



**HAL**  
open science

# Intérêt de la génomique du VEGF en endocrinologie clinique

Marc Robert Rancier

► **To cite this version:**

Marc Robert Rancier. Intérêt de la génomique du VEGF en endocrinologie clinique. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2015. Français. NNT: 2015LORR0054 . tel-01751643

**HAL Id: tel-01751643**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01751643>**

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](mailto: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.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: **Marc RANCIER**

**Intérêt de la génomique du VEGF  
en endocrinologie clinique**

Le 24 Mars 2015

Membres du jury:

<b>Rapporteurs :</b>	M. Vangelis E. MANOLOPOULOS	Professeur, Department of Clinical Pharmacology and Pharmacogenetics Unit, Academic General Hospital of Evros, Democritus University of Thrace Alexandroupolis, Alexandroupolis, Greece
	M. Ron HN. VAN SCHAİK	Professeur, European Specialist Laboratory Medicine, Department of Clinical Chemistry, University of Rotterdam, Netherlands
<b>Examineurs :</b>	M. Jean Louis MERLIN	PU-PH, Université de Lorraine, Faculté de Pharmacie, CRAN, Institut de Cancérologie de Lorraine, Vandoeuvre les Nancy, France
	M. Adrian LLERENA	Professeur, University of Extremadura, CICAB Clinical Research Centre, Badajoz, Spain
	M. Pierre Emmanuel MORANGE	PU-PH, Laboratoire d'hématologie, Hôpital de la Timone, Marseille, France
	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 ma famille*

*Doutez de tout et surtout de ce que je vais vous dire.*  
Siddhartha Gautama dit Buddha

## *Remerciements*

Tout d'abord je souhaiterais remercier mon épouse, Sarah WOZNIAK-RANCIER dont la confiance et la lucidité m'ont toujours été d'une très grande aide. Impossible de ne pas penser à mes 2 filles Annabelle et Charlotte dont les rires ont su amener la joie dans les moments de peine. Une pensée également pour mes parents, à qui je dois tant.

Je remercie mon père Georges RANCIER, l'exemple, tout simplement... ma mère Simone RANCIER pour son soutien et mon frère Cédric RANCIER qui est un géant sans le savoir. J'aimerais également adresser mes remerciements à Delphine CHARPENTIER pour ce qu'elle représente.

Je dois ensuite remercier ma directrice de thèse, le Dr. Sophie VISVIKIS-SIEST qui a invariablement maintenu le cap pendant les moments difficiles, quoi qu'il en coûte.

Je souhaiterais également remercier ma co-encadrante, le Dr. Maria STATHOPOULOU qui n'a pas hésité à sacrifier ses nuits de sommeil pour régler d'épineux problèmes.

Je tiens à remercier l'ensemble du personnel du laboratoire pour son accueil, sa gentillesse et son sens de la camaraderie.

Je remercie également les membres du jury qui auront sacrifié un temps précieux pour lire et critiquer ce travail.

Une dernière petite pensée pour le Pr. GUERCI, les Dr. CUNY père et fils pour le soutien indéfectible dont ils ont fait preuve au cours de ma courte vie professionnelle... Merci !!!

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 facteur vasculaire de la croissance endothélial A (VEGF-A) joue un rôle essentiel dans un grand nombre de processus physiologiques et pathologiques incluant les maladies cardiovasculaires, inflammatoires et cancéreuses. Ainsi, au cours de cette thèse, nous avons développé une *approche intégrée et de génomique fonctionnelle* sur le rôle du VEGF-A de manière à mieux rendre compte de la diversité des processus dans lesquels il est impliqué en ajoutant dans le panel des investigations des phénotypes autour des hormones thyroïdiennes, acteurs essentiels de la physiopathologie humaine.

L'*objectif final* de cette thèse était d'identifier des polymorphismes impliqués dans la variation plasmatique du VEGF-A et des produits de son expression protéique et génique utiles en médecine personnalisée. Pour ce faire des études sur des phénotypes intermédiaires comme les molécules d'adhésion et d'inflammation, le syndrome métabolique et les lipides communs aux pathologies précédemment citées ont été réalisées dans la cohorte STANISLAS, constituée de sujets sains, ainsi que dans d'autres populations de réplication de l'équipe. Des études dans une population pathologique, visant à explorer les liens avec les hormones thyroïdiennes et les thyroïdites ont été réalisées avec une population Tunisienne, 'cas-témoins', les patients étant traités pendant 6 mois pour une maladie de Graves ou de Hashimoto.

Nos *résultats principaux* sont au final les suivants :

1. Association de l'isoforme *VEGF-A<sub>145</sub>* avec les ARNm d'*ICAM-1*, de *sélectine L* et de *TNF- $\alpha$* .
2. Association entre les taux plasmatiques de VEGF-A et ceux d'*ICAM-1* et de *sélectine E*.
3. Interactions épistatiques entre les variants du *VEGF-A* pour les taux de *sélectine E*, de *TNF- $\alpha$* , d'*ICAM-1* et d'*IL-6*.
4. Association significative entre le rs4416670 et les niveaux de l'ARNm de la *sélectine-L*.
5. Association significative entre le rs10738760 et le risque de syndrome métabolique.
6. Association entre rs6921438 et HDL et LDL.
7. Interaction entre rs4416670 et hypertension pour la variation d'apolipoprotéine E.
8. Corrélation positive entre taux plasmatiques de VEGF-A et de FT4 chez les sujets contrôles.
9. Association négative entre FT4 plasmatique et VEGF-A<sub>145</sub> dans la population totale des patients avec thyroïdite et chez les contrôles.
10. Niveaux de VEGF-A<sub>165</sub> plus élevés chez les patients traités pour une maladie de Graves par rapport aux sujets contrôles.
11. Niveaux de VEGF-A<sub>165b</sub> plus élevés chez les patients traités pour une maladie de Hashimoto par rapport à ceux traités pour une maladie de Graves.
12. Niveaux de VEGF-A<sub>165b</sub> plus élevés chez tous les patients en hypothyroïdie après 6 mois de traitement par rapport à ceux en euthyroïdie.
13. Niveaux de VEGF-A<sub>189</sub> plus faibles chez tous les patients avec thyroïdite en comparaison avec les sujets contrôles.
14. Association entre les niveaux de VEGF-A<sub>145</sub> et le statut thyroïdien uniquement chez les patients traités pour une maladie de Hashimoto.
15. Association entre la positivité des anti-TPO et les taux de VEGF-A<sub>165</sub> dans la population totale des patients avec thyroïdite et chez les contrôles.
16. Association entre l'allèle A du rs10738760 et un sur-risque de maladie de Graves
17. Association du rs692148 (allèle A) avec un sur-risque de maladie de Graves.
18. Association de l'allèle T du rs4416770 avec un risque accru d'hyperthyroïdie indépendamment du diagnostic initial et du traitement des patients.

19. Association de l'allèle A du rs10738760 avec des taux circulants de FT3 dans la population totale des patients avec thyroïdite et contrôles.

*Cette thèse montre à travers ces nombreux résultats de médecine stratifiée l'implication centrale de la génomique du VEGF-A dans la régulation de processus physiologiques et pathologiques. La mise en évidence de son rôle dans la régulation des hormones thyroïdiennes pourrait qualifier le VEGF-A comme un nouveau dénominateur commun des maladies cardiovasculaires, inflammatoires et cancéreuses, à évaluer cliniquement.*

## Summary

The vascular endothelial growth factor (VEGF-A) plays a key role in a large variety of physiological and pathological processes, including cardiovascular and inflammatory diseases and cancer. Consequently, during this thesis, we have developed a *functional genomics and integrative approach* of the VEGF-A roles in order to better describe the diversity of the processes in which it is implicated by adding in the investigation panel phenotypes the thyroid hormones, which are essential in the human physiopathology.

The *final objective* of this work was to identify the VEGF-A plasma variability linked polymorphisms and the VEGF-A expression products useful for personalized medicine. Therefore, studies on common among diseases intermediate phenotypes such as adhesion, and inflammation molecules, metabolic syndrome and lipids have been conducted on the STANISLAS cohort (healthy volunteers), as well as on other replication-directed populations of the team. Studies in a pathological population aiming to investigate links with thyroid hormones and thyroiditis have been conducted in a Tunisian “case-control” population with cases treated for thyroiditis during 6 months.

Here are our *main results*:

1. Association between *VEGF-A*<sub>145</sub> and *ICAM-1*, *L-selectin* and *TNF- $\alpha$*  mRNA levels.
2. Association between plasma levels of VEGF-A and ICAM-1 and E-selectin.
3. Epistasis interactions between *VEGF-A* variants for E-selectin, *TNF- $\alpha$* , ICAM-1 and IL-6 plasma levels.
4. Association between rs4416670 and *L-selectin* mRNA levels.
5. Association between the rs10738760 and the risk for metabolic syndrome.
6. Association between rs6921438 and HDL and LDL plasma levels.
7. Interaction between rs4416670 and hypertension for plasma variation of apolipoprotein E.
8. Positive correlation between plasma levels of VEGF-A and FT4 in Tunisian controls.
9. Negative association between plasma FT4 levels and *VEGF-A*<sub>145</sub> levels in the entire Tunisian population (patients and controls).
10. Increase of *VEGF-A*<sub>165</sub> levels in Graves’ patients in comparison with controls.
11. Increase of *VEGF-A*<sub>165b</sub> levels in Hashimoto patients in comparison with Graves’ patients.
12. Increase of *VEGF-A*<sub>165b</sub> levels in hypothyroid patients in comparison with hyperthyroid patients after 6 months of treatment.
13. Decrease of *VEGF-A*<sub>189</sub> levels in all after 6 months of treatment thyroiditis patients in comparison with controls.
14. Association between *VEGF-A*<sub>145</sub> and thyroid status, only in Hashimoto patients.
15. Association between anti-TPO antibodies positivity and *VEGF-A*<sub>165</sub> in the entire Tunisian population (patients and controls).
16. Association between the A allele of rs10738760 and an increased risk of Graves’ disease.
17. Association of the A allele of rs692148 with an increased risk for Graves’ disease.
18. Association of the T allele of rs4416770 with a higher risk of hyperthyroidism regardless of the initial diagnosis and treatment of patients.
19. Association of A allele of rs10738760 with higher FT3 plasma levels in the entire Tunisian population (patients and controls).

*This thesis shows, through an important number of results of stratified medicine, the central implication of VEGF-A genomics in the regulation of physiological and pathological processes. The identification of its role in the regulation of thyroid hormones could highlight*



*the role of VEGF-A as a new common denominator of cardiovascular, inflammatory and oncological diseases that has to be clinically validated.*

### *Liste des abréviations*

AACE : American Association of Clinical Endocrinologists  
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire  
AMPK : Protéine kinase dépendante de l'adénosine monophosphate cyclique  
AP-1 : Activator protein-1  
ApoC : Apolipoprotéine C  
ApoE : Apolipoprotéine E  
ARN : Acide ribonucléique  
ATA : American Thyroid Association  
AVC : Accident vasculaire cérébral  
CRB : Centre de ressource Biologique  
EGIR: European Group for the Study of Insulin Resistance  
FGF : Fibroblastic growth factor  
GWAS : genome-wide association studies  
HDL : High Density Lipoprotein  
HIF : Hypoxia Inductible Factor  
HOMA : Homeostasis Model Assessment  
ICAM1 : Intercellular adhesion molécule 1  
IDF : International Diabetes Foundation  
IL : Interleukine  
IMC : Indice de Masse Corporelle  
IGE-PCV : Interaction Gene-Environnement en Pathologie CardioVasculaire  
LDL : Low-Density Lipoprotein  
MetS: Syndrome métabolique  
MCP-1 : Monocyte Chemoattractant Protein 1  
NCEP-ATPIII : National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III  
NFκB : Nuclear factor Kappa B  
NFAT : Nuclear factor activated T-cell  
OMS : Organisation Mondiale de la Santé  
PAD/S : Pression Artérielle Diastolique / Systolique  
PCR : Polymerase Chain Reaction  
Pb : Paire de bases

PBMC : Peripheral Blood Mononuclear cells

PIGF : Facteur de croissance placentaire

RBP4 : Retinol Binding Protein 4

SNP : Single Nuclear Polymorphism

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

T3 : Tri-iodothyronine

T4 : Tétr-iodothyronine

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

TG : Triglycérides

TGF : Transforming Growth Faactor

TNF : Tumor Necrosis Factor

TPO : Thyroperoxydase

TSH : Thyroid Stimulating Hormone

TSHR : Thyroid Stimulating Hormone Receptor

VCAM1 : Vascular Cell Adhesion Molecule 1

VEGF : Facteur de croissance l'endothélium vasculaire

VEGFR : Facteur de croissance l'endothélium vasculaire récepteur

# Table des matières

<b>Avant propos</b> .....	<b>14</b>
<b>Liste des publications</b> .....	<b>15</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>16</b>
<b>Angiogenèse</b> .....	<b>16</b>
<i>Le VEGF-A</i> .....	16
<i>Angiogenèse et pathologies multifactorielles</i> .....	18
Angiogenèse, VEGF-A et risque vasculaire .....	18
Hypertension artérielle.....	18
Inflammation.....	19
Dyslipidémies .....	20
Obésité .....	21
Diabète.....	24
Le syndrome métabolique.....	25
Autres facteurs de risques .....	27
VEGF-A et atteintes cardiovasculaires.....	28
Angiogenèse, VEGF-A et atteintes endocriniennes .....	30
Au niveau thyroïdien .....	30
Au niveau hypophysaire .....	31
Au niveau parathyroïdien.....	32
Au niveau utéro-ovarien .....	33
Au niveau surrénalien .....	33
Influence des hormones sur la production de VEGF-A .....	33
Angiogenèse, VEGF-A et atteintes oncologiques .....	34
Oncogenèse générale .....	34
Cas spécifique du cancer thyroïdien .....	36
<b>Médecine personnalisée</b> .....	<b>38</b>
L'avènement de nouvelles techniques et approches en médecine personnalisée .....	39
<b>Argumentaire, hypothèses de travail et objectifs</b> .....	<b>43</b>
<b>Matériel et méthodes</b> .....	<b>47</b>
<i>Populations</i> .....	47
La cohorte STANISLAS.....	47
La population ApoEurope.....	49
La population iranienne .....	49
La population tunisienne.....	50
<i>Mesures des molécules d'adhésion et d'inflammation (toutes les études)</i> .....	51
<i>Génotypage (pour toutes les études)</i> .....	51
<i>Transcriptomique</i> .....	52
Extraction des ARN totaux.....	52
Rétrotranscription des ARN totaux.....	53
<b>Résultats et discussion</b> .....	<b>63</b>
<i>Publication N°1</i> .....	63
<i>Publication N°2</i> .....	68
<i>Publication N°3</i> .....	72
<i>Publication N°4</i> .....	77
<i>Publication N°5</i> .....	84
<b>Discussion générale, conclusions et perspectives.</b> .....	<b>90</b>
<i>Discussion générale</i> .....	90
<i>Conclusion de la thèse</i> .....	93

<i>Perspectives</i> .....	94
<i>Conclusion générale</i> .....	102
<b>Références</b> .....	<b>104</b>
<b>Publications</b> .....	<b>126</b>

## Liste des figures

Figure 1 : Structure des principaux variants d'épissage du VEGF-A chez l'homme.....	17
Figure 2 : Panorama des technologies biologiques à haut débit mises en place entre 2007 - 2013. ....	39
Figure 3 : Evolution de la production scientifique en fonction du temps.....	40
Figure 4 : Evolution du coût du séquençage en fonction du temps.....	40
Figure 5 : Phases de recrutement de la cohorte STANISLAS.....	47
Figure 6 : Etapes de l'extraction des ARN totaux .....	53
Figure 7 : Courbe d'amplification d'un gène cible par PCR en temps réel .....	54
Figure 8: Mécanismes des phases de la PCR en temps réel avec la technologie SYBR Green .....	55
Figure 9: Courbe de fusion du gène amplifié par PCR en temps réel .....	57
Figure 10: Représentation schématique de la gamme étalon .....	59
Figure 11: Représentation schématique de la droite d'étalonnage moyenne.....	59
Figure 12 : Equation caractérisant la valeur de E en fonction de la pente et du logarithme....	60
Figure 13 : Interconnexion des différentes maladies centrées sur le métabolisme oxydatif et le VEGF-A.....	94
Figure 14 : paradoxe neuroendocrine .....	96
Figure 15 : Voies métaboliques induites par les dérivés réactifs de l'oxygène et les ions métalliques, d'après Valko et al. ....	98
Figure 16 : Les 3 étapes de la carcinogénèse induites par les ROS, d'après Valko et al. ....	99
Figure 17 : Interactions protéiques chez l'obèse, d'après Mendonça et al.....	100
Figure 18 : Interactions cellulaires chez l'obèse, d'après Mendonça et al. ....	101
Figure 19 : Impact du stress oxydatif dans la pathogénie des maladies métaboliques, inflammatoires, cardiovasculaires et oncologiques. ....	103

## *Liste des tables*

Table 1 : Les adipokines, leurs relations et leurs effets sur l'homéostasie du glucose.....	23
Table 2 : Critères d'identification du syndrome métabolique (MetS) et valeurs des définitions OMS, EGIR, NCEP, IDF et ACCE et AHA/NHLBI.....	26
Table 3 : Les hormones et leurs effets sur la sécrétion de VEGF-A.....	34
Table 4 : Caractéristiques des polymorphismes étudiés.....	51

## Avant propos

L'histoire des rapports entre l'angiogenèse et l'endocrinologie remonte à la naissance même de cette dernière. En effet, lorsque Charles-Edouard Brown Sequard (1817-1894) a utilisé le concept de « glande vasculaire » pour décrire les testicules (de chiens et de cobayes), on peut voir qu'il voulait insister sur la riche vascularisation de ces derniers, dont les extraits permettaient de redonner vigueur à des patients atteints d'hypogonadisme. Par la suite, Siegfried Oberndorfer (1876-1944) décrivait un nouveau type de tumeur particulièrement vasculaire. Il venait de caractériser la première tumeur carcinoïde. A ce titre nous pouvons rappeler que les tumeurs dites endocrines (anciennement appelées neuroendocrines) sont les tumeurs les plus vascularisées de la pathologie médicale, à égalité avec les paragangliomes et les phéochromocytomes.

L'endocrinologie est, parmi les disciplines médicales, celle imposant la plus grande diversité de compétence au praticien qui veut l'exercer. Ainsi un endocrinologue peut au sein de la même journée passer des troubles de la fertilité au diabète multicompliqué, en passant par la prise en charge d'une maladie de Basedow particulièrement vasculaire et par celle d'une tumeur endocrine métastatique. L'ensemble de ces maladies fait intervenir des phénomènes d'angiogenèse pathologique dans lesquelles le VEGF-A tient une place capitale. A l'heure actuelle, l'étude de la cybernétique des risques liés aux grandes pathologies chroniques émergentes (pathologies vasculaires, inflammatoires, métaboliques et oncologiques) n'en est qu'à ses balbutiements. Il n'en reste pas moins que le contexte économique actuel nous impose de bouleverser nos conceptions de ces maladies en raison de l'avènement des nouveaux outils de la génétique moderne post GWAS (études pangénomiques, genome-wide association studies). Cette nécessité constitue en elle-même l'acte de naissance de la médecine personnalisée et stratifiée.

Notre travail de thèse tente humblement d'apporter les éclairages suffisants par l'étude du VEGF-A pour implémenter des techniques de génomique aux pathologies chroniques.



## Liste des publications

### Articles originaux faisant partie de la thèse

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

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.

\* co-premiers auteurs

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

**Rancier M\***, Zaaber I\*, Stathopoulou MG, Saleh A, Marmouch H, Masson C, Murray H, Kurth MJ, Lamont J, Fitzgerald P, Mahjoub S, Said K, Bel Hadj Jrad Tensaout B, Mestiri S, Visvikis-Siest S. **New biomarkers in thyroiditis: VEGF 145, VEGF 189 and VEGF 165 (a and b) mRNAs** Manuscrit soumis: MOL CELL ENDOCRINOL.

\* co-premiers auteurs

Zaaber I\*, **Rancier M\***, Stathopoulou M, Saleh A, Marmouch H, Masson C, Murray H, Kurth MJ, Lamont J, Fitzgerald P, Mahjoub S, Said K, Bel Hadj Jrad Tensaout B, Mestiri S, Visvikis-Siest S. **Plasma VEGF- related polymorphisms are implied in autoimmune thyroid diseases.** Manuscrit soumis: Journal of Endocrinology.

\* co-premiers auteurs

### Articles de revue faisant partie de la thèse

**Rancier M**, Stathopoulou MG, Visvikis-Siest S. **VEGF/VEGFR in thyroid physiology and physiopathology.** Manuscrit soumis: Molecular Endocrinology.

## Introduction

### Angiogenèse

L'angiogenèse est un processus complexe qui conduit au développement et à la croissance de nouvelles structures vasculaires à partir du réseau vasculaire préexistant. 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 normales mais des anomalies de l'angiogenèse sont associées à diverses maladies, notamment les thyroidites [1]. L'angiogenèse est régulée par diverses molécules dont les cytokines, les facteurs de croissance, les prostaglandines et les enzymes protéolytiques tels que les protéines de la famille VEGF, les angiopoïétines, le TGF- $\alpha$  et - $\beta$  (transforming growth factor- $\alpha$  et - $\beta$ ), le PDGF (platelet-derived growth factor), les interleucines (IL), les chimiokines et des membres de la famille FGF (fibroblast growth factor) [2].

#### Le VEGF-A

Parmi les régulateurs de l'angiogenèse, 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 [3]. Il 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 (PIGF). Le gène du VEGF, qui est situé sur le bras court du chromosome 6, se compose de huit exons et donne quatre isoformes matures (VEGF-A<sub>121</sub>, VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF-A<sub>189</sub> et VEGF-A<sub>206</sub>) (Figure 1) [4]. La désignation numérique des isoformes protéiques désigne le nombre d'acides aminés dans la molécule. En outre, certaines isoformes moins fréquemment exprimées ont été identifiées (VEGF-A<sub>145</sub> et VEGF-A<sub>183</sub>) [5]. Le VEGF-A<sub>165</sub> est l'isoforme dominante, il est surexprimé dans une variété de tumeurs solides.

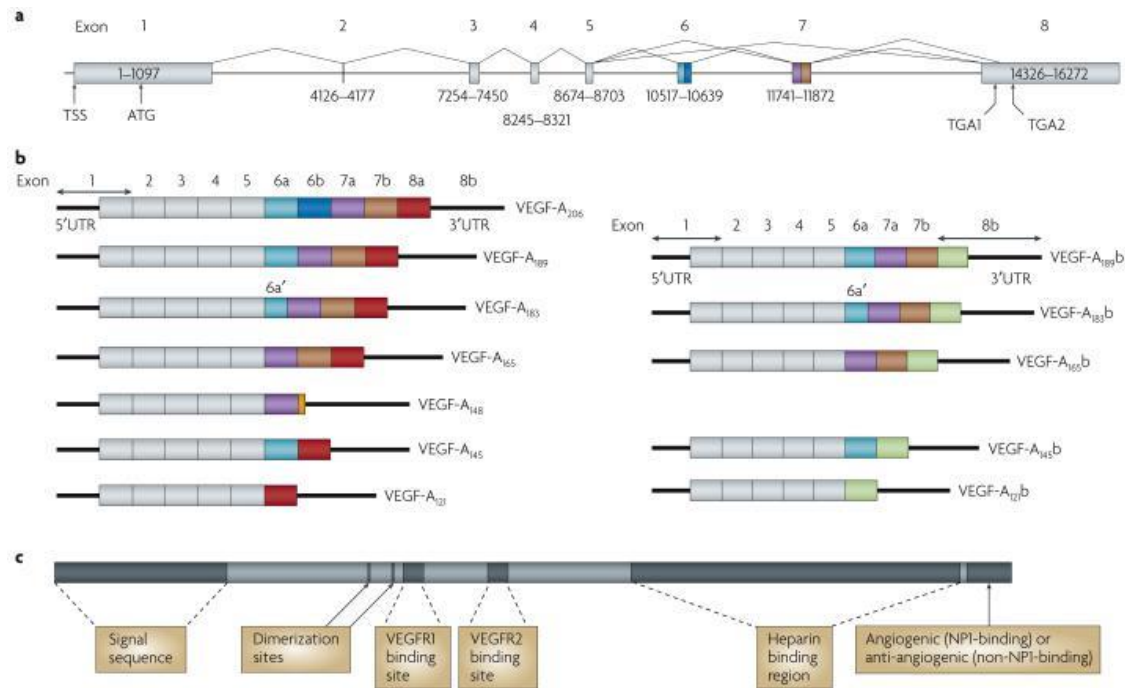


Figure 1 : Structure des principaux variants d'épissage du VEGF-A chez l'homme [6].

Plus de 12 isoformes du VEGF-A, regroupés dans deux familles principales, sont exprimés à partir du gène VEGF-A par épissage alternatif du pré-ARNm. La famille VEGF-A est le résultat de l'épissage au niveau des exons 6, 7 et du site d'épissage proximal de l'exon 8 (exon 8a), alors que les isoformes de la famille VEGFb présentent un site d'épissage distal différent pour l'exon 8 (exon 8b) qui est situé 6 pb en aval du site d'épissage proximal. Les isoformes du VEGF-A sont pro-angiogéniques tandis que les isoformes du VEGFb sont anti-angiogéniques. Dans un contexte normal chez l'adulte, les isoformes anti-angiogéniques sont exprimés dans des tissus non angiogéniques et représentent plus de 50 % de la quantité totale de protéine VEGF. À l'inverse, dans un contexte cancéreux, un retournement de situation est observé et les isoformes pro-angiogéniques sont désormais exprimés à la place des isoformes anti-angiogéniques, ce qui conduit à une néovascularisation et par conséquent au développement tumoral. Il a également été suggéré que le profil d'expression des isoformes des différents types de tumeurs pourrait influencer sur la réponse aux thérapies anti-VEGF [7]. Les fonctions du VEGF-A sont multiples, et sont exercées par l'intermédiaire de deux récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2 (vascular endothelial growth factor receptor 1 et 2). Elles incluent l'activation, la migration et la prolifération des cellules endothéliales (CE), la survie des CE (par la production de monoxyde d'azote (NO) par les CE) et la régulation de la perméabilité vasculaire, ce qui se traduit par l'angiogenèse et d'autres effets hémodynamiques

tels que qu'une extravasation accrue de cellules inflammatoires, une augmentation de la taille des vésicules et une production accrue de molécules antigéniques [8, 9].

### **Angiogenèse et pathologies multifactorielles**

Une angiogenèse insuffisante ou excédentaire est retrouvée dans un nombre important de maladies courantes bien que complexes, dont des maladies vasculaires comme les accidents vasculaires cérébraux (AVC), 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 [10-12]. Eu égard aux différences d'intérêt porté par la communauté scientifique aux thèmes successivement abordés, une asymétrie peut être constatée entre les différentes parties de cette introduction.

### **Angiogenèse, VEGF-A et risque vasculaire**

Le rôle précis de l'angiogenèse dans les phénomènes d'athérosclérose et les maladies cardiovasculaires reste à l'heure actuelle largement méconnu en dépit de l'intense recherche dont il fait l'objet. D'emblée, il est important de reconnaître le paradoxe fondamental de l'angiogenèse vis-à-vis des processus athéromateux. D'une part la néo-vascularisation est impliquée dans la croissance des lésions athéromateuses et constitue un facteur indéniable de déstabilisation de la plaque avant rupture, d'autre part l'angiogenèse apparaît comme un facteur protecteur vis à vis des maladies ischémiques à travers ses fonctions de protection et de régénération de l'arbre vasculaire [13].

Dans ce chapitre, nous allons détailler les rapports entre le VEGF-A et les principaux facteurs de risque cardiovasculaires unanimement reconnus. Le syndrome métabolique sera abordé en raison de son intérêt épidémiologique car il correspond à l'agrégation de plusieurs facteurs de risque, sans être un facteur de risque individualisé.

### ***Hypertension artérielle***

L'hypertension est caractérisée par une pression artérielle systolique  $>140$  mmHg et/ou une pression artérielle diastolique  $>90$  mmHg ; d'après le Joint National Committee de 2003 [14].

Elle constitue un des premiers facteurs de risque d'évènement cardiovasculaire majeur [15-18].

L'hypertension constitue un des principaux facteurs de risque des maladies cardiovasculaires. Son existence est la conséquence d'un dérèglement de l'homéostasie de la croissance vasculaire. Dans une étude datant de 2001, il apparaît que les taux plasmatiques de VEGF-A sont significativement augmentés chez les patients présentant une hypertension artérielle essentielle en comparaison avec de sujets normotendus. L'amélioration des chiffres tensionnels aboutit à une réduction de ces taux plasmatiques [13, 19]. Une étude a montré que les sujets atteints d'hypertension compliquée de rétinopathie ont des taux de VEGF plasmatiques supérieurs à ceux n'ayant pas de rétinopathie ainsi que les sujets normotendus [20]. Concernant les complications rénales, la présence d'une microalbuminurie signe la gravité d'une hypertension artérielle par l'intermédiaire de l'atteinte du filtre rénal qu'elle traduit. Cette anomalie serait due à un effet d'augmentation de la perméabilité glomérulaire induite directement par le VEGF-A [21]. Le VEGF semble en lui-même un indicateur des dysfonctions l'endothélium vasculaire [22].

Au niveau génétique, une étude réalisée chez 178 hypertendus (100 blancs et 78 noirs) et 186 contrôles sains concernant les polymorphismes -2578\*C/A, -1154\*G/A et 634\*G/C du gène du *VEGF-A* a permis de monter que :

- l'ethnie influait peu sur l'association entre HTA et VEGF-A. Cependant, l'haplotype C-A-G était plus fréquent chez les sujets sains blancs et l'haplotype C-A-C plus fréquents chez les sujets sains noirs.
- le caractère résistant de l'hypertension n'était pas discriminant.
- L'haplotype C-A-G était plus fréquent chez les sujets avec un taux sanguin de NOx élevés [23].

Par ailleurs, le taux de VEGF-A plasmatique est associé à la fonction ventriculaire droite en contexte d'hypertension artérielle pulmonaire [24], et même en contexte d'hypertension artérielle pulmonaire isolée [25].

Pour finir, les taux de VEGF-A circulants sont également associés à l'hypertension gravidique [26, 27]. Cette élévation est associée à un plus grand risque d'accouchement prématuré [28].

### *Inflammation*

Les processus inflammatoires se situent au cœur de nombreuses pathologies chroniques, comme les pathologies cardiovasculaires [29], l'asthme [30] ou la maladie d'Alzheimer [31].

Lors de l'inflammation, il y a augmentation des taux des protéines de la phase aiguë qui sont définies empiriquement comme des protéines dont la concentration plasmatique évolue au cours d'une réaction inflammatoire. La CRP est une protéine de la phase aiguë de la réaction inflammatoire [32] qui interagit avec les autres cytokines au niveau de l'endothélium et favorise le développement des plaques athéromateuses [33]. Les TNF $\alpha$  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 [34]. L'IL-6 est synthétisée par une grande variété de cellules parmi lesquelles les phagocytes mononucléaires qui représentent la source la plus importante [35]. Généralement, les taux d'IL-6 sont élevés dans la majorité des maladies inflammatoires chroniques [36-38]. Les changements dans le microenvironnement affectent les cellules endothéliales qui expriment les molécules d'adhésion (ICAM-1: molécules d'adhésion intercellulaire-1 [39], VCAM-1: molécules d'adhésion vasculaire-1 [40], sélectines L, E et P) [41]. D'autre part, ces molécules participent au développement de l'inflammation. En général, les molécules d'adhésion jouent un rôle important dans la physiopathologie des maladies cardio-vasculaires [42], néoplasiques [43], infectieuses [44].

Beaucoup de maladies chroniques avec des activations des processus inflammatoires immunitaires sont accompagnées par une incidence élevée de maladies cardiovasculaires.

L'obésité est associée à un effet terrain inflammatoire [45], prédisposant à des maladies comme la spondylarthrite ankylosante [46], polyarthrite inflammatoire [47, 48] et le rhumatisme psoriasique [49]. Cette inflammation peut également être associée à un asthme [50], des troubles rénaux [51] et éventuellement des thyroïdites [52]. Les molécules de l'inflammation sont associées à des taux augmentés de VEGF, mais les données actuelles restent imprécises en termes mécanistiques [53, 54].

### *Dyslipidémies*

Les dyslipidémies sont un facteur de risque majeur et indépendant [55-57].

In vitro, le HDL augmente les taux de HIF1 $\alpha$  et de VEGF-A à travers la régulation post-transcriptionnelle des produits de *HIF1* [58], tout en diminuant la voie liée aux protéines de l'inflammation comme le TNF $\alpha$  et la méthylmalonyl-CoA mutase [59]. En retour, le VEGF est un inhibiteur de la lipase endothéliale qui régule les taux de HDL [60].

Cliniquement, au sein d'une cohorte de 20 patients et de 40 sujets contrôles, les dyslipidémies

ont été associées à des taux accrus des VEGF-A plasmatiques [61]. Une autre étude constituée de femmes ménopausées recevant un traitement hormonal substitutif a montré que la diminution du taux de LDL était associée à une diminution du VEGF-A plasmatique [62]. Cependant l'utilisation elle-même d'oestrogènes équinés est également associée à une diminution des taux de VEGF-A [63]. Lors de l'étude autrichienne SAPHIR (Salzburg Atherosclerosis Prevention Program in Subjects at High Individual Risk) réalisée sur 909 sujets sains (511 hommes et 398 femmes), les taux de VEGF-A étaient, uniquement chez les femmes, négativement corrélés à ceux de LDL, cholestérol total et apolipoprotéine-B [64]. Dans une étude japonaise, les taux de VEGF étaient associés chez l'homme à ceux de HDL, en association à d'autres facteurs de risque cardiovasculaire ; Kimura a donc naturellement proposé à l'époque de faire du VEGF un marqueur global du risque vasculaire, et ce, particulièrement chez l'homme [65]. Récemment l'utilisation de statine à petites doses chez des diabétiques de type 2 a été associée à une diminution des taux plasmatiques de VEGF [66].

Par ailleurs, dyslipidémie et inflammation sont souvent associés dans le polyarthrite rhumatoïde [67] et les maladies inflammatoires du tube digestif [68], les deux paramètres évoluant de manière liée. Il est également important de noter que même dans les état de malnutrition, les anomalies du métabolisme lipidiques sont associées à une inflammation [69]. L'utilisation de petites doses de statines chez des diabétiques de type 2 a été associée à une diminution des molécules de l'inflammation comme VCAM-1 et CMP-1. Au final, le stress oxydatif en lui-même peut rendre compte pour les deux situations [70]. L'activité physique améliore nettement le bilan lipidique [71].

### *Obésité*

Le surpoids et l'obésité sont en progression constante dans le monde. A l'heure actuelle, 36,9% des hommes et 38% des femmes dans le monde ont un BMI (masse en Kg/ taille<sup>2</sup> en m) supérieur au égale à 25 Kg/m<sup>2</sup> [72]. L'adiposité gynoïde est associée à un rapport taille sur hanche <1 et l'adiposité androïde >1. Dans la première situation, le dépôt de graisse est périphérique. Dans l'autre, elle est dite centrale, viscérale.

De nombreuses données suggèrent que l'accumulation de graisse périphérique pourrait être protectrice vis à vis de l'athérosclérose [73, 74]. L'adiposité viscérale est elle associée à un sur-risque cardiovasculaire [75].

La leptine est synthétisée plutôt par les tissus graisseux sous-cutanés, de manière cependant différente selon le sexe [76]. Son rôle principal consiste en la régulation de l'appétit au niveau hypothalamique [77]. Cette action pourrait passer via l'activation de la NO synthase [78]. L'hypersécrétion de leptine à visée en théorie compensatrice est associée à une véritable leptinorésistance lié à une inflammation hypothalamique [79]. L'effet régulateur de la leptine est ainsi partiellement annulé en raison de cette leptinorésistance. Il existe une inflammation liée à l'obésité, dont le profil cytokinique est spécifique [80] au niveau des adipocytes. Ainsi, les molécules de l'inflammation les plus associées à l'obésité sont : l'IL-6, la CRP, le TNF $\alpha$ , leptine, resistine et visfatine [81].

D'autres molécules comme la résistine, le visfatine, et l'omentine sont principalement sécrétées par le tissu adipeux viscéral et ont un effet pro-inflammatoire, principalement via l'activation de l'IL-6, la CRP, et le TNF $\alpha$  [82].

L'adiponectine est corrélée négativement à l'adiposité. La corrélation avec le pourcentage de graisse viscérale et l'insulinorésistance est particulièrement forte [83]. Un de ses effets principaux est de diminuer cette insulinorésistance [84]. Elle présente par opposition des propriétés anti-inflammatoire et antiathérogènes [85].

D'autres molécules stimulant l'effet de l'adiponectine sont moins connues, comme la vaspine et la chémerine, associée à une diminution de l'IL-6, la CRP, et du TNF $\alpha$ . La table 1 résume les caractéristiques des principales adipokines [82].



**Table 1.** Adipokines, adipokine interplay and the effects on glucose homeostasis<sup>a</sup>

Adipokine	Receptor	Effects on other adipokines	Metabolic function
Adiponectin	AdipoR1, AdipoR2, T-cadherin	Suppression of TNF- $\alpha$ and IL-6 expression	Suppression of hepatic gluconeogenesis Stimulation of fatty acid oxidation in liver and skeletal muscle Stimulation of glucose uptake in skeletal muscle Stimulation of insulin secretion Modulation of food intake and energy expenditure
Chemerin	CMKLR1	Suppression of TNF- $\alpha$ and IL-6 expression Stimulation of adiponectin expression	Enhancement of insulin-stimulated glucose uptake and IRS-1 phosphorylation in 3T3-L1 adipocytes
Leptin	LR isoforms $\alpha$ -e <sup>b</sup>	Stimulation of TNF- $\alpha$ and IL-6 expression Suppression of resistin and retinol binding protein 4 expression Stimulation of adiponectin expression	Repression of food intake Promotion of energy expenditure Stimulation of fatty acid oxidation in liver, pancreas and skeletal muscle Modulation of hepatic gluconeogenesis Modulation of pancreatic $\beta$ -cell function
Omentin	Unknown	Unknown	Enhancement of insulin-stimulated glucose transport and Akt phosphorylation in human adipocytes
Resistin	Unknown	Stimulation of TNF- $\alpha$ and IL-6 expression	Induction of insulin resistance in mice Lack of a clear function in glucose metabolism in humans
Retinol binding protein 4	unknown (RAR, RXR, cell surface receptors?)	Unknown	Stimulation of hepatic gluconeogenesis in mice Impairment of skeletal muscle insulin signaling in mice Uncertain effect on insulin resistance in humans
Tumor necrosis factor- $\alpha$ and IL-6	TNFR, IL-6R/gp130	Stimulation of leptin, resistin, and visfatin/PBEF/Nampt expression Suppression of adiponectin and retinol binding protein 4 expression	Modulation of hepatic and skeletal muscle insulin signaling
Vaspin	— <sup>c</sup>	Suppression of leptin, resistin, and TNF- $\alpha$ expression Stimulation of adiponectin expression	Improvement of insulin sensitivity in mice Uncertain effect on insulin sensitivity in humans
Visfatin/PBEF/Nampt	— <sup>d</sup>	Stimulation of TNF- $\alpha$ and IL-6 expression	Stimulation of insulin secretion in mice Uncertain effect on insulin resistance in rodents and humans

<sup>a</sup>Abbreviations in table: AdipoR1, adiponectin receptor 1; AdipoR2, adiponectin receptor 2; CMKLR1, chemokine like receptor-1; IL-6R, interleukin-6 receptor; IRS-1, insulin receptor substrate-1; LR, leptin receptor; Nampt, nicotinamide phosphoribosyltransferase; PBEF, pre-B cell colony-enhancing factor; RAR, retinoic acid receptor; RXR retinoic acid-X receptor; TNFR, Tumor necrosis factor- $\alpha$  receptor; vaspin, visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor.

<sup>b</sup>LRb is restricted to the hypothalamus, brainstem and key regions of the brain which control feeding, energy balance and glucose metabolism.

<sup>c</sup>Effects likely to be mediated through inhibition of a yet-unknown protease.

<sup>d</sup>Effects mediated through nicotinamide adenine dinucleotide biosynthetic activity.

Table 1 : Les adipokines, leurs relations et leurs effets sur l'homéostasie du glucose [82].

Sur le plan thérapeutique, la simple perte de poids permet d'améliorer ce profil inflammatoire [86]. La chirurgie bariatrique est associée de manière encore plus forte à une diminution des cytokines pro-inflammatoires [87], notamment sur l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  [88]. Inversement, il a été montré que l'inflammation en elle-même pouvait être associée préférentiellement à l'obésité [89-92], en ayant tenu compte des problématiques liées aux corticothérapies.

Le BMI est corrélé fortement aux taux plasmatiques de VEGF-A ( $\beta = 0,407$ ,  $P = 0,001$ ) [93]. La forme antiangiogénique VEGF165b est surexprimée au niveau sanguin chez les obèses [94]. Cet aspect expliquerait le caractère hypovasculaire des tissus graisseux.

Dans des cultures de cellules de cancer du sein, la leptine stimulerait la production de VEGF, via l'activation de NF- $\kappa$ B et HIF1 $\alpha$  [95]. L'adiponectine aurait un rôle suppresseur sur le VEGF-A dans des cultures de cellules de cancer prostatiques [96]. Pour finir, la perte de poids liée à la chirurgie bariatrique est associée à une nette diminution des taux plasmatiques de VEGF-A [97].

### *Diabète*

Le diabète est lui aussi un facteur de risque important, tant sur le plan micro- que macrovasculaire. Le diabète de type 2 a un tel poids que sa seule présence suffit à faire classer un patient comme à haut risque [98, 99].

Ils sont caractérisés par une hyperglycémie à jeun (entre 1,1 et 1,25 g/l) ou un diabète de type 2. Des études prospectives ont montré une forte association entre le syndrome métabolique et le risque de développer un diabète de type 2 ultérieurement [100-104].

Le taux plasmatique du VEGF-A est normal chez les patients bien équilibrés [105] et le déséquilibre entraîne son augmentation [106]. L'augmentation des taux plasmatiques de VEGF-A est également déjà présente avant l'apparition de la microalbuminurie [107]. A l'apparition de celle-ci, le taux de VEGF-A y est corrélé de manière positive [21].

Plusieurs polymorphismes sont été associés au risque de :

- microalbuminurie [108]
- néphropathie comme les rs2010963 et rs3025039 [109].
- rétinopathie comme le polymorphisme +405\*G/C du gène du *VEGF-A* (phénotype GG) [110] et *VEGF-A* +936\*C/T [111].
- neuropathie comme le polymorphisme -7\*C/T du gène du *VEGF-A* [112] et les ulcérations du pied diabétique avec l'allèle A du polymorphisme -2578\*C/A [113].

- coronaropathie comme le polymorphisme +405\*G/C et-2578\*C/A [114].

Par ailleurs, des études ont mis en évidence l'intérêt du VEGF-B dans le traitement du diabète [115].

### *Le syndrome métabolique*

Le syndrome métabolique a vu le jour en 1988 sous l'impulsion de J. Reaven qui propose de grouper les troubles de la tolérance glucidique, l'hypertension artérielle, l'hypertriglycéridémie, l'obésité et l'insulinorésistance au sein d'un syndrome appelé « syndrome X » [116]. Bien qu'il existe plusieurs définitions différentes (table 2), ce syndrome est construit autour de l'insulinorésistance et de ses complications vasculaires. L'étude DESIR a mis en évidence dans un échantillon de volontaires sains de la population française une prévalence de ce syndrome de 17% chez les hommes et de 10% chez les femmes, et dépassait 25% dans la tranche d'âge 60-64 ans quel que soit le sexe [117]. L'enquête MONICA a montré que la prévalence du syndrome métabolique était presque deux fois plus élevée dans le Nord que dans le Sud de la France, et qu'elle double entre 40 et 60 ans [118]. L'étude de Framingham a mis en évidence l'association synergique des différents facteurs de risque vasculaire sur la morbidité [119]. La Botnia Study a mis en évidence le risque accru de complications chez les diabétiques de type 2 [120].

Chez 51 patients présentant un syndrome métabolique, les taux de VEGF-A plasmatiques se sont avérés plus bas en comparaison de leurs 25 sujets contrôles associés, de même que le potentiel antioxydant et le NO [121]. De manière physiologique, le NO stimule la production de VEGF-A et son inhibition diminue les taux de VEGF-A [122]. Ces éléments sous-tendent l'origine d'une altération de la balance d'oxydation-réduction chez ces patients entraînant un altération de la production de NO d'origine endothéliale.

**Table 1: Proposed Criteria for Clinical Diagnosis of the MetS**

Clinical measure	IDF(2005)	NCEP(2001)	WHO(1998)	EGIR	AACE	AHA
Insulin resistance	None	None, <i>but any 3 of the following 5 features</i>	IGT, IFG, T2DM, or lowered insulin sensitivity <i>plus any 2 of the following</i>	Plasma insulin >75th percentile <i>plus any 2 of the following</i>	IGT or IFG <i>plus any of the following based on clinical judgment</i>	None, <i>but any 3 of the following 5 features</i>
Body weight	Increased WC (population specific) <i>plus any 2 of the following</i>	WC ≥102 cm in men or ≥88 cm in women	Men: waist-to-hip ratio >0.90; women: waist-to-hip ratio >0.85 and/or BMI >30 kg/m <sup>2</sup>	WC ≥94 cm in men or ≥80 cm in women	BMI ≥25 kg/m <sup>2</sup>	WC ≥102 cm in men or ≥88 cm in women
Lipid	TG ≥150 mg/dL or on TG Rx HDL-C <40 mg/dL in men or <50 mg/dL in women or on HDL-C Rx	TG ≥150 mg/dL HDL-C: <40 mg/dL in men or <50 mg/dL in women	TG ≥150 mg/dL and/or HDL-C <35 mg/dL in men or <39 mg/dL in women	TG ≥150 mg/dL and/or HDL-C <39 mg/dL in men or women	TG ≥150 mg/dL and HDL-C <40 mg/dL in men or <50 mg/dL in women	TG ≥150 mg/dL HDL-C: <40 mg/dL in men or <50 mg/dL in women
Blood pressure	≥130 mm Hg systolic or ≥85 mm Hg diastolic or on hypertension Rx	≥130/85 mm Hg	≥140/90 mm Hg	≥140/90 mm Hg or on hypertension Rx	≥130/85 mm Hg	≥130/85 mm Hg or on hypertension Rx
Glucose	≥100 mg/dL (includes diabetes)	>110 mg/dL (includes diabetes) <sup>1</sup>	IGT, IFG, or T2DM	IGT or IFG (but not diabetes)	IGT or IFG (but not diabetes)	≥100 mg/dL (includes diabetes)
Other			Microalbuminuria ( <i>urinary average excretion rate ≥20 µg/min or albumin-creatinine ratio ≥20 mg/g</i> )		Other features of insulin resistance <sup>2</sup>	

IDF: International Diabetes Federation, NCEP: National Cholesterol Education Program, WHO: World Health Organization, EGIR: European Group for studying Insulin Resistance, AACE: American Association of Clinical Endocrinology, AHA: American Heart Association, IGT: Impaired Glucose Tolerance (2-h glucose ≥140 mg/dL), IFG: Impaired Fasting Glucose (110 ≤fasting glucose ≤126 mg/dL), T2DM: Type 2 diabetes Mellitus; WC: Waist Circumference; BMI: Body Mass Index; TG: Triglycerides, HDL-C: High density Lipoprotein Cholesterol, Rx: Recommended treatment.

<sup>1</sup>The 2001 definition identified fasting plasma glucose of ≥110 mg/dL (6.1 mmol/L) as elevated. This was modified in 2004 to be ≥100 mg/dL (5.6 mmol/L), in accordance with the American Diabetes Association's updated definition of IFG. <sup>2</sup>Includes family history of T2D mellitus, polycystic ovary syndrome, sedentary lifestyle, advancing age, and ethnic groups susceptible to T2D mellitus.

Table 2 : Critères d'identification du syndrome métabolique (MetS) et valeurs des définitions OMS [123], EGIR [124], NCEP [98], IDF [125] et ACCE [126] et AHA/NHLBI [127].

### *Autres facteurs de risques*

Les facteurs de risques présentés dans cette section feront l'objet d'un examen plus succinct en raison de l'absence d'implications directes dans les travaux liés à cette thèse.

#### Age et sexe

L'âge constitue le plus puissant facteur de risque vasculaire, avec un sur-risque masculin [128]. Les taux de VEGF-A augmentent avec l'âge, mais il n'existe pas de réelle différence liée au sexe [129, 130].

#### Tabagisme

Le tabagisme est le facteur de risque vasculaire modifiable le plus important [131, 132]. In vitro, l'exposition à la fumée de cigarette inhibe la migration cellulaire induite par le VEGF-A en altérant la voie Akt/eNOS/NO [133]. Cliniquement, on retrouve une augmentation des taux plasmatiques de VEGF-A chez les fumeurs [65]. Il existe une corrélation inverse entre la dilatation bronchique médié par l'acétylcholine et les taux de VEGF-A [134].

#### Exercice physique

L'exercice physique protège contre les maladies cardiovasculaires [131] et active la néoangiogenèse [135]. Dans une étude chez le rat, l'entraînement permet d'augmenter l'expression sanguine du gène du VEGF-A dans les suites de l'exercice [136]. Cependant les effets chez l'homme restent controversés [137]. Parallèlement, l'exercice physique diminue les taux de CRP circulants [138].

#### Alimentation

Une alimentation équilibrée avec une charge glucidique importante et un index glycémique élevé constitue un risque vasculaire [139]. Une alimentation riche en graisse induit l'angiogenèse via la stimulation de l'expression des gènes *HIF* et *VEGF-A* [140]. Un régime riche en huile de poisson active les cellules endothéliales et améliore la néovascularisation ischémie-induite via l'activation de la voie VEGF-A/NO chez la souris [141]. Chez l'homme sain, un régime proche

du modèle méditerranéen permet la diminution du VEGF-A plasmatique, probablement en rapport les acides gras  $\omega$ -3 [142].

#### Troubles psychologiques

L'hostilité [143], l'anxiété [144], la dépression [145], la colère [146] ont été associées lors d'études ou de méta-analyses à un risque cardiovasculaire accru. La pratique de la méditation aurait un effet protecteur vis à vis de ces pathologies [147].

Le VEGF est plus élevé chez les patients présentant un épisode dépressif [148], mais les données manquent dans les autres pathologies.

#### Altération de la fonction rénale

L'insuffisance rénale avancée est un facteur de risque vasculaire majeure, que la mise en dialyse aggrave encore [149].

La présence de lésions avancées dans le cadre de la néphropathie diabétique est associée à une augmentation de l'expression locale du gène du *VEGF-A* [150].

Le génotype AA du polymorphisme -2578\*C/A est associé à un meilleur pronostic de la polykystose rénale autosomique dominante alors que l'haplotype -1154G/-2578C était associé à la survenue plus précoce de l'insuffisance rénale terminale [151]. Des épisodes d'insuffisance rénale aiguë ont été décrits lors de l'utilisation du bevacizumab pour le traitement d'un cancer bronchique [152], ainsi que pour une rétinopathie diabétique proliférante [153]. Un traitement expérimental a été associé à une amélioration de la récupération après glomérulopathie [154].

### *VEGF-A et atteintes cardiovasculaires*

L'athérosclérose est une affection inflammatoire chronique caractérisée par des lésions inflammatoires lipidiques dans les grosses et moyennes artères. Ces lésions sont à l'origine d'un épaissement focal de l'intima et provoquent une hypoxie locale [155], qui active une voie de signalisation métabolique essentiellement par l'intermédiaire de HIF-1 $\alpha$ . L'hypoxie conduit à une activation de l'expression de divers gènes dont les gènes *VEGF-A* et *NOS*. En outre de son rôle de promotion de l'angiogenèse physiologique, le VEGF-A peut avoir un effet négatif sur les structures vasculaires par l'accélération du processus athérogène, en favorisant la production de

molécules d'adhérence telles que le VCAM-1, l'ICAM-1 et la sélectine-E et l'infiltration de leucocytes dans les plaques artérioscléreuses, puis en augmentant la production de molécules inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL1- $\beta$  et les métalloprotéinases (MMP) et la perméabilité vasculaire. Ces mécanismes inflammatoires [8, 9, 156] et les processus collatéraux complexes qui leur sont associés conduisent à une instabilité de la plaque qui est la cause principale des événements cliniques les plus sévères, notamment la rupture de plaque, la thrombose occlusive brutale, l'AVC et l'infarctus du myocarde [155].

Sur le plan clinique, le VEGF-A circulant augmente lors de la survenue d'un accident vasculaire cérébral, quel que soit son type. Sa signification quant à la récupération fonctionnelle pourrait être différente selon le mécanisme lésionnel [157]. Le VEGF-A semble avoir des effets neuro- et glioprotecteur et des propriétés angiogéniques intracérébrales au cours des infarctus cérébraux. Ceci pourrait avoir des répercussions fonctionnelles majeures à l'avenir [158].

L'utilisation de l'atorvastatine (une statine de forte puissance) serait associée à une induction de l'angiogenèse, à une stimulation de la plasticité cérébrale et à une augmentation de la récupération fonctionnelle dans les suites d'un accident vasculaire cérébral [159].

Pour finir les polymorphismes -2578\*C/A, -1154\*G/C, -634\*G/C et +936\*C/T ont été étudiés chez des patients neurovasculaires en comparaison à des sujets sains. Les haplotypes GC+CC étaient surreprésentés dans le groupe des malades, signant une implication du gène du *VEGF-A*. Lors de la survenue d'infarctus du myocarde, le taux plasmatique de VEGF-A est élevé. Il pourrait également s'élever en cas de préinfarctus [160]. Le traitement par héparine est associé à une diminution des taux de VEGF-A plasmatique, ce qui traduirait l'influence du processus de guérison [161]. Une ascension importante des taux de VEGF est corrélée à une extension plus importante de la zone infarctée [162].

Sur le plan génétique :

- les polymorphismes rs2010963 et rs699947 sont associés aux coronaropathies [163], notamment chez le diabétique [164].
- les mêmes polymorphismes sont associés à l'infarctus du myocarde [165].
- Le polymorphisme rs2010963 est associé à l'insuffisance cardiaque après infarctus [166] et en général [167].
- Le polymorphisme rs2010963 est associé à la mortalité après pontage coronarien artériel [114].

Pour finir la littérature actuelle abonde de commentaires et de revues relatives aux effets secondaires des médicaments antiangiogéniques. Leur principal effet secondaire est l'hypertension artérielle, ainsi que les saignements. L'étude précise de ces effets latéraux va permettre d'approfondir nos connaissances du rôle du VEGF-A dans la pathologie cardiovasculaire [168].

### **Angiogenèse, VEGF-A et atteintes endocriniennes**

(Voir détails dans revue, liste des publications)

Le VEGF-A occupe une place importante dans toute l'endocrinologie [169, 170]. Les glandes endocrines sont particulièrement connues pour leur caractère très vasculaire facilitant la libération hormonale [171].

#### ***Au niveau thyroïdien***

Le VEGF-A est fortement exprimé au niveau de la thyroïde [171], tant au niveau des thyrocytes [172] qu'au niveau stromal [173]. La stimulation par la TSH des cellules thyroïdiennes en culture induit leur prolifération. In vitro, la stimulation des thyrocytes humains par la TSH ou les anticorps anti-récepteurs à la TSH conduit à l'accroissement de l'expression de l'ARNm du *VEGF-A*. In vivo, cette stimulation induit l'expression du *VEGF-A* et de ses 2 récepteurs *VEGFR1* et 2 dans les cellules endothéliales de rat. Ceci souligne l'importance du VEGF-A dans la physiologie thyroïdienne et dans la constitution de maladies comme celle de Graves [174, 175]. En effet, dans cette maladie, la stimulation par les TRAK augmente l'hormonogénèse et l'angiogenèse [171], ce qui explique l'apparition d'un goitre fortement vasculaire. Le sérum des patients atteints de la maladie de Basedow non traitée présente un taux de VEGF-A corrélé avec l'intensité de la vascularisation en doppler couleur [176]. Il apparaît également une corrélation avec la vélocité systolique maximale en doppler pulsé, l'index de résistance permettant de faire la part entre les maladies de Basedow et de Hashimoto (données non encore publiées). On peut noter également que le VEGF-C et le VEGFR3 sont présents dans les goitres et les thyroïdites auto immunes [171, 175]. Les tissus thyroïdiens, en contexte de thyroïdite lymphocytaire et de



carcinome bien différenciés expriment fortement le *VEGF-A* en comparaison avec les tissus sains [175, 177]. Dans le cadre de la maladie de Basedow, les taux circulants de VEGF-A sont augmentés chez les patients présentant une orbitophtie [178]. Sur le plan hormonal, les études concernant l'impact du climat hormonal sur les taux circulants de VEGF-A divergent [179, 180]. Pour finir, une association a été décrite en 2012 entre les polymorphismes +405 et -2578 et un risque accru de maladie de Graves, ainsi qu'une production accrue d'anticorps anti-récepteurs de la TSH [181].

