matsushita T, Horikawa M, et al. Endothelial selectins regulate skin wound healing in cooperation with L-selectin and ICAM-1. *J Leukoc Biol* 2007;82(3):519–31.
- [12] Gogitidze JN, Hedrington MS, Briscoe VJ, Tate DB, Ertl AC, Davis SN. Effects of acute hypoglycemia on inflammatory and pro-atherothrombotic biomarkers in individuals with type 1 diabetes and healthy individuals. *Diabetes Care* 2010;33(7):1529–35.
- [13] Liu N, Liu J, Ji Y, Lu P. Toll-like receptor 4 signaling mediates inflammatory activation induced by C-reactive protein in vascular smooth muscle cells. *Cell Physiol Biochem* 2010;25(4–5):467–76.
- [14] Siervo M, Ruggiero D, Sorrice R, Nutile T, Aversano M, Iafusco M, et al. Body mass index is directly associated with biomarkers of angiogenesis and inflammation in children and adolescents. *Nutrition* 2012;28(3):262–6.
- [15] Slevin M, Matou-Nasri S, Turu M, Luque A, Rovira N, Badimon L, et al. Modified C-reactive protein is expressed by stroke neovessels and is a potent activator of angiogenesis in vitro. *Brain Pathol* 2010;20(1):151–65.
- [16] Haddy N, Sassi C, Drosch S, Zaiou M, Siest G, Ponthieux A, et al. IL-6, TNF-alpha and atherosclerosis risk indicators in a healthy family population: the STANISLAS cohort. *Atherosclerosis* 2003;170(2):277–83.
- [17] Ishikawa T, Kokura S, Sakamoto N, Okajima M, Matsuyama T, Sakai H, et al. Relationship between circulating cytokine levels and physical or psychological functioning in patients with advanced cancer. *Clin Biochem* 2012;45(3):207–11.
- [18] lysaght J, van der Stok EP, Allott EH, Casey R, Donohoe CL, Howard JM, et al. Pro-inflammatory and tumour proliferative properties of excess visceral adipose tissue. *Cancer Lett* 2011;312(1):62–72.
- [19] Manna P, Sil PC. Impaired redox signaling and mitochondrial uncoupling contributes vascular inflammation and cardiac dysfunction in type 1 diabetes: protective role of arjunolic acid. *Biochimie* 2012;94(3):786–97.
- [20] Chen CD, Wu MY, Chen HF, Chen SU, Ho HN, Yang YS. Relationships of serum pro-inflammatory cytokines and vascular endothelial growth factor with liver dysfunction in severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod* 2000;15(1):66–71.
- [21] Foster W, Carruthers D, Lip GY, Blann AD. Relationships between endothelial, inflammatory and angiogenesis markers in rheumatoid arthritis: implications for cardiovascular pathophysiology. *Thromb Res* 2009;123(4):659–64.
- [22] Dayer JM, Choy E. Therapeutic targets in rheumatoid arthritis: the interleukin-6 receptor. *Rheumatology (Oxford)* 2010;49(1):15–24.
- [23] Tang SC, Leung JC, Lai KN. Diabetic tubulopathy: an emerging entity. *Contrib Nephrol* 2011;170:124–34.
- [24] Tesarova P, Kvasnicka J, Umlaufova A, Homolkova J, Kalousova M, Tesar V. Soluble adhesion molecules in female patients with breast carcinoma. *Cas Lek Cesk* 2003;142(5):292–9.
- [25] Ferroni P, Spila A, D'Alessandro R, Martini F, Iacovone F, Ettorre GM, et al. Platelet activation and vascular endothelial growth factor 165 release in hepatocellular cancer. *Clin Chim Acta* 2011;412(5–6):450–4.
- [26] Visvikis-Siest S, Siest G. Cohort: a 10-year follow-up of supposed healthy families. Gene-environment interactions, reference values and evaluation of biomarkers in prevention of cardiovascular diseases. *Clin Chem Lab Med* 2008;46(6):733–47.
- [27] Fitzgerald SP, Lamont JV, McConnell RL, Benchikh eO. Development of a high-throughput automated analyzer using biochip array technology. *Clin Chem* 2005;51(7):1165–76.
- [28] Marteau JB, Mohr S, Pfister M, Visvikis-Siest S. Collection and storage of human blood cells for mRNA expression profiling: a 15-month stability study. *Clin Chem* 2005;51(7):1250–2.
- [29] Ehrlich M, Bocker S, van den Boom D. Multiplexed discovery of sequence polymorphisms using base-specific cleavage and MALDI-TOF MS. *Nucleic Acids Res* 2005;33(4):e38.
- [30] Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 2007;81(3):559–75.
- [31] Kim I, Moon SO, Kim SH, Kim HJ, Koh YS, Koh GY. Vascular endothelial growth factor expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), and E-selectin through nuclear factor-kappa B activation in endothelial cells. *J Biol Chem* 2001;276(10):7614–20.
- [32] Rabquer BJ, Amin MA, Teegala N, Shaheen MK, Tsou PS, Ruth JH, et al. Junctional adhesion molecule-C is a soluble mediator of angiogenesis. *J Immunol* 2010;185(3):1777–85.
- [33] Koch AE, Halloran MM, Haskell CJ, Shah MR, Polverini PJ. Angiogenesis mediated by soluble forms of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1. *Nature* 1995;376(6540):517–9.
- [34] Somers WS, Tang J, Shaw GD, Camphausen RT. Insights into the molecular basis of leukocyte tethering and rolling revealed by structures of P- and E-selectin bound to SLe(X) and PSGL-1. *Cell* 2000;103(3):467–79.
- [35] Zhao L, Shey M, Farnsworth M, Dailey MO. Regulation of membrane metalloproteolytic cleavage of L-selectin (CD62L) by the epidermal growth factor domain. *J Biol Chem* 2001;276(33):30631–40.
- [36] Berrahmoune H, Herbeth B, Lamont JV, Masson C, Fitzgerald PS, Visvikis-Siest S. Heritability for plasma VEGF concentration in the Stanislas family study. *Ann Hum Genet* 2007;71(Pt 1):54–63.
- [37] Xu J, Zou MH. Molecular insights and therapeutic targets for diabetic endothelial dysfunction. *Circulation* 2009;120(13):1266–86.
- [38] Aziz H, Zaas A, Ginsburg GS. Peripheral blood gene expression profiling for cardiovascular disease assessment. *Genomic* 2007;1(3–4):105–12.
- [39] Visvikis-Siest S, Marteau JB, Samara A, Berrahmoune H, Marie B, Pfister M. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs): a possible model for studying cardiovascular biology systems. *Clin Chem Lab Med* 2007;45(9):1154–68.
- [40] Nowak Dawid G, Woolard Jeanette, Amin Elianna Mohamed, Konopatskaya Olga, Saleem Moin A, et al. *J Cell Sci* 2008;15 121(pt 20):3487–95.
- [41] Ghosh S, Baltimore D. Activation in vitro of NF-kappa B by phosphorylation of its inhibitor I kappa B. *Nature* 1990;344(6267):678–82.
- [42] Boyle Jr EM, Kovacich JC, Cauty Jr TG, Morgan EN, Chi E, et al. Inhibition of nuclear factor-kappa B nuclear localization reduces human E-selectin expression and the systemic inflammatory response. *Circulation* 1998;98(19 (Suppl.)):II282–8.
- [43] Ledebur HC, Parks TP. Transcriptional regulation of the intercellular adhesion molecule-1 gene by inflammatory cytokines in human endothelial cells. Essential roles of a variant NF-kappa B site and p65 homodimers. *J Biol Chem* 1995;270(2):933–43.
- [44] Wrighton CJ, Hofer-Warbinek R, Moll T, Eytner R, Bach FH, De MR. Inhibition of endothelial cell activation by adenovirus-mediated expression of I kappa B alpha, an inhibitor of the transcription factor NF-kappa B. *J Exp Med* 1996;183(3):1013–22.
- [45] Suh J, Rabson AB. NF-kappaB activation in human prostate cancer: important mediator or epiphenomenon? *J Cell Biochem* 2004;91(1):100–17.
- [46] Mohammadi M, Bazrafshani MR, Day PJ, Ollier WE. Vascular endothelial growth factor production is regulated by gene polymorphisms. *Iran J Immunol* 2009;6(3):119–29.
- [47] Westra J, Molema G, Kallenberg CG. Hypoxia-inducible factor-1 as regulator of angiogenesis in rheumatoid arthritis – therapeutic implications. *Curr Med Chem* 2010;17(3):254–63.
- [48] Bottomley MJ, Webb NJ, Watson CJ, Holt L, Bukhari M, Denton J, et al. Placenta growth factor (PlGF) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion from mononuclear cells and is co-expressed with VEGF in synovial fluid. *Clin Exp Immunol* 2000;119(1):182–8.
- [49] Paleolog EM, Young S, Stark AC, McCloskey RV, Feldmann M, Maini RN. Modulation of angiogenic vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1998;41(7):1258–65.
- [50] Yoshida S, Ono M, Shono T, Izumi H, Ishibashi T, Suzuki H, et al. Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. *Mol Cell Biol* 1997;17(7):4015–23.
- [51] Hao Q, Wang L, Tang H. Vascular endothelial growth factor induces protein kinase D-dependent production of proinflammatory cytokines in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009;296(4):C821–7.
- [52] Poltorak Z, Cohen T, Sivan R, Kandelis Y, Spira G, Vlodavsky I, et al. VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. *J Biol Chem* 1997;272(11):7151–8.
- [53] Mourah S, Porcher R, Lescaille G, Rousset P, Podgorniak MP, Labarchede G, et al. Quantification of VEGF isoforms and VEGFR transcripts by qRT-PCR and their significance in acute myeloid leukemia. *Int J Biol Markers* 2009;24(1):22–31.

A common variant highly associated with plasma VEGFA levels also contributes to the variation of both LDL-C and HDL-C[§]

Maria G. Stathopoulou,^{1,*} Amélie Bonnefond,^{1,*} Ndeye Coumba Ndiaye,^{1,*} Mohsen Azimi-Nezhad,^{*} Said El Shamieh,^{*} Abdelsalam Saleh,^{*} Marc Rancier,^{*} Gerard Siest,^{*} John Lamont,[†] Peter Fitzgerald,[†] and Sophie Visvikis-Siest^{2,*}

Université de Lorraine,^{*} "Génétique Cardio-vasculaire," EA-4373, Nancy, F-54000, France; and Radox Laboratories, Ltd.,[†] Crumlin, Antrim, United Kingdom

Abstract Vascular endothelial growth factor A (VEGFA) is among the most-significant stimulators of angiogenesis. Its effect on cardiovascular diseases and on the variation of related risk factors such as lipid parameters is considered important, although as yet unclear. Recently, we identified four common variants (rs6921438, rs4416670, rs6993770, and rs10738760) that explain up to 50% of the heritability of plasma VEGFA levels. In the present study, we aimed at assessing the contribution of these variants to the variation of blood lipid levels (including apoE, triglycerides, total cholesterol, low- and high-density lipoprotein cholesterol levels (LDL-C and HDL-C)) in healthy subjects. The effect of these single-nucleotide polymorphisms (SNPs) on lipid levels was assessed using linear regression in discovery and replication samples (n = 1,006 and n = 1,145; respectively), followed by a meta-analysis. Their gene×gene and gene×environment interactions were also assessed. SNP rs6921438 was associated with HDL-C ($\beta = -0.08$ mmol/l, $P_{\text{overall}} = 1.2 \times 10^{-7}$) and LDL-C ($\beta = 0.13$ mmol/l, $P_{\text{overall}} = 1.5 \times 10^{-4}$). We also identified a significant association between the interaction rs4416670×hypertension and apoE variation ($P_{\text{overall}} = 1.7 \times 10^{-5}$).[§] Therefore, our present study shows a common genetic regulation between VEGFA and cholesterol homeostasis molecules. The SNP rs6921438 is in linkage disequilibrium with variants located in an enhancer- and promoter-associated histone mark region and could have a regulatory effect in the expression of surrounding genes, including VEGFA.—Stathopoulou, M. G., A. Bonnefond, N. C. Ndiaye, M. Azimi-Nezhad, S. El Shamieh, A. Saleh, M. Rancier, G. Siest, J. Lamont, P. Fitzgerald, and S. Visvikis-Siest. A common variant highly associated with plasma VEGFA levels also contributes to the variation of both LDL-C and HDL-C. *J. Lipid Res.* 2013. 54: 535–541.

Supplementary key words vascular endothelial growth factor A polymorphism • lipid metabolism • cardiovascular disease • high density lipoprotein-C • low density lipoprotein-C • epistatic interaction • gene×environment interaction

This project was realized thanks to the Bio-Intelligence project. The authors also thank the "Institut national de la santé et de la recherche médicale" (INSERM), the "Région Lorraine, the "communauté Urbaine de Grand Nancy," and the "Université de Lorraine" for supporting this work.

Manuscript received 17 July 2012 and in revised form 21 November 2012.

Published, JLR Papers in Press, December 2, 2012
DOI 10.1194/jlr.P030551

Copyright © 2013 by the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

This article is available online at <http://www.jlr.org>

The vascular endothelial growth factor (VEGF) family is one of the most important regulators of vascular biology. VEGFA, in particular, stimulates angiogenesis in a wide range of normal and pathological processes (1). Owing to this marked role in blood vessel homeostasis, the contribution of VEGFA to cardiovascular diseases (CVDs) and atherogenesis has been studied in recent years (2). However, the effect of VEGFA on CVDs is still unclear.

The use of anti-VEGF agents in cancer therapy has shown cardiovascular side effects such as hypertension, cardiomyopathy, and hemorrhagic events (3). Furthermore, VEGFA therapies have been tested in randomized clinical trials, particularly in patients with coronary artery disease, with results showing low clinical importance (2). Many studies have identified higher VEGFA levels in patients with vascular diseases; nevertheless, it is not clear whether the upregulation of VEGFA is an adaptation to ischemia or if it is, rather, causal in the onset of these diseases (4–11). Concerning the involvement of VEGFA in atherosclerosis, results seem to be conflicting. A possible neovascularization and proinflammatory effect of VEGFA, which leads to progression of atherosclerosis and plaque instability, in particular (12–17), has been identified in animal models and in vitro studies. In contrast, clinical trials using VEGFA in humans (2) and gene therapy in animal studies (18, 19) do not support a positive effect of VEGFA on atherosclerosis progression. The complexity of CVDs, combined with the pleiotropic effects of VEGFA, could partially explain the differences between studies.

Abbreviations: BMI, body mass index; BRC IGE-PCV, Biological Resources Bank "Interactions Gène-Environnement en Physiopathologie Cardiovasculaire"; CVD, cardiovascular disease; GWAS, genome-wide association study; LD, linkage disequilibrium; SNP, single-nucleotide polymorphism; TC, total cholesterol; VEGF, vascular endothelial growth factor.

¹M. G. Stathopoulou, A. Bonnefond, and N. C. Ndiaye contributed equally to this work.

²To whom correspondence should be addressed.

e-mail: Sophie.Visvikis-Siest@inserm.fr

[§]The online version of this article (available at <http://www.jlr.org>) contains supplementary data in the form of three tables.

An interesting point would be the assessment of the effect of VEGFA (which is expressed in almost all vascularized tissues, including the heart, the liver, and the kidney) on known cardiovascular risk factors in supposedly healthy populations, such as lipid parameters (20), inasmuch as this could partially explain the implications of VEGFA in the physiopathology of CVDs. In particular, high-density and low-density lipoprotein cholesterol levels (HDL-C, LDL-C, respectively) are considered independent risk factors for the development of CVD (20). Increased levels of circulating VEGFA have been found in subjects with uncomplicated hyperlipidemia in a small-sample-size study (21), and a similar finding has been shown in a pilot study in patients with hypercholesterolemia (22). Significant associations were found between HDL-C and VEGFA levels in a supposedly healthy population from Japan (23), whereas in a supposedly healthy population in the SAPHIR study, VEGFA was negatively correlated with LDL-C, total cholesterol (TC), and apoB only in women (24). Although the relation between lipid profiles and VEGFA levels is not yet clearly defined, these observations suggest an eventual implication of this molecule in lipid metabolism.

Genetic studies can be highly useful in the identification of strong associations between distinct metabolic pathways of risk factors involved in a common pathophysiology. Via a recent genome-wide association study (GWAS), we identified four single-nucleotide polymorphisms (SNPs) that explained up to 50% of the heritability of VEGFA circulating levels (25). The investigation of the effect of these new genetic variants, as well as the interactions between them and with environmental factors, on blood lipids levels might give some insight into the relation between VEGFA and blood lipids. Therefore, the aim of the present study is the assessment of genetic determinants of blood lipid levels using these four novel VEGFA-related SNPs in supposedly healthy discovery and replication populations.

METHODS

Subjects

Discovery and replication population. Discovery ($n = 1,006$) and replication ($n = 1,145$) samples belong to two independent and nonoverlapping populations extracted from the Biological Resources Bank (BRC) "Interactions Gène-Environnement en Physiopathologie Cardiovasculaire" (IGE-PCV) in Nancy, in northeast France. They consist of supposedly healthy, unrelated adults of European origin (discovery population: Portugal, France; and replication population: Ireland, Greece). Individuals with chronic disorders (cardiovascular or cancer) or having a personal history of CVD were not included. Subjects taking blood lipid-lowering drugs or medications having an effect on cardiovascular function (including inotropic agents, β blockers, calcium-channel blockers, organic nitrates, anti-arrhythmics, angiotensin-converting enzyme inhibitors, angiotensin II receptor blockers, diuretics, clot busters, anti-coagulants, anti-platelet drugs, anti-diabetic drugs, and insulin) were also excluded. The study protocols were approved by the local ethics committee of each recruitment center, and all subjects gave written informed consent for their participation in the study.

Data collection

For both populations, biological and clinical measurements and health and lifestyle information were collected using appropriate validated questionnaires and procedures as described previously (26, 27). Hypertension was defined as systolic blood pressure ≥ 140 mm/Hg, diastolic blood pressure ≥ 90 mm/Hg; and smokers were identified based on current smoking status. Body mass index (BMI) was calculated as weight (kilograms) divided by height (meters) squared. Obesity was defined as BMI ≥ 30 kg/m².

ApoE serum levels were measured using a turbidimetric immunoassay method (28), and triglycerides, TC, and HDL-C plasma levels were measured as previously described (26, 27). In particular, TC was measured using a cholesterol oxidase-paraaminophenazone method, triglycerides using a glycerophosphate oxidase/paraaminophenazone alanyl-glycine method, and HDL-C levels using a phosphotungstate method. LDL-C levels were calculated using the Friedewald formula (29). VEGFA plasma levels were measured in a subsample of 403 individuals from the discovery population by Randox, Ltd. (Crumlin, UK) using a biochip array analyzer (Evidence®) (25). Blood collection was performed after overnight fasting.

Genotyping

DNA was extracted from all participants, and relative biobanks have been constructed in the BRC IGE-PCV. The SNPs rs6921438, rs4416670, rs6993770, and rs10738760 were genotyped by Genoscreen® (<http://genoscreen.fr>) using a Sequenom® iPLEX Gold assay (Medium Throughput Genotyping Technology) (30) and in Kbioscience (<http://www.kbioscience.co.uk>) using the competitive allele-specific PCR (KASP) chemistry coupled with a FRET-based genotyping system (<http://www.kbioscience.co.uk/reagents/KASP/KASP.html>) in the replication population. For each SNP, 192 duplicate samples were used, and a concordance of 100% was found.

Statistical analysis

Continuous variables are presented as mean value \pm standard deviation, and categorical variables are given in percentages. Hardy-Weinberg equilibrium was tested using the χ^2 test. VEGFA concentrations were natural log-transformed to normalize their distribution in a subsample of the discovery population. Correlations were evaluated by calculating the Pearson coefficient (r). Linear regression models adjusted for age, gender, and BMI were used to test possible associations between VEGFA plasma levels and the levels of the assessed lipid traits. Significance was assessed at a two-tailed $P = 0.05$ level.

Genetic analyses were performed under the assumption of an additive model.

For the discovery population and the replication populations, linear regression models adjusted for age, gender, and BMI were used for the assessment of the effect of each SNP (independent variable) in blood lipid concentrations (dependent variables). Further adjustments were performed in both populations for smoking and hypertension. Significance was assessed at a two-tailed $P = 0.0125$ level (adjustment for multiple testing). In a case in which more than one SNP is associated with one trait, a conditional analysis assessing the main effect of all significant SNPs in the same model of linear regression (adjusted for age, gender, and BMI) was performed to clarify the independent determinants of the trait.

Concerning the use of BMI as a covariate in the regression models and before performing the analysis on SNP associations with lipids traits, we assessed the existence of direct effects of the SNPs on BMI, using linear regression models adjusted for age and gender. The results were not statistically significant (data not shown), thus allowing the use of BMI in the analyses models.

The environmental factors used for the gene×environment interactions assessment were BMI, smoking, or hypertension. We assessed the contribution of these interactions using linear regression models adjusted for age, gender, BMI, the environmental factor, and the additional interaction term (SNP×environmental factors). Significant results were considered those with $P \leq 0.004$. For the significant SNPs implicated in gene×environment interactions, separate regression models using the environmental factor as the dependent variable were performed to control for a direct association between the SNPs and the factor.

The assessment of gene×gene interactions was tested using all possible pair-wise combinations between the four SNPs in both discovery and replication populations. In the regression models adjusted for age, gender, and BMI, two SNPs and their interaction term were added. In order to adjust for multiple testing, significance was set at $P = 0.008$.

All analyses were performed using PLINK 1.07 software (<http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink>) (31) and the SPSS statistical software version 16.0 (SPSS, Inc.; Chicago, IL).

