

Université de Montréal

Étude rétrospective évaluant le VEGF comme biomarqueur d'athérosclérose mesurée par
coronarographie quantitative et ultrason intra-vasculaire.

Par Rémi Kouz MD,CM

Sciences biomédicales, Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine en vue de l'obtention du grade de MSc en
Sciences Biomédicales option générale

Décembre 2013

Copyright, Rémi Kouz, 2013

Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Étude rétrospective évaluant le VEGF comme biomarqueur d'athérosclérose mesurée par coronarographie quantitative et ultrason intra-vasculaire.

Présenté par : Rémi Kouz

À été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Gaetan Mayer, PhD, président rapporteur

Éric Rhéaume, PhD, co-directeur de recherche

Claude Poirier, MD MSc, membre du jury

Résumé en français (245 mots):

Introduction : Puisque le VEGF promeut l'inflammation et la néovascularisation des plaques athérosclérotiques, il pourrait contribuer à l'athérogénèse. Cependant, les données cliniques tentant de lier le VEGF à la maladie cardiaque athérosclérotique (MCAS) sont controversées. Nous avons investigué l'association entre les niveaux de VEGF et la sévérité de la MCAS.

Méthode : Nous avons effectué une étude rétrospective transversale : 56 patients présentant une MCAS stable et 112 patients avec un syndrome coronarien aigu (SCA) ont été étudiés. Nous avons investigué la relation entre la charge athérosclérotique et les niveaux sériques de VEGF en utilisant la coronarographie par analyse quantitative (QCA) et avons évalué la morphologie des plaques athérosclérotiques en utilisant l'imagerie intravasculaire ultrasonore (IVUS).

Résultats : Les niveaux de VEGF étaient plus bas chez les patients avec SCA que chez ceux avec MCAS stable. On observe une corrélation positive entre les niveaux de VEGF et le fardeau de la MCAS stable mesurée par le QCA *Cumulative Coronary Stenosis Score* - CCSS (Pearson $r = 0.423$ et $p = 0.001$). En analyse multivariée, les niveaux sériques de VEGF demeuraient prédicteurs du CCSS ($p = 0.003$) des patients avec une MCAS stable. Nous avons observé une corrélation positive entre les niveaux de VEGF et le volume de plaque (Spearman $r = 0.381$, $p = 0.035$) ainsi que le pourcentage de volume d'athérome (Spearman $r = 0.466$, $p = 0.008$) mesurés par IVUS chez les patients avec MCAS stable.

Conclusions : Notre étude suggère un usage potentiel des niveaux sérique de VEGF comme biomarqueur de MCAS.

Mots clés : maladie cardiaque athérosclérotique, athérosclérose, VEGF (*vascular endothelial growth factor*).

Résumé en anglais (244 mots):

Background: The role of vascular endothelial growth factor A (VEGF) in atherogenesis remains controversial. By promoting inflammation and neovascularization of the atherosclerotic plaque, VEGF is hypothesized to partake in the development of atherosclerotic plaques. However, clinical data linking VEGF to coronary atherosclerosis have been controversial. We investigated the association between vascular endothelial growth factor (VEGF) serum levels and coronary artery disease (CAD).

Methods: We performed a retrospective cross-sectional study on data collected from 56 patients that presented with stable CAD and 112 that presented with an acute coronary syndrome (ACS). We investigated the relationship between coronary atherosclerosis burden and serum VEGF concentration using Quantitative Coronary Angiography (QCA), and assessed plaque morphology with Intravascular Ultrasound (IVUS).

Results: We found that stable CAD patients had significantly higher VEGF levels than patients with ACS. We observed a positive correlation between serum VEGF levels and the extent and severity of atherosclerotic disease measured by QCA Cumulative Coronary Stenosis Score (Pearson correlation coefficient of 0.423 and $p=0.001$) in patients with stable CAD. In a multivariate analysis, serum VEGF levels remained a valid predictor of QCA CCSS score ($p=0.003$) in patients with stable CAD, with age being the only other predictor of QCA CCSS ($p=0.007$). Finally, using IVUS, we observed a significant positive correlation between serum VEGF levels and plaque volume (Spearman correlation

coefficient = 0.381, $p=0.035$) as well as percent atheroma volume (Spearman correlation coefficient = 0.466, $p=0.008$) in patients with stable CAD.

Conclusion: Our findings suggest that serum VEGF could be used as a potential biomarker of atherosclerosis.

Keywords

Atherosclerosis, coronary artery disease, vascular endothelial growth factor

Table des Matières

Résumé.....	iv
Abstract.....	vi
Liste des tableaux.....	x
Liste des figures.....	xi
Liste des abréviations.....	xii
Remerciements.....	xiv
Chapitre 1 : Introduction	
1.1 Épidémiologie de la maladie cardiovasculaire.....	1
1.2 Pathophysiologie de l'athérosclérose.....	2
1.3 L'athérosclérose, manifestations cliniques.....	4
1.4 Anatomie des artères.....	6
1.5 Méthodes de dépistage de la maladie cardiaque athérosclérotique.....	7
1.6 Biomarqueurs de la maladie cardiaque athérosclérotique.....	10
1.7 Coronarographie, perspective historique.....	14
1.8 Coronarographie, concepts de base et limitations.....	17
1.9 Coronarographie par analyse quantitative.....	21
1.10 Cumulative Coronary Stenosis Score (CCSS).....	24
1.11 L'imagerie intravasculaire ultrasonore (IVUS).....	25
1.12 Le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF).....	27
1.13 Implications thérapeutiques du VEGF.....	29
1.14 VEGF plasmatique vs sérique et la méthode de mesure.....	30
1.15 Le VEGF et l'athérosclérose.....	31

Chapitre 2 : Méthode, Statistiques, Résultats (article scientifique)	35
Chapitre 3 : Discussion	
3.1 Le VEGF et le QCA CCSS, patients avec MCAS stable	60
3.2 VEGF et sévérité de la MCAS, comparaison avec la littérature	60
3.3 Le VEGF et l'aspirine	65
3.4 Le VEGF et l'héparine	65
3.5 Le VEGF et l'IVUS	66
3.6 Le VEGF et le risque d'évènement cardiovasculaire	67
3.7 Limites de notre étude	68
3.8 Forces de notre