### *Au niveau hypophysaire*

Les tumeurs hypophysaires, contrairement aux autres glandes endocrines, présentent un profil vasculaire plus restreint que dans l'hypophyse normale. Aucune relation n'a été trouvée entre l'intensité de la prolifération et la densité microvasculaire [171, 182]. Ces mécanismes ne sont pas encore compris. Parmi les tumeurs hypophysaires sécrétantes, l'expression de l'ARNm du *VEGF-A* des adénomes à TSH était inférieure à ceux des tissus sains. Cette même expression était supérieure par rapport aux tissus sains pour les tumeurs non sécrétantes. L'expression de l'ARNm du *VEGFR2* dans tous les types de tumeur hypophysaire (sécrétante ou non) était plus importante que l'expression dans les tissus sains. Il existe une corrélation positive entre l'expression de l'ARNm du *VEGF-A* et de *VEGFR2* avec l'expression de l'ARNm du pituitary tumor transformig gene (*PTTG*) et avec celle du *FGF2*. Il apparaît que l'activité transcriptionnelle du *PTTG* contribue à stimuler celle du *VEGF-A* [183]. Dans des lignées cellulaires hypophysaires, le TGFβ1 stimule la production de VEGF-A de manière dose dépendante, l'effet dépendant du type de cible cellulaire [184]. Chez les patients ayant une acromégalie active, les effets systémiques proangiogéniques de la GH et de l'IGF-1 dépendent de l'activation du *VEGF-A* par l'IGF1 [171, 185]. La somatostatine utilisée de manière thérapeutique inhibe directement l'angiogenèse à travers les récepteurs présents sur les cellules endothéliales et indirectement à travers l'inhibition de la sécrétion de GH, IGF-1, VEGF-A et d'autres facteurs de croissance. Ceci a pour conséquence que les analogues de la somatostatine protègent l'organisme d'une angiogenèse VEGF-A induite galopante et peuvent réduire la sécrétion de GH [186]. L'expression du Ki-67 et p53 n'est pas corrélée avec les caractéristiques d'invasivité des adénomes. Ce qui est le cas du VEGF-A pour les tumeurs invasives. Le VEGF-

A est un stimulateur indépendant de l'angiogenèse et de la progression des adénomes somatotropes, dont l'immunoréactivité est supérieure à 25%. Ceci pourrait avoir des conséquences dans la pratique clinique, notamment le traitement préopératoire par analogue de la somatostatine des adénomes invasifs somatotropes [187].

Les prolactinomes ont une expression de la protéine VEGF-A supérieure en comparaison des adénomes corticotropes, somatotropes ou non fonctionnels [182]. Les macro-prolactinomes ont une meilleure vascularisation que les microprolactinomes. Il en va de même pour les prolactinomes invasifs en comparaison des non invasifs, et des cancers vis à vis des tumeurs bénignes [186]. L'efficacité d'un traitement chirurgical d'un prolactinome faiblement vascularisé est meilleure que pour une tumeur plus vasculaire. Les agonistes dopaminergiques utilisés dans le traitement des prolactinomes inhibent la transduction du signal du VEGF-A. Ils ont par conséquent une action anti angiogénique. La dexaméthasone inhibe également la sécrétion de VEGF-A dans la majorité des tumeurs hypophysaires [188]. Les prolactinomes induits par une imprégnation oestrogénique chez le rat expriment de hauts niveaux de VEGF-A et des anticorps anti-VEGF-A montrent un effet inhibiteur sur ces tumeurs. Ces un effet inhibiteur peuvent être reliés à un effet autocrine/paracrine du VEGF-A sur ces cellules tumorales, où l'expression du *VEGF-A* et de ses récepteurs y sont coréprimés [189]. D'après des modèles animaux, cette approche est efficace pour inhiber des prolactinomes dopamine résistants. Après traitement anti VEGF-A, le niveau d'expression du *VEGF-A* reste le même, le niveau sérique augmente, mais la stimulation hypophysaire via VEGFR2 était réduite. Ceci souligne le rôle de l'angiogenèse dans les adénomes hypophysaires, et que la voie du VEGF-A peut constituer une alternative intéressante pour les prolactinomes résistants aux agonistes dopaminergiques [190]. Récemment, le rôle de la prolactine en elle-même sur l'angiogenèse a été mis en lumière par une étude sur des adénomes somatotropes [191].

#### **Au niveau parathyroïdien**

Dans le domaine de la pathologie des glandes parathyroïdes, les capacités naturelles qu'a cette glande à produire de l'angiogenèse a été utilisée cliniquement depuis longtemps via les procédures d'auto-transplantation. A ce titre, la PTH régule l'expression du VEGF-A et des métalloprotéinases [192].

### *Au niveau utéro-ovarien*

Les hormones sexuelles montrent également des capacités angiogéniques. Les oestrogènes ont des effets à la fois stimulants et freinateurs sur la transcription du gène du VEGF-A, alors qu'ils réduisent la vascularisation de la prostate après castration [171]. Le VEGF-A est également impliqué dans la physiopathologie en d'endométriose [193]. Dans une population de femmes ostéoporotiques, les taux de VEGF-A plasmatiques sont diminués en comparaison avec des témoins sains [194, 195].

### *Au niveau surrénalien*

Les phéochromocytome expriment fortement le VEGF-A [196]. Dans la maladie de Von Hippel Lindau, la mutation de la protéine VHL, responsable habituellement de la dégradation du facteur HIF1 $\alpha$ , et mutée, ce qui augmente l'effet HIF1 $\alpha$  et donc l'expression de VEGF-A [197]. Récemment le VEGF-A a été impliqué dans la genèse des phéochromocytomes sporadiques et associés à la néoplasie endocrinienne multiple de type 2 [198]. Des niveaux élevés d'expression tissulaire du VEGF-A sont associés à la malignité [199]. En cas de chirurgie, des taux élevés de VEGF-A plasmatiques peuvent être utilisés comme facteur pronostique de récurrence [200]. L'expression du VEGF-A au niveau du cortex surrénalien est associée au statut fonctionnel [201]. Les concentrations sériques de VEGF-A sont elles aussi associées au statut hormonal des tumeurs corticales [202].

### *Influence des hormones sur la production de VEGF-A*

D'un point de vue général, l'action des hormones sur l'angiogenèse est considérable. La table 3 résumé les effets des différentes hormones.

TABLE 2A. Hormones and their effect on angiogenesis and VEGF expression

Hormone	Effect on angiogenesis or MVD	Effect on VEGF
Estradiol	↑ EC proliferation [low (nanomoles) concentrations] ↓ EC proliferation [high (micromoles) concentrations] (101)	↑ Cultured breast cancer (MCF7) cells (102) ↑/↓ In breast and uterus depending on VEGF gene binding site (103)
Progestogens LH/FSH	↓ Following transfection of ER (104) ↓ In endometrium because ↑ TSP-1 (inhibitor) (106) ↑ Ovarian tumor neovascularization (110)	↑ In women receiving estrogen (105) ↑ In breast cancer cells (107) ↑ Plasma and follicular VEGF during IVF and spontaneous ovulation (108, 109)
GnRH	↑ In corpus luteum (111)	
Testosterone	↑ Angiogenesis in prostate after castration-induced regression (112)	
Glucocorticoids		↓ In pulmonary fibroblasts and smooth muscle cells (113) ↓ In pituitary FSC (114) ↓ In rat glioma cell lines (115) ↑ In cultured adrenal cortical cells (116)
ACTH CRH	↑ EC migration (117) ↑ Tumor angiogenesis in nude mice (117)	
TSH	↑ EC proliferation (118)	↑ In human thyroid follicles and thyroid carcinoma cell lines (92, 93, 94, 119, 120, 121) ↑ VEGFR (119, 120)
GH	↑ Retinal neovascularization (122, 123) ↑ In <i>in vitro</i> CAM assay (124)	
IGF-I	↑ Retinal neovascularization (126)	↑ In fibroblasts (125), colorectal cell line (76, 77), retinal pigment epithelial cells (127), human osteoblasts (128), endometrial adenocarcinoma cells (129)
IGF-II	↑ <i>In vivo</i> (CAM) and <i>in vitro</i> (HUVEC) (131)	↑ Human hepatoma cells (130)
Insulin		↑ Via HIF-1 transduction pathway (132)
PTH PTHrP	↑ In bone (133) ↑ <i>In vivo</i> [malignant pituitary cell line (mGH3) implanted into rats] and <i>in vitro</i> (capillary tube formation by bovine aortic endothelial cells) (136)	↑ Osteoblast cell line (133, 134, 135)
Erythropoietin PPAR $\gamma$	↑ <i>In vivo</i> (CAM) and <i>in vitro</i> (HUVEC) (137) ↓ HUVEC proliferation (138)	↑ In vascular smooth muscle cells (139)

EC, Endothelial cells; PPAR $\gamma$ , peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ; IVF, *in vitro* fertilization; ↑, increase, *e.g.*, in angiogenesis/VEGF expression; ↓, reduction, *e.g.*, in angiogenesis/VEGF.

Table 3 : Les hormones et leurs effets sur la sécrétion de VEGF-A [171].

## Angiogenèse, VEGF-A et atteintes oncologiques

(Voir détails dans revue-liste des publications)

### Oncogenèse générale

Folkman a proposé un modèle de croissance tumorale et de diffusion métastatique fortement basé sur l'angiogenèse, ce qui lui avait permis de prédire en quelque sorte l'avènement des thérapies actuelles [203]. Les mutations à l'intérieur des protooncogènes conduisent à une production incontrôlée de facteurs de croissance et de facteurs angiogéniques. Ainsi les mutations de *ras* et de *p53* augmentent l'expression du *VEGF-A* [204]. Au sein de lésions préneoplasiques, l'acquisition d'une angiogenèse accrue est impérative pour l'évolution vers le stade de cancer, sans développement d'une néovascularisation, les tumeurs ne peuvent pas croître et métastaser [10, 205]. La vascularisation tumorale est caractérisée par un maillage et des fonctions chaotiques. Les vaisseaux sont tortueux, très interconnectés, de diamètre inadéquat, et présente une paroi anormale et hypervasculaire. Ceci est dû à l'absence de facteurs régulant l'angiogenèse physiologique et ceci aboutit à des zones d'ischémie, d'acidose, pouvant conduire à

des nécroses tumorales. A noter que cette caractéristique est également à la base de la prise de contraste des tumeurs lors des examens de scanner et d'IRM. De telles conditions rendent impossible l'obtention de doses thérapeutiques homogènes en agents thérapeutiques. Il en résulte également une diffusion métastatique facilitée [206, 207]. Il a été trouvé une surexpression de l'angiopoïétine 1 et une faible expression du VEGF-A dans les tumeurs faiblement vasculaires. A l'opposé, dans les tumeurs ayant une vascularisation très perméable, aucune expression de l'angiopoïétine 1 ou de l'angiopoïétine 2 n'a pas été constatée. L'augmentation de la perméabilité vasculaire et de l'angiogenèse dépend avant tout de l'organe dans lequel la tumeur prend corps. L'hypoxie permet l'expansion de cellules monoclonales qui ont perdu leur capacité à induire l'apoptose en conditions hypoxiques [188]. L'hypoxie ne conduit pas toujours à l'expression de VEGF-A dans les tissus tumoraux [208]. Les molécules pro et anti angiogéniques sont synthétisées dans le micro environnement tumoral [173]. Les lymphocytes, mastocytes et monocytes infiltrant la tumeur sont des sources importantes de facteurs angiogéniques dont le VEGF-A [209]. L'obtention d'un flux sanguin suffisant et d'une perméabilité vasculaire suffisante permet aux cellules tumorales de diffuser dans le flux sanguin, notamment par l'intermédiaire du VEGF-A [205, 210].

La participation de l'angiogenèse et du VEGF dans la pathogénie des cancers a été largement décrite [185, 205, 207, 211, 212]. La présence de VEGF-A a été trouvée dans les cancers de la thyroïde [213, 214], bronches, estomac, colon, sein, ovaire, rein et vessie [213]. L'expression de l'ARNm du VEGF-A est présente dans les tumeurs des cerveau, œsophage, estomac, colon, foie, sein, ovaire, rein et vessie [204, 215]. Des niveaux plasmatiques de VEGF-A élevés ont été rencontrés chez des patients présentant des cancers de l'oesophage, du colon, du sein, de l'ovaire, de l'utérus, des os et de la prostate, même si des concentrations sanguines de VEGF-A dans les vaisseaux drainant la tumeur étaient normaux [216]. Il existe des corrélations entre l'expression du VEGF-A et l'agressivité/le pronostic tumoral [217-222]. Les tumeurs invasives du colon présentent une expression du VEGF-A accru vis à vis des stades préneoplasiques [223]. Dans le cancer du sein, le nombre de métastases dépend de l'expression de VEGF-A et de VEGFR2 mais pas de VEGFR1 [210]. L'expression de VEGF-A est plus importante dans les tumeurs malignes de nombreux cancers en comparaison aux tissus correspondants. Les tumeurs des poumons, ovaire, thyroïde présentent une expression de HIF1 $\alpha$  et VEGF-A augmentée. Pourtant l'expression du VEGF-A n'est pas rapportée dans tous les cancers. Elle est réduite dans des

tissus comme l'hypertrophie bénigne de prostate, les hémopathies, la prostate, l'estomac et les testicules. Il semblerait ainsi que des mécanismes paracrines soient impliqués. Ainsi le microenvironnement du cancer testiculaire montre des changements histologiques. Aucune différence d'expression du VEGF-A entre le tissu tumoral et les tissus adjacents n'a été rapportée pour le colon, l'ovaire, le sein et le col utérin [208].

### *Cas spécifique du cancer thyroïdien*

Une expression augmentée dans les tumeurs malignes a été constatée en comparaison avec les tumeurs bénignes et des tissus sains. Les tissus thyroïdiens, en contexte de thyroïdite lymphocytaire et de carcinome bien différenciés expriment fortement le *VEGF-A* en comparaison avec les tissus sains [175, 224]. Cependant, il n'existe pas de différence entre les microcarcinomes papillaires et les tissus sains. Dans les cancers papillaires et folliculaires, l'augmentation d'expression du *VEGF-A* est corrélée à l'augmentation de l'indice de prolifération Ki67 [171]. Les carcinomes thyroïdiens qui expriment le plus le VEGF-A (ARNm et protéines) sont caractérisés par un index mitotique plus élevé [224]. Il existe une corrélation entre la taille de la tumeur et l'expression du *VEGF-A* [171]. Ces tumeurs sont d'ailleurs plus vascularisées que le tissu sain [171, 192]. L'expression de *VEGF-A* et de *VEGFR1* dans le cancer papillaire est corrélée avec la taille [225]. Les cellules thyroïdiennes de carcinome primitif de la thyroïde métastatique ont une plus forte expression du *VEGF-A* qu'en cas d'absence de métastases [224]. L'expression de l'ARNm du *VEGF-A* est similaire dans les tumeurs primitives et dans les métastases mais dans les cellules de carcinome papillaire et folliculaire, elle est supérieure à celle trouvée dans les carcinomes médullaires, les tumeurs bénignes et la maladie de Basedow [226]. L'expression de la protéine et de l'ARNm du VEGFR1 a été retrouvée dans les cellules endothéliales de thyroïde saine et carcinomateuse [171]. L'expression des protéines *VEGF-A*, *VEGFR1* et *VEGFR2* est augmentée dans les cellules de carcinome médullaire et pourraient être impliquée dans la progression de cellules tumorales [214].

L'expression de *VEGF-A* est associée à l'agressivité, à la récurrence locale, métastatique et à la survie dans progression [227]. L'expression du VEGF dans des ganglions lymphatiques métastatique est supérieure à celle présentes dans les tumeurs primitives [171]. Ainsi, l'expression globale du *VEGF-A* dans les tumeurs est corrélée avec leur agressivité [171, 192].

Certaines études ont montré une corrélation entre la densité microvasculaire et le pronostic pour les carcinomes papillaires et médullaires (goth, 2003, 98). Une méta-analyse chinoise a montré un relation entre l'expression de la protéine VEGF-A et la présence de métastases ganglionnaires cervicales [228].

Certains polymorphismes et niveaux d'expression de l'ARNm pourraient être associés à un plus grand niveau d'agressivité. La distribution des polymorphismes -141\*A/C, +405\*C/G et +936\*C/T du gène du *VEGF-A* est significativement différente entre les carcinomes papillaires et les tumeurs bénignes [229]. L'allèle A du polymorphisme -2578\*C/A est associé à un risque accru de cancer thyroïdien et d'extension ganglionnaire [230].

## Médecine personnalisée

Le contexte démographique et épidémiologique dans lequel nous nous trouvons à l'heure actuelle constitue pratiquement en lui-même la justification de travaux entrepris dans cette thèse. D'un côté, la population des pays occidentaux vieillit [231]. De l'autre, il s'opère une transition épidémiologique forte dans beaucoup de pays émergents. Ceux-ci voient la part des maladies chroniques sans cesse croître, menaçant leur développement à moyen terme [232]. Les pathologies non transmissibles vont par exemple coûter 35 mille milliards d'euros dans les vingt prochaines années dans le monde entier. En effet, la médecine actuelle manque d'efficacité dans les maladies non transmissibles dont le coût menace les systèmes de santé européens. La crise économique impose un cahier des charges complexe avec notamment une regrettable tendance au sacrifice des actions de prévention [233]. Face à cette situation, les autorités européennes ont construit un programme visant à proposer des solutions à ces défis : le programme HORIZON 2020 [234]. En effet, à l'heure actuelle, l'association européenne pour la médecine prédictive, préventive et personnalisée développe des stratégies de recherche pour améliorer l'anticipation de ses problèmes de santé publique par l'intermédiaire d'un riposte multimodale : elle vise l'amélioration de la compréhension de la connaissance et de la prise en charge des maladies chroniques au rang desquels les pathologies liés à l'obésité ont une place prépondérante. Ses moyens sont orientés vers :

- le développement des solutions de biologie moléculaire appelées *-omics* en anglais.
- les développements des technologies innovantes [235].
- L'amélioration des démarches diagnostiques et de dépistage.
- La recherche de nouveaux biomarqueurs dont le VEGF-A peut se revendiquer.
- Les études précliniques et cliniques.
- L'investissement dans les maladies rares.
- L'innovation en santé publique
- L'aide à la recherche pharmaceutique via les 'Innovative Medicines Initiative' [236].

Bien que il n'existe pas une définition officielle de la médecine personnalisée, elle fait référence à un modèle médical utilisant le profil moléculaire pour adapter la stratégie thérapeutique à chaque patient, « au bon moment » et / ou pour déterminer la prédisposition à la maladie et / ou pour fournir une prévention opportune et ciblée.



Cette approche a potentiellement de très grands avantages pour les patients, les cliniciens et les systèmes de santé. Certains avantages potentiels offerts par cette nouvelle approche comprennent:

- - Capacité à prendre des décisions médicales plus éclairées;
- - Efficacité de traitement plus élevée grâce à des thérapies mieux ciblées;
- - Réduction de la probabilité de réactions indésirables aux médicaments;
- - Accent sur la prévention et la prédiction de la maladie
- - Intervention précoce de la maladie, ce qu'il n'était possible dans le passé;
- - Maîtrise des coûts des soins de santé.

### L'avènement de nouvelles techniques et approches en médecine personnalisée

La promotion des axes de médecine personnalisée précédemment cités a permis l'encouragement des stratégies de recherche à haut débit. La figure 2 permet de synthétiser l'ensemble des axes regroupés par ce dernier terme.

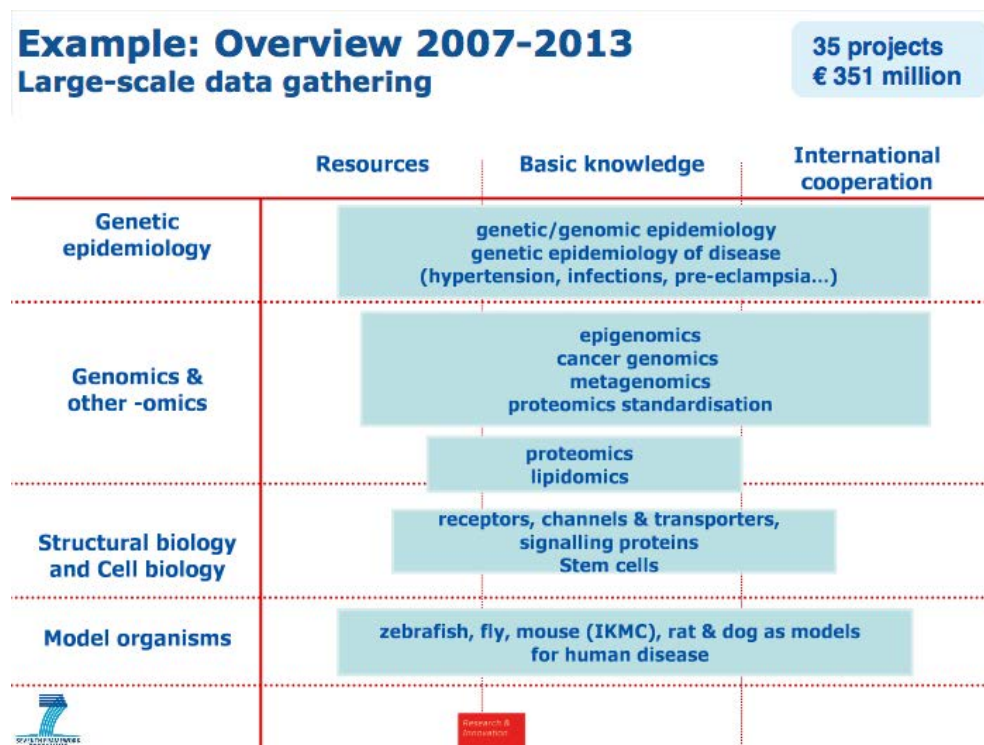


Figure 2 : Panorama des technologies biologiques à haut débit mises en place entre 2007 -2013.  
[http://ec.europa.eu/health/files/latest\\_news/2013-10\\_personalised\\_medicine\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/health/files/latest_news/2013-10_personalised_medicine_en.pdf)

Cet encouragement pour ces nouvelles approches plus fonctionnelles du génome s'est traduit par une croissance quasi-exponentielle des publications depuis les balbutiements en 1999 (Figure 3). Ceci s'explique notamment par une miniaturisation des technologies ainsi que la forte diminution du prix par Kb (Figure 4).

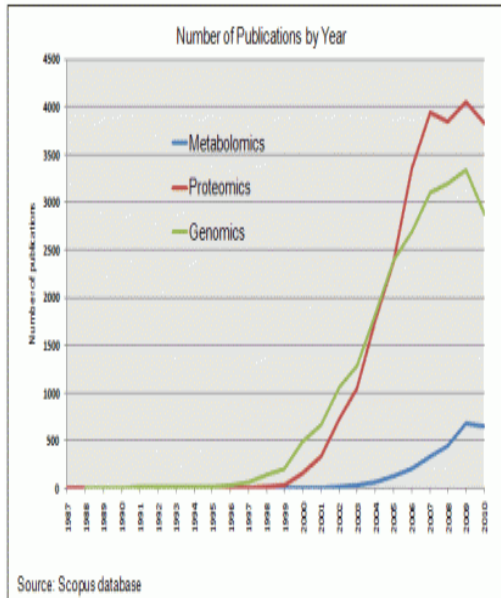


Figure 3 : Evolution de la production scientifique en fonction du temps.

[http://commonfund.nih.gov/sites/default/files/Metabolomics Overview Graph\\_0.gif](http://commonfund.nih.gov/sites/default/files/Metabolomics%20Overview%20Graph_0.gif)

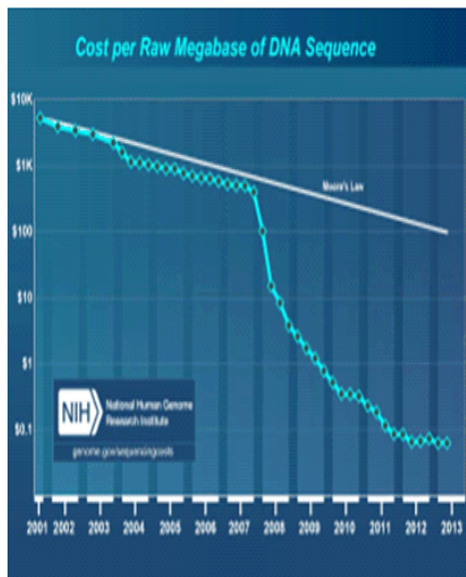


Figure 4 : Evolution du coût du séquençage en fonction du temps. <http://www.senat.fr/rap/r13-306/r13-3063.gif>

L'évolution des pratiques conventionnelles basées sur les antécédents familiaux et la prise en considération de facteurs de risque bien établis (p. ex. la pression artérielle, le tabagisme, etc.) vers une médecine personnalisée ne pourra se faire que par

l'intégration à grande échelle de données moléculaires personnelles dans les outils de stratification du risque.

Le développement des technologies « omiques » en particulier avec les GWAS favorise déjà cette évolution par l'accroissement de nos connaissances des processus biologiques et moléculaires impliqués dans les maladies, et le transfert de ces connaissances sur le plan clinique. Les progrès technologiques et scientifiques actuels en épidémiologie génétique, peuvent établir la causalité des variants génétiques, ainsi que aider à comprendre d'autres aspects de la régulation génomique de la variabilité entre individus du risque à développer une pathologie chronique. En particulier la transcriptomique, qui s'attache à analyser l'expression des gènes, peut fournir des renseignements sur la fonctionnalité de marqueurs génétiques. Par ailleurs, les effets de marqueurs localisés dans des régions non traduites et non codantes de l'ARN, tels que les micro-ARN, sur l'expression génique et les traits quantitatives peuvent être examinés principalement par analyse transcriptomique et séquençage de prochaine génération [237]. Cependant, comme la présence d'ARN ne correspond pas toujours à la présence de la protéine [238], l'analyse protéinique fournira des données essentielles sur le profil d'expression des protéines et leurs modifications post-traductionnelles (ces modifications étant responsables de changements importants dans la fonction et la régulation des protéines). La protéomique pourrait donc permettre d'établir la causalité génétique et d'identifier d'autres facteurs non génétiques, lesquels pourraient servir de biomarqueurs pour les maladies chroniques et améliorer la prédiction du risque [239]. D'autre part, il est admis que les modifications épigénétiques jouent un rôle important dans les profils de transcription, la régulation de la réplication de l'ADN et l'organisation de la structure de l'ADN au sein de la cellule [240]. Les mécanismes épigénétiques sont des mécanismes permettant à la cellule de répondre rapidement à des facteurs environnementaux:-

La complexité des maladies chroniques, associée à la complexité de leur régulation moléculaire, impose aujourd'hui la mise en œuvre de nouvelles stratégies thérapeutiques et de prédiction du risque des maladies reposant sur des approches sophistiquées et transverses utilisant des marqueurs moléculaires. Les interactions entre les éléments qui forment un système biologique sont décrites sous le terme « biologie des systèmes » [241]. Cette approche s'appuie sur le fait que les manifestations individuelles de maladies complexes découlent d'interactions entre des réseaux nébuleux composés de voies moléculaires multiples. Les avancées technologiques de

l'ère post-génome permettent à présent l'étude de « l'interactome » humain (réseaux interactifs dans la cellule humaine) [242]. Les outils de la biologie des systèmes sont d'ordre expérimental, théorique et informatique [241]. La combinaison de ces outils permet de construire des modèles, facilitant l'analyse intégrée des réseaux biologiques. Leur utilisation vise à identifier et à comprendre les voies biologiques, à identifier des biomarqueurs et à offrir un cadre pour une médecine prédictive et personnalisée [243].

Les médicaments anti-VEGF-A sont à la première ligne du traitement pour de nombreuses tumeurs solides telles que le carcinome des cellules rénales [244-247], le cancer colorectal métastatique [248-250], et pour d'autres maladies cancéreuses telles que le cancer de l'œsophage, un glioblastome, un gliome malin, le cancer ovarien épithélial, cancer du poumon non à petites cellules, les tumeurs neuroendocrines du pancréas ou des intestins ou de mélanome [251-261]. Les données cliniques et expérimentales récentes ont montré que l'administration de VEGF-A peut protéger les tissus ischémiques telles que le myocarde, le cerveau et le rein par stimulation de la prolifération microvasculaire et de réparation [262]. Par contre, les inhibiteurs du VEGF, tels que le bévacizumab et le sorafénib ont été utilisés avec succès pour inhiber l'angiogenèse dans la dégénérescence maculaire, et la polyarthrite rhumatoïde [263]. Cependant, les études cliniques animales et humaines ont montré que les traitements anti-VEGF-A sont associés à l'hypertension et des lésions rénales en grande partie due à des anomalies de la microvascularisation [264]. Il est important de noter que les patients traités pour un cancer sont les patients plus âgés, très souvent souffrant d'hypertension et sous traitement antihypertensive, soulignant l'importance de la mise en œuvre de protocoles personnalisés adaptés. Une étude de Minardi et al [265] a suggéré une utilisation potentielle de l'expression du VEGF-A comme un marqueur pronostique pour la survie sans métastases à distance et la survie globale pour la réponse au sunitinib chez des patients atteints de carcinome rénal métastatique. Cependant, le niveau de VEGF-A plasmatique n'était pas un marqueur de réponse au traitement. L'expression de VEGF-A par les cellules tumorales pourrait être génétiquement héritée comme ses niveaux plasmatiques, et ainsi l'hypothèse que l'information génomique du VEGF-A pourrait interférer dans les traitements anti-VEGF de cancer.

## Argumentaire, hypothèses de travail et objectifs

La néoangiogenèse est un phénomène complexe où s'entrecroisent de nombreux gènes et molécules dont les fonctions ne sont pas pour tous entièrement élucidées. La famille des facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire compte parmi les acteurs les plus abondants et les plus puissants de l'orchestre angiogénique. Ces facteurs peuvent être assimilés à des cytokines pluripotentes capables d'induire de manière non exhaustive la prolifération et la survie des cellules endothéliales et immunitaires, la perméabilité vasculaire, l'émergence de bourgeons vasculaires, la lymphangiogenèse, la mobilisation de précurseurs médullaires, l'adhésion et la chimotaxie de cellules immunocompétentes. Ces molécules sont engagées autant dans des phénomènes homéostatiques (maintien de l'architecture vasculaire, endocrinienne et osseuse, le cycle menstruel ainsi que la cicatrisation), adaptatifs (croissance et grossesse), que pathologiques (hypertrophie, inflammation, promotion de la croissance tumorale). Leur implication dans des phénomènes physiologiques ou physiopathologiques en endocrinologie est ubiquitaire au niveau fondamental et prend une importance clinique de plus en plus considérable. Ainsi les traitements ciblés de la rétinopathie diabétique proliférante (ranibizumab et bevacizumab) et des carcinomes endocrines (bevacizumab, inhibiteurs de la tyrosine kinase) sont cités dans les recommandations internationales et appartiennent à la pratique clinique quotidienne. La prépondérance fonctionnelle du VEGF-A est telle qu'il est couramment appelé VEGF alors même que la famille du VEGF est particulièrement vaste. On peut ainsi recenser les formes VEGF-A, B, C, D, E, PlGF et sv-VEGF, bien que toutes n'appartiennent pas à la physiologie humaine. Au sein même de cette classification, le VEGF-A regroupe 2 sous-familles de molécules issues d'un phénomène complexe d'épissage alternatif des ARN messagers : les formes VEGF<sub>xxx</sub> proangiogéniques et les formes VEGF<sub>xxx</sub><sub>b</sub> antiangiogéniques. L'épissage alternatif modifiant le comportement angiogénique ne porte que sur l'exon 8 de l'extrémité C-terminale (longue de 6 acides aminés seulement). Il existe plusieurs isoformes dans chacune de ces 2 familles. Ainsi les formes VEGF-A 121 et 145 sont acides et ont une grande capacité de diffusion alors que les formes 189 et 206 sont basiques et interagissent fortement avec la matrice extracellulaire. Ces différences de structure induisent des différences de comportement biologique dont l'étendue est encore en cours d'investigation à l'heure actuelle.

L'avènement des thérapeutiques antiangiogéniques notamment en cancérologie a engendré de nombreuses réactions au sein des communautés scientifiques et médicales. Il y a ainsi eu des réactions d'espoir des cliniciens et des patients à travers des modifications notables du pronostic de plusieurs maladies, d'angoisse des autorités de santé et des organismes de sécurité sociale à la prévention de l'*explosion des dépenses de santé* à venir et de curiosité des scientifiques au sens large concernant la phénoménologie des thérapies ciblées et particulièrement de l'antagonisation de l'angiogenèse via la voie des VEGF. C'est donc d'emblée dans une problématique clinique de *rationalisation des indications* que les cliniciens ont conçu l'utilisation des thérapies ciblées. Pour chacune des molécules, des études ont été menées pour définir à la fois des critères de réponses et de tolérance afin de sélectionner les patients pour lesquelles la balance bénéfice-risque est la meilleure et donc digne des dépenses engagées. Il est d'ailleurs à noter que les classiques critères d'évaluation de type RECIST ont été mis à mal par les thérapies antiangiogéniques dont ils ne reflètent pas l'efficacité clinique. Le développement de la notion de théranostique prend donc sa source dans la prise en compte de la trinité : coût – efficacité – tolérance.

Alors même qu'émergeaient les thérapies ciblées, nous avons assisté à la renaissance médiatique d'une molécule « scientifiquement oubliée », bien que présente sur la liste des médicaments essentiels de l'Organisation Mondiale de la Santé: le diméthyl-biguanide : la *metformine*. Cet antidiabétique utilisé depuis 1957 en France, et bien plus tardivement aux Etats-Unis, a tout d'abord montré son utilité dans la réduction des complications microvasculaires et macrovasculaires du diabète. L'utilisation de la metformine a d'abord été associée dans des études de registre à une diminution de l'incidence d'une grande variété de cancers. Ces données ont ensuite été confirmées dans des études *in vitro* et *in vivo*, à travers des travaux rétrospectifs puis prospectifs. Les preuves quant aux propriétés anti-inflammatoires de la metformine s'accumulent par ailleurs depuis le milieu des années 2000. Plusieurs études ont permis de montrer que l'emploi de la metformine aboutit à une réduction des taux de VEGF-A de manière indiscutable, notamment en association avec une diminution du stress oxydatif. L'ensemble de ces données est à mettre en parallèle avec celles relatives à l'association reliant l'obésité à l'inflammation, aux maladies cardiovasculaires et plus récemment à la plupart des cancers. Ces associations ont également été décrites dans le syndrome métabolique. Les mécanismes précis conduisant à cette triangulation des risques vasculaires, inflammatoires et oncologiques ne sont

pas encore suffisamment connus pour qu'un modèle physiopathologique global puisse être présenté. Il semble cependant que toutes ces pistes convergent vers le métabolisme oxydatif et la mitochondrie, le VEGF-A agissant comme un révélateur des perturbations métaboliques.

Ainsi, nous avons émis comme hypothèse de travail que la compréhension des mécanismes impliquant le VEGF-A dans les pathologies métaboliques (au sens clinique du terme), vasculaires et inflammatoires nécessitait une série d'études dédiées, basées cependant sur un socle conceptuel commun. L'existence de processus commun entre VEGF-A et les facteurs de risques des différentes maladies pourrait potentiellement expliquer la diversité des fonctions du VEGF-A dans l'ensemble des maladies précitées, ainsi que les liens les unissant entre elles.

L'endocrinologie est une discipline dans laquelle se croisent les pathologies métaboliques comme le diabète et les dyslipidémies avec les pathologies vasculaires et oncologiques. Ainsi cette discipline est une des plus concernées par la problématique du VEGF-A.

Nous avons construit dans notre équipe une approche intégrative et multidisciplinaire de l'étude du VEGF. Alors que le laboratoire venait d'obtenir sa labellisation U1122 « Interactions Gène Environnement en Physiologie Cardio-Vasculaire » (IGE-PCV) par l'INSERM, l'intégration d'une thématique relative à l'oncologie constitue une ouverture vers cette approche intégrée des risques vasculaires, inflammatoires et oncologiques. Cette approche combine des études pangénomiques d'identification des variants génétiques associés au VEGF, l'étude de leurs relations avec des phénotypes intermédiaires des maladies précitées et leur validation par une approche transcriptomique et de biologie classique des protéines.

Une étude réalisée en 2007 a tout d'abord montré la forte héritabilité des taux circulants de VEGF-A au sein de la cohorte STANISLAS, un échantillon d'adultes sains de la région Lorraine. Par la suite 4 SNPs situés dans 3 régions chromosomiques différentes ont été associés à 48% de la variabilité des taux plasmatiques du VEGF. Ces résultats ont été répliqués sur de populations issues du Centre de Ressources Biologiques IGE-PCV.

**Le but général** de cette thèse est d'investiguer les SNPs liés aux taux circulants du VEGF, les isoformes des ARN messagers et/ou les taux circulants de VEGF-A avec les paramètres lipidiques, les marqueurs de l'inflammation, les molécules d'adhésion, les paramètres thyroïdiens, l'obésité et la pression artérielle. En résumé, nous avons poursuivi comme objectif majeur de cette thèse de transposer nos travaux en physiopathologie cardio-vasculaire à la

cancérologie en ajoutant l'endocrinologie touchant les 2 pathologies chroniques. Ces investigations concernent à la fois des sujets sains et des patients.

Au final, nous avons donc poursuivi cinq **objectifs majeurs**, constituant la base de 5 groupes de projets différents mais complémentaires :

1. Etudier les relations entre les polymorphismes liés aux taux plasmatiques du VEGF-A (rs1993770, rs10738760, rs4416670, rs6921438) et les molécules d'adhésion et les molécules d'inflammation au niveau transcriptomique et des taux circulants.
2. Explorer les relations entre ces quatre SNPs et les composantes du syndrome métabolique.
3. Etudier la participation de ces quatre SNPs dans la variation interindividuelle des taux de lipides sanguins.
4. Examiner les relations entre les isoformes du gène du *VEGF*, les taux circulants et les paramètres thyroïdiens et immunologiques chez des individus contrôles et des patients traités pour une thyroïdite auto-immune.
5. Définir les relations entre les SNPs liés au VEGF-A et les paramètres thyroïdiens et immunologiques chez des individus contrôles et des patients traités pour une thyroïdite auto-immune.



# Matériel et méthodes

## Populations

### La cohorte STANISLAS

L'étude familiale STANISLAS s'est étendue de 1993 à 2005, avec 3 phases de recrutement. Au total de 1 006 familles résidant à Vandoeuvre-lès-Nancy (France) ont été incluses [266, 267]. Les sujets étaient considérés comme sains, c'est-à-dire exempts de maladies aiguës et/ou chroniques ; la présence de troubles chroniques (comme les maladies cardiovasculaires ou le cancer) et des antécédents individuels de maladie cardiovasculaire constituaient donc des critères d'exclusion. Le protocole de l'étude a fait l'objet d'une approbation par le comité d'éthique local de Nancy et tous les participants ont donné leur consentement éclairé écrit. La première phase de recrutement de 1993 à 1995 a permis d'inclure 1 006 familles biparentales (4 455 sujets) d'origine française avec au moins deux enfants de plus de six ans. Lors de la seconde visite de 1998 à 2000, 75% des familles initialement recrutées ont participé. Ce chiffre était de 375 pour la dernière visite, de 2003 à 2005 (Figure 5). 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.

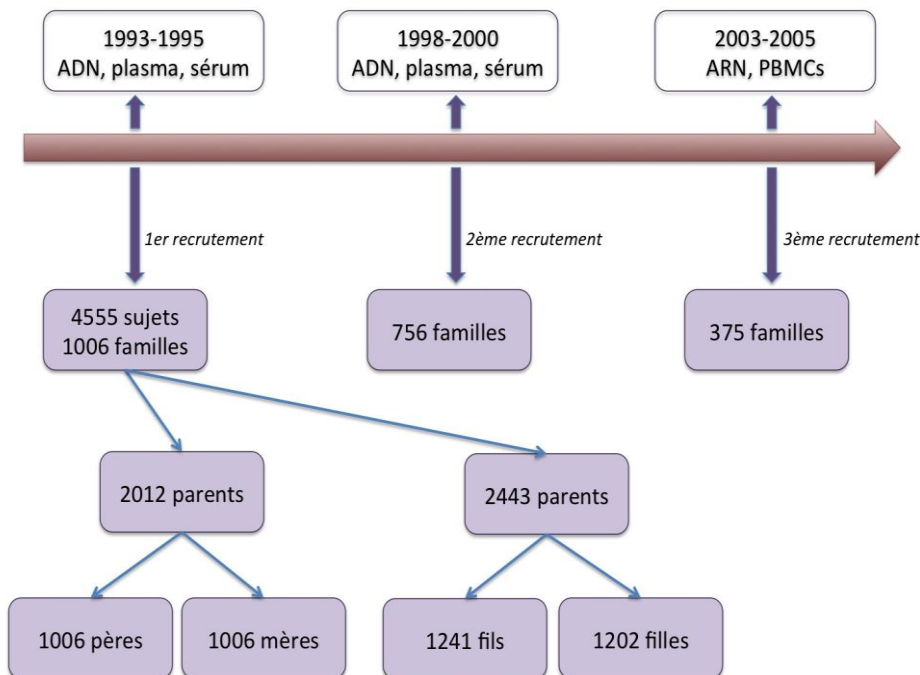


Figure 5 : Phases de recrutement de la cohorte STANISLAS [266, 267].

Pour chaque participant, le poids et la taille ont été mesurés en position debout avec des vêtements légers, sans chaussures. L'IMC a été calculé selon la formule de Quetelet: poids (kg) / taille (m<sup>2</sup>). Le tour de taille a été mesuré à mi-chemin entre le bord inférieur de la dernière côte palpable et le haut de la crête iliaque (os de la hanche), et la circonférence des hanches a été mesurée au niveau maximal sur des vêtements légers, en utilisant un ruban standard, sans aucune pression sur la surface du corps. Toutes les mesures ont été prises par des infirmières formées à ces procédures standard, et la fiabilité des appareils de mesure a été périodiquement vérifiée lors de la période d'étude. La pression artérielle PAS et PAD ont été calculées comme la moyenne de trois mesures effectuées dans des conditions normalisées avec un tensiomètre, avec le sujet en position couchée. En outre, les données ont été recueillies à l'aide de questionnaires standard, y compris les informations sur le mode de vie comme le tabagisme et les antécédents médicaux personnels. L'obésité centrale a été définie comme un tour de la taille > 102 cm chez les hommes et > 90 cm chez les femmes [266, 267]. Le syndrome métabolique était défini par les critères de la Fédération Internationale du Diabète [125].

Lors du recueil du sang, les participants devaient être à jeun depuis 12 heures. Le prélèvement avait lieu en position allongée, au niveau d'une veine antécubitale, dans deux tubes de modèle Vacutainer® (Becton Dickinson, Grenoble, France) :

- Des tubes dits secs (sans anticoagulant, bouchon jaune) 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.

- Des tubes d'acide Ethylenediaminetetraacetic (EDTA, bouchon mauve) pour ADN et plasma. 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 déterminées enzymatiquement avec un automate AU 640 (Olympus, Rungis, France).

La concentration en HDL 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 ont été calculées selon la formule de Friedewald [268] lorsque la concentration en TG était inférieure à 4.56 mmol/L et en l'absence de chylomicrons :

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

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

Les concentrations en ApoA-I, en apolipoprotéine B (ApoB), et CRP) 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 insuline ont été dosées grâce à un kit de dosage d'immunoenzymologie microparticulaire (Microparticulate Enzymatic ImmunoAssay ou MEIA) sur un automate IMx (Abbott laboratories, Abbott Park, IL, USA).

### **La population ApoEurope**

Cette cohorte regroupe 1145 participants considérés comme sains, sans lien de parenté, issus de différentes zones géographiques de l'Europe : Nancy (France), Crète (Grèce); Barcelone (Spain) et Lisbonne (Portugal). Les sujets prenant des médicaments antihypertensives étaient exclus. 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

### **La population iranienne**

Cette étude prospective dénommée MASHAD menée par l'Université de Mashhad des sciences médicales (Iran) était orientée sur les facteurs de risque cardiovasculaire. Les critères d'exclusion portaient sur les maladies aiguës et chroniques (tout événement cardiovasculaire, maladie rénale, endocrinienne ou oncologique). La cohorte comporte 357 individus sains, sans lien de parenté. 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

### **La population tunisienne**

Cette étude prospective menée à l'hôpital universitaire Bourguiba à Monastir (Tunisie) a permis de recruter 364 sujets considérés comme contrôles et 389 patients pris en charge pour une thyroïdite dans le service d'Endocrinologie. Parmi les 297 patients présentant une thyroïdite de Hashimoto, on comptait 279 femmes et 18 hommes ; l'âge moyen était de  $46 \pm 11$  ans. Parmi les 92 patients présentant une maladie de Basedow, on comptait 74 femmes et 18 hommes ; l'âge moyen était de  $46 \pm 12$  ans. Les critères diagnostiques standards fixés par l'Association Américaine des Endocrinologues Cliniques et de l'Association Américaine de Thyroïde (AAACE / ATA) [269, 270] ont été utilisés pour la définition de la maladie de Basedow et de la thyroïdite de Hashimoto. Les sujets contrôles étaient recrutés parmi des donneurs de sang sans maladie auto-immune cliniquement déclarée. Chez les patients comme chez les contrôles, la présence de liens de famille entre certains participants a été enregistrée pour être intégrée lors des études statistiques. Le protocole de l'étude a été validé par le comité d'éthique local de l'hôpital universitaire de Monastir. Plusieurs dosages ont été réalisés dans cette population pour nos études spécifiques après 6 mois de traitement: Ce traitement consiste en la prise orale d'antithyroïdiens de synthèse ou l'administration d'une dose d'iode radioactif  $I^{131}$ . Le traitement a commencé pour les patients hyperthyroïdiens lors du diagnostic initial. Par la suite, la surveillance de la TSH a pu permettre d'instaurer un traitement par lévothyroxine en cas de virage hypothyroïdien. Les patients hypothyroïdiens ont reçu de la lévothyroxine. Après 6 mois de traitement, tous les patients devaient être euthyroïdiens même si, dans des conditions réelles, la réponse au traitement n'est pas la même pour tous les patients, ainsi le statut hormonal peut être hypothyroïdien, hyperthyroïdien ou euthyroïdien ( $TSH \geq 6,82$  mUI / l,  $TSH \leq 0,28$  mUI / l, et de TSH entre 0,28 et 6,82 mUI / l respectivement).

Les dosages plasmatiques ont pu être réalisés sur 110 patients (21 maladies de Graves et 89 maladies de Hashimoto) et 55 contrôles. Le recueil des PBMC a pu être réalisé sur 71 patients (20 maladies de Graves et 51 maladies de Hashimoto) et 86 contrôles.

Les concentrations plasmatiques de TSH, FT4, et FT3 ont été réalisées par kits ELISA, Monobind Inc en utilisant le VAST (Versatile Analyse System Technology).

Les valeurs de référence dans le plasma étaient de 0,28-6.82 mIU/L pour la TSH, de 0,8-2 ng/dl pour la FT4 et de 1.4-4.2 pg/ml pour la FT3.

Les concentrations plasmatiques des anticorps anti-TPO et anti-thyroglobuline ont été réalisées par EURO DIAGNOSTICA® utilisant le kit ELISA DIASTAT® Anti-TPO.

Le seuil de positivité était de 1:100 pour les deux anticorps.

Les concentrations plasmatiques des anticorps anti-TSHR ont été réalisées par ALPHA DIAGNOSTIC INTERNATIONAL INC utilisant le kit ELISA anti-TSHR humaine.

### Mesures des molécules d'adhésion et d'inflammation (toutes les études)

Les concentrations plasmatiques en VEGF-A, en sélectines E, L et P, en ICAM-I IL-6 et en TNF- $\alpha$  ont été dosées grâce à des kits commercialisés par Randox Ltd by Evidence ® Investigator (Crumlin, UK) [271].

### Génotypage (pour toutes les études)

Les polymorphismes d'un seul nucléotide (SNP) rs6921438, rs4416670, rs6993770 et rs10738760, précédemment démontrés comme étant associés aux taux de VEGF-A (table 4), ont été génotypés par une biopuce spécifique à ces polymorphismes qui était effectuée par Randox Ltd (Crumlin, UK). Les caractéristiques des polymorphismes étudiés sont présentés dans le table 4.

Chromosome	SNPs	Allèle mineur	Allèle commun	Gènes de proximité	Féquence de l'allèle mineur
6	rs4416670	C	C	<i>C6orf223</i> et <i>MRPL14</i> (près du VEGF-A)	0,47
6	rs6921438	A	G	<i>C6orf223</i> et <i>MRPL14</i> (près du VEGF-A)	0,4
8	rs6993770	T	A	<i>ZFPM2</i>	0,28
9	rs10738760	G	A	<i>VLDLR</i> et <i>KCNV2</i>	0,48

Table 4 : Caractéristiques des polymorphismes étudiés [263].

## Transcriptomique

### Extraction des ARN totaux

L'automate « MagNA Pure LC le kit MagNA Pure LC RNA Isolation KIT–High Performance et (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) a été utilisé pour l'extraction des ARN totaux provenant des PBMC de la cohorte STANISLAS. Le protocole de traitement des échantillons est le suivant (Figure 5):

- A. Les échantillons de PBMC ( $2.10^6$  cellules/mL) sont stockés dans 200 $\mu$ L de tampon de lyse Instapure à  $-80^{\circ}\text{C}$  et subissent une lyse complémentaire par ajout de 520 $\mu$ L de Lysis/Binding Buffer du kit d'extraction et un passage au vortex (Figure 6A).
- B. Le transfert des échantillons dans la plaque Sample de 32 puits de l'appareil pour l'extraction selon le protocole External Lysis. Le principe utilisé est celui des billes de silice. Pour ce faire, une première étape de lyse complète la lyse des cellules (Lysis/Binding Buffer) est réalisé, en inactivant également les RNases, dans le but de libérer l'ARN de la cellule en évitant ainsi sa dégradation par ces dernières. Par ailleurs, la protéinase K complète la digestion les protéines cellulaires (Figure 6).
- C. Les particules magnétiques présentes à la surface des billes de silice se fixent sur les ARN suites aux modifications du milieu engendrées par les différents réactifs, notamment par diminution de la stringence et l'ajout de l'isopropanol (Figure 6).
- D. L'ADN génomique non désiré est éliminé par l'ajout d'une DNase, ce qui peut d'obtenir un échantillon ne contenant plus que de l'ARN (Figure 6D).
- E. L'isopropanol-est à nouveau utilisé pour permettre la liaison entre l'ARN et les particules magnétiques. L'utilisation d'un aimant induit la rétention des billes dans une pipette. Ainsi tous les résidus d'ADN, de protéines, de débris cellulaires sont éliminés lors d'un lavage.
- F. Les complexes ARN-billes sont lavés à plusieurs reprises à l'aide de wash Buffer.
- G. Le tampon d'élution permet de détacher les ARN des billes magnétiques qui sont à nouveau récupérées par l'aimant.

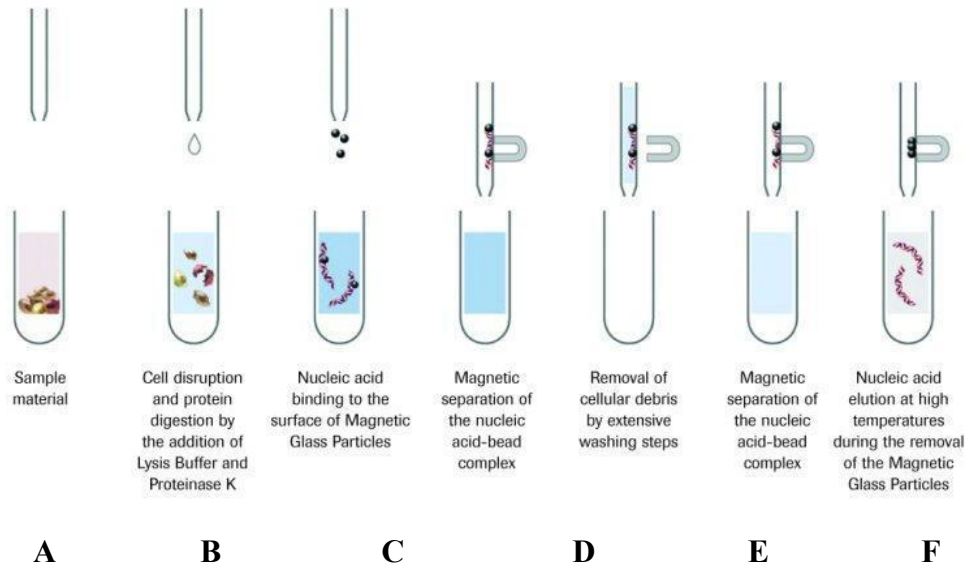


Figure 6 : Etapes de l'extraction des ARN totaux (source : MagNa Pure LC, Roche)

### Rétrotranscription des ARN totaux

La phase permettant d'obtenir l'ADNc (ADN complémentaire) à partir des ARN totaux des échantillons de PBMC (cohorte STANISLAS) fait intervenir des transcriptases inverses et un Thermocycler classique. Ces enzymes nécessitent l'équivalent d'un primer pour entamer la rétrotranscription. Les ARN messagers ayant une queue polyA, l'adjonction d'oligodTs (polyT) permet d'amorcer la réaction de manière non spécifique. Dans certains cas, il est possible d'ajouter un primer de désoxyribonucléotides spécifiques pour obtenir la rétrotranscription d'ARN ciblés.

- A. Pour permettre l'action des transcriptases inverses, l'ARNm doit être linéarisé. Pour ce faire, l'ARN est dénaturé par une période de 5 mn à 70°C.
- B. L'ARN est ensuite hybridé sur sa queue polyA à une amorce oligodTs (polyT).
- C. L'ajout des transcriptases inverses et des désoxyribonucléotides marque le début de la phase d'élongation, et par conséquent la production d'ADNc. Cette étape se fait à 42°C pendant 1h
- D. A la fin de cette période, l'appareil diminue la température à 4°C jusqu'à nouvel ordre de manière à limiter la dégradation de l'ADNc.

Les ADNc peuvent par la suite être conservés sur forme d'aliqots à -20°C.

## PCR en temps réel

Principe de l'amplification par PCR en temps réel

La réaction de polymérisation en chaîne (polymerase chain reaction, PCR) est un procédé d'amplification des quantités d'ADN présentes dans un échantillon. La spécificité de la PCR en temps réel (real time PCR, quantitative PCR, QPCR) est une technique d'amplification permettant de mesurer la quantité d'une séquence spécifique au sein d'un échantillon à chacun des cycles. La précision dépend cependant de la technique utilisée, limitant par la-même les comparaisons directes d'une méthode à l'autre. La quantification est basée sur une lecture spectrométrique (260 nm) de la fluorescence qui est 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 7). Nous utilisons une technique de SYBR Green pour les amplifications. Les molécules de SYBR Green se fixent sur l'ADN double brin permettant la quantification de l'ADN par la lecture de leur fluorescence (Figure 7).

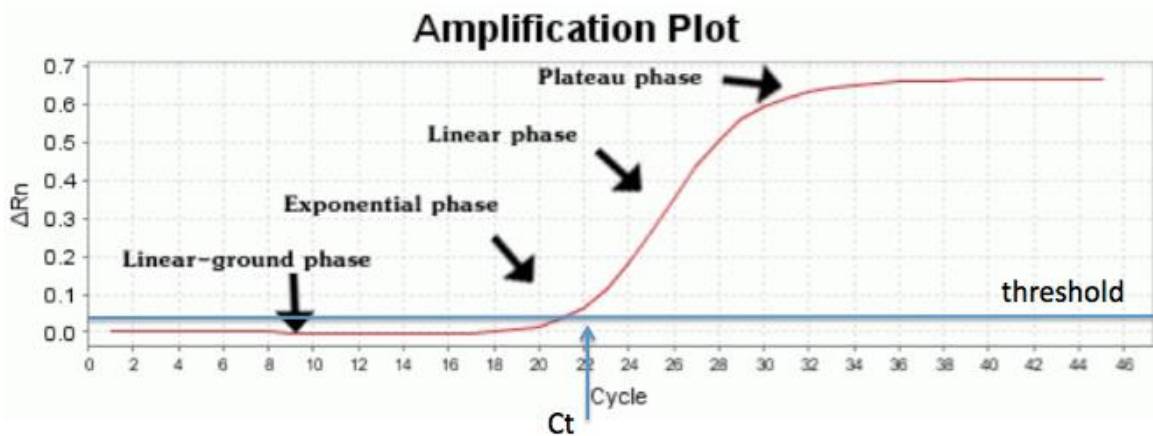


Figure 7 : Courbe d'amplification d'un gène cible par PCR en temps réel (Source Molecular)

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  $C_t$ , 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. Le Ct calculé est inversement proportionnel au logarithme décimal du nombre de copies initiales. Il apparaît toujours au cours de la phase exponentielle de la PCR.

La technique de PCR quantitative avec la technologie SYBR Green se déroule selon les quatre phases suivantes (Figure 8):

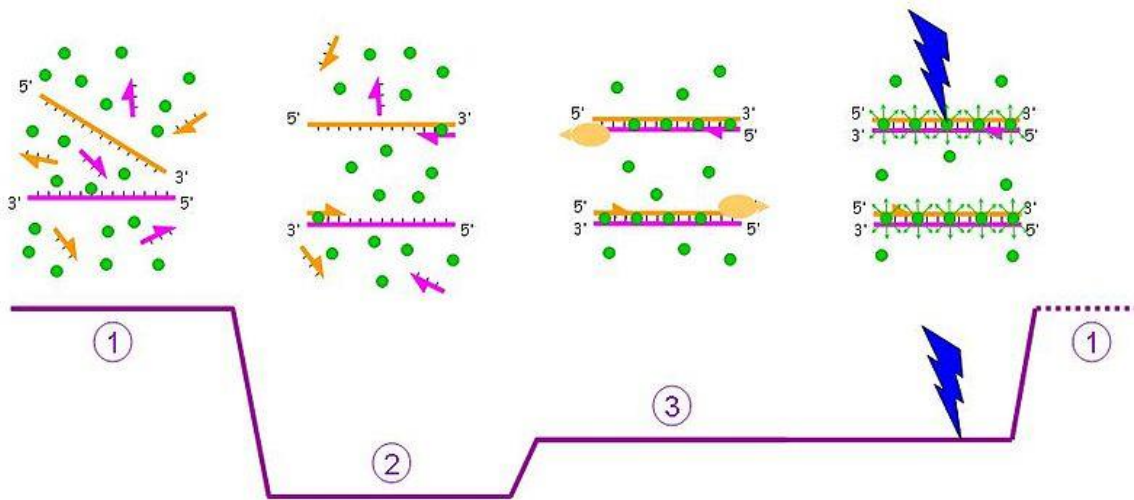


Figure 8: Mécanismes des phases de la PCR en temps réel avec la technologie SYBR Green (source Wikipedia)

1. Première phase d'amplification : dénaturation de l'ADN puis adjonction des amorces et du fluorophore SYBR Green libre.
2. Phase d'hybridation : hybridation spécifique des amorces. Le fluorophore se lie ensuite à l'ADN double brin nouvellement synthétisé. La liaison se traduit par une production de fluorescence.
3. Phase d'élongation : augmentation de l'incorporation des molécules de SYBR Green au fur et à mesure que l'ADN double brin est synthétisé avec pour conséquence une augmentation de la fluorescence.
4. Phase d'élongation finale : lorsque tout l'ADN double brin est synthétisé, la quantité maximale de SYBR Green incorporée est atteinte. La quantification est alors réalisée.