Meta-analysis for each quantitative trait was performed using a weighted inverse normal method via the function "metagen," with a fixed effect, in the "META" R 2.15.1 package.

The significant results of this study were compared with previous findings in the literature (previous GWAS). SNPs with a correlation coefficient $\geq 80\%$ were considered in linkage disequilibrium (LD). The GWAS investigator of HuGENavigator engine (32) and the NHGRI catalog of published GWAS (<http://www.genome.gov/gwasstudies>) (33) were used to assess previous GWAS concerning blood lipid levels.

RESULTS

Participants' data are presented in Table 1. The characteristics of the genotyped SNPs are shown in Table 2. All SNPs in both populations are in agreement with the Hardy-Weinberg equilibrium.

In the discovery population, significant associations were observed between rs6921438 and rs6993770, and the levels of HDL-C ($\beta = -0.09$ mmol/l, $P = 1.2 \times 10^{-4}$ and $\beta = -0.01$ mmol/l, $P = 8.3 \times 10^{-3}$, respectively; Table 3) and between rs6921438 with plasma LDL-C concentrations ($\beta = 0.14$ mmol/l, $P = 6.7 \times 10^{-3}$, Table 3). Specifically, the minor allele A of rs6921438 is associated with decreased HDL-C and increased LDL-C values, whereas the minor allele T of rs6993770 is associated with increased levels of HDL-C. These significant associations were only confirmed for SNP rs6921438 in the replication population ($\beta = -0.07$ mmol/l, $P = 2.7 \times 10^{-4}$ and $\beta = 0.12$ mmol/l, $P = 8.4 \times 10^{-3}$ for HDL-C and LDL-C, respectively; Table 3). Conditional analysis including both rs6993770 and rs6921438 revealed that rs6921438 was the only SNP with significant direct effect on HDL-C levels in the discovery and replication populations ($\beta = -0.09$ mmol/l, $P = 1.2 \times 10^{-4}$ and $\beta = -0.07$ mmol/l, $P = 2.7 \times 10^{-4}$, respectively; Table 3). Of note, these results remained significant in both populations after adjustments for both smoking and hypertension (data not shown). SNP rs6921438 explained 1% of the variability of HDL-C and 0.2% for LDL-C in both populations. Meta-analysis of the results of both populations gave highly significant associations between rs6921438 and both HDL-C and LDL-C levels ($\beta = -0.08$

mmol/l, $P = 1.2 \times 10^{-7}$ and $\beta = 0.13$ mmol/l, $P = 1.5 \times 10^{-4}$ for HDL-C and LDL-C, respectively; Table 3). SNP rs6993770 was not significantly associated with HDL-C levels in joint analysis of the two populations. Furthermore, meta-analysis of the conditional analysis results including rs6993770 and rs6921438 verified that rs6921438 is the only independent determinant of HDL-C levels ($\beta = -0.08$ mmol/l, $P = 1.2 \times 10^{-7}$; Table 3).

The nonsignificant associations between the four assessed SNPs and the other lipid traits are presented in supplementary Table I for the discovery and replication populations, as well as the results of the meta-analyses.

Among 10 previously published GWAS concerning lipid levels, rs6921438 (and SNPs in LD with rs6921438) was not reported in the lists of statistically significant SNPs (34–43). Supplementary Table II presents the nonsignificant associations of the four SNPs with the assessed lipid traits in a large GWAS meta-analysis (43). Therefore, rs6921438 is a novel SNP associated with both HDL-C and LDL-C levels.

A significant association between the interaction rs4416670×hypertension and apoE variation was also identified ($P = 3.5 \times 10^{-3}$, 1.6×10^{-3} , and 1.7×10^{-5} , respectively, in the discovery and replication populations and meta-analysis; Table 4). The minor allele of the polymorphism was associated with lower levels of apoE in hypertensive participants ($\beta = -0.71$ mg/l, -0.75 mg/l, and -0.73 mg/l, respectively; Table 4). To test for a possible direct association of rs4416670 in hypertension, further analyses were performed in both populations. No significant associations were observed between the same SNP and hypertension ($P = 0.576$ for discovery and $P = 0.592$ for replication population).

Regarding epistatic interactions, in the discovery set, we found that the SNP rs6921438 interacted with rs6993770 for HDL-C levels ($\beta = 0.05$ mmol/l, $P = 2.4 \times 10^{-3}$, Table 4). Although this finding was not significant in the replication population ($\beta = 0.02$ mmol/l, $P = 0.035$, Table 4), it was significant in the meta-analysis of the results ($\beta = 0.03$ mmol/l, $P = 2.6 \times 10^{-3}$, Table 4).

In a subsample of the discovery population ($n = 403$) with VEGFA plasma level measurements, no correlation was found between VEGFA plasma levels and any of the assessed lipid traits ($R = 0.022$, $P = 0.657$ for HDL-C, $R = -0.010$, $P = 0.845$ for LDL-C, $R = 0.017$, $P = 0.741$ for TC, $R = 0.069$, $P = 0.164$ for triglycerides and $R = 0.066$, $P = 0.184$ for apoE). Furthermore, VEGFA levels were not associated with lipid levels in regression models ($P > 0.05$) (see supplementary Table III).

DISCUSSION

The present study assessed the effect of VEGFA-related SNPs on blood lipid traits and found significant associations and gene×environment interactions for HDL-C, LDL-C, and apoE levels in two independent populations of healthy unrelated adults of European origin.

In particular, SNP rs6921438 was robustly associated with both HDL-C and LDL-C plasma levels. This SNP is an

TABLE 1. Characteristics of the study participants

Variable	Discovery (n = 1,006)		Subsample with VEGFA plasma- level measurements (n = 403)		Replication (n=1,145)	
	Mean ^a	SD ^b	Mean ^a	SD ^b	Mean ^a	SD ^b
Age (years)	43.17	9.08	44.52	4.91	41.98	9.24
Gender (male %)	43.00		50.40		82.00	
Body mass index (kg/m ²)	25.19	4.15	24.92	3.94	26.70	3.91
Hypertension (%)	25.80		14.30		27.80	
Obesity (%)	10.12		7.93		15.90	
Smoking (%)	23.33		25.40		27.30	
HDL-cholesterol (mmol/l)	1.47	0.44	1.60	0.47	1.61	0.62
LDL-cholesterol (mmol/l)	3.27	1.09	3.55	0.89	3.57	1.17
Total cholesterol (mmol/l)	5.51	1.09	5.73	1.03	5.92	1.18
Triglycerides (mmol/l)	1.24	1.36	1.30	1.91	1.63	1.30
ApoE (mg/l)	42.68	15.14	41.84	17.63	47.39	18.33
Vascular endothelial growth factor A (ng/l)			42.71	43.33		

^a Mean value for continuous variables and percentage for categorical variables.

^b SD, standard deviation (only for continuous variables).

intergenic genetic variant located on chromosome 6p21.1, at 171 kb downstream of the *VEGFA* gene. More precisely, this SNP is located between *LOC100132354* (a noncoding RNA) and the *C6orf223* gene (encoding an uncharacterized protein). To our knowledge, no expression data are available for the *C6orf223* gene. SNP rs6921438 is in linkage disequilibrium with a few SNPs close to it (<6 kb): rs4513773, rs7767396, and rs9472159 ($r^2 > 0.7$; $D' > 0.9$; in the HapMap CEU population), all located between *LOC100132354* and *C6orf223*. SNP rs9472159 is located in an enhancer- and promoter-associated histone mark region according to ENCODE (<http://genome.ucsc.edu/ENCODE/index.html>). Therefore, it could regulate the expression of surrounding genes, including *VEGFA*. In a recent GWAS, we showed that the minor allele of rs6921438 strongly contributed to decreased VEGFA circulating levels (with an explained variance of VEGFA levels of 41%) (25). Subsequently, it appears that rs6921438 could have a negative effect in the cardiovascular system through a decrease in HDL-C levels, an increase in LDL-C levels, and a decrease in VEGFA levels.

It should be mentioned that to our knowledge, this is the first study that investigates the effects of VEGFA-related SNPs with blood lipid traits. Also, rs6921438 has not been identified in any previous GWAS concerning HDL-C and LDL-C levels (34–43). The existing GWASs have managed to explain a small percentage of the blood lipid trait variance (e.g., for HDL-C, it ranges from 0.6% to 10%); thus,

other genetic variants remain to be found. Nevertheless, in the present study, rs6921438 explained 1% of HDL-C variability and 0.2% of LDL-C variability (in both populations). A large meta-analysis of GWAS including more than 100,000 participants did not identify the genetic variants assessed in the present study as significant determinants of blood lipid levels (see supplementary Table II) (43). The reason for this discrepancy may be due to differences in the studied populations. Teslovich et al. (43) included in their study more than 45 populations of European descent corresponding also to family-based or case-control studies. These populations may be different from our healthy unrelated European adult populations.

In the present study, a candidate gene approach was used based on SNPs identified from a GWAS concerning VEGFA-level heritability. The use of GWAS-identified SNPs as candidate loci for other trait variations could help in the elucidation of genetic relationships between phenotypes and new biological mechanisms associated with pathologies. Hence, the present study, which suggests a common genetic regulation of blood lipid traits and VEGFA, could support this methodology.

To further assess the effect of this common regulation, we tested the association between VEGFA and blood lipid levels, although the results were nonsignificant. Therefore, plasmatic levels of VEGFA may have an indirect implication in lipid metabolism, at least in supposedly healthy individuals. However, Blann et al. (21) demonstrated that

TABLE 2. Characteristics of the four studied genetic variants

Chr	SNP	Minor allele	Direction of effect on plasma VEGFA ^a	Variance of plasma VEGFA explained (%) ^b	Function	Location		MAF ^c	
						Closest genes	Discovery	Replication	
6	rs6921438	A	-0.72	41.2	Intergenic	<i>LOC100132354/ C6orf223</i>	0.42	0.40	
6	rs4416670	C	-0.13	1.5	Intergenic	<i>LOC100132354/ C6orf223</i>	0.47	0.45	
8	rs6993770	T	-0.17	2.0	Intronic	<i>ZFPM2</i>	0.30	0.31	
9	rs10738760	G	-0.28	5.0	Intergenic	<i>KCNV2/ VLDLR</i>	0.48	0.45	

^a According to Ref. 25, effect size in the discovery cohort (VEGFA values in ng/l, log-transformed).

^b According to Ref. 25.

^c MAF, minor allele frequency.

TABLE 3. Significant associations of SNPs with blood lipids

SNP	Traits/Study	Mean values level \pm SD ^a by genotype (mmol/l)			β [SE] ^b (mmol/l)	P
		XX	XY	YY		
rs6921438	HDL-C ^c / discovery	1.97 \pm 0.47	1.89 \pm 0.49	1.76 \pm 0.54	-0.09 [0.02]	1.2 \times 10 ⁻⁴
	HDL-C / replication	1.73 \pm 0.62	1.61 \pm 0.62	1.39 \pm 0.58	-0.07 [0.02]	2.7 \times 10 ⁻⁴
	X-allele = G	NA ^e	NA	NA	-0.08 [0.01]	1.2 \times 10 ⁻⁷
Y-allele = A	LDL-C ^d / discovery	3.03 \pm 1.08	3.29 \pm 1.09	3.61 \pm 1.093	0.14 [0.05]	6.7 \times 10 ⁻³
	LDL-C / replication	3.50 \pm 1.19	3.54 \pm 1.17	3.84 \pm 1.06	0.12 [0.04]	8.4 \times 10 ⁻³
	LDL-C / meta-analysis	NA	NA	NA	0.13 [0.03]	1.5 \times 10 ⁻⁴
rs6993770	HDL-C / discovery	1.86 \pm 0.52	1.93 \pm 0.47	2.06 \pm 0.49	0.01 [0.02]	8.3 \times 10 ⁻³
X-allele = A	HDL-C / replication	1.61 \pm 0.62	1.61 \pm 0.63	1.61 \pm 0.64	-0.02 [0.02]	0.318
	Y-allele = T	NA	NA	NA	0.01 [0.01]	0.298
	HDL-C / meta-analysis	NA	NA	NA	-0.09 [0.02]	1.2 \times 10 ⁻⁴
rs6921438 conditioned for rs6993770	HDL-C / discovery	NA	NA	NA	-0.07 [0.02]	2.7 \times 10 ⁻⁴
	HDL-C / replication	NA	NA	NA	-0.08 [0.01]	1.2 \times 10 ⁻⁷
	HDL-C / meta-analysis	NA	NA	NA	-0.003 [0.01]	0.780
rs6993770 conditioned for rs6921438	HDL-C / discovery	NA	NA	NA	0.005 [0.01]	0.58
	HDL-C / replication	NA	NA	NA	0.002 [0.008]	0.790
	HDL-C / meta-analysis	NA	NA	NA		

Associations that are not significant are reported in supplementary Table I.

^aSD, standard deviation.

^b β , effect size; SE, standard error.

^cHDL-C, HDL-cholesterol.

^dLDL-C, LDL-cholesterol.

^eNA, not applicable.

subjects with hyperlipidemia have increased levels of VEGFA compared with healthy controls, even if the authors found no correlation of VEGFA with blood lipid levels. Additionally, similar results were observed in a small pilot study of hypercholesterolemia patients by Belgore, Lip, and Blann (22). Both of these studies were performed in small sample sizes, and they have included pathological populations in a case-control design. Thus, these results cannot be directly compared with the present study, where healthy populations have been used. In the study of Kimura et al. (23), serum VEGFA levels were negatively correlated with HDL-C levels in healthy adults; however, this correlation was observed only in male populations. Moreover, in this study, measurements were performed in serum samples, which demonstrate higher levels of VEGFA compared with plasma levels that were measured in the present study

(23, 25). Finally, Sandhofer et al. (24) have shown that plasma VEGFA levels were negatively associated with TC and LDL-C in a healthy female sample. Although the population of this study is larger than our discovery cohort, the female sample is significantly older compared with ours. As previously observed, VEGFA levels increase with age, especially in women (44). In the abovementioned study, VEGFA plasma levels in the female sample are higher than the levels of our study, and this could probably explain the different results between them. It should be mentioned that in our sample, there were no significant differences between genders (data not shown). Taken together, it seems that in supposedly healthy populations, VEGFA is only marginally or not associated with blood lipid levels. Thus, although a common genetic background between VEGFA and blood lipids, especially HDL-C and

TABLE 4. Significant gene \times environment and gene \times gene interactions with blood lipids

Interaction	Traits/Study	β [SE] ^a	P
rs4416670 \times hypertension	ApoE ^b / discovery	-0.71 [0.24]	3.5 \times 10 ⁻³
	ApoE / replication	-0.75 [0.23]	1.6 \times 10 ⁻³
	ApoE / meta-analysis	-0.73 [0.17]	1.7 \times 10 ⁻⁵
rs6921438 \times rs6993770	HDL-C ^c / discovery	0.05 [0.01]	2.4 \times 10 ⁻³
	HDL-C / replication	0.02 [0.01]	0.035
	HDL-C / meta-analysis	0.03 [0.01]	2.6 \times 10 ⁻³

^a β , effect size; SE, standard error; units for β coefficient are: mg/l for apoE and mmol/l for HDL-cholesterol.

^bApoE, apolipoprotein E.

^cHDL-C, HDL-cholesterol.

LDL-C, may exist, a clinical manifestation cannot be detected in physiological situations. However, the functionality of these SNPs and the clarification of molecular pathways that are implicated should be determined in other functional studies, including transcriptomic analysis for the expression of key proteins.

We also analyzed the effect interactions of the four VEGFA-related SNPs between them and with environmental factors, on lipid parameters. It is currently widely accepted that gene×gene and gene×environmental interactions can explain a significant amount of genetic heritability and can help identify subgroups among populations with higher disease risk (45–47). Hypertension, BMI, and smoking were the “environmental factors” selected because these are known risk factors for CVD. Because these are factors commonly present in individuals with pathological blood lipid levels, the effect of their interactions with genetic variants could have significant clinical importance. We identified a significant effect of the interaction between rs4416670 and hypertension on decreased apoE levels. ApoE serum levels are known to be associated with the APO-E common polymorphism; in particular, we have previously shown that the APO-E 2/2 genotype contributed to high apoE levels and APO-E 4/4 with low apoE levels (48). Here, we have identified a new genetic variant that has an effect on apoE levels through an interaction with hypertension. The SNP×hypertension interaction that we demonstrated is not due to a direct relationship between the two components of the interaction. Hypertension is among the major risk factors for CVD (49). The presence of altered blood lipid levels and high blood pressure is a very common manifestation in subjects with CVD. Thus, the identification and explanation of these types of interactions between risk factors and genes could be important for the understanding of the complex mechanisms that define the phenotypes in CVD.

This study was the first designed to assess common genetic regulation between VEGFA and blood lipids. The selection of healthy populations is important for the understanding of these relationships because in pathological situations like CVD, the clinical profile of both blood lipids and VEGFA is affected by many disease-related factors which complicate the situation and do not allow the demonstration of comprehensive results. Another strong point of the study is the replication of the most-significant results in an independent population, as well as the use of meta-analyses, that ensured the validity of the findings. We acknowledge, however, the limited number of individuals with VEGFA plasma-level measurements.

In conclusion, we found a robust association between a common VEGFA-related genetic variant and both HDL-C and LDL-C. Furthermore, apoE variation was partly explained by interactions between another VEGFA-related SNP and hypertension, which is known to be related to CVD. The assessment of other CVD risk factor associations with these polymorphisms could assist in the understanding of the normal regulation and the pathophysiological mechanisms that underlie these complex diseases. ■

Samples and data used for this study are part of the BRC IGE-PCV in Nancy, France.

REFERENCES

1. Carmeliet, P., and R. K. Jain. 2011. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. **473**: 298–307.
2. Ylä-Herttuala, S., T. T. Rissanen, I. Vajanto, and J. Hartikainen. 2007. Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *J. Am. Coll. Cardiol.* **49**: 1015–1026.
3. Vaklavas, C., D. Lenihan, R. Kurzrock, and A. M. Tsimberidou. 2010. Anti-vascular endothelial growth factor therapies and cardiovascular toxicity: what are the important clinical markers to target? *Oncologist*. **15**: 130–141.
4. Blann, A. D., F. M. Belgore, C. N. McCollum, S. Silverman, P. L. Lip, and G. Y. Lip. 2002. Vascular endothelial growth factor and its receptor, Flt-1, in the plasma of patients with coronary or peripheral atherosclerosis, or Type II diabetes. *Clin. Sci. (Lond.)*. **102**: 187–194.
5. Chin, B. S., N. A. Chung, C. R. Gibbs, A. D. Blann, and G. Y. Lip. 2002. Vascular endothelial growth factor and soluble P-selectin in acute and chronic congestive heart failure. *Am. J. Cardiol.* **90**: 1258–1260.
6. Heeschen, C., S. Dimmeler, C. W. Hamm, E. Boersma, A. M. Zeiher, and M. L. Simoons. 2003. Prognostic significance of angiogenic growth factor serum levels in patients with acute coronary syndromes. *Circulation*. **107**: 524–530.
7. Hojo, Y., U. Ikeda, Y. Zhu, M. Okada, S. Ueno, H. Arakawa, H. Fujikawa, T. Katsuki, and K. Shimada. 2000. Expression of vascular endothelial growth factor in patients with acute myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **35**: 968–973.
8. Slevin, M., J. Krupinski, A. Slowik, P. Kumar, A. Szczudlik, and J. Gaffney. 2000. Serial measurement of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta1 in serum of patients with acute ischemic stroke. *Stroke*. **31**: 1863–1870.
9. Belgore, F. M., A. D. Blann, F. L. Li-Saw-Hee, D. G. Beevers, and G. Y. Lip. 2001. Plasma levels of vascular endothelial growth factor and its soluble receptor (SFlt-1) in essential hypertension. *Am. J. Cardiol.* **87**: 805–809.
10. Nakajima, K., S. Tabata, T. Yamashita, M. Kusuhara, K. Arakawa, R. Ohmori, A. Yonemura, K. Higashi, M. Ayaori, H. Nakamura, et al. 2004. Plasma vascular endothelial growth factor level is elevated in patients with multivessel coronary artery disease. *Clin. Cardiol.* **27**: 281–286.
11. Eaton, C. B., R. Gramling, D. R. Parker, M. B. Roberts, B. Lu, and P. M. Ridker. 2008. Prospective association of vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) with coronary heart disease mortality in southeastern New England. *Atherosclerosis*. **200**: 221–227.
12. Celletti, F. L., J. M. Waugh, P. G. Amabile, A. Brendolan, P. R. Hilfiker, and M. D. Dake. 2001. Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nat. Med.* **7**: 425–429.
13. Inoue, M., H. Itoh, M. Ueda, T. Naruko, A. Kojima, R. Komatsu, K. Doi, Y. Ogawa, N. Tamura, K. Takaya, et al. 1998. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerotic lesions: possible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis. *Circulation*. **98**: 2108–2116.
14. Khurana, R., Z. Zhuang, S. Bhardwaj, M. Murakami, E. De Muinck, S. Ylä-Herttuala, N. Ferrara, J. F. Martin, I. Zachary, and M. Simons. 2004. Angiogenesis-dependent and independent phases of intimal hyperplasia. *Circulation*. **110**: 2436–2443.
15. Lemström, K. B., R. Krebs, A. I. Nykanen, J. M. Tikkanen, R. K. Sihvola, E. M. Aaltola, P. J. Hayry, J. Wood, K. Alitalo, S. Ylä-Herttuala, et al. 2002. Vascular endothelial growth factor enhances cardiac allograft arteriosclerosis. *Circulation*. **105**: 2524–2530.
16. Moulton, K. S., K. Vakili, D. Zurakowski, M. Soliman, C. Butterfield, E. Sylvén, K. M. Lo, S. Gillies, K. Javaherian, and J. Folkman. 2003. Inhibition of plaque neovascularization reduces macrophage accumulation and progression of advanced atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **100**: 4736–4741.
17. Rutanen, J., P. Leppänen, T. T. Tuomisto, T. T. Rissanen, M. O. Hiltunen, I. Vajanto, M. Niemi, T. Hakkinen, K. Karkola, S. A. Stacker, et al. 2003. Vascular endothelial growth factor-D expression in human atherosclerotic lesions. *Cardiovasc. Res.* **59**: 971–979.