### *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. Le kit LightCycler FastStart DNA Master <sup>PLUS</sup> SYBR Green 1 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) utilisé pour cette réaction contient :

- une solution d'enzyme TaqPolymérase
- un mélange réactionnel de dNTP
- du chlorure de magnésium ( $MgCl_2$ )
- le tampon d'enzyme
- le fluorophore SYBR Green.

La solution enzymatique et le mélange réactionnel sont préalablement mélangés selon les consignes du kit. La préparation se poursuit par un mélange de 15 $\mu$ L/capillaire avec 4 $\mu$ L/capillaire de la solution réactionnelle du kit (1<sup>er</sup> mélange) ainsi qu'avec les amorces (concentration finale de 0,5 $\mu$ M). Le volume est complété par l'ajout d'eau qualité BioMol. Pour finir, 5 $\mu$ L d'ADN de chaque sujet sont ajoutés dans chaque capillaire.

### *Vérification de la spécificité des produits de PCR*

#### *Courbe de fusion*

La courbe de fusion explique comment les séquences spécifiquement amplifiées sont identifiées avec la technologie SYBR Green. Pour chaque séquence d'ADN double brin, il existe une température de fusion ( $T_m$ ) qui lui est propre. Alors que la température augmente, les brins complémentaires se dissocient, relargant en même temps le fluorophore SYBR Green et entraînant une chute de la fluorescence. Le signal enregistré par l'appareil diminue alors (Figure 9). La dérivée de cette courbe présente sur la même figure met en évidence un pic unique en cas d'amplification spécifique. Ce pic correspond au  $T_m$  de la molécule d'ADN double brin amplifiée ( $T_m$  sur la figure). Il s'agit en fait de la température à laquelle 50% des brins sont appariés et 50% sont

libres (simples brins). En cas de présence de plusieurs séquences différentes, le nombre de pic correspond au nombre de séquences différentes.

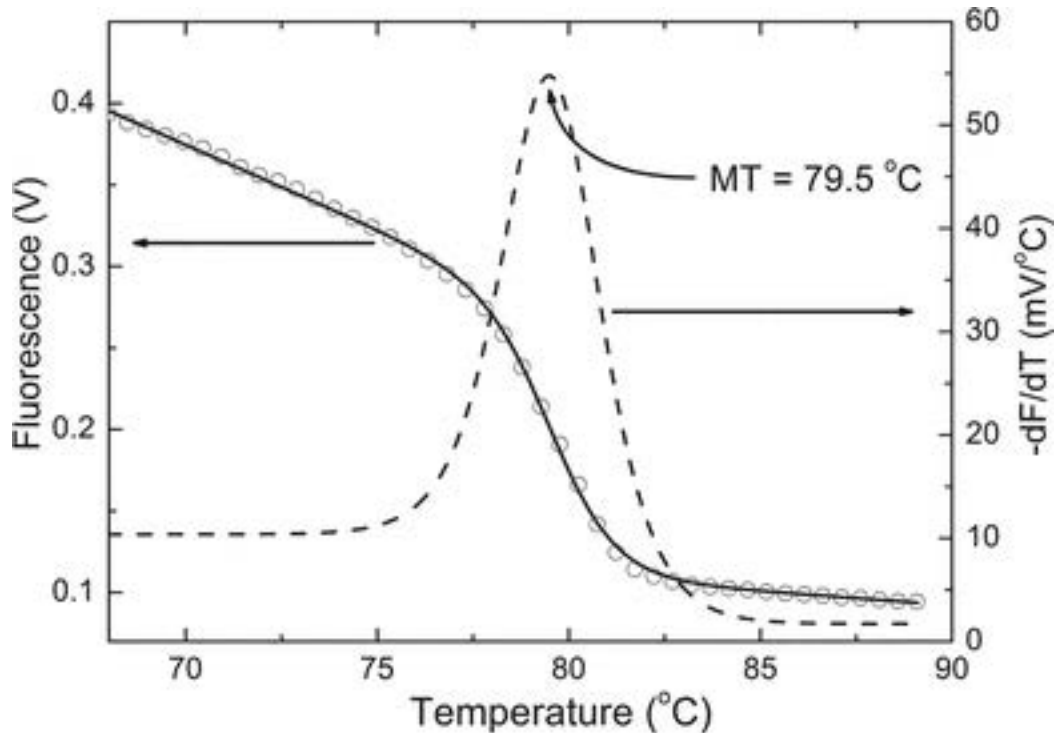


Figure 9: Courbe de fusion du gène amplifié par PCR en temps réel (source wikipedia)

La courbe de fusion (ronds) représente l'intensité de fluorescence en fonction de la température °C. Sa dérivée (ligne discontinue) ne présente qu'un seul pic de fusion dont la projection sur l'axe des températures donne le point de fusion du fragment d'intérêt.

#### Migration sur gel de polyacrylamide à 10 %

De manière à vérifier les produits des réactions issues des techniques de PCR temps réel, une migration sur gel de polyacrylamide à 10% est réalisée de manière à vérifier la taille des produits de PCR obtenus par amplification.

La composition de ce gel de polyacrylamide est la suivante :

- 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%

- 4,5  $\mu\text{L}$  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).

#### Purification des acides nucléiques

Les purifications ont été faites avec le kit "QIAquick PCR Purification Kit" (QIAGEN, Courtaboeuf, France). La réalisation nécessite une centrifugeuse et des colonnes avec une membrane de Silice qui ont pour rôle de retenir 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 ADNs provenant des échantillons grecs avaient été purifiés avant d'être dosés, puis dilués à  $5\text{ng}/\mu\text{L}$ , et enfin aliquotes et stockés à  $-80^\circ\text{C}$ . 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.

#### *Étapes de mise en place des gammes étalon*

##### Dosage des produits de PCR

Afin de construire les gammes étalons pour chaque gène étudié, le dosage des produits de PCR a été réalisé sur l'appareil NanoDrop 1000 Spectrophotometer. Cet appareil authentifie la pureté des échantillons ainsi que leur concentration en acides nucléiques ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ ). Nous pouvons ensuite calculer le nombre de copies par  $\mu\text{L}$  avec la formule suivante :

$$\text{Nombre de copies}/\mu\text{l} = \text{Concentration de la solution mère (g}/\mu\text{l}) \times N_A \times 1/\text{masse molaire de l'amplicon (g/mol)}$$

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

Pour obtenir la masse molaire de l'amplicon, il faut multiplier le nombre de paire de base par la masse molaire moyenne d'une paire de base, soit  $660\text{g/mol}$ .

## La gamme étalon

La construction de cette gamme de fait par des dilutions successives des produits de PCR, de 10 en 10 en allant de  $10^7$  à  $10^1$  copies/ $\mu\text{L}$ , puis par amplification PCR en temps réel (Figure 10).

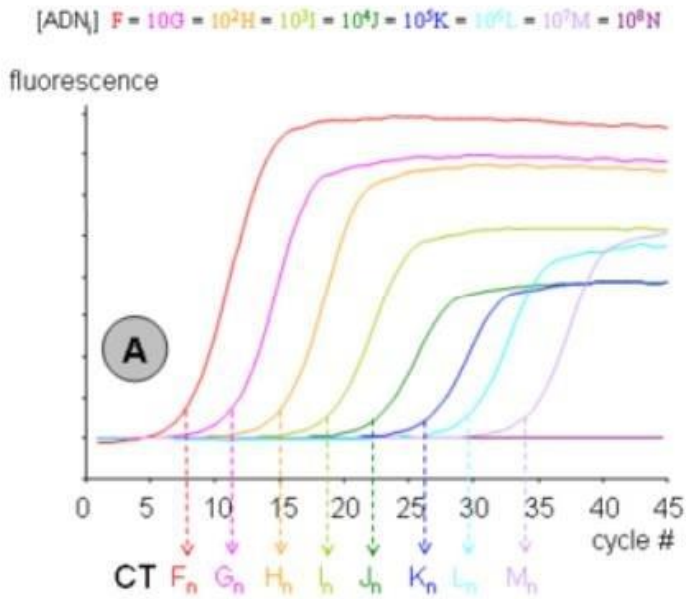


Figure 10: Représentation schématique de la gamme étalon (source Wikipedia)

La droite d'étalonnage moyenne est modélisée à l'aide d'une régression linéaire, représentant le logarithme de base 10 de la concentration du nombre de copies en fonction du nombre de cycle (Figure 10). La pente de cette droite doit s'approcher d'environ -3,332.

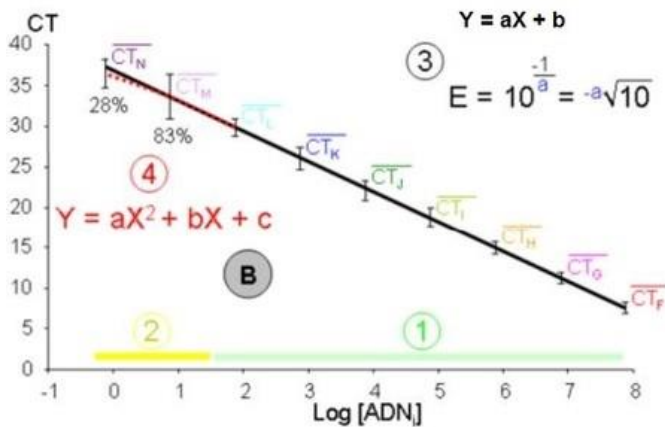


Figure 11: Représentation schématique de la droite d'étalonnage moyenne (source Wikipedia)

Le calcul de l'indice E permet de calculer l'efficacité de PCR. La construction d'une droite de régression à partir des nombres de cycles seuils permet de représenter 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 calculer l'efficacité E de la PCR pour l'amplification concernée (Figure 12). La valeur de E doit être comprise entre 1,5 et 2,2, sachant que 2 est la valeur idéale, correspondant à une amplification théorique de l'amplicon de deux fois par cycle.

$$E = (\text{indice de logarithme})^{-1/\text{pente}} = \sqrt[\text{pente}]{(\text{indice de logarithme})}$$

Figure 12 : Equation caractérisant la valeur de E en fonction de la pente et du logarithme.

## Analyses

### Test de l'équilibre de Hardy-Weinberg

L'équilibre panmictique, selon Hardy-Weinberg (Hardy étant un mathématicien anglais et Weinberg un médecin allemand) représente la base de la génétique des populations.

Pour qu'une population soit considérée comme idéale (car en équilibre), cette population doit répondre à 2 exigences:

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', ou tout du moins de taille suffisante pour minimiser les variations d'échantillonnage ;
3. Pas de perte ou de gain d'allèle : ni sélection, ni mutation, ni migration ;
4. Les croisements entre générations différentes ne sont pas permis: générations successives discrètes.

Dans ces conditions, la diversité génétique est préservée. La distribution des génotypes (et donc des phénotypes) reste stable dans le temps et la diversité génétique est assurée. Les fréquences alléliques restent également stables dans le temps et ne dépendent que des fréquences de la

génération initiale. Les fréquences génotypiques ne dépendent ainsi 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 situation d'équilibre sont :

$$\begin{aligned}f(AA) &= p^2 \\f(aa) &= q^2 = (1-p)^2 \\f(Aa) &= 2pq = 2p(1-p)\end{aligned}$$

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 validé à l'aide du test de Khi carré.

### **Analyses statistiques (pour toutes les études)**

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, les concentrations plasmatiques de molécules et les 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>) [272] et SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, États-Unis).

Les analyses génétiques concernant la cohorte tunisienne ont tenu compte des structures familiales. Les associations entre les génotypes et les maladies auto-immunes thyroïdiennes, le statut hormonal après traitement et la présence de taux significatifs d'anticorps durant le traitement ont été testées en utilisant une équation d'estimation généralisée ajustée pour l'âge et le sexe pour tenir compte des liens familiaux. Les associations des SNPs avec des variables continues comme la TSH, la FT4, la FT3 et le VEGF-A ont été testées par l'intermédiaire d'un modèle linéaire à effets mixtes également ajustés pour l'âge, le sexe et la structure familiale. Les analyses ont été réalisées à l'aide des logiciels GWAF en R. Les associations entre les taux de VEGF, les isoformes ARNm de *VEGF-A* et les paramètres cliniques ont été testées par des modèles de régression linéaire ajustée pour l'âge et le sexe. Les comparaisons des valeurs de VEGF-A et des isoformes ARNm de VEGF-A entre les différents groupes de patients ont été réalisées par des tests non paramétriques (Kruskal-Wallis et Mann-Whitney).



## Résultats et discussion

### Publication N°1

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

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

*Cytokine*. 2013;61(2):602–607. doi:10.1016/j.cyto.2012.10.024.

\*Co-premiers auteurs

L'inflammation est un mode de défense multimodal à un stimulus perçu comme nocif par l'organisme. Parmi les réactions engagées lors de cette inflammation, l'angiogenèse joue un rôle important. Le VEGF-A est l'un des principaux facteurs de cette angiogenèse, et est directement impliqué dans de nombreuses maladies inflammatoires comme la sclérose en plaques [273], la maladie de Crohn [274], les uvéites [275], la dermatopolymyosite [276], les glomérulonéphrites [277] ou encore les thyroïdites [1, 278]. Parmi les voies de signalisation connues, certaines sont communes au VEGF-A et aux CAM ainsi qu'aux molécules d'inflammation [279, 280]. Cette association entre VEGF-A et CAM est particulièrement documentée dans le versant inflammatoire des pathologies cardiovasculaires. L'étude de modèles d'artérite a mis en évidence l'implication de l'IL-6, ICAM-1, VCAM-1 et des sélectines E, L et P dans l'angiogenèse induite par l'inflammation. Ainsi, au cours d'une chimiothérapie, les molécules VEGF-A, ICAM-1, et sélectine P sont augmentées significativement après plusieurs cycles [281]. D'autres études ont montré l'implication du TNF- $\alpha$  et de la CRP, non retrouvée dans l'étude précédente, soulignant la variabilité des réactions inflammatoires [282, 283].

## Objectifs

- Etudier les associations entre le VEGF-A et les marqueurs d'adhésion et d'inflammation ICAM-1, VCAM-1, et les sélectines E, L et P, TNF- $\alpha$ , IL-6 et CRP dans le plasma de sujets considérés comme sains.
- Déterminer si une relation existe entre le profil d'expression de ces molécules dans les PBMCs.
- Préciser les liens possibles entre ces différentes molécules et les 4 polymorphismes liés au VEGF-A.

## Population

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

## Résultats

Les caractéristiques générales de la population étudiées, les niveaux d'expression des facteurs étudiés ainsi que la fréquence des différents SNPs dans les deux populations sont présentés dans la publication relative.

Les résultats sont regroupés selon les 3 axes précédemment cités dans les objectifs.

### *Association des taux plasmatiques de VEGF-A avec ceux de CAM et des molécules d'inflammation.*

Les taux plasmatiques de VEGF-A étaient associés *positivement* avec :

- Les taux plasmatiques d'ICAM-1 dans un modèle de régression ajusté pour l'âge, le sexe et l'IMC ( $\beta = 0,043$ ,  $P = 0,023$ ).
- Les taux plasmatiques de sélectine E ( $\beta = 0,085$ ,  $P = 0,039$ ).

Il n'existait pas d'autre corrélation entre les niveaux plasmatiques du VEGF-A et les autres protéines étudiées

*Association entre les isoformes des ARN messagers du gène du VEGF-A et l'expression des gènes des CAM et des molécules d'inflammation.*

La détermination de l'expression du gène du *VEGF-A* a montré que l'isoforme VEGF-A<sub>165</sub> était la plus exprimés par le PBMCs.

Dans des modèles de régression ajustés pour l'âge, le sexe et l'IMC, le taux d'ARNm total de *VEGF-A* était associé positivement aux niveaux d'ARNm du TNF- $\alpha$  ( $\beta = 0,412$ ,  $P = 0,015$ ). Les niveaux de l'isoforme VEGF-A<sub>145</sub> était positivement corrélés avec :

- les niveaux d'ARNm d'ICAM-1 ( $\beta = 0,353$ ,  $P = 0,021$ ).
- Les niveaux d'ARNm de sélectine L ( $\beta = 0,616$ ,  $P = 0,001$ ).
- Les niveau d' ARNm de TNF- $\alpha$  ( $\beta = 0,616$ ,  $P = 0,001$ ).

Les niveaux d'expression des autres isoformes n'étaient pas significativement associés aux niveaux d'expression des autres protéines étudiées.

*Association des polymorphismes rs4416670, rs6921438, rs6993770 et rs10738760 et leurs interactions épistatiques avec les taux plasmatiques et les transcrits de VEGF-A, de CAM et des molécules d'inflammation.*

Des interactions épistatiques ont été identifiées pour les niveaux plasmatiques du VEGF-A, sélectine E, TNF- $\alpha$ , ICAM-1 et IL-6 comme suit :

- une interaction entre rs6993770 (génotype TA et allèle T) et rs10738760 (allèle G) était associée avec des taux plus élevés d'ICAM-1 et de sélectine E.
- une interaction entre l'allèle T de rs6993770 et les allèles C de rs4416670 et A de rs6921438 était associée à l'augmentation des niveaux d'IL-6.
- une interaction de l'allèle A de rs10738760 avec les allèles T de rs4416670 et G de rs6921438 était associée à la diminution des niveaux d'IL-6.
- une interaction entre l'allèle A de rs6921438 et l'allèle A de rs10738760 était associée à une augmentation des taux de VEGF-A.
- une interaction entre l'allèle A de rs6921438 et l'allèle C de rs4416770 était associée à une augmentation des taux de TNF- $\alpha$ .

Le polymorphisme rs4416770 était positivement associé aux niveaux d'ARNm de sélectine L ( $\beta = 0,196$ ,  $P = 0,039$ ).

Aucune autre association significative n'a été mise en évidence entre les variants génétiques et les taux d'ARNm circulants.

### Discussion

Dans des conditions physiologiques, notre étude a montré des relations entre le *VEGF-A*, les CAM et les molécules de l'inflammation. La présence de corrélations multiples à plusieurs niveaux (taux plasmatiques, expression génique dans les PBMCs, déterminants génétiques communs, interactions épistatiques) souligne le fort lien fonctionnel entre ces molécules.

Dans ce travail, les taux circulants de VEGF-A sont positivement corrélés à ceux d'ICAM-1 et de sélectine E. Jusqu'à présent aucune autre étude n'a décrit de telles associations. Ces éléments prennent une valeur particulière dans le domaine de l'endocrinologie. En effet, les cliniciens sont à la recherche de bons marqueurs d'évolution de l'inflammation, particulièrement dans les domaines des thyroïdites. Dans ces thyroïdites, les taux circulants des molécules d'adhésion et d'inflammation ICAM-1, VCAM-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 [284], IL-6R [285] et sélectines E, L et P [286] sont plus élevés que chez des sujets contrôles. On sait également que le traitement par lévothyroxine et/ou sélénium a un effet anti-inflammatoire avec une baisse des taux de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 [284, 287]. L'expression intrathyroïdienne de sélectine E et VCAM-1 diminue elle aussi lors d'un traitement par iode [288]. Pour finir, au sein d'une cohorte de sujets thyroïdectomisés, la stimulation par la TSH (recombinante) semble provoquer un état inflammatoire puis l'augmentation de la TSH plasmatique est corrélée positivement aux concentrations plasmatique de ICAM1 et de sélectines E et L [289]. Sur la base de ces données, l'étude de la corrélation entre les taux circulants de VEGF-A, de ses produits d'expression, ainsi que des quatre polymorphismes liés au VEGF-A dans les thyroïdites apparaît comme une suite naturelle à cette étude, tant sur le plan hormonal qu'inflammatoire.

Par ailleurs, l'expression de l'ARNm de l'isoforme VEGF-A<sub>145</sub> est corrélée positivement avec l'expression d'*ICAM-1*, de *sélectine* E et de *TNF- $\alpha$* . Ceci tend à montrer l'existence d'une régulation transcriptionnelle commune ou d'autres mécanismes influant sur l'expression de ces molécules spécifiques dans les PBMCs.

## Conclusion

Cette étude démontre le lien fonctionnel important entre le VEGF-A et les molécules d'adhésion et d'inflammation à travers une stratégie étagée allant du niveau des protéines plasmatiques aux régulations épistatiques. Les taux plasmatiques de VEGF-A sont positivement corrélés à ceux d'ICAM-1 et de sélectine E ce qui n'a jusqu'à présent jamais été rapporté. C'est également le cas de l'association positive entre l'expression de l'isoforme VEGF-A<sub>145</sub> et celles de l'ICAM-1, de la sélectine L et du TNF- $\alpha$ , évoquant une régulation transcriptionnelle commune. L'ensemble de ces résultats ouvre la porte d'investigations complémentaires spécifiques dans le domaine de l'endocrinologie. L'inflammation représente un dénominateur commun entre le syndrome métabolique et les thyroïdites qui feront chacun l'objet d'études spécifiques ultérieures.

## Publication N°2

### **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 SD, Ndiaye N-C, Saleh A, Bahrami A, Varasteh A, Bonnefond A, Rancier M, Masson C, Herbeth B, Lamont J, Fitzgerald P, Chayour-Mobarhan M, Visvikis-Siest S.

Manuscrit soumis au journal *Gene*.

\*Co-premiers auteurs

Le syndrome métabolique est une entité nosologique faite d'un agrégat de 5 facteurs de risque cardiovasculaire. En dépit de sa construction orientée vers le diabète et les maladies cardiovasculaires, de nombreuses études cliniques et épidémiologiques associent de manière croissante le syndrome métabolique à d'autres risques comme le risque oncologique en raison de son lien avec l'obésité abdominale [290-293]. Le syndrome métabolique est par ailleurs associé à des taux plasmatiques de VEGF-A et sVEGFR2 accrus [294, 295]. Il semble donc pertinent de détailler à l'aide de la génomique les relations existant entre VEGF-A et syndrome métabolique.

#### **Objectifs**

Etudier les associations entre les SNPs liés au VEGF-A et la prévalence du syndrome métabolique dans deux populations supposées saines.

#### **Populations**

Quatre cent trois adultes de la cohorte STANISLAS et 357 individus sains de la cohorte Iranienne (MASHAD Study).

## Résultats

Les caractéristiques des deux populations sont détaillées dans la publication relative. Il existe des différences significatives de prévalence du syndrome métabolique entre les 2 populations. La population iranienne présente des prévalences fortes d'hypertension, d'obésité abdominale, d'hypertriglycémie et de taux bas de HDL. Les fréquences des polymorphismes liés au VEGF-A étaient en accord avec l'équilibre d'Hardy-Weinberg.

### *Association entre les taux plasmatiques de VEGF-A et le syndrome métabolique.*

Aucune association n'a été mise en évidence entre les taux plasmatiques de VEGF-A et le syndrome métabolique, aussi bien dans la cohorte STANISLAS que dans la cohorte MASHAD.

### *Association entre les SNPs liés au VEGF-A et le syndrome métabolique*

En ce qui concerne l'effet des variants, le rs10738760 était positivement associé au syndrome métabolique. La présence de l'allèle mineur A du rs10738760 était associé à un risque diminué de syndrome métabolique (OR = 0,47, P = 0,01).

Aucune association entre les SNPs et les composantes du syndrome métabolique liés au métabolisme du glucose n'a été mise en évidence.

Concernant l'effet des SNPs dans la population de réplique, une association positive existait entre le rs6993770 et le syndrome métabolique (OR = 1,5, P = 0,01).

La méta-analyse des 2 populations concernant les effets des polymorphismes sur le syndrome métabolique a confirmé l'effet protecteur de l'allèle mineur A du rs10738760 (OR = 0,73, P = 0,03).

## Discussion

Le syndrome métabolique est une entité nosologique complexe dont les définitions sont multiples. On peut ainsi en recenser 5 selon l'Organisation Mondiale de la Santé [123], le groupe européen d'étude de l'insulinorésistance [98], la Nation Cholestérol Education NCEP, l' 'International Diabetes Foundation' [125] et l' 'American Association of Clinical Endocrinologists' [126]. Il est à noter qu'il n'existe pas de code spécifique dans la classification internationale des maladies (CIM10), le code couramment utilisé étant le E88.9 (anomalie métabolique, sans précision). Ceci tend à montrer la complexe utilisation de ce concept en pratique clinique quotidienne et le manque de prise en compte à l'échelle des autorités de santé.

En dépit de ses imperfections, le syndrome métabolique est une entité hautement représentative de l'insulinorésistance. Il constitue également un bon marqueur du risque vasculaire [296] bien que cette notion reste controversée sur le plan pratique [297], certains auteurs insistant sur sa valeur épidémiologique et mécanistique [298].

Dans cette étude, aucune association n'existait entre ces SNPs et les composants du syndrome métabolique liés au métabolisme du glucose. La méta-analyse des 2 populations concernant les effets des polymorphismes sur le syndrome métabolique a confirmé l'effet protecteur de l'allèle mineur A du rs10738760. Ce polymorphisme concernant un loci situé en 9p24.2, entre les gènes KCNV2 (codant pour un canal potassique voltage dépendant) et VLDLR (codant pour le récepteur des lipoprotéines de très bas densité) n'a pas encore fait l'objet d'une caractérisation fonctionnelle à l'heure actuelle suffisante pour son effet protecteur vis à vis du syndrome métabolique sur la base de faits cliniques.

De nombreuses études ont décrit des SNPs associés à l'hypertension, mais seulement une a été réalisée lors d'un traitement antiangiogénique par sunitinib en contexte de cancer du rein métastatique [299]. Certains auteurs ont par ailleurs mis en évidence la valeur pronostique de l'apparition d'une hypertension lors d'un traitement par bevacizumab dans un contexte de cancer colique métastatique [300]. Ces éléments sont à mettre en parallèle avec l'amoncellement de preuves liant l'obésité et le syndrome métabolique au cancer [290-292]. Une méta-analyse publiée dans le Lancet en 2014 fait état qu'un quart des nouveaux cas de cancers survenus entre 1982 et 2002 serait attribuable à l'augmentation générale de l'IMC au sein de la population mondiale [301].



De manière complémentaire, le syndrome métabolique et l'obésité sont associés à une forte augmentation du stress oxydatif [302, 303]. Ce même stress oxydatif est associé à une augmentation du risque de cancer. L'accumulation des dérivés réactifs de l'oxygène et de l'azote induit des réactions inflammatoires ainsi que des lésions directement au niveau de l'ADN [304, 305]. Une corrélation positive existe entre le stress oxydatif et les taux plasmatiques de VEGF-A dans le cancer du poumon [306]. Par ailleurs une étude a montré qu'en contexte de stress, le VEGF-C protégeait les cellules cancéreuses prostatiques en activant la voie mTOR-2 et AKT-1, conduisant à une survie cellulaire et donc accroissant le risque de récurrence et de diffusion métastatique [307]. L'ensemble souligne à quel point le VEGF-A agit en tant que régulateur de l'homéostasie métabolique, bien plus qu'en simple garant de l'homéostasie vasculaire.

La metformine, utilisée habituellement en diabétologie, modifie le rapport entre l'oxydation du glucose aérobie et anaérobie en faveur de la première, en inhibant le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative. Elle est associée à une diminution des taux circulants de VEGF-A [308]. De premiers résultats font état d'effets positifs en terme d'incidence des cancers et de mortalité sous traitement. Des essais cliniques sont d'ailleurs actuellement en cours, tant sur le plan de la prévention que sur celui du traitement [309, 310].

Dès lors, il semble intéressant de poursuivre plus loin les investigations sur l'interaction entre le syndrome métabolique (et ses composantes) et la réponse aux traitement par antiangiogéniques dans l'ensemble des indications de ces derniers (cancers, maladies ophtalmologiques), ainsi que de mesurer l'impact de la prescription de metformine. Certaines études pourront donc éventuellement prendre un aspect pharmacogénomique dans le futur.

## Conclusion

La caractérisation de l'effet protecteur du rs10738760 sur le syndrome métabolique vient compléter le tableau associant le risque vasculaire et le risque oncologique. Elle ouvre également la porte à la préparation d'études pronostiques et pharmacogénomiques d'importance capitale au vu des coûts des antiangiogéniques et de la fréquence des pathologies dans lesquelles ils peuvent être employés.

## Publication N°3

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

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

*J Lipid Res.* 2013;54(2):535–541. doi:10.1194/jlr.P030551

\*Co-premiers auteurs

Le VEGF-A est un des facteurs angiogéniques les plus puissants. Son rôle dans les pathologies vasculaires est établi par de très nombreuses études. Dans le cadre d'une approche multifactorielle du risque vasculaire, il semblait naturel de déterminer comment le VEGF-A interagissait avec l'ensemble des facteurs de risques cardiovasculaires connus. A ce titre, les paramètres du bilan lipidiques tels que HDL et LDL sont considérés comme des modulateurs importants de ce risque vasculaire, modulateurs au sein desquels l'hérédité joue un rôle important. Sur le plan plasmatique, les patients présentant une dyslipidémie ont des taux accrus de VEGF-A circulant. Cette association a également été constatée entre les niveaux en HDL plasmatique et ceux en VEGF-A au sein d'une population japonaise de sujets sains. L'objectif d'une telle étude est d'identifier de nouvelles voies physiopathologiques sur la base de la mise en évidence d'associations non encore décrites.

### **Objectifs**

- Etudier les associations et interactions éventuelles des quatre SNPs liés au VEGF-A avec les taux de lipides sanguins

## Populations

L'étude a été réalisée sur deux populations indépendantes:

- 403 volontaires sains d'origine française (cohorte STANILAS)
- 1145 volontaires sains originaires de 4 pays européens : France, Grèce, Espagne, Portugal (cohorte ApoEurope)

## Résultats

### *Association entre les SNPs liés au VEGF-A et les taux circulants des lipides sanguins.*

Sur la cohorte STANISLAS :

- les SNPs rs6921438 et rs6993770 sont associés négativement avec les niveaux de HDL plasmatiques ( $\beta=-0,09\text{mmol/l}$ ,  $P=1.2\times 10^{-4}$  et  $\beta=-0,01\text{ mmol/l}$ ,  $P=8.3\times 10^{-3}$  respectivement).
- le SNP rs6921438 est associé positivement avec les niveaux de LDL plasmatiques ( $\beta=0,14\text{mmol/l}$ ,  $P=6.7\times 10^{-3}$ ).
- L'allèle mineur T du rs6993770 est associé avec une augmentation des niveaux de HDL.

Sur la cohorte ApoEurope :

- seule l'association entre rs6921438 avec les taux plasmatiques de HDL ( $\beta=-0,07\text{mmol/l}$ ,  $P=2.7\times 10^{-4}$ ) et LDL ( $\beta=0,12\text{mmol/l}$ ,  $P=8.4\times 10^{-3}$ ) étaient confirmée.

Sur l'ensemble des deux populations :

- après analyse conditionnelle sur les polymorphismes rs6993770 et rs6921438, seul le rs6921438 avait un effet significatif sur le niveaux de HDL plasmatiques dans les deux cohortes ( $\beta=-0,09\text{mmol/l}$ ,  $P=1.2\times 10^{-4}$  et  $\beta=-0,07\text{mmol/l}$ ,  $P=2.7\times 10^{-4}$ , respectivement).
- le polymorphisme rs6921438 serait responsable de 1% des variations plasmatiques de HDL et de 0,2% des variations de LDL.

La méta-analyse des résultats des deux populations a montré :

- une association du polymorphisme rs6921438 avec le HDL ( $\beta=-0,08\text{mmol/l}$ ,  $P=1.2\times 10^{-7}$ ) et le LDL ( $\beta=0,13\text{mmol/l}$ ,  $P=1.5\times 10^{-4}$ ) et
- que le polymorphisme rs6993770 n'était plus associé avec les taux plasmatiques de HDL,

L'analyse conditionnelle de la méta-analyse a confirmé que seul le polymorphisme rs6921438 déterminait les niveaux de HDL ( $\beta=-0,08\text{mmol/l}$ ,  $P=1.2\times 10^{-7}$ ).

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

Cette partie de l'étude a montré une association forte entre le polymorphisme rs4416670 et l'hypertension artérielle agissant sur la variation de l'APO-E ( $P= 3.5\times 10^{-3}$ ,  $1.6\times 10^{-3}$ , et  $1.7\times 10^{-5}$  respectivement dans les populations de découverte, de réplication et de méta-analyse). L'allèle mineur du polymorphisme rs4416670 est associé à une diminution de taux plasmatique d'APO-E dans le sous-groupe des patients hypertendus ( $\beta=-0,71\text{mg/l}$ ,  $-0,75\text{mg/l}$ , et  $-0,73\text{mg/l}$  respectivement).

L'interaction rs4416670 x hypertension artérielle n'est pas due à une relation directe des deux paramètres concernés.

### *Interactions épistatiques entre les polymorphismes liés au VEGF-A*

Dans la cohorte STANISLAS une interaction entre les polymorphismes rs6921438 et rs6993770 au niveau des taux plasmatiques de HDL ( $\beta=0,05\text{mmol/l}$ ,  $P=2.4\times 10^{-3}$ ) a été mise en évidence. Bien que ce résultat n'a pas été retrouvé au sein de la cohorte APO-Europe, la méta-analyse confirme cette association ( $\beta=0,03\text{mmol/l}$ ,  $P =2.6\times 10^{-3}$ ).

## **Discussion**

Cette étude a exploré les relations entre quatre SNPs liés au VEGF-A et les paramètres du métabolisme lipidique, tel qu'il peut être utilisé en clinique. Des associations fortes ont été retrouvées dans deux populations différentes de volontaires sains.

Le polymorphisme rs6921438 est associé de manière forte aux plasmatiques de HDL et de LDL, dans des sens contraires. Ce SNP est localisé en 6p21.1 entre le loc1001132354 (un gène d'ARN non traduit) et le gène c6orf223 (codant une protéine non identifiée). Il se situe 171Kb en aval du gène du VEGF-A.

Notre laboratoire a montré en 2011 [263] que l'allèle mineur du polymorphisme rs6921438 est associé à des faibles niveaux de VEGF-A. Ce polymorphisme explique 41% de la variabilité du VEGF-A plasmatique. La présente étude est la première à ce jour à montrer un lien entre ces 4 SNPs liés au VEGF-A et les paramètres lipidiques.

Chez les patients en bonne santé, le VEGF-A peut exercer un effet régulateur sur les lipoprotéines. Une association a été montrée chez des sujets exempts de pathologie cardiovasculaire entre l'hyperlipémie et les valeurs de VEGF-A plasmatiques, en dépit de l'absence de corrélation au sens strict. Parallèlement, une étude d'intervention sur un petit nombre de patients a montré qu'un traitement par fluvastatine et fénofibrate serait associé à une diminution du VEGF-A circulant [61]. Une étude japonaise a retrouvé une corrélation négative entre les taux de VEGF-A plasmatiques et les taux de HDL, chez des adultes sains de sexe masculin [65]. Le pendant féminin de cette étude (étude SAPHIR) a montré que les taux de VEGF-A étaient corrélés de manière négative avec ceux de cholestérol total et de LDL, toujours chez des sujets sains [64]. Il est cependant difficile de comparer formellement les études en raison de différences d'âge moyen assez nettes entre les populations, d'autant plus que l'âge est corrélé positivement avec les taux de VEGF-A [311]. L'ensemble montre que les taux plasmatiques du VEGF-A ne sont pas toujours associés aux paramètres lipidiques en situation physiologique. Il semble que les manifestations cliniques de l'effet du VEGF-A circulant sur les taux plasmatiques des lipides ne sont pas toujours détectables dans les situations physiologiques. Cette observation souligne l'importance des associations génétiques en général du fait qu'elles existent même dans les situations physiologiques, et de la génétique du VEGF-A en particulier rendant ces résultats utiles pour la prédiction précoce des maladies cardiovasculaires. Il en reste tout de même que d'autres études permettront, à travers des approches transcriptomiques, d'explorer plus spécifiquement les liens entre les SNPs et les voies métaboliques qui sont impliquées dans le métabolisme lipidique.

Dans notre étude, nous avons montré que le polymorphisme rs4416670 avait un effet sur le taux d'APO-E dans le cadre d'une interaction avec l'hypertension artérielle. Cette interaction ne peut être considérée comme une relation directe entre les deux composantes de cette interaction. L'effet de l'interaction entre ce polymorphisme et l'hypertension artérielle tend à diminuer les taux d'APO-E. Les niveaux d'APO-E sont associés par ailleurs au polymorphisme déjà décrit de l'APO-E. Notre équipe a été parmi les premières à montrer que le génotype *APO-E* 2/2 est

associé au cholestérol, à des taux élevés d'APO-E [312-314], l'APO- E 4/4 à des faibles niveaux d'APO-E et à la maladie d' Alzheimer[315].

### **Conclusion**

Cette étude originale a permis de mettre en lumière une régulation génétique commune entre le VEGF-A et les lipides sanguins. Bien que l'investigation des populations saines soit importante, elle reste cependant perfectible, ce qui constitue invariablement une source de perte de puissance des études des protéines dans ce domaine. Nos travaux en génétique sont importants pour améliorer la compréhension des relations entre les lipides sanguins et le VEGF-A ouvrant des perspectives pour une utilisation clinique. L'obtention de résultats concordants sur plusieurs populations confirmés par les méta-analyses souligne la force des liaisons mises en évidence. Pour finir, les résultats concernant l'APO-E laissent envisageables de futures explorations dans l'expression des maladies athéromateuses, et ouvrent une porte vers l'exploration de la maladie d'Alzheimer.

## Publication N°4

### **De nouveaux biomarqueurs dans les thyroïdites : les ARN messagers du VEGF-A (isoformes 145, 189 et 165 a et b).**

*Rancier M\**, Zaaber I\*, Stathopoulou MG, Saleh A, Marmouch H, Masson C, Murray H, Kurth MJ, Lamont J, Fitzgerald P, Mahjoub S, Said K, Bel Hadj Jrad Tensaout B, Mestiri S, Visvikis-Siest S.

Manuscrit soumis au journal *MOL CELL ENDOCRINOL*

\* Co-premiers auteurs

Les thyroïdites sont des pathologies inflammatoires auto-immunes dont la prévalence est de 27% pour les femmes et 7% pour les hommes [316-319]. Les deux pathologies les plus fréquentes sont la thyroïdite de Hashimoto (orientée vers l'immunité cellulaire T) et la maladie de Graves (orientée vers l'immunité humorale B). Alors que la maladie de Hashimoto expose à un risque d'hypothyroïdie, la maladie de Graves est caractérisée par une hyperthyroïdie. Le VEGF-A est une des molécules de l'angiogenèse la plus impliquée dans les processus pathologiques [3]. Son implication dans les pathologies inflammatoires spécifiques aux organes ou générales est également établie [181]. Il existe une dizaine d'isoformes du VEGF-A différentes, en rapport avec un phénomène d'épissage alternatif de régulation complexe, aboutissant à des formes pro- et antiangiogéniques [6, 320]. La répartition de ces isoformes peut être altérée dans des conditions pathologiques. Dans le cadre du cancer, la résistance au traitement antiangiogénique pourrait être médiée par une altération de ce dit profil [7].

Au cours des thyroïdites, les taux plasmatiques du VEGF-A ainsi que son expression tissulaire sont accrus tant pour la maladie de Hashimoto que pour la maladie de Graves (appelée maladie de Basedow en Europe) [278].

A l'heure actuelle, les rapports entre le climat thyroïdien et les taux plasmatiques de VEGF-A restent méconnus en raison de données discordantes [179, 180].

Cependant le profil des isoformes du VEGF-A reste inconnu dans le cadre des pathologies thyroïdiennes et plus spécifiquement des thyroïdites auto-immunes, de même que les liens moléculaires unissant l'inflammation et le climat hormonal aux taux circulants de VEGF-A. Ce travail apporte des éléments de réponse à ces questions.

### **Objectifs**

- Etudier les relations entre le VEGF-A plasmatique, les différentes isoformes d'ARNm du *VEGF-A* et les paramètres thyroïdiens hormonaux et immunitaires dans une population de malades HT et GD traitée pour 6 mois comparée à des témoins.

### **Méthodes et Populations**

Dans une population provenant de Tunisie, les niveaux des hormones thyroïdiennes et des anticorps ont été quantifiés simultanément avec le VEGF-A plasmatique et l'ARNm du VEGF-A (4 isoformes proangiogéniques ; VEGF-A<sub>121</sub>, VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF-A<sub>145</sub> et VEGF-A<sub>189</sub> et une isoforme antiangiogénique ; VEGF-A<sub>165b</sub>) chez des patients après une période de six mois de traitement. Le VEGF-A plasmatique a été mesurée dans 110 patients AITD (21 patients atteints de GD et 89 patients atteints de HT). Les isoformes du VEGF-A ont été quantifiés dans les PBMCs chez 71 patients (20 patients avec GD et 51 patients avec HT) et 86 témoins.

### **Résultats**

#### *Association entre les concentrations plasmatiques de VEGF-A et les paramètres hormonaux après traitement.*

Les taux de VEGF-A plasmatiques n'étaient pas différents entre les patients traités pour thyroïdites et les sujets contrôles, ni entre les différents groupes basées sur le statut hormonal final.



*Association entre les isoformes des ARNm du gène du VEGF-A et les paramètres hormonaux après traitement.*

- Après 6 mois de traitement, les niveaux de l'isoforme VEGF-A<sub>165</sub> étaient plus élevés chez les patients traités pour une maladie de Graves en comparaison avec les sujets contrôles (P = 0,040).
- Les niveaux de VEGF-A<sub>189</sub> étaient plus faibles chez tous les patients traités pour une maladie de Graves (P=0,000) ou de Hashimoto (P=0,000) par rapport aux sujets contrôles et pour l'ensemble des patients traités (P = 0,000) en comparaison avec les sujets contrôles.
- Les niveaux de VEGF-A<sub>165b</sub> étaient plus élevés chez les patients traités pour une maladie de Hashimoto par rapport à ceux traités pour une maladie de Graves (P = 0,017).
- Les niveaux de VEGF-A<sub>165b</sub> étaient plus élevés chez les patients en hypothyroïdie par rapport à ceux en euthyroïdie (P = 0,043).

*Analyse par régression linéaire des taux de VEGF-A plasmatiques et des transcrits d'ARNm après traitement en fonction des paramètres hormonaux.*

- Les taux de VEGF-A plasmatiques étaient corrélés positivement aux taux de FT4 plasmatiques chez les sujets contrôles ( $\beta = 0,34$ , P = 0,011).
- Les niveaux de VEGF-A<sub>145</sub> sont associés avec le statut thyroïdien uniquement chez les patients traités pour une maladie de Hashimoto ( $\beta = -2,293$ , P = 0,001) dans un modèle ajusté pour le VEGF-A total, l'âge et le sexe.
- Seul les niveaux de FT4 plasmatiques et ceux de VEGF-A<sub>145</sub> sont associés négativement pour la population totale ( $\beta = -0,026$ , P = 0,005), mais pas dans les différents sous-groupes.

*Analyse par régression linéaire des taux de VEGF-A plasmatiques et des isoformes des ARNm du gène du VEGF-A en fonction des paramètres immunitaires après traitement.*

- La positivité des anticorps anti-TPO est associée à des taux élevés de VEGF-A<sub>165</sub> dans la population entière ( $\beta = 0,426$ ,  $P = 0,025$ ), mais pas dans les différents sous-groupes.

## **Discussion**

Notre étude a montré pour la première fois que le VEGF-A plasmatique n'est associé ni au statut hormonal, ni aux indices cliniques chez les patients traités pendant 6 mois.

Le fait que la FT4 soit corrélée positivement au VEGF-A plasmatique chez les sujets contrôles pourrait être expliqué par une contribution directe de la FT4 dans la régulation de la production de VEGF-A., sans interférence avec les phénomènes inflammatoires. Alors que des études précédentes ont montré que les taux plasmatiques de VEGF-A étaient plus élevés chez les patients hyperthyroïdies en comparaison à des sujets sains [179], une autre a montré que les taux étaient supérieurs chez les sujets en hypothyroïdie [180]. Des études précédentes ont montré que l'hypothyroïdie et l'euthyroïdie ne sont pas associées à une variation significative des niveaux plasmatiques de VEGF-A [179]. Cette discordance apparente peut être expliquée par deux modes de stimulation du VEGF-A. La première sera hormone thyroïdienne-dépendante, comme l'a montré une étude utilisant un agoniste des récepteurs des hormones [321, 322]. La seconde explication est celle d'une origine TSH-dépendante de la synthèse de VEGF-A, comme une autre étude a montré [278]. D'une manière plus simple, une TSH haute peut avoir un effet compensatoire par rapport à de faibles taux d'hormones thyroïdiennes circulantes.

Dans cette étude, les taux de VEGF-A ne sont pas différents dans les thyroïdites auto-immunes en comparaison avec les contrôles ou entre maladies de Graves et de Hashimoto. Ceci pourrait au final s'expliquer par le phénomène cité ci-dessus. En dépit de ces hypothèses, il reste difficile de déterminer précisément si la variation plasmatique de VEGF-A est la cause ou la conséquence dans les changements de statut hormonal et immunitaire dans les thyroïdites. Ces données pourraient également s'expliquer par le fait que le dosage de VEGF-A employé ne contient pas l'ensemble des isoformes connues du VEGF-A (il contient essentiellement le VEGF-A<sub>165</sub>) et revêt donc un caractère perfectible.

L'absence d'association trouvée entre les taux plasmatiques de VEGF-A après traitement et ceux de TSH supporterait l'hypothèse que, même si la TSH est un outil acceptable de dépistage, la FT4, en raison de sa corrélation positive avec les taux circulants de VEGF-A chez les sujets contrôles, représente une mesure plus sensible et donc plus adaptée à la sévérité dans les thyroïdites auto-immunes.

Les associations entre les niveaux d'expression des 5 isoformes du VEGF-A (VEGF-A<sub>121</sub>, VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF-A<sub>145</sub>, VEGF-A<sub>189</sub> pour les formes proangiogéniques et VEGF-A<sub>165b</sub> pour la forme antiangiogénique) et le statut thyroïdien et les indices cliniques de ces patients a livré de précieux renseignements.

Le résultat principal concerne les faibles niveaux de VEGF-A<sub>189</sub> chez l'ensemble des patients traités pour une thyroïdite, par rapport aux sujets contrôles. En dépit de son apparence paradoxale puisque le VEGF-A<sub>189</sub> a un effet chémoattractif pour les neutrophiles, cette donnée supporte une possible implication du VEGF-A dans l'immunopathologie des thyroïdites.

De plus, l'isoforme VEGF-A<sub>165</sub> est plus exprimée chez les patients traités pour une maladie de Graves par rapport aux sujets contrôles, alors que ceci n'est pas observé chez les patients traités pour une maladie de Hashimoto. Ainsi, le VEGF-A<sub>165</sub> montre une spécificité particulière pour la maladie de Graves. De plus, la forme antiangiogénique VEGF-A<sub>165b</sub> était plus élevée chez les patients traités pour une maladie de Hashimoto que chez ceux traités pour une maladie de Graves, ce qui confère un rôle tout spécifique à chacune des formes pro- et antiangiogénique de VEGF-A<sub>165</sub> dans la caractérisation de chacune des deux maladies au sein des thyroïdites. Il doit être souligné que ces résultats surviennent en l'absence de différences significatives de niveaux de VEGF-A plasmatiques. Cette différence de VEGF-A<sub>165</sub> entre les patients traités pour une maladie de Graves et les contrôles apparaît logique considérant les arguments exposés ci-dessus concernant l'hyperthyroïdie [179]. La différence entre les patients traités pour une maladie de Graves et une thyroïdite de Hashimoto concernant les niveaux de VEGF-A<sub>165</sub> apparaît contre-intuitive pour la même raison, puisque le VEGF-A<sub>165b</sub> montre des propriétés antiangiogéniques [323]. Ceci s'intègre cependant avec notre résultat relatif à l'accroissement du VEGF-A<sub>165b</sub> chez les patients hypothyroïdiens en comparaison avec les patients euthyroïdiens après le traitement.

Les niveaux du VEGF-A<sub>165</sub> étaient également associés positivement avec les anticorps anti-TPO pour la population totale. Ceci souligne le rôle de cette isoforme dans l'inflammation résiduelle, puisque les anticorps anti-TPO sont trouvés dans ces deux formes de thyroïdites. L'absence de

corrélation avec les anticorps anti-thyroglobuline souligne la meilleure sensibilité des anticorps anti-TPO.

Les niveaux de VEGF-A<sub>145</sub> sont associés négativement avec les niveaux de FT4 dans la population entière, ce qui peut être considéré comme un index d'angiogenèse sélective qui semblerait plus prononcée dans la maladie de Hashimoto. En fait, dans un modèle incluant le VEGF, et le statut thyroïdien, ce dernier était négativement associé avec les niveaux de VEGF-A<sub>145</sub> chez les patients traités pour une maladie de Hashimoto. Ceci pourrait être expliqué par les difficultés rencontrées pour atteindre l'euthyroïdie, ce qui peut être dû à la dose et/ou à la durée du traitement, mais aussi à des limitations ethnographiques à l'observance des traitements.

Une précédente étude de notre équipe a montré que le VEGF-A<sub>145</sub> était corrélé positivement à des molécules de l'inflammation (ARNm d'ICAM-1, sélectine L et TNF- $\alpha$ ) [86]. De plus, le traitement par lévothyroxine provoque en lui-même une augmentation des niveaux de VEGF-A dans le sérum [324]. Ainsi, on peut faire l'hypothèse que l'inflammation hormono-induite implique des isoformes de VEGF-A spécifiques.

Pris dans leur ensemble, les résultats de cette étude permettent d'envisager de futures études pharmacogénomiques. En fait, le profil des isoformes du VEGF-A peut avoir de potentielles applications en médecine personnalisée.

Les déterminants des taux de VEGF-A plasmatique et des isoformes pro- et antiangiogéniques chez des patients traités pour des thyroïdites auto-immunes depuis 6 mois constitue une approche originale. Cependant, l'absence de données disponibles (plasma, ARN) au moment du diagnostic constitue une faiblesse indéniable de cette étude dans la mesure où elle interdit toute approche longitudinale des changements des profils des isoformes du VEGF.

## Conclusion

Cette étude montre les caractéristiques spécifiques de patients traités depuis 6 mois pour une thyroïdite auto-immune, comme la diminution du VEGF-A<sub>189</sub>, le rôle spécifique du VEGF-A<sub>165</sub> chez les patients traités pour une maladie de Graves, du VEGF-A<sub>165b</sub> chez les patients traités pour une maladie de Hashimoto et la diminution du VEGF-A<sub>165b</sub> chez les patients hypothyroïdiens après traitement. Nous avons démontré que les niveaux de l'isoforme VEGF-A<sub>145</sub> sont déterminés :

- par les taux de FT4 chez tous les patients traités
- par le statut thyroïdien seulement chez les patients traités pour une maladie de Hashimoto.

L'association des niveaux du VEGF-A<sub>165</sub> à la positivité des anticorps anti-TPO chez tous les patients.

Au final, la FT4 est associée aux taux plasmatiques de VEGF-A chez les sujets contrôles uniquement. Ces résultats démontrent l'implication complexe du VEGF-A à travers l'épissage alternatif de ses produits d'expression dans la physiopathologie et le pronostic des thyroïdites auto-immunes.

Sur la base de ces éléments, il semble intéressant d'étudier les isoformes du VEGF-A dans la prise en charge du nodule thyroïdien et des cancers thyroïdiens et endocrines.

## Publication N°5

### **Les polymorphismes liés aux niveaux plasmatiques du VEGF-A sont impliqués dans les thyroïdites auto-immunes.**

Zaaber I\*, Rancier M\*, Stathopoulou MG, Saleh A, Marmouch H, Masson C, Murray H, Kurth MJ, Lamont J, Fitzgerald P, Mahjoub S, Said K, Bel Hadj Jrad Tensaout B, Mestiri S, Visvikis-Siest S.

Manuscrit soumis au *Journal of Endocrinology*

\* Co-premiers auteurs

Les thyroïdites sont des pathologies inflammatoires auto-immunes dont la prévalence est de 27% pour les femmes et 7% pour les hommes [316-319]. Les deux pathologies les plus fréquentes sont la thyroïdite de Hashimoto (HT) (orientée vers l'immunité cellulaire T) et la maladie de Graves (GD) (orientée vers l'immunité humorale B). Alors que la maladie de Hashimoto expose à un risque d'hypothyroïdie, la maladie de Graves est caractérisée par une hyperthyroïdie. Le VEGF-A est une des molécules de l'angiogenèse la plus impliquée dans les processus pathologiques [3]. Son implication dans les pathologies inflammatoires spécifiques aux organes ou générales est également établie. Quatre SNPs identifiés par une étude pangénomique rendent compte pour près de la moitié de la variabilité plasmatique du VEGF-A [263], qui a une forte héritabilité (>60%) [325].

D'un point de vue général, les rapports entre le climat thyroïdien reste méconnus en raison de données discordantes [179, 181]. Dans le cadre nosologique spécifique des thyroïdites auto-immunes, l'expression tissulaire du *VEGF-A* ainsi que les taux plasmatiques sont stimulés à la fois dans la maladie de Graves que dans celle de Hashimoto [278]. Dans l'étude précédente nous avons montré que le profil de production des différentes isoformes du VEGF-A diffère entre les 2 formes de thyroïdites. C'est donc naturellement que nous avons décidé d'étudier les rôles des différents polymorphismes liés à la variabilité plasmatique du VEGF-A dans la physiopathologie de ces thyroïdites auto-immunes.

## Objectifs

- Définir les relations entre les SNPs liés au VEGF-A et les paramètres thyroïdiens et immunologiques chez des individus contrôles et chez des patients traités pour une thyroïdite auto-immune.

## Résultats

Notre étude a mis en évidence plusieurs associations entre 4 SNPs liés aux variations plasmatiques du VEGF-A avec des paramètres thyroïdiens :

- l'allèle A du polymorphisme rs10738760 était associé à un sur-risque de maladie de Graves en comparaison avec la maladie de Hashimoto ( $\beta = 0,54$ ,  $P = 0,003$ ) et avec les sujets contrôles ( $\beta = 0,46$ ,  $P = 0,006$ ).
- l'association du polymorphisme rs692148 avec le risque de maladie de Graves a été montrée. L'allèle A de ce SNP est associé à un sur-risque vis à vis de cette maladie ( $\beta = 0,324$ ,  $P = 0,05$ ).
- Aucun résultat n'était significatif concernant l'association des 4 SNPs avec la maladie de Hashimoto.
- L'allèle T du polymorphisme rs4416770 est associé à un risque accru d'hyperthyroïdie chez les patients, après 6 mois de traitement, indépendamment du diagnostic initial ( $\beta = 1,82$ ,  $P = 0,049$ ).
- L'allèle A du polymorphisme rs10738760 est associé à des taux circulants de T3 libre nettement accrus ( $\beta = 0,716$ ,  $P = 0,024$ ).
- Aucun résultat significatif ne concernait les taux plasmatiques de VEGF-A après traitement.

## Discussion

La médecine vit à l'occasion de l'émergence des thérapies ciblées et du développement des analyses génétiques et fonctionnelles à haut débit une révolution. Alors que ces techniques d'analyses ont suscité un grand espoir dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques des maladies, les résultats concrets sur un plan mécanistiques et cliniques s'avèrent en deçà des espérances. En un mot, le nombre de questions et de possibilités augmente beaucoup plus vite que ce que notre capacité de synthèse nous permet d'assembler afin de créer des ensembles nosologiques ou épidémiologiques utilisables.

Ce travail est basé sur un ensemble de travaux épidémiologiques antérieurs qui ont permis de définir une arborescence du VEGF-A dans les pathologies métaboliques, vasculaires et inflammatoires [325, 326]. Notre équipe a montré que l'héritabilité des taux circulants de VEGF-A au sein des familles est de 60,5% de la variance totale de ce trait [325]. Cette forte héritabilité de VEGF-A, qui revêt un caractère unique parmi la pathologie médicale humaine, laisse supposer un potentiel important de la « VEGF-omique » pour fournir des biomarqueurs d'intérêt clinique.

L'hypothèse a conduit notre équipe à identifier par une étude pangénomique 4 polymorphismes liés au VEGF-A (4 SNPs situés sur 3 chromosomes) qui ensemble expliquent près de 50% de la variabilité des taux circulants de VEGF-A [263]. Ce chiffre constitue en lui-même une exception dans les domaines des traits quantitatifs complexes dont la génétique ne parvient habituellement à expliquer qu'à hauteur de 20%. Ainsi, à l'opposé du modèle habituel, les données des explorations du VEGF-A peuvent être intégrées dans des algorithmes de prédiction de risque.

Dans ce travail, notre étude montre pour la première fois que les polymorphismes liés au VEGF-A précités sont associés à un risque accru de maladie de Graves (par rapport à la maladie de Hashimoto) et avec le risque d'hyperthyroïdie après 6 mois de traitement. Ces résultats respectent la vision physiopathologique de cette maladie connue pour son caractère hypervasculaire clinique. En effet, le goitre de la maladie de Graves est souvent qualifié de « soufflant » en rapport avec l'intense hypervascularisation de la glande que l'on entend sous forme de souffle lors de son auscultation. Cette caractéristique se retrouve également lors de l'exploration ultrasonographique des 4 artères nourricières en doppler pulsé [176, 327, 328]. Nous avons également montré que le polymorphisme rs10738760 était associé à des taux de FT3



plus élevés. Pour finir, aucune association n'a été trouvée avec le taux plasmatiques de VEGF. Ces éléments renforcent l'intérêt diagnostique de la génétique du VEGF-A.