18. Laitinen, M., I. Zachary, G. Breier, T. Pakkanen, T. Hakkinen, J. Luoma, H. Abedi, W. Risau, M. Soma, M. Laakso, et al. 1997. VEGF gene transfer reduces intimal thickening via increased production of nitric oxide in carotid arteries. *Hum. Gene Ther.* 8: 1737–1744.
19. Leppänen, P., S. Koota, I. Kholova, J. Koponen, C. Fieber, U. Eriksson, K. Alitalo, and S. Yla-Herttuala. 2005. Gene transfers of vascular endothelial growth factor-A, vascular endothelial growth factor-B, vascular endothelial growth factor-C, and vascular endothelial growth factor-D have no effects on atherosclerosis in hypercholesterolemic low-density lipoprotein-receptor/apolipoprotein B48-deficient mice. *Circulation.* 112: 1347–1352.
20. Arsenault, B. J., S. M. Bockholdt, and J. J. Kastelein. 2011. Lipid parameters for measuring risk of cardiovascular disease. *Nat. Rev. Cardiol.* 8: 197–206.
21. Blann, A. D., F. M. Belgore, J. Constans, C. Conri, and G. Y. Lip. 2001. Plasma vascular endothelial growth factor and its receptor Flt-1 in patients with hyperlipidemia and atherosclerosis and the effects of fluvastatin or fenofibrate. *Am. J. Cardiol.* 87: 1160–1163.
22. Belgore, F. M., G. Y. Lip, and A. D. Blann. 2000. Successful therapy reduces levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) in patients with hypertension and patients with hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 151: 599.
23. Kimura, K., T. Hashiguchi, T. Deguchi, S. Horinouchi, T. Uto, H. Oku, S. Setoyama, I. Maruyama, M. Osame, and K. Arimura. 2007. Serum VEGF—as a prognostic factor of atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 194: 182–188.
24. Sandhofer, A., T. Tatarczyk, R. Kirchmair, B. Iglseder, B. Paulweber, J. R. Patsch, and P. Schratzberger. 2009. Are plasma VEGF and its soluble receptor sFlt-1 atherogenic risk factors? Cross-sectional data from the SAPHIR study. *Atherosclerosis.* 206: 265–269.
25. Debette, S., S. Visvikis-Siest, M. H. Chen, N. C. Ndiaye, C. Song, A. Destefano, R. Safa, M. Azimi Nezhad, D. Sawyer, J. B. Marteau, et al. 2011. Identification of cis- and trans-acting genetic variants explaining up to half the variation in circulating vascular endothelial growth factor levels. *Circ. Res.* 109: 554–563.
26. Siest, G., S. Visvikis, B. Herbeth, R. Gueguen, M. Vincent-Viry, C. Sass, B. Beaud, E. Lecomte, J. Steinmetz, J. Locuty, et al. 1998. Objectives, design and recruitment of a familial and longitudinal cohort for studying gene-environment interactions in the field of cardiovascular risk: the Stanislas cohort. *Clin. Chem. Lab. Med.* 36: 35–42.
27. Visvikis-Siest, S., and G. Siest. 2008. The STANISLAS Cohort: a 10-year follow-up of supposed healthy families. Gene-environment interactions, reference values and evaluation of biomarkers in prevention of cardiovascular diseases. *Clin. Chem. Lab. Med.* 46: 733–747.
28. Noma, A., Y. Hata, and Y. Goto. 1991. Quantitation of serum apolipoprotein A-I, A-II, B, C-II, C-III and E in healthy Japanese by turbidimetric immunoassay: reference values, and age- and sex-related differences. *Clin. Chim. Acta.* 199: 147–157.
29. Friedewald, W. T., R. I. Levy, and D. S. Fredrickson. 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* 18: 499–502.
30. Ehrlich, M., S. Bocker, and D. van den Boom. 2005. Multiplexed discovery of sequence polymorphisms using base-specific cleavage and MALDI-TOF MS. *Nucleic Acids Res.* 33: e38.
31. Purcell, S., B. Neale, K. Todd-Brown, L. Thomas, M. A. Ferreira, D. Bender, J. Maller, P. Sklar, P. I. de Bakker, M. J. Daly, et al. 2007. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet.* 81: 559–575.
32. Yu, W., M. Gwinn, M. Clyne, A. Yesupriya, and M. J. Khoury. 2008. A navigator for human genome epidemiology. *Nat. Genet.* 40: 124–125.
33. Hindorf, L. A., P. Sethupathy, H. A. Junkins, E. M. Ramos, J. P. Mehta, F. S. Collins, and T. A. Manolio. 2009. Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106: 9362–9367.
34. Aulchenko, Y. S., S. Ripatti, I. Lindqvist, D. Boomsma, I. M. Heid, P. P. Pramstaller, B. W. Penninx, A. C. Janssens, J. F. Wilson, T. Spector, et al. 2009. Loci influencing lipid levels and coronary heart disease risk in 16 European population cohorts. *Nat. Genet.* 41: 47–55.
35. Heid, I. M., E. Boes, M. Muller, B. Kollerits, C. Lamina, S. Coassin, C. Gieger, A. Doring, N. Klopp, R. Frikke-Schmidt, et al. 2008. Genome-wide association analysis of high-density lipoprotein cholesterol in the population-based KORA study sheds new light on intergenic regions. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 1: 10–20.
36. Kathiresan, S., O. Melander, C. Guiducci, A. Surti, N. P. Burtt, M. J. Rieder, G. M. Cooper, C. Roos, B. F. Voight, A. S. Havulinna, et al. 2008. Six new loci associated with blood low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol or triglycerides in humans. *Nat. Genet.* 40: 189–197.
37. Kathiresan, S., C. J. Willer, G. M. Peloso, S. Demissie, K. Musunuru, E. E. Schadt, L. Kaplan, D. Bennett, Y. Li, T. Tanaka, et al. 2009. Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia. *Nat. Genet.* 41: 56–65.
38. Kraja, A. T., D. Vaidya, J. S. Pankow, M. O. Goodarzi, T. L. Assimes, I. J. Kullo, U. Sovio, R. A. Mathias, Y. V. Sun, N. Franceschini, et al. 2011. A bivariate genome-wide approach to metabolic syndrome: STAMPEED consortium. *Diabetes.* 60: 1329–1339.
39. Ridker, P. M., G. Pare, A. N. Parker, R. Y. Zee, J. P. Miletich, and D. I. Chasman. 2009. Polymorphism in the CETP gene region, HDL cholesterol, and risk of future myocardial infarction: genomewide analysis among 18 245 initially healthy women from the Women's Genome Health Study. *Circ Cardiovasc Genet.* 2: 26–33.
40. Sabatti, C., S. K. Service, A. L. Hartikainen, A. Pouta, S. Ripatti, J. Brodsky, C. G. Jones, N. A. Zaitlen, T. Varilo, M. Kaakinen, et al. 2009. Genome-wide association analysis of metabolic traits in a birth cohort from a founder population. *Nat. Genet.* 41: 35–46.
41. Waterworth, D. M., S. L. Ricketts, K. Song, L. Chen, J. H. Zhao, S. Ripatti, Y. S. Aulchenko, W. Zhang, X. Yuan, N. Lim, et al. 2010. Genetic variants influencing circulating lipid levels and risk of coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30: 2264–2276.
42. Willer, C. J., S. Sanna, A. U. Jackson, A. Scuteri, L. L. Bonnycastle, R. Clarke, S. C. Heath, N. J. Timpson, S. S. Najjar, H. M. Stringham, et al. 2008. Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease. *Nat. Genet.* 40: 161–169.
43. Teslovich, T. M., K. Musunuru, A. V. Smith, A. C. Edmondson, I. M. Stylianou, M. Koseki, J. P. Pirruccello, S. Ripatti, D. I. Chasman, C. J. Willer, et al. 2010. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature.* 466: 707–713.
44. Berrahmoune, H., J. V. Lamont, B. Herbeth, P. S. FitzGerald, and S. Visvikis-Siest. 2006. Biological determinants of and reference values for plasma interleukin-8, monocyte chemoattractant protein-1, epidermal growth factor, and vascular endothelial growth factor: results from the STANISLAS cohort. *Clin. Chem.* 52: 504–510.
45. Hunter, D. J. 2005. Gene-environment interactions in human diseases. *Nat. Rev. Genet.* 6: 287–298.
46. Manolio, T. A. 2010. Genomewide association studies and assessment of the risk of disease. *N. Engl. J. Med.* 363: 166–176.
47. Ndiaye, N. C., M. Azimi Nezhad, S. El Shamieh, M. G. Stathopoulou, and S. Visvikis-Siest. 2011. Cardiovascular diseases and genome-wide association studies. *Clin. Chim. Acta.* 412: 1697–1701.
48. Vincent-Viry, M., F. Schiele, R. Gueguen, K. Bohnet, S. Visvikis, and G. Siest. 1998. Biological variations and genetic reference values for apolipoprotein E serum concentrations: results from the STANISLAS cohort study. *Clin. Chem.* 44: 957–965.
49. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) 2002. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation.* 106: 3143–3421.

Supplementary tables

Supplementary Table 1 : Non-significant associations of VEGFA-related SNPs with blood lipids levels.

SNP	Traits / Study	β [SE] ^a	<i>P</i>
rs6921438	TC ^b / discovery	0.04 [0.05]	0.353
	TC / replication	0.06 [0.04]	0.190
	TC / meta-analysis	0.05 [0.03]	0.110
	Triglycerides / discovery	0.01 [0.05]	0.867
	Triglycerides / replication	0.03 [0.05]	0.473
	Triglycerides / meta-analysis	0.02 [0.03]	0.520
	APO-E ^c / discovery	0.23 [0.86]	0.791
	APO-E / replication	0.69 [0.74]	0.350
	APO-E / meta-analysis	0.49 [0.56]	0.379
rs4416670	TC / discovery	0.08 [0.05]	0.105
	TC / replication	0.04 [0.04]	0.340
	TC / meta-analysis	0.06 [0.03]	0.072
	Triglycerides / discovery	0.03 [0.05]	0.514
	Triglycerides / replication	0.05 [0.05]	0.287
	Triglycerides / meta-analysis	0.04 [0.03]	0.221
	APO-E / discovery	1.12 [0.84]	0.187
	APO-E / replication	0.68 [0.75]	0.365
	APO-E / meta-analysis	0.87 [0.56]	0.120
rs6993770	TC / discovery	-0.02 [0.05]	0.677

	TC / replication	0.002 [0.05]	0.961
	TC / meta-analysis	-0.009 [0.03]	0.809
	Triglycerides / discovery	0.004 [0.06]	0.942
	Triglycerides / replication	0.09 [0.05]	0.090
	Triglycerides / meta-analysis	0.05 [0.04]	0.199
	APO-E / discovery	0.14 [0.90]	0.876
	APO-E / replication	0.81 [0.78]	0.299
	APO-E / meta-analysis	0.52 [0.59]	0.376
	TC / discovery	0.001 [0.05]	0.981
	TC / replication	0.04 [0.04]	0.328
	TC / meta-analysis	0.02 [0.03]	0.456
	Triglycerides / discovery	0.01 [0.05]	0.775
rs10738760	Triglycerides / replication	0.048 [0.05]	0.097
	Triglycerides / meta-analysis	0.05 [0.03]	0.156
	APO-E / discovery	0.57 [0.83]	0.487
	APO-E / replication	1.15 [0.72]	0.113
	APO-E / meta-analysis	0.90 [0.54]	0.098

^a β , effect size; *SE*, standard error; units for β coefficient are: mg/l for apolipoprotein E and mmol/l for total cholesterol and triglycerides

^b*TC*, total cholesterol

^c*APO-E*, apolipoprotein E

Supplementary Table 2 : Reported associations of the VEGFA-related SNPs in previous GWAS meta-analysis based on reference #43

SNPs	Traits	<i>P</i>
rs6921438	TC ^a	0.613
	Triglycerides	0.359
	HDL-C ^b	0.368
	LDL-C ^c	0.322
rs4416670	TC	0.396
	Triglycerides	0.414
	HDL-C	0.991
	LDL-C	0.613
rs6993770	TC	0.375
	Triglycerides	0.285
	HDL-C	0.201
	LDL-C	0.646
rs10738760	TC	0.460
	Triglycerides	0.592
	HDL-C	0.033
	LDL-C	0.709

^aTC, total cholesterol

^bHDL-C, high-density lipoprotein cholesterol

^cLDL-C, low-density lipoprotein cholesterol

Supplementary Table 3 : Non-significant associations of VEGFA plasma levels with blood lipids levels (*N*=403).

Independent	Dependent variables	β [SE] ^a	<i>P</i>
-------------	---------------------	---------------------------	----------

variable			
VEGFA plasma levels	TC ^b (mmol/l)	0.003 [0.01]	0.824
	Triglycerides (mmol/l)	0.008 [0.03]	0.826
	APO-E ^c (mg/l)	0.007 [0.02]	0.737
	HDL-C ^d (mmol/l)	0.001 [0.02]	0.976
	LDL-C ^e / (mmol/l)	0.003 [0.02]	0.865

^a β , effect size; **SE**, standard error; units for β coefficient are: mg/l for apolipoprotein E and mmol/l for total cholesterol, triglycerides, high-density lipoprotein cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol

^b**TC**, total cholesterol

^c**APO-E**, apolipoprotein E

^d**HDL-C**, high-density lipoprotein cholesterol

^e**LDL-C**, low-density lipoprotein cholesterol

Angiogenesis related genes NOS3, CD14, MMP3 and IL4R are associated to VEGF gene expression and circulating levels in physiological conditions

Abdelsalam Saleh^{a,*}, Maria G. Stathopoulou^{a,*}, Mohsen Azimi-Nezhad^{a,b}, Ndeye Coumba Ndiaye^a, Helena Murray^c, Christine Masson^a, John Lamont^c, Peter Fitzgerald^c, Sophie Visvikis-Siest^{a,d,}**

^aUMR INSERM U 1122, IGE-PCV “Interactions Gène-Environnement en Physiopathologie Cardio Vasculaire”, Université de Lorraine, Nancy, F-54000, France.

^bDepartment of Medical Genetics, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

^cRadox Laboratories, Crumlin, United Kingdom.

^dGeriatric Service, University Hospital of Nancy, Nancy, France

*Equal first authors

****Corresponding author:**

Dr. VISVIKIS-SIEST Sophie

UMR INSERM U 1122; IGE-PCV, Université de Lorraine, Faculté de Pharmacie

30 Rue Lionnois

54000 Nancy, France

Tel: +33(0)6.07.60.25.69

Fax: +33(0)3.83.32.13.22

E-mail address: Sophie.Visvikis-Siest@inserm.fr

Abstract

The aim of the study was to assess the genetic connections between the angiogenesis-related *NOS3*, *CD14*, *MMP3*, *IL4R*, *IL4* genes and VEGF expression and plasma levels. The associations were assessed in 403 healthy unrelated adults. The epistatic and environmental interactions were explored, including 4 VEGF-related polymorphisms previously identified. The VEGF expression in peripheral blood mononuclear cells was quantified (n=65) for the VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, and VEGF₁₈₉ isoforms. The polymorphism rs1799983 of *NOS3* was associated with the sum of all VEGF isoforms mRNA levels (P=0.032) and VEGF₁₄₅ (P=0.033). Rs1800779 of *NOS3* interacted with rs3918226 of the same gene and with the rs2569190 of *CD14* (P=0.022, P=0.042, respectively) for VEGF plasma levels. Other epistatic interactions included the rs1801275 of *IL-4R* with the rs6921438 (VEGF-related variant) and rs3025058 of *MMP3* (P=0.042, P=0.010 respectively) and the rs2569190 of *CD14* with the rs3025058 of *MMP3* (P=0.0119). We also identified an interaction of rs1800779 with obesity, high density lipoprotein cholesterol and triglycerides (P=0.018, P=0.005, P=0.043, respectively) as well as the interaction of rs6921438 with hypertension (P=0.028). Our findings indicated that genetic variants of *NOS3*, *CD14*, *MMP3* and *IL4R* are implicated in the determination of VEGF expression and plasma levels.

Key words: VEGF, polymorphisms, physiological conditions, *NOS3*, *CD14*, *MMP3*, *IL4R*, *IL4*

1. Introduction

The vascular endothelial growth factor A (VEGF-A or more commonly known as VEGF¹) is a highly conserved, disulfide-bonded dimeric glycoprotein of 34–46 kDa. VEGF is generated by several cell types including neutrophils, macrophages, fibroblasts, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and endothelial cells. It is one of the most potent angiogenesis regulators and elevated circulating VEGF levels have been associated with several types of cancer and other chronic diseases including cardiovascular diseases (ischemic heart disease, heart failure, stroke), diabetes, immune and inflammatory disorders [1-3].

Nitric oxide synthase (NOS₃) provides continuous local production of nitric oxide (NO) which is an important angiogenesis mediator and/or effector also involved in endothelial function and thereby can influence vascular tonicity, insulin resistance, development of atherosclerosis and type 2 diabetes [4, 5]. The increase in NO production via up regulation of NOS₃ by VEGF indicates that the angiogenic effect of VEGF seems to be mediated by NO [6-8]

CD14⁺ monocytes are abundant in human peripheral blood and have strong potential to differentiate into endothelial cells [9]. CD14 is a multifunctional receptor and contributes to different biological and pathophysiological processes including apoptosis, sepsis, inflammatory diseases, angiogenesis and tumor growth. Therefore, CD14 has been demonstrated to be a candidate for developing anti-cancer medications in tumor growth and angiogenesis [10].

Matrix metalloproteinases (MMPs) are zinc-dependent proteinases with an ability to degrade enzymes [11]. They are involved in pathologic conditions characterized by excessive degradation of extracellular matrix, such as tumor metastasis, and arteriosclerosis [12].

¹PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; VEGF, vascular endothelial growth factor; NOS₃, nitric oxide synthase; MMPs, matrix metalloproteinases ; IL4, interleukin 4; TC, total cholesterol; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; BMI, body mass index; BRC IGE-PCV, Biological Resources Center “Interactions Gène-Environnement en Physiopathologie CardioVasculaire”, SNPs, single nucleotide polymorphisms

Several pieces of evidence indicate associations between MMPs and VEGF and a link of MMPs with angiogenesis [12-18].

Interleukin 4 (IL4) is a glycoprotein secreted by activated T lymphocytes, basophils and mast cells [19]. Previous studies have indicated the involvement of IL4 in angiogenesis [20, 21].

The precise mechanisms involving the aforementioned molecules in angiogenesis in different conditions are under investigation. However, due to their complexity, interpreting the origin of their biological connections is challenging. Therefore, their evaluation in the healthy state could offer important information concerning the physiological relationships between these molecules before the development of a specific disease.

The aim of this study was to examine possible genetic links between NOS3, CD14, MMP3, and IL4 candidate genes and VEGF plasma levels and gene expression in a supposed healthy population. Gene-gene (epistatic) and gene-environment interactions effects on VEGF plasma levels were also investigated. Those interaction analyses included 4 polymorphisms significantly associated with VEGF plasma levels in a previous genome-wide association study (GWAS), and explaining up to 50% of its inter-individual variability [3].

2. Materials and Methods

2.1. Study population

The STANISLAS Family Study (BB-0033-00051/001) is a 10-year longitudinal survey involving 1,006 families from Vandoeuvre-lès-Nancy, France between 1993-1995 [22]. Exclusion criteria included the presence of chronic disorders (cardiovascular diseases or cancer) and the personal history of cardiovascular disease. The study protocol was approved by the Local Ethics Committee of Nancy and all subjects gave written informed consent. Four hundred and three unrelated adults collected during the second examination of the STANISLAS Family Study were selected based on complete availability of data.

2.2. Data collection and biological measurements

The procedures of data collection have been previously described [22, 23]. Blood samples were collected after overnight fasting. Sodium EDTA-plasma was separated by centrifugation at 2000g for 15 min at 4°C and stored at -196°C in liquid nitrogen until analysis. VEGF plasma levels were quantified by Randox Ltd (Crumlin, UK) using a biochip array analyser (Evidence[®]) [24]. Total cholesterol (TC) was measured using a cholesterol oxidase-paraaminophenazone method, triglycerides using a glycerophosphate oxidase/paraaminophenazone alanyl-glycine method, and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) levels using a phosphotungstate method, while low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) levels were calculated using the Friedewald formula [25].

Hypertension was defined as systolic blood pressure ≥ 140 mm/Hg or diastolic blood pressure ≥ 90 mm/Hg. Body mass index (BMI) was calculated as weight (kilograms) divided by height (meters) squared. Obesity was defined as BMI ≥ 30 kg/m². Smokers were identified based on current smoking status.

2.3. Genotyping

The polymorphisms rs2569190, rs2243250, rs2010963, rs3918226, rs1799983, rs1800779, rs3025058, rs1805015 and rs1801275 of the *NOS3*, *CD14*, *MMP3*, *IL4R*, and *IL4* genes (table 1) were genotyped using multilocus genotyping assays previously described [26, 27]. The single nucleotide polymorphisms (SNPs) previously shown to be associated with VEGF levels [3] rs6921438, rs4416670, rs6993770, and rs10738760 were genotyped by Genoscreen (<http://genoscreen.fr>), using a Sequenom iPLEX Gold assay—Medium Throughput Genotyping Technology [28].