Des études antérieures explorant les relations entre les polymorphismes du *VEGF-A* et les taux circulants de VEGF-A n'ont donné que des résultats mitigés. Plusieurs études ont montré une association positive avec quelques polymorphismes (rs699947, rs1570360, rs833061, rs2010963, rs3025039) [329-332], alors que d'autres n'ont trouvé aucun lien [333, 334]. Les données dans la littérature sont minces concernant l'association d'un polymorphisme du gène du *VEGF-A* avec les thyroïdites auto-immunes. Seule l'étude de Vural réalisée en Turquie cherché à mettre en évidence une relation entre la survenue de la maladie de Graves et les SNPs a-2578C, T-460C et G+405C du gène du *VEGF-A* [181]. Cette étude a montré que seul le polymorphisme +405 est associé à la maladie de Graves et le -2578 est associé à la production d'anticorps. Ces résultats mitigés peuvent être dus à un manque de pertinence des polymorphismes étudiés en terme d'impact sur la variabilité des taux circulants de VEGF-A. Aucun de ces SNPs n'a été associé avec les taux plasmatiques du VEGF-A dans l'analyse pangénomique. Cependant, il est intéressant de rappeler que l'allèle A du polymorphisme -2578 du gène du *VEGF-A* a été associé à une incidence accrue du cancer de la thyroïde, dans le cadre d'une étude réalisée à Taiwan sur 332 patients [230]. Cet élément montre qu'un impact clinique potentiel peut être supputé, mais aucune étude de réplication n'a encore été réalisée.

Les 4 SNPs identifiés en analyse pangénomique sont situés proche des gènes *VEGF-A* et *MRPL14* (locus 6p21.2), dans le gène *ZFPM2* (locus 8q23.1) et entre les gènes *VLDLR* et *KCNV2* (loci 9p24.2). Jusqu'à présent, aucun lien n'a été fait entre ces loci et les thyroïdites auto-immunes.

L'allèle A du polymorphisme rs10738760 était plus fréquent dans le groupe atteint par la maladie de Graves que dans les 2 autres groupes. L'allèle A du polymorphisme 6921438 était plus fréquent dans le groupe atteint par la maladie de Graves en comparaison avec les contrôles. Ces résultats soulignent le lien fort avec la maladie de Graves à l'intérieur même des thyroïdites. Même si la maladie de Graves requiert un fort niveau de néovascularisation, ceci ne peut pas être la seule explication pour ces résultats. Ainsi, une étude précédente de notre équipe a montré une interaction épistatique entre le polymorphisme rs10738760 x rs6921436 sur les taux plasmatiques d'IL-6 [335]. Cette molécule et son récepteur semblent avoir un impact fonctionnel particulièrement fort dans la maladie de Graves, avec des taux élevés avant traitement [336,

337], puis diminués après traitement [338, 339]. Plusieurs chercheurs ont apporté des éléments de pondération vis à vis de cette position [340, 341]. Il semble donc au final que les deux polymorphismes agissent ensemble dans un effort promoteur fort de la réaction immunitaire via l'augmentation des taux circulants d'IL-6. Pour finir, L'hyperthyroïdie est en elle-même associée avec une production accrue de VEGF-A [179, 342]. Ainsi, il est difficile de déterminer si le VEGF-A joue un rôle à travers l'inflammation ou la goitrigénèse ou comme conséquence de l'angiogénèse induite par l'hyperthyroïdie, néanmoins, l'IL-6 semble y jouer un rôle déterminant.

Par son rôle dans la migration et la prolifération des cellules endothéliales, le VEGF-A régule un grand nombre de phénomènes inflammatoires. Il stimule aussi l'adhésion [321, 322] des leucocytes à l'endothélium et promeut la chémotaxie en même temps que l'angiogénèse. Chez les patients ayant une thyroïdite auto-immune, les taux de VEGF-A plasmatiques étaient élevés et il existait une néoangiogénèse intrathyroïdienne [278]. Une étude récente réalisée dans une population chinoise a trouvé des taux circulants de VEGF-A diminués chez des patients hyperthyroïdiens en comparaison avec des sujets contrôles [180]. Une autre étude a montré des résultats opposés, qui étaient appuyés par l'induction de facteurs comme l'Ang-1, Ang-2, et sTie-2 [343]. Dans la présente étude, les niveaux de VEGF-A n'étaient pas disponibles lors du diagnostic. Cependant, les niveaux de VEGF-A après 6 mois de traitement n'étaient pas associés avec les thyroïdites.

Dans la maladie de Graves, le pronostic du traitement pouvait être analysé selon la présence des polymorphismes rs10738760, rs6921438 et rs4416670. Ceci est particulièrement important lorsque l'on considère l'épineux problème de la récurrence après 12 à 18 mois de traitement par thionamide chez les patients ayant une maladie modérée, oscillant entre 25 et 50% [323]. Ainsi, la force de se travail réside dans son originalité, dans l'utilisation heureuse des indices moléculaires personnalisés et d'information issue d'une étude pangénomique et dans la portée clinique potentielle des ces résultats. L'étude du suivi durant le traitement est également intéressante et permettrait d'envisager par la suite des études pharmacogénomiques. Malheureusement, l'absence de données initiales ne permettait pas de réaliser ces dites études à travers l'utilisation de cette cohorte de patients.

## Conclusion

Cette étude montre le rôle joué par 3 polymorphismes indépendamment liés au VEGF-A dans la constitution du risque de maladie de Graves et les niveaux d'hormones circulants après 6 mois de traitement. Ceci confirme l'ancien, déjà fort, sentiment clinique d'une forte dépendance de cette pathologie à la néoangiogénèse, en ajoutant une touche mécanistique dans la participation forte du VEGF-A. Partant de ce constat, de nouvelles investigations semblent nécessaires pour aborder la suite logique de ce travail sous la forme d'études de médecine personnalisée dans le domaine de la maladie de Graves pour laquelle la découverte d'un facteur pronostic fiable constituerait une grande avancée pour la pratique endocrinologique quotidienne.

## **Discussion générale, conclusions et perspectives.**

### **Discussion générale**

#### **La nécessité d'une autre médecine, une médecine personnalisée.**

A l'heure actuelle, compte tenu de la situation économique et de la nécessité impérieuse de limiter les coûts, il est nécessaire d'utiliser au mieux les techniques dites « omiques » de manière à pouvoir optimiser l'efficacité et la tolérance dans le traitement des maladies chroniques.

#### **Le laboratoire U1122 et cette thèse au sein de cette mouvance**

Notre équipe d'accueil, UMR U1122 ; « Interactions Gène-Environnement en Physiopathologie Cardio-Vasculaire » (CRB IGE-PCV), peut se prévaloir d'une expérience reconnue internationalement, dans l'étude des maladies cardiovasculaires. La démarche originale développée a permis de découvrir et approfondir l'étude de nombreux variants génétiques, ainsi que d'une large palette de phénotypes intermédiaires et de facteurs environnementaux pouvant entrer en interaction les uns avec les autres de manière à permettre l'élaboration de modèles complexes. Ces modèles permettent de mieux décrire la réalité de maladies polygéniques multifactorielles en faisant intervenir des facteurs de susceptibilité génétiques, des interactions gène x gène et gène x environnement. Un des angles retenus dans le laboratoire pour aborder la pathologie vasculaire a été celui de l'angiogenèse, pour laquelle il se trouve qu'un facteur en particulier domine le tableau : le VEGF-A.

Depuis 2006, la stratégie employée pour cette molécule s'est avérée fructueuse puisqu'il a été possible de déterminer dans le cadre de la cohorte STANISLAS que l'héritabilité génétique additive des taux de VEGF-A dans le plasma était de 60,5% de sa variance totale [325]. Le nombre important des sujets étudiés a rendu possible de déterminer les valeurs de références ainsi que les principaux facteurs influençant et contextualisant ces dernières [311].

Depuis 2007, l'évolution de l'équipe a été concomitante des avancées mondiales en matière d'analyse génétique à haut débit et a accompagné l'acquisition d'outils d'analyse et l'arrivée de

personnels apportant des compétences complémentaires permettant d'étendre les champs d'investigation. L'ensemble a permis de mettre en évidence, lors d'une étude pangénomique, 4 polymorphismes mononucléotidiques (SNPs) permettant ensemble d'expliquer près de 50% de la variabilité de ce phénotype [263]. A l'échelle des PMBCs, l'étude transcriptomique ancillaire a permis d'identifier 6 SNPs associés aux niveaux de l'ARNm du VEGF-A<sub>121</sub> [263].

En 2011, alors que la thématique initiale développée au laboratoire était principalement dévolue à la pathologie cardiovasculaire, mon intégration à l'équipe comme clinicien endocrinologue à valence oncologique a constitué une opportunité d'élargir le panorama des investigations cliniques et conceptuelles vers la cancérologie.

Longtemps considérée comme inintéressante, l'étude des troubles métaboliques liés au surpoids et à l'obésité fait opérer à la médecine sa révolution copernicienne. Ce point de vue doit son existence à la spécificité de l'Endocrinologie en elle-même, la pratique de cette spécialité imposant de manier avec aisance des concepts reliés aux pathologies cardiovasculaires, métaboliques comme les dyslipidémies ou le diabète, inflammatoires comme les thyroïdites et oncologiques en raison des nombreuses néoplasies à prendre en charge avec le vieillissement. Ainsi, depuis une dizaine d'années, les preuves impliquant l'obésité et le syndrome métabolique dans le développement de la plupart des cancers [290-293] vont amener la science à reconsidérer totalement les liens entre les pathologies métaboliques, vasculaires, inflammatoires et oncologiques.

Au vu de l'impact majeur du VEGF-A dans la pathologie cardiovasculaire mais aussi dans le cancer, nous avons retenu l'idée pour cette thèse d'explorer le rôle de ses SNPs dans la constitution de différents phénotypes intermédiaires associés aux maladies précitées. Parmi ces phénotypes intermédiaires, on pourra citer : le syndrome métabolique, les paramètres lipidiques (HDL, LDL), les marqueurs de l'inflammation (IL-6, TNF- $\alpha$ , CRP) et les molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1, les sélectines E, L et P).

Nous avons ainsi développé, à travers la réalisation des explorations génétiques, transcriptomiques et biochimiques, un axe de recherche novateur visant à unifier ou tout du moins à rapprocher la physiopathologie des domaines de biologie il y a encore peu très éloignés, à savoir l'oncologie et la pathologie cardio vasculaire.

Nous avons au final obtenu, à grâce à la coopération de l'ensemble de l'équipe du laboratoire, les résultats suivants impliquant le VEGF-A :

1. ***La mise en évidence des associations et des interactions épistatiques avec les molécules d'adhésion et d'inflammation.*** Ces données démontrent l'existence d'une régulation transcriptionnelle commune entre le VEGF-A, les molécules de l'inflammation et les molécules d'adhésion. Ainsi il est possible d'expliquer l'implication du VEGF-A dans le vaste champ des pathologies inflammatoires.
2. ***La démonstration du rôle protecteur d'un polymorphisme lié aux concentrations plasmatiques du VEGF-A vis à vis du syndrome métabolique.*** Ceci souligne l'importance du VEGF-A dans les pathologies pouvant prendre leur source dans les désordres métaboliques, en particulier les pathologies cancéreuses.
3. ***L'identification d'associations avec les taux de lipides sanguins ainsi que des interactions gène x environnement*** soulignant le lien fonctionnel entre le VEGF-A et les lipides sanguins.
4. ***La reconnaissance des associations des transcrits du VEGF-A avec les taux des hormones thyroïdiennes et les marqueurs de l'auto-immunité,*** ce qui démontre l'implication du VEGF-A dans le contexte de thyroïdite, ouvrant la voie vers l'extension des études vers le nodule et les cancers thyroïdiens.
5. ***L'identification des associations des polymorphismes avec les taux des hormones thyroïdiennes et les marqueurs de l'auto-immunité,*** ce qui confirme le rôle du VEGF-A et ceci, particulièrement dans la maladie de Graves. Ces données constituent un excellent rationnel en faveur des études de médecine personnalisée et de pharmacogénomique pour cette pathologie à l'issue particulièrement incertaine.

## Conclusion de la thèse

Dans cette thèse, nous avons développé, à l'aide des outils de la génomique, une approche intégrée et fonctionnelle de l'action du VEGF-A de manière à mieux rendre compte de la diversité des processus dans lesquels il est impliqué.

Les 4 polymorphismes identifiés par notre équipe ont été associés à des phénotypes intermédiaires biologiques et cliniques dans des domaines différents en apparence comme le syndrome métabolique, l'inflammation systémique, les lipoprotéines et l'hormonologie au sein d'une cohorte de sujets sains.

Des associations ont également été trouvées dans l'exploration de plusieurs types de thyroïdites. L'ensemble montre l'implication du VEGF-A dans ces processus physiologiques et pathologiques, soulignant l'intérêt de la biologie des systèmes et de la médecine personnalisée pour améliorer la balance bénéfice-risque des traitements antiangiogéniques.

De manière à ajouter un aspect fonctionnel à ces résultats, les études de transcriptomique ont été réalisées pour définir l'influence des SNPs précités et de l'expression des différentes isoformes du VEGF-A sur l'expression des molécules d'inflammation et d'adhésion dans les PBMCs ainsi que sur les paramètres hormonaux et immunitaires de patients traité pour une thyroïdite. Devant les fortes associations que nous avons trouvées, nous pouvons affirmer qu'il existe des phénomènes de régulation transcriptionnelle commune dans le domaine de l'inflammation en conditions physiologiques et des profils transcriptomiques propres à chaque sous-type de thyroïdite.

En attendant la validation clinique, puis l'implémentation de ces résultats en pratique courante, la poursuite d'explorations multimodales permettra d'explorer plus avant les liens unissant les risques métaboliques et oncologiques (Figure 13). La figure 13 montre le rôle central de la génomique du VEGF-A dans les 4 grands groupes de pathologies que sont les maladies cardiovasculaires, inflammatoires, métaboliques et oncologiques et les interactions complexes.

Nos résultats concernant les hormones thyroïdiennes, bien que non représentés sur cette figure, permettent d'appréhender la capacité de ces dernières à jouer un rôle de modulateur de l'ensemble de ces interactions.

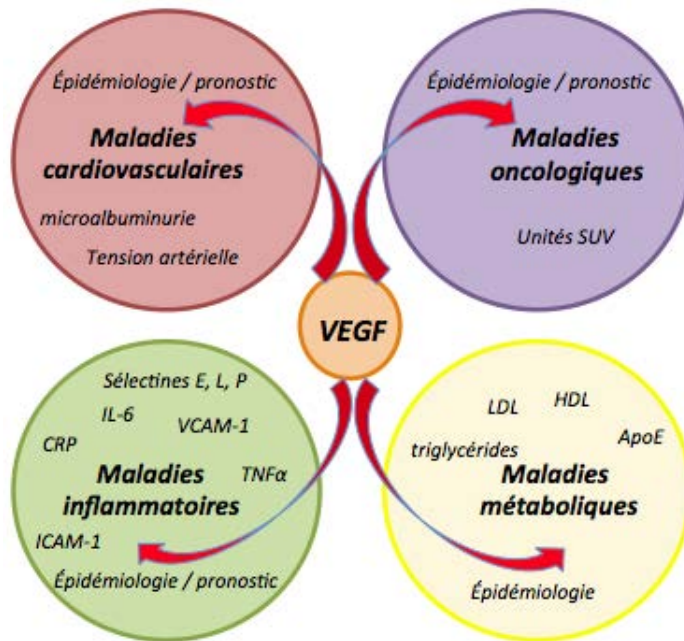


Figure 13 : Interconnexion des différentes maladies centrées sur le métabolisme oxydatif et le VEGF-A.

D'une manière générale, il apparaît que l'implication de la génomique du *VEGF-A* dans ces interconnexions complexes permettrait d'engager déjà des démarches de médecine personnalisée potentiellement très prometteuses.

## Perspectives

### Extension des investigations

Nos travaux apportent des éléments supplémentaires dans l'exploration des liens unissant les risques vasculaires et oncologiques à travers le syndrome métabolique et les variations protéiques et génomiques du VEGF-A qui y sont associées.

A ce titre, il semble possible d'implémenter nos résultats dans de futures études descriptives et fonctionnelles dans un cadre de pathologies de plus en plus vaste. Ces futures explorations



devraient permettre de caractériser de nouveaux phénotypes intermédiaires et d'élucider les variations individuelles de réponses aux traitements.

Pour finir, nos connaissances actuelles de la biologie du VEGF-A ne permettent pas de rendre compte intégralement des phénomènes cliniques que nous avons voulu étudier. A ce titre, l'exploration de nouvelles voies telles que celle des récepteurs du VEGF-A [344] est susceptible d'apporter des connaissances supplémentaires dans les maladies vasculaires et oncologiques.

### *Implications en endocrinologie clinique*

#### En diabétologie

La prise en charge du diabète compte pour une part importante de l'activité en endocrinologie clinique. En dépit de la pléthore de traitement actuellement disponible à l'heure actuelle, l'équilibre glycémique global des patients reste perfectible [345]. Une étude réalisée par notre équipe sur les polymorphismes associés au VEGF-A n'a pas permis de trouver des corrélations avec le risque de diabète ou avec ses complications microvasculaires [346]. Cependant cette étude n'a pas pu aboutir à la recherche d'une étude de pharmacogénomique, ce qu'il reste à faire. Au final, le VEGF-A en général semble omniprésent dans la pathologie diabétique. La présence de cofacteurs multiples modifiant les taux de VEGF-A rend les analyses particulièrement complexes. Cependant une étude transcriptomique permettrait d'affiner les interactions avec d'autres phénotypes intermédiaires sur le plan inflammatoire. Pour finir, des stratégies de recherches pharmacogénomiques pourraient aider à mieux cibler les patients répondeurs dans le cadre d'une médecine stratifiée.

#### Oncologie endocrinienne spécifique

L'implication du VEGF-A en oncologie endocrinienne est importante en raison de la nature particulièrement vasculaire des tumeurs endocrines [347]. Il existe cependant un phénomène unique en pathologie cancéreuse que l'on appelle le « paradoxe neuroendocrine ». La densité microvasculaire de ces tumeurs diminue lors que le grade tumoral histologique augmente. Les tumeurs de bas grade ont donc une densité microvasculaire plus élevée que les tumeurs de haut

grade (Figure 14). Contrairement aux tumeurs épithéliales, la nature vasculaire est une caractéristique glandulaire propre. La capacité à maintenir une architecture vasculaire constitue donc un signe de bonne différenciation cellulaire [169]. Ces éléments sont confirmés par les études d'expression de gène du *VEGF-A* au niveau tumoral [348, 349], avec des signes histologiques d'hypoxie croissants [349, 350].

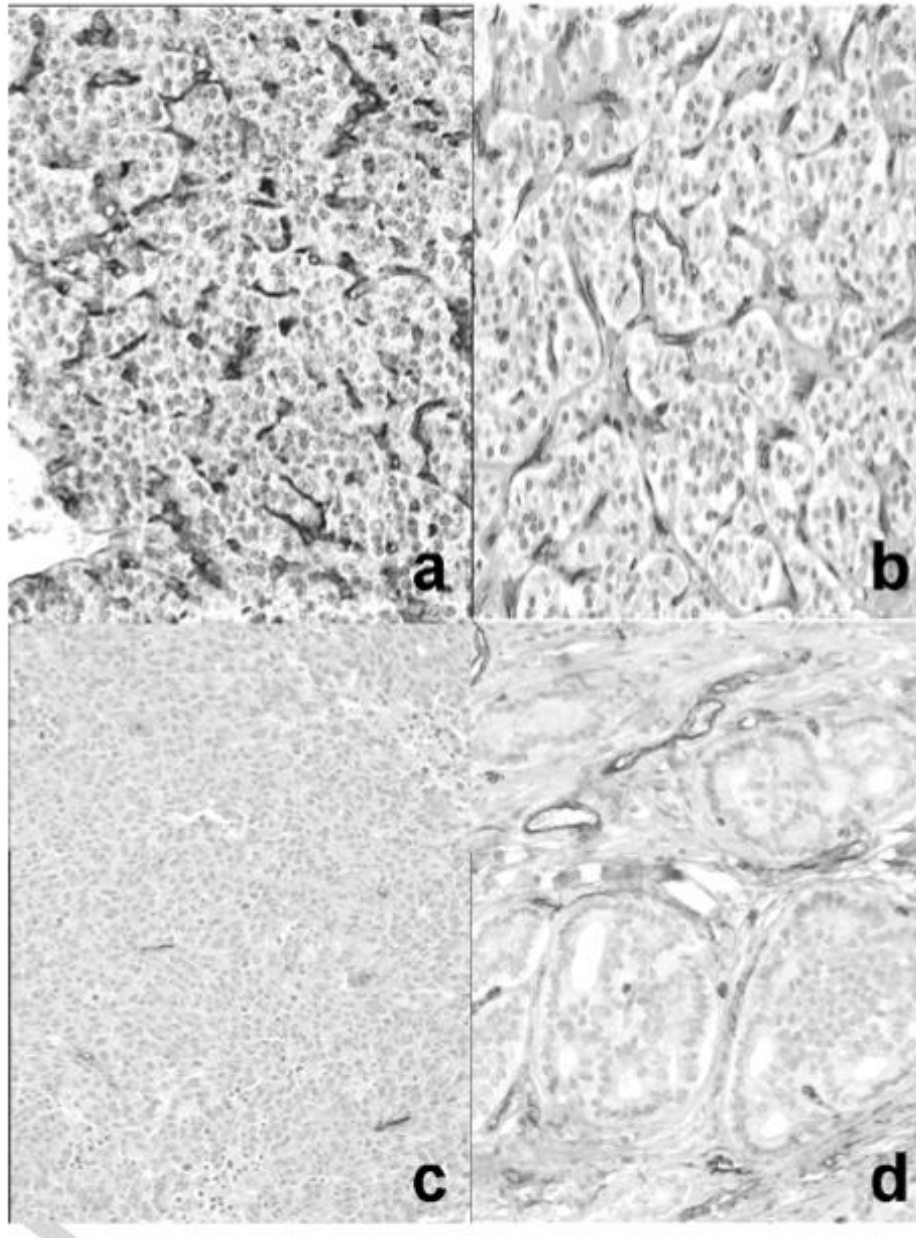


Figure 14 : paradoxe neuroendocrine 2 [351]

Coupes histologiques de tumeurs endocrines avec immunodétection de CD34, de différenciation décroissance de a à c, avec comme référence la glande normale en d.

Les études pharmacogénomiques ont permis d'associer plusieurs polymorphismes du gène du *VEGF-A* ou de ses récepteurs avec la réponse ou la tolérance sous traitement [352]. Aucune n'a encore été menée sur les 4 SNPs liés aux variations plasmatiques du VEGF-A. Ceci constitue donc un développement ultérieur possible soit vis à vis du pronostic, soit sur un plan pharmacogénomique concernant la réponse sous traitement.

### **Extension des concepts**

Dans cette thèse, nous avons mis en évidence des associations pertinentes sur le plan mécanistiques et potentiellement cliniques entre le VEGF-A et des paramètres cliniques et/ou biologiques. Malgré cela, une synthèse semble nécessaire sur les mécanismes en amont de la sécrétion de VEGF-A. Il peut donc être intéressant d'opérer une contre-lecture de nos travaux de manière à déterminer si une hypothèse mécanistique globale innovante peut être tirée de nos résultats.

### ***Rôle du stress oxydant***

L'allèle A du rs10738760 est associé à une diminution du risque de syndrome métabolique. Le syndrome métabolique est associé à un hyperinsulinisme, des taux accrus d'IGF-1[293], des cytokines pro-inflammatoires sécrétées par les adipocytes viscéraux (TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1, PAI-1, RBP-4, leptine, visfatine et résistine) [353] et à un stress oxydant important [302, 305]. Nous pouvons noter que certaines de ces molécules ont été associées au VEGF-A lors de notre étude dédiée à l'inflammation systémique. Ce stress oxydant est caractérisé par la présence de nombreux types de molécules différents :

- les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS). Ceux ci sont synthétisés principalement dans les mitochondries et dans une moindre mesure par les peroxysomes [354]. Ils peuvent exister sous la forme de radical hydroxyl (\*OH) (ONOO\*), d'ion superoxyde radical

(O<sub>2</sub>\*), de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), d'oxygène singulet (O<sub>2</sub>\*), d'ion hypochlorite (ClO\*), de radical oxyde nitrique (NO\*) et de radical peroxydinitrite (ONOO\*).

- les ions métalliques (Fe, Cu, Cr, Co, V, Cd, Ar, Ni), à haut pouvoir oncogène.

Ces produits du métabolisme sont neutralisés par de puissants réducteurs comme le glutathion, la catalase et la superoxyde dismutase. Les moyens non-enzymatiques sont représentés par la vitamine D, la vitamine E, le système thiorédoxine, l'acide lipoïque, les caroténoïdes, les flavonoïdes, le sélénium. Produits en excès, l'activité oxydante dépasse les capacités de « tamponnement » et induit des lésions subcellulaires. Ces lésions consistent essentiellement une oxydation des bases de l'ADN, et la peroxydation de molécules (création de dérivés etheno- et propnao-). Les protéines sont aussi affectées à travers leurs acides aminés, les plus concernés étant l'arginine, la proline, la cystéine, la valine, la tyrosine, le glutamate et la méthionine. Les réactions induites par les ROS et les ions métalliques sont expliquées dans la figure 15.

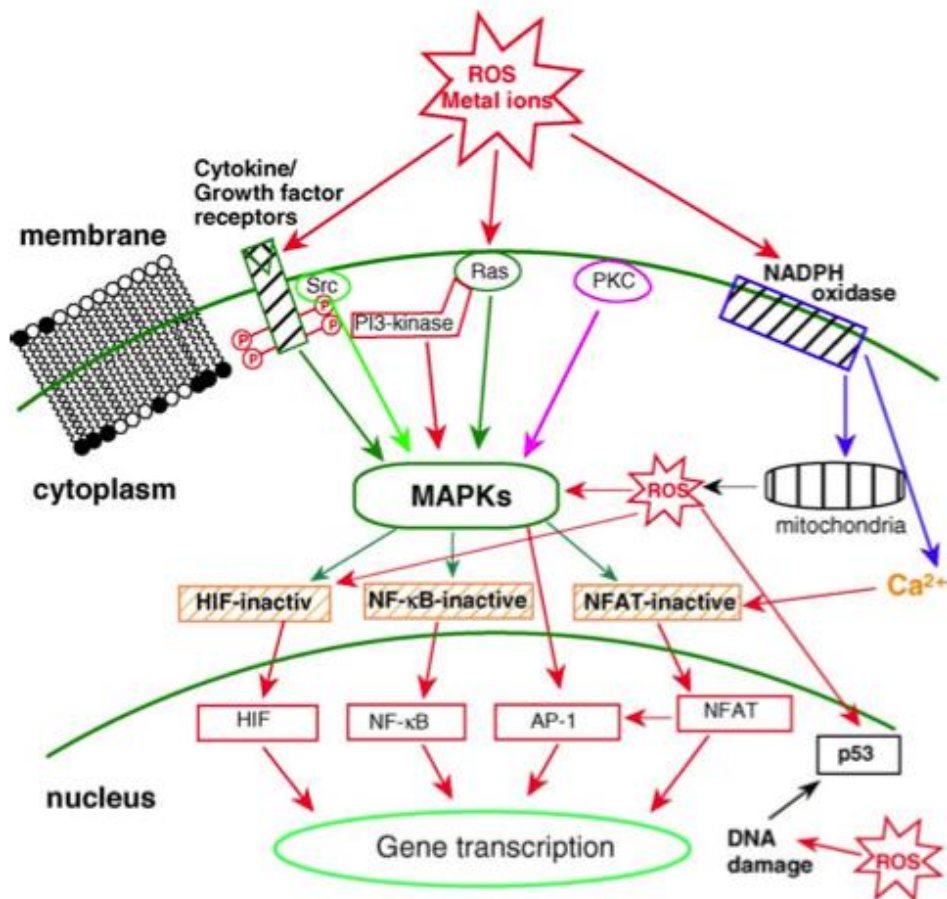


Figure 15 : Voies métaboliques induites par les dérivés réactifs de l'oxygène et les ions métalliques, d'après Valko et al [351].

Ces ROS sont capables d'agir comme de véritables faux seconds messagers et activer des enzymes comme Ras, des protéines phosphatases, des tyrosine-phosphatases, des Sérine/Thréonine kinases ou de protéines kinases non liées à un récepteur de la famille Src ou JAK. Des effets géniques directs sont également recensés via l'activation de la voie de MAP kinases. On peut ainsi rapporter l'action de NFAT, NF- $\kappa$ B, AP-1, P53, HIF1 qui stimulera par la suite la production de VEGF-A [351].

Le modèle actuellement retenu pour représenter l'action carcinogénique du stress oxydant se détaille en 3 phases : l'initiation, la promotion et la progression. Les différentes phases sont représentées dans la figure 16.

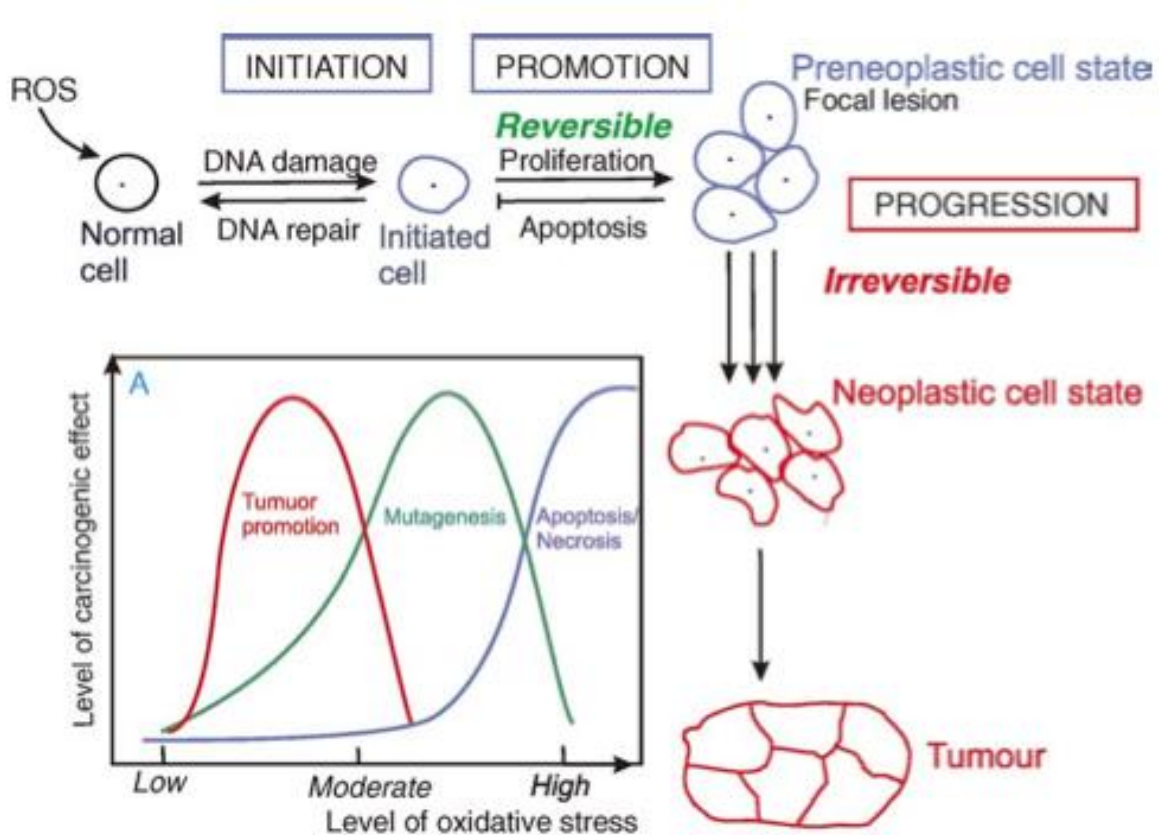


Figure 16 : Les 3 étapes de la carcinogénèse induites par les ROS, d'après Valko et al [351].

L'augmentation du stress oxydatif est associée à des taux augmentés de VEGF-A [355]. Il serait donc intéressant d'étudier l'association des 4 SNPs liés au VEGF-A ou le profil des isoformes du VEGF-A avec le statut oxydatif ainsi qu'avec les polymorphismes des enzymes anti-oxydantes.

Il faut également constater que l'activation de la voie AMPK par les ROS correspond à une perturbation de la perception que la cellule a de son statut énergétique, l'activation de l'AMPK servant de senseur métabolique [356]. On retrouve cette idée dans le fait que l'hyperglycémie [357] et les dyslipidémies [358] isolées peuvent accroître la production de ROS. En retour les ROS sont responsables d'altérations endothéliales qui accélèrent le vieillissement vasculaire.

Concernant la thyroïde, le stress oxydatif est intense en cas de thyroïdite [359], soulignant le lien que nous avons établi avec les taux sériques de transcrits du VEGF, et en cas de cancer différencié de souche folliculaire [360].

Sur le plan de l'inflammation, on note un lien entre les concentrations circulantes de marqueurs de l'inflammation et le statut oxydatif [361].

Pour finir, de nombreux cancers sont associés à un niveau de stress oxydatif élevé lors de leur diagnostic [304]. Les interactions à l'échelle cellulaire et subcellulaire chez l'obèse sont présentes dans les tableaux (Figures 17 et 18).

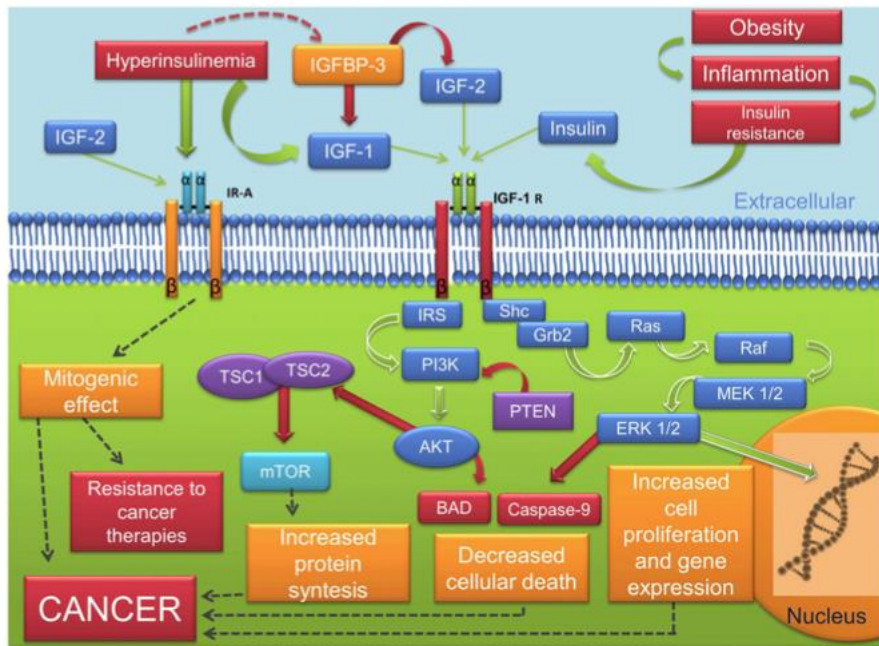


Figure 17 : Interactions protéiques chez l'obèse, d'après Mendonça et al [293].

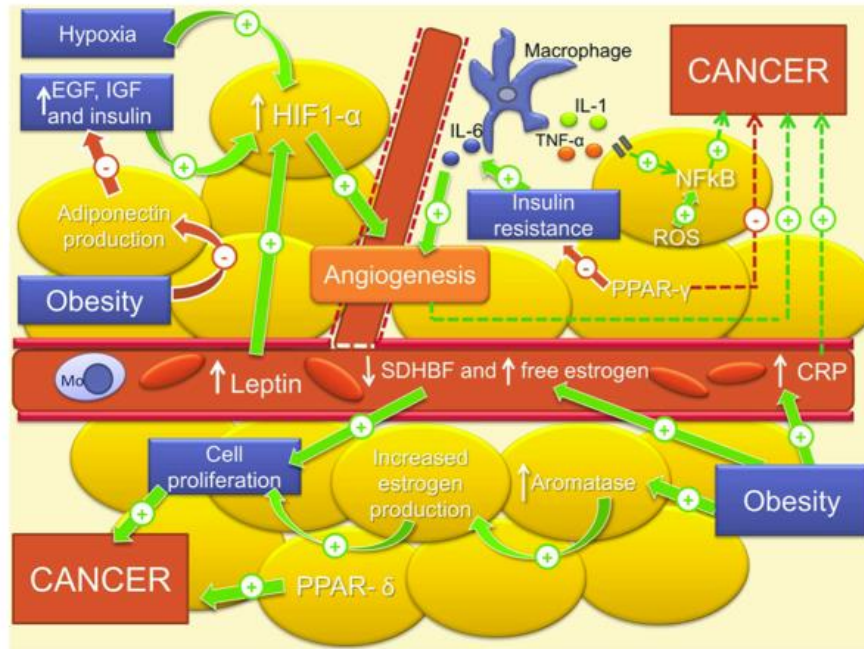


Figure 18 : Interactions cellulaires chez l'obèse, d'après Mendonça et al [293].

### *Effet de la correction du stress oxydatif*

Compte tenu du caractère indéniablement délétère du stress oxydatif, de nombreux auteurs ont proposé des solutions afin de mesurer l'impact de l'amélioration de ce stress sur la santé.

L'activité physique, en plus d'améliorer le stress oxydatif, améliore également la fonction endothéliale [362]. Son effet sur le risque de cancer est également connu [363], et a inspiré une partie des conseils qui sont prodigués lors des actions de santé publique.

La perte de poids, suite à la combinaison d'activité physique et d'un régime hypocalorique, améliore nettement le stress oxydatif, à travers l'induction de SIRT3 et de l'activation de la MAPK ainsi que de PGC-1 $\alpha$  au niveau des muscles. A noter que le régime végétarien s'accompagne d'une nette diminution du stress oxydatif [364, 365]. Cette tendance se retrouve dans la réduction du risque cancéreux général, mais plus particulièrement colorectal chez les végétariens [366, 367].

D'un point de vue pharmacologique, les seules molécules utilisées avec succès appartiennent à la classe des antidiabétiques.

La metformine, utilisée depuis plus d'un demi-siècle en diabétologie, a montré les caractéristiques suivantes :

- diminution des taux circulants de VEGF-A et de PAI-1 [308].
- diminution des marqueurs intracellulaires de l'inflammation [368], tissulaires de TNF- $\alpha$  , et diminution des taux circulants d'IL-6 [369].
- diminution des taux circulants de résistine [370].
- augmentation des taux circulants de sirtuine-1 [371], dont l'action en faveur de l'ADN est documentée [372].
- diminution du fonctionnement des protéines UCP2 et amélioration du statut oxydatif [373].
- amélioration de l'efficacité des chimiothérapies anticancéreuses [374].

De manière attendue au vu de ces résultats, la metformine est associée à une diminution de la prévalence de la plupart des cancers [375, 376].

## **Conclusion générale**

Les interactions entre les pathologies inflammatoires, métaboliques, vasculaires et oncologiques semblent indiquer, sur la base des éléments précédemment cités, que le syndrome métabolique occupe un rôle leader dans leur pathogénèse. La dysrégulation métabolique, modulée par les hormones, induit un stress oxydatif occupant un rôle central dans les interactions précédemment citées. Ainsi le surpoids engendrerait un phénomène de « blocage métabolique » dans lequel il existerait un déséquilibre en produit à oxyder et substance oxydante, à savoir l'oxygène. Dès lors, nous pouvons qualifier cette situation d'hypoxie fonctionnelle dont la première conséquence serait d'allumer le signal HIF1 qui ensuite activerait la voie du VEGF, de manière compensatrice. Ce modèle propose donc une place singulière pour le VEGF, dans lequel il intervient en tant que régulateur du métabolisme, pour essayer de rétablir une oxygénation tissulaire perçue comme défaillante (Figure 19).

Ainsi, il apparaît que les senseurs moléculaires jouent un rôle important, et que l'ajout des molécules du stress oxydant aux résultats de cette thèse permettrait de compléter les applications de médecine personnalisée qui ressortent déjà de ce travail.



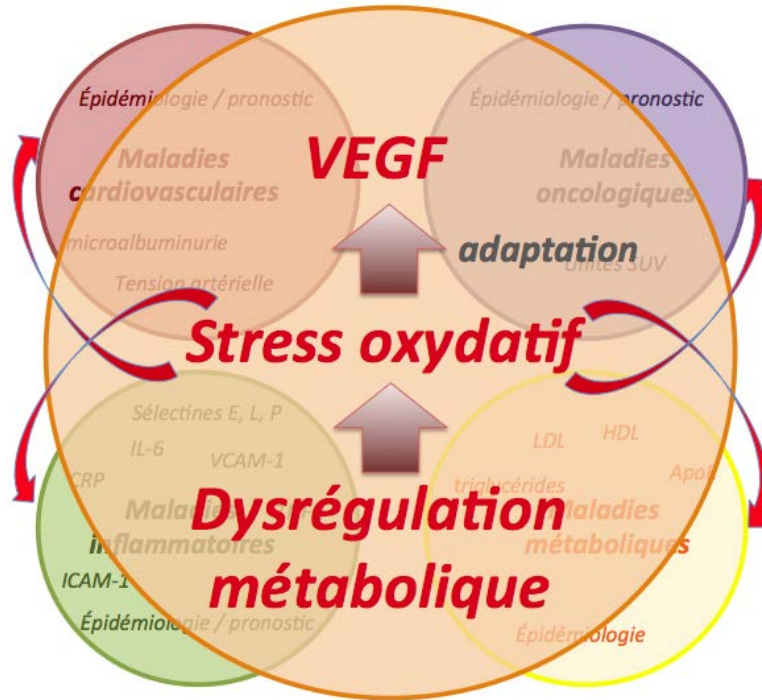


Figure 19 : Impact du stress oxydatif dans la pathogénie des maladies métaboliques, inflammatoires, cardiovasculaires et oncologiques.

## Références

1. Rancier, M., M.G. Stathopoulou, and S. Visvikis-Siest, *VEGF/VEGFR in thyroid physiology and physiopathology*. Mol Endocrinol, 2015.
2. Presta, M., et al., *Inflammatory cells and chemokines sustain FGF2-induced angiogenesis*. Eur Cytokine Netw, 2009. **20**(2): p. 39-50.
3. Ferrara, N., *VEGF-A: a critical regulator of blood vessel growth*. Eur Cytokine Netw, 2009. **20**(4): p. 158-63.
4. Tischer, E., et al., *The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing*. J Biol Chem, 1991. **266**(18): p. 11947-54.
5. Neufeld, G., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors*. Faseb j, 1999. **13**(1): p. 9-22.
6. Harper, S.J. and D.O. Bates, *VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics?* Nat Rev Cancer, 2008. **8**(11): p. 880-7.
7. Nowak, D.G., et al., *Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) splicing from pro-angiogenic to anti-angiogenic isoforms: a novel therapeutic strategy for angiogenesis*. J Biol Chem, 2010. **285**(8): p. 5532-40.
8. Holm, P.W., et al., *Atherosclerotic plaque development and instability: a dual role for VEGF*. Ann Med, 2009. **41**(4): p. 257-64.
9. Moreno, P.R., M. Purushothaman, and K.R. Purushothaman, *Plaque neovascularization: defense mechanisms, betrayal, or a war in progress*. Ann N Y Acad Sci, 2012. **1254**: p. 7-17.
10. Carmeliet, P. and R.K. Jain, *Angiogenesis in cancer and other diseases*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 249-57.
11. Lodomery, M.R., S.J. Harper, and D.O. Bates, *Alternative splicing in angiogenesis: the vascular endothelial growth factor paradigm*. Cancer Lett, 2007. **249**(2): p. 133-42.
12. Qutub, A.A., et al., *Multiscale models of angiogenesis*. IEEE Eng Med Biol Mag, 2009. **28**(2): p. 14-31.
13. Khurana, R., et al., *Role of angiogenesis in cardiovascular disease: a critical appraisal*. Circulation, 2005. **112**(12): p. 1813-24.
14. James, P.A., et al., *2014 evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8)*. Jama, 2014. **311**(5): p. 507-20.
15. Dawber, T.R., G.F. Meadors, and F.E. Moore, Jr., *Epidemiological approaches to heart disease: the Framingham Study*. Am J Public Health Nations Health, 1951. **41**(3): p. 279-81.
16. Assmann, G., P. Cullen, and H. Schulte, *Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the prospective cardiovascular Munster (PROCAM) study*. Circulation, 2002. **105**(3): p. 310-5.
17. Yusuf, S., et al., *Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study*. Lancet, 2004. **364**(9438): p. 937-52.
18. Frohlich, J. and A. Al-Sarraf, *Cardiovascular risk and atherosclerosis prevention*. Cardiovasc Pathol, 2013. **22**(1): p. 16-8.

19. Belgore, F.M., et al., *Plasma levels of vascular endothelial growth factor and its soluble receptor (SFlt-1) in essential hypertension*. Am J Cardiol, 2001. **87**(6): p. 805-7, A9.
20. Tsai, W.C., et al., *Plasma vascular endothelial growth factor as a marker for early vascular damage in hypertension*. Clin Sci (Lond), 2005. **109**(1): p. 39-43.
21. Ayerden Ebinc, F., et al., *The relationship between vascular endothelial growth factor (VEGF) and microalbuminuria in patients with essential hypertension*. Intern Med, 2008. **47**(17): p. 1511-6.
22. Lim, H.S., et al., *Plasma vascular endothelial growth factor, angiopoietin-1, and angiopoietin-2 in diabetes: implications for cardiovascular risk and effects of multifactorial intervention*. Diabetes Care, 2004. **27**(12): p. 2918-24.
23. Sandrim, V.C., et al., *Functional VEGF haplotypes affect the susceptibility to hypertension*. J Hum Hypertens, 2013. **27**(1): p. 31-7.
24. Pako, J., et al., *Plasma VEGF levels and their relation to right ventricular function in pulmonary hypertension*. Clin Exp Hypertens, 2014: p. 1-5.
25. Papaioannou, A.I., et al., *Serum VEGF levels are related to the presence of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis*. BMC Pulm Med, 2009. **9**: p. 18.
26. Estemberg, D., et al., *[VEGF serum concentration in pregnant women with hypertension]*. Ginekologia polska, 2006. **77**(11): p. 858-864.
27. Wender-Ozegowska, E., et al., *Concentrations of eNOS, VEGF, ACE and PlGF in maternal blood as predictors of impaired fetal growth in pregnancy complicated by gestational hypertension/preeclampsia*. Hypertens Pregnancy, 2015. **34**(1): p. 17-23.
28. Hong, S.N., et al., *Prediction of preterm delivery using levels of vascular endothelial growth factor and leptin in amniotic fluid from the second trimester*. Archives of gynecology and obstetrics, 2015. **291**(2): p. 265-271.
29. Azambuja, M.I.R., *Inflammation as the cause of coronary heart disease*. The Lancet. Infectious diseases, 2010. **10**(3): p. 142-143.
30. Boushey, H.A., *Airway inflammation and severe asthma: abstract and commentary*. JAMA, 1998. **279**(11): p. 883.
31. Jones, R.W., *Inflammation and Alzheimer's disease*. Lancet, 2001. **358**(9280): p. 436-437.
32. Thompson, D., M.B. Pepys, and S.P. Wood, *The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine*. Structure (London, England : 1993), 1999. **7**(2): p. 169-177.
33. Ferri, C., et al., *C-reactive protein: interaction with the vascular endothelium and possible role in human atherosclerosis*. Current pharmaceutical design, 2007. **13**(16): p. 1631-1645.
34. Beutler, B. and A. Cerami, *The history, properties, and biological effects of cachectin*. Biochemistry, 1988. **27**(20): p. 7575-7582.
35. Ferguson-Smith, A.C., et al., *Regional localization of the interferon-beta 2/B-cell stimulatory factor 2/hepatocyte stimulating factor gene to human chromosome 7p15-p21*. Genomics, 1988. **2**(3): p. 203-208.
36. Swardfager, W., et al., *A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease*. Biological psychiatry, 2010. **68**(10): p. 930-941.
37. Tackey, E., P.E. Lipsky, and G.G. Illei, *Rationale for interleukin-6 blockade in systemic lupus erythematosus*. Lupus, 2004. **13**(5): p. 339-343.

38. Smith, P.C., et al., *Interleukin-6 and prostate cancer progression*. Cytokine & growth factor reviews, 2001. **12**(1): p. 33-40.
39. Yang, L., et al., *ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow*. Blood, 2005. **106**(2): p. 584-592.
40. Barreiro, O., et al., *Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes*. The Journal of cell biology, 2002. **157**(7): p. 1233-1245.
41. Ley, K., *The role of selectins in inflammation and disease*. Trends in molecular medicine, 2003. **9**(6): p. 263-268.
42. Zamani, P., et al., *Inflammatory biomarkers, death, and recurrent nonfatal coronary events after an acute coronary syndrome in the MIRACL study*. Journal of the American Heart Association, 2013. **2**(1): p. e003103-e003103.
43. Esquivel-Velázquez, M., et al., *The role of cytokines in breast cancer development and progression*. Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research, 2015. **35**(1): p. 1-16.
44. Raza, A., et al., *Tumor necrosis factor - $\alpha$ , interleukin-10, intercellular and vascular adhesion molecules are possible biomarkers of disease severity in complicated Plasmodium vivax isolates from Pakistan*. PloS one, 2013. **8**(12): p. e81363.
45. Versini, M., et al., *Obesity in autoimmune diseases: not a passive bystander*. Autoimmun Rev, 2014. **13**(9): p. 981-1000.
46. Durcan, L., et al., *Increased body mass index in ankylosing spondylitis is associated with greater burden of symptoms and poor perceptions of the benefits of exercise*. J Rheumatol, 2012. **39**(12): p. 2310-4.
47. Wesley, A., et al., *Association between body mass index and anti-citrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis: results from a population-based case-control study*. Arthritis Care Res (Hoboken), 2013. **65**(1): p. 107-12.
48. Crowson, C.S., et al., *Contribution of obesity to the rise in incidence of rheumatoid arthritis*. Arthritis Care Res (Hoboken), 2013. **65**(1): p. 71-7.
49. Soltani-Arabshahi, R., et al., *Obesity in early adulthood as a risk factor for psoriatic arthritis*. Arch Dermatol, 2010. **146**(7): p. 721-6.
50. Leiria, L.O., M.A. Martins, and M.J. Saad, *Obesity and asthma: beyond T2 inflammation*. Metabolism, 2015. **64**(2): p. 172-181.
51. Decleves, A.E. and K. Sharma, *Obesity and kidney disease: differential effects of obesity on adipose tissue and kidney inflammation and fibrosis*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2015. **24**(1): p. 28-36.
52. Duntas, L.H. and B. Biondi, *The interconnections between obesity, thyroid function, and autoimmunity: the multifold role of leptin*. Thyroid, 2013. **23**(6): p. 646-53.
53. Klimiuk, P.A., et al., *Soluble adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in patients with distinct variants of rheumatoid synovitis*. Annals of the rheumatic diseases, 2002. **61**(9): p. 804-809.
54. Kuryliszyn-Moskal, A., P.A. Klimiuk, and S. Sierakowski, *Soluble adhesion molecules (sVCAM-1, sE-selectin), vascular endothelial growth factor (VEGF) and endothelin-1 in patients with systemic sclerosis: relationship to organ systemic involvement*. Clinical rheumatology, 2005. **24**(2): p. 111-116.

55. Steinberg, D. and J.L. Witztum, *Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010. **30**(12): p. 2311-6.
56. *Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. The Expert Panel*. *Arch Intern Med*, 1988. **148**(1): p. 36-69.
57. Gordon, T., et al., *High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study*. *Am J Med*, 1977. **62**(5): p. 707-14.
58. Tan, J.T.M., et al., *High-density lipoproteins augment hypoxia-induced angiogenesis via regulation of post-translational modulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$* . *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2014. **28**(1): p. 206-217.
59. Prosser, H.C.G., et al., *Multifunctional regulation of angiogenesis by high-density lipoproteins*. *Cardiovascular research*, 2014. **101**(1): p. 145-154.
60. Kivelä, A.M., et al., *Regulation of endothelial lipase and systemic HDL cholesterol levels by SREBPs and VEGF-A*. *Atherosclerosis*, 2012. **225**(2): p. 335-340.
61. Blann, A.D., et al., *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*, 2001. **87**(10): p. 1160-3.
62. Belgore, F.M., G.Y. Lip, and A.D. Blann, *Successful therapy reduces levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) in patients with hypertension and patients with hypercholesterolemia*. *Atherosclerosis*, 2000. **151**(2): p. 599.
63. Sumino, H., et al., *Serum level of vascular endothelial growth factor is decreased by hormone replacement therapy in postmenopausal women without hypercholesterolemia*. *Atherosclerosis*, 2000. **148**(1): p. 189-95.
64. Sandhofer, A., et al., *Are plasma VEGF and its soluble receptor sFlt-1 atherogenic risk factors? Cross-sectional data from the SAPHIR study*. *Atherosclerosis*, 2009. **206**(1): p. 265-9.
65. Kimura, K., et al., *Serum VEGF--as a prognostic factor of atherosclerosis*. *Atherosclerosis*, 2007. **194**(1): p. 182-8.
66. Dworacka, M., et al., *Statins in low doses reduce VEGF and bFGF serum levels in patients with type 2 diabetes mellitus*. *Pharmacology*, 2014. **93**(1-2): p. 32-38.
67. Bag-Ozbek, A. and J.T. Giles, *Inflammation, adiposity, and atherogenic dyslipidemia in rheumatoid arthritis: is there a paradoxical relationship?* *Curr Allergy Asthma Rep*, 2015. **15**(2): p. 497.
68. Karaahmet, F., et al., *Dyslipidemia and inflammation in patients with inflammatory bowel disease*. *Dig Dis Sci*, 2013. **58**(6): p. 1806-7.
69. Peev, V., A. Nayer, and G. Contreras, *Dyslipidemia, malnutrition, inflammation, cardiovascular disease and mortality in chronic kidney disease*. *Curr Opin Lipidol*, 2014. **25**(1): p. 54-60.
70. Vaziri, N.D., *Role of dyslipidemia in impairment of energy metabolism, oxidative stress, inflammation and cardiovascular disease in chronic kidney disease*. *Clin Exp Nephrol*, 2014. **18**(2): p. 265-8.
71. Lira, F.S., et al., *The relationship between inflammation, dyslipidemia and physical exercise: from the epidemiological to molecular approach*. *Curr Diabetes Rev*, 2014. **10**(6): p. 391-6.

72. Ng, M., et al., *Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013*. Lancet, 2014. **384**(9945): p. 766-781.
73. McCarty, M.F., *A paradox resolved: the postprandial model of insulin resistance explains why gynoid adiposity appears to be protective*. Med Hypotheses, 2003. **61**(2): p. 173-6.
74. Snijder, M.B., et al., *Larger thigh and hip circumferences are associated with better glucose tolerance: the Hoorn study*. Obes Res, 2003. **11**(1): p. 104-11.
75. Chiba, Y., et al., *Relationship between visceral fat and cardiovascular disease risk factors: the Tanno and Sobetsu study*. Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension, 2007. **30**(3): p. 229-236.
76. Montague, C.T., et al., *Depot- and sex-specific differences in human leptin mRNA expression: implications for the control of regional fat distribution*. Diabetes, 1997. **46**(3): p. 342-347.
77. Van Harmelen, V., et al., *Leptin secretion from subcutaneous and visceral adipose tissue in women*. Diabetes, 1998. **47**(6): p. 913-917.
78. Leshan, R.L., et al., *Leptin action through hypothalamic nitric oxide synthase-1-expressing neurons controls energy balance*. Nature medicine, 2012. **18**(5): p. 820-823.
79. de Git, K.C. and R.A. Adan, *Leptin resistance in diet-induced obesity: the role of hypothalamic inflammation*. Obes Rev, 2015.
80. Febbraio, M.A., *Role of interleukins in obesity: implications for metabolic disease*. Trends Endocrinol Metab, 2014. **25**(6): p. 312-9.
81. Derosa, G., et al., *Adipocytokine levels in obese and non-obese subjects: an observational study*. Inflammation, 2013. **36**(4): p. 914-20.
82. Rabe, K., et al., *Adipokines and insulin resistance*. Molecular medicine (Cambridge, Mass.), 2008. **14**(11-12): p. 741-751.
83. Silha, J.V., et al., *Plasma resistin, adiponectin and leptin levels in lean and obese subjects: correlations with insulin resistance*. European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies, 2003. **149**(4): p. 331-335.
84. Matsuzawa, Y., *Adiponectin: Identification, physiology and clinical relevance in metabolic and vascular disease*. Atherosclerosis. Supplements, 2005. **6**(2): p. 7-14.
85. Ohashi, K., N. Ouchi, and Y. Matsuzawa, *Anti-inflammatory and anti-atherogenic properties of adiponectin*. Biochimie, 2012. **94**(10): p. 2137-2142.
86. Wieser, V., A.R. Moschen, and H. Tilg, *Inflammation, cytokines and insulin resistance: a clinical perspective*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2013. **61**(2): p. 119-25.
87. Montecucco, F., et al., *Gastric bypass in morbid obese patients is associated with reduction in adipose tissue inflammation via N-oleoylethanolamide (OEA)-mediated pathways*. Thromb Haemost, 2014. **113**(3).
88. Viana, E.C., et al., *Gastric bypass and sleeve gastrectomy: the same impact on IL-6 and TNF-alpha. Prospective clinical trial*. Obes Surg, 2013. **23**(8): p. 1252-61.
89. Bhole, V.M., et al., *Differences in body mass index among individuals with PsA, psoriasis, RA and the general population*. Rheumatology (Oxford), 2012. **51**(3): p. 552-6.
90. Katz, P.P., et al., *Sex differences in assessment of obesity in rheumatoid arthritis*. Arthritis Care Res (Hoboken), 2013. **65**(1): p. 62-70.

91. Ottaviani, S., et al., *Body mass index influences the response to infliximab in ankylosing spondylitis*. *Arthritis Res Ther*, 2012. **14**(3): p. R115.
92. Ilich, J.Z., et al., *Low-grade chronic inflammation perpetuated by modern diet as a promoter of obesity and osteoporosis*. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2014. **65**(2): p. 139-48.
93. Loebig, M., 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**(9): p. e12610.
94. Ngo, D.T.M., et al., *Antiangiogenic actions of vascular endothelial growth factor-A165b, an inhibitory isoform of vascular endothelial growth factor-A, in human obesity*. *Circulation*, 2014. **130**(13): p. 1072-1080.
95. Gonzalez-Perez, R.R., et al., *Leptin upregulates VEGF in breast cancer via canonic and non-canonical signalling pathways and NFkappaB/HIF-1alpha activation*. *Cellular signalling*, 2010. **22**(9): p. 1350-1362.
96. Gao, Q., et al., *Adiponectin inhibits VEGF-A in prostate cancer cells*. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 2015: p. 1-6.
97. García de la Torre, N., et al., *Effects of weight loss after bariatric surgery for morbid obesity on vascular endothelial growth factor-A, adipocytokines, and insulin*. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 2008. **93**(11): p. 4276-4281.
98. *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**(25): p. 3143-421.
99. De Backer, G., et al., *European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. Third Joint Task Force Of European and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice (constituted by representatives of eight societies and by invited experts)*. *Arch Mal Coeur Vaiss*, 2004. **97**(10): p. 1019-30.
100. Hanson, R.L., et al., *Components of the "metabolic syndrome" and incidence of type 2 diabetes*. *Diabetes*, 2002. **51**(10): p. 3120-7.
101. Resnick, H.E., et al., *Insulin resistance, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular disease in nondiabetic american indians: the Strong Heart Study*. *Diabetes Care*, 2003. **26**(3): p. 861-7.
102. Klein, B.E., R. Klein, and K.E. Lee, *Components of the metabolic syndrome and risk of cardiovascular disease and diabetes in Beaver Dam*. *Diabetes Care*, 2002. **25**(10): p. 1790-4.
103. Sattar, N., et al., *Metabolic syndrome with and without C-reactive protein as a predictor of coronary heart disease and diabetes in the West of Scotland Coronary Prevention Study*. *Circulation*, 2003. **108**(4): p. 414-9.
104. Sattar, N., et al., *Can metabolic syndrome usefully predict cardiovascular disease and diabetes? Outcome data from two prospective studies*. *Lancet*, 2008. **371**(9628): p. 1927-35.
105. Ruszkowska-Ciastek, B., et al., *A preliminary evaluation of VEGF-A, VEGFR1 and VEGFR2 in patients with well-controlled type 2 diabetes mellitus*. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2014. **15**(6): p. 575-81.

106. Kakizawa, H., et al., *The relationship between glycemic control and plasma vascular endothelial growth factor and endothelin-1 concentration in diabetic patients.* Metabolism, 2004. **53**(5): p. 550-5.
107. Kubisz, P., et al., *Circulating vascular endothelial growth factor in the normo- and/or microalbuminuric patients with type 2 diabetes mellitus.* Acta Diabetol, 2010. **47**(2): p. 119-24.
108. Nikzamir, A., et al., *The role of vascular endothelial growth factor +405 G/C polymorphism and albuminuria in patients with type 2 diabetes mellitus.* Mol Biol Rep, 2012. **39**(2): p. 881-6.
109. Sun, L., et al., *VEGF genetic polymorphisms may contribute to the risk of diabetic nephropathy in patients with diabetes mellitus: a meta-analysis.* ScientificWorldJournal, 2014. **2014**: p. 624573.
110. Fegghi, M., et al., *Relationship of vascular endothelial growth factor (VEGF) +405 G/C polymorphism and proliferative retinopathy in patients with type 2 diabetes.* Transl Res, 2011. **158**(2): p. 85-91.
111. Kim, H.W., et al., *Role of the VEGF 936 C/T polymorphism in diabetic microvascular complications in type 2 diabetic patients.* Nephrology (Carlton), 2009. **14**(7): p. 681-8.
112. Tavakkoly-Bazzaz, J., et al., *VEGF gene polymorphism association with diabetic neuropathy.* Mol Biol Rep, 2010. **37**(7): p. 3625-30.
113. Amoli, M.M., et al., *VEGF gene polymorphism association with diabetic foot ulcer.* Diabetes research and clinical practice, 2011. **93**(2): p. 215-219.
114. Lin, T.-H., et al., *Functional vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and diabetes: effect on coronary collaterals in patients with significant coronary artery disease.* Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry, 2010. **411**(21-22): p. 1688-1693.
115. Hagberg, C.E., et al., *Targeting VEGF-B as a novel treatment for insulin resistance and type 2 diabetes.* Nature, 2012. **490**(7420): p. 426-30.
116. Strobel, A., et al., *A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity.* Nat Genet, 1998. **18**(3): p. 213-5.
117. Balkau, B., [An epidemiologic survey from a network of French Health Examination Centres, (D.E.S.I.R.): epidemiologic data on the insulin resistance syndrome]. Rev Epidemiol Sante Publique, 1996. **44**(4): p. 373-5.
118. Gomila, S. and J. Dallongeville, *Epidemiologie du syndrome métabolique en France.* Médecine et Nutrition 2003. **32**(2): p. 89-94.
119. Gordon, T. and W.B. Kannel, *Multiple risk functions for predicting coronary heart disease: the concept, accuracy, and application.* Am Heart J, 1982. **103**(6): p. 1031-9.
120. Isomaa, B., et al., *The metabolic syndrome influences the risk of chronic complications in patients with type II diabetes.* Diabetologia, 2001. **44**(9): p. 1148-1154.
121. Barylski, M., et al., *Plasma total antioxidant activity in comparison with plasma NO and VEGF levels in patients with metabolic syndrome.* Angiology, 2009. **60**(1): p. 87-92.
122. Ziche, M., et al., *Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis.* The Journal of clinical investigation, 1997. **99**(11): p. 2625-2634.



123. Alberti, K.G. and P.Z. Zimmet, *Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation*. Diabet Med, 1998. **15**(7): p. 539-53.
124. Balkau, B. and M.A. Charles, *Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR)*. Diabet Med, 1999. **16**(5): p. 442-3.
125. Alberti, K.G., P. Zimmet, and J. Shaw, *The metabolic syndrome--a new worldwide definition*. Lancet, 2005. **366**(9491): p. 1059-62.
126. Einhorn, D., et al., *American College of Endocrinology position statement on the insulin resistance syndrome*. Endocr Pract, 2003. **9**(3): p. 237-52.
127. Grundy, S.M., et al., *Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement*. Circulation, 2005. **112**(17): p. 2735-2752.
128. Savji, N., et al., *Association between advanced age and vascular disease in different arterial territories: a population database of over 3.6 million subjects*. Journal of the American College of Cardiology, 2013. **61**(16): p. 1736-1743.
129. Larsson, A., E. Sköldenber, and H. Ericson, *Serum and plasma levels of FGF-2 and VEGF in healthy blood donors*. Angiogenesis, 2002. **5**(1-2): p. 107-110.
130. Berrahmoune, H., et al., *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**(3): p. 504-510.
131. Yusuf, S., et al., *Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study*. Lancet, 2004. **364**(9438): p. 937-952.
132. Njølstad, I., E. Arnesen, and P.G. Lund-Larsen, *Smoking, serum lipids, blood pressure, and sex differences in myocardial infarction. A 12-year follow-up of the Finnmark Study*. Circulation, 1996. **93**(3): p. 450-456.
133. Michaud, S.E., et al., *Cigarette smoke exposure impairs VEGF-induced endothelial cell migration: role of NO and reactive oxygen species*. Journal of molecular and cellular cardiology, 2006. **41**(2): p. 275-284.
134. Schmidt-Lucke, C., et al., *Soluble vascular endothelial growth factor, soluble VEGF receptor Flt-1 and endothelial function in healthy smokers*. International journal of cardiology, 2005. **100**(2): p. 207-212.
135. Duggan, C., et al., *Effect of a 12-month exercise intervention on serum biomarkers of angiogenesis in postmenopausal women: a randomized controlled trial*. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology, 2014. **23**(4): p. 648-657.
136. Czarkowska-Paczek, B., et al., *The influence of physical exercise on the generation of TGF- $\beta$ 1, PDGF-AA, and VEGF-A in adipose tissue*. European journal of applied physiology, 2011. **111**(5): p. 875-881.
137. Vital, T.M., et al., *Physical exercise and vascular endothelial growth factor (VEGF) in elderly: A systematic review*. Archives of gerontology and geriatrics, 2014. **59**(2): p. 234-239.

138. Swardfager, W., et al., *Exercise intervention and inflammatory markers in coronary artery disease: a meta-analysis*. American heart journal, 2012. **163**(4): p. 666-76.e1-3.
139. Dong, J.-Y., et al., *Meta-analysis of dietary glycemic load and glycemic index in relation to risk of coronary heart disease*. The American journal of cardiology, 2012. **109**(11): p. 1608-1613.
140. Silvennoinen, M., et al., *High-fat feeding induces angiogenesis in skeletal muscle and activates angiogenic pathways in capillaries*. Angiogenesis, 2013. **16**(2): p. 297-307.
141. Turgeon, J., et al., *Fish oil-enriched diet protects against ischemia by improving angiogenesis, endothelial progenitor cell function and postnatal neovascularization*. Atherosclerosis, 2013. **229**(2): p. 295-303.
142. Ambring, A., et al., *Mediterranean-inspired diet lowers the ratio of serum phospholipid n-6 to n-3 fatty acids, the number of leukocytes and platelets, and vascular endothelial growth factor in healthy subjects*. The American journal of clinical nutrition, 2006. **83**(3): p. 575-581.
143. Shekelle, R.B., et al., *Hostility, risk of coronary heart disease, and mortality*. Psychosomatic medicine, 1983. **45**(2): p. 109-114.
144. Kawachi, I., et al., *Prospective study of phobic anxiety and risk of coronary heart disease in men*. Circulation, 1994. **89**(5): p. 1992-1997.
145. Lichtman, J.H., et al., *Depression and coronary heart disease: recommendations for screening, referral, and treatment: a science advisory from the American Heart Association Prevention Committee of the Council on Cardiovascular Nursing, Council on Clinical Cardiology, Council on Epidemiology and Prevention, and Interdisciplinary Council on Quality of Care and Outcomes Research: endorsed by the American Psychiatric Association*. Circulation, 2008. **118**(17): p. 1768-1775.
146. Mostofsky, E., E.A. Penner, and M.A. Mittleman, *Outbursts of anger as a trigger of acute cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis*. European heart journal, 2014. **35**(21): p. 1404-1410.
147. Koike, M.K. and R. Cardoso, *Meditation can produce beneficial effects to prevent cardiovascular disease*. Hormone molecular biology and clinical investigation, 2014. **18**(3): p. 137-143.
148. Lee, B.-H. and Y.-K. Kim, *Increased plasma VEGF levels in major depressive or manic episodes in patients with mood disorders*. Journal of affective disorders, 2012. **136**(1-2): p. 181-184.
149. Gansevoort, R.T., et al., *Chronic kidney disease and cardiovascular risk: epidemiology, mechanisms, and prevention*. Lancet, 2013. **382**(9889): p. 339-352.
150. Nakagawa, T., *Uncoupling of the VEGF-endothelial nitric oxide axis in diabetic nephropathy: an explanation for the paradoxical effects of VEGF in renal disease*. American journal of physiology. Renal physiology, 2007. **292**(6): p. F1665-72.
151. Reiterová, J., et al., *Influence of VEGF polymorphism on progression of autosomal dominant polycystic kidney disease*. Kidney & blood pressure research, 2008. **31**(6): p. 398-403.
152. Zhao, J., H. Li, and M. Wang, *Acute renal failure in a patient receiving anti-VEGF therapy for advanced non-small cell lung cancer*. Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer, 2009. **4**(9): p. 1185-1187.

153. Georgalas, I., et al., *Renal injury following intravitreal anti-VEGF administration in diabetic patients with proliferative diabetic retinopathy and chronic kidney disease--a possible side effect?* Current drug safety, 2014. **9**(2): p. 156-158.
154. Foster, R.R., *The importance of cellular VEGF bioactivity in the development of glomerular disease.* Nephron. Experimental nephrology, 2009. **113**(1): p. e8-e15.
155. Ribatti, D., F. Levi-Schaffer, and P.T. Kovanen, *Inflammatory angiogenesis in atherogenesis--a double-edged sword.* Ann Med, 2008. **40**(8): p. 606-21.
156. Vuorio, T., S. Jauhiainen, and S. Yla-Herttuala, *Pro- and anti-angiogenic therapy and atherosclerosis with special emphasis on vascular endothelial growth factors.* Expert Opin Biol Ther, 2012. **12**(1): p. 79-92.
157. Matsuo, R., et al., *Clinical significance of plasma VEGF value in ischemic stroke - research for biomarkers in ischemic stroke (REBIOS) study.* BMC neurology, 2013. **13**(1): p. 32.
158. Mărgăritescu, O., D. Pirici, and C. Mărgăritescu, *VEGF expression in human brain tissue after acute ischemic stroke.* Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie, 2011. **52**(4): p. 1283-1292.
159. Chen, J., et al., *Atorvastatin induction of VEGF and BDNF promotes brain plasticity after stroke in mice.* Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 2005. **25**(2): p. 281-290.
160. Soeki, T., et al., *Serial changes in serum VEGF and HGF in patients with acute myocardial infarction.* Cardiology, 2000. **93**(3): p. 168-174.
161. Kawamoto, A., et al., *Serum levels of VEGF and basic FGF in the subacute phase of myocardial infarction.* International journal of cardiology, 1998. **67**(1): p. 47-54.
162. Korybalska, K., et al., *Interpretation of elevated serum VEGF concentrations in patients with myocardial infarction.* Cytokine, 2011. **54**(1): p. 74-78.
163. Lin, T.H., et al., *Vascular endothelial growth factor polymorphisms and extent of coronary atherosclerosis in Chinese population with advanced coronary artery disease.* Am J Hypertens, 2010. **23**(9): p. 960-6.
164. Lin, T.H., et al., *Functional vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and diabetes: effect on coronary collaterals in patients with significant coronary artery disease.* Clin Chim Acta, 2010. **411**(21-22): p. 1688-93.
165. Licastro, F., et al., *Gene-gene and gene - clinical factors interaction in acute myocardial infarction: a new detailed risk chart.* Current pharmaceutical design, 2010. **16**(7): p. 783-788.
166. Douvaras, P., et al., *Association of VEGF gene polymorphisms with the development of heart failure in patients after myocardial infarction.* Cardiology, 2009. **114**(1): p. 11-18.
167. van der Meer, P., 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**(4): p. 279-284.
168. Thanigaimani, S., G. Kichenadasse, and A.A. Mangoni, *The emerging role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in vascular homeostasis: lessons from recent trials with anti-VEGF drugs.* Current vascular pharmacology, 2011. **9**(3): p. 358-380.
169. Turner, H.E., et al., *Angiogenesis in endocrine tumors.* Endocr Rev, 2003. **24**(5): p. 600-32.

170. Kajdaniuk, D., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) - part 2: in endocrinology and oncology*. Endokrynol Pol, 2011. **62**(5): p. 456-64.
171. Turner, H.E., et al., *Angiogenesis in endocrine tumors*. Endocrine reviews, 2003. **24**(5): p. 600-632.
172. Viglietto, G., et al., *Upregulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) and downregulation of placenta growth factor (PlGF) associated with malignancy in human thyroid tumors and cell lines*. Oncogene, 1995. **11**(8): p. 1569-79.
173. Fukumura, D., et al., *Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells*. Cell, 1998. **94**(6): p. 715-725.
174. Sato, K., et al., *Stimulation by thyroid-stimulating hormone and Graves' immunoglobulin G of vascular endothelial growth factor mRNA expression in human thyroid follicles in vitro and flt mRNA expression in the rat thyroid in vivo*. The Journal of clinical investigation, 1995. **96**(3): p. 1295-1302.
175. Ramsden, J.D., *Angiogenesis in the thyroid gland*. The Journal of endocrinology, 2000. **166**(3): p. 475-480.
176. Nagasaki, T., et al., *Significance of thyroid blood flow as a predictor of methimazole sensitivity in untreated hyperthyroid patients with Graves' disease*. Biomed Pharmacother, 2007. **61**(8): p. 472-6.
177. Klein, M., et al., *Vascular endothelial growth factor gene and protein: strong expression in thyroiditis and thyroid carcinoma*. The Journal of endocrinology, 1999. **161**(1): p. 41-49.
178. Nowak, M., et al., *Serum concentration of VEGF and PDGF-AA in patients with active thyroid orbitopathy before and after immunosuppressive therapy*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2014. **122**(10): p. 582-6.
179. Figueroa-Vega, N., et al., *Serum levels of angiogenic molecules in autoimmune thyroid diseases and their correlation with laboratory and clinical features*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(4): p. 1145-53.
180. Zhao, X., G. Wang, and J. You, *[Measurement and correlation analysis of plasma VEGF level in the patients of hyperthyroidism]*. Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi, 2013. **30**(2): p. 365-7.
181. Vural, P., et al., *Vascular endothelial growth factor polymorphisms increase the risk of developing Graves' disease*. Int Immunopharmacol, 2012. **14**(2): p. 133-7.
182. Cristina, C., et al., *VEGF and CD31 association in pituitary adenomas*. Endocrine pathology, 2010. **21**(3): p. 154-160.
183. McCabe, C.J., et al., *Vascular endothelial growth factor, its receptor KDR/Flk-1, and pituitary tumor transforming gene in pituitary tumors*. The Journal of clinical endocrinology and metabolism, 2002. **87**(9): p. 4238-4244.
184. Renner, U., et al., *Transforming growth factor-beta stimulates vascular endothelial growth factor production by folliculostellate pituitary cells*. Endocrinology, 2002. **143**(10): p. 3759-3765.
185. Marek, B., et al., *Acromegaly and the risk of cancer*. Pathophysiology : the official journal of the International Society for Pathophysiology / ISP, 2001. **8**(2): p. 69-75.
186. García de la Torre, N., J.A.H. Wass, and H.E. Turner, *Antiangiogenic effects of somatostatin analogues*. Clinical endocrinology, 2002. **57**(4): p. 425-441.

187. Yarman, S., et al., *Expression of Ki-67, p53 and vascular endothelial growth factor (VEGF) concomitantly in growth hormone-secreting pituitary adenomas; which one has a role in tumor behavior ?* Neuro endocrinology letters, 2010. **31**(6): p. 823-828.
188. Góth, L. and M. Vitai, *The effects of hydrogen peroxide promoted by homocysteine and inherited catalase deficiency on human hypocalasemic patients.* Free radical biology & medicine, 2003. **35**(8): p. 882-888.
189. Miyajima, K., et al., *Inhibitory effects of anti-VEGF antibody on the growth and angiogenesis of estrogen-induced pituitary prolactinoma in Fischer 344 Rats: animal model of VEGF-targeted therapy for human endocrine tumors.* Acta histochemica et cytochemica, 2010. **43**(2): p. 33-44.
190. Luque, G.M., et al., *Inhibitory effects of antivascular endothelial growth factor strategies in experimental dopamine-resistant prolactinomas.* The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 2011. **337**(3): p. 766-774.
191. Balinisteanu, B., et al., *Crosstalk between tumor blood vessels heterogeneity and hormonal profile of pituitary adenomas: evidence and controversies.* Anticancer Res, 2014. **34**(10): p. 5413-20.
192. Risau, W., *Mechanisms of angiogenesis.* Nature, 1997. **386**(6626): p. 671-674.
193. Donnez, J., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis.* Hum Reprod, 1998. **13**(6): p. 1686-90.
194. Saran, U., S. Gemini Piperni, and S. Chatterjee, *Role of angiogenesis in bone repair.* Arch Biochem Biophys, 2014. **561**: p. 109-17.
195. Senel, K., et al., *Circulating vascular endothelial growth factor concentrations in patients with postmenopausal osteoporosis.* Arch Med Sci, 2013. **9**(4): p. 709-12.
196. Claffey, K.P., W.O. Wilkison, and B.M. Spiegelman, *Vascular endothelial growth factor. Regulation by cell differentiation and activated second messenger pathways.* J Biol Chem, 1992. **267**(23): p. 16317-22.
197. Soggia, A., et al., *von Hippel-Lindau gene disruption in mouse pancreatic progenitors and its consequences on endocrine differentiation in vivo: importance of HIF1-alpha and VEGF-A upregulation.* Diabetologia, 2014. **57**(11): p. 2348-56.
198. Ferreira, C.V., et al., *Role of VEGF-A and its receptors in sporadic and MEN2-associated pheochromocytoma.* Int J Mol Sci, 2014. **15**(4): p. 5323-36.
199. Zielke, A., et al., *VEGF-mediated angiogenesis of human pheochromocytomas is associated to malignancy and inhibited by anti-VEGF antibodies in experimental tumors.* Surgery, 2002. **132**(6): p. 1056-63; discussion 1063.
200. Kolomecki, K., H. Stepien, and J.M. Narebski, *Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor evaluation in blood serum of patients with hormonally active and inactive adrenal gland tumours.* Cytobios, 2000. **101**(396): p. 55-64.
201. Bernini, G.P., et al., *Angiogenesis in human normal and pathologic adrenal cortex.* J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(11): p. 4961-5.
202. Korzeniewska, M., et al., *[Assessment of pro- and antiangiogenic factors blood serum concentrations in patients with hormonal inactive adrenal tumors].* Endokrynol Pol, 2005. **56**(1): p. 39-44.
203. Folkman, J., *Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease.* Nat Med, 1995. **1**(1): p. 27-31.
204. Shi, B., X. Wang, and Z. Yang, *Vascular endothelial growth factors and liver diseases.* Hepato-gastroenterology, 2001. **48**(40): p. 1145-1148.

205. Pircher, A., M. Medinger, and J. Dreves, *Liver cancer: Targeted future options*. World journal of hepatology, 2011. **3**(2): p. 38-44.
206. Carmeliet, P. and R.K. Jain, *Angiogenesis in cancer and other diseases*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 249-257.
207. Zhu, A.X., et al., *HCC and angiogenesis: possible targets and future directions*. Nature reviews. Clinical oncology, 2011. **8**(5): p. 292-301.
208. Jubb, A.M., et al., *Expression of vascular endothelial growth factor, hypoxia inducible factor 1alpha, and carbonic anhydrase IX in human tumours*. Journal of clinical pathology, 2004. **57**(5): p. 504-512.
209. Harmey, J.H., et al., *Regulation of macrophage production of vascular endothelial growth factor (VEGF) by hypoxia and transforming growth factor beta-1*. Annals of surgical oncology, 1998. **5**(3): p. 271-278.
210. Claffey, K.P. and G.S. Robinson, *Regulation of VEGF/VPF expression in tumor cells: consequences for tumor growth and metastasis*. Cancer metastasis reviews, 1996. **15**(2): p. 165-176.
211. Folkman, J., *Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease*. Nature medicine, 1995. **1**(1): p. 27-31.
212. Qin, L.-X. and Z.-Y. Tang, *The prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma*. World journal of gastroenterology : WJG, 2002. **8**(3): p. 385-392.
213. Ferrara, N. and T. Davis-Smyth, *The biology of vascular endothelial growth factor*. Endocrine reviews, 1997. **18**(1): p. 4-25.
214. Capp, C., et al., *Increased expression of vascular endothelial growth factor and its receptors, VEGFR-1 and VEGFR-2, in medullary thyroid carcinoma*. Thyroid : official journal of the American Thyroid Association, 2010. **20**(8): p. 863-871.
215. Yamaguchi, R., et al., *Expression of vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma*. Hepatology (Baltimore, Md.), 1998. **28**(1): p. 68-77.
216. Salgado, R., et al., *Arterio-venous gradients of IL-6, plasma and serum VEGF and D-dimers in human cancer*. British journal of cancer, 2002. **87**(12): p. 1437-1444.
217. Shimada, H., et al., *Clinical significance of serum vascular endothelial growth factor in esophageal squamous cell carcinoma*. Cancer, 2001. **92**(3): p. 663-669.
218. Broll, R., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF)--a valuable serum tumour marker in patients with colorectal cancer? European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology, 2001. 27(1): p. 37-42.*
219. Oehler, M.K. and H. Caffier, *Prognostic relevance of serum vascular endothelial growth factor in ovarian cancer*. Anticancer research, 2000. **20**(6D): p. 5109-5112.
220. Gornall, R.J., et al., *Investigation of women with endometrial carcinoma using serum vascular endothelial growth factor (VEGF) measurement*. International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society, 2001. **11**(2): p. 164-166.
221. Holzer, G., et al., *Concentration of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the serum of patients with malignant bone tumors*. Medical and pediatric oncology, 2001. **36**(6): p. 601-604.
222. George, D.J., et al., *Prognostic significance of plasma vascular endothelial growth factor levels in patients with hormone-refractory prostate cancer treated on Cancer*

- and Leukemia Group B 9480. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2001. 7(7): p. 1932-1936.*
223. Wong, M.P., et al., *Vascular endothelial growth factor is up-regulated in the early pre-malignant stage of colorectal tumour progression.* International journal of cancer. Journal international du cancer, 1999. **81**(6): p. 845-850.
  224. Klein, M., et al., *Vascular endothelial growth factor gene and protein: strong expression in thyroiditis and thyroid carcinoma.* J Endocrinol, 1999. **161**(1): p. 41-9.
  225. Fenton, C., et al., *The expression of vascular endothelial growth factor and the type 1 vascular endothelial growth factor receptor correlate with the size of papillary thyroid carcinoma in children and young adults.* Thyroid : official journal of the American Thyroid Association, 2000. **10**(4): p. 349-357.
  226. Soh, E.Y., et al., *Vascular endothelial growth factor expression is higher in differentiated thyroid cancer than in normal or benign thyroid.* The Journal of clinical endocrinology and metabolism, 1997. **82**(11): p. 3741-3747.
  227. Siironen, P., et al., *Prognostic factors in papillary thyroid cancer: an evaluation of 601 consecutive patients.* Tumour Biol, 2005. **26**(2): p. 57-64.
  228. Chang, D.F., Z.Q. Xu, and B. Sun, *Relationship between VEGF protein expression and lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma among Asians: a meta-analysis.* Tumour Biol, 2014. **35**(6): p. 5511-8.
  229. Salajegheh, A., et al., *Single nucleotide polymorphisms and mRNA expression of VEGF-A in papillary thyroid carcinoma: potential markers for aggressive phenotypes.* Eur J Surg Oncol, 2011. **37**(1): p. 93-9.
  230. Hsiao, P.J., et al., *Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms in thyroid cancer.* J Endocrinol, 2007. **195**(2): p. 265-70.
  231. Bellamy, V. and C. Beaumel. *Bilan démographique 2014. Des décès moins nombreux.* 2015; Available from: <http://www.epsilon.insee.fr/jspui/handle/1/26013>.
  232. Maher, D., N. Ford, and N. Unwin, *Priorities for developing countries in the global response to non-communicable diseases.* Global Health, 2012. **8**: p. 14.
  233. de Belvis, A.G., et al., *The financial crisis in Italy: implications for the healthcare sector.* Health Policy, 2012. **106**(1): p. 10-6.
  234. *Horizon 2020: European perspectives in healthcare sciences and implementation.* 2014. **5**((suppl 1)): p. A1.
  235. Golubnitschaja, O., J. Kinkorova, and V. Costigliola, *Predictive, Preventive and Personalised Medicine as the hardcore of 'Horizon 2020': EPMA position paper.* Epma j, 2014. **5**(1): p. 6.
  236. *Personalised Medicine: an EU Perspective.* 2014: p. 1-13.
  237. Esteller, M., *Non-coding RNAs in human disease.* Nat Rev Genet, 2011. **12**(12): p. 861-74.
  238. McGregor, E. and M.J. Dunn, *Proteomics of the heart: unraveling disease.* Circ Res, 2006. **98**(3): p. 309-21.
  239. Sharma, P., J. Cosme, and A.O. Gramolini, *Recent advances in cardiovascular proteomics.* J Proteomics, 2012.
  240. Ballestar, E., *An introduction to epigenetics.* Adv Exp Med Biol, 2011. **711**: p. 1-11.
  241. Quinn, T.A. and P. Kohl, *Systems biology of the heart: hype or hope?* Ann N Y Acad Sci, 2011. **1245**: p. 40-3.

242. Chan, S.Y., K. White, and J. Loscalzo, *Deciphering the molecular basis of human cardiovascular disease through network biology*. *Curr Opin Cardiol*, 2012. **27**(3): p. 202-9.
243. Azuaje, F.J., et al., *Systems-based approaches to cardiovascular biomarker discovery*. *Circ Cardiovasc Genet*, 2012. **5**(3): p. 360-7.
244. Escudier, B., 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): p. 2103-11.
245. Flaherty, K.T., 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): p. 496-501.
246. Heng, D.Y., 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): p. 5794-9.
247. Tsavachidou-Fenner, D., 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): p. 1599-606.
248. Emmanouilides, C., et al., *Anti-VEGF antibody bevacizumab (Avastin) with 5FU/LV as third line treatment for colorectal cancer*. *Tech Coloproctol*, 2004. **8 Suppl 1**: p. s50-2.
249. Jayson, G.C., 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): p. 555-63.
250. Kabbinavar, F.F., et al., *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): p. 3706-12.
251. Dutton, S.J., 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): p. 894-904.
252. Fuchs, C.S., 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): p. 31-9.
253. Gilbert, M.R., et al., *A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma*. *N Engl J Med*, 2014. **370**(8): p. 699-708.
254. Wiestler, B., et al., *Towards optimizing the sequence of bevacizumab and nitrosoureas in recurrent malignant glioma*. *J Neurooncol*, 2014. **117**(1): p. 85-92.
255. Ahn, J.S., 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): p. 455-60.
256. Berruti, A., 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**: p. 184.
257. Corrie, P.G., 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): p. 620-30.



258. Mahalingam, D., 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): p. 77-84.
259. Penson, R.T., 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): p. 478-85.
260. Schilder, R.J., 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): p. 86-91.
261. Tamiya, M., et al., *Phase 2 study of bevacizumab with carboplatin-paclitaxel for non-small cell lung cancer with malignant pleural effusion*. *Med Oncol*, 2013. **30**(3): p. 676.
262. Henry, T.D., et al., *Intracoronary administration of recombinant human vascular endothelial growth factor to patients with coronary artery disease*. *Am Heart J*, 2001. **142**(5): p. 872-80.
263. Debette, S., 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): p. 554-63.
264. Milan, A., et al., *Arterial hypertension and cancer*. *Int J Cancer*, 2014. **134**(10): p. 2269-77.
265. Minardi, D., et al., *VEGF expression and response to sunitinib in patients with metastatic clear cell renal cell carcinoma*. *Anticancer Res*, 2013. **33**(11): p. 5017-22.
266. Visvikis-Siest, S. and G. Siest, *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): p. 733-47.
267. Siest, G., 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): p. 35-42.
268. Friedewald, W.T., R.I. Levy, and D.S. Fredrickson, *Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge*. *Clin Chem*, 1972. **18**(6): p. 499-502.
269. Bahn, R.S., et al., *Hyperthyroidism and other causes of thyrotoxicosis: management guidelines of the American Thyroid Association and American Association of Clinical Endocrinologists*. *Endocr Pract*, 2011. **17**(3): p. 456-520.
270. Garber, A.J., et al., *Attainment of glycaemic goals in type 2 diabetes with once-, twice-, or thrice-daily dosing with biphasic insulin aspart 70/30 (The 1-2-3 study)*. *Diabetes Obes Metab*, 2006. **8**(1): p. 58-66.
271. Fitzgerald, S.P., et al., *Development of a high-throughput automated analyzer using biochip array technology*. *Clin Chem*, 2005. **51**(7): p. 1165-76.
272. Purcell, S., et al., *PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses*. *Am J Hum Genet*, 2007. **81**(3): p. 559-75.
273. Lengfeld, J., T. Cutforth, and D. Agalliu, *The role of angiogenesis in the pathology of multiple sclerosis*. *Vasc Cell*, 2014. **6**(1): p. 23.

274. Rutella, S., et al., *Infliximab therapy inhibits inflammation-induced angiogenesis in the mucosa of patients with Crohn's disease*. Am J Gastroenterol, 2011. **106**(4): p. 762-70.
275. Gulati, N., et al., *Vascular endothelial growth factor inhibition in uveitis: a systematic review*. Br J Ophthalmol, 2011. **95**(2): p. 162-5.
276. Volpi, N., et al., *Antiangiogenic VEGF isoform in inflammatory myopathies*. Mediators Inflamm, 2013. **2013**: p. 219313.
277. Terzi, H., et al., *The association between therapeutic outcomes and VEGF G-1154A and C-936T gene polymorphisms in patients with glomerulonephritis*. Ren Fail, 2014. **36**(6): p. 904-7.
278. Iitaka, M., et al., *Increased serum vascular endothelial growth factor levels and intrathyroidal vascular area in patients with Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis*. J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**(11): p. 3908-12.
279. Cid, M.C., et al., *Cell adhesion molecules in the development of inflammatory infiltrates in giant cell arteritis: inflammation-induced angiogenesis as the preferential site of leukocyte-endothelial cell interactions*. Arthritis Rheum, 2000. **43**(1): p. 184-94.
280. Yukami, T., et al., *Endothelial selectins regulate skin wound healing in cooperation with L-selectin and ICAM-1*. J Leukoc Biol, 2007. **82**(3): p. 519-31.
281. Mills, P.J., et al., *Predictors of inflammation in response to anthracycline-based chemotherapy for breast cancer*. Brain Behav Immun, 2008. **22**(1): p. 98-104.
282. Liu, N., et al., *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): p. 467-76.
283. Szekanecz, Z., et al., *Angiogenesis in rheumatoid arthritis*. Autoimmunity, 2009. **42**(7): p. 563-73.
284. Mikos, H., et al., *The clinical role of serum concentrations of selected cytokines: IL-1beta, TNF-alpha and IL-6 in diagnosis of autoimmune thyroid disease (AITD) in children*. Autoimmunity, 2014. **47**(7): p. 466-72.
285. Masek, Z., et al., *[Plasma and tissue levels of cytokines and adhesive molecules in patients before strumectomy]*. Vnitr Lek, 1996. **42**(11): p. 747-50.
286. Hara, H., et al., *Plasma selectin levels in patients with Graves' disease*. Endocr J, 1996. **43**(6): p. 709-13.
287. Krysiak, R. and B. Okopien, *The effect of levothyroxine and selenomethionine on lymphocyte and monocyte cytokine release in women with Hashimoto's thyroiditis*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(7): p. 2206-15.
288. Bonita, R.E., et al., *Adhesion molecules as susceptibility factors in spontaneous autoimmune thyroiditis in the NOD-H2h4 mouse*. Exp Mol Pathol, 2002. **73**(3): p. 155-63.
289. Desideri, G., et al., *Enhanced proatherogenic inflammation after recombinant human TSH administration in patients monitored for thyroid cancer remnant*. Clin Endocrinol (Oxf), 2009. **71**(3): p. 429-33.
290. Braun, S., K. Bitton-Worms, and D. LeRoith, *The link between the metabolic syndrome and cancer*. Int J Biol Sci, 2011. **7**(7): p. 1003-15.
291. Romon, I., et al., *The excess mortality related to cardiovascular diseases and cancer among adults pharmacologically treated for diabetes--the 2001-2006 ENTRED cohort*. Diabet Med, 2014. **31**(8): p. 946-53.

292. Iyengar, N.M., C.A. Hudis, and A.J. Dannenberg, *Obesity and cancer: local and systemic mechanisms*. *Annu Rev Med*, 2015. **66**: p. 297-309.
293. Mendonca, F.M., et al., *Metabolic syndrome and risk of cancer: Which link?* *Metabolism*, 2015. **64**(2): p. 182-189.
294. Kowalski, J., et al., [*Plasma nitric oxide and vascular endothelial growth factor levels in patients with metabolic syndrome and co-existing vascular complications*]. *Pol Merkur Lekarski*, 2011. **30**(178): p. 249-52.
295. Wada, H., et al., *Soluble VEGF receptor-2 is increased in sera of subjects with metabolic syndrome in association with insulin resistance*. *Atherosclerosis*, 2010. **208**(2): p. 512-7.
296. Dallongeville, J., et al., *Household income is associated with the risk of metabolic syndrome in a sex-specific manner*. *Diabetes Care*, 2005. **28**(2): p. 409-15.
297. Grundy, S.M., et al., *Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement*. *Circulation*, 2005. **112**(17): p. 2735-52.
298. Cameron, A., *The metabolic syndrome: validity and utility of clinical definitions for cardiovascular disease and diabetes risk prediction*. *Maturitas*, 2010. **65**(2): p. 117-21.
299. Kim, J.J., 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**(7): p. 1946-54.
300. Ryanne Wu, R., et al., *Evaluation of hypertension as a marker of bevacizumab efficacy*. *J Gastrointest Cancer*, 2009. **40**(3-4): p. 101-8.
301. Arnold, M., et al., *Global burden of cancer attributable to high body-mass index in 2012: a population-based study*. *Lancet Oncol*, 2014.
302. Fernandez-Garcia, J.C., F. Cardona, and F.J. Tinahones, *Inflammation, oxidative stress and metabolic syndrome: dietary modulation*. *Curr Vasc Pharmacol*, 2013. **11**(6): p. 906-19.
303. Youn, J.Y., et al., *Role of vascular oxidative stress in obesity and metabolic syndrome*. *Diabetes*, 2014. **63**(7): p. 2344-55.
304. Maia, F.M., E.B. Santos, and G.E. Reis, *Oxidative stress and plasma lipoproteins in cancer patients*. *Einstein (Sao Paulo)*, 2014. **0**: p. 0.
305. Thanan, R., et al., *Oxidative Stress and Its Significant Roles in Neurodegenerative Diseases and Cancer*. *Int J Mol Sci*, 2014. **16**(1): p. 193-217.
306. Katsabeki-Katsafli, A., et al., *Serum vascular endothelial growth factor is related to systemic oxidative stress in patients with lung cancer*. *Lung Cancer*, 2008. **60**(2): p. 271-6.
307. Muders, M.H., et al., *Vascular endothelial growth factor-C protects prostate cancer cells from oxidative stress by the activation of mammalian target of rapamycin complex-2 and AKT-1*. *Cancer Res*, 2009. **69**(15): p. 6042-8.
308. Ersoy, C., et al., *The effect of metformin treatment on VEGF and PAI-1 levels in obese type 2 diabetic patients*. *Diabetes Res Clin Pract*, 2008. **81**(1): p. 56-60.
309. Orecchioni, S., et al., *The biguanides metformin and phenformin inhibit angiogenesis, local and metastatic growth of breast cancer by targeting both neoplastic and microenvironment cells*. *Int J Cancer*, 2015. **136**(6): p. E534-44.

310. Morales, D.R. and A.D. Morris, *Metformin in cancer treatment and prevention*. *Annu Rev Med*, 2015. **66**: p. 17-29.
311. Berrahmoune, H., et al., *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*, 2006. **52**(3): p. 504-10.
312. Boerwinkle, E., et al., *The use of measured genotype information in the analysis of quantitative phenotypes in man. II. The role of the apolipoprotein E polymorphism in determining levels, variability, and covariability of cholesterol, betalipoprotein, and triglycerides in a sample of unrelated individuals*. *Am J Med Genet*, 1987. **27**(3): p. 567-82.
313. Gueguen, R., et al., *An analysis of genotype effects and their interactions by using the apolipoprotein E polymorphism and longitudinal data*. *Am J Hum Genet*, 1989. **45**(5): p. 793-802.
314. Vincent-Viry, M., et al., *Biological variations and genetic reference values for apolipoprotein E serum concentrations: results from the STANISLAS cohort study*. *Clin Chem*, 1998. **44**(5): p. 957-65.
315. Lucotte, G., et al., *Apolipoprotein E-epsilon 4 allele and Alzheimer's disease*. *Lancet*, 1993. **342**(8882): p. 1309.
316. Viglietto, G., et al., *Upregulation of the angiogenic factors PIGF, VEGF and their receptors (Flt-1, Flk-1/KDR) by TSH in cultured thyrocytes and in the thyroid gland of thiouracil-fed rats suggest a TSH-dependent paracrine mechanism for goiter hypervascularization*. *Oncogene*, 1997. **15**(22): p. 2687-98.
317. Heufelder, A.E. and R.S. Bahn, *Elevated expression in situ of selectin and immunoglobulin superfamily type adhesion molecules in retroocular connective tissues from patients with Graves' ophthalmopathy*. *Clin Exp Immunol*, 1993. **91**(3): p. 381-9.
318. Sivanandam, V.G., et al., *Lethality in an anti-angiogenic tumor gene therapy model upon constitutive but not inducible expression of the soluble vascular endothelial growth factor receptor 1*. *J Gene Med*, 2008. **10**(10): p. 1083-91.
319. Vanderpump, M.P., *The epidemiology of thyroid disease*. *Br Med Bull*, 2011. **99**: p. 39-51.
320. Catena, R., et al., *VEGF(1)(2)(1)b and VEGF(1)(6)(5)b are weakly angiogenic isoforms of VEGF-A*. *Mol Cancer*, 2010. **9**: p. 320.
321. Barleon, B., et al., *Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1*. *Blood*, 1996. **87**(8): p. 3336-43.
322. Goebel, S., et al., *VEGF-A stimulation of leukocyte adhesion to colonic microvascular endothelium: implications for inflammatory bowel disease*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006. **290**(4): p. G648-54.
323. Cooper, D.S., *Antithyroid drugs*. *N Engl J Med*, 2005. **352**(9): p. 905-17.
324. Schmid, C., et al., *Effect of thyroxine replacement on creatinine, insulin-like growth factor 1, acid-labile subunit, and vascular endothelial growth factor*. *Clin Chem*, 2004. **50**(1): p. 228-31.
325. Berrahmoune, H., et al., *Heritability for plasma VEGF concentration in the Stanislas family study*. *Ann Hum Genet*, 2007. **71**(Pt 1): p. 54-63.

326. Lieb, W., 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): p. 1121-7.
327. Ueda, M., et al., *The significance of thyroid blood flow at the inferior thyroid artery as a predictor for early Graves' disease relapse.* Clin Endocrinol (Oxf), 2005. **63**(6): p. 657-62.
328. Zuhur, S.S., et al., *The Diagnostic Utility of Color Doppler Ultrasonography, Tc-99m Pertechnetate Uptake, and TSH-Receptor Antibody for Differential Diagnosis of Graves' Disease and Silent Thyroiditis: A Comparative Study.* Endocr Pract, 2014. **20**(4): p. 310-9.
329. Renner, W., et al., *A common 936 C/T mutation in the gene for vascular endothelial growth factor is associated with vascular endothelial growth factor plasma levels.* J Vasc Res, 2000. **37**(6): p. 443-8.
330. Zhai, R., et al., *Genotypes and haplotypes of the VEGF gene are associated with higher mortality and lower VEGF plasma levels in patients with ARDS.* Thorax, 2007. **62**(8): p. 718-22.
331. Kamoun, M., et al., *Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and serum levels in Behcet's disease.* Tissue Antigens, 2008. **72**(6): p. 581-7.
332. Steffensen, K.D., et al., *The relationship of VEGF polymorphisms with serum VEGF levels and progression-free survival in patients with epithelial ovarian cancer.* Gynecol Oncol, 2010. **117**(1): p. 109-16.
333. Petrovic, M.G., et al., *Local and genetic determinants of vascular endothelial growth factor expression in advanced proliferative diabetic retinopathy.* Mol Vis, 2008. **14**: p. 1382-7.
334. Ferrante, M., et al., *The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in inflammatory bowel disease.* Inflamm Bowel Dis, 2006. **12**(9): p. 870-8.
335. Azimi-Nezhad, M., et al., *Associations of vascular endothelial growth factor (VEGF) with adhesion and inflammation molecules in a healthy population.* Cytokine, 2013. **61**(2): p. 602-7.
336. Shimomura, N., et al., *Effects of interleukins on EGF-stimulated growth promotion in human thyroid cells: differential modifications by IL-2 and IL-6 in Graves' and normal thyroid cells.* Endocr Regul, 1994. **28**(2): p. 55-65.
337. Corrales, J.J., et al., *Analysis of IL-2 and IL-6 binding to peripheral blood lymphocytes in Graves disease: relationship with disease activity.* Cytometry, 1997. **30**(3): p. 118-23.
338. Jones, B.M., C.C. Kwok, and A.W. Kung, *Effect of radioactive iodine therapy on cytokine production in Graves' disease: transient increases in interleukin-4 (IL-4), IL-6, IL-10, and tumor necrosis factor-alpha, with longer term increases in interferon-gamma production.* J Clin Endocrinol Metab, 1999. **84**(11): p. 4106-10.
339. Nygaard, B., et al., *Serum levels of the cytokines IL-1beta, IL-6 and ICAM-1 after 131I-treatment of Graves' disease and nodular goiter.* Horm Metab Res, 2000. **32**(7): p. 283-7.
340. Bossowski, A., et al., *[Serum levels of interleukin 6 (IL-6) and soluble IL-6 receptor (sIL-6R) in children and adolescents with Graves-Basedow disease].* Endokrynol Diabetol Chor Przemiany Materii Wieku Rozw, 1999. **5**(2): p. 85-93.

341. Chen, R.H., et al., *Lack of association between pro-inflammatory cytokine (IL-6, IL-8 and TNF-alpha) gene polymorphisms and Graves' disease*. Int J Immunogenet, 2005. **32**(6): p. 343-7.
342. Luidens, M.K., et al., *Thyroid hormone and angiogenesis*. Vascul Pharmacol, 2010. **52**(3-4): p. 142-5.
343. Figueroa-Vega, N., et al., *Increased circulating pro-inflammatory cytokines and Th17 lymphocytes in Hashimoto's thyroiditis*. J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(2): p. 953-62.
344. Loupakis, F., et al., *Prospective validation of candidate SNPs of VEGF/VEGFR pathway in metastatic colorectal cancer patients treated with first-line FOLFIRI plus bevacizumab*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e66774.
345. *Diabète traité: quelles évolutions entre 2000 et 2009 en France*. 2010.
346. Bonnefond, A., 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**(2): p. e55921.
347. Scoazec, J.Y., *Angiogenesis in neuroendocrine tumors: therapeutic applications*. Neuroendocrinology, 2013. **97**(1): p. 45-56.
348. Terris, B., et al., *Expression of vascular endothelial growth factor in digestive neuroendocrine tumours*. Histopathology, 1998. **32**(2): p. 133-8.
349. Couvelard, A., et al., *Microvascular density and hypoxia-inducible factor pathway in pancreatic endocrine tumours: negative correlation of microvascular density and VEGF expression with tumour progression*. Br J Cancer, 2005. **92**(1): p. 94-101.
350. Couvelard, A., et al., *Overexpression of the oxygen sensors PHD-1, PHD-2, PHD-3, and FIH Is associated with tumor aggressiveness in pancreatic endocrine tumors*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(20): p. 6634-9.
351. Valko, M., et al., *Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer*. Chem Biol Interact, 2006. **160**(1): p. 1-40.
352. Eng, L. and G. Liu, *VEGF pathway polymorphisms as prognostic and pharmacogenetic factors in cancer: a 2013 update*. Pharmacogenomics, 2013. **14**(13): p. 1659-67.
353. *Omics approaches in breast cancer*. Springer, 2014.
354. Inoue, M., et al., *Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life*. Curr Med Chem, 2003. **10**(23): p. 2495-505.
355. Barylski, M., et al., *Plasma total antioxidant activity in comparison with plasma NO and VEGF levels in patients with metabolic syndrome*. Angiology, 2009. **60**(1): p. 87-92.
356. Towler, M.C. and D.G. Hardie, *AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling*. Circ Res, 2007. **100**(3): p. 328-41.
357. Decensi, A., et al., *Metformin and cancer risk in diabetic patients: a systematic review and meta-analysis*. Cancer Prev Res (Phila), 2010. **3**(11): p. 1451-61.
358. Singh, R., S. Devi, and R. Gollen, *Role of free radical in atherosclerosis, diabetes and dyslipidemia: larger-than-life*. Diabetes Metab Res Rev, 2014.
359. Rostami, R., et al., *Enhanced oxidative stress in Hashimoto's thyroiditis: inter-relationships to biomarkers of thyroid function*. Clin Biochem, 2013. **46**(4-5): p. 308-12.
360. Xing, M., *Oxidative stress: a new risk factor for thyroid cancer*. Endocr Relat Cancer, 2012. **19**(1): p. C7-11.

361. Sprung, C.N., et al., *Oxidative DNA damage caused by inflammation may link to stress-induced non-targeted effects*. *Cancer Lett*, 2015. **356**(1): p. 72-81.
362. Merino, J., et al., *Physical activity below the minimum international recommendations improves oxidative stress, ADMA levels, resting heart rate and small artery endothelial function*. *Clin Investig Arterioscler*, 2015. **27**(1): p. 9-16.
363. Samad, A.K., et al., *A meta-analysis of the association of physical activity with reduced risk of colorectal cancer*. *Colorectal Dis*, 2005. **7**(3): p. 204-13.
364. Kim, M.K., S.W. Cho, and Y.K. Park, *Long-term vegetarians have low oxidative stress, body fat, and cholesterol levels*. *Nutr Res Pract*, 2012. **6**(2): p. 155-61.
365. Somannavar, M.S. and M.V. Kodliwadmth, *Correlation between oxidative stress and antioxidant defence in South Indian urban vegetarians and non-vegetarians*. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2012. **16**(3): p. 351-4.
366. Frentzel-Beyme, R. and J. Chang-Claude, *Vegetarian diets and colon cancer: the German experience*. *Am J Clin Nutr*, 1994. **59**(5 Suppl): p. 1143s-1152s.
367. Tantamango-Bartley, Y., et al., *Vegetarian diets and the incidence of cancer in a low-risk population*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2013. **22**(2): p. 286-94.
368. Isoda, K., et al., *Metformin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor-kappaB in human vascular wall cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(3): p. 611-7.
369. Xu, X., et al., *Effect of metformin on serum interleukin-6 levels in polycystic ovary syndrome: a systematic review*. *BMC Womens Health*, 2014. **14**: p. 93.
370. Gomez-Diaz, R.A., et al., *Metformin decreases plasma resistin concentrations in pediatric patients with impaired glucose tolerance: a placebo-controlled randomized clinical trial*. *Metabolism*, 2012. **61**(9): p. 1247-55.
371. Song, Y.M., et al., *Metformin alleviates hepatosteatosis by restoring SIRT1-mediated autophagy induction via an AMP-activated protein kinase-independent pathway*. *Autophagy*, 2014: p. 0.
372. Choi, J.E. and R. Mostoslavsky, *Sirtuins, metabolism, and DNA repair*. *Curr Opin Genet Dev*, 2014. **26**: p. 24-32.
373. Anedda, A., E. Rial, and M.M. Gonzalez-Barroso, *Metformin induces oxidative stress in white adipocytes and raises uncoupling protein 2 levels*. *J Endocrinol*, 2008. **199**(1): p. 33-40.
374. Uehara, T., et al., *Metformin potentiates the anticancer effects of cisplatin under normoxic conditions in vitro*. *Oncol Rep*, 2015. **33**(2): p. 744-50.
375. Ben Sahra, I., et al., *Metformin in cancer therapy: a new perspective for an old antidiabetic drug?* *Mol Cancer Ther*, 2010. **9**(5): p. 1092-9.
376. Del Barco, S., et al., *Metformin: multi-faceted protection against cancer*. *Oncotarget*, 2011. **2**(12): p. 896-917.

## **Publications**





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

Mohsen Azimi-Nezhad<sup>a,1</sup>, Maria G. Stathopoulou<sup>a,1</sup>, Amélie Bonnefond<sup>a</sup>, Marc Rancier<sup>a</sup>, Abdelsalam Saleh<sup>a</sup>, John Lamont<sup>b</sup>, Peter Fitzgerald<sup>b</sup>, Ndeye Coumba Ndiaye<sup>a</sup>, Sophie Visvikis-Siest<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>“Cardiovascular Genetics” Research Unit, EA4373, University of Lorraine, F-54000 Nancy, France

<sup>b</sup>Randox 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- $\alpha$   
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- $\alpha$ , 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, VEGF<sub>145</sub> mRNA was associated with ICAM-1, L-selectin and TNF- $\alpha$  expression. Interactions of the genetic variants were shown to affect ICAM-1, E-selectin, IL-6 and TNF- $\alpha$  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. VEGF<sub>145</sub> and VEGF<sub>206</sub> have a key role during the angiogenesis of the human ovarian as well as in bone and wound healing [1,3,4]. VEGF<sub>183</sub> also has a broad tissue expression and may have not been easily detected earlier due to confusion with VEGF<sub>189</sub> [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](mailto:Sophie.Visvikis-Siest@inserm.fr) (S. Visvikis-Siest).

<sup>1</sup> 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- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ) 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 VEGF<sub>165</sub> [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- $\alpha$ , 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<sup>®</sup>) [27].

Plasma IL-6, TNF- $\alpha$ , 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<sup>™</sup> 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  $\mu$ 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'-TgCAGACCAAAgAAAATAgCAgACA], VEGF145 [antisense: 5'-CTTgTCACATACgCTCCAggAC-3' and probe: 5'AAACgAAAgCgCAAgAAATCCCggTA-3'], VEGF165 [antisense: 5'-GCTTCTCCgCTC TgAgCA-3' and probe: 5'-AgCAAgACAAGAAATCCCTgTgggCC-3'], VEGF189 [antisense: 5'-CCACAggAACgCTCCAggAC-3' and probe: 5'-AgCAAgACAAGAAAAAATCAgTTCgAggAAA-3']), ICAM-1, E-, L-, P-selectins, TNF- $\alpha$ , IL-6 and the beta 2 microglobulin ( $\beta$ 2M) control gene were performed using TaqMan<sup>®</sup> and LightCycler technologies (LC TaqMan Master Kit, Roche Diagnostics, France). It should be mentioned that a common VEGF forward primer (5'-gAgCTTCTCAgCA CAACAA-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<sup>®</sup> Green technology (LC FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR Green I kit, Roche Diagnostic, France), melting curves analysis and agarose gel electrophoresis of the PCR amplicons, as previously described [29]. VEGF<sub>183</sub>, VEGF<sub>206</sub>, 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  $\beta$ 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 VEGF<sub>165</sub> and VEGF<sub>180</sub> 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://pngu.mgh.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- $\alpha$ , and IL-6 in PBMCs. VEGF<sub>165</sub> 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- $\alpha$  mRNA levels ( $\beta = 0.412$ ,  $P = 0.015$ ), while VEGF<sub>145</sub> 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- $\alpha$  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- $\alpha$ , 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- $\alpha$  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 <sup>a</sup>	SD
Age (years)	44.460	4.885
Gender (%) male	50.4	
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	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 $\alpha$ (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

<sup>a</sup> Mean values for continuous variables and percentages for categorical variables.

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

Variable	Mean <sup>a</sup>	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 $\alpha$	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

<sup>a</sup> Mean values are presented as normalized ratio with the beta 2 microglobulin ( $\beta 2M$ ) control gene.

**Table 3**  
SNPs characteristics.

Chromosome	SNP	Function	Closed to/on gene	Minor allele	Common allele	Minor allele frequency
6	rs6921438	Intergenic	MCC45491 and MRPL14 (near VEGF)	A	G	0.445
6	rs4416670	Intergenic	MCC45491 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, MCC: 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- $\alpha$	
	mRNA	Protein	mRNA	Protein	mRNA	Protein	mRNA	Protein
mRNA								
Total VEGF							0.412 (P = 0.015)	
VEGF <sub>121</sub>								
VEGF <sub>145</sub>	0.353 (P = 0.018)		0.611 (P = 0.001)				0.616 (P = 0.001)	
VEGF <sub>165</sub>								
VEGF <sub>189</sub>								
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- $\alpha$ , ICAM-1 and IL6 (regression models adjusted for age, gender and BMI).

SNPs	rs6921438	rs4416670	rs6993770	rs10738760
rs6921438				VEGF (P = 0.01)
rs4416670	TNF- $\alpha$ (P = 0.035)			
rs6993770	IL-6 (P = 0.004)	IL-6 (P = 0.0008)		E-selectin (P = 0.041)
rs10738760	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 VEGF<sub>165</sub> is the most abundant VEGF isoform [1,3] as we found that VEGF<sub>165</sub> mRNA is one that prevails in PBMCs. We demonstrated that VEGF<sub>145</sub> isoform mRNA is positively associated with ICAM-1, L-selectin and TNF- $\alpha$  expression while total VEGF mRNA is associated with TNF- $\alpha$ . Nowak et al. [40] have reported

that TNF- $\alpha$  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- $\kappa$ B transcription factor [41]. A growing body of evidence indicates that the activation of NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ B activation. Interestingly, Kiriakidis and colleagues [2] have documented the involvement of the transcription factor NF- $\kappa$ 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- $\alpha$ , it has been shown to induce VEGF production via the stimulation of its corresponding transcription factor, HIF1- $\alpha$  [46]. Westra and colleagues [47] have shown that blocking of TNF- $\alpha$  reduces TNF- $\alpha$  induced VEGF production. Further studies have documented that TNF- $\alpha$  up regulates VEGF production by synovial membrane cells and PBMCs of patients with rheumatoid arthritis [48,49]. It has also been shown that NF- $\kappa$ B is partly responsible for the up-regulation of VEGF mRNA expression in response to TNF- $\alpha$  [50]. Our study revealed that VEGF<sub>145</sub> 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- $\alpha$  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 VEGF<sub>145</sub> isoform mRNA showed associations with the CAM/inflammation molecules expression. VEGF<sub>145</sub> binds to heparin but behaves like VEGF<sub>121</sub> with regard to its receptor recognition ability. It also has angiogenic effects similar to VEGF<sub>121</sub> and VEGF<sub>165</sub>. Also, among VEGF isoforms, VEGF<sub>145</sub> 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 VEGF<sub>145</sub> 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- $\alpha$  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 VEGF<sub>145</sub> 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- $\alpha$  in PBMCs. Finally, epistatic interactions between VEGF-related SNPs were shown to affect the levels of ICAM-1, E-selectin, IL-6 and TNF- $\alpha$  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-Environnement 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, Andreaskos E, Moraco 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] Laiñinen 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. *Genet Res* 2011;109(5):554–63.
- [7] Blann AD, Begore 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] Gallikina 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] Yuki 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 DR, Ert AC, Davis SN. Effects of acute hyperglycemia 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, Sorice 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-Nazari 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, Sass C, Drosch S, Zaiou M, Siest G, Porthieux A, et al. IL-6, TNF-alpha and atherosclerosis risk indicators in a healthy family population: the STANSLAS 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 to vascular inflammation and cardiac dysfunction in type 1 diabetes: protective role of argininosuccinic acid. *Biochimie* 2012;94(3):786–97.
- [20] Chen CD, Wu MY, Chen HF, Chen SH, 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] Dayr 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, McCormell 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] Raheuer 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* 1993;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 metalloprotease 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 Moïn 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, Kovach JC, Carty 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.)):II82–8.
- [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, Bazzazhani MR, Day PJ, Olier 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, McCoskey 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, Lescaillie G, Roussetot 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.