2.4. Gene expression assays

Total RNA was extracted from PBMCs in a subsample of 65 subjects with a MagNaPure automate, using the MagNA Pure LC RNA HP isolation kit and RNA HP Blood External lysis protocol [Roche Diagnostics, France]. Reverse transcription of total RNAs were performed using 200 units of M-MuLV Reverse Transcriptase with 0.25 µg of oligos (dT) (Promega, France) as previously described [29]. Quantification of the transcripts coding for the VEGF isoforms (VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉), the beta 2 microglobulin (β2M) control gene were performed using TaqMan® and LightCycler technologies (LC TaqMan Master Kit, Roche Diagnostics, France) in duplicate. RT-PCR optimization and specificity of Real Time-PCR products were conducted using SYBR® Green technology (LC FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I kit, Roche Diagnostic, France), melting curves analysis and agarose gel electrophoresis of the PCR amplicons [29]. All mRNA levels were normalized to the mRNA levels of β2M gene. Total VEGF mRNA derived from the sum of the ratio of the four isoforms present in PBMCs.

2.5. Statistical analyses

VEGF plasma concentrations and mRNA values were log-transformed, before the analyses, to normalize their distribution. Hardy-Weinberg equilibrium was tested using the chi-square test. The associations between the SNPs of *NOS3*, *CD14*, *MMP3*, *IL4R* and *IL4* genes and VEGF plasma and expression levels were assessed through linear regression adjusted for age, gender and BMI under an additive model and using the minor allele as reference allele.

The epistatic interactions between the polymorphisms of *NOS3*, *CD14*, *MMP3*, *IL4R* and *IL4* genes and the VEGF-related SNPs for VEGF plasma levels were tested with the introduction of the interaction term of a 2×2 combination between the assessed SNPs in the previously described regression models. The environmental factors used for the SNPs \times environment interactions included smoking, blood lipids levels, obesity, and hypertension. We used linear regression models adjusted for age, gender, BMI (when obesity was the assessed factor, adjustments were performed only for age and gender), the environmental factor, and the additional interaction term (SNP \times environmental factors). The interaction analyses were not performed for *VEGF* gene expression data due to the limited sample size. Analyses were performed using PLINK 1.07 (<http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink>) [30] and the SPSS 17.0 (SPSS, Inc, Chicago, Illinois) statistical softwares. Significance was determined at a two-tailed $P=0.05$ level.

3. Results

The studied polymorphisms are presented in table 1. All SNPs were in agreement with Hardy-Weinberg equilibrium ($P > 0.05$). The characteristics of the studied population are summarized in table 2.

3.1. Association of the assessed polymorphisms of the NOS3, CD14, MMP3, IL-4R and IL4 genes with VEGF gene expression and plasma levels

After adjustment for age, gender and BMI, a significant association was observed between rs1799983 of *NOS3* and the sum of all VEGF isoforms mRNA and VEGF₁₄₅ mRNA ($\beta = 0.19$, $P = 0.032$ and $\beta = 0.17$, $P = 0.033$ respectively). None of the polymorphisms of the *NOS3*, *CD14*, *MMP3*, *IL-4R* and *IL4* genes were associated with VEGF plasma levels.

3.2. Epistatic interactions between NOS3, CD14, MMP3, IL4R, IL4 and VEGF-related polymorphisms on the plasma levels of VEGF

Six genetic variants were involved in epistatic interactions for VEGF plasma levels regulation, including rs1800779 and rs3918226 (*NOS3*), rs2569190 (*CD14*), rs3025058 (*MMP3*), rs1801275 (*IL4R*) and rs6921438 (*VEGF*) (table 3). Specifically, the rs1800779 of *NOS3* interacted with the rs3918226 of the same gene ($\beta = 0.17$, $P = 0.022$) and with the rs2569190 of *CD14* ($\beta = -0.06$, $P = 0.042$); leading to different effects on VEGF plasma values (increase and decrease respectively). Additionally the rs1801275 of *IL-4R* interacted with the VEGF-related SNP rs6921438 resulting in an increase of VEGF plasma levels ($\beta = 0.07$, $P = 0.042$) and with the rs3025058 of *MMP3* with an opposite effect ($\beta = -0.09$, $P = 0.010$). Finally, the interaction between rs2569190 of *CD14* and rs3025058 of *MMP3* was associated with a significant increase in plasma levels of VEGF ($\beta = 0.07$, $P = 0.019$).

3.3. SNPs \times environmental interactions on the plasma levels of VEGF

Significant interactions were observed between *NOS3* SNPs and HDL-C, triglycerides and obesity (table 4). A decrease of VEGF plasma levels resulted from the interaction of rs1800779 with obesity and triglycerides ($\beta = -0.11$, $P=0.018$, $\beta = -0.04$, $P=0.043$ respectively), while its interaction with HDL-C was associated with an increase in VEGF plasma levels ($\beta = 0.12$, $P=0.005$). Furthermore, the VEGF-related polymorphism rs6921438 interacted with hypertension to decrease VEGF levels ($\beta = -0.18$, $P=0.028$).

4. Discussion

In the present study, we have identified significant associations between genetic variants of *NOS3* with *VEGF* gene expression in a healthy population. Furthermore, significant epistatic and gene \times environment interactions have been identified for VEGF plasma levels involving polymorphisms of *NOS3*, *CD14*, *MMP3*, *IL4R*, *IL4* and VEGF-related SNPs.

Numerous SNPs have been identified in *NOS3* gene. Among them, the common variant, G984T (rs1799983), located in exon 7 of the gene, modifies its coding sequence, thus resulting in an amino acidic substitution of glutamic acid to aspartic acid at position 298 of the protein, which may alter its enzymatic activity [31, 32]. This SNP has been demonstrated by several groups to be linked with the risk for coronary spasm, coronary artery disease and acute myocardial infarction [33-37].

In this study, a significant association between this SNP and *VEGF* expression level (total mRNA and VEGF₁₄₅ isoform) was observed. The minor allele of this SNP was associated with increased levels of VEGF mRNA. Such association might suggest the existence of transcriptional regulation of *VEGF* from *NOS3* in PBMCs in non-pathological situations and thus a novel molecular link between VEGF and NO. It is noteworthy that in a previous investigation, we had identified significant associations between the VEGF₁₄₅ isoform with cellular adhesion and inflammation molecules expression (*ICAM-1*, *L-selectin* and *TNF- α*) in the same population [38]. Our current results further support the importance of this isoform on cardiovascular physiology and underline its potent role as a key molecule in different diseases.

On the other hand, no significant relations were found between *VEGF* gene expression and/or plasma levels and *CD14*, *MMP3*, *IL4R* and *IL4* polymorphisms in our healthy population.

In this study, we also observed an epistatic interaction between *NOS3* SNP rs1800779 and *CD14* SNP rs2569190 which resulted in a significant decrease in VEGF plasma level. The

rs1800779 is located in the upstream and promoter region of the gene and may eventually lead to reduced production and bioavailability of NO. Also, the CD14 SNP rs2569190 is situated at position -159 of the gene and has been suggested to be linked with increased expression and transcriptional activity of CD14 [39].

Additionally, we have found that the interaction between the *NOS3* SNPs, rs1800779 and rs3918226, was associated with a significant increase in VEGF plasma level. Similar to the former SNP, the rs3918226 is located in the promoter region of *NOS3* gene and although no functional studies have been reported so far for this SNP, few studies have identified a transcription-factor binding site for the ETS-family next to rs3918226, suggesting that rs3918226 can potentially modulate the expression of *NOS3* [40].

It is important to mention that the epistatic interaction between *IL-4R* SNP rs1801275 and the VEGF-related SNP rs6921438 was associated with a significant increase in VEGF plasma level in our healthy population. IL-4 biological actions are mediated by its binding to the receptors IL-4, which leads to the activation of intracellular signaling pathways [41]. The *IL-4R* SNP rs1801275 is a substitution of Arg with Gln at the position 576 of the protein, resulting in an enhancement in the receptor signaling. In addition, the VEGF-related SNP rs6921438 is an intergenic variant that is located at 171 kb downstream of the *VEGF* gene on chromosome 6p21.1. In a previous GWAS, the minor allele of the polymorphism was associated with decreased VEGF levels [3].

Complex relationships have been observed between IL4 and VEGF in several diseases. IL4 has pro-angiogenic and pro-inflammatory properties in the lungs during exposure to chronic hypoxia and this effect is dependent on the hypoxia-mediated induction of the VEGF signaling pathway [42]. Also, IL4 has been discovered to exert anti-angiogenic properties in several cancer models with high VEGF expression levels [43]. Moreover, in patients with

rheumatoid arthritis, IL4 inhibits VEGF production in synovial fibroblasts [7]. The results of our study support the concept of crosstalk between VEGF and IL4.

Another finding of our investigation indicates an epistatic interaction between the *IL4R* SNP rs1801275 and *MMP3* SNP rs3025058 that was associated with a significant decrease in VEGF plasma level. The *MMP3* SNP is located in the promoter region of the gene where the one allele has a run of six adenosines (6A) and another having five adenosines (5A) at position 1171 [44]. It has been shown that MMPs are involved in different steps of angiogenesis and play an important role in the blood vessel growth and the process of vascular development in cancer [45]. In addition, MMPs can increase the bioavailability of VEGF [46] and the association between MMPs and VEGF has been demonstrated, in several studies, to contribute to different pathological conditions, e.g. cancer invasion [15-17]. Considering the potential interactions of VEGF with both IL4 and MMPs, it is not surprising that in this study we observed that the interaction between *IL4R* and *MMP3* SNPs are significant for VEGF plasma levels?

Hypertension, smoking, blood lipids and obesity were the “environmental factors” selected for interaction analyses, as they are risk factors with large environmental impact for different diseases. We observed interactions between *NOS3* SNP rs1800779 with HDL-C, triglycerides and obesity. These interactions were associated with increased VEGF plasma levels in the case of HDL-C, and decreased VEGF levels for triglycerides and obesity.

Loebig et al reported a positive correlation between plasma VEGF concentrations in overweight subjects as compared with normal and low weight individuals. However, they did not find any significant differences of VEGF levels when comparing normal and low weight participants [6]. Sandhofer et al, found that the plasma levels of VEGF are positively and negatively correlated with BMI in men, and visceral fat in women respectively [47]. Our

interactions results indicate a possible implication of *NOS3* variants in the relationship between indexes of adiposity and VEGF.

Finally, we identified also an interaction of the SNP rs6921438 with hypertension, which was associated with a decrease in VEGF levels. As previously mentioned, the minor allele of this variant was associated with decreased VEGF levels [3] and explained 41% of the VEGF inter-individual variability. Furthermore, it was the only polymorphism among the 4 VEGF-related assessed in the present study that was implicated in epistatic and environmental interactions for VEGF. Therefore, it seems that its role as a VEGF biomarker may be more significant than its large effect on VEGF levels being implicated in VEGF determination through indirect interactions as well. Moreover, the same variant has been also recently found to contribute to decreased HDL-C and increased LDL-C levels in the same population [48]. Thus, it could represent a strong biological link between angiogenesis, blood pressure regulation and blood.

5. Conclusion

In the present work, we assessed the associations of VEGF plasma levels and gene expression with *NOS3*, *CD14*, *MMP3*, *IL4R*, *IL4* and VEGF-related SNPs in a healthy population, as well as their epistatic and environmental interactions. The significant role of a clinically significant *NOS3* polymorphism on *VEGF* gene expression was presented. VEGF plasma levels were also associated with epistatic and environmental interactions with polymorphisms of the *NOS3*, *CD14*, *MMP3*, and *IL4R*, while among the VEGF-related polymorphisms, the stronger VEGF determinant rs6921438 was also implicated in such interactions. These results indicate the central role of VEGF regulation in different physiological biological procedures and support the existence of complex relationships between angiogenesis, and *NOS3*, *CD14*, *MMP3* and *IL4R* which exist even in the healthy state. Such complex interactions should be taken into account in future studies concerning the implication of VEGF in related human

chronic pathologies. The understanding of these associations may promote the knowledge of the molecular mechanisms and the processes that mediate complex diseases such as diabetes, cancer and cardiovascular diseases, but also the possible development of new therapeutic targets in a personalized medicine approach. Furthermore, this study underlines the value of candidate gene approach in combination with GWAS in assessing interactions of the biological determinants of disease intermediate phenotypes such as the VEGF.

6. Acknowledgments

Samples and data used for this study are part of the Biological Resources Center (BRC): “Interactions Gène-Environnement en Physiopathologie Cardio-Vasculaire” (IGE-PCV) in Nancy, France.

This work was funded through the Collaborative BioIntelligence Program. The funding source had no implication in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication.

7. Conflicts of Interest

Authors declare that they have no conflict of interest.

8. References

- [1] Kiriakidis S, Andreakos E, Monaco C, Foxwell B, Feldmann M, Paleolog E. VEGF expression in human macrophages is NF-kappaB-dependent: studies using adenoviruses expressing the endogenous NF-kappaB inhibitor IkappaBalpha and a kinase-defective form of the IkappaB kinase 2. *J Cell Sci* 2003; 116:665-674.
- [2] Blann AD, Belgore FM, McCollum CN, Silverman S, Lip PL, Lip GY. Vascular endothelial growth factor and its receptor, Flt-1, in the plasma of patients with coronary or peripheral atherosclerosis, or Type II diabetes. *Clin Sci (Lond)* 2002; 102:187-194.
- [3] Debette S, Visvikis-Siest S, Chen MH, et al. Identification of cis- and trans-acting genetic variants explaining up to half the variation in circulating vascular endothelial growth factor levels. *Circ Res* 2011; 109:554-563.
- [4] Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, et al. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med* 2003; 9:1370-1376.
- [5] Podar K, Anderson KC. The pathophysiologic role of VEGF in hematologic malignancies: therapeutic implications. *Blood* 2005; 105:1383-1395.
- [6] Loebig M, Klement J, Schmoller A, et al. Evidence for a relationship between VEGF and BMI independent of insulin sensitivity by glucose clamp procedure in a homogenous group healthy young men. *PLoS One* 2010; 5:e12610.
- [7] Hong KH, Cho ML, Min SY, et al. Effect of interleukin-4 on vascular endothelial growth factor production in rheumatoid synovial fibroblasts. *Clin Exp Immunol* 2007; 147:573-579.
- [8] Isenberg JS, Martin-Manso G, Maxhimer JB, Roberts DD. Regulation of nitric oxide signalling by thrombospondin 1: implications for anti-angiogenic therapies. *Nat Rev Cancer* 2009; 9:182-194.
- [9] Fernandez Pujol B, Lucibello FC, Gehling UM, et al. Endothelial-like cells derived from human CD14 positive monocytes. *Differentiation* 2000; 65:287-300.
- [10] Song M-N, Cho S-Y. CD14 Acts as an Angiogenic Factor by Inducing Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF). *Bull Korean Chem Soc* 2007; 28:1613-1614.
- [11] Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:161-174.
- [12] Westermarck J, Li S, Jaakkola P, Kallunki T, Grenman R, Kahari VM. Activation of fibroblast collagenase-1 expression by tumor cells of squamous cell carcinomas is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun NH2-terminal kinase-2. *Cancer Res* 2000; 60:7156-7162.
- [13] Itoh T, Tanioka M, Matsuda H, et al. Experimental metastasis is suppressed in MMP-9-deficient mice. *Clin Exp Metastasis* 1999; 17:177-181.
- [14] Gatto C, Rieppi M, Borsotti P, et al. BAY 12-9566, a novel inhibitor of matrix metalloproteinases with antiangiogenic activity. *Clin Cancer Res* 1999; 5:3603-3607.
- [15] Bergers G, Brekken R, McMahon G, et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2000; 2:737-744.
- [16] Zhou Z, Apte SS, Soininen R, et al. Impaired endochondral ossification and angiogenesis in mice deficient in membrane-type matrix metalloproteinase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:4052-4057.
- [17] Chang C, Werb Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol* 2001; 11:S37-43.
- [18] Silvestre JS, Mallat Z, Tamarat R, Duriez M, Tedgui A, Levy BI. Regulation of matrix metalloproteinase activity in ischemic tissue by interleukin-10: role in ischemia-induced angiogenesis. *Circ Res* 2001; 89:259-264.
- [19] Carr C, Aykent S, Kimack NM, Levine AD. Disulfide assignments in recombinant mouse and human interleukin 4. *Biochemistry* 1991; 30:1515-1523.
- [20] Faffe DS, Flynt L, Bourgeois K, Panettieri RA, Jr., Shore SA. Interleukin-13 and interleukin-4 induce vascular endothelial growth factor release from airway smooth muscle cells: role of vascular endothelial growth factor genotype. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 34:213-218.
- [21] Haas CS, Amin MA, Allen BB, et al. Inhibition of angiogenesis by interleukin-4 gene therapy in rat adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2006; 54:2402-2414.
- [22] Visvikis-Siest S, Siest G. The STANISLAS Cohort: a 10-year follow-up of supposed healthy families. Gene-environment interactions, reference values and evaluation of biomarkers in prevention of cardiovascular diseases. *Clin Chem Lab Med* 2008; 46:733-747.
- [23] Siest G, Visvikis S, Herbeth B, et al. Objectives, design and recruitment of a familial and longitudinal cohort for studying gene-environment interactions in the field of cardiovascular risk: the Stanislas cohort. *Clin Chem Lab Med* 1998; 36:35-42.
- [24] Fitzgerald SP, Lamont JV, McConnell RI, Benchikh el O. Development of a high-throughput automated analyzer using biochip array technology. *Clin Chem* 2005; 51:1165-1176.

- [25] Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18:499-502.
- [26] Cheng S, Pallaud C, Grow MA, et al. A multilocus genotyping assay for cardiovascular disease. *Clin Chem Lab Med* 1998; 36:561-566.
- [27] Hoppe C, Klitz W, Cheng S, et al. Gene interactions and stroke risk in children with sickle cell anemia. *Blood* 2004; 103:2391-2396.
- [28] Ehrich M, Bocker S, van den Boom D. Multiplexed discovery of sequence polymorphisms using base-specific cleavage and MALDI-TOF MS. *Nucleic Acids Res* 2005; 33:e38.
- [29] Marteau JB, Mohr S, Pfister M, Visvikis-Siest S. Collection and storage of human blood cells for mRNA expression profiling: a 15-month stability study. *Clin Chem* 2005; 51:1250-1252.
- [30] Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 2007; 81:559-575.
- [31] Ryk C, Wiklund NP, Nyberg T, de Verdier PJ. Polymorphisms in nitric-oxide synthase 3 may influence the risk of urinary-bladder cancer. *Nitric Oxide* 2011; 25:338-343.
- [32] Venturelli E, Villa C, Fenoglio C, et al. The NOS3 G894T (Glu298Asp) polymorphism is a risk factor for frontotemporal lobar degeneration. *Eur J Neurol* 2009; 16:37-42.
- [33] Hibi K, Ishigami T, Tamura K, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction. *Hypertension* 1998; 32:521-526.
- [34] Colombo MG, Andreassi MG, Paradossi U, et al. Evidence for association of a common variant of the endothelial nitric oxide synthase gene (Glu298-->Asp polymorphism) to the presence, extent, and severity of coronary artery disease. *Heart* 2002; 87:525-528.
- [35] McNamara DM, Holubkov R, Postava L, et al. Effect of the Asp298 variant of endothelial nitric oxide synthase on survival for patients with congestive heart failure. *Circulation* 2003; 107:1598-1602.
- [36] Rios DL, D'Onofrio LO, Souza JK, et al. Smoking-dependent and haplotype-specific effects of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms on angiographically assessed coronary artery disease in Caucasian- and African-Brazilians. *Atherosclerosis* 2007; 193:135-141.
- [37] Morray B, Goldenberg I, Moss AJ, et al. Polymorphisms in the paraoxonase and endothelial nitric oxide synthase genes and the risk of early-onset myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2007; 99:1100-1105.
- [38] Azimi-Nezhad M, Stathopoulou MG, Bonnefond A, et al. Associations of vascular endothelial growth factor (VEGF) with adhesion and inflammation molecules in a healthy population. *Cytokine* 2013; 61:602-607.
- [39] LeVan TD, Bloom JW, Bailey TJ, et al. A common single nucleotide polymorphism in the CD14 promoter decreases the affinity of Sp protein binding and enhances transcriptional activity. *J Immunol* 2001; 167:5838-5844.
- [40] Salvi E, Kotalik Z, Glorioso N, et al. Genomewide association study using a high-density single nucleotide polymorphism array and case-control design identifies a novel essential hypertension susceptibility locus in the promoter region of endothelial NO synthase. *Hypertension* 2012; 59:248-255.
- [41] Roger T, Froidevaux C, Le Roy D, et al. Protection from lethal gram-negative bacterial sepsis by targeting Toll-like receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106:2348-2352.
- [42] Yamaji-Kegan K, Su Q, Angelini DJ, Johns RA. IL-4 is proangiogenic in the lung under hypoxic conditions. *J Immunol* 2009; 182:5469-5476.
- [43] Saleh M, Wiegmanns A, Malone Q, Stylli SS, Kaye AH. Effect of in situ retroviral interleukin-4 transfer on established intracranial tumors. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91:438-445.
- [44] Ye S, Eriksson P, Hamsten A, Kurkinen M, Humphries SE, Henney AM. Progression of coronary atherosclerosis is associated with a common genetic variant of the human stromelysin-1 promoter which results in reduced gene expression. *J Biol Chem* 1996; 271:13055-13060.
- [45] Nguyen M, Arkell J, Jackson CJ. Human endothelial gelatinases and angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 2001; 33:960-970.
- [46] Liutkeviciene R, Zaliaduonyte-Peksiene D, Zaliuniene D, et al. Does matrix metalloproteinase-3 polymorphism play a role in age-related macular degeneration in patients with myocardial infarction? *Medicina (Kaunas)* 2012; 48:404-409.
- [47] Sandhofer A, Tatarczyk T, Kirchmair R, et al. Are plasma VEGF and its soluble receptor sFlt-1 atherogenic risk factors? Cross-sectional data from the SAPHIR study. *Atherosclerosis* 2009; 206:265-269.
- [48] Stathopoulou MG, Bonnefond A, Ndiaye NC, et al. A common variant highly associated with plasma VEGFA levels also contributes to the variation of both LDL-C and HDL-C. *J Lipid Res* 2013; 54:535-541.