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

Mohsen Azimi-Nezhad, PhD<sup>1,2,3\*</sup>, Maria G. Stathopoulou, PhD<sup>1\*</sup>, Helena Murray, PhD<sup>4</sup>, Seyed-Reza Mirhafez<sup>3</sup>, Ndeye Coumba Ndiaye, PhD<sup>1</sup>, Abdelsalam Saleh, MSc<sup>1</sup>, Marc Rancier, MD<sup>1</sup>, Abdollah Bahrami, MD<sup>5</sup>, Abdoreza Varasteh, PhD<sup>6</sup>, Amelie Bonnefond, PhD<sup>1</sup>, Christine Masson, BSc<sup>1</sup>, Bernard Herbeth, PhD<sup>1</sup>, John Lamont, PhD<sup>4</sup>, Peter Fitzgerald, PhD<sup>4</sup>, Majid Chayour-Mobarhan, PhD<sup>3,¶</sup>, Sophie Visvikis-Siest, PhD<sup>1,¶</sup>

<sup>1</sup>UMR INSERM U 1122, IGE-PCV “ Interactions Gène-Environnement en Physiopathologie CardioVasculaire ”, Université de Lorraine , Nancy, F-54000, France, <sup>2</sup> Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran, <sup>3</sup> Department of New Sciences and Technology (Molecular Medicine), Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran, <sup>4</sup> Randox Laboratories, Crumlin, United Kingdom, <sup>5</sup> Department of Internal Medicine, Imam-Reza Hospital, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran, <sup>6</sup> 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](mailto: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 (VEGF<sup>1</sup>) 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 (m<sup>2</sup>). 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 <sup>®</sup>) (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*<sup>-/-</sup>) 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 Ca<sup>2+</sup> 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 Ca<sup>2+</sup> 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 $\alpha$  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) 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.
- (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) Ottshytsch 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> channels in pancreatic  $\beta$ -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<sup>2+</sup> 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  $\beta$ -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 <sup>2</sup>	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
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)

	<b>rs6921438</b>		<b>rs4416670</b>		<b>rs6993770</b>		<b>rs10738760</b>	
	OR	<i>P</i>	OR	<i>P</i>	OR	<i>P</i>	OR	<i>P</i>
	(95% CI)		(95% CI)		(95% CI)		(95% CI) <sup>a</sup>	
<b>Discovery population</b>	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)	<b>0.010</b>
<b>Replication population</b>	0.94 (0.67-1.30)	0.718	1.18 (0.85-1.62)	0.306	1.50 (1.04-2.16)	<b>0.028</b>	0.85 (0.61-1.17)	0.320

<sup>a</sup> OR: Odds ratio, 95% CI: 95% confidence interval

*patient-oriented and epidemiological research*

## A common variant highly associated with plasma VEGFA levels also contributes to the variation of both LDL-C and HDL-C<sup>§</sup>

Maria G. Stathopoulou,<sup>1,\*</sup> Amélie Bonnefond,<sup>1,\*</sup> Ndeye Coumba Ndiaye,<sup>1,\*</sup> Mohsen Azimi-Nezhad,<sup>\*</sup> Said El Shamieh,<sup>\*</sup> Abdelsalam Saleh,<sup>\*</sup> Marc Rancier,<sup>\*</sup> Gerard Siest,<sup>\*</sup> John Lamont,<sup>†</sup> Peter Fitzgerald,<sup>†</sup> and Sophie Visvikis-Siest<sup>2,\*</sup>

Université de Lorraine,<sup>\*</sup> "Génétique Cardio-vasculaire," EA-4373, Nancy, F-54000, France; and Randox Laboratories, Ltd.,<sup>†</sup> 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 ( $P_{\text{overall}} = 1.7 \times 10^{-5}$ ).<sup>§</sup> 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.

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

<sup>2</sup>To whom correspondence should be addressed.

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

<sup>§</sup>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,  $\beta$  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  $\geq 140$  mm/Hg, diastolic blood pressure  $\geq 90$  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  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>.

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  $\chi^2$  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 ( $P = 3.5 \times 10^{-3}$ ,  $1.6 \times 10^{-3}$ , and  $1.7 \times 10^{-5}$ , 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 <sup>a</sup>	SD <sup>b</sup>	Mean <sup>a</sup>	SD <sup>b</sup>	Mean <sup>a</sup>	SD <sup>b</sup>
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 <sup>2</sup> )	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		

<sup>a</sup> Mean value for continuous variables and percentage for categorical variables.

<sup>b</sup> 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 <sup>a</sup>	Variance of plasma VEGFA explained (%) <sup>b</sup>	Function	Location		MAF <sup>c</sup>	
						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	

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

<sup>b</sup> According to Ref. 25.

<sup>c</sup> MAF, minor allele frequency.

TABLE 3. Significant associations of SNPs with blood lipids

SNP	Traits/Study	Mean values level $\pm$ SD <sup>a</sup> by genotype (mmol/l)			$\beta$ [SE] <sup>b</sup> (mmol/l)	P
		XX	XY	YY		
rs6921438	HDL-C <sup>c</sup> / discovery	1.97 $\pm$ 0.47	1.89 $\pm$ 0.49	1.76 $\pm$ 0.54	-0.09 [0.02]	1.2 $\times$ 10 <sup>-4</sup>
	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 <sup>-4</sup>
	X-allele = G	NA <sup>e</sup>	NA	NA	-0.08 [0.01]	1.2 $\times$ 10 <sup>-7</sup>
Y-allele = A	LDL-C <sup>d</sup> / discovery	3.03 $\pm$ 1.08	3.29 $\pm$ 1.09	3.61 $\pm$ 1.093	0.14 [0.05]	6.7 $\times$ 10 <sup>-3</sup>
	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 <sup>-3</sup>
	LDL-C / meta-analysis	NA	NA	NA	0.13 [0.03]	1.5 $\times$ 10 <sup>-4</sup>
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 <sup>-3</sup>
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 <sup>-4</sup>
rs6921438 conditioned for rs6993770	HDL-C / discovery	NA	NA	NA	-0.07 [0.02]	2.7 $\times$ 10 <sup>-4</sup>
	HDL-C / replication	NA	NA	NA	-0.08 [0.01]	1.2 $\times$ 10 <sup>-7</sup>
	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.

<sup>a</sup>SD, standard deviation.

<sup>b</sup> $\beta$ , effect size; SE, standard error.

<sup>c</sup>HDL-C, HDL-cholesterol.

<sup>d</sup>LDL-C, LDL-cholesterol.

<sup>e</sup>NA, 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	$\beta$ [SE] <sup>a</sup>	P
rs4416670 $\times$ hypertension	ApoE <sup>b</sup> / discovery	-0.71 [0.24]	3.5 $\times$ 10 <sup>-3</sup>
	ApoE / replication	-0.75 [0.23]	1.6 $\times$ 10 <sup>-3</sup>
	ApoE / meta-analysis	-0.73 [0.17]	1.7 $\times$ 10 <sup>-5</sup>
rs6921438 $\times$ rs6993770	HDL-C <sup>c</sup> / discovery	0.05 [0.01]	2.4 $\times$ 10 <sup>-3</sup>
	HDL-C / replication	0.02 [0.01]	0.035
	HDL-C / meta-analysis	0.03 [0.01]	2.6 $\times$ 10 <sup>-3</sup>

<sup>a</sup> $\beta$ , effect size; SE, standard error; units for  $\beta$  coefficient are: mg/l for apoE and mmol/l for HDL-cholesterol.

<sup>b</sup>ApoE, apolipoprotein E.

<sup>c</sup>HDL-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. Heesch, 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. Kojima, 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. Arsenaault, 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. Iglseider, 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: genome-wide 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. Genome-wide 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	$\beta$ [SE] <sup>a</sup>	<i>P</i>
rs6921438	TC <sup>b</sup> / 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 <sup>c</sup> / 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

<sup>a</sup> $\beta$ , effect size; **SE**, standard error; units for  $\beta$  coefficient are: mg/l for apolipoprotein E and mmol/l for total cholesterol and triglycerides

<sup>b</sup>**TC**, total cholesterol

<sup>c</sup>**APO-E**, apolipoprotein E

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

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

<sup>a</sup>**TC**, total cholesterol

<sup>b</sup>**HDL-C**, high-density lipoprotein cholesterol

<sup>c</sup>**LDL-C**, low-density lipoprotein cholesterol



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

<b>Independent variable</b>	<b>Dependent variables</b>	<b><math>\beta</math> [SE]<sup>a</sup></b>	<b><i>P</i></b>
VEGFA plasma levels	TC <sup>b</sup> (mmol/l)	0.003 [0.01]	0.824
	Triglycerides (mmol/l)	0.008 [0.03]	0.826
	APO-E <sup>c</sup> (mg/l)	0.007 [0.02]	0.737
	HDL-C <sup>d</sup> (mmol/l)	0.001 [0.02]	0.976
	LDL-C <sup>e</sup> / (mmol/l)	0.003 [0.02]	0.865

<sup>a</sup> $\beta$ , effect size; **SE**, standard error; units for  $\beta$  coefficient are: mg/l for apolipoprotein E and mmol/l for total cholesterol, triglycerides, high-density lipoprotein cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol

<sup>b</sup>**TC**, total cholesterol

<sup>c</sup>**APO-E**, apolipoprotein E

<sup>d</sup>**HDL-C**, high-density lipoprotein cholesterol

<sup>e</sup>**LDL-C**, low-density lipoprotein cholesterol

## **New biomarkers in thyroiditis: VEGF 145, VEGF 189 and VEGF 165 (a and b) mRNAs**

Marc RANCIER<sup>1, 2, ‡</sup>, Ines ZAABER<sup>1, 3, ‡</sup>, Maria G STATHOPOULOU<sup>1</sup>, Abdelsalam SALEH<sup>1</sup>, Héra MARMOUCH<sup>4</sup> Christine MASSON<sup>1</sup>, Helena MURRAY<sup>5</sup>, Mary Jo KURTH<sup>5</sup>, John LAMONT<sup>5</sup>, Peter FITZGERALD<sup>5</sup>, Selvia MAHJOUB<sup>4</sup>, Khaled SAID<sup>3</sup>, Besma BEL HADJ JRAD TENSAOUT<sup>3</sup>, Souhir MESTIRI<sup>3, \*</sup>, Sophie VISVIKIS-SIEST<sup>1, 6\*, \*</sup>

1. UMR INSERM U1122; Interactions Gène-Environnement en Physiopathologie Cardio-Vasculaire (IGE-PCV), Université de Lorraine, Nancy, F-54500, FRANCE.
2. Department of Endocrinology, Centre Hospitalier Robert Schuman, Luxembourg, L-2540, LUXEMBOURG.
3. Laboratory of Genetics, Biodiversity and Bioresource Valorization, Superior Institute of Biotechnology of Monastir, University of Monastir, Monastir 5000, TUNISIA.
4. Department of Internal Medicine-Endocrinology, Hospital Fattouma Bourguiba in Monastir, TUNISIA
5. Randox Laboratories Ltd, Crumlin, United Kingdom BT29 4QY
6. Department of Internal Medicine and Geriatrics, CHU Nancy-Brabois, FRANCE.

‡ Equal first authors.

\* Equal last authors.

**Abbreviated title:** VEGF isoforms in thyroiditis

**Key terms:** VEGF, splicing isoforms, thyroiditis

**Word count:** 3176

**Number of figure and tables:** 3

Corresponding author and person to whom reprint request should be adressed

*Dr. Sophie VISVIKIS-SIEST*

*Director of Research in INSERM*

*Director of UMR INSERM U 1122; IGE-PCV «Interactions Gène-Environnement en Physiopathologie Cardio-Vasculaire»*

*Director of BRC "IGE-PCV"*

*Université de Lorraine - Faculté de Pharmacie*

*30, rue Lionnois - 54000 NANCY*

*Telephone : 00 33 (0)3.83.68.21.84 - Mobile : 00 33 (0)6.07.60.25.69*

*Fax : 00 33 (0)3.83.32.13.22*

*Email : Sophie.Visvikis-Siest@inserm.fr*

**Disclosure Statement** : The authors have nothing to disclose

## **Abstract**

**Context:** The existence of a large number of transcription isoforms from the vascular endothelial growth factor A (*VEGF-A* or *VEGF*) gene could allow the study of VEGF specificity between autoimmune thyroid diseases (AITD).

**Objective:** To assess the relationships between plasma VEGF levels and 5 VEGF mRNA products in patients treated for AITD.

**Design:** Case control study of patients with Graves' disease (GD) and Hashimoto's thyroiditis (HT)). The follow-up period was 6 months.

**Setting:** Department of Endocrinology, University Hospital Fattouma Bourguiba Monastir , Tunisia.

**Patients:** Plasma VEGF was measured in 110 AITD patients after a period of 6 months of patient treatment. Isoforms VEGF121, VEGF165, VEGF145 and VEGF189 (pro-angiogenic) and VEGF165b (anti-angiogenic) in peripheral blood mononuclear cells were quantified in 71 patients and 86 healthy controls.

**Main Outcome Measure:** Associations between VEGF plasma and gene expression levels with disease, and indexes of hormonal and immunological status.

**Results:** Decreased levels of VEGF189 mRNA were observed in AITD patients compared to controls. VEGF165 was increased in GD patients compared to controls and the VEGF165b was increased in HT patients compared to GD. We observed increased levels of VEGF165b in hypothyroid AITD patients after treatment. VEGF145 isoform levels were determined by FT4 in the entire population and by the thyroid status after 6 months of treatment in HT patients only. An association was observed for VEGF165 mRNA levels with anti-TPO antibodies. Finally, FT4 was associated with VEGF plasma levels only in controls.

**Conclusion:** This investigation study highlights the specificity of VEGF mRNA isoforms underlining their diagnostic and pharmacogenomic potential in AITD.

## Introduction

The concept of thyroiditis refers to pathological conditions sharing parenchymatous inflammation. In autopsy studies, thyroiditis is present in 27% of adult women and 7% of men (1). In the general adult population, the prevalence is between 2 and 5% (2). Most common thyroiditis are autoimmune chronic thyroiditis, mainly Hashimoto's thyroiditis (HT) and Graves' disease (GD) (2). The pathophysiology of HT is T cell-mediated, with lymphocytic infiltration and thyroid cell destruction that leads to hypothyroidism (2). The main aspect of GD is hyperthyroidism due to thyroid hormone excessive secretion lead by anti-TSH receptor antibodies, implicating B cell-reaction (3). The immune reaction is Th1-orientated in HT and Th2-orientated in GD (2,4-6). However, this remains controversial (3,7-9).

VEGF (or VEGF-A) is the most potent factor associated with angiogenesis and is considered a key regulatory molecule for both physiological and pathological angiogenesis (10). It is implicated in various inflammatory diseases, especially auto-immune (11-14).

The existence of an exceptionally large number of transcription isoforms from the *VEGF* gene could allow the study of VEGF specificity between autoimmune diseases and with other non-communicable diseases in which VEGF is implied. In other words, differential splicing of VEGF may differentiate the molecule's involvement in diseases (15,16).

The *VEGF* gene gives rise to more than 12 isoforms grouped in two major families due to differential pre-mRNA splicing. The VEGF isoforms family results from splicing in exons 6, 7 and the proximal splice site in exon 8 (exon 8a), while the VEGFb family isoforms differ in the selection of a distal splice site at exon 8 (exon 8b) located 66bp downstream of the proximal splice site. In fact, alternative splicing provides pro-angiogenic and anti-angiogenic products: VEGF<sub>xxx</sub> (pro-angiogenic) and VEGF<sub>xxx</sub>b (anti-angiogenic). The VEGF isoforms promote angiogenesis whereas the VEGFb isoforms are anti-angiogenic (15,16).

The pro-angiogenic subfamily shows different species (isoforms) of VEGF (121, 145, 148, 165, 183, 189, 206), with different physical characteristics. VEGF206 is highly basic and stays in the extracellular spaces, whereas VEGF121 is acidic and diffuses freely. The other variants show intermediate chemical and physical characteristics (3,17-19). The main anti-angiogenic factor is VEGF165b (3,20) followed by VEGF121b and VEGF189b (2,15,19).

It is possible that the imbalance between pro- and anti-angiogenic VEGF isoforms is linked with the differential development of diseases in a way that over-expression of specific isoforms may characterise specific diseases. The understanding of the differential and tissue-specific functions of VEGF related to the different isoforms production in normal and pathological tissues may possibly explain the mechanisms that underlie the implication of VEGF in the development of a large range of diseases. Thus, the determinants of VEGF plasma levels and VEGF mRNA isoforms could provide information on autoimmune disease specificity and sensitivity; this is one of the major hypotheses of this investigation.

In normal conditions in adults, the anti-angiogenic isoforms are expressed in non-angiogenic tissues and represent >50% of total VEGF protein. In contrast, many cancers are characterised by a switch from the anti-angiogenic to pro-angiogenic isoforms which leads to neo-vascularisation and consequently to tumor growth. Also, it has been suggested that the isoform profile of different tumors may affect the responsiveness to anti-VEGF therapies (21).

Plasma VEGF protein and tissue VEGF mRNA have been found to be increased in patients with HT or GD (7,22,23). Increased tissue expression was also found in these patients in comparison with healthy controls (24). *In vitro*, both thyrocytes (25) and thyroid stromal cells (22) are able to secrete mRNA and VEGF protein. In a rat model, a thiouracil-induced goiter was associated with hyper vascularization and an increase in VEGF mRNA levels (7,26). This phenomenon has also been described in GD and HT (7,19,24).

This is the first study to investigate the VEGF protein levels in parallel with the expression of its specific anti- and pro-angiogenic mRNA isoforms in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in patients with AITD after 6 months of treatment. The aim of the study was to elucidate novel pathophysiological mechanisms to be used in AITD personalized medicine.

## **Materials and Methods**

### Patients and controls

This study was conducted on healthy controls and patients with autoimmune thyroid disease (GD and HT). Controls and patients were randomly selected from the same population living in the middle coast of Tunisia.

Patients were recruited in the Department of Endocrinology, University Hospital Fattouma Bourguiba Monastir. Plasma was available for 110 AITD patients (21 patients with GD and 89 HT). VEGF isoforms in PBMCs were quantified in 71 patients (20 patients with GD and 51 patients with HT) and 86 healthy controls. Their characteristics are presented in table 1 and 2. Controls were healthy blood donors with no declared autoimmune disease.

GD and HT were diagnosed by standard criteria set by the American Association of Clinical Endocrinologists and the American Thyroid Association (AACE/ATA) (27,28). At the starting point of the discovery of the disease, GD patients were treated with synthetic antithyroid according to their status with specific dosage depending on clinical parameters. The follow-up period used in this investigation was 6 months after the initial diagnosis and administration of treatment. After 6 months of treatment, all patients were expected to be euthyroids even if, in real life conditions, the response to treatment is not the same for all patients. The hormonal status can be hypothyroid, hyperthyroid or euthyroid (TSH  $\geq$  6.82 mUI/l, TSH  $\leq$  0.28 mUI/l, and TSH between 0.28 and 6.82 mUI/l respectively).

Written informed consent was obtained from all patients and controls. Study protocol was approved by the ethics committee of the hospital-university Fattouma Bourguiba, Monastir, Tunisia.



## Laboratory measurements

### *Levels of TSH, FT4, and FT3 after 6 months treatment*

Plasma TSH, FT4, FT3 quantification was performed by Monobind Inc. using VAST (Versatile Analyse System Technology) FT3, FT4 & TSH ELISA Kit.

The reference range of serum TSH is 0.28-6.82 mIU/L, of FT4 is 0.8-2 ng/dl and of FT3 is 1.4-4.2 pg/ml.

### *Levels of anti-TPO antibody and anti-Tg antibody after 6 months treatment*

Plasma anti-TPO antibody quantification was performed by EURO DIAGNOSTICA® using the DIASTAT® Anti-TPO ELISA kit. Plasma anti-Tg antibody quantification was performed by EURO DIAGNOSTICA® using DIASTAT® Anti-Tg ELISA kit.

For anti-Tg and anti-TPO a reciprocal titer of >1:100 was considered positive.

### *Levels of anti-thyroid stimulating hormone receptor (anti-TSHR) antibody after 6 months treatment*

Plasma anti-TSHR antibody quantification was performed by ALPHA DIAGNOSTIC INTERNATIONAL INC using the Human anti-TSHR antibody ELISA Kit.

### *Plasma levels of VEGF after 6 months treatment*

Plasma VEGF protein quantification (isoforms 165 and 189) was performed by Randox Laboratories Ltd. (Crumlin, UK) using a biochip array analyzer (Evidence ®) (29).

## RNA extraction

PBMCs were prepared by Ficoll density-gradient centrifugation of freshly drawn peripheral venous blood (10 ml) collected into EDTA tubes under fasting conditions, at 1500 rpm for 30 min at room temperature. The ring of high-density PBMCs was isolated and washed twice in 50 ml of Hanks buffer. After cell survival, which was determined with the trypan-blue exclusion test, PBMC populations were evaluated by microscopic observation after May-Grun-wald-Giemsa staining. The PBMCs concentration was normalized to 10<sup>6</sup> cells/ml in

Hanks buffer. After centrifugation for 6 min at 2000 rpm at 4°C, 200 µl of cell lysis buffer was immediately added to the PBMC pellet. PBMCs were stored at -80°C until RNA extraction.

Total RNA was isolated from PBMCs by an automated isolation procedure with the MagNa Pure LC instrument (Roche Diagnostics) and the MagNa Pure LC RNA Isolation Kit I according to the manufacturer's instructions, including DNase treatment. Total RNA concentration was estimated by ultraviolet absorbance at 260 nm (1 absorbance unit at 260 nm = 40 ng/µl RNA) and the RNA purity by measuring the ratio of absorbance at 260 nm and 280 nm ( $1.8 < A_{260}/A_{280} < 2.1$  for pure RNA). Total RNA was run on 1% agarose gel to check size and integrity.

#### qRT-PCR Analysis

RNA from each sample was assessed by reverse transcription-PCR (iScript cDNA Synthesis Kit) cDNA was synthesized at 25°C for 5 min, 42°C for 30 min and 85°C for 5 min. After each reverse transcription, quantification of the transcripts coding for the VEGF121, VEGF165, VEGF145 and VEGF189 pro-angiogenic isoforms, the VEGF165b anti-angiogenic isoform and the beta-2 microglobulin (B2M) control gene was performed using LightCycler instrument (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) with Master Plus SYBR Green I kit. All reactions were carried out in duplicate in a total reaction volume of 20 µl containing 0.5 mM of each specific primer. Negative and internal positive controls were included. All mRNA levels were normalized to the mRNA levels of B2M. The specificity of generate PCR products was further verified by electrophoresis on 10% polyacrylamide gel. RT-PCR optimization and specificity of RT-PCR products were examined using SYBR® Green technology (LC FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I kit, Roche Diagnostic, France), melting curve analysis and agarose gel electrophoresis of the PCR amplicons.

PCR products for B2M and for each VEGF mRNA spliced variant amplification were purified using a PCR purification kit (QiaQuick, Qiagen, France). The product concentrations were measured in a spectrophotometer, the molecule concentrations were calculated, and a standard curve was generated for each transcript using serial dilutions of products ranging from 10 to 10<sup>8</sup> molecules/μl. The copy number of unknown samples was calculated by setting their PCR cycle number (Crossing Point: CP) to the standard curve and normalized to the housekeeping B2M gene. Results are presented as copies of the target gene product per 10<sup>6</sup> copies of B2M.

The supplementary table 1 includes the primers, sequences and size products for the different studied transcripts.

#### Statistical analysis

Levels of plasma VEGF and VEGF isoforms were not normally distributed. Therefore, for the comparisons between groups of initial diagnosis and current thyroid status, non-parametric tests were applied (Kruskal-Wallis and Mann-Whitney). Furthermore linear regression models adjusted for age and gender were applied using the transformed values of plasma VEGF and VEGF mRNA isoforms (transformations to achieve normal distribution). Hypothesis tested included:

1. VEGF plasma as dependent variable affected by: thyroid status after 6 months of treatment (euthyroid, hypothyroid or hyperthyroid), TSH, FT4, FT3, anti-Tg, anti-TPO and anti-TSHR in the whole population (patients and controls) and in each initial patient and control group separately.
2. VEGF mRNA isoforms as dependent variables affected by: thyroid status after 6 months of treatment (euthyroid, hypothyroid or hyperthyroid), TSH, FT4, FT3, anti-Tg, anti-TPO and anti-TSHR in the whole population (patients and controls) and in each initial patient and control group separately.
3. VEGF mRNA isoforms as dependent variables affected by VEGF plasma levels adjusted for current thyroid status and initial diagnosis.

Analyses were performed with the SPSS package (version 20). The level of significance was set at  $p < 0.05$ .

## Results

Plasma VEGF and VEGF mRNA isoforms levels in patients (AITD, GD and HT) and controls are presented in table 1. Plasma VEGF and VEGF mRNA isoforms levels by group of current thyroid status (hypothyroid, euthyroid and hyperthyroid) are presented in table 2.

Plasma VEGF levels after 6 months of treatment were not different in initially diagnosed AITD in comparison with healthy controls or between GD and HT. No significant differences were found for groups of thyroid status after treatment.

Concerning the VEGF mRNA isoforms after 6 months of treatment, the VEGF165 was higher in the group of GD patients compared to controls ( $P=0.040$ ). The VEGF189 was lower in GD compared to controls ( $P=0.000$ ), in HT compared to controls ( $P=0.000$ ) and in all AITD patients compared to controls ( $P=0.000$ ). However, VEGF165b was higher in HT compared to GD ( $P=0.017$ ).

For the comparison of levels based on thyroid status, the VEGF165b was increased more in hypothyroid patients compared to euthyroid subjects ( $P=0.043$ ).

In the regression analysis, we found that among thyroid status after 6 months of treatment, TSH, FT4, FT3, anti-Tg, anti-TPO and anti-TSHR, only FT4 levels were associated with plasma VEGF levels but only in controls ( $\beta = 0.34$ ,  $P = 0.011$ ).

Moreover, among thyroid status after 6 months of treatment, TSH, FT4, FT3, anti-Tg, anti-TPO and anti-TSHR associations with VEGF isoforms expression levels, FT4 was the only significant determinant of VEGF145 levels in the whole population ( $\beta = -0.026$ ,  $P = 0.005$ ), but not in separate groups of patients and controls. Furthermore, the presence of positive anti-TPO antibodies was significantly associated with VEGF165 in the entire population ( $\beta = 0.426$ ,  $P = 0.025$ ). No other significant association was observed. Thyroid status was significantly associated with VEGF145 levels in a model adjusted for VEGF plasma, age, and gender only in the HT group ( $\beta = -2,293$ ,  $P=0.001$ ).

## **Discussion**

Whereas a previous study has shown that hyperthyroid patients have higher plasma VEGF levels in comparison with healthy controls (30,31), another one has supported the opposite (32). Therefore, the implication of VEGF in AITD still needed to be elucidated. In addition, no study has been performed in AITD patients after 6 months of treatment, which could give important information about the thyroid status of patients and on the efficacy of the treatment. Moreover, no up to date information is available concerning eventual associations with VEGF splicing isoforms. The above observations have motivated us to undertake this investigation.

Among our results, we demonstrate for the first time that plasma VEGF levels are associated neither with thyroid status nor with clinical indexes in AITD patients treated for 6 months.

The fact that FT4 is positively associated with VEGF plasma levels in healthy controls could be explained by the direct contribution of FT4 in the regulation of VEGF production, without the interference of inflammatory phenomena. Previous studies have shown that hypothyroidism is associated with no specific variation of VEGF plasma levels in comparison with euthyroidism (30,31). This apparent discrepancy could be explained by a 2 ways approach of VEGF stimulation. The first one could be thyroid hormone-dependent, as described through diiodothyropropionic acid, a thyroid hormone analog, action on non-ischemic heart(33). The second one could be TSH-dependent, as described in TSH stimulation trials in patients without thyroid (34). In a simplified way, TSH high levels could have a compensatory effect of low thyroid hormone levels outside the thyroid. Figure 1 shows a synthetic view of this hypothesis. In our investigation, plasma VEGF levels are not different in AITD in comparison with healthy controls or between GD and HT. This could in fact be in agreement with the compensatory effect described above. Despite all above

hypotheses, it remains difficult to determine precisely whether the variation of VEGF levels is a cause or a consequence of the change in both hormonal and/or inflammatory status in thyroiditis. Another explanation could reside in the VEGF plasma measurement assay design by which not all isoforms, but mainly the VEGF165 which is the most abundant, have been measured.

The absence of association found between VEGF plasma levels after 6 months of treatment and TSH supports the hypothesis that even if TSH is an acceptable screening tool, free T4, given its observed association with VEGF plasma levels in controls, is a more sensitive measurement, and as such a more suitable severity marker in AITD.

The associations between the levels of expression of 5 VEGF splicing products (VEGF121, VEGF165, VEGF145 and VEGF189 pro-angiogenic isoforms and VEGF165b anti-angiogenic) with thyroid status and clinical indexes of these patients also gave interesting results.

One main result resides in the decreased levels of VEGF189 mRNA in treated AITD patients, whatever the disease, in comparison with healthy controls. This observation, even if it could be considered as a paradox since VEGF has a specific chemotactic effect through VEGF189 on neutrophils (12), supports a possible immunopathological implication of VEGF in thyroiditis.

Furthermore, the VEGF165 isoform had a higher expression in GD patients compared to controls, while this was not observed in HT patients. Therefore, VEGF165 shows specificity for GD. Also, the anti-angiogenic isoform VEGF165b was higher in HT patients compared to GD, thus implying a specific role of each pro- and anti-angiogenic isoform VEGF165 in the differentiation between GD and HT in treated AITD patients. It must be emphasized that these results occur in spite of the absence of significant difference in plasma VEGF levels. The difference in VEGF165 mRNA levels between GD patients and healthy controls appears

logical considering the above-mentioned arguments related to hyperthyroidism (30,31). The difference between GD and HT in VEGF165b mRNA levels appears counter-intuitive for the same reason, since VEGF165b exhibits anti-angiogenic properties (15). This fits also with our finding that VEGF165b was increased in hypothyroid subjects compared to euthyroid patients after treatment.

The VEGF165 mRNA level was also positively associated with anti-TPO antibody. This underlines the role of VEGF165 in residual inflammation, since anti-TPO antibodies are found in both GD and HT. The absence of its correlation with anti-Tg antibodies underlines the higher sensitivity of anti-TPO antibodies.

VEGF145 mRNA levels were negatively associated with free T4 levels in the entire population of patients after treatment and controls, which could be considered as an index of 'selective' angiogenesis which seems more pronounced in HT patients. In fact, in a model including both VEGF and thyroid status, the thyroid status was negatively associated with VEGF145 mRNA levels in the HT patients. This could be explained by the difficulty to reach euthyroidism, which could be due to the dose and/ or duration of the treatment but also to ethnographic characteristics of the adherence population.

A previous study within our group showed that VEGF145 mRNA was positively associated with several adhesion molecules (ICAM-1, L-selectin and TNF- $\alpha$  mRNA) (35). Moreover, levothyroxine therapy causes by itself an increase in VEGF values in serum (36). Therefore one could hypothesize that hormone-induced and inflammation-induced angiogenesis do not use the same VEGF subtype pathways.

In their totality, our results give interesting perspectives for pharmacogenomics studies. In fact, VEGF isoform profiling may have potential pharmacogenomics applications. For example, it could be interesting to study VEGF mRNA isoforms profile in responders and non-responders to AITD patients' treatment.



The determinants of VEGF plasma levels and VEGF pro- and anti-angiogenic isoforms in patients with AITD treated for 6 months is an original approach and strengthen of our study. Nevertheless, the non-existence of available material (plasma, RNA) at the time of diagnosis of AITD is a weakness, as it could not permit the study of longitudinal changes in VEGF profile due to treatment.

In conclusion, this study reveals specific features in 6 months treated AITD patients, like the decreased levels of VEGF189 mRNA, the specific roles of VEGF165 in treated GD patients, VEGF165b in treated HT patients and the increased levels of VEGF165b in hypothyroid AITD patients after treatment. It has also been demonstrated that VEGF145 isoform levels are determined by FT4 in all treated patients and by the thyroid status after 6 months of treatment only in HT patients as well as the association of VEGF165 mRNA levels with anti-TPO antibodies in all patients. Finally, FT4 was associated with VEGF plasma levels but only in healthy controls. These results demonstrate the complex implication of VEGF through its specific splicing isoforms in the pathophysiology and prognosis of treated AITD patients. After extension and verification in bigger studies they could have significant clinical usefulness and be used to develop pharmacogenomics solutions for clinicians, especially needed in the field of GD.

#### Acknowledgements

The study was funded by the “Région Lorraine”.

## **Bibliography**

1. Vanderpump MPJ. The epidemiology of thyroid disease. *Br Med Bull.* 2011;99:39–51. doi:10.1093/bmb/ldr030.
2. Mackay IR, Rose NR. *The Autoimmune Diseases.* Academic Press; 2013.
3. Ganesh BB, Bhattacharya P, Gopisetty A, Prabhakar BS. Role of cytokines in the pathogenesis and suppression of thyroid autoimmunity. *J Interferon Cytokine Res.* 2011;31(10):721–731. doi:10.1089/jir.2011.0049.
4. Weetman AP, McGregor AM. Autoimmune thyroid disease: further developments in our understanding. *Endocrine Reviews.* 1994;15(6):788–830. doi:10.1210/edrv-15-6-788.
5. Tunbridge WM, Evered DC, Hall R, Appleton D, Brewis M, Clark F, Evans JG, Young E, Bird T, Smith PA. The spectrum of thyroid disease in a community: the Whickham survey. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1977;7(6):481–493.
6. Phenekos C, Vryonidou A, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Goula M, Papamichail M. Th1 and Th2 serum cytokine profiles characterize patients with Hashimoto’s thyroiditis (Th1) and Graves’ disease (Th2). *Neuroimmunomodulation.* 2004;11(4):209–213. doi:10.1159/000078438.
7. Viglietto G, Romano A, Manzo G, Chiappetta G, Paoletti I, Califano D, Galati MG, Mauriello V, Bruni P, Lago CT, Fusco A, Persico MG. Upregulation of the angiogenic factors PlGF, VEGF and their receptors (Flt-1, Flk-1/KDR) by TSH in cultured thyrocytes and in the thyroid gland of thiouracil-fed rats suggest a TSH-dependent paracrine mechanism for goiter hypervascularization. *Oncogene.* 1997;15(22):2687–2698. doi:10.1038/sj.onc.1201456.

8. Vural P, Degirmencioglu S, Erden S, Gelincik A. The relationship between transforming growth factor-beta1, vascular endothelial growth factor, nitric oxide and Hashimoto's thyroiditis. *Int Immunopharmacol.* 2009;9(2):212–215. doi:10.1016/j.intimp.2008.11.003.
9. Aust G, Krohn K, Morgenthaler NG, Schröder S, Schütz A, Edelmann J, Brylla E. Graves“ disease and Hashimoto”s thyroiditis in monozygotic twins: case study as well as transcriptomic and immunohistological analysis of thyroid tissues. *Eur J Endocrinol.* 2006;154(1):13–20. doi:10.1530/eje.1.02063.
10. Ferrara N. VEGF-A: a critical regulator of blood vessel growth. *Eur Cytokine Netw.* 2009;20(4):158–163. doi:10.1684/ecn.2009.0170.
11. Dvorak HF, Detmar M, Claffey KP, Nagy JA, Van de Water L, Senger DR. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: an important mediator of angiogenesis in malignancy and inflammation. *Int Arch Allergy Immunol.* 1995;107(1-3):233–235.
12. Ancelin M, Chollet-Martin S, Hervé MA, Legrand C, Benna El J, Perrot-Applanat M. Vascular endothelial growth factor VEGF189 induces human neutrophil chemotaxis in extravascular tissue via an autocrine amplification mechanism. *Lab Invest.* 2004;84(4):502–512. doi:10.1038/labinvest.3700053.
13. Carvalho JF, Blank M, Shoenfeld Y. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in autoimmune diseases. *J Clin Immunol.* 2007;27(3):246–256. doi:10.1007/s10875-007-9083-1.
14. Hervé MA, Buteau-Lozano H, Vassy R, Bieche I, Velasco G, Pla M, Perret G, Mourah S, Perrot-Applanat M. Overexpression of vascular endothelial growth factor 189 in

- breast cancer cells leads to delayed tumor uptake with dilated intratumoral vessels. *Am J Pathol.* 2008;172(1):167–178. doi:10.2353/ajpath.2008.070181.
15. Harper SJ, Bates DO. VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? *Nat Rev Cancer.* 2008;8(11):880–887. doi:10.1038/nrc2505.
  16. Catena R, Larzabal L, Larrayoz M, Molina E, Hermida J, Agorreta J, Montes R, Pio R, Montuenga LM, Calvo A. VEGF<sub>121b</sub> and VEGF<sub>165b</sub> are weakly angiogenic isoforms of VEGF-A. *Mol Cancer.* 2010;9:320. doi:10.1186/1476-4598-9-320.
  17. Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem.* 1992;267(36):26031–26037.
  18. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.* 1999;13(1):9–22.
  19. Ramsden JD. Angiogenesis in the thyroid gland. *J Endocrinol.* 2000;166(3):475–480.
  20. Bates DO, Harper SJ. Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factors. *Vascular Pharmacology.* 2002;39(4-5):225–237.
  21. Nowak DG, Amin EM, Rennel ES, Hoareau-Aveilla C, Gammons M, Damodoran G, Hagiwara M, Harper SJ, Woolard J, Lodomery MR, Bates DO. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) splicing from pro-angiogenic to anti-angiogenic isoforms: a novel therapeutic strategy for angiogenesis. *J Biol Chem.* 2010;285(8):5532–5540. doi:10.1074/jbc.M109.074930.
  22. Fukumura D, Xavier R, Sugiura T, Chen Y, Park EC, Lu N, Selig M, Nielsen G, Taksir T, Jain RK, Seed B. Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal

- cells. *Cell*. 1998;94(6):715–725.
23. Iitaka M, Miura S, Yamanaka K, Kawasaki S, Kitahama S, Kawakami Y, Kakinuma S, Oosuga I, Wada S, Katayama S. Increased serum vascular endothelial growth factor levels and intrathyroidal vascular area in patients with Graves“ disease and Hashimoto”s thyroiditis. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1998;83(11):3908–3912.
  24. Klein M, Picard E, Vignaud JM, Marie B, Bresler L, Toussaint B, Weryha G, Duprez A, Leclère J. Vascular endothelial growth factor gene and protein: strong expression in thyroiditis and thyroid carcinoma. *J Endocrinol*. 1999;161(1):41–49.
  25. Viglietto G, Maglione D, Rambaldi M, Cerutti J, Romano A, Trapasso F, Fedele M, Ippolito P, Chiappetta G, Botti G. Upregulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) and downregulation of placenta growth factor (PIGF) associated with malignancy in human thyroid tumors and cell lines. *Oncogene*. 1995;11(8):1569–1579.
  26. Wang JF, Milosveski V, Schramek C, Fong GH, Becks GP, Hill DJ. Presence and possible role of vascular endothelial growth factor in thyroid cell growth and function. *J Endocrinol*. 1998;157(1):5–12.
  27. Garber JR, Cobin RH, Gharib H, Hennessey JV, Klein I, Mechanick JI, Pessah-Pollack R, Singer PA, Woeber KA, American Association Of Clinical Endocrinologists And American Thyroid Association Taskforce On Hypothyroidism In Adults. Clinical practice guidelines for hypothyroidism in adults: cosponsored by the American Association of Clinical Endocrinologists and the American Thyroid Association. *Thyroid*. 2012;22(12):1200–1235. doi:10.1089/thy.2012.0205.
  28. Bahn RS, Burch HB, Cooper DS, Garber JR, Greenlee MC, Klein I, Laurberg P,

- McDougall IR, Montori VM, Rivkees SA, Ross DS, Sosa JA, Stan MN, American Thyroid Association, American Association of Clinical Endocrinologists. Hyperthyroidism and other causes of thyrotoxicosis: management guidelines of the American Thyroid Association and American Association of Clinical Endocrinologists. *Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists*. 2011;17(3):456–520.
29. Debette S, Visvikis-Siest S, Chen M-H, Ndiaye N-C, Song C, Destefano A, Safa R, Azimi Nezhad M, Sawyer D, Marteau J-B, Xanthakis V, Siest G, Sullivan L, Pfister M, Smith H, Choi S-H, Lamont J, Lind L, Yang Q, Fitzgerald P, Ingelsson E, Vasani RS, Seshadri S. 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. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.243790.
30. Figueroa-Vega N, Sanz-Cameno P, Moreno-Otero R, Sánchez-Madrid F, González-Amaro R, Marazuela M. Serum levels of angiogenic molecules in autoimmune thyroid diseases and their correlation with laboratory and clinical features. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(4):1145–1153. doi:10.1210/jc.2008-1571.
31. Nowak M, Marek B, Karpe J, Kos-Kudla B, Sieminska L, Kajdaniuk D, Treszer M. Serum concentration of VEGF and PDGF-AA in patients with active thyroid orbitopathy before and after immunosuppressive therapy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2014;122(10):582–586. doi:10.1055/s-0034-1383579.
32. Zhao X, Wang G, You J. [Measurement and correlation analysis of plasma VEGF level in the patients of hyperthyroidism]. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*. 2013;30(2):365–367.

33. Wang X, Zheng W, Christensen LP, Tomanek RJ. DITPA stimulates bFGF, VEGF, angiopoietin, and Tie-2 and facilitates coronary arteriolar growth. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;284(2):H613–8. doi:10.1152/ajpheart.00449.2002.
34. Klein M, Brunaud L, Muresan M, Barbé F, Marie B, Sapin R, Vignaud J-M, Chatelin J, Angioï-Duprez K, Zarnegar R, Weryha G, Duprez A. Recombinant human thyrotropin stimulates thyroid angiogenesis in vivo. *Thyroid*. 2006;16(6):531–536. doi:10.1089/thy.2006.16.531.
35. Azimi Nezhad M, Stathopoulou MG, Bonnefond A, RANCIER M, Saleh A, Lamont J, Fitzgerald P, Ndiaye N-C, Visvikis-Siest S. Associations of vascular endothelial growth factor (VEGF) with adhesion and inflammation molecules in a healthy population. *Cytokine*. 2013;61(2):602–607. doi:10.1016/j.cyto.2012.10.024.
36. Schmid C, Brändle M, Zwimpfer C, Zapf J, Wiesli P. Effect of thyroxine replacement on creatinine, insulin-like growth factor 1, acid-labile subunit, and vascular endothelial growth factor. *Clin Chem*. 2004;50(1):228–231. doi:10.1373/clinchem.2003.021022.

Tables

Table 1. Plasma VEGF and VEGF mRNA isoforms levels in patients and controls

	Healthy subjects	AITD	HT	GD
	mean±SD	mean±SD	mean±SD	mean±SD
n	55	110	89	21
Gender (% male)	6.70	10.00	6.80	19.80
Age (years)	46.36±11.03	46.05±11.22	46.45±10.91	44.84±12.10
TSH actual (mIU/l)	2.03±1.44	1.22±2.04	3.036±3.194	0.5±0.51
FT4 actual (ng/dl)	24.48±6.46	25.18±9.06	23.658±7.288	31.60±12.60
FT3 actual (pg/ml)	5.02±2.27	4.64±3.22	3.995±2.31	7.28±4.81
Anti-TPO (% positive)	11.1	60.40	60.00	61.90
Anti-Tg (% positive)	14.80	11.70	10.00	19.00
Anti-TSHR (% positive)	0	50.00	0	50.00
VEGF protein (pg/ml)	87.98±5.50	115.82±142.27	117.671±135.501	108.00±171.63
VEGF121 mRNA	4798.39±3690.55	4830.38±3679.63	4666.419±3636.893	5264.90±4168.32



VEGF145 mRNA	2.87±3.38	3.15±4.37	2.851±4.239	3.96±4.72
VEGF165 mRNA	26.23±25.65	44.09±62.19	40.131±62.777	54.10±61.03
VEGF189 mRNA	187.45±165.49	36.44±26.21	38.381±26.847	31.65±26.05
VEGF165b mRNA	483.36±608.95	249.06±220.97	273.032±212.926	186.745±234.747

---

AITD = autoimmune thyroid disease, GD = Graves' disease, HT = Hashimoto's thyroiditis, FT4: Free Tetraiodothyroxine, FT3: Free triiodothyroxine, TSH: Thyroid stimulating hormone, Anti Tg: anti-thyroglobulin, Anti TPO: anti-thyroid peroxydase, Anti TSHR: anti-thyrotropin receptor, SD=standard deviation.

Table 2. Plasma VEGF and VEGF mRNA isoforms levels by group of current thyroid status

	Hypothyroid	Euthyroid	Hyperthyroid
	mean±SD	mean±SD	mean±SD
n	29	88	5
Gender (% male)	3.40	6.60	20.00
Age (years)	44.30±9.84	47.07±	11.47
TSH (mIU/l)	8.69±1.19	1.14±0.97	NA
FT4 (ng/dl)	19.41±6.88	25.94±7.15	31.78±7.84
FT3 (pg/ml)	3.96±2.63	4.46±2.74	2.94±1.45
Anti-TPO (% positive)	69.00	52.70	20.00
Anti-Tg (% positive)	20.70	4.40	20.00
Anti-TSHR (% positive)	0	33.30	100
VEGF plasma (pg/ml)	124.22±142.12	111.29±137.68	184.52±179.41
VEGF121 mRNA	30745.07±1124.41	2676.56±1519.44	NA
VEGF145 mRNA	3.93±2.86	0.81±0.51	NA
VEGF165 mRNA	26.08±25.73	10.52±9.44	NA
VEGF189 mRNA	107.89±127.31	44.73±42.27	NA

---

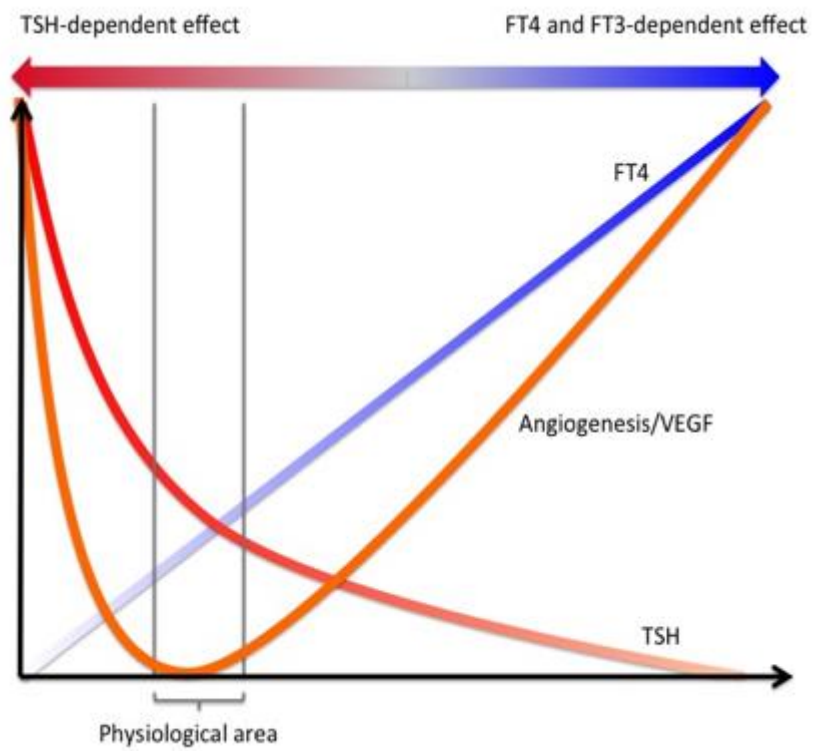
VEGF165b mRNA	630.51±292.22	194.60±136.63	NA
---------------	---------------	---------------	----

---

FT4: Free Tetraiodothyroxine, FT3: Free triiodothyroxine, TSH: Thyroid stimulating hormone, Anti Tg: anti-thyroglobulin, Anti TPO: anti-thyroid peroxydase, Anti TSHR: anti-thyrotropin receptor, SD: standard deviation, NA: non available

## Figures

Figure 1. Synthetic view of thyroid hormone-dependent and TSH-dependent hypotheses of VEGF stimulation



**Plasma VEGF - related polymorphisms are implied in autoimmune thyroid diseases**

Ines ZAABER<sup>1,2,‡</sup>, Marc RANCIER<sup>1,3,‡</sup>, Maria G STATHOPOULOU<sup>1</sup>, Abdelsalam SALEH<sup>1</sup>, H la MARMOUCH<sup>4</sup>, Christine MASSON<sup>1</sup>, Helena MURRAY<sup>5</sup>, Mary Jo KURTH<sup>5</sup>, John LAMONT<sup>5</sup>, Peter FITZGERALD<sup>5</sup>, Selvia MAHJOUB<sup>4</sup>, Khaled SAID<sup>2</sup>, Besma BEL HADJ JRAD TENSAOUT<sup>2</sup>, Souhir MESTIRI<sup>2,\*</sup>, Sophie VISVIKIS-SIEST<sup>1,6\*</sup>

1. UMR INSERM U1122; Interactions Gène-Environnement en Physiopathologie Cardio-Vasculaire (IGE-PCV), Université de Lorraine, Nancy, F-54500, FRANCE.
2. Laboratory of Genetics, Biodiversity and Bioresource Valorization, Superior Institute of Biotechnology of Monastir, University of Monastir , Monastir 5000, TUNISIA.
3. Department of Endocrinology, Centre Hospitalier Robert Schuman, Luxembourg, L-2540, LUXEMBOURG.
4. Department of Internal Medicine-Endocrinology, Hospital Fattouma Bourguiba in Monastir, TUNISIA
5. Randox Laboratories Ltd, Crumlin, United Kingdom BT29 4QY
6. Department of Internal Medicine and Geriatrics, CHU Nancy-Brabois, FRANCE.

‡ Equal first authors.

\* Equal last authors.

**Abbreviated title:** VEGF polymorphisms in thyroiditis

**Key terms:** polymorphisms, VEGF, thyroiditis

**Word count:** 2594

**Number of figure and tables:** 6

Corresponding author and person to whom reprint request should be adressed

*Dr. Sophie VISVIKIS-SIEST*

*Director of Research in INSERM*

*Director of UMR INSERM U 1122; IGE-PCV «Interactions Gène-Environnement en  
Physiopathologie Cardio-Vasculaire»*

*Director of BRC "IGE-PCV"*

*Université de Lorraine - Faculté de Pharmacie*

*30, rue Lionnois - 54000 NANCY*

*Telephone : 00 33 (0)3.83.68.21.84 - Mobile : 00 33 (0)6.07.60.25.69*

*Fax : 00 33 (0)3.83.32.13.22*

*Email : Sophie.Visvikis-Siest@inserm.fr*

**Disclosure Statement** : The authors have nothing to disclose

## **Abstract**

Autoimmune thyroid diseases (AITD) including Graves' disease (GD) and Hashimoto's thyroiditis (HT) are complex multifactorial diseases. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is implicated in various inflammatory diseases, especially autoimmune diseases.

Our aim was to elucidate the relationships between plasma VEGF levels and four GWAS - identified SNPs related to VEGF with AITD in Tunisian patients.

A total of 364 healthy controls and 389 patients with AITD were genotyped for the SNPs rs6921438, rs4416670, rs6993770, and rs10738760. Levels of thyroid hormones and antibodies were quantified simultaneously with plasma VEGF after a period of 6 months of treatment.

We found that the minor alleles of rs10738760 and rs6921438 are associated with the presence of GD. A allele of rs10738760 polymorphism is associated with increased plasma levels of free tri-iodothyronin (FT3) while no relationship was found with circulating VEGF plasma levels after 6 months of treatment. We also showed that the T allele of rs4416670 polymorphism was associated with increased risk of hyperthyroidism in patients treated for 6 months, independently of their initial diagnosis. There was no significant association between the SNPs and the risk for HT compared to controls.

This study shows that AITD are influenced by 3 SNPs linked to VEGF circulating levels. Whereas rs10738760 appeared specific to GD and FT3 production after 6 months of treatment, rs6921438 and rs4416670 were implicated in the risk for GD. This study opens new ways to test pharmacogenomics concepts in the future especially in GD in which recurrence prognosis is still challenging

## Introduction

Thyroid autoimmune diseases (AITD) comprise essentially two major diseases in clinical practice: Hashimoto's thyroiditis (HT) and Graves' disease (GD).

Genetic, endogenous and / or environmental factors can elicit the immune response leading to infiltration of the thyroid by lymphocytes and production of autoantibodies directed against constituents of the thyroid (1).

In GD, thyroid presents as hyperplasia, inflammation and neovascularization. TRAK autoantibodies bind to TSH-receptor and stimulate the hormone secretion, resulting in hyperthyroidism. This also leads to goiter genesis.

Hashimoto's thyroiditis is associated with a lymphocyte infiltration leading to necrosis and apoptosis increased probability of hypothyroidism. However, both HT and GD exhibit destructive consequences on thyroid parenchyma (2).

AITDs are complex autoimmune diseases involving multiple genes, including both immune regulatory genes and thyroid-specific genes such as thyroid stimulating hormone receptor (*TSHR*), thyroglobulin, human leukocyte antigen (*HLA*), cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (*CTLA4*), protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22, (*PTPN22*), *CD40*, Fc receptor-like protein 3 (*FCRL3*), interleukin-2 receptor alpha (*IL2RA*) and forkhead box P3 (*FOXP3*) (3).

AITD can be accompanied by goiter. Angiogenesis plays an important role in the development of goiter in the proliferation of endothelial cells occurring before the increased proliferation of the thyroid follicular cells (4). Angiogenesis is regulated by proteins, such as proinflammatory cytokines and growth factors, which promote and regulate endothelial cell proliferation and stabilization of neovascularization. Whereas HT exhibits a Th1 profile (including elevated interleukin 1 beta ( $IL-1\beta$ ), interleukin 2 ( $IL-2$ ), interleukin 12 ( $IL-12$ ), interferon gamma ( $IFN\gamma$ ), tumor necrosis factor alpha  $TNF\alpha$  and CD40 ligand ( $CD40L$ )), GD



follows a Th2 profile (interleukin 4 (IL-4), interleukin 5 (IL-5), interleukin 6 (IL-6), interleukin 10 (IL-10), interleukin 13 (IL-13) and CD40 ligand (CD40L)) (5-9).

Vascular endothelial growth factor (VEGF or VEGF-A) is the most potent angiogenic factor and is implicated in various inflammatory diseases, especially autoimmune diseases (10,11). An increase in serum VEGF and intrathyroid neovascularization has also been observed in patients with GD and HT (12). Among angiogenic proteins, VEGF has been studied extensively (13,14). Several *in vivo* and *in vitro* studies have demonstrated the expression of VEGF in normal and diseased tissue of the thyroid (7,8,15,16).

A number of single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been described in *VEGF* gene, including A-2578C and T-460C in the promoter region, and G+405C in the 5'-untranslated region, reported to be related with protein production (17-19). Relationships between these polymorphisms and some autoimmune diseases such as psoriasis (20), and type 1 diabetes mellitus (21) have been demonstrated. Only one study has examined the association between these polymorphisms and GD showing that some of them may be risk factors for AITD (22).

Recently, in a genome-wide association study (GWAS), we identified four SNPs mapping to 3 chromosomal regions explaining up to ~50% of the inter-individual variability of circulating VEGF levels: rs6921438 and rs4416670 (6p21.1), rs6993770 (8q23.1), and rs10738760 (9p24.2) (23).

To our knowledge, no study has been published regarding the relationship of these polymorphisms and AITD. Similarly, whether these polymorphisms could have an effect on the response to standard treatment of patients with AITD and the status of thyroid hormones after treatment, especially in GD remains unknown. Indeed, GD still lacks accurate prognosis factors for recurrence after non-surgical therapies.

Therefore, our aim was to investigate the role of VEGF in the development of AITD. First, we investigated the relationship between the 4 VEGF-related SNPs with the presence of

AITD together with the thyroid status after 6 months of treatment in a Tunisian population. Furthermore, we aimed to assess the possible associations of VEGF circulatory levels with thyroid status after treatment.

## **Materials and methods**

### **Patients and controls**

This study was conducted on 364 healthy controls and 389 patients with AITD (297 with HT and 92 with GD). Controls and patients were randomly selected from the same population living in the middle coast of Tunisia.

Clinical data were obtained from medical records of patients recruited in the Department of Endocrinology, University Hospital Fattouma Bourguiba Monastir. Patients with HT (279 women and 18 men) and with GD (74 women and 18 men) had an average age of  $46 \pm 11$  years. Controls (23 men and 341 women) having a mean age of  $46 \pm 12$  years were healthy blood donors with no declared autoimmune disease. In both patients and controls there were some family structures that were recorded and taken into account for appropriate statistical analyses.

GD and HT were diagnosed by standard criteria set by the American Association of Clinical Endocrinologists and the American Thyroid Association (AACE/ATA) (24,25).

The patients were followed for more than 6 months after their initial diagnosis and beginning of treatment. After the starting point of the discovery of the disease, GD patients were treated with synthetic antithyroid according to their status with doses specific to the severity of their disease. During the second period after 6 months of treatment, all patients were expected to be euthyroid. However, in real life conditions, the response to treatment is not the same for all patients, thus the hormonal status can be hypothyroid, hyperthyroid or euthyroid ( $TSH \geq 6.82$  mUI/l,  $TSH \leq 0.28$  mUI/l, and TSH between 0.28 and 6.82 mUI/l respectively).