Table 1: Characteristics of the studied polymorphisms.

Chromosome	SNPs	Minor allele	Common allele	Closed to/on gene	Minor allele Frequency
5	rs2569190	G	A	CD14 molecule	0.48
5	rs2243250	T	C	IL4 interleukin 4	0.15
6	rs4416670	C	C	MGC45491 and MRPL14 (near VEGF)	0.47
6	rs2010963	C	G	VEGFA	0.35
6	rs6921438	A	G	MGC45491 and MRPL14 (near VEGF)	0.4
7	rs3918226	T	C	NOS3 nitric oxide synthase 3	0.09
7	rs1799983	T	G	NOS3 nitric oxide synthase 3	0.35
7	rs1800779	G	A	NOS3 nitric oxide synthase 3	0.4
8	rs6993770	T	A	ZFPM2	0.28
9	rs10738760	G	A	VLDLR and KCNV2	0.48
11	rs3025058	-	T	MMP3 matrix metalloproteinase 3	0.48
16	rs1805015	C	T	IL4R interleukin 4 receptor	0.13
16	rs1801275	G	A	IL4R interleukin 4 receptor	0.18

Table 2: Characteristics of study population ($n = 403$).

Variable	Mean^a	SD^b
Age (years)	44.4	4.8
Gender (%) male	50.4	
Body mass index (kg/m ²)	24.9	3.9
<i>Vascular endothelial growth factor</i> (pg/ml)	42.7	43.3
Total cholesterol (mmol/l)	5.7	1.0
Triglycerides (mmol/l)	1.3	1.2
High- density lipoprotein (mmol/l)	1.6	0.4
Low-density lipoprotein (mmol/l)	3.5	0.8
Obesity (%)	7.9 %	
Smoking (%)	25.4 %	
Hypertension (%)	5.7 %	

^aMean values for continuous variables and percentages for categorical variables

^bSD standard deviation

Table 3: Epistatic interactions for VEGF plasma levels

SNP × SNP	Genes	β^a(pg/ml)	<i>P</i>
rs1800779 × rs2569190	<i>NOS3</i> × <i>CD14</i>	-0.07	0.042
rs1800779 × rs3918226	<i>NOS3</i> × <i>NOS3</i>	+0.17	0.022
rs1801275 × rs6921438	<i>IL4R</i> × <i>VEGF</i>	+0.08	0.042
rs1801275 × rs3025058	<i>IL4R</i> × <i>MMP3</i>	-0.10	0.010
rs2569190 × rs3025058	<i>CD14</i> × <i>MMP3</i>	+0.07	0.019

^a β , effect size

Table 4: Significant gene x environment interactions with VEGF plasma levels

Interaction	Gene	β^a(pg/ml)	<i>P</i>
rs1800779 × HDL-C	NOS3	0.12	0.005
rs1800779 × Triglycerides	NOS3	-0.04	0.043
rs1800779 × Obesity	NOS3	-0.11	0.018
	MGC45491	and	
rs6921438 × Hypertention	MRPL14(<i>VEGF</i>)	near -0.18	0.028

^a β , effect size

GWAS-identified VEGF-related variants associations with obesity risk in a healthy population: interactions with blood lipids

Running title: VEGF and obesity-related phenotypes

Abdelsalam Saleh^{1*}, Maria G. Stathopoulou^{1*}, Ndeye Coumba Ndiaye¹, Jerome Chatelin¹, Helena Murray², Christine Masson¹, Georges Weryha³, Gérard Siest¹, John Lamont², Peter Fitzgerald², Sophie Visvikis-Siest^{1,4,}**

¹ INSERM UMR U 1122 ; IGE-PCV “Interactions Gène-Environnement en Physiopathologie CardioVasculaire”, Université de Lorraine, Faculté de Pharmacie, Nancy, France

² Radox Laboratories, Crumlin, United Kingdom.

³ Department of Endocrinology, University Hospital of Nancy, University of Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy, France

⁴ Geriatric Service, University Hospital of Nancy, Nancy, France

* These authors contributed equally to this work

****Corresponding author:**

Dr. VISVIKIS-SIEST Sophie

INSERM UMR U 1122 ; IGE-PCV, Université de Lorraine, Faculté de Pharmacie

30 Rue Lionnois

54000 Nancy, France

Tel: +33(0)6.07.60.25.69

Fax: +33(0)3.83.32.13.22

E-mail address: Sophie.Visvikis-Siest@inserm.fr

This work was financially supported by the BioIntelligence project. The authors have no conflicts of interest.

Abstract

Background/Objective: Our aim was to investigate the effects of 4 polymorphisms that we previously identified by a GWAS as related to an angiogenic factor, the vascular endothelial growth factor (VEGF), and their interactions with blood lipids on obesity-related phenotypes in a healthy population.

Subjects/Methods: In 403 healthy adults, 4 VEGF-related polymorphisms (rs6921438, rs4416670, rs6993770, and rs10738760) were investigated (linear and logistic regression models) against body mass index (BMI), waist circumference (WC), and obesity. Their interactions with blood lipids were also assessed.

Results: The rs4416670 was directly associated with decreased risk for obesity and with decreased WC. Interactions with triglycerides were observed (rs4416670, rs6921438 and rs10738760) for BMI and obesity. All polymorphisms interacted with triglycerides to modify WC and 2 polymorphisms (rs6921438 and rs10738760) the risk for central obesity. Furthermore, rs4416670 interacted with total cholesterol for WC and general obesity.

Conclusions: These findings demonstrate that all investigated VEGF-related polymorphisms directly or after interaction with blood lipids (especially triglycerides) are associated with obesity-related phenotypes in a healthy state, thus supporting the existence of links between angiogenesis and obesity mediated by interactions with preventable cardiovascular risk factors. This supports the elaboration of VEGF-centred personalised cardiovascular risk prediction and prevention programs.

Keywords: VEGF, angiogenesis, obesity, blood lipids, polymorphisms.

Introduction

Obesity is one of the most common health shift issues and has become a worldwide source of public health concern, because of its negative effects on morbidity and mortality at different ages in both developed and developing countries ¹. According to the World Health Organization more than 1.4 billion adults were overweight in 2008 and among them, 500 million were obese ². Obesity is associated with an increased risk of numerous pathological conditions, including cardiovascular diseases (CVDs), hypertension, and type 2 diabetes ³. Diverse subgroups of adiposity and obesity are probably produced by complex interactions between the genetic background, diet and physical activity ⁴ disturbing physiological mechanisms. Angiogenesis, for instance, has been shown to have a crucial role in the modulation of adipogenesis and obesity by controlling the number of vessels of the adipose tissue ^{5,6}.

Indeed, angiogenesis is a complex and tightly regulated process that consists of the growth of blood vessels from the existing vasculature. There are four phases of the process of angiogenesis: 1) degradation of extracellular matrix, 2) cell migration, 3) cell proliferation, and 4) structural reorganisation ⁷. These distinct steps are likely to be differentially regulated.

The understanding that the control of angiogenesis could have therapeutic value has stimulated great interest during the past 40 years and many angiogenic molecules have been identified as targets. Among them, the major molecule is the vascular endothelial growth factor (VEGF), which is necessary for the initiation of the formation of immature vessels during development and in adults. It is a highly specific mitogen for endothelial cells ⁷ and modulates cell migration ^{8,9}.

We previously demonstrated that VEGF has a high heritable component of more than 60% ¹⁰. This extremely high heritability was further confirmed by Lieb W et al ¹¹. In a previous genome-wide association study (GWAS), we showed that up to half of its inter-individual

variation is explained by four genetic variants: rs6921438, rs4416670, rs6993770, and rs10738760¹². These four variants have been further associated with cardiovascular risk factors such as cholesterol levels and inflammation molecules, which are monitored and modulated in most CVD prevention programs^{13, 14}. We have also shown that these associations are modulated by common environmental risk factors for CVD. Thus, VEGF could be used as a pivotal regulator for multiple preventable cardiovascular risk factors and consequently have an important application in prevention.

Nevertheless, the role of VEGF-related polymorphisms has not been studied in relation to obesity development.

Furthermore, its unrivalled genetic component, that we extensively characterized, makes it a unique biomarkers in the “-omics” field.

Our aim was to assess the effects of polymorphisms associated to VEGF levels, on general and central obesity and their related phenotypes in healthy individuals, in order to investigate its metabolic role in normal conditions of weight regulation.

Materials and Methods

Study population

The STANISLAS Family Study (SFS) is a 10-year longitudinal survey involving 1,006 families from Vandoeuvre-lès-Nancy, France^{15, 16}. Exclusion criteria included the presence of chronic disorders (CVDs or cancer) and the personal history of CVDs. A sample of 403 unrelated adults, collected during the second examination of the SFS, was selected based on complete availability of data to participate in this study. The protocol has been approved by the Local Ethics Committee of Nancy and all subjects gave written informed consent for their participation.

Data collection

Data collection methods have been previously presented^{15, 16}. In brief, body mass index (BMI) was calculated as weight (kilograms) divided by height (meters) squared. General obesity was defined as BMI ≥ 30 kg/m². Waist circumference was taken at the midpoint between the lower margin of the last palpable rib and the top of the iliac crest (hip bone). Measurements were recorded to the nearest 0.1 cm. Central obesity was defined as a waist circumference >102 cm in men and >90 cm in women.

Biological measurements

Blood samples were collected after overnight fasting. Sodium EDTA-plasma was separated by centrifugation at 2000g for 15 min at 4°C and stored at -196°C in liquid nitrogen until analysis. VEGF plasma levels were quantified by Randox Ltd (Crumlin, UK) with the Evidence Investigator¹⁷. Total cholesterol (TC) was measured using a cholesterol oxidase-paraaminophenazone method, triglycerides using a glycerophosphate oxidase/paraaminophenazone alanyl-glycine method, and high-density lipoprotein

cholesterol (HDL-C) levels using a phosphotungstate method. Low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) levels were calculated using the Friedewald formula¹⁸.

Genotyping

The single nucleotide polymorphisms (SNPs) previously shown to be associated with VEGF levels¹²: rs6921438, rs4416670, rs6993770, and rs10738760 were genotyped by Genoscreen (<http://genoscreen.fr>), using a Sequenom Iplex Gold assay-Medium Throughput Genotyping Technology and by Randox Ltd (Crumlin, UK) using a VEGF specific biochip and the analyser Evidence® Investigator.

Samples and data used for this study are part of the Biological Resources Center (BRC): “Interactions Gène-Environnement en Physiopathologie Cardio-Vasculaire” (IGE-PCV) in Nancy, France

Statistical analysis

Before the statistical analysis, BMI and waist circumference values were log-transformed to achieve a normal distribution. Hardy-Weinberg equilibrium was tested for the genotyped SNPs using the chi-square test.

All analyses were performed under an additive model and using the minor allele as reference allele. The associations between the SNPs and BMI were tested with the use of linear regression models following adjustment for age and gender.

Logistic regression models adjusted for age and gender were used for the assessment of the associations of the SNPs with general and central obesity.

For the SNPs × blood lipids levels interactions (TC, triglycerides, HDL-C, and LDL-C), similar tests (linear and logistic regressions) were used with the addition of the lipid factor as a covariate and the addition of the SNPs × lipid term.

Analyses were performed using PLINK 1.07 (<http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink>).
Significance was determined at a two-tailed $P=0.05$.

Results

The characteristics of the studied population are presented in Table 1. The assessed polymorphisms were all in agreement with Hardy-Weinberg equilibrium (Table 2).

Associations of VEGF-related polymorphisms with BMI, waist circumference, central obesity and general obesity.

Significant associations with general obesity were observed for the VEGF-related rs4416670 (OR=0.738, $P=0.038$). The minor allele of this polymorphism was associated with decreased risk for general obesity. Also, the minor allele of rs4416670 was significantly associated with a decrease in waist circumference ($\beta=-0.007$, $P=0.023$). No significant associations were found for the other polymorphisms tested and no variant had a significant direct effect on BMI or central obesity.

Interactions between VEGF-related polymorphisms with blood lipids for BMI, waist circumference, central obesity and general obesity.

Significant interactions with triglycerides were observed for BMI. Three VEGF-related SNPs were involved in these interactions (rs6921438 and rs4416670 increasing BMI while the interaction with rs10738760 decreased BMI levels) ($\beta=0.017$, $P=2.954 \times 10^{-5}$, $\beta=0.012$, $P=0.001$, $\beta=-0.017$, $P=3.966 \times 10^{-6}$ respectively).

Likewise associations were observed for the same SNPs for general obesity. The interactions of rs6921438 and rs4416670 with triglycerides were increasing the risk of general obesity (OR=1.584, $P=0.002$; OR=1.476, $P=0.009$), while the rs10738760 was associated with a decreased risk for general obesity (OR=0.668, $P=0.002$).

Very strong interactions with triglycerides were present for waist circumference. The interactions with rs6921438, rs4416670 but also rs6993770 had an increasing effect in waist

circumference (beta= 0.014, $P=1.5 \times 10^{-6}$, beta= 0.011, $P=5.5 \times 10^{-5}$, beta= 0.009, $P=0.029$, respectively). The SNP rs10738760 interacted with triglycerides to decrease waist circumference levels (beta= -0.015, $P=2.14 \times 10^{-8}$).

Furthermore, similar results were observed for interactions of 2 SNPs (rs6921438 rs10738760) with triglycerides for central obesity (rs6921438, OR=1.720, $P=0.008$; rs10738760, OR=0.677, $P=0.032$).

Additionally, another significant interaction between the VEGF-related rs4416670 with TC significantly increased the risk of general obesity (OR=1.497, $P=0.01$) and the waist circumference (beta= 0.006, $P=0.042$).

Discussion

Obesity is a highly complex chronic disorder with a multifactorial aetiology and polygenic regulation. It has become epidemic and is a major subject of interest in public health but remains a challenge in everyday clinic. Here, we clearly and interestingly demonstrate that variants related to VEGF levels are associated with different obesity-related phenotypes directly or by significant interactions with blood lipids levels and our results could be translated in personalised clinical practice. Obesity-related phenotypes are associated with cardiovascular risk and many other health concerns leading to a poorer quality of life and reduced life expectancy.

Analysing the role of VEGF-related polymorphisms, the rs4416670 shows a protective role against waist circumference and obesity. This effect was reversed through an interaction with triglycerides and total cholesterol. These interactions increased BMI and waist circumference levels and the risk of general obesity. This SNP is an inter-genic region between LOC100132354 (a non-coding RNA) and the *C6orf223* gene (encoding an uncharacterized protein) on chromosome 6p21.1, at 171 kb downstream of the *VEGF* gene and decreased levels of circulating VEGF¹².

Two more polymorphisms related to VEGF (rs6921438 and rs10738760) interacted with triglycerides to modify the levels of BMI, and the risk for central obesity and general obesity (positively for rs6921438 and negatively for rs10738760). The SNP rs6921438 is an intergenic variant located on chromosome 6p21.1, at 171 kb downstream of the *VEGF* gene and decreased levels of circulating VEGF. On the other hand, the SNP rs10738760 is an intergenic variant between *KCNV2* and *VLDLR* on chromosome 6p21.1, at 171kb downstream of the *VEGF* gene and has been associated with increased levels of circulating VEGF¹².

A significant interaction was also described between triglycerides and rs6993770 for increased waist circumference. The rs6993770 yielded a significant positive association with

VEGF levels and is an intronic variant that is located in the zinc finger protein, multitype 2 (*ZFPM2*) gene and at 980.4 kb on chromosome 8q23.1¹².

Concerning the clinical implications of our findings, as the VEGF-related polymorphisms show significant associations with obesity and its related phenotypes, it would be interesting to evaluate if obese people respond differently to weight loss programs according to these variants. Such a discovery could lead to a specific management of VEGF-related SNPs sub populations. Moreover, knowing that some polymorphisms could expose to a lesser or bigger risk of obesity could help in the dispensation of individual advices. The practitioner could adapt them to each patient and provide personalised guidance instead of general recommendations. Furthermore, significant interactions between three VEGF-related SNPs (rs6921438, rs4416670, rs107387760) with triglycerides for obesity and BMI pleads for a great interest of triglycerides lowering regimen in this population to prevent or cure obesity while choosing between low-fat, low-carbohydrate, complex versus simple carbohydrates, glycemic load dietary or higher protein approaches.

Also, high triglycerides levels interacted with rs6921438, rs4416670 and rs6993770 to increase waist circumference while rs10738760 interacted with triglycerides to decrease waist circumference. As previously mentioned, this last SNP is located between *VLDLR*, which favours triglycerides entry in adipocytes and *KCNV2* (voltage-gated potassium channel) genes. We could hypothesise an interaction of this SNP with the *VLDLR* gene, which would so decrease the entrance of triglycerides into adipocytes and thus the risk of obesity.

All together, these findings plead for genetic influences of VEGF-related genes on body composition and cardiovascular risk through metabolic pathways. This field has to be further explored to seek for personal treatment. Currently, treatments of dyslipidaemia are in development. For example, effects of different PPAR- α and PPAR- γ agonists will have to be studied in regards to their effects on VEGF. Improving knowledge in this field is important

and could lead to the development of specific genetic based treatments in the future personalised medicine.

In conclusion, in the present work, we showed associations of 4 VEGF-related SNPs with obesity-related phenotypes in a healthy population, as well as their interactions with blood lipids. We observed significant direct association of rs4416670 with decreasing risk for obesity and interactions of this SNP with blood lipids (triglycerides and TC) reversing its effect. Interactions with lipids (especially with triglycerides) for obesity-related phenotypes were also observed for the other VEGF-related polymorphisms.

These findings help to explain the link between obesity and angiogenesis through the mediation of known chronic diseases risk factors such as blood lipids levels, which are preventable, prevention being considered the most powerful and cost-effective strategy for these diseases.

In fact, the understanding of these associations promote the knowledge of the molecular mechanisms and the processes that mediate complex diseases where obesity is implicated such as diabetes, cancer and CVDs and this knowledge could lead to the development of new therapeutic modalities and prevention strategies for obesity.

Acknowledgments

Samples and data used for this study are part of the Biological Resources Center (BRC): “Interactions Gène-Environnement en Physiopathologie Cardio-Vasculaire” (IGE-PCV) in Nancy, France. We are deeply grateful to the cooperation of the families participating in the STANISLAS Cohort. We thank the staff of the “Centre de Médecine Préventive” of Vandoeuvre-les-Nancy (France) for their involvement in the recruitment of the STANISLAS cohort. This work was financially supported by the BioIntelligence project.

Conflict of Interest

The authors have no conflicts of interest.

References

1. Bellisari A. Evolutionary origins of obesity. *Obes Rev* 2008; **9**(2): 165-80.
2. WHO. *Obesity and overweight*, 2012.
3. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature* 2000; **404**(6778): 635-43.
4. DiPietro L. Physical activity, body weight, and adiposity: an epidemiologic perspective. *Exerc Sport Sci Rev* 1995; **23**: 275-303.
5. Cao Y. Angiogenesis modulates adipogenesis and obesity. *J Clin Invest* 2007; **117**(9): 2362-8.
6. Lijnen HR. Angiogenesis and obesity. *Cardiovasc Res* 2008; **78**(2): 286-93.
7. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev* 2004; **56**(4): 549-80.
8. Qi JH, Claesson-Welsh L. VEGF-induced activation of phosphoinositide 3-kinase is dependent on focal adhesion kinase. *Exp Cell Res* 2001; **263**(1): 173-82.
9. Rousseau S, Houle F, Landry J, Huot J. p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. *Oncogene* 1997; **15**(18): 2169-77.

10. Berrahmoune H, Herbeth B, Lamont JV, Masson C, Fitzgerald PS, Visvikis-Siest S. Heritability for plasma VEGF concentration in the Stanislas family study. *Annals of human genetics* 2007; **71**(Pt 1): 54-63.
11. Lieb W, Safa R, Benjamin EJ, Xanthakis V, Yin X, Sullivan LM *et al.* Vascular endothelial growth factor, its soluble receptor, and hepatocyte growth factor: clinical and genetic correlates and association with vascular function. *European heart journal* 2009; **30**(9): 1121-7.
12. Debette S, Visvikis-Siest S, Chen MH, Ndiaye NC, Song C, Destefano A *et al.* Identification of cis- and trans-acting genetic variants explaining up to half the variation in circulating vascular endothelial growth factor levels. *Circ Res* 2011; **109**(5): 554-63.
13. Azimi-Nezhad M, Stathopoulou MG, Bonnefond A, Rancier M, Saleh A, Lamont J *et al.* Associations of vascular endothelial growth factor (VEGF) with adhesion and inflammation molecules in a healthy population. *Cytokine* 2013; **61**(2): 602-7.
14. Stathopoulou MG, Bonnefond A, Ndiaye NC, Azimi-Nezhad M, El Shamieh S, Saleh A *et al.* A common variant highly associated with plasma VEGFA levels also contributes to the variation of both LDL-C and HDL-C. *J Lipid Res* 2013; **54**(2): 535-41.
15. Siest G, Visvikis S, Herbeth B, Gueguen R, Vincent-Viry M, Sass C *et al.* Objectives, design and recruitment of a familial and longitudinal cohort for studying gene-environment interactions in the field of cardiovascular risk: the Stanislas cohort. *Clin Chem Lab Med* 1998; **36**(1): 35-42.

16. Visvikis-Siest S, Siest G. The STANISLAS Cohort: a 10-year follow-up of supposed healthy families. Gene-environment interactions, reference values and evaluation of biomarkers in prevention of cardiovascular diseases. *Clin Chem Lab Med* 2008; **46**(6): 733-47.
17. Fitzgerald SP, Lamont JV, McConnell RI, Benchikh el O. Development of a high-throughput automated analyzer using biochip array technology. *Clin Chem* 2005; **51**(7): 1165-76.
18. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; **18**(6): 499-502.

Table 1 Characteristics of study population (n = 403).

Variable	Mean	SD
Age (years)	44.4	4.8
Gender (%) male	50.4	
Body mass index (kg/m ²)	24.9	3.9
Obesity (%)	7.9	
Waist circumference (cm)	82.4	11.0
Central obesity (%)	9.0	
Triglycerides (mmol/l)	1.3	1.2
Total cholesterol (mmol/l)	5.7	1.0
High- density lipoprotein (mmol/l)	1.6	0.4
Low-density lipoprotein (mmol/l)	3.5	0.8

Table 2 Characteristics of the SNP studied genetic variants

Chromosome	Variants	Minor allele	Common allele	Closed to/on gene	Minor allele frequency
6	rs4416670	C	T	MGC45491 and MRPL14 (near VEGF)	0.47
6	rs6921438	A	G	MGC45491 and MRPL14 (near VEGF)	0.40
8	rs6993770	T	A	ZFPM2	0.28
9	rs10738760	A	G	VLDLR and KCNV2	0.48

VEGF genetic determinants are involved in blood pressure regulation.

Abdelsalam Saleh^{1, *}, Maria G. Stathopoulou^{1, *}, Jérôme Chatelin^{1, 2}, Ndeye Coumba Ndiaye¹, Said El Shamieh¹, Gérard Siest¹, Christine Masson¹, Helena Murray³, Mary Jo Kurth³, John Lamont³, Peter Fitzgerald³, Sophie Visvikis-Siest^{1, 4, **}

¹ Université de Lorraine, UMR INSERM U 1122; IGE-PCV, Nancy, F-54000, France.

² Department of Endocrinology, CHU Nancy-Brabois, FRANCE

³ Randox Laboratories Ltd, Crumlin, United Kingdom BT29 4QY.

⁴ Department of Internal Medicine and Geriatrics, CHU Nancy-Brabois, FRANCE.

* Equal first authors

****Corresponding author:**

Dr. VISVIKIS-SIEST Sophie

UMR INSERM U 1122; IGE-PCV, Université de Lorraine, Faculté de Pharmacie

30 Rue Lionnois

54000 Nancy, France

Tel: +33(0)6.07.60.25.69

Fax: +33(0) 3.83.32.13.22

E-mail address: sophie.visvikis-siest@inserm.fr

Abbreviations: BMI, body mass index; BP, blood pressure; BRC IGE-PCV, Biological Resources Centre, “Interactions Gène-Environnement en Physiopathologie CardioVasculaire”; CVDs, cardiovascular diseases; DBP, diastolic blood pressure; EC, endothelial cells; GWAS, genome-wide association study; HTN, hypertension; PP, pulse pressure; SBP, systolic blood pressure; SNPs, single nucleotide polymorphisms; VEGF, vascular endothelial growth factor.

.....

Abstract

Vascular endothelial growth factor A (VEGFA or more commonly VEGF) is the most potent angiogenic factor with numerous physiological actions including involvement in vasodilation. It is highly heritable with ~60% of genetic component identified. Blood pressure's heritability is also high, ranging between 30 – 50 %, and some evidences suggest that complex, not yet identified, interactions between multiple genes have an important role in determining the individual's risk for hypertension. Epistatic interactions could help to identify subgroups among populations with higher risk for hypertension.

No study has been performed concerning possible associations of VEGF genetic determinants with blood pressure regulation.

Our aim was to examine the possible genetic links between four polymorphisms, identified by a genome wide association study to be related to VEGF circulating levels, and their epistatic interactions with blood pressure levels in a supposed healthy population.

Design and Methods: We have used a discovery and a replication population of supposed healthy unrelated adults (n=403 and n=380; respectively). The four VEGF-related polymorphisms (rs6921438G>A, rs4416670T>C, rs6993770A>T, and rs10738760A>G) and their epistatic interactions were investigated (linear regression models adjusted for age, gender and body mass index) against systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP) and pulse pressure (PP).

Results: In both populations, rs4416670C was directly associated with PP ($\beta=0.01$, $P=0.048$ and $\beta=0.01$, $P=0.042$ for discovery and replication populations respectively). In addition, one epistatic interaction between rs6921438G>A and rs10738760A>G was identified in both populations for PP ($\beta_{\text{int}}=-0.01$, $P_{\text{int}}=0.026$ and $\beta_{\text{int}}=-0.01$, $P_{\text{int}}=0.043$ for discovery and replication populations respectively).

Conclusions: Our findings support the existence of relationships between 3 GWAS-identified VEGF-related SNPs and blood pressure regulation in healthy state conditions. These results could be important for personalized therapy with anti VEGF drugs and for monitoring their hypertensive side effects.

Key words: VEGF, polymorphisms, blood pressure levels.

Introduction

Vascular endothelial growth factor A (VEGFA, also referred to as VEGF), a 45 kDa glycoprotein, is a powerful inducer of angiogenesis with numerous physiological actions,

including induction of endothelial cell permeability, proliferation, lymphogenesis, and vasodilation ^{1,2}.

The two major receptors for VEGF signals are the structurally related tyrosine kinases VEGFR1 (Flt-1) and VEGFR2 (Flk-1). These two receptors are expressed on multiple cell types such as tumor cells, endothelial cells (EC) progenitors and mature EC including glomerular, preglomerular and peritubular cells ³.

We have previously shown that VEGF has a heritable component of more than 60% ⁴, results further validated by others⁵. Up to half of this heritability is explained by four genetic variants that we identified by a genome-wide association study (GWAS) ⁶. This exceptionally high genetic component, extensively characterized, makes VEGF unique among biomarkers in the “-omics” field.

VEGF is implicated in the pathophysiology of cardiovascular diseases (CVD) and in our recent studies the four VEGF-related variants previously identified by GWAS have been associated with CVD risk factors such as high and low density lipoprotein levels and adhesion and inflammation molecules, which are monitored in most CVD prevention programs ^{7,8}. Thus, VEGF “-omics” determinants could be used as regulators for those CVD risk factors and could have an important application in prevention programs.

Hypertension (HTN) is a multifactorial disease resulting from complex interactions between genetic and environmental components ⁹. Approximately, one billion people are affected worldwide and an increasing incidence of HTN has been observed ¹⁰. It is also a major risk factor for CVD such as heart attack, congestive heart failure, peripheral vascular disease and stroke ^{9,11}.

Some previous studies suggest that blood pressure (BP) heritability ranges between 30 – 50 % ^{12,13}. Moreover, some evidences suggest that not yet identified complex interactions between multiple genes and environmental factors have an important role in determining the risk of one individual for HTN ^{14,15}.

This investigation was set up in order to assess the associations between the 4 VEGF- related genetic variants that we previously identified by GWAS and their gene × gene interactions to BP levels in a supposed healthy population.

Materials and methods

Ethics statement

The study protocol was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, Local Ethics Committee of each recruitment center and all subjects gave written informed consent for their participation in the study.

Study population

Samples and data used for this study are part of the Biological Resources Center (BRC): “Interactions Gène-Environnement en Physiopathologie Cardio-Vasculaire” (IGE-PCV) in Nancy, France.

A discovery and an independent replication population were included in the present study.

The discovery population was extracted from the STANISLAS Family Study (SFS), a 10-year longitudinal survey initiated between 1993-1995 involving 1,006 families from France¹⁶. Exclusion criteria included the presence of chronic disorders (cardiovascular diseases or cancer) and the personal history of cardiovascular disease. For this investigation 403 unrelated adults from the second examination of the SFS were selected based on complete availability of data.

The replication population consists of 380 non-related adults that take part of the BRC IGE-PCV. All subjects were of European origin and supposed healthy. Individuals with chronic disorders (cardiovascular or cancer) or having a personal history of CVDs have not been included. Subjects taking blood lipids lowering drugs or drugs having an effect on cardiovascular function (including inotropic agents, beta blockers, calcium-channel blockers, organic nitrates, anti-arrhythmics, angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors, angiotensin II receptor blockers, diuretics, clot-busters, anti-coagulants, anti-platelet drugs, anti-diabetic and insulin) were also excluded.

Data collection

The procedures of data collection have been previously described^{16,17}. Body mass index (BMI) was calculated as weight (kilograms) divided by height (meters) squared.

Systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood pressure (DBP) were measured by expert nurses under constant temperature (19°C-21°C) and standardized conditions (supine position) using a manual sphygmomanometer. The recorded values were the means of 3 readings on 20 min intervals. Pulse pressure (PP) was calculated as the difference between SBP and DBP. HTN was defined as systolic BP \geq 140 mm/Hg or diastolic BP \geq 90 mm/Hg.

Genotyping

The single nucleotide polymorphisms (SNPs) related to VEGF, rs6921438G>A, rs4416670T>C, rs6993770A>T, and rs10738760A>G, were genotyped by Genoscreen (<http://genoscreen.fr>), using a Sequenom iPLEX Gold assay–Medium Throughput Genotyping Technology¹⁸ and by Randox Laboratories Ltd (Crumlin, UK) using a VEGF specific biochip and the analyser Evidence® Investigator¹⁹.

Statistical analysis

BP values were log-transformed before the analyses to normalize their distribution. Hardy-Weinberg equilibrium was tested using the chi-square test.

The associations between the SNPs and BP levels were assessed through linear regression adjusted for age, gender and BMI under an additive model and using the minor allele as reference allele.

The epistatic interactions between the VEGF-related SNPs were tested with the introduction of the interaction term of a 2 × 2 combination between the assessed SNPs in the previously described regression models.

Analyses were performed using PLINK 1.07 (<http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink>)²⁰ statistical software. Significance was determined at a two-tailed P=0.05 level.

Results

The general characteristics of the participants and the studied polymorphisms are summarized in tables 1 and 2.

Associations of VEGF- related polymorphisms with blood pressure levels:

We found a significant association between rs4416670C and PP in the discovery population ($\beta=0.01$, $P=0.048$), which was confirmed in the replication population ($\beta=0.01$, $P=0.042$).

Gene × gene interactions with blood pressure:

One epistatic interaction between rs6921438G>A and rs10738760A>G had a significant effect for both populations on PP ($\beta_{\text{int}}=-0.01$, $P_{\text{int}}=0.026$ and $\beta_{\text{int}}=-0.01$, $P_{\text{int}}=0.043$ for discovery and replication populations respectively).

Discussion

Despite that multiple genetic determinants and environmental factors contribute to regulate BP levels²¹, the exact interplays between them is still not clear. To date, the largest GWAS on BP, which included $\approx 200,000$ individuals²², reported 29 loci to be associated with SBP, DBP and/or essential HTN. However, the genetic risk score subsequently constructed explained only 0.9% of BP phenotypic variation²², this illustrating the so-called ‘dark matter’ of genetic risk²³: a large ‘hidden heritability’ of unknown nature that may be explained by epistasis (gene \times gene)²³. The complex interactions between genetic factors for the risk of HTN are a promising field of investigations. In this study, we demonstrate that variants regulating VEGF levels are involved in BP regulation through direct and epistatic effects. Our results suggest that gene \times gene interactions are significant in the regulation of traits related to common human diseases such as BP.

More precisely, the minor allele C of SNP rs4416670 was found significantly associated with increased PP in two independent populations (discovery and replication) in our study. The same allele was associated with a decrease in VEGF levels in our previous GWAS⁶. The SNP rs4416670 is located on chromosome 6p21.1, at 171 kb, between *LOC100132354* (resulting in a non-coding RNA) and the *C6orf223* gene (encoding an uncharacterized protein), downstream of the *VEGF* gene. To our knowledge, the few expression data available for the *C6orf223* gene show an up-regulation in hypoxia, which also increases VEGF production²⁴.

Also, an interaction between two VEGF related SNPs (rs6921438G>A and rs10738760A>G) showed a significant effect on PP in the discovery and replication populations. SNP rs6921438G>A is an intergenic variant located in chromosome 6p21.1; at 171kb downstream of the *VEGF* gene whose minor allele has a negative effect in cardiovascular system. It decreases VEGF levels, increases low density lipoproteins and decreases high density lipoproteins in healthy conditions^{6,8}. However, the present investigation shows that its interaction with the SNP rs10738760 A>G, whose minor allele is associated with a decrease in VEGF levels, leads to a decrease of PP levels, thus demonstrating that combination of the two SNPs provides a more protective cardiovascular profile.

High dose VEGF infusion into rabbits induces systemic vasodilation causing an immediate drop in BP that can be inhibited by the Nitric Oxide Synthase (NOS) inhibitor²⁵. VEGF, acting through VEGFR2, activates endothelial NOS (eNOS) activity through AKT26, leading to increased vasodilatory NO production²⁶. Based on the above, it was interesting to find that

the variant related to decreased VEGF levels is associated with increased PP levels in two independent populations of healthy unrelated adults of European origin.

Angiogenesis plays a central role in various physiological processes within the human body. Animal studies have revealed that the deletion of a single allele of *VEGF* in *VEGF (+/-)* induces immature angiogenesis and cardiovascular insufficiency resulting in embryonic lethality. However, the loss of one gene allele in mammals rarely causes lethality. This evidence highlights the importance of this gene in angiogenic the homeostasis and the cardiovascular system^{27,28}.

Hypoxic conditions, growth factor signaling and hormones, such as estrogen, up regulate expression of *VEGF*²⁴. According to knockout studies²⁹, VEGFR2 is the major transducer of the VEGF message. VEGF is secreted from the decidual cells, which are progesterone receptor expressing cells, and is also involved during pregnancy in decidual angiogenesis and vascular remodeling in rapidly growing and regressing uteri³⁰. In diabetic retinopathy, persisting high levels of glucose, with the production of advance glycation end products, cause damage to retinal capillary bed and retinal ischemia which in turn leads to production of VEGF³¹. Hypoxia leads to the production of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) which stimulates VEGF expression and ocular neovascularization^{32,33}. Age-related macular degeneration (AMD) has become the most common cause of uncorrectable severe vision loss after 55 years in developed countries, choroidal neovascularization being responsible for most of AMD-related severe vision loss, where VEGF again is implicated³⁴.

In cancer diseases, growth of the tumor needs neovascularization. Studies of the VEGF pathway has led to the development of tyrosine kinase inhibitors targeted at VEGF receptor (VEGFR) with the assumption that VEGF was more necessary for tumor growth and less so for the maintenance of angiogenesis. Clinical trials are beginning but more work is required to evaluate the roles of different anti VEGF targeted therapies in multiple cancers.

Anti VEGFR treatments have been tried successfully in many different types of solid neoplasms such as renal cell carcinoma³⁵⁻³⁸, metastatic colorectal cancer³⁹⁻⁴¹, and for other cancer diseases such as esophageal cancer, glioblastoma, malignant glioma, epithelial ovarian cancer, non-small cell lung cancer, neuroendocrine tumors of the pancreas or intestines or melanoma⁴²⁻⁵⁴.

It is very important to note that, in animal and human clinical studies, anti VEGFR treatments are associated with hypertension⁵⁵. Their prescription leads to higher systolic, diastolic and pulse blood pressure, these effects being totally reversed by treatment interruption. Apart from the need of a treatment for hypertension, this may have clinical consequences. First,

clinicians may consider hypertension development as an indirect sign of compliance to the treatment. Further on, hypertension under anti VEGFR treatment has been regarded and confirmed as a potential predictor of their efficacy against cancer. For example, a study from Rautolia J. et al. has demonstrated that among patients treated with sunitinib, anti VEGFR treatment, 33% develop a hypertension up to grade 2. This adverse event was associated with longer progression-free survival ⁵⁶. However, it is important to note that patients treated for cancer are aged patients, very often suffering from hypertension and under hypertensive treatment, underlying the importance of implementation of adapted personalized protocols.

Considering both our results that demonstrate a relation between SNP rs4416670 and PP hypertensive trait and the link between hypertension and cancer prognosis of the anti VEGFR treatment, one can hypothesize a pharmacogenomic susceptibility for anti VEGFR efficacy on cancer development. The minor allele of rs4416670 is associated with a diminution of plasma VEGF levels and the SNP is responsible for 1.5% of the genetic variance of plasma VEGF⁶. Relatively, the major allele is responsible for the VEGF plasma level increase and lower PP.

Moreover, a study from Minardi D. et al ⁵⁷ suggested a potential use of tumor cell VEGF expression as a prognostic marker for distant metastasis free survival and overall survival for response to sunitinib in patients with metastatic clear renal cell carcinoma. However, VEGF plasma level did not appear promising as a marker of response to therapy. Tumor cell expression of VEGF might be genetically inherited as its plasma levels, and so the hypothesis that VEGF genomic information could interfere in anti VEGFR treatments of cancers should be seriously investigated on the basis of our results. This will aid in the choice of patient treatment and/or treatment dose in future pharmacogenomics approaches.

Conclusion

In the present study, we highlighted the association of 3 VEGF-related GWAS identified polymorphisms, directly and through epistatic interactions, with BP regulation in two healthy populations. Significant associations and gene \times gene interactions observed for PP levels demonstrate a complex role of angiogenesis in BP regulation. Our findings support the existence of relationships between the VEGF with BP in healthy state conditions. The understanding of these associations may promote the knowledge of the molecular mechanisms and the processes that mediate BP regulation and provide some perspectives for clinical use of these genetic associations in the response of cancer treatment with anti-VEGF agents.

Acknowledgments

Samples and data used for this study are part of the Biological Resources Center (BRC): “Interactions Gène-Environnement en Physiopathologie Cardio-Vasculaire” (IGE-PCV) in Nancy, France. The study was supported by the BioIntelligence Project.

References

1. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995; **1**(1): 27-31.
2. Maharaj AS, D'Amore PA. Roles for VEGF in the adult. *Microvasc Res* 2007; **74**(2-3): 100-113.
3. Kappers MH, van Esch JH, Sleijfer S, Danser AH, van den Meiracker AH. Cardiovascular and renal toxicity during angiogenesis inhibition: clinical and mechanistic aspects. *J Hypertens* 2009; **27**(12): 2297-2309.
4. Berrahmoune H, Herbeth B, Lamont JV, Masson C, Fitzgerald PS, Visvikis-Siest S. Heritability for plasma VEGF concentration in the Stanislas family study. *Ann Hum Genet* 2007; **71**(Pt 1): 54-63.
5. Lieb W, Safa R, Benjamin EJ, Xanthakis V, Yin X, Sullivan LM *et al.* Vascular endothelial growth factor, its soluble receptor, and hepatocyte growth factor: clinical and genetic correlates and association with vascular function. *Eur Heart J* 2009; **30**(9): 1121-1127.
6. Debette S*, Visvikis-Siest S*, Chen MH, Ndiaye NC, Song C, Destefano A *et al.* Identification of cis- and trans-acting genetic variants explaining up to half the variation in circulating vascular endothelial growth factor levels. *Circ Res* 2011; **109**(5): 554-563.*co-first authors
7. Azimi-Nezhad M, Stathopoulou MG, Bonnefond A, Rancier M, Saleh A, Lamont J *et al.* Associations of vascular endothelial growth factor (VEGF) with adhesion and inflammation molecules in a healthy population. *Cytokine* 2013; **61**(2): 602-607.
8. Stathopoulou MG, Bonnefond A, Ndiaye NC, Azimi-Nezhad M, El Shamieh S, Saleh A *et al.* A common variant highly associated with plasma VEGFA levels also contributes to the variation of both LDL-C and HDL-C. *J Lipid Res* 2013; **54**(2): 535-541.
9. Lifton RP, Gharavi AG, Geller DS. Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell* 2001; **104**(4): 545-556.
10. WHO. A global brief on hypertension. *World Health Organisation* 2013; **WHO/DCO/WHO/2013.2**.
11. Vasan RS, Larson MG, Leip EP, Evans JC, O'Donnell CJ, Kannel WB *et al.* Impact of high-normal blood pressure on the risk of cardiovascular disease. *N Engl J Med* 2001; **345**(18): 1291-1297.
12. Kunes J, Zicha J. Developmental windows and environment as important factors in the expression of genetic information: a cardiovascular physiologist's view. *Clin Sci (Lond)* 2006; **111**(5): 295-305.
13. Timberlake DS, O'Connor DT, Parmer RJ. Molecular genetics of essential hypertension: recent results and emerging strategies. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2001; **10**(1): 71-79.
14. Kunes J, Zicha J. The interaction of genetic and environmental factors in the etiology of hypertension. *Physiol Res* 2009; **58 Suppl 2**: S33-41.
15. Franks PW. Identifying genes for primary hypertension: methodological limitations and gene-environment interactions. *J Hum Hypertens* 2009; **23**(4): 227-237.
16. Visvikis-Siest S, Siest G. The STANISLAS Cohort: a 10-year follow-up of supposed healthy families. Gene-environment interactions, reference values and evaluation of biomarkers in prevention of cardiovascular diseases. *Clin Chem Lab Med* 2008; **46**(6): 733-747.
17. Siest G, Visvikis S, Herbeth B, Gueguen R, Vincent-Viry M, Sass C *et al.* Objectives, design and recruitment of a familial and longitudinal cohort for studying gene-environment interactions in the field of cardiovascular risk: the Stanislas cohort. *Clin Chem Lab Med* 1998; **36**(1): 35-42.
18. Ehrlich M, Bocker S, van den Boom D. Multiplexed discovery of sequence polymorphisms using base-specific cleavage and MALDI-TOF MS. *Nucleic Acids Res* 2005; **33**(4): e38.