Written informed consent was obtained from all patients and controls. The study protocol was approved by the ethics committee of the hospital-university Fattouma Bourguiba, Monastir, Tunisia.

## **Genotyping of VEGF gene polymorphisms**

Genomic DNA was obtained from peripheral blood leukocytes by the salting out technique (26). Genotyping was performed by Randox Laboratories Ltd (Crumlin, UK) (Evidence Investigator ®) using an assay based on a combination of multiplex PCR and biochip array hybridisation.

## **Laboratory measurements**

### *Levels of TSH, FT4, and FT3 after 6 months treatment*

Plasma TSH, FT4, and FT3 quantification was performed by Monobind Inc. using VAST (Versatile Analyse System Technology) FT3, FT4 & TSH ELISA Kit.

The reference range of plasma TSH is 0.28-6.82 mIU/L, of FT4 is 0.8-2 ng/dl and of FT3 is 1.4-4.2 pg/ml.

### *Levels of anti-TPO antibody and anti-Tg antibody after 6 months treatment*

Plasma anti-TPO antibody quantification was performed by EURO DIAGNOSTICA® using the DIASTAT® Anti-TPO ELISA kit. Plasma anti-Tg antibody quantification was performed by EURO DIAGNOSTICA® using DIASTAT® Anti-Tg ELISA kit.

For anti-Tg and anti-TPO a reciprocal titer of >1:100 was considered positive.

### *Levels of anti-thyroid stimulating hormone receptor (anti-TSHR) antibody after 6 months treatment*

Plasma anti-TSHR antibody quantification was performed by ALPHA DIAGNOSTIC INTERNATIONAL INC using the Human anti-TSHR antibody ELISA Kit.

### *Plasma levels of VEGF after 6 months treatment*

Plasma VEGF protein quantification was performed by Randox Laboratories, Ltd. (Crumlin, UK) using a biochip array analyser (Evidence ®) (27).

## **Statistical analysis**

The after treatment values of VEGF were not normally distributed and they were log-transformed. All analyses were performed using the GWAF package developed in R that allows the adjustment of the analyses in the familial structure (28). The associations between the genotyped SNPs and the AITD, the after treatment hormonal status and the presence of thyroid antibodies were tested using a Generalized Estimation Equation adjusted for age and gender to account for within pedigree correlation. The associations of the SNPs with the continuous traits (VEGF, TSH, FT4, FT3) were tested through Linear Mixed Effects models also adjusted for age, gender and familial structure. The level of significance was set at  $P < 0.05$ .

## Results

Genotype and allele frequencies distributions of rs10738760, rs6921438, rs4416670 and rs6993770 polymorphisms are presented in tables 1- 4.

The A allele of polymorphism rs10738760 was significantly associated with an increased risk of GD compared to HT ( $\beta = 0.54$ ,  $P = 0.003$ ) and controls ( $\beta = 0.46$ ,  $P = 0.006$ ).

A significant association between rs6921438 and risk of GD compared to controls was also observed. The allele A of the SNP was associated with increased GD risk ( $\beta = 0.324$ ,  $P = 0.05$ ). There was no significant association between the SNPs and the risk for HT compared to controls.

By studying the association between the SNPs and the current hormonal status of i.e. between patients currently hypothyroidism, hyperthyroidism or patients currently in normal thyroid condition, we showed that the T allele of rs4416670 polymorphism was associated with an increased risk of hyperthyroidism in 6 months treated patients ( $\beta = 1.82$ ,  $P = 0.049$ ), independently of their initial diagnosis.

Levels (after treatment) of TSH, FT4, and FT3 among the rs10738760, rs4416670, rs6921438 and rs6993770 genotypes are shown in table 5 and the distribution of anti-TPO, anti-Tg and anti-TSHR antibodies are presented in table 6.

By studying the association between polymorphisms and measured clinical parameters after 6 months of treatment, we observed a significant positive association between the A allele of rs10738760 polymorphism and plasma levels of FT3 ( $\beta = 0.716$ ,  $P = 0.024$ ).

Our analyses gave no significant results concerning the associations between plasma VEGF after treatment and initial diagnosis and between different thyroid status after treatment.

## **Discussion**

The change from traditional medicine to molecular personalised medicine can only be performed by integrating large-scale personalised molecular data in risk stratification tools. The development of “-omics” technologies is already facilitating this change by increasing our knowledge on the biological and molecular processes implicated in diseases, and the translation of this knowledge into clinical practice. However, a major obstacle in the integration of molecular information in current risk prediction and prevention is that the identified “-omics” markers explain a much lower percentages of the disease/trait variability than that initially expected.

This investigation is based on strong epidemiological evidence that demonstrates VEGF’s high heritable genetic component (29,30). In fact, we have previously shown that the additive genetic heritability of VEGF plasma levels in families was 60.5% of the total variance of the trait (29). The extremely high heritable component of VEGF, which is a unique finding among biomarkers of chronic diseases, ensures that the study of VEGF “-omics” determinants can lead to predictive biomarkers.

This hypothesis led us to a GWAS identification of VEGF-related variants (4 single nucleotide polymorphisms, SNPs, in 3 chromosomes) that explain up to 50% of VEGF circulating levels variability (23). These findings represent an additional exception in the field of complex traits, where typically the identified genetic markers explain less than 20% of the trait’s heritability, consequently overcoming the above mentioned major obstacle of the majority of GWAS for integration of molecular information in current risk prediction.

In this study, we demonstrate for the first time that the above-mentioned polymorphisms associated with VEGF levels are also associated with an increased risk of GD (versus HT and versus controls) and with a risk of hyperthyroidism even after treatment. Moreover, we have shown that one of these SNPs is also associated with increased levels of FT3 after treatment.

Finally, no association with VEGF levels was observed between GD and HT patients, neither between each group of AITD patients and controls nor between all AITD patients and controls. Given this last result, a higher diagnostic value to the genetic component of VEGF could be attributed.

Previous studies exploring associations between polymorphisms of VEGF and circulating levels of VEGF have yielded conflicting results on clinical conditions. Several studies have shown a positive association with some polymorphisms such as rs699947, rs1570360, rs833061, rs2010963, rs3025039 (31-34) while other studies have found no association for different diseases (19,35). Few data in the literature describe the relationship between GD or HT and polymorphisms of *VEGF* gene. Only Vural et al (22) have investigated the relationship between GD and A-2578C, T-460C and G+405C single nucleotide polymorphisms (SNPs) of VEGF in GD. This study revealed that VEGF +405 polymorphism might be a risk factor for GD, while the -2578 SNP is related with increased autoantibody production.

The conflicting results of the previous genetic studies could be due to the low pertinence of the studied polymorphisms in terms of their implication in the VEGF circulating levels inter-individual variability. No SNP among the previously reported has been found associated with VEGF levels in our GWAS (23).

The 4 GWAS-identified SNPs are located close to the *VEGF* and *MRPL14* genes (chromosome 6p21.1), within the *ZFPM2* gene (chromosome 8q23.1), and between the *VLDLR* and *KCNV2* genes (chromosome 9p24.2). To date a link between these loci and AITD pathophysiology has not been established.

The A allele of polymorphism rs10738760 was more frequent in the GD group and was associated with an increased risk compared to HT and control groups. The A allele of rs6921438 polymorphism, was significantly associated with a high risk of GD compared to



controls. These results underline the specificity of VEGF-linked polymorphisms in GD, inside the AITD family. Even if GD requires constant VEGF-dependent neovascularization, this cannot be the only explanation for these results. Hyperthyroidism is in itself associated with increased VEGF production (36). Therefore, it is difficult to determine if VEGF plays its major role through inflammation and goiter genesis or as a consequence of thyroid hormone-induced vascularization.

While rs10738760 is associated with FT3 levels, the SNP rs4416670 is associated with hyperthyroidism after 6 months of treatment. This could lead to the separation of patients with common hyperthyroidism and patients with gravity signs. Since higher FT3 levels are considered as a sign of severity and since the highest levels of FT3 are often found in GD, rs10738760 could be implicated in the genesis of hyperthyroidism through inflammation. Considering the apparent lack of specificity of rs4416670, it could be hypothesized that the latter polymorphism acts in the downstream effects of inflammatory lesions.

VEGF regulates many inflammatory and autoimmune mechanisms by promoting the migration and proliferation of endothelial cells. It stimulates also leukocyte adhesion to the endothelium, and initiates monocyte/macrophage chemotaxis as well as angiogenesis (37,38). In patients with autoimmune thyroid disease such as GD and HT circulating levels of VEGF were increased and neovascularisation intrathyroid observed (12). A recent study in a Chinese population found decreased plasma levels of VEGF in hyperthyroid patients in comparison with healthy controls (39). Another study found the opposite results, in association with other angiogenic factor such as Ang-1, Ang-2 and STie-2 (40). In the current study, levels of VEGF at diagnosis were not available, however, its levels after 6 months of treatment were not associated with AITD.

In Graves' disease, the outcome treatment could be analysed according to the presence of rs10738760, rs6921438 or rs4416670. This is particularly important when one considers the

problem of recurrence rate after 12 to 18 months of thionamide treatment in patients with mild disease, which is between 25 and 50% (41). Therefore, the strength of this work is the originality of the approach, applying valid molecular personalized information, from GWAS-polymorphisms identified, in clinical research. The existence of follow-up points during treatment is also interesting and could propose new perspectives in the field of pharmacogenomics. However, the lack of VEGF measurements because of non-available biological material at the time of the initial diagnosis does not allow further investigations.

In conclusion, molecular personalized medicine through integration of personalized molecular data in risk stratification could increase our knowledge on the biological and molecular processes implicated in AITD, and the translation of this knowledge into clinical practice.

In patients with autoimmune thyroid disease belonging to the Tunisian population, we showed the involvement of the minor alleles of rs10738760, rs4416670 and rs6921438, identified by a previous GWAS, to be independently associated with circulating levels of VEGF, in the risk of Graves' disease and thyroid hormone levels after treatment. This supports the evidence that VEGF is directly involved in autoimmune thyroid diseases and warrants further investigations. From this observation, the way forward for pharmacogenomics studies is wide open in the field of thyroiditis (especially in GD), which lacks a reliable prognostic marker and as a result presents a challenge to the physician in everyday practice.

### **Acknowledgements**

The study was funded by the "Région Lorraine".

## References

1. Weetman AP. Cellular immune responses in autoimmune thyroid disease. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2004;61(4):405–413. doi:10.1111/j.1365-2265.2004.02085.x.
2. Mikoś H, Mikoś M, Obara-Moszyńska M, Niedziela M. The role of the immune system and cytokines involved in the pathogenesis of autoimmune thyroid disease (AITD). *Endokrynol Pol*. 2014;65(2):150–155. doi:10.5603/EP.2014.0021.
3. Smith TJ, Hegedüs L, Douglas RS. Role of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) pathway in the pathogenesis of Graves' orbitopathy. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2012;26(3): 1–302. doi:10.1016/j.beem.2011.10.002.
4. Wollman SH, Herveg JP, Zeligs JD, Ericson LE. Blood capillary enlargement during the development of thyroid hyperplasia in the rat. *Endocrinology*. 1978;103(6):2306–2314. doi:10.1210/endo-103-6-2306.
5. Sato K, Yamazaki K, Shizume K, Kanaji Y, Obara T, Ohsumi K, Demura H, Yamaguchi S, Shibuya M. Stimulation by thyroid-stimulating hormone and Grave's immunoglobulin G of vascular endothelial growth factor mRNA expression in human thyroid follicles in vitro and flt mRNA expression in the rat thyroid in vivo. *J Clin Invest*. 1995;96(3):1295–1302. doi:10.1172/JCI118164.
6. Viglietto G, Romano A, Manzo G, Chiappetta G, Paoletti I, Califano D, Galati MG, Mauriello V, Bruni P, Lago CT, Fusco A, Persico MG. Upregulation of the angiogenic factors PlGF, VEGF and their receptors (Flt-1, Flk-1/KDR) by TSH in cultured thyrocytes and in the thyroid gland of thiouracil-fed rats suggest a TSH-dependent paracrine mechanism for goiter hypervascularization. *Oncogene*. 1997;15(22):2687–

2698. doi:10.1038/sj.onc.1201456.
7. Ramsden JD. Angiogenesis in the thyroid gland. *J Endocrinol.* 2000;166(3):475–480.
  8. Nagura S, Katoh R, Miyagi E, Shibuya M, Kawaoi A. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor-1 (Flt-1) in Graves disease possibly correlated with increased vascular density. *Hum Pathol.* 2001;32(1):10–17. doi:10.1053/hupa.2001.21139.
  9. Mikoś H, Mikoś M, Rabska-Pietrzak B, Niedziela M. The clinical role of serum concentrations of selected cytokines: IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6 in diagnosis of autoimmune thyroid disease (AITD) in children. *Autoimmunity.* 2014. doi:10.3109/08916934.2014.914175.
  10. Dvorak HF, Detmar M, Claffey KP, Nagy JA, Van de Water L, Senger DR. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: an important mediator of angiogenesis in malignancy and inflammation. *Int Arch Allergy Immunol.* 1995;107(1-3):233–235.
  11. Carvalho JF, Blank M, Shoenfeld Y. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in autoimmune diseases. *J Clin Immunol.* 2007;27(3):246–256. doi:10.1007/s10875-007-9083-1.
  12. Iitaka M, Miura S, Yamanaka K, Kawasaki S, Kitahama S, Kawakami Y, Kakinuma S, Oosuga I, Wada S, Katayama S. Increased serum vascular endothelial growth factor levels and intrathyroidal vascular area in patients with Graves“ disease and Hashimoto”s thyroiditis. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 1998;83(11):3908–3912.

13. Jones PF. Not just angiogenesis--wider roles for the angiopoietins. *J Pathol.* 2003;201(4):515–527. doi:10.1002/path.1452.
14. Chen J-X, Chen Y, DeBusk L, Lin W, Lin PC. Dual functional roles of Tie-2/angiopoietin in TNF-alpha-mediated angiogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;287(1):H187–95. doi:10.1152/ajpheart.01058.2003.
15. Katoh R, Miyagi E, Kawaoi A, Hemmi A, Komiyama A, Oyama T, Shibuya M. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human thyroid neoplasms. *Hum Pathol.* 1999;30(8):891–897.
16. Fenton C, Patel A, Dinauer C, Robie DK, Tuttle RM, Francis GL. The expression of vascular endothelial growth factor and the type 1 vascular endothelial growth factor receptor correlate with the size of papillary thyroid carcinoma in children and young adults. *Thyroid.* 2000;10(4):349–357.
17. 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. *Mol Biol Cell.* 1992;3(2):211–220.
18. Stevens A, Soden J, Brenchley PE, Ralph S, Ray DW. Haplotype analysis of the polymorphic human vascular endothelial growth factor gene promoter. *Cancer Res.* 2003;63(4):812–816.
19. Petrovic MG, Korosec P, Kosnik M, Osredkar J, Hawlina M, Peterlin B, Petrovic D. Local and genetic determinants of vascular endothelial growth factor expression in advanced proliferative diabetic retinopathy. *Mol Vis.* 2008;14:1382–1387.
20. Barile S, Medda E, Nisticò L, Bordignon V, Cordiali-Fei P, Carducci M, Rainaldi A,

- Marinelli R, Bonifati C. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms increase the risk to develop psoriasis. *Exp Dermatol.* 2006;15(5):368–376.  
doi:10.1111/j.0906-6705.2006.00416.x.
21. Del Bo R, Scarlato M, Ghezzi S, Maestroni A, Sjölin L, Forsblom C, Wessman M, Groop P-H, Comi GP, Bresolin N, Luzi L, Zerbini G. VEGF gene variability and type 1 diabetes: evidence for a protective role. *Immunogenetics.* 2006;58(2-3):107–112.  
doi:10.1007/s00251-006-0089-2.
22. Vural P, Baki M, Dođru-Abbasođlu S, Ozderya A, Karadađ B, Uysal M. Vascular endothelial growth factor polymorphisms increase the risk of developing Graves' disease. *Int Immunopharmacol.* 2012;14(2):133–137.  
doi:10.1016/j.intimp.2012.06.018.
23. Debette S\*, Visvikis-Siest S\*, Chen M-H, Ndiaye N-C, Song C, Destefano A, Safa R, Azimi Nezhad M, Sawyer D, Marteau J-B, Xanthakis V, Siest G, Sullivan L, Pfister M, Smith H, Choi S-H, Lamont J, Lind L, Yang Q, Fitzgerald P, Ingelsson E, Vasan RS, Seshadri S. 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. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.243790.\*equal first authors
24. Garber JR, Cobin RH, Gharib H, Hennessey JV, Klein I, Mechanick JI, Pessah-Pollack R, Singer PA, Woeber KA, American Association Of Clinical Endocrinologists And American Thyroid Association Taskforce On Hypothyroidism In Adults. Clinical practice guidelines for hypothyroidism in adults: cosponsored by the American Association of Clinical Endocrinologists and the American Thyroid Association. *Thyroid.* 2012;22(12):1200–1235. doi:10.1089/thy.2012.0205.

25. Bahn RS, Burch HB, Cooper DS, Garber JR, Greenlee MC, Klein I, Laurberg P, McDougall IR, Montori VM, Rivkees SA, Ross DS, Sosa JA, Stan MN, American Thyroid Association, American Association of Clinical Endocrinologists. Hyperthyroidism and other causes of thyrotoxicosis: management guidelines of the American Thyroid Association and American Association of Clinical Endocrinologists. *Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists*. 2011;17(3):456–520.
26. Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens*. 1992;39(5):225–235.
27. 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.
28. Chen M-H, Yang Q. GWAF: an R package for genome-wide association analyses with family data. *Bioinformatics*. 2010;26(4):580–581. doi:10.1093/bioinformatics/btp710.
29. 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. doi:10.1111/j.1469-1809.2006.00298.x.
30. Lieb W, Safa R, Benjamin EJ, Xanthakis V, Yin X, Sullivan LM, Larson MG, Smith HM, Vita JA, Mitchell GF, Sawyer DB, Vasan RS. 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):1121–1127. doi:10.1093/eurheartj/ehp007.
31. Renner W, Kotschan S, Hoffmann C, Obermayer-Pietsch B, Pilger E. A common 936 C/T mutation in the gene for vascular endothelial growth factor is associated with vascular endothelial growth factor plasma levels. *J Vasc Res*. 2000;37(6):443–448.
  32. Zhai R, Gong MN, Zhou W, Thompson TB, Kraft P, Su L, Christiani DC. Genotypes and haplotypes of the VEGF gene are associated with higher mortality and lower VEGF plasma levels in patients with ARDS. *Thorax*. 2007;62(8):718–722. doi:10.1136/thx.2006.069393.
  33. Kamoun M, Houman MH, Hamzaoui A, Hamzaoui K. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and serum levels in Behçet's disease. *Tissue Antigens*. 2008;72(6):581–587. doi:10.1111/j.1399-0039.2008.01145.x.
  34. Steffensen KD, Waldstrøm M, Brandslund I, Jakobsen A. The relationship of VEGF polymorphisms with serum VEGF levels and progression-free survival in patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2010;117(1):109–116. doi:10.1016/j.ygyno.2009.11.011.
  35. Ferrante M, Pierik M, Henckaerts L, Joossens M, Claes K, Van Schuerbeek N, Vlietinck R, Rutgeerts P, Van Assche G, Vermeire S. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2006;12(9):870–878. doi:10.1097/01.mib.0000235095.01608.10.
  36. Luidens MK, Mousa SA, Davis FB, Lin H-Y, Davis PJ. Thyroid hormone and angiogenesis. *Vascular Pharmacology*. 2010;52(3-4):142–145.



doi:10.1016/j.vph.2009.10.007.

37. Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marmé D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood*. 1996;87(8):3336–3343.
38. Goebel S, Huang M, Davis WC, Jennings M, Siahaan TJ, Alexander JS, Kevil CG. VEGF-A stimulation of leukocyte adhesion to colonic microvascular endothelium: implications for inflammatory bowel disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;290(4):G648–54. doi:10.1152/ajpgi.00466.2005.
39. Zhao X, Wang G, You J. [Measurement and correlation analysis of plasma VEGF level in the patients of hyperthyroidism]. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*. 2013;30(2):365–367.
40. Figueroa-Vega N, Sanz-Cameno P, Moreno-Otero R, Sánchez-Madrid F, González-Amaro R, Marazuela M. Serum levels of angiogenic molecules in autoimmune thyroid diseases and their correlation with laboratory and clinical features. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(4):1145–1153. doi:10.1210/jc.2008-1571.
41. Cooper DS. Antithyroid drugs. *N Engl J Med*. 2005;352(9):905–917. doi:10.1056/NEJMra042972.

## Tables

**Table 1:** Distribution of rs10738760 genotypes and alleles in patients with AITD (n=378), HT (n=286), GD (n=92), healthy control subjects (n=354), hypothyroidism, hyperthyroidism and euthyroidism

	Contro l n (%)	AITD n (%)	HT n (%)	GD n (%)	Hypothyroidis m n (%)	Hyperthyroidis m n (%)	Euthyroidis m n (%)
<b>Genotyp</b>							
<b>e</b>							
<b>GG</b>	118 (33.33)	98 (25.92)	82 (28.67)	16 (17.39)	9 (33.33)	1 (20)	29 (33.33)
<b>GA</b>	154 (43.5)	197 (52.12)	149 (52.1)	48 (52.17)	15 (55.56)	3 (60)	44 (50.57)
<b>AA</b>	82 (23.17)	83 (21.96)	55 (19.23)	28 (30.44)	3 (11.11)	1 (20)	14 (16)
<b>Allele</b>							
<b>G</b>	390 (55.08)	393 (51.98)	313 (54.72)	80 (43.48)	33 (61.11)	5 (50)	102 (58.62)
<b>A</b>	318	363	259	104	21 (38.89)	5 (50)	72 (41.38)

---

(44.92) (48.02 (45.28 (56.52

) ) )

---

AITD = autoimmune thyroid disease, GD = Graves' disease, HT = Hashimoto's thyroiditis

**Table 2:** Distribution of rs6921438 genotypes and alleles in patients with AITD (n=377), HT (n=286), GD (n=91), healthy control subjects (n=348), hypothyroidism, hyperthyroidism and euthyroidism

	Control	AITD	HT	GD	Hypothyroidism	Hyperthyroidism	Euthyroidism
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<b>Genotype</b>							
<b>GG</b>	190 (54.6)	182 (48.27)	144 (50.35)	38 (41.76)	15 (55.56)	4 (80)	39 (44.32)
<b>GA</b>	117 (33.62)	150 (39.79)	110 (38.46)	40 (43.96)	10 (37.04)	0	37 (42.32)
<b>AA</b>	41 (11.78)	45 (11.94)	32 (11.19)	13 (14.28)	2 (7.4)	1 (20)	12 (13.63)
<b>Allele</b>							
<b>G</b>	497 (71.41)	514 (68.17)	398 (69.58)	116 (63.74)	40 (74.07)	8 (80)	113 (64.94)
<b>A</b>	199 (28.59)	240 (31.83)	174 (30.42)	66 (36.26)	14 (25.93)	2 (20)	61 (35.06)

AITD = autoimmune thyroid disease, GD = Graves' disease, HT = Hashimoto's thyroiditis

**Table 3:** Distribution of rs6993770 genotypes and alleles in patients with AITD (n=372), HT (n=282), GD (n=90), healthy control subjects (n=349), hypothyroidism, hyperthyroidism and euthyroidism

	Control	AITD	HT	GD	Hypothyroidism	Hyperthyroidism	Euthyroidism
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<b>Genotype</b>							
<b>AA</b>	139 (39.83)	145 (38.98)	109 (38.65)	36 (40) (48.89)	11 (40.74)	2 (40)	33 (37.93)
<b>TA</b>	152 (43.55)	181 (48.66)	137 (48.58)	44 (48.89)	12 (44.44)	3 (60)	43 (49.42)
<b>TT</b>	58 (16.62)	46 (12.36)	36 (12.77)	10 (11.11)	4 (14.82)	0	11 (12.65)
<b>Allele</b>							
<b>A</b>	430 (61.61)	471 (63.31)	355 (62.94)	116 (64.44)	34 (62.96)	7 (70)	109 (62.64)
<b>T</b>	268 (38.39)	273 (36.69)	209 (37.06)	64 (35.56)	20 (37.04)	3 (30)	65 (37.36)

AITD = autoimmune thyroid disease, GD = Graves' disease, HT = Hashimoto's thyroiditis,

**Table 4:** Distribution of rs4416670 genotypes and alleles in patients with AITD (n=374), HT (n=282), GD (n=92), healthy control subjects (n=352), hypothyroidism, hyperthyroidism and euthyroidism

	<b>Control</b>	<b>AITD</b>	<b>HT</b>	<b>GD</b>	<b>Hypothyroidism</b>	<b>Hyperthyroidism</b>
	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>
<b>Genotype</b>						
<b>CC</b>	99 (28.13)	102 (27.27)	85 (30.14)	17 (18.48)	9 (33.33)	0
<b>TC</b>	160 (45.45)	180 (48.13)	126 (44.68)	54 (58.69)	13 (48.15)	2 (40)
<b>TT</b>	93 (26.42)	92 (24.6)	71 (25.18)	21 (22.83)	5 (18.52)	3 (60)
<b>Allele</b>						
<b>C</b>	358 (50.85)	384 (51.34)	296 (52.48)	88 (47.83)	31 (57.41)	2 (20)
<b>T</b>	346 (49.15)	364 (48.66)	268 (47.52)	96 (52.17)	23 (42.59)	8 (80)

AITD = autoimmune thyroid disease, GD = Graves' disease, HT = Hashimoto's thyroiditis,

**Table 5:** Hormone levels among the of rs10738760, rs6921438, rs4416670, rs6993770 genotypes

	<b>FT4 after 6 months of treatment Mean ± standard deviation</b>	<b>FT3 after 6 months of treatment Mean ± standard deviation</b>	<b>TSH after 6 months of treatment Mean ± standard deviation</b>	<b>FT4 initial Mean ± standard deviation</b>	<b>TSH initial Mean ± standard deviation</b>
<b>rs10738760</b>					
<b>GG</b>	23.276 ± 6.912	4.075 ± 2.321	2.168 ± 2.688	12.076 ± 13.407	39.314 ± 72.379
<b>GA</b>	24.661 ± 7.518	4.894 ± 2.714	1.835 ± 1.974	19.322 ± 23.592	24.59 ± 52.887
<b>AA</b>	26.478 ± 9.793	5.532 ± 3.699	1.817 ± 2.041	23.04 ± 29.417	31.302 ± 70.125
<b>rs6921438</b>					
<b>GG</b>	24.165 ± 7.496	4.924 ± 2.475	2.249 ± 2.408	16.212 ± 17.49	29.185 ± 61.456
<b>GA</b>	25.608 ± 8.432	4.62 ± 3.344	1.394 ± 1.318	19.219 ± 26.335	29.683 ± 65.184
<b>AA</b>	22.817 ± 7.535	5.055 ± 1.803	1.965 ± 2.828	18.793 ± 19.551	30.409 ± 54.619
<b>rs4416670</b>					
<b>CC</b>	23.533 ± 6.756	5.064 ± 2.061	1.935 ± 1.845	19.548 ± 26.825	29.266 ± 51.839
<b>TC</b>	24.264 ± 8.249	4.415 ± 2.629	1.777 ± 2.247	19.358 ± 24.406	29.833 ± 69.015

<b>TT</b>	26.669 ± 8.384	5.229 ± 3.804	2.103 ± 2.324	15.81 ± 17.562	30.005 ± 59.086
<b>rs6993770</b>					
<b>AA</b>	25.21 ± 7.502	4.449 ± 2.631	1.784 ± 1.787	17.727 ± 19.803	25.259 ± 49.381
<b>TA</b>	24.16 ± 8.736	5.055 ± 3.223	1.835 ± 2.227	19.926 ± 25.648	33.641 ± 73.771
<b>TT</b>	24.956 ± 5.953	4.755 ± 1.953	2.427 ± 2.745	15.813 ± 26.963	32.571 ± 59.896

FT4: Free Tetraiodothyroxine, FT3: Free triiodothyroxine, TSH: Thyroid stimulating hormone



**Table 6:** Distribution of anti TPO, anti Tg and anti TSHR antibody among the of rs10738760, rs6921438, rs4416670, rs6993770 genotypes

	Anti TPO antibody		Anti TG antibody		Anti TSHR antibody	
	+	-	+	-	+	-
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<b>rs10738760</b>						
<b>GG</b>	25 (32.05)	25 (25)	7 (36.84)	43 (27.05)	1 (10)	3 (30)
<b>GA</b>	37 (47.44)	52 (52)	7 (36.84)	82 (51.57)	7 (70)	3 (30)
<b>AA</b>	16 (20.51)	23 (23)	5 (26.32)	34 (21.38)	2 (20)	4 (40)
<b>rs6921438</b>						
<b>GG</b>	35 (44.3)	56 (54.91)	8 (42.11)	83 (51.23)	5 (50)	4 (40)
<b>GA</b>	34 (43.04)	36 (35.29)	7 (36.84)	63 (38.89)	3 (30)	4 (40)
<b>AA</b>	10 (12.66)	10 (9.8)	4 (21.05)	16 (9.88)	2 (20)	2 (20)
<b>rs4416670</b>						
<b>CC</b>	19 (24.36)	24 (24)	9 (47.37)	34 (21.38)	2 (20)	2 (20)
<b>TC</b>	46 (58.97)	47 (47)	7 (36.84)	86 (54.09)	5 (50)	6 (60)
<b>TT</b>	13 (16.67)	29 (29)	3 (15.79)	39 (24.53)	3 (30)	2 (20)
<b>rs6993770</b>						
<b>AA</b>	30 (38.46)	38 (37.62)	6 (31.58)	62 (38.75)	4 (40)	2 (20)
<b>TA</b>	38 (48.72)	51 (50.5)	12 (63.16)	77 (48.13)	6 (60)	7 (70)

---

<b>TT</b>	10 (12.82)	12 (11.88)	1 (5.26)	21 (13.12)	0	1 (10)
-----------	------------	------------	----------	------------	---	--------

---

Anti Tg: anti-thyroglobulin, Anti TPO: anti-thyroid peroxydase, Anti TSHR: anti-thyrotropin receptor

## VEGF/VEGFR BIOLOGY AND THYROID PHYSIOPATHOLOGY

**Marc RANCIER<sup>1,2</sup>, Maria G STATHOPOULOU<sup>1</sup>, Sophie VISVIKIS-SIEST<sup>1,3,\*</sup>.**

UMR INSERM U1122; Interactions Gène-Environnement en Physiopathologie Cardio-Vasculaire (IGE-PCV), Université de Lorraine, Nancy, F-54500, FRANCE.

Department of Endocrinology, Centre Hospitalier Robert Schuman, Luxembourg, L-2540, LUXEMBOURG.

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

*Abbreviated Title:* VEGF and thyroid

*Key terms:* VEGF, VEGFR, thyroiditis, cancer, regulation.

*Word count:* 4765

*Number of figures and tables:* 4

*\*Corresponding author and person to whom reprint request should be addressed:*

*Dr. Sophie VISVIKIS-SIEST*

*UMR INSERM U1122; IGE-PCV*

*Université de Lorraine*

*30 Rue Lionnois, 54000 Nancy*

*Tél : + 33 (0)3 83 68 21 63*

*Fax : + 33 (0)3 83 32 13 22*

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

Disclosure statement: The authors have nothing to disclose

Search strategy and selection criteria:

Articles for this review were identified through search of Pubmed for publications between 1971 and 2014, by the use of the terms “VEGF”, “VEGFR” or “angiogenesis” in combination with “thyroid”, “thyroiditis” and “inflammation” or “carcinoma”. Articles resulting from this search and relevant references cited in them were reviewed. Articles published in English, French, and German were included. References chosen in this review are primary/root references only.

## **Abstract**

Angiogenesis is a complex, continuous and whole life process promoting the development and growth of new vascular structures from pre-existing blood vessels. In physiology, a subtle equilibrium exists between pro- and anti-angiogenic processes. In pathological conditions, like cancers, this equilibrium is broken, and alternative angiogenic processes occur. The activation of VEGFR by VEGF induces the dimerization of the receptor and leads to auto- and trans-phosphorylation of the latter. This induces proliferation, survival, migration and vascular permeability. The role played by VEGF in thyroid physiological and pathological mechanisms is crucial. Angiogenesis exploration permits a new approach in thyroiditis. Thyroid tumors exhibit a high VEGF-dependence. VEGF pathway is a worldwide subject of research, with an increasing number of molecules in clinics or in development. A better understanding of the VEGF/VEGFR signalling and the pharmacogenomics of these drugs may assist clinicians in therapeutic decisions, allow appropriately targeted treatment and decrease treatment costs.

## Introduction

Angiogenesis is a complex process promoting the development and growth of new vascular structures in contact with pre-existing vasculature. It plays a key role in the regulation of physiological processes (embryogenesis, wound healing, vascular homeostasis) and in various pathologies (1) conditions (inflammatory disease, neoplasias). These angiogenic processes are provided by different classes of molecules including cytokines, growth factors, prostaglandins and proteolytic enzymes (2). Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) is the most potent angiogenic factor known. The activation of *VEGF* and *VEGFR* genes leads to numerous types of products, which explain the great variety of downstream reactions induced by the combinations of the different receptors and ligands. The dimer VEGF/VEGFR has a major impact on the thyroid physiology from ontogenesis to oncogenesis. The discovery of VEGF has raised great hopes, especially in the field of oncology and a vast number of molecules have been developed. Even if thyroid carcinoma is particularly dependant on VEGF, only few molecules are currently used in clinical practice (3). This review aims to associate VEGF complexity to a variety of thyroid clinical situations, from molecular to pharmacogenomics aspects.

### VEGF and VEGFR characteristics

VEGF is a designation for a multipotent family of molecules implicated in a wide spectrum of physiological and pathological situations, mainly through angiogenesis and vascular homeostasis. In mammals, this family contains 5 glycoproteins: VEGF-A, B, C, D, and placental growth factor (PlGF) with 8 conserved cysteine residues in each monomer peptide. VEGF acts in homodimeric or heterodimeric structures, through side-by-side or anti parallel disulfide bonds. Alternative splicing of the exon 8 provides pro-angiogenic and anti-angiogenic products. The wide variety of gene sub-products showing various physicochemical properties explains the diversity of action of VEGF. The VEGF family members bind to 3 main receptors (VEGFR1, VEGFR2 and VEGFR3) and neuropilin co-receptors (table1). The binding of VEGF-A to VEGFR1 and 2 regulates the proliferation, survival and migration of endothelial cells. VEGF-C and D bind to VEGFR3 to regulate the same processes for lymphatic vessels.

*VEGFR1* and 2 alternative gene products named sVEGFR1 and 2 are decoy receptors with no trans-membrane domain which sequester free VEGF-A. This prevents downstream phosphorylations. Other co-receptors called neuropilins (neuron-specific semaphoring receptors) are especially implicated in neural crest development and enhance VEGFR

signalling. Neuropilins are involved in cell migration and lymphatic vasculature expansion. VEGFR2, the most studied receptor, induces angiogenic reactions through several pathways: RAS/RAF, phospholipase-c (PLC), focal adhesion kinase (FAK), p38, inositol-trisphosphate 3-kinase (IP3K). This occurs after homo- or heterodimerization of VEGFR receptors in cis or trans on adjacent cells, following allosteric changes. Then downstream proteic actors are phosphorylated. VEGFR3, through integrin-mediated phosphorylation, activates the recruitment of the adaptor proteins p38 and SHC inducing activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK). Affinity for VEGF subtypes and kinase activity level differs among VEGFR types. Combinations of VEGF receptors induce different downstream effects, leading to a multimodal stimulation of endothelial cells (4,5) (table1).

VEGF/VEGFR in thyroid physiology and function

Role in the normal gland

VEGF-A is a widespread factor in adult endocrine tissues and is expressed in the thyroid (6). Both thyrocytes (7) and thyroid stromal cells (8) are able to express *VEGF* gene and secrete VEGF protein. VEGF-C protein is also expressed in thyroid tissue (9). Also VEGF receptors genes are expressed in normal thyroid follicular cells (*neuropilin1* = *neuropilin2* = *VEGFR2* > *VEGFR1* > *VEGFR3*). The subcellular distribution of VEGFR2 suggests others *functions*, with potentially a role in follicular integrity and iodine uptake (10).

Iodide, TSH, and thyroid hormones influence on VEGF/VEGFR

Iodide status influence and iodide metabolism

Iodide deficiency induces a chronic angiogenic reaction in thyroid cancer through hypoxia-inducible factor-1/VEGF pathway activation, but not through the ROS pathway. Whereas iodide deficiency induces a transient *VEGF-A* mRNA and moderate *HIF1* protein expression in normal cells, this induction persists in transgenic mice cancer cell lines, with differences according to the cell lines (11). In experimental iodide deficiency, a first phase (about one week) involves vascular activation; this process is TSH-independent and directly triggered by VEGF protein expression by thyrocytes as soon as the intracellular iodine content decreased. This is followed by an endothelial cell proliferation and an increase of the thyroid blood flow. Both phases are mediated by VEGF and can be prevented by VEGF-blocking antibodies. TSH induces the second angiogenic reaction. The major pro-angiogenic proteins VEGF-A, FGF-2, angiopoietin-1, and neuron-gial antigen 2 as well as their receptors VEGFR1, VEGFR2, and TIE-2 are involved (12). In rats treated for goiter by propylthiouracil *PIGF*, *VEGF* and their receptors mRNA levels are upregulated by TSH (*in vitro* and *in vivo*). This demonstrates a

paracrine pattern of action (13). Iodide deficiency inhibits the production of TGF- $\beta$  (14) which is known to downregulate many thyroid specific genes as sodium-iodide transporter (*NIS*), thyroperoxidase, thyroglobulin and TSH-receptor (15) through *TTF-1*, *TTF-2* and *PAX-8* (16). Iodide can also indirectly induce VEGF as TGF- $\beta$  can modulate *VEGF* expression (17).

On the opposite, high concentrations of iodide decrease the expression of the angiogenic factors *VEGF-A*, *VEGF-B*, and *PlGF*, accompanied by an increase in the expression of anti-angiogenic factors such as urokinase-type plasminogen activator. This partly accounts for the iodide-induced decrease in thyroid blood flow (18).

The Wolff-Chaikoff effect requires angiogenic factors. Iodolactons derived from arachidonic acid and iodoaldehydes derived from plasmalogens are candidates, but additional factors, such as TGF- $\beta$ , are also involved (19,20). *NIS* mRNA levels are decreased by a high dose of iodide and is involved in iodine-induced inhibition of thyroid hormonogenesis and escape phenomenon from this acute Wolff-Chaikoff effect (19). *NIS* mRNA levels are induced by TSH (21). The Wolff-Chaikoff effect represents the historical treatment used to lower the vascular flow, later proved by ultrasonographic Doppler studies (22).

Globally, all types of variation in the iodide status induce VEGF-dependant angiogenic reactions (Figures 1,2). This regulation implicates more than 100 genes, and a global sight remains challenging (23). Pharmacological inhibition of VEGFR compromises cell survival increases  $I^{125}$  uptake and decreases plasminogen activators synthesis. This effect is reversible by TSH or insulin treatment (24).

#### Hypothyroidism and hyperthyroidism

The thyroid hormone levels are associated with significant VEGF protein plasma level variations, as well as other angiogenic factors. In mice cancer model, T4 enhances angiogenesis through NO activation, but requires integrin  $\alpha v \beta 3$  to promote carcinogenesis(25). In human, levothyroxine regimen for HT is associated with an increase of VEGF protein plasma levels (26) but paradoxally a recent Chinese clinical study found lower plasma VEGF in hyperthyroid patients compared to healthy controls(27). Endogenous hyperthyroidism is associated, in comparison with healthy subjects, with higher levels of VEGF, angiopoietin-1, angiopoietin-2, and sTIE-2 proteins. Hypothyroidism is associated with no specific variation of the previous parameters (28). Interestingly, nitric oxide (NO) and malondialdehyde (MDA) levels are higher in non-treated hypothyroid patients in comparison with controls. Superoxide dismutase (SOD) activity is not different in patients before

treatment when compared to controls. SOD activity is significantly higher after treatment when compared to both pre-treatment and control levels. MDA levels decrease with treatment but remain higher than in controls (21). This concept has been later extended to hyperthyroidism, through the same mitochondrial respiration and downstream ROS production (29).

#### TSH influence on VEGF/VEGFR

*In vitro*, TSH decreases VEGF-A protein production in thyroid cell. Under TSH treatment, *VEGFR2* mRNA is reduced by 50% in non-tumor cell lines (24). *In vivo*, short-term administration of rh-TSH in patients monitored for PTC induces a significant reduction in serum VEGF protein values even in the absence of thyroid tissue (30). In a study on 72 patients with cancer and non-toxic multinodular goiter, endogenous TSH stimulation decreased VEGF protein plasma levels in patients either with or without thyroid tissue, suggesting that its regulatory effects are induced through receptors located outside the thyrocytes (1,31,32).

In contrast, an *in vitro* stimulating effect of TSH on VEGF has been demonstrated, through PKC and PKA (less) pathways (2,33). Compared to TSH, TGF- $\beta$ 1 and EGF were twice more potent in stimulating cancer cells. In the absence of a functioning TSH-R, additional growth factors, such as TGF- $\alpha$ , increase capacity for VEGF stimulation (3,34). *In vivo*, the expression of VEGF protein can also be upregulated by rh-TSH injections, in comparison with controls (4,5,35). Anti-TSH receptors antibodies increase *VEGF-A* mRNA levels and increase *in vivo* *VEGFR1* and *VEGFR2* mRNA in rat cells (6,13,36). This explains how GD increases hormonal synthesis and vascularity through angiogenesis. In thyroiditis, *VEGF-A* mRNA is detected in hyperplastic follicular cells and *VEGFR1* mRNA and protein in endothelial cells in the whole thyroid (7,37).

Synthetically, hyperthyroidism is associated with high FT4 and FT3 levels, which can induce mitochondrial stimulation, and therefore angiogenesis through an increase in oxygen needs. In peripheral hypothyroidism, TSH plays its trophic effect and induces by itself an angiogenic effect in order to potentialise hormone secretion. For these two reasons, both low and high TSH levels can be associated with increased levels of VEGF effect without any logical aberration.

#### VEGF/VEGFR in benign pathologies

##### Thyroiditis

Development of vasculature and vascular permeability are the cornerstones of chronic and acute inflammation. The high levels of tissular VEGF mRNA in thyroiditis are explained by



angiogenesis in inflammatory lesions (8,38). Inflammation process in general follows both Th1 and Th2 pathways (9,39), however specific profiles have been described, according to each disease. In HT, the major cytokines are  $TNF\alpha$ ,  $IL-1\beta$ ,  $IFN\gamma$ ,  $IL-2$ ,  $IL-12$ , and  $CD40L$ , following a Th1 profile. In GD, the main actors are  $IL-4$ ,  $IL-5$ ,  $IL-6$ ,  $IL-10$ ,  $IL-13$  and  $CD40L$ , following a Th2 profile (10,40). Some risk factors are common in the two conditions (sex, parity, X-chromosome inactivation), but some others can play opposite roles (smoking, iodine status). Various genes are known as major actors in the heritability of these diseases (*TSHR*, *thyroglobuline*, *HLA*, *CTLA4*, *PTPN22*, *CD40*, *FCRL3*, *IL2RA* and *FOXP3*)(11,41).

*VEGF-A* mRNA and protein levels in thyroid are increased in de Quervain's subacute thyroiditis, HT and GD (12,31). In HT, serum VEGF protein and TSH levels are correlated. Levothyroxine therapy significantly decreases VEGF serum levels, intrathyroidal vascularity area and thyroid volume. Hashimoto patients have a significantly higher vascular area in comparison with patients with subacute thyroiditis. Serum VEGF protein levels are higher in De Quervain's, in comparison with chronic thyroiditis. High serum VEGF protein levels in De Quervain's thyroiditis seem to be related to systemic inflammation (13,42). TGF- $\beta$  controls the development of auto-immunity through lymphocyte activation and differentiation, cell adhesion molecule expression, regulatory T cell function, expression of MHC molecules and cytokines, and cell apoptosis (14,43), with a preventive effect (15,44). VEGF and TGF- $\beta$ 1 have an action on thyroid auto-immunity through their action on NOS expression(13,16), specifically in HT (17,37). A decrease in TGF- $\beta$ 1 protein serum levels reduces an immunosuppressive protection on the thyroid (18,45). At the granulomatous stage, monocytes and macrophages infiltrating into follicle lumina trigger the granulomatous reaction. In a second step, the major actors like TGF- $\beta$ 1, FGF- $\beta$ , PDGF, EGF and VEGF are secreted by the stroma cells. At the regenerative step, EGF serves follicle regeneration through its mitogenic effect on thyrocytes, although some co-factors with EGF are involved in folliculogenesis, and the decreased expression of *TGF- $\beta$ 1* contributes to thyroid tissue repair. During the regeneration following sub-acute thyroiditis, VEGF modulates folliculogenesis and angiogenesis, in association with other growth factors among which TGF $\beta$ 1, EGF, bFGF and PDGF (19,20,46).

According to different animal models  $IL-1\beta$ ,  $IL-2$ ,  $IL-6$ ,  $TNF-\alpha$  and  $PGE_2$  also stimulate VEGF synthesis in inflammatory diseases, but this remains unclear in thyroiditis (19).

VEGF-C and VEGFR3 proteins are expressed in autoimmune thyroiditis (6,21,36). *VEGF-A* and *VEGF-B* are expressed in all thyroid diseases and seem less specific. *VEGF-D* mRNA is

present in 46.0% of patients, significantly lower than that of the proportion of the other VEGF types (22,47).

#### Specificity of Graves' disease

Graves's disease associates hyperthyroidism and goiter. Beyond the proper role of hyperthyroidism on serum VEGF protein levels (23,48), the parenchyma hyperplasia is an explanation for high VEGF protein levels.

This thyroid hyperplasia is accompanied by an increase in blood flow and formation of neovessels (24,36,49). The expression of *VEGF*, *PIGF* and their receptors *VEGFR1* and *VEGFR2*, is stimulated in GD (25,31,50,51). VEGF, Angiopoietin-2 and sTIE-2 protein levels are also elevated in GD and can potentially be used as markers of Graves' ophthalmopathy activity. Antithyroid drugs affect the angiogenic pattern in GD (26,28). TSH and thyrostimulating antibodies increase *VEGF-A* mRNA synthesis through the protein kinase C and adenylate cyclase pathway(14,28).

A correlation has been found between intrathyroidal vascular area in Doppler ultrasonography and VEGF protein serum concentrations in untreated GD with a goiter larger than 40 cm<sup>3</sup> (21,42). *VEGF* and *VEGFR1* expression were also correlated with this hypervascularity (29,50,51).

. In general, tissular VEGF protein levels are elevated in non-treated thyroiditis (Hashimoto and Graves)(24,31). Furthermore, the VEGF levels are correlated with the degree of vascularity measured by Doppler ultrasonography. Treatment with antithyroid drugs is associated with a decrease of thyroid vascularisation and serum VEGF (30,42). However, even if inferior thyroid artery pulse wave velocity was correlated with thyroid hormones and thyroid volume in patients before treatment, no correlation has been observed with VEGF serum levels (52).

In Graves' patients with orbitopathy biopsies, positive expression has been found for *FGF*, *IGF-1*, and *VEGF-A* if clinical activity score was equal or over 5. The endocrine status was not correlated with immunostaining. In Graves' ophthalmopathy, the restricted orbital compartment is associated with compression of orbital tissue and slow venous return (53). This could explain the impact of the clinical score; since a more severe compression induces hypoxia, lower pH and lactate accumulation(54).

In 2009, a study compared healthy subject, with patients with HT, GD or toxic nodular goiter. sTIE-2 and Angiopoietin-2 protein levels were correlated with FT4 and TSHR-antibodies. Serum levels of sTIE-2 and its ligand Angiopoietin-2 were increased in patients with untreated GD. Serum sTIE-2 was increased in patients with active Grave's ophthalmopathy.

Antithyroid therapy was associated with diminution of Angiopoietin-2 protein levels in case of GD. *TIE-2* and *ANG-2* mRNA levels are increased in thyroid glands from patients with GD (28). An association has been reported in 2012 between the polymorphism +405 and -2578 with a higher risk of GD and increased antibodies production, respectively (55).

### Goiter

Thiouracil-induced goiter in rats is associated with an augmentation of VEGF protein between the 3<sup>rd</sup> of the 7<sup>th</sup> day of treatment (14). Other rats treated by thiouracil develop a goiter associated with an elevation of *PIGF*, *VEGF-A*, *VEGFR1* and *VEGFR2* mRNA and protein levels concomitant with the increase of TSH and the vascularisation (50). In HT, levothyroxine therapy decreases TSH and blood flow(19).

In goiter, *VEGF-A*, *VEGF-C*, *VEGFR1* and *VEGFR3* mRNA tissular levels are linked to neovascularisation (6,36,51). Endothelin-1 promotes vasomotor tone and endothelial proliferation. The endothelin-1 receptors are expressed in thyroid during goiter formation (56). Endothelin-1 increases angiogenesis through VEGF production stimulation (57). Endothelin-1 directly affects thyroid blood flow by modification of NO availability, since NOS antagonists reduce vascular expansion without any effect on goiter size (56). In rats treated with fluoride-supplemented drinking water, the average relative weight of their thyroid glands is significantly higher than that in control rats. *VEGF-A* expression is higher in treated rats. A positive feedback mechanism between NO and *VEGF-A* expression explains fluoride-induced goiter formation (58).

The thyroid nodule microenvironment is different between uninodular and multinodular goiter. In the first condition, transcription and protein of VEGF and its receptors is high in thyrocytes in comparison with surrounding tissues. In the second one, no such difference could be found between nodular and surrounding tissue (59).

### Thyroid benign nodules and cysts

In thyroid adenoma, *VEGF-A* is highly expressed (31,60). Follicular adenomas and multinodular goiter show an homogenous VEGF, VEGFR1 and VEGFR2 protein expression in thyrocytes and in vascular endothelium (60). *VEGF-A* expression is involved in cyst recurrence. A study has shown that, after a first cyst needle evacuation, recurrence is associated with higher VEGF protein serum levels (23,61). However, there is no evidence to establish the direct accountability of VEGF in the pathogenesis of thyroid cysts.

### VEGF/VEGFR in malignant pathologies

Low-risk differentiated thyroid carcinoma usually is associated with approximately 5% 10 years recurrence and 2–3% disease-specific mortality (62). However, management of radioiodine resistant tumor is difficult, with 10 years survival under 10%(63). Interesting results have been recorded in the field of radioiodine negative differentiated thyroid carcinoma with various tyrosin kinase inhibitors (sunitinib, sorafenib, vandetanib, axitinib, motesanib, gefitinib, pazopanib and selumetinib). Several molecules have been approved by EMEA and FDA (3).

### Microvascular density

The development of vascularisation is mandatory for tumor survival and growth (64). Microvascular density is an important prognostic factor of PTC (65). In undifferentiated tumors, microvascular is higher compared with differentiated tumors (66). This vascular density is associated with bad prognosis. A correlation has been described with aggressiveness. The invasiveness of tumor is related with lymphatic vessels due to its structural features without cohesive pericytes and thin endothelial wall (67). Increased vasculogenesis engenders blood and lymphatic vessels differentiation impairment (68). Among VEGF family, VEGF-C is involved in proliferation and migration of endothelial cells, increased vascular permeability and lymphangiogenesis (69). However, the data on lymphatic vessels density in thyroid remain controversial (70,71). Lymphatic vessels density and VEGF-C protein are significantly higher in benign thyroid tumors in comparison with malignant (72). According to Tanaka et al, no correlation exists between *VEGF-A* mRNA levels and microvascular density in FTC(47).

Despite two studies showing an increased risk of recurrence and shorter disease-free survival in the more vascular papillary thyroid tumors (65,73), a decreased vascularity is associated with a worst prognosis(74). This paradox is a well-known singularity of endocrine tumor in general, especially in neuroendocrine tumors (75).

Higher vascularity is associated with a worse outcome in PTC (66). In a study on iodo-negative differentiated thyroid carcinoma, *BRAF* mutation V600E was associated with decreased intra-tumoral vascular density. Microvessels density and lymphatic vessels density were not different (76).

### Tumor characteristics and VEGF expression

Serum VEGF-A levels are correlated with stage and bad prognosis. A correlation exists between the size of thyroid tumors and VEGF-A and VEGFR1 protein and mRNA levels. However, other studies are conflicting, with correlation found between VEGF levels and sex, age and tumor diameter (77). A study on 25 papillary and 18 follicular thyroid cancers has shown that microvascular density was higher in follicular lesions. Tumors greater than 4 cm were associated with increased vascular density. *VEGF* expression was also associated with vascularity levels. There was no association between *FGF* expression and histological parameters (78). Among PTCs, only 20% of tumor cells in follicular variant and 68% of typical papillary variant exhibit a strong expression of *VEGF-A* (79). The highest serum levels of VEGF are found in anaplastic carcinomas (7). In a study on 34 papillary, 18 follicular and 8 poorly differentiated thyroid carcinomas, *VEGF-A*, *VEGFR1* and *VEGFR2* expression was assessed: the rates were respectively of 79/76/68/50% for papillary carcinoma, 50/83/56/39% for follicular carcinoma, and 37/25/37/12% for poorly differentiated carcinoma. The blockage of either VEGF or its receptors with specific antibodies significantly reduced cell viability and increased apoptosis levels of VEGFR positive thyroid cell line NPA087. The blockade of VEGFR2 was more effective than VEGFR1 blockade (80). An autocrine loop seems to exist inside the thyroid carcinoma, especially for VEGFR2 (10).

Although a downregulation of *PIGF* has been described in thyroid tumor biopsies (7), PIGF is associated with tumor vascularisation (81).

*VEGF-A*, *VEGFR1* and *VEGFR2* are expressed in PTC and are implicated in its progression (82). *VEGFR3* is also expressed, without any significant difference between microcarcinoma and >1cm carcinoma (83).

Lymphangiogenesis and tumoral growth are stimulated by VEGF-C and its receptor VEGFR3(84). After surgery, VEGF-A and VEGF-C protein levels decrease in PTC(85).

Distribution of polymorphisms in the 5'-UTR -141A>C and +405C>G and 3'-UTR +936C>T of *VEGF* gene are all significantly different in papillary carcinoma and benign thyroid tissue (86).

Iodine-123-VEGF165 SPECT has been used as a tumor marker (*in vitro* and *in vivo*) in gastrointestinal carcinomas, as with octreotide. Sensibility is low in comparison with CT/MRI. No further development was achieved since then. No study has been conducted in thyroid carcinoma yet, since conventional iodine scintigraphy exhibits high sensitivity and specificity (87).

The ability of sVEGFR-like molecule to bind VEGF has been proposed as a therapeutic target in thyroid carcinoma (88).

VEGF/VEGFR status and cancer outcome: from protein to gene polymorphism

Tissular over-expression of *VEGF* has been demonstrated in thyroid tumors (30), although some authors do not report any difference between healthy tissue and microcarcinomas. In papillary and FTCs, the growth in *VEGF* expression is correlated with proliferation index Ki67 (6).

Carcinomas showing highest VEGF-A protein and mRNA levels have a higher mitotic index (31). Inside the tumors, *VEGF-A* expression levels are correlated with aggressiveness, invasiveness (89) and circulating VEGF-A protein (85). Parenchymal expression of VEGF-C is more frequent in papillary carcinoma, compared to follicular form. Serum VEGF-A protein levels are correlated with thyroglobulin levels, but not VEGF-C (85).

*VEGF-C* expression is more frequent in papillary tumors (89). Among PTCs *VEGF-A* mRNA levels are higher in follicular variants. Post-transcriptional modifications are implicated, probably affecting RNA stability (79).

Initially, no difference has been found in *VEGF-A* mRNA levels between primitive tumors and metastasis, but papillary, follicular and Hürtle cell tumor had higher levels compared to healthy tissues, benign tumors and medullary carcinomas. Inside tumors, stromal cells are able to secrete VEGF and other angiogenic factors. A correlation exists between invasion, metastatic spread and angiogenesis in different tumor types (90).

Expression of *VEGF-A* is associated with aggressiveness, local recurrence, metastasis and progression free survival (91). *VEGF-C* and *VEGF-D* expression is also increased in loco-regional extension (92). Cancer cells in metastatic lymph node show a greater expression in comparison with primitive tumor lesions (6). A meta-analyse on Chinese patients confirmed the association between VEGF protein and lymph node metastasis(93). The expression of *VEGF* in cancer cells in metastatic patients is higher than in patients without metastatic lesions (31). Preoperative levels of TSH seem to be associated with *VEGF* expression in PTC (94).

*VEGFR1* expression is related to lymph node metastasis and serum VEGF-A may be a marker of progression in the follow-up of patients with differentiated thyroid carcinoma (95).

Increased VEGF protein levels in blood are associated with lymph nodes extension of the cancer and metastasis. Metastatic diffusion is correlated with microvascular density (96).

Patients with distant metastasis have higher serum VEGF levels compared to patients without such extension. That is not the case for loco-regional recurrence. No difference exists between healthy controls and patients in remission (32). Serum VEGF-A protein levels are associated

with recurrence and metastasis, but not VEGF-C (85). Serum VEGF-D protein levels are reduced in metastatic diseases. Molecules secreted by tumor tissues induce a decrease in physiological VEGF-D production in healthy tissues (97). However, a study published in 2011, found that serum VEGF-D protein level was correlated with the presence of cervical lymph node metastases in PTC patients (98). Even in a study concerning aggressive tumors, VEGF-A protein levels are associated with progression free survival (99). Neuropilin-2 (Nrp2) is known for its role in lymph node invasion in cancers (100), and especially in PTC (92). Nrp2 is associated with VEGF-D protein levels and lymph node metastasis. Anti-Nrp2 blocks VEGF-D-induced motility and invasion (101).

Several *VEGF* and/or *VEGFR* polymorphisms are associated with cancers. The A allele of the -2578C/A polymorphism (rs6999947) increases the risk of thyroid cancer development and regional lymph node metastasis in men(102). The *VEGF* -141C allele is more common in PTC with lymph node metastases. *VEGF* +405G alleles and *VEGF* +936CC genotype are more common in PTC of advanced pathological staging. Also, *VEGF-A* expression is increased in PTC compared to control. Among patients with conventional PTC, the level of *VEGF-A* mRNA is higher in patients with lymph nodal metastases in comparison with other patients, showing then a trend for a higher aggressiveness (86).

#### Role of BRAF

The kinase cascade RAS/RAF/MEK/ERK1/2 pathway results in the activation of VEGF promoter (103). Activating point mutations of *BRAF*, especially V600E, has been found in PTC, but not in FTC (104) *BRAF* mutations are associated with a bad prognosis of PTC. Recurrence rate is higher if a mutation is present (105). There is a correlation with V600E mutation and extra-thyroidal extension, lymph node invasion and stage III and IV in PTC (106) but this notion remains controversial (107). In PTC cell lines, the expression of *HIF-1 $\alpha$*  is regulated not only by hypoxia, but also by the alternative *BRAF*-mutated pathway (108). In iodo-negative differentiated carcinomas, angiogenic factor, and especially VEGF, VEGFR1, 2 and 3 and neuropilin-1 mRNA levels are low if *BRAF* is mutated, in comparison with wild type. In thyroid carcinoma cell lines, *VEGF* mRNA levels are decreased if *BRAF* V600E mutation is induced, and increased if the gene is silenced. Since *BRAF* mutation downregulates *VEGF* and *VEGFR*, the presence of *BRAF* mutation does not imply a stronger prediction of response to drugs targeting VEGF signalling pathways (76) (figure 3).

#### Epigenetic VEGF gene regulation and mRNA processing

##### Epigenetics of VEGF

Angiogenesis can be regulated through DNA methylation. In endothelial cells, the methylation of the eNOS promoter inversely correlates with its transcriptional activity (109), and eNOS activity is influenced by DNA methylation (110). Gene silencing is common in cancers (111). It occurs through gene hypermethylation of CpG island in the promoter area (112). Since many cancers do not respond to anti-VEGF therapies and since others can often restore previously altered angiogenesis, some authors have speculated that *VEGFR* epigenetic silencing might influence the efficacy of VEGF-targeted drugs by altering the VEGF-VEGFR signaling pathway (112). Indeed, *VEGF* and *VEGFR* gene promoter contain CpG islands, but no methylation was observed in most cancers cell lines. In a normal thyroid cell line, no methylation has been found in *VEGF*, *VEGFR1* and *VEGFR2* promoter area. In thyroid cancer, FRO cell lines showed no specific modification, whereas NPA and TPC1 cell lines showed *VEGFR1* promoter methylation and ARO cell lines showed *VEGFR1* and *VEGFR2* promoter methylation (113). There seems to be a balance between VEGF-mediated stimulation and methylation-induced inhibition of the *VEGFR* genes in cancers. Hyper *VEGFR*-methylated cell lines showed a higher expression of *VEGF* and lower expression of *VEGFR1* and *VEGFR2* in comparison with no- *VEGFR*-methylated cell lines and HUVEC. After VEGF stimulation, hyper-*VEGFR*-methylated cell lines showed no change in ERK and AKT phosphorylation. Bevacizumab and sunitinib showed a proliferation inhibitory effect in HUVEC. No effect was noticed in no- nor hyper *VEGFR*-methylated cancer cell lines under Bevacizumab treatment. Under *VEGFR2*-antibody treatment, no-*VEGFR*-methylated cancer cell lines did not change their proliferation. Hyper-*VEGFR*-methylated cancer cell lines showed an increased proliferation effect under *VEGFR2*-antibody. TKI were able to decrease proliferation in HUVEC. TKI effect was preserved in no-*VEGFR*-methylated cancer cell lines and significantly decreased in hyper-*VEGFR* methylated cancer cell lines. The addition of a demethylating agent reduced the effect of TKI in HUVEC. In hyper-*VEGFR*-methylated cancer cell lines, demethylated agent alone decreased proliferation, and the adjunction of TKI increased its effect. In no-*VEGFR*-methylated cancer cell lines, demethylated agent alone decreased proliferation, and in association with TKI decreased the effect of the letter. No specific thyroic cancer cell lines were studied(112). Another team found that the expression of *VEGFR2* and *VEGFR3* is silenced by DNA methylation (dermal and umbilical vein cells) (114). However, no promoter methylation profile has been found for *VEGF* or *VEGFR* genes in thyroid carcinoma cell lines in comparison with healthy controls (113). No information is yet available concerning the effect on anti-angiogenic variants of the VEGF gene in proliferation or in clinical outcome.



## RNA processing

Recently, new regulation mechanisms of *VEGF* gene physiology have been described, especially in mRNA processing. This concerns alternative splicing, mRNA stability, alternative polyadenylation, and translational regulation (115). The new actors miR-7 and miR-126 have recently been associated with the diagnostic of malignancy in fine needle aspiration of thyroid (116). Since VEGF is a target of miR-126, the latter could potentially be used in the treatment of thyroid carcinoma. However, none of these new concepts has led to major impact in clinics for the moment. Recently, miR-145 was also associated with inhibition of cancer growth and metastatic expansion by targeting AKT3 (117).

## **Conclusion**

VEGF is a major actor in angiogenesis, especially in thyroid. Its implications in physiological as well as pathological processes have opened the way to prognostic, therapeutic and theranostic future developments. This review highlights the complementarity of the different downstream interventions after VEGF receptor activation. The variety of VEGF/VEGFR combinations explains the diversity of reactions under treatment, especially with tyrosine kinase inhibitors. Multikinase inhibitors currently used in clinical trials represent a challenge for pharmacogenomics, and potentially the cornerstone in the management of radioiodine refractory thyroid cancer. These molecules can eventually represent an add-on in the understanding of inflammatory diseases.

## **Abbreviations**

eNOS: endothelial nitric oxide synthase

FAK: focal adhesion kinase

FTC: follicular thyroid carcinoma

GD: Graves' disease

HIF1: hypoxia inducible factor 1

HT: Hashimoto's thyroiditis

HUVEC: human umbilical vein endothelial cells

IP3K: phosphoinositide 3' kinase

MAPK: mitogen-activated protein kinase

NRP: neuropilin

ROS: reactive oxygen species

PLC: phospholipase C

PTC: papillary thyroid carcinoma

sVEGFR: soluble vascular endothelial factor receptor

TSH: thyreostimulating hormone

TKI: tyrosine kinase inhibitor

VEGF: vascular endothelial factor

VEGFR: vascular endothelial factor receptor

VHL: Von Hippel Lindau

**Funding**

This review has been conducted thanks to the financial support of the “BioIntelligence” project and Region Lorraine.

**Acknowledgments**

We thank Pr. Marc Klein (Department of endocrinology, University Hospital of Nancy, FRANCE), for reviewing this paper.

## References

1. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000;407(6801):249–257. doi:10.1038/35025220.
2. Polverini PJ. The pathophysiology of angiogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1995;6(3):230–247.
3. Multikinase inhibitors in the treatment of thyroid cancer: specific role of lenvatinib. 2014;8:129–139. doi:10.2147/BTT.S39381.
4. Thanigaimani S, Kichenadasse G, Mangoni AA. The emerging role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in vascular homeostasis: lessons from recent trials with anti-VEGF drugs. *Curr Vasc Pharmacol*. 2011;9(3):358–380.
5. Koch S, Claesson-Welsh L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(7):a006502. doi:10.1101/cshperspect.a006502.
6. Turner HE, Harris AL, Melmed S, Wass JAH. Angiogenesis in endocrine tumors. *Endocrine Reviews*. 2003;24(5):600–632.
7. Viglietto G, Maglione D, Rambaldi M, Cerutti J, Romano A, Trapasso F, Fedele M, Ippolito P, Chiappetta G, Botti G. Upregulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) and downregulation of placenta growth factor (PlGF) associated with malignancy in human thyroid tumors and cell lines. *Oncogene*. 1995;11(8):1569–1579.
8. Fukumura D, Xavier R, Sugiura T, Chen Y, Park EC, Lu N, Selig M, Nielsen G, Taksir T, Jain RK, Seed B. Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell*. 1998;94(6):715–725.
9. Joory KD, Levick JR, Mortimer PS, Bates DO. Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) expression in normal human tissues. *Lymphat Res Biol*. 2006;4(2):73–82. doi:10.1089/lrb.2006.4.73.
10. Susarla R, Gonzalez A-M, Watkinson JC, Eggo MC. Expression of receptors for VEGFs on normal human thyroid follicular cells and their role in follicle formation. *J Cell Physiol*. 2012;227(5):1992–2002. doi:10.1002/jcp.22930.
11. Gerard A-C, Humblet K, Wilvers C, Poncin S, Derradji H, de Ville de Goyet C, Abou-El-Ardat K, Baatout S, Sonveaux P, Denef J-F, Colin IM. Iodine-deficiency-induced long lasting angiogenic reaction in thyroid cancers occurs via a vascular endothelial growth factor-hypoxia inducible factor-1-dependent, but not a reactive oxygen species-dependent, pathway. *Thyroid*. 2012;22(7):699–708. doi:10.1089/thy.2011.0387.

12. Gerard A-C, Poncin S, Caetano B, Sonveaux P, Audinot J-N, Feron O, Colin IM, Soncin F. Iodine deficiency induces a thyroid stimulating hormone-independent early phase of microvascular reshaping in the thyroid. *Am J Pathol.* 2008;172(3):748–760. doi:10.2353/ajpath.2008.070841.
13. Donckier JE, Michel L, Delos M, Havaux X, Van Beneden R. Interrelated overexpression of endothelial and inducible nitric oxide synthases, endothelin-1 and angiogenic factors in human papillary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2006;64(6):703–710. doi:10.1111/j.1365-2265.2006.02535.x.
14. Sato K, Yamazaki K, Shizume K, Kanaji Y, Obara T, Ohsumi K, Demura H, Yamaguchi S, Shibuya M. Stimulation by thyroid-stimulating hormone and Grave's immunoglobulin G of vascular endothelial growth factor mRNA expression in human thyroid follicles in vitro and flt mRNA expression in the rat thyroid in vivo. *J Clin Invest.* 1995;96(3):1295–1302. doi:10.1172/JCI118164.
15. Franzén A, Piek E, Westermark B, Dijke ten P, Heldin NE. Expression of transforming growth factor-beta1, activin A, and their receptors in thyroid follicle cells: negative regulation of thyrocyte growth and function. *Endocrinology.* 1999;140(9):4300–4310. doi:10.1210/endo.140.9.6961.
16. Zannini M, Avantaggiato V, Biffali E, Arnone MI, Sato K, Pischetola M, Taylor BA, Phillips SJ, Simeone A, Di Lauro R. TTF-2, a new forkhead protein, shows a temporal expression in the developing thyroid which is consistent with a role in controlling the onset of differentiation. *EMBO J.* 1997;16(11):3185–3197. doi:10.1093/emboj/16.11.3185.
17. Saadeh PB, Mehrara BJ, Steinbrech DS, Dudziak ME, Greenwald JA, Luchs JS, Spector JA, Ueno H, Gittes GK, Longaker MT. Transforming growth factor-beta1 modulates the expression of vascular endothelial growth factor by osteoblasts. *Am J Physiol.* 1999;277(4 Pt 1):C628–37.
18. Yamada E, Yamazaki K, Takano K, Obara T, Sato K. Iodide inhibits vascular endothelial growth factor-A expression in cultured human thyroid follicles: a microarray search for effects of thyrotropin and iodide on angiogenesis factors. *Thyroid.* 2006;16(6):545–554. doi:10.1089/thy.2006.16.545.
19. Ryuto M, Ono M, Izumi H, Yoshida S, Weich HA, Kohno K, Kuwano M. Induction of vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor alpha in human glioma cells. Possible roles of SP-1. *J Biol Chem.* 1996;271(45):28220–28228.

20. Dugrillon A. Iodolactones and iodoaldehydes--mediators of iodine in thyroid autoregulation. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 1996;104 Suppl 4:41–45. doi:10.1055/s-0029-1211700.
21. Baskol G, Atmaca H, Tanriverdi F, Baskol M, Kocer D, Bayram F. Oxidative stress and enzymatic antioxidant status in patients with hypothyroidism before and after treatment. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2007;115(8):522–526. doi:10.1055/s-2007-981457.
22. Arntzenius AB, Smit LJ, Schipper J, van der Heide D, Meinders AE. Inverse relation between iodine intake and thyroid blood flow: color Doppler flow imaging in euthyroid humans. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1991;73(5):1051–1055.
23. Sato K. Vascular endothelial growth factors and thyroid disorders. *Endocr J*. 2001;48(6):635–646.
24. Susarla R, Watkinson JC, Eggo MC. Regulation of human thyroid follicular cell function by inhibition of vascular endothelial growth factor receptor signalling. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;351(2):199–207. doi:10.1016/j.mce.2011.12.009.
25. Carmona-Cortés J, Rodríguez-Gómez I, Wangensteen R, Banegas I, García-Lora ÁM, Quesada A, Osuna A, Vargas F. Effect of thyroid hormone-nitric oxide interaction on tumor growth, angiogenesis, and aminopeptidase activity in mice. *Tumour Biol*. 2014;35(6):5519–5526. doi:10.1007/s13277-014-1726-2.
26. Schmid C, Brändle M, Zwimpfer C, Zapf J, Wiesli P. Effect of thyroxine replacement on creatinine, insulin-like growth factor 1, acid-labile subunit, and vascular endothelial growth factor. *Clin Chem*. 2004;50(1):228–231. doi:10.1373/clinchem.2003.021022.
27. Zhao X, Wang G, You J. [Measurement and correlation analysis of plasma VEGF level in the patients of hyperthyroidism]. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*. 2013;30(2):365–367.
28. Figueroa-Vega N, Sanz-Cameno P, Moreno-Otero R, Sánchez-Madrid F, González-Amaro R, Marazuela M. Serum levels of angiogenic molecules in autoimmune thyroid diseases and their correlation with laboratory and clinical features. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(4):1145–1153. doi:10.1210/jc.2008-1571.
29. Erdamar H, Demirci H, Yaman H, Erbil MK, Yakar T, Sancak B, Elbeg S, Biberoğlu G, Yetkin I. The effect of hypothyroidism, hyperthyroidism, and their treatment on parameters of oxidative stress and antioxidant status. *Clin Chem Lab Med*. 2008;46(7):1004–1010. doi:10.1515/CCLM.2008.183.
30. Sorvillo F, Mazziotti G, Carbone A, Piscopo M, Rotondi M, Cioffi M, Musto P, Biondi B, Iorio S, Amato G, Carella C. Recombinant human thyrotropin reduces serum

vascular endothelial growth factor levels in patients monitored for thyroid carcinoma even in the absence of thyroid tissue. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2003;88(10):4818–4822.

31. Klein M, Picard E, Vignaud JM, Marie B, Bresler L, Toussaint B, Weryha G, Duprez A, Leclère J. Vascular endothelial growth factor gene and protein: strong expression in thyroiditis and thyroid carcinoma. *J Endocrinol*. 1999;161(1):41–49.

32. Klubo-Gwiedzinska J, Junik R, Kopczynska E, Juraniec O, Kardymowicz H. The comparison of serum vascular endothelial growth factor levels between patients with metastatic and non-metastatic thyroid cancer, and patients with nontoxic multinodular goiter. *Eur J Endocrinol*. 2007;157(4):521–527. doi:10.1530/EJE-07-0252.

33. Hoffmann S, Hofbauer LC, Scharrenbach V, Wunderlich A, Hassan I, Lingelbach S, Zielke A. Thyrotropin (TSH)-induced production of vascular endothelial growth factor in thyroid cancer cells in vitro: evaluation of TSH signal transduction and of angiogenesis-stimulating growth factors. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004;89(12):6139–6145. doi:10.1210/jc.2004-1260.

34. Ma D, Zhu X, Zhao P, Zhao C, Li X, Zhu Y, Li L, Sun J, Peng J, Ji C, Hou M. Profile of Th17 cytokines (IL-17, TGF-beta, IL-6) and Th1 cytokine (IFN-gamma) in patients with immune thrombocytopenic purpura. *Ann Hematol*. 2008;87(11):899–904. doi:10.1007/s00277-008-0535-3.

35. Klein M, Brunaud L, Muresan M, Barbé F, Marie B, Sapin R, Vignaud J-M, Chatelin J, Angioï-Duprez K, Zarnegar R, Weryha G, Duprez A. Recombinant human thyrotropin stimulates thyroid angiogenesis in vivo. *Thyroid*. 2006;16(6):531–536. doi:10.1089/thy.2006.16.531.

36. Ramsden JD. Angiogenesis in the thyroid gland. *J Endocrinol*. 2000;166(3):475–480.

37. Vural P, Degirmencioglu S, Erden S, Gelincik A. The relationship between transforming growth factor-beta1, vascular endothelial growth factor, nitric oxide and Hashimoto's thyroiditis. *Int Immunopharmacol*. 2009;9(2):212–215. doi:10.1016/j.intimp.2008.11.003.

38. Wang JF, Milosveski V, Schramek C, Fong GH, Becks GP, Hill DJ. Presence and possible role of vascular endothelial growth factor in thyroid cell growth and function. *J Endocrinol*. 1998;157(1):5–12.

39. Ajjan RA, Watson PF, McIntosh RS, Weetman AP. Intrathyroidal cytokine gene expression in Hashimoto's thyroiditis. *Clin Exp Immunol*. 1996;105(3):523–528.



40. Mikoś H, Mikoś M, Obara-Moszyńska M, Niedziela M. The role of the immune system and cytokines involved in the pathogenesis of autoimmune thyroid disease (AITD). *Endokrynol Pol.* 2014;65(2):150–155. doi:10.5603/EP.2014.0021.
41. Effraimidis G, Wiersinga WM. Mechanisms in endocrinology: autoimmune thyroid disease: old and new players. *Eur J Endocrinol.* 2014;170(6):R241–52. doi:10.1530/EJE-14-0047.
42. Iitaka M, Miura S, Yamanaka K, Kawasaki S, Kitahama S, Kawakami Y, Kakinuma S, Oosuga I, Wada S, Katayama S. Increased serum vascular endothelial growth factor levels and intrathyroidal vascular area in patients with Graves“ disease and Hashimoto”s thyroiditis. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 1998;83(11):3908–3912.
43. Aoki CA, Borchers AT, Li M, Flavell RA, Bowlus CL, Ansari AA, Gershwin ME. Transforming growth factor beta (TGF-beta) and autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2005;4(7):450–459. doi:10.1016/j.autrev.2005.03.006.
44. Ramsden JD, Cocks HC, Shams M, Nijjar S, Watkinson JC, Sheppard MC, Ahmed A, Eggo MC. Tie-2 is expressed on thyroid follicular cells, is increased in goiter, and is regulated by thyrotropin through cyclic adenosine 3“,5-”monophosphate. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2001;86(6):2709–2716.
45. Akinci B, Comlekci A, Yener S, Bayraktar F, Demir T, Ozcan MA, Yuksel F, Yesil S. Hashimoto's thyroiditis, but not treatment of hypothyroidism, is associated with altered TGF-beta1 levels. *Arch Med Res.* 2008;39(4):397–401. doi:10.1016/j.arcmed.2007.12.001.
46. Toda S, Tokuda Y, Koike N, Yonemitsu N, Watanabe K, Koike K, Fujitani N, Hiromatsu Y, Sugihara H. Growth factor-expressing mast cells accumulate at the thyroid tissue-regenerative site of subacute thyroiditis. *Thyroid.* 2000;10(5):381–386.
47. Tanaka K, Kurebayashi J, Sonoo H, Otsuki T, Yamamoto Y, Ohkubo S, Yamamoto S, Shimozuma K. Expression of vascular endothelial growth factor family messenger RNA in diseased thyroid tissues. *Surg Today.* 2002;32(9):761–768. doi:10.1007/s005950200146.
48. Luidens MK, Mousa SA, Davis FB, Lin H-Y, Davis PJ. Thyroid hormone and angiogenesis. *Vascular Pharmacology.* 2010;52(3-4):142–145. doi:10.1016/j.vph.2009.10.007.
49. Szekanecz Z, Koch AE. Mechanisms of Disease: angiogenesis in inflammatory diseases. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2007;3(11):635–643. doi:10.1038/ncprheum0647.
50. Viglietto G, Romano A, Manzo G, Chiappetta G, Paoletti I, Califano D, Galati MG, Mauriello V, Bruni P, Lago CT, Fusco A, Persico MG. Upregulation of the angiogenic factors PlGF, VEGF and their receptors (Flt-1, Flk-1/KDR) by TSH in cultured thyrocytes and in the

thyroid gland of thiouracil-fed rats suggest a TSH-dependent paracrine mechanism for goiter hypervascularization. *Oncogene*. 1997;15(22):2687–2698. doi:10.1038/sj.onc.1201456.

51. Nagura S, Katoh R, Miyagi E, Shibuya M, Kawaoi A. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor-1 (Flt-1) in Graves disease possibly correlated with increased vascular density. *Hum Pathol*. 2001;32(1):10–17. doi:10.1053/hupa.2001.21139.

52. Nagasaki T, Inaba M, Kumeda Y, Fujiwara-Ueda M, Hiura Y, Nishizawa Y. Significance of thyroid blood flow as a predictor of methimazole sensitivity in untreated hyperthyroid patients with Graves' disease. *Biomed Pharmacother*. 2007;61(8):472–476. doi:10.1016/j.biopha.2007.02.002.

53. Matos K, Manso PG, Marback E, Furlanetto R, Alberti GN, Nose V. Protein expression of VEGF, IGF-1 and FGF in retroocular connective tissues and clinical correlation in Graves' ophthalmopathy. *Arq Bras Oftalmol*. 2008;71(4):486–492.

54. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem*. 1992;267(16):10931–10934.

55. Vural P, Baki M, Dođru-Abbasođlu S, Ozderya A, Karadađ B, Uysal M. Vascular endothelial growth factor polymorphisms increase the risk of developing Graves' disease. *Int Immunopharmacol*. 2012;14(2):133–137. doi:10.1016/j.intimp.2012.06.018.

56. Colin IM, Nava E, Toussaint D, Maiter DM, vanDenhove MF, Lüscher TF, Ketelslegers JM, Denef JF, Jameson JL. Expression of nitric oxide synthase isoforms in the thyroid gland: evidence for a role of nitric oxide in vascular control during goiter formation. *Endocrinology*. 1995;136(12):5283–5290.

57. Pedram A, Razandi M, Hu RM, Levin ER. Vasoactive peptides modulate vascular endothelial cell growth factor production and endothelial cell proliferation and invasion. *J Biol Chem*. 1997;272(27):17097–17103.

58. Liu G, Zhang W, Jiang P, Li X, Liu C, Chai C. Role of nitric oxide and vascular endothelial growth factor in fluoride-induced goitrogenesis in rats. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2012;34(2):209–217. doi:10.1016/j.etap.2012.04.003.

59. Malkomes P, Oppermann E, Bechstein WO, Holzer K. Vascular endothelial growth factor--marker for proliferation in thyroid diseases? *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2013;121(1):6–13. doi:10.1055/s-0032-1327634.

60. Jebreel A, England J, Bedford K, Murphy J, Karsai L, Atkin S. Vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors expression and microvascular density in benign and malignant thyroid diseases. *Int J Exp Pathol*. 2007;88(4):271–277. doi:10.1111/j.1365-2613.2007.00533.x.

61. Sato K, Miyakawa M, Onoda N, Demura H, Yamashita T, Miura M, Kasajima T, Yamazaki K, Obara T. Increased concentration of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in cyst fluid of enlarging and recurrent thyroid nodules. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1997;82(6):1968–1973.
62. Elisei R, Schlumberger M, Driedger A, Reiners C, Kloos RT, Sherman SI, Haugen B, Corone C, Molinaro E, Grasso L, Leboulleux S, Rachinsky I, Luster M, Lassmann M, Busaidy NL, Wahl RL, Pacini F, Cho SY, Magner J, Pinchera A, Ladenson PW. Follow-up of low-risk differentiated thyroid cancer patients who underwent radioiodine ablation of postsurgical thyroid remnants after either recombinant human thyrotropin or thyroid hormone withdrawal. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(11):4171–4179. doi:10.1210/jc.2009-0869.
63. Durante C. Long-Term Outcome of 444 Patients with Distant Metastases from Papillary and Follicular Thyroid Carcinoma: Benefits and Limits of Radioiodine Therapy. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2006;91(8):2892–2899. doi:10.1210/jc.2005-2838.
64. Almog N. Molecular mechanisms underlying tumor dormancy. *Cancer Letters*. 2010;294(2):139–146. doi:10.1016/j.canlet.2010.03.004.
65. Ishiwata T, Iino Y, Takei H, Oyama T, Morishita Y. Tumor angiogenesis as an independent prognostic indicator in human papillary thyroid carcinoma. *Oncol Rep*. 1998;5(6):1343–1348.
66. Fontanini G, Vignati S, Pacini F, Pollina L, Basolo F. Microvessel count: an indicator of poor outcome in medullary thyroid carcinoma but not in other types of thyroid carcinoma. *Mod Pathol*. 1996;9(6):636–641.
67. Reis-Filho JS, Schmitt FC. Lymphangiogenesis in tumors: what do we know? *Microsc Res Tech*. 2003;60(2):171–180. doi:10.1002/jemt.10255.
68. Afonso J, Santos LL, Amaro T, Lobo F, Longatto-Filho A. The aggressiveness of urothelial carcinoma depends to a large extent on lymphovascular invasion--the prognostic contribution of related molecular markers. *Histopathology*. 2009;55(5):514–524. doi:10.1111/j.1365-2559.2009.03425.x.
69. Yamazaki Y, Morita T. Molecular and functional diversity of vascular endothelial growth factors. *Mol Divers*. 2006;10(4):515–527. doi:10.1007/s11030-006-9027-3.
70. la Torre de NG, Buley I, Wass JAH, Turner HE. Angiogenesis and lymphangiogenesis in thyroid proliferative lesions: relationship to type and tumour behaviour. *Endocrine Related Cancer*. 2006;13(3):931–944. doi:10.1677/erc.1.01210.

71. Giorgadze TA, Baloch ZW, Pasha T, Zhang PJ, Livolsi VA. Lymphatic and blood vessel density in the follicular patterned lesions of thyroid. *Mod Pathol*. 2005;18(11):1424–1431. doi:10.1038/modpathol.3800452.
72. Garcia EA, Simões K, Wakamatsu A, Ressio RA, Alves VAF, Longatto-Filho A, Camargo RS. Lymphatic vessel density and VEGF-C expression are significantly different among benign and malignant thyroid lesions. *Endocr Pathol*. 2010;21(2):101–107. doi:10.1007/s12022-010-9116-9.
73. Dhar DK, Kubota H, Kotoh T, Tabara H, Watanabe R, Tachibana M, Kohno H, Nagasue N. Tumor vascularity predicts recurrence in differentiated thyroid carcinoma. *Am J Surg*. 1998;176(5):442–447.
74. Akslen LA, Livolsi VA. Increased angiogenesis in papillary thyroid carcinoma but lack of prognostic importance. *Hum Pathol*. 2000;31(4):439–442. doi:10.1053/1-ip.2000.6548.
75. Scoazec J-Y. Angiogenesis in Neuroendocrine Tumors: Therapeutic Applications. *Neuroendocrinology*. 2012. doi:10.1159/000338371.
76. Durante C, Tallini G, Puxeddu E, Sponziello M, Moretti S, Ligorio C, Cavaliere A, Rhoden KJ, Verrienti A, Maranghi M, Giacomelli L, Russo D, Filetti S. BRAF(V600E) mutation and expression of proangiogenic molecular markers in papillary thyroid carcinomas. *Eur J Endocrinol*. 2011;165(3):455–463. doi:10.1530/EJE-11-0283.
77. Kilicarslan AB, Ogun M, Arici C, Pestereli HE, Cakir M, Karpuzoglu G. Clinical importance of vascular endothelial growth factor (VEGF) for papillary thyroid carcinomas. *APMIS*. 2003;111(3):439–443.
78. Giatromanolaki A, Lyberakidis G, Lyratzopoulos N, Koukourakis MI, Sivridis E, Manolas C. Angiogenesis and angiogenic factor expression in thyroid cancer. *J BUON*. 2010;15(2):357–361.
79. de Araujo-Filho VJF, Alves VAF, de Castro IV, Lourenço SV, Cernea CR, Brandão LG, Ferraz AR. Vascular endothelial growth factor expression in invasive papillary thyroid carcinoma. *Thyroid*. 2009;19(11):1233–1237. doi:10.1089/thy.2008.0179.
80. Vieira JM. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in thyroid carcinomas of follicular origin: a potential autocrine loop. *Eur J Endocrinol*. 2005;153(5):701–709. doi:10.1530/eje.1.02009.
81. Luttun A, Tjwa M, Carmeliet P. Placental growth factor (PlGF) and its receptor Flt-1 (VEGFR-1): novel therapeutic targets for angiogenic disorders. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;979:80–93.

82. Capp C, Wajner SM, Siqueira DR, Brasil BA, Meurer L, Maia AL. Increased expression of vascular endothelial growth factor and its receptors, VEGFR-1 and VEGFR-2, in medullary thyroid carcinoma. *Thyroid*. 2010;20(8):863–871. doi:10.1089/thy.2009.0417.
83. Cheong H, Kang H, Kim HK, Bae JY, Song DE, Cho MS, Sung SH, Han WS, Koo H. Microvessel and Lymphatic Vessel Density and VEGFR-3 Expression of Papillary Thyroid Carcinoma with Comparative Analysis of Clinicopathological Characteristics. *Korean J Pathol*. 2010;44(3):243. doi:10.4132/KoreanJPathol.2010.44.3.243.
84. Liang Q-C, Wei Q-Y, Fan S-Q. [Expression of VEGF-C and angiogenesis, and lymphangiogenesis in papillary thyroid carcinoma]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2006;31(3):414–6– 419.
85. Yu X-M, Lo C-Y, Lam AK-Y, Lang BH-H, Leung P, Luk JM. The potential clinical relevance of serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-C in recurrent papillary thyroid carcinoma. *Surgery*. 2008;144(6):934–40– discussion 940–1. doi:10.1016/j.surg.2008.07.027.
86. Salajegheh A, Smith RA, Kasem K, Gopalan V, Nassiri MR, William R, Lam AKY. Single nucleotide polymorphisms and mRNA expression of VEGF-A in papillary thyroid carcinoma: potential markers for aggressive phenotypes. *Eur J Surg Oncol*. 2011;37(1):93–99. doi:10.1016/j.ejso.2010.10.010.
87. Li S, Peck-Radosavljevic M, Kienast O, Preitfellner J, Havlik E, Schima W, Traub-Weidinger T, Graf S, Beheshti M, Schmid M, Angelberger P, Dudczak R. Iodine-123-vascular endothelial growth factor-165 (123I-VEGF165). Biodistribution, safety and radiation dosimetry in patients with pancreatic carcinoma. *Q J Nucl Med Mol Imaging*. 2004;48(3):198–206.
88. Ye C, Feng C, Wang S, Wang KZQ, Huang N, Liu X, Lin Y, Li M. sFlt-1 gene therapy of follicular thyroid carcinoma. *Endocrinology*. 2004;145(2):817–822. doi:10.1210/en.2003-1106.
89. Fellmer PT, Sato K, Tanaka R, Okamoto T, Kato Y, Kobayashi M, Shibuya M, Obara T. Vascular endothelial growth factor-C gene expression in papillary and follicular thyroid carcinomas. *Surgery*. 1999;126(6):1056–61– discussion 1061–2.
90. Jiang H-G, Gao M, Tang W-P, Li F-H, Cai Q-Z. [Expression and significance of VEGF, VEGF-C, and VEGF-D in papillary thyroid carcinoma]. *Ai Zheng*. 2005;24(9):1136–1139.

91. Siironen P, Louhimo J, Nordling S, Ristimäki A, Mäenpää H, Haapiainen R, Haglund C. Prognostic factors in papillary thyroid cancer: an evaluation of 601 consecutive patients. *Tumour Biol.* 2005;26(2):57–64. doi:10.1159/000085586.
92. Yasuoka H, Nakamura Y, Zuo H, Tang W, Takamura Y, Miyauchi A, Nakamura M, Mori I, Kakudo K. VEGF-D expression and lymph vessels play an important role for lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma. *Mod Pathol.* 2005;18(8):1127–1133. doi:10.1038/modpathol.3800402.
93. Chang D-F, Xu Z-Q, Sun B. Relationship between VEGF protein expression and lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma among Asians: a meta-analysis. *Tumour Biol.* 2014;35(6):5511–5518. doi:10.1007/s13277-014-1725-3.
94. Li J, Teng L, Jiang H. Relationship between preoperative serum TSH levels and expression of VEGF in papillary thyroid carcinoma. *Asia Pac J Clin Oncol.* 2014;10(2):149–152. doi:10.1111/ajco.12075.
95. Karaca Z, Tanriverdi F, Unluhizarci K, Ozturk F, Gokahmetoglu S, Elbuken G, Cakir I, Bayram F, Kelestimur F. VEGFR1 expression is related to lymph node metastasis and serum VEGF may be a marker of progression in the follow-up of patients with differentiated thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol.* 2011;164(2):277–284. doi:10.1530/EJE-10-0967.
96. Gasparini G. Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer. *Oncologist.* 2000;5 Suppl 1:37–44.
97. Nersita R, Matrone A, Klain M, Scavuzzo F, Vitolo G, Abbondanza C, Carlino MV, Giacco V, Amato G, Carella C. Decreased serum vascular endothelial growth factor-D levels in metastatic patients with differentiated thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2012;76(1):142–146. doi:10.1111/j.1365-2265.2011.04183.x.
98. Lai C-W, Chen K-Y, Hung C-S, Kuo S-W, Chang Y-J, Lin M-T, Chang K-C, Wu M-H. Serum vascular endothelial growth factor-D levels correlate with cervical lymph node metastases in papillary thyroid carcinoma. *Growth Factors.* 2011;29(2-3):57–62. doi:10.3109/08977194.2011.557373.
99. Bass MB, Sherman SI, Schlumberger MJ, Schlumberger MJ, Davis MT, Kivman L, Khoo H-M, Notari KH, Peach M, Hei Y-J, Patterson SD. Biomarkers as predictors of response to treatment with motesanib in patients with progressive advanced thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(11):5018–5027. doi:10.1210/jc.2010-0947.
100. Stacker SA, Achen MG, Jussila L, Baldwin ME, Alitalo K. Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(8):573–583. doi:10.1038/nrc863.

101. Yasuoka H, Kodama R, Hirokawa M, Takamura Y, Miyauchi A, Inagaki M, Sanke T, Nakamura Y. Neuropilin-2 Expression in Papillary Thyroid Carcinoma: Correlation with VEGF-D Expression, Lymph Node Metastasis, and VEGF-D-Induced Aggressive Cancer Cell Phenotype. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2011;96(11):E1857–E1861. doi:10.1210/jc.2011-1180.
102. Hsiao PJ, Lu MY, Chiang FY, Shin SJ, Tai YD, Juo SHH. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms in thyroid cancer. *Journal of Endocrinology*. 2007;195(2):265–270. doi:10.1677/JOE-07-0395.
103. Kranenburg O, Gebbink MFBG, Voest EE. Stimulation of angiogenesis by Ras proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1654(1):23–37. doi:10.1016/j.bbcan.2003.09.004.
104. Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocrine Related Cancer*. 2005;12(2):245–262. doi:10.1677/erc.1.0978.
105. Guerra A, Fugazzola L, Marotta V, Cirillo M, Rossi S, Cirello V, Forno I, Moccia T, Budillon A, Vitale M. A High Percentage of BRAFV600E Alleles in Papillary Thyroid Carcinoma Predicts a Poorer Outcome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(7):2333–2340. doi:10.1210/jc.2011-3106.
106. Lee J-H, Lee E-S, Kim Y-S. Clinicopathologic significance of BRAF V600E mutation in papillary carcinomas of the thyroid: a meta-analysis. *Cancer*. 2007;110(1):38–46. doi:10.1002/cncr.22754.
107. Ito Y, Yoshida H, Maruo R, Morita S, Takano T, Hirokawa M, Yabuta T, Fukushima M, Inoue H, Tomoda C, Kihara M, Uruno T, Higashiyama T, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K, Matsuzuka F, Miyauchi A. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma in a Japanese population: its lack of correlation with high-risk clinicopathological features and disease-free survival of patients. *Endocr J*. 2009;56(1):89–97.
108. Zerilli M, Zito G, Martorana A, Pitrone M, Cabibi D, Cappello F, Giordano C, Rodolico V. BRAF(V600E) mutation influences hypoxia-inducible factor-1alpha expression levels in papillary thyroid cancer. *Mod Pathol*. 2010;23(8):1052–1060. doi:10.1038/modpathol.2010.86.
109. Chan Y, Fish JE, D'Abreo C, Lin S, Robb GB, Teichert A-M, Karantzoulis-Fegaras F, Keightley A, Steer BM, Marsden PA. The cell-specific expression of endothelial nitric-oxide synthase: a role for DNA methylation. *J Biol Chem*. 2004;279(33):35087–35100. doi:10.1074/jbc.M405063200.
110. Yan MS-C, Matouk CC, Marsden PA. Epigenetics of the vascular endothelium. *J Appl Physiol*. 2010;109(3):916–926. doi:10.1152/jappphysiol.00131.2010.

111. Herman JG, Latif F, Weng Y, Lerman MI, Zbar B, Liu S, Samid D, Duan DS, Gnarr JR, Linehan WM. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91(21):9700–9704.
112. Kim J, Hwang J, Jeong H, Song H-J, Shin J, Hur G, Park YW, Lee SH, Kim J. Promoter methylation status of VEGF receptor genes: a possible epigenetic biomarker to anticipate the efficacy of intracellular-acting VEGF-targeted drugs in cancer cells. *Epigenetics*. 2012;7(2):191–200. doi:10.4161/epi.7.2.18973.
113. Kim JY, Hwang JH, Zhou W, Shin J, Noh SM, Song IS, Kim JY, Lee SH, Kim J. The expression of VEGF receptor genes is concurrently influenced by epigenetic gene silencing of the genes and VEGF activation. *Epigenetics*. 2009;4(5):313–321.
114. Quentmeier H, Eberth S, Romani J, Weich HA, Zaborski M, Drexler HG. DNA methylation regulates expression of VEGF-R2 (KDR) and VEGF-R3 (FLT4). *BMC Cancer*. 2012;12:19. doi:10.1186/1471-2407-12-19.
115. Arcondéguy T, Lacazette E, Millevoi S, Prats H, Touriol C. VEGF-A mRNA processing, stability and translation: a paradigm for intricate regulation of gene expression at the post-transcriptional level. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(17):7997–8010. doi:10.1093/nar/gkt539.
116. Kitano M, Rahbari R, Patterson EE, Xiong Y, Prasad NB, Wang Y, Zeiger MA, Kebebew E. Expression profiling of difficult-to-diagnose thyroid histologic subtypes shows distinct expression profiles and identify candidate diagnostic microRNAs. *Annals of surgical oncology*. 2011;18(12):3443–3452. doi:10.1245/s10434-011-1766-4.
117. Boufraquech M, Zhang L, Jain M, Patel D, Ellis R, Xiong Y, He M, Nilubol N, Merino MJ, Kebebew E. miR-145 suppresses thyroid cancer growth and metastasis and targets AKT3. *Endocrine Related Cancer*. 2014;21(4):517–531. doi:10.1530/ERC-14-0077.



## Tables

Table 1: The VEGF family

Isoforms of VEGF	VEGF-A	VEGF-B	VEGF-C	VEGF-D	VEGF-E	PIGF	sv-VEGF
Specie	human	human	human	human	Parapox virus	Orf	human snake venom
Locus	6p21.3	11q13	4q34	Xp22.31	-	14q24	-
Subtypes	12	2	1	1	5	4	2
Receptor	VEGFR1	VEGFR1	VEGFR2	VEGFR2	VEGFR2	VEGFR1	VEGFR1
	sVEGFR1	sVEGFR1	VEGFR3	VEGFR3	NRP-1	sVEGFR1	VEGFR2
	VEGFR2	VEGFR2	NRP-2	NRP-2	NRP-2	NRP-1	
	NRP-1	NRP-1				NRP-2	
	NRP-2	NRP-2					
Isoforms of VEGFR	VEGFR1	VEGFR2	VEGFR3	sVEGFR1	NRP-1	NRP-2	
Alternative name	Flt-1	KDR, Flk-1	Flt-4	sFlt	-	-	
Ligand	VEGF-A	VEGF-A	VEGF-C	VEGF-A	VEGF-A	VEGF-A	
	VEGF-B	VEGF-B	VEGF-D	VEGF-B	VEGF-B	VEGF-B	
	PIGF	VEGF-C		PIGF	VEGF-C	VEGF-C	
	sv-VEGF	VEGF-D			VEGF-E	VEGF-E	
		VEGF-E			PIGF	PIGF	
		sv-VEGF					

Effect	P, S, M	P, S, M	L	decay	co-receptor	co-receptor
--------	---------	---------	---	-------	-------------	-------------

---

P: proliferation, S: survival, M: migration, L: lymphangiogenesis

## Figure legends

### Figure 1: VEGF and iodide deficiency

Figure 1: Iodide deficiency promotes endothelial proliferation and thyroid blood flow in a first TSH-independent phase and later a second TSH-dependent phase.

HIF1= hypoxia-inducible factor, NIS= Na/I symporteur, TPO= thyroperoxidase, TG= thyroglobulin, TSHR= thyrotropin receptor, TGF= transforming growth factor.

### Figure 2: VEGF and iodide excess

Figure 2: Iodide excess blocks endothelial proliferation, blood flow, growth and hormone synthesis through multiple pathways.

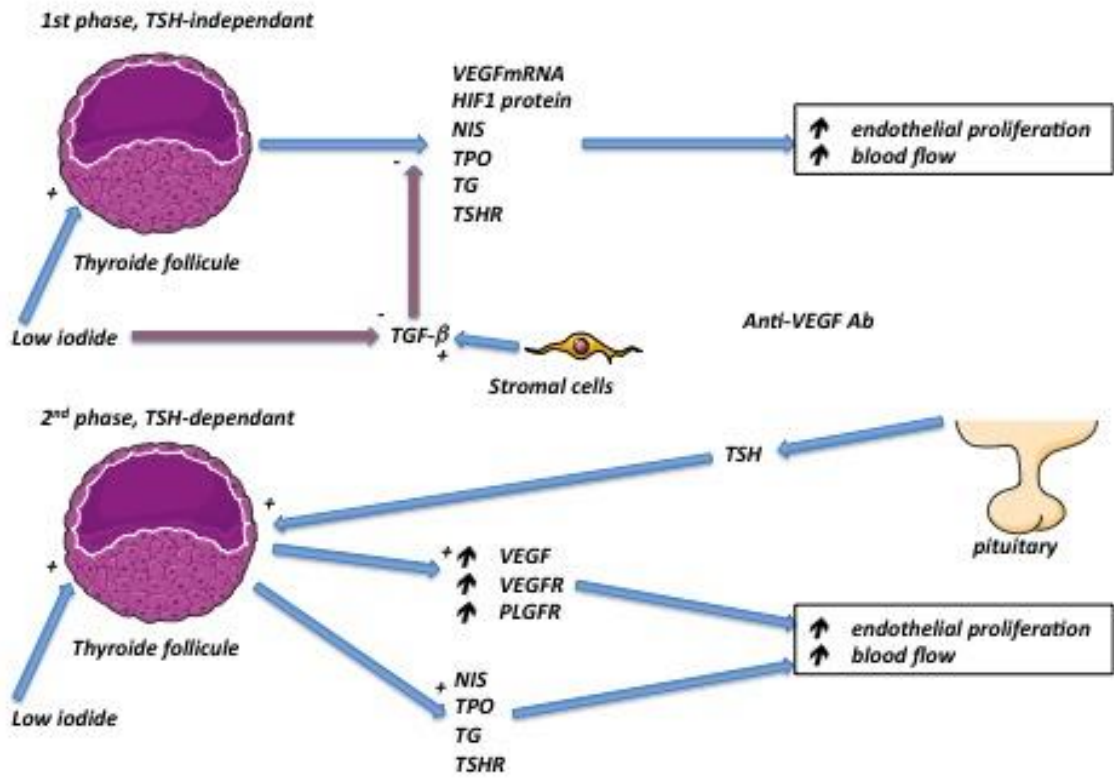
EGF= epidermal growth factor, FGF= fibroblast growth factor, NIS= Na/I symporter, TPO= thyroperoxidase, TG= thyroglobulin, TSHR= thyrotropin receptor, TGF= transforming growth factor .

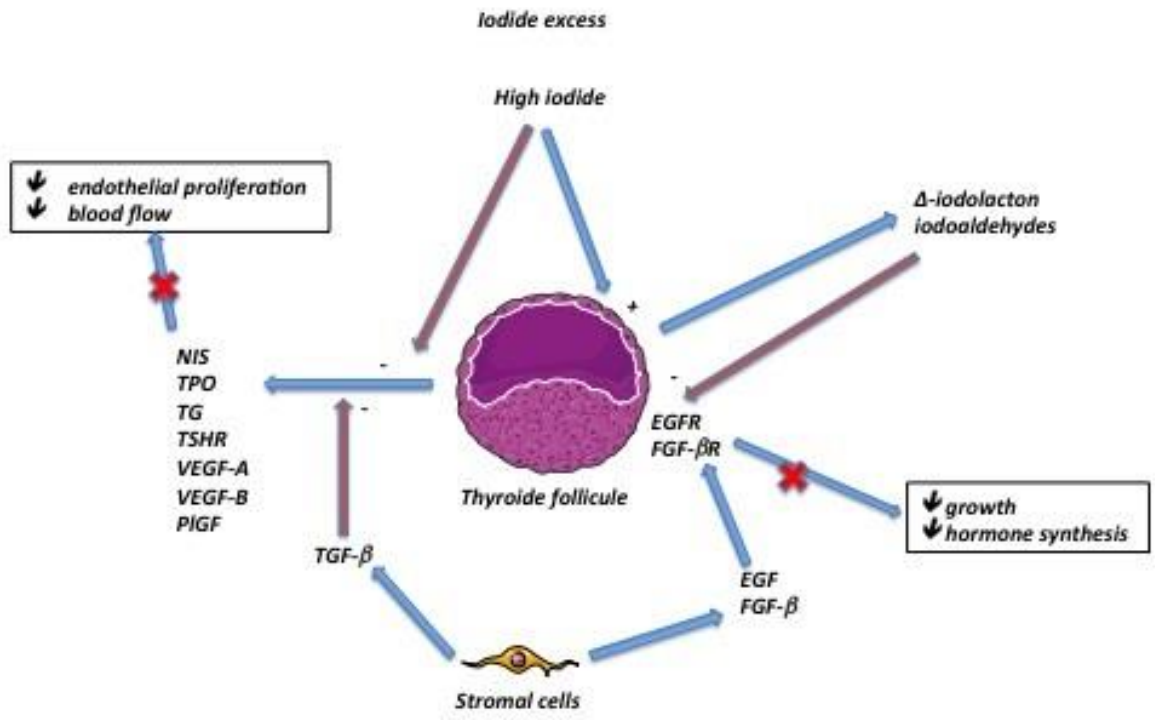
### Figure 3: Factor influencing thyroid-induced VEGF effect

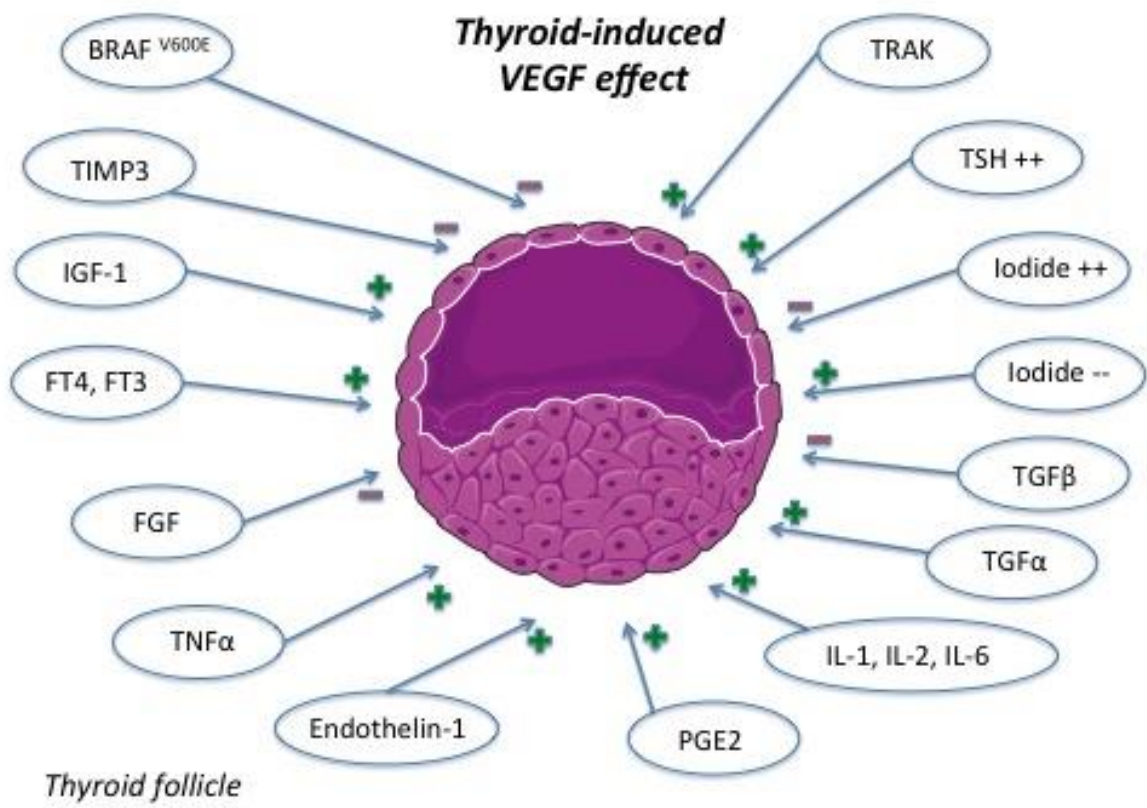
Figure 3: Thyroid-induced VEGF effect is influenced by hormonal, inflammatory, environmental and genetic factors.

TIMP3= metalloproteinase inhibitor 3 , IGF1= insulin growth factor-1, FGF= fibroblast growth factor, TNF= tumor necrosis factor, PGE2= progstaglandine 2, TGF= transforming growth factor, IL-1= interleukine 1

Iodide deficiency







## Résumé

Le facteur vasculaire de la croissance endothélial A (VEGF-A) joue un rôle essentiel dans un grand nombre de processus physiologiques et pathologiques incluant les maladies cardiovasculaires, inflammatoires et cancéreuses. Ainsi, au cours de cette thèse, nous avons développé une *approche intégrée et de génomique fonctionnelle* sur le rôle du VEGF-A de manière à mieux rendre compte de la diversité des processus dans lesquels il est impliqué en ajoutant dans le panel des investigations des phénotypes autour des hormones thyroïdiennes, acteurs essentiels de la physiopathologie humaine.

L'*objectif final* de cette thèse était d'identifier des polymorphismes impliqués dans la variation plasmatique du VEGF-A et des produits de son expression protéique et génique utiles en médecine personnalisée. Pour ce faire des études sur des phénotypes intermédiaires comme les molécules d'adhésion et d'inflammation, le syndrome métabolique et les lipides communs aux pathologies précédemment citées ont été réalisées dans la cohorte STANISLAS, constituée de sujets sains, ainsi que dans d'autres populations de réplication de l'équipe. Des études dans une population pathologique, visant à explorer les liens avec les hormones thyroïdiennes et les thyroïdites ont été réalisées avec une population Tunisienne, 'cas-témoins', les patients étant traités pendant 6 mois pour une maladie de Graves ou de Hashimoto.

Nos *résultats principaux* sont au final les suivants :

1. Association de l'isoforme *VEGF-A<sub>145</sub>* avec les ARNm d'*ICAM-1*, de *sélectine L* et de *TNF- $\alpha$* .
2. Association entre les taux plasmatiques de VEGF-A et ceux d'*ICAM-1* et de *sélectine E*.
3. Interactions épistatiques entre les variants du *VEGF-A* pour les taux de *sélectine E*, de *TNF- $\alpha$* , d'*ICAM-1* et d'*IL-6*.
4. Association significative entre le rs4416670 et les niveaux de l'ARNm de la *sélectine-L*.
5. Association significative entre le rs10738760 et le risque de syndrome métabolique.
6. Association entre rs6921438 et HDL et LDL.
7. Interaction entre rs4416670 et hypertension pour la variation d'apolipoprotéine E.
8. Corrélation positive entre taux plasmatiques de VEGF-A et de FT4 chez les sujets contrôles.
9. Association négative entre FT4 plasmatique et VEGF-A<sub>145</sub> dans la population totale des patients avec thyroïdite et chez les contrôles.
10. Niveaux de VEGF-A<sub>165</sub> plus élevés chez les patients traités pour une maladie de Graves par rapport aux sujets contrôles.
11. Niveaux de VEGF-A<sub>165b</sub> plus élevés chez les patients traités pour une maladie de Hashimoto par rapport à ceux traités pour une maladie de Graves.
12. Niveaux de VEGF-A<sub>165b</sub> plus élevés chez tous les patients en hypothyroïdie après 6 mois de traitement par rapport à ceux en euthyroïdie.
13. Niveaux de VEGF-A<sub>189</sub> plus faibles chez tous les patients avec thyroïdite en comparaison avec les sujets contrôles.
14. Association entre les niveaux de VEGF-A<sub>145</sub> et le statut thyroïdien uniquement chez les patients traités pour une maladie de Hashimoto.
15. Association entre la positivité des anti-TPO et les taux de VEGF-A<sub>165</sub> dans la population totale des patients avec thyroïdite et chez les contrôles.
16. Association entre l'allèle A du rs10738760 et un sur-risque de maladie de Graves
17. Association du rs692148 (allèle A) avec un sur-risque de maladie de Graves.
18. Association de l'allèle T du rs4416770 avec un risque accru d'hyperthyroïdie indépendamment du diagnostic initial et du traitement des patients.
19. Association de l'allèle A du rs10738760 avec des taux circulants de FT3 dans la population totale des patients avec thyroïdite et contrôles.

Cette thèse montre à travers ces nombreux résultats de médecine stratifiée l'implication centrale de la génomique du VEGF-A dans la régulation de processus physiologiques et pathologiques. La mise en évidence de son rôle dans la régulation des hormones thyroïdiennes pourrait qualifier le VEGF comme un nouveau dénominateur commun des maladies cardiovasculaires, inflammatoires et cancéreuses, à évaluer cliniquement.

## Summary

The vascular endothelial growth factor (VEGF-A) plays a key role in a large variety of physiological and pathological processes, including cardiovascular and inflammatory diseases and cancer. Consequently, during this thesis, we have developed a *functional genomics and integrative approach* of the VEGF-A roles in order to better describe the diversity of the processes in which it is implicated by adding in the investigation panel phenotypes the thyroid hormones, which are essential in the human physiopathology.

The *final objective* of this work was to identify the VEGF-A plasma variability linked polymorphisms and the VEGF-A expression products useful for personalized medicine. Therefore, studies on common among diseases intermediate phenotypes such as adhesion, and inflammation molecules, metabolic syndrome and lipids have been conducted on the STANISLAS cohort (healthy volunteers), as well as on other replication-directed populations of the team. Studies in a pathological population aiming to investigate links with thyroid hormones and thyroiditis have been conducted in a Tunisian "case-control" population with cases treated for thyroiditis during 6 months.

Here are our *main results*:

1. Association between *VEGF-A<sub>145</sub>* and *ICAM-1*, *L-selectin* and *TNF- $\alpha$*  mRNA levels.
2. Association between plasma levels of VEGF-A and ICAM-1 and E-selectin.
3. Epistasis interactions between *VEGF-A* variants for E-selectin, *TNF- $\alpha$* , ICAM-1 and IL-6 plasma levels.
4. Association between rs4416670 and *L-selectin* mRNA levels.
5. Association between the rs10738760 and the risk for metabolic syndrome.
6. Association between rs6921438 and HDL and LDL plasma levels.
7. Interaction between rs4416670 and hypertension for plasma variation of apolipoprotein E.
8. Positive correlation between plasma levels of VEGF-A and FT4 in Tunisian controls.
9. Negative association between plasma FT4 levels and VEGF-A<sub>145</sub> levels in the entire Tunisian population (patients and controls).
10. Increase of VEGF-A<sub>165</sub> levels in Grave's patients in comparison with controls.
11. Increase of VEGF-A<sub>165b</sub> levels in Hashimoto patients in comparison with Graves patients.
12. Increase of VEGF-A<sub>165b</sub> levels in hypothyroid patients in comparison with hyperthyroid patients after 6 months of treatment.
13. Decrease of VEGF-A<sub>189</sub> levels in all after 6 months of treatment thyroiditis patients in comparison with controls.
14. Association between VEGF-A<sub>145</sub> and thyroid status, only in Hashimoto patients.
15. Association between anti-TPO antibodies positivity and VEGF-A<sub>165</sub> in the entire Tunisian population (patients and controls).
16. Association between the A allele of rs10738760 and an increased risk of Graves' disease.
17. Association of the A allele of rs692148 with an increased risk for Grave's disease.
18. Association of the T allele of rs4416770 with a higher risk of hyperthyroidism regardless of the initial diagnosis and treatment of patients.
19. Association of A allele of rs10738760 with higher FT3 plasma levels in the entire Tunisian population (patients and controls).

This thesis shows, through an important number of results of stratified medicine, the central implication of VEGF-A genomics in the regulation of physiological and pathological processes. The identification of its role in the regulation of thyroid hormones could highlight the role of VEGF-A as a new common denominator of cardiovascular, inflammatory and oncological diseases that has to be clinically validated.