19. Fitzgerald SP, Lamont JV, McConnell RI, Benchikh el O. Development of a high-throughput automated analyzer using biochip array technology. *Clin Chem* 2005; **51**(7): 1165-1176.
20. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D *et al*. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 2007; **81**(3): 559-575.
21. Whelton PK, He J, Appel LJ, Cutler JA, Havas S, Kotchen TA *et al*. Primary prevention of hypertension: clinical and public health advisory from The National High Blood Pressure Education Program. *JAMA* 2002; **288**(15): 1882-1888.
22. Ehret GB, Munroe PB, Rice KM, Bochud M, Johnson AD, Chasman DI *et al*. Genetic variants in novel pathways influence blood pressure and cardiovascular disease risk. *Nature* 2011; **478**(7367): 103-109.
23. Ndiaye NC, Azimi Nehzad M, El Shamieh S, Stathopoulou MG, Visvikis-Siest S. Cardiovascular diseases and genome-wide association studies. *Clin Chim Acta* 2011; **412**(19-20): 1697-1701.
24. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004; **25**(4): 581-611.
25. Yang R, Thomas GR, Bunting S, Ko A, Ferrara N, Keyt B *et al*. Effects of vascular endothelial growth factor on hemodynamics and cardiac performance. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996; **27**(6): 838-844.
26. Horowitz JR, Rivard A, van der Zee R, Hariawala M, Sheriff DD, Esakof DD *et al*. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor produces nitric oxide-dependent hypotension. Evidence for a maintenance role in quiescent adult endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; **17**(11): 2793-2800.
27. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M *et al*. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996; **380**(6573): 435-439.
28. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS *et al*. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996; **380**(6573): 439-442.
29. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML *et al*. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 1995; **376**(6535): 62-66.
30. Kim M, Park HJ, Seol JW, Jang JY, Cho YS, Kim KR *et al*. VEGF-A regulated by progesterone governs uterine angiogenesis and vascular remodelling during pregnancy. *EMBO Mol Med* 2013; **5**(9): 1415-1430.
31. Crawford TN, Alfaro DV, 3rd, Kerrison JB, Jablon EP. Diabetic retinopathy and angiogenesis. *Curr Diabetes Rev* 2009; **5**(1): 8-13.
32. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; **161**(2): 851-858.
33. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992; **359**(6398): 843-845.
34. Solomon SD, Lindsley K, Vedula SS, Krzystolik MG, Hawkins BS. Anti-vascular endothelial growth factor for neovascular age-related macular degeneration. *Cochrane Database Syst Rev* 2014; **8**: CD005139.
35. Escudier B, Pluzanska A, Koralewski P, Ravaud A, Bracarda S, Szczylik C *et al*. Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. *Lancet* 2007; **370**(9605): 2103-2111.

36. Flaherty KT, Rosen MA, Heitjan DF, Gallagher ML, Schwartz B, Schnall MD *et al.* Pilot study of DCE-MRI to predict progression-free survival with sorafenib therapy in renal cell carcinoma. *Cancer Biol Ther* 2008; **7**(4): 496-501.
37. Heng DY, Xie W, Regan MM, Warren MA, Golshayan AR, Sahi C *et al.* Prognostic factors for overall survival in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with vascular endothelial growth factor-targeted agents: results from a large, multicenter study. *J Clin Oncol* 2009; **27**(34): 5794-5799.
38. Tsavachidou-Fenner D, Tannir N, Tamboli P, Liu W, Petillo D, Teh B *et al.* Gene and protein expression markers of response to combined antiangiogenic and epidermal growth factor targeted therapy in renal cell carcinoma. *Ann Oncol* 2010; **21**(8): 1599-1606.
39. Emmanouilides C, Pegram M, Robinson R, Hecht R, Kabbinavar F, Isacoff W. Anti-VEGF antibody bevacizumab (Avastin) with 5FU/LV as third line treatment for colorectal cancer. *Tech Coloproctol* 2004; **8 Suppl 1**: s50-52.
40. Jayson GC, Mulatero C, Ranson M, Zweit J, Jackson A, Broughton L *et al.* Phase I investigation of recombinant anti-human vascular endothelial growth factor antibody in patients with advanced cancer. *Eur J Cancer* 2005; **41**(4): 555-563.
41. Kabbinavar FF, Hambleton J, Mass RD, Hurwitz HI, Bergsland E, Sarkar S. Combined analysis of efficacy: the addition of bevacizumab to fluorouracil/leucovorin improves survival for patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2005; **23**(16): 3706-3712.
42. Dutton SJ, Ferry DR, Blazeby JM, Abbas H, Dahle-Smith A, Mansoor W *et al.* Gefitinib for oesophageal cancer progressing after chemotherapy (COG): a phase 3, multicentre, double-blind, placebo-controlled randomised trial. *Lancet Oncol* 2014; **15**(8): 894-904.
43. Fuchs CS, Tomasek J, Yong CJ, Dumitru F, Passalacqua R, Goswami C *et al.* Ramucirumab monotherapy for previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (REGARD): an international, randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2014; **383**(9911): 31-39.
44. Gilbert MR, Dignam JJ, Armstrong TS, Wefel JS, Blumenthal DT, Vogelbaum MA *et al.* A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med* 2014; **370**(8): 699-708.
45. Gold PJ, Goldman B, Iqbal S, Leichman LP, Zhang W, Lenz HJ *et al.* Cetuximab as second-line therapy in patients with metastatic esophageal adenocarcinoma: a phase II Southwest Oncology Group Study (S0415). *J Thorac Oncol* 2010; **5**(9): 1472-1476.
46. Wiestler B, Radbruch A, Osswald M, Combs SE, Jungk C, Winkler F *et al.* Towards optimizing the sequence of bevacizumab and nitrosoureas in recurrent malignant glioma. *J Neurooncol* 2014; **117**(1): 85-92.
47. Ahn JS, Lee KH, Sun JM, Park K, Kang ES, Cho EK *et al.* A randomized, phase II study of vandetanib maintenance for advanced or metastatic non-small-cell lung cancer following first-line platinum-doublet chemotherapy. *Lung Cancer* 2013; **82**(3): 455-460.
48. Berruti A, Fazio N, Ferrero A, Brizzi MP, Volante M, Nobili E *et al.* Bevacizumab plus octreotide and metronomic capecitabine in patients with metastatic well-to-moderately differentiated neuroendocrine tumors: the XELBEVOCT study. *BMC Cancer* 2014; **14**: 184.
49. Corrie PG, Marshall A, Dunn JA, Middleton MR, Nathan PD, Gore M *et al.* Adjuvant bevacizumab in patients with melanoma at high risk of recurrence (AVAST-M): preplanned interim results from a multicentre, open-label, randomised controlled phase 3 study. *Lancet Oncol* 2014; **15**(6): 620-630.
50. Mahalingam D, Malik L, Beeram M, Rodon J, Sankhala K, Mita A *et al.* Phase II study evaluating the efficacy, safety, and pharmacodynamic correlative study of dual antiangiogenic inhibition using bevacizumab in combination with sorafenib in patients with advanced malignant melanoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 2014; **74**(1): 77-84.

51. Penson RT, Moore KM, Fleming GF, Braly P, Schimp V, Nguyen H *et al.* A phase II study of ramucirumab (IMC-1121B) in the treatment of persistent or recurrent epithelial ovarian, fallopian tube or primary peritoneal carcinoma. *Gynecol Oncol* 2014; **134**(3): 478-485.
52. Schilder RJ, Sill MW, Lankes HA, Gold MA, Mannel RS, Modesitt SC *et al.* A phase II evaluation of motesanib (AMG 706) in the treatment of persistent or recurrent ovarian, fallopian tube and primary peritoneal carcinomas: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 2013; **129**(1): 86-91.
53. Tamiya M, Tamiya A, Yamadori T, Nakao K, Asami K, Yasue T *et al.* Phase2 study of bevacizumab with carboplatin-paclitaxel for non-small cell lung cancer with malignant pleural effusion. *Med Oncol* 2013; **30**(3): 676.
54. Yap TA, Arkenau HT, Camidge DR, George S, Serkova NJ, Gwyther SJ *et al.* First-in-human phase I trial of two schedules of OSI-930, a novel multikinase inhibitor, incorporating translational proof-of-mechanism studies. *Clin Cancer Res* 2013; **19**(4): 909-919.
55. Milan A, Puglisi E, Ferrari L, Bruno G, Losano I, Veglio F. Arterial hypertension and cancer. *Int J Cancer* 2014; **134**(10): 2269-2277.
56. Rautiola J, Donskov F, Peltola K, Joensuu H, Bono P. Sunitinib-induced hypertension, neutropenia and thrombocytopenia as predictors of good prognosis in metastatic renal cell carcinoma patients. *BJU Int* 2014.
57. Minardi D, Lucarini G, Santoni M, Mazzucchelli R, Burattini L, Pistelli M *et al.* VEGF expression and response to sunitinib in patients with metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Anticancer Res* 2013; **33**(11): 5017-5022.

Table 1 Characteristics of the study populations (discovery n = 403, replication n=380).

Variable	Discovery		Replication	
	Mean	SD	Mean	SD
Age (years)	44.4	4.8	43.4	11.2
Gender (%) male	50.4		48.8	
Body mass index (kg/m ²)	24.9	3.9	27.2	4.9
Systolic Blood Pressure (mmHg)	123.3	13.8	127.8	19.5
Diastolic Blood Pressure (mmHg)	73.9	10.1	83.1	10.8
Pulse pressure (mmHg)	49.3	8.7	44.8	14.0

Mean values for continuous variables and percentages for categorical variables
SD standard deviation

Table 2 Characteristics of the studied single nucleotide polymorphisms (SNPs)

Chromosome	SNPs	Minor allele	Common allele	Closed to/on gene	MAF discovery	MAF replication
9	rs10738760	A	G	<i>VLDLR</i> and <i>KCNV2</i>	0.49	0.45
6	rs4416670	C	T	<i>MGC45491</i> and <i>MRPL14</i> (near <i>VEGF</i>)	0.47	0.46
8	rs6993770	T	A	<i>ZFPM2</i>	0.28	0.30
6	rs6921438	A	G	<i>MGC45491</i> and <i>MRPL14</i> (near <i>VEGF</i>)	0.40	0.33

KCNV2: potassium channel, subfamily V, MAF: Minor allele Frequency, SNP: single nucleotide polymorphism, VLDLR: very low density lipoprotein receptor, , member 2. MGC: Ancient (alternative) acronym of C6orf223 (chromosome 6 open reading frame 223), MRPL14: mitochondrial ribosomal protein L14, ZFPM: zinc finger protein, multitype 2.

Association of Vascular Endothelial Growth Factor Trans- and Cis-acting Genetic Variants with Metabolic Syndrome

Mohsen Azimi-Nezhad, PhD^{1,2,3*}, Maria G. Stathopoulou, PhD^{1*}, Helena Murray, PhD⁴, Seyed-Reza Mirhafez³, Ndeye Coumba Ndiaye, PhD¹, **Abdelsalam Saleh**, MSc¹, Marc Rancier, MD¹, Abdollah Bahrami, MD⁵, Abdoreza Varasteh, PhD⁶, Amelie Bonnefond, PhD¹, Christine Masson, BSc¹, Bernard Herbeth, PhD¹, John Lamont, PhD⁴, Peter Fitzgerald, PhD⁴, Majid Chayour-Mobarhan, PhD^{3,¶}, Sophie Visvikis-Siest, PhD^{1,¶}

¹UMR INSERM U 1122, IGE-PCV “ Interactions Gène-Environnement en Physiopathologie CardioVasculaire ”, Université de Lorraine , Nancy, F-54000, France, ² Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran, ³ Department of New Sciences and Technology (Molecular Medicine), Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran, ⁴ Randox Laboratories, Crumlin, United Kingdom, ⁵ Department of Internal Medicine, Imam-Reza Hospital, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran, ⁶ Immuno-biochemistry Lab, Allergy Research Center, Mashhad University of Medical Sciences Mashhad, Iran

* Equal first authors, [¶]Equal last authors

To whom correspondence should be addressed: Dr. Sophie Visvikis-Siest, UMR INSERM U 1122, IGE-PCV “ Interactions Gène-Environnement en Physiopathologie CardioVasculaire ”,

Université de Lorraine, 30 Rue lionnois, F-54000 Nancy, France, Tel: +33(0)6.07.60.25.69; fax: +33(0)3.83.32.13.22; E-mail: Sophie.Visvikis-Siest@inserm.fr

Abbreviations:

MetS, metabolic syndrome; VEGF, vascular endothelial growth factor; CVDs, cardiovascular diseases; SNPs, single nucleotide polymorphisms; GWAS, genome-wide association study; WC, waist circumference; BMI, body mass index; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; IDF, International Diabetes Federation; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; VLDLR, very low-density lipoprotein receptor; KCNV2, potassium voltage-gated channel subfamily V, member 2; LDLR, low density lipoprotein receptor; Kv, Voltage-gated potassium.

Word count: 2805

Tables: 3

References: 40

ABSTRACT

Background: Our aim was to investigate the possible effects of vascular endothelial growth factor (VEGF¹) and four VEGF-associated genetic variants, which explain ~50% of VEGF circulating levels variability, on metabolic syndrome and on its related components in supposed healthy populations.

Materials and methods: We examined the associations of rs6921438, rs4416670, rs6993770, rs10738760 with metabolic syndrome and its related components in a discovery (n=403) and a replication population (n=357) followed by a meta-analysis. Metabolic syndrome was defined according to the International Diabetes Federation criteria.

Results In the discovery population, we found an association between rs10738760 with metabolic syndrome ($P=0.010$, OR = 0.47). In the replication sample, we observed a significant association between rs6993770 and metabolic syndrome ($P=0.028$, OR = 1.50), while the meta-analysis of the two studies confirmed the significant protective effect of rs10738760 ($P_{overall}=0.032$, OR = 0.73).

Conclusions: The association of the VEGF regulatory genetic variant rs10738760 with metabolic syndrome suggests a direct effect of VEGF-related genetic variants on metabolic syndrome and might lead us to propose a possible protective role of this variant. Further research is needed to determine the possible molecular mechanisms of function of these associations as well as their possible effects on other cardiovascular risk factors, in order to establish this polymorphism as a metabolic syndrome and cardiovascular disease biomarker.

Key words: Metabolic syndrome; vascular endothelial growth factor (VEGF); genetic polymorphisms; angiogenesis; cardiovascular disease.

INTRODUCTION

Metabolic syndrome (MetS) refers to a cluster of metabolic risk factors linked with impaired angiogenesis and narrowly associated with insulin resistance (1). In its advanced form, clinical fasting hyperglycemia or even type 2 diabetes is present (2). The syndrome has been broadened to encompass features as central obesity, glucose abnormalities, dyslipidemia, elevated blood pressure, and low grade inflammation state with a pro-thrombotic circumstance (3). The prevalence of MetS, mainly due to emerging “obesity epidemic”, varies between 35-40% of adults in developed countries (4). In circumstances of metabolic burden such as obesity and diabetes mellitus, coordinated regulation between oxygen supply and consumption has been reported to be interrupted and subsequently cause tissue hypoxia (5). The risk for atherosclerotic cardiovascular disease (CVDs) and type 2 diabetes is approximately doubled and fivefold respectively in patients with MetS (6). It is noteworthy that several studies have revealed that ischemic tissues neovascularization is impaired in type 2 diabetes with obesity, hypercholesterolemia, or hypertension (1, 7).

Vascular endothelial growth factor (VEGF), as a multifunctional cytokine, has distinguished functions in angiogenesis, lymphangiogenesis, vascular permeability, and hematopoiesis (8). Adipocytes produce VEGF, which may act as an angiogenic and vascular survival factor for the omental vasculature (9).

Elevated circulating levels of VEGF have been observed in ischemic heart disease, heart failure and stroke and in various other disorders such as type 2 diabetes and polycystic ovary disease. Recent evidence indicates that VEGF could be an adaptive response to obesity induced hypoxia (10). However, the implication of VEGF on MetS is not extensively studied (1, 10, 11). Few

recent publications have shown a positive association of VEGF circulating levels with MetS as well as with a number of its components (11, 12).

Furthermore, genetic variants have been shown to be associated with MetS and its components (13-15). We have recently identified four single nucleotide polymorphisms (SNPs) (rs6921438, rs4416670, rs6993770, rs10738760) explaining ~50% of VEGF variability using a genome-wide association study (GWAS) (16). As a relationship between VEGF and MetS has been previously reported, these SNPs could be considered as candidate genes for MetS and its components as well. Therefore, in the present study, we aimed to assess the possible associations of MetS and its related components with VEGF plasma levels and with its *cis*- and *trans*-genetic variants recently identified, in two supposed healthy populations (discovery and replication). In addition, components of MetS including waist circumference (WC), central obesity and fasting plasma glucose, and a number of linked factors to cardiovascular diseases such as waist to hip ratio and waist to height ratio were also tested.

MATERIALS AND METHODS

Discovery population

The STANISLAS Family study is a 10-year longitudinal survey involving 1,006 volunteer families from Vandoeuvre-lès-Nancy (in the east of France) (17). Individuals with known acute or chronic diseases such as stroke, myocardial infarctions, hypertension, dyslipidemia or cancer were not included, as the aim of the study was the assessment of genetic susceptibility factors on the variability of intermediate phenotypes in physiological conditions without the influence of any long term medication and disease. The study protocol was approved by the Local Ethics Committee of Nancy and all subjects gave written informed consent for their participation in the

study. A total of 403 unrelated adults were involved in the current study. All data were collected during the second examination of the study.

Replication population

The MASHAD study is a prospective study for cardiovascular risk factors conducted by the Mashhad University of Medical Sciences (in north east of Iran). Individuals with recognized acute or chronic diseases such as stroke, myocardial infarctions, history of major systemic inflammation or infection diseases, history of endocrinological abnormalities, congestive heart disease, liver and/or renal disease, or cancer were excluded. All participants (n=357) provided written informed consent for their participation in the study. Mashhad University of Medical Sciences ethics committee approved the study procedure. All data were collected during the first visit of the MASHAD study. Both studies complied with the World Medical Association Declaration of Helsinki regarding ethical conduct of research involving human subjects.

Anthropometric indices, medical history and lifestyle data

Weight and height were measured in standing position with light clothing without shoes. Weight was recorded with digital scales to the nearest 200 grams using a weight scale. Height was measured to the nearest 0.1 cm using wall-mounted stadiometer, with the subjects' shoulders in a normal position. Body mass index (BMI) was calculated according to the Quetelet's formula: weight (kg)/height (m²). Waist circumference was taken at the midpoint between the lower margin of the last palpable rib and the top of the iliac crest (hip bone), and hip circumference was measured at the maximum level over light clothing, using a standard tape measure, without any pressure on the body surface. Measurements were recorded to the nearest 0.1 cm. All measurements were taken by trained nurses according to standard procedures, and the reliability

of the measuring devices was periodically checked during the study period. Systolic and diastolic blood pressure (SBP and DBP) were calculated as the mean of three measurements taken under standardized conditions with a sphygmomanometer, with the subject in a supine position (18). Pulse pressure was calculated as the difference between SBP and DBP. Also, data were collected using standard questionnaire including information about lifestyle such as smoking and personal medical history. Central obesity was defined as a WC >102 cm in men and >90 cm in women (18).

MetS was defined based on the International Diabetes Federation (IDF) criteria (19). IDF definition: WC \geq 94 cm in men or \geq 80 cm in women plus any two of the four following criteria (1) triglyceride \geq 1.7 mmol/l or drug treatment for elevated triglyceride, (2) high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) < 1.03 mmol/l in men or <1.3 in women or having medication for reduced HDL-C, (3) SBP \geq 130 mmHg or DBP \geq 85 mmHg or anti-hypertensive medication, (4) fasting blood glucose \geq 5.6 mmol/l or drug treatment for increased serum glucose.

Laboratory measurements

Blood samples were collected after overnight fast between 8:00 and 9:00 am. Serum and plasma samples were separated by centrifugation at 2000 \times g for 15 min. Serum fasting blood glucose, total cholesterol and triglycerides levels were measured using standard enzymatic methods (Merck, Germany) on an automated analyzer AU5021 (Olympus, Japan). Insulin, apolipoprotein A-I, apolipoprotein B, apolipoprotein CIII were determined by immunonephelometry on Behring Nephelometer analyzed with Behring reagents (France). Apolipoprotein E and HDL-C were measured by turbidimetry and precipitation by phosphotungstate respectively, on a Cobas-Mira

analyzer (Roche). VEGF plasma levels quantification was performed by Randox Ltd (Crumlin, UK) using a biochip array analyser (Evidence ®) (17).

Genotyping

The SNPs rs6921438, rs4416670, rs6993770, rs10738760 were genotyped by Genoscreen (<http://genoscreen.fr>), using a Sequenom iPLEX Gold assay–Medium Throughput Genotyping Technology (20) in the STANISLAS cohort. For the replication population genotyping was performed by Randox Ltd (Crumlin, UK) (Evidence Investigator ®) using an assay based on a combination of multiplex PCR and biochip array hybridisation.

Statistical analysis

Continuous variables are presented as mean value \pm standard deviation and categorical variables are given in percentages. Hardy-Weinberg equilibrium was tested using the chi-square test. All continuous variables were log-transformed to normalize their distribution. For the SNPs associations analyses, an additive model was used. Results are presented using the minor allele as reference allele.

Logistic regression models adjusted for age, gender and BMI were used to test possible associations between VEGF-related SNPs and VEGF plasma levels with MetS. Similar models adjusted for age and gender were used for central obesity.

Concerning the quantitative traits including waist circumference, waist to hip ratio, waist to height ratio, fasting blood glucose, insulin and lipids, linear regression models adjusted for age, gender and BMI were applied for the assessment of possible effects of the VEGF-related SNPs.

Meta-analysis for MetS was performed with a fixed effect model.

All analyses were performed using PLINK 1.07 software (<http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink>) (21) and the SPSS statistical software version 16.0 (SPSS, Inc, Chicago, Illinois). Significance was assessed at a two-tailed $P=0.05$ level. The significant results of this study were compared to previous findings in the literature (previous GWAS) by imputation analyses using Plink. SNPs with a correlation coefficient $\geq 80\%$ were considered in linkage disequilibrium (LD). The GWAS investigator of HuGENavigator engine (22) and the NHGRI Catalog of published GWAS (<http://www.genome.gov/gwasstudies>) (23) were used in order to assess previous GWAS concerning blood lipid levels.

RESULTS

The general characteristics of the studied populations and polymorphisms are presented in tables 1 and 2 respectively. Significant differences in MetS between the French and the Iranian cohorts are similar to those previously described and discussed. Iranian population had high rates of hypertension, abdominal obesity, hypertriglyceridemia, and low high-density lipoprotein cholesterol(18). All polymorphisms were in agreement with Hardy-Weinberg equilibrium ($P>0.05$).

No statistically significant associations were observed between VEGF plasma levels and MetS as well as with its related components in STANISLAS population. Regarding the effect of the assessed variants, rs10738760 was significantly associated with MetS (table 3). The presence of the minor allele A of rs10738760 was associated with decreased risk for MetS (OR = 0.47). There was no association of this SNP with the components of MetS.

Concerning the effect of the assessed variants in the replication population, there was an association between rs6993770 and metabolic syndrome (table 3, OR = 1.5).

A meta-analysis of the two populations concerning the polymorphisms effect on MetS was performed and its results confirmed the significant protective effect of the minor allele A of the rs10738760 ($P=0.03$, $OR=0.73$).

Among three previous GWAS (13-15) performed on MetS and its related components, rs10738760, rs4416670 and rs6993770 were not included in the significant SNPs (genotyped or in LD with another SNP). Therefore, these are considered as the novel polymorphisms for MetS.

DISCUSSION

In this study, we examined the associations of MetS, its related components and some of linked factors to CVDs with VEGF levels and cis- and trans-acting VEGF-related genetic variants. We report a significant association of rs10738760 with MetS.

Epidemiological studies show that the visceral fat accumulation, the predominant driving force behind the MetS (2), is the most important determinant factor for VEGF circulating levels (9). Very recent evidence indicates that an increase in adipose tissue VEGF-induced angiogenesis is a protective phenomenon against obesity-induced hypoxia and, consequently, insulin resistance (10). In the present study, we did not obtain the significant statistical relationship between MetS (or its related components) and VEGF plasma levels observed by Lieb and colleagues (12). It appears that a number of differences between our and their populations such as sample size and obesity indices could explain these discrepancies. Tarantino and colleagues (24), in a case control study, found higher circulating VEGF levels in individuals with MetS compared to lean subjects. Plasma VEGF levels are augmented in individuals with hyperlipidemia and in obese type 2 diabetes patients with or without established atherosclerosis, and lipids as well as glucose lowering with either fluvastatin or fenofibrate and metformin results in a significant reduction of

VEGF levels (25, 26). Therefore, it is not clear whether the elevated VEGF levels are a deleterious factor or a physiologic/negative feedback response to prevent the progress of ischemia in metabolic linked ischemic status (27) as well as in MetS (1, 12).

The polymorphism rs10738760 was associated with MetS, with the minor allele showing a protective effect in the discovery cohort and in the meta-analysis of the discovery and replication populations. It is located on 9p24.2, and it is an intergenic SNP close to the very low-density lipoprotein receptor (*VLDLR*) and potassium voltage-gated channel subfamily V, member 2 (*KCNV2*) genes (16). Recently, we have reported that rs10738760 up-regulates and explains around 5% of variation of circulating VEGF (16). Furthermore, our ingenuity pathway analyses in the mentioned study found plausible biological links between VEGF and *VLDLR* gene in related loci. The *VLDLR* gene encodes a lipoprotein receptor that is a member of the low density lipoprotein receptor (LDLR) family and plays important roles in VLDL-triglyceride metabolism and the reelin signaling pathway (28). This receptor is expressed abundantly in adipose tissue, skeletal muscle and heart, which all participate actively in lipid metabolism. The expression of *VLDLR* in macrophages and monocytes has been shown in human atherosclerotic lesions by Takahashi (29). As *VLDLR* knockout mice remained lean and did not show insulin resistance after high fat, high calorie diet (30), it seems that *VLDLR* may play a role in MetS. Based on an animal study, the knockout mice in *VLDLR* gene (*VLDLR*^{-/-}) showed improved survival and decreased infarct area after an induced myocardial infarction (31).

Voltage-gated potassium (Kv) channels represent the most complex class of voltage-gated ion channels from a both functional and structural point of view. Their diverse functions include regulating neurotransmitter release, heart rate, insulin secretion, neuronal excitability, epithelial electrolyte transport, smooth muscle contraction, and cell volume.

Kcnv2 encodes the voltage-gated potassium channel subunit Kv8.2, which also called Kv11.1 and RCD3B, and is a silent subunit when expressed as a homotetramer (32). However, when co-formed as a heterotetramer with Kv2 family members, Kv8.2 influences membrane translocation and biophysical properties of these channels (32). In other words, Kv8.2 and Kv2.1 form a heterotetramer which adapt the functions of Kv2 channels. Insulin secreting cells express mRNA transcripts for a number of Kv channels and Kv2.1 protein. The mRNA of Kv8.2 is strongly expressed in pancreas and testis (32). A growing body of evidences indicates that there is an impairment of coronary ion channels including Kv and Ca²⁺ channels in MetS which play an important role in the alterations of the control of coronary blood flow (33). The Kv2.1 has a negative regulatory effect on insulin secretion while its inhibition in mouse pancreatic beta cells enhances glucose-dependent insulin secretion (34). Furthermore VEGF has been shown to act as a survival factor for human pancreatic islets and improve their functions of insulin secretion (35). Cytosolic free Ca²⁺ rises in pancreatic beta-cells in response to glucose stimulation and is part of the coupling to insulin secretion (36). It has been shown that VEGF stimulates increase in cytosolic calcium concentration (37). Muoio and colleagues have well described that obese and insulin resistant individuals can remain in a state of beta cell compensation that protects them from diabetes for long periods of time before beta cell failure (38). Indeed, the onset of type 2 diabetes has been determined by the failure of compensatory response of beta cells for insulin resistance (35). Watada et al (35) in an animal study have proposed possible VEGF-induced compensatory beta cells activation, nevertheless they have not discussed how the proposed model may affect insulin secretion. So far, based on our knowledge, it seems that there is no evidence to precise the molecular pathways which explain the mechanism of VEGF-induced insulin secretion.

However, we have recently reported a lack of association between rs6921438 and rs10738760 and fasting glucose, fasting insulin, the risk of diabetes type 2, diabetic nephropathy and retinopathy (39). These results are also observed in the current study, where no association of the SNP or VEGF levels is shown for the MetS component traits related to glucose metabolism and central obesity. Concerning lipids metabolism traits, we have also previously shown the association of the VEGF-related SNP rs6921438 with LDL-C and HDL-C, but again the rs10738760 was not significantly associated with lipid phenotypes (40). This finding supports the results of the present study that the rs10738760 has a direct effect on MetS risk, which is independent from its related components. It is also a novel polymorphism associated with MetS risk as it has not been identified in previous GWAS on this field.

This is the first study that aimed to assess the common genetic determinants between VEGF and MetS. The results should be replicated in larger studies before making final conclusions. Furthermore, the mechanisms that explain the protective effect of rs10738760 are still to be determined in functional studies.

In conclusion, we have identified an unpublished protective role of one VEGF-related genetic variant on MetS risk in supposed healthy individuals. Given the complex actions of VEGF, the multifactorial nature of MetS, and the unexplained interconnections between them, the identification of a common variant with pleiotropic effect such as the rs10738760 could be useful as a marker of decreased risk (for both VEGF levels and MetS). It could also provide a novel research starting point for the assessment of the implicated mechanisms between angiogenesis and metabolic syndrome.

ACKNOWLEDGEMENTS

The study was funded by the “BioIntelligence” project. The funding source had no involvement in the study design; in the collection, analysis and interpretation data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication. We are deeply grateful for the cooperation of the families participating in the STANISLAS Cohort. We acknowledge the management, reception, preclinical, laboratory and medical staff of the Center for Preventive Medicine of Vandoeuvre-lès-Nancy (France). Data make part of the Biological Ressources Center (BRC), Interactions Gène-Environnement en Physiopathologie Cardio-Vasculaire (IGE-PCV). Also, we would like to express our profound thanks to Mashhad University of Medical Sciences for their cooperation and support.

CONFLICT OF INTEREST DECLARATION

None declared.

REFERENCES

- (1) Wada H, Satoh N, Kitaoka S, Ono K, Morimoto T, Kawamura T, et al. Soluble VEGF receptor-2 is increased in sera of subjects with metabolic syndrome in association with insulin resistance. *Atherosclerosis* 2010; 208:512-7.
- (2) Grundy SM. Metabolic syndrome: a multiplex cardiovascular risk factor. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2007; 92:399-404.
- (3) Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *The Lancet* 2005; 365:1415-28.
- (4) Osborn O, Olefsky JM. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nature medicine* 2012; 18:363-74.
- (5) Ochiai D, Goda N, Hishiki T, Kanai M, Senoo-Matsuda N, Soga T, et al. Disruption of HIF-1 α in hepatocytes impairs glucose metabolism in diet-induced obesity mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2011; 415:445-9.
- (6) Cornier M-A, Dabelea D, Hernandez TL, Lindstrom RC, Steig AJ, Stob NR, et al. The metabolic syndrome. *Endocrine reviews* 2008; 29:777-822.
- (7) van Weel V, de Vries M, Voshol PJ, Verloop RE, Eilers PH, van Hinsbergh VW, et al. Hypercholesterolemia reduces collateral artery growth more dominantly than hyperglycemia or insulin resistance in mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2006; 26:1383-90.
- (8) Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine reviews* 2004; 25:581-611.
- (9) Cao Y. Angiogenesis modulates adipogenesis and obesity. *Journal of clinical investigation* 2007; 117:2362-8.

- (10) Elias I, Franckhauser S, Ferré T, Vilà L, Tafuro S, Muñoz S, et al. Adipose tissue overexpression of vascular endothelial growth factor protects against diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2012; 61:1801-13.
- (11) Jialal I, Fadini GP, Pollock K, Devaraj S. Circulating levels of endothelial progenitor cell mobilizing factors in the metabolic syndrome. *The American journal of cardiology* 2010; 106:1606-8.
- (12) Lieb W, Safa R, Benjamin EJ, Xanthakis V, Yin X, Sullivan LM, et al. Vascular endothelial growth factor, its soluble receptor, and hepatocyte growth factor: clinical and genetic correlates and association with vascular function. *European heart journal* 2009; 30:1121-7.
- (13) Kraja AT, Vaidya D, Pankow JS, Goodarzi MO, Assimes TL, Kullo IJ, et al. A Bivariate Genome-Wide Approach to Metabolic Syndrome STAMPEED Consortium. *Diabetes* 2011; 60:1329-39.
- (14) Kristiansson K, Perola M, Tikkanen E, Kettunen J, Surakka I, Havulinna AS, et al. Genome-wide screen for metabolic syndrome susceptibility Loci reveals strong lipid gene contribution but no evidence for common genetic basis for clustering of metabolic syndrome traits. *Circulation: Cardiovascular Genetics* 2012; 5:242-9.
- (15) Zabaneh D, Balding DJ. A genome-wide association study of the metabolic syndrome in Indian Asian men. *PLoS One* 2010; 5:e11961.
- (16) Debette S, Visvikis-Siest S, Chen M-H, Ndiaye N-C, Song C, Destefano A, et al. Identification of cis-and trans-acting genetic variants explaining up to half the variation in circulating vascular endothelial growth factor levels. *Circulation research* 2011; 109:554-63.
- (17) Herbeth B, Samara A, Ndiaye C, Marteau J-B, Berrahmoune H, Siest G, et al. Metabolic syndrome-related composite factors over 5years in the STANISLAS Family Study:

Genetic heritability and common environmental influences. *Clinica Chimica Acta* 2010; 411:833-9.

(18) Azimi-Nezhad M, Herbeth B, Siest G, Dadé S, Ndiaye NC, Esmaily H, et al. High prevalence of metabolic syndrome in Iran in comparison with France: what are the components that explain this? *Metabolic syndrome and related disorders* 2012; 10:181-8.

(19) Alberti K, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome—a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabetic Medicine* 2006; 23:469-80.

(20) Ehrich M, Böcker S, van den Boom D. Multiplexed discovery of sequence polymorphisms using base-specific cleavage and MALDI-TOF MS. *Nucleic acids research* 2005; 33:e38-e.

(21) Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *The American Journal of Human Genetics* 2007; 81:559-75.

(22) Yu W, Gwinn M, Clyne M, Yesupriya A, Khoury MJ. A navigator for human genome epidemiology. *Nature genetics* 2008; 40:124-5.

(23) Hindorff LA, Sethupathy P, Junkins HA, Ramos EM, Mehta JP, Collins FS, et al. Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009; 106:9362-7.

(24) Tarantino G, Lobello R, Scopacasa F, Contaldo F, Pasanisi F, Cirillo M, et al. The contribution of omental adipose tissue to adipokine concentrations in patients with the metabolic syndrome. *Clinical & Investigative Medicine* 2007; 30:E192-E9.

(25) Blann AD, Belgore FM, Constans J, Conri C, Lip GY. Plasma vascular endothelial growth factor and its receptor Flt-1 in patients with hyperlipidemia and atherosclerosis and the

effects of *fluvastatin* or *fenofibrate*. *The American journal of cardiology* 2001; 87:1160-3.

(26) Ersoy C, Kiyici S, Budak F, Oral B, Guclu M, Duran C, et al. The effect of metformin treatment on VEGF and PAI-1 levels in obese type 2 diabetic patients. *Diabetes research and clinical practice* 2008; 81:56-60.

(27) Schiekofler S, Galasso G, Sato K, Kraus BJ, Walsh K. Impaired revascularization in a mouse model of type 2 diabetes is associated with dysregulation of a complex angiogenic-regulatory network. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2005; 25:1603-9.

(28) McIlroy SP, Vahidassr MD, Savage DA, Patterson CC, Lawson JT, Passmore AP. Risk of Alzheimer's disease is associated with a very low-density lipoprotein receptor genotype in northern Ireland. *American journal of medical genetics* 1999; 88:140-4.

(29) Takahashi S, Sakai J, Fujino T, Hattori H, Zenimaru Y, Suzuki J, et al. The very low-density lipoprotein (VLDL) receptor: characterization and functions as a peripheral lipoprotein receptor. *Journal of atherosclerosis and thrombosis* 2004; 11:200.

(30) Goudriaan JR, Tacke PJ, Dahlmans VE, Gijbels MJ, van Dijk KW, Havekes LM, et al. Protection from obesity in mice lacking the VLDL receptor. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2001; 21:1488-93.

(31) Perman JC, Boström P, Lindbom M, Lidberg U, StÅhlman M, Hägg D, et al. The VLDL receptor promotes lipotoxicity and increases mortality in mice following an acute myocardial infarction. *The Journal of clinical investigation* 2011; 121:2625.

(32) Ottschytsch N, Raes A, Van Hoorick D, Snyders DJ. Obligatory heterotetramerization of three previously uncharacterized Kv channel alpha-subunits identified in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:7986-91.

- (33) Berwick ZC, Dick GM, Moberly SP, Kohr MC, Sturek M, Tune JD. Contribution of voltage-dependent K^{+} channels to metabolic control of coronary blood flow. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2012; 52:912-9.
- (34) MacDonald PE, Sewing S, Wang J, Joseph JW, Smukler SR, Sakellaropoulos G, et al. Inhibition of $Kv2.1$ voltage-dependent K^{+} channels in pancreatic β -cells enhances glucose-dependent insulin secretion. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277:44938-45.
- (35) Watada H. Role of VEGF-A in pancreatic beta cells. *Endocrine journal* 2009; 57:185-91.
- (36) Foster RR, Hole R, Anderson K, Satchell SC, Coward RJ, Mathieson PW, et al. Functional evidence that vascular endothelial growth factor may act as an autocrine factor on human podocytes. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 2003; 284:F1263-F73.
- (37) Deeney J, Tornheim K, Korchak H, Prentki M, Corkey B. Acyl-CoA esters modulate intracellular Ca^{2+} handling by permeabilized clonal pancreatic beta-cells. *Journal of Biological Chemistry* 1992; 267:19840-5.
- (38) Muoio DM, Newgard CB. Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and β -cell failure in type 2 diabetes. *Nature reviews Molecular cell biology* 2008; 9:193-205.
- (39) Bonnefond A, Saulnier P-J, Stathopoulou MG, Grarup N, Ndiaye NC, Roussel R, et al. What is the contribution of two genetic variants regulating VEGF levels to type 2 diabetes risk and to microvascular complications? *PLoS One* 2013; 8:e55921.
- (40) Stathopoulou MG, Bonnefond A, Ndiaye NC, Azimi-Nezhad M, El Shamieh S, Saleh A, et al. A common variant highly associated with plasma VEGFA levels also contributes to the variation of both LDL-C and HDL-C. *Journal of lipid research* 2013; 54:535-41.

Table 1. Characteristics of the discovery and replication populations

Variable	Discovery population (n=403)		Replication population (n=357)	
	Mean	SD	Mean	SD
Age, years	44.460	4.885	51.11	7.64
Gender, % Male	50.40		30.00	
Female	49.60		70.00	
Metabolic Syndrome, %	10.40		40.50	
Smoking, % No	45.00		39.00	
Yes	25.40		58.00	
Ex-smoker	29.60		3.00	
Body mass index, Kg/m ²	24.90	3.88	29.64	4.47
Waist circumference, cm	82.43	11.02	98.84	10.59
Waist/Hip ratio	0.84	0.09	0.92	0.06-
Waist/Height ratio	48.96	5.85	62.27	7.40
Systolic blood pressure, mmHg	123.29	13.79	126.99	18.81
Diastolic blood pressure, mmHg	79.93	10.13	82.47	12.06
Pulse pressure, mmHg	49.35	8.75	44.56	12.26
Fasting blood glucose, mmol/l	5.03	0.68	5.09	2.25
Insulin, IU/ml	6.21	5.64	-	-
Triglycerides, mmol/l	1.34	1.96	1.88	0.88
Low-density lipoprotein-C, mmol/l	3.56	0.90	3.08	0.95
High-density lipoprotein-C, mmol/l	1.61	0.46	1.05	0.23

mmol/l				
Total cholesterol, mmol/l	5.74	1.00	5.04	2.25
Apolipoprotein A1, g/l	1.63	0.26	-	-
Apolipoprotein B, g/l	1.01	0.23	-	-
Apolipoprotein E, mg/l	41.82	17.57	-	-
Apolipoprotein CIII, mg/l	98.33	37.19	-	-
Vascular endothelial growth factor, ng/l	42.75	43.33	-	-

The Kolmogorov–Smirnov test was performed for [normality](#) determination of the variables distribution in replication population. Based on that total cholesterol, HDL-C, LDL-C and hip circumference had a normal distribution.

Table 2. Genetic variants' characteristics of the discovery and replication populations

Chromosome	SNP	Function	Closed to/on gene	Minor allele		Minor allele frequency	
				discovery	replication	discovery	replication
6	rs6921438	Intergenic	MGC45491 and MRPL14 (near VEGF)	A	A	0.445	0.404
6	rs4416670	Intergenic	MGC45491 and MRPL14 (near VEGF)	C	C	0.476	0.484
8	rs6993770	Intronic	ZFPM2	T	T	0.283	0.318
9	rs10738760	Intergenic	between VLDLR and KCNV2	A	A	0.491	0.409

Table 3. Associations of the four VEGF single nucleotide polymorphisms with metabolic syndrome in the discovery and replication populations (model adjusted for age, gender and BMI)

	rs6921438		rs4416670		rs6993770		rs10738760	
	OR	<i>P</i>	OR	<i>P</i>	OR	<i>P</i>	OR	<i>P</i>
	(95% CI)		(95% CI)		(95% CI)		(95% CI) ^a	
Discovery population	1.36 (0.78-2.37)	0.272	0.75 (0.43-1.31)	0.320	0.79 (0.43-1.45)	0.454	0.47 (0.27-0.84)	0.010
Replication population	0.94 (0.67-1.30)	0.718	1.18 (0.85-1.62)	0.306	1.50 (1.04-2.16)	0.028	0.85 (0.61-1.17)	0.320

^a OR: Odds ratio, 95% CI: 95% confidence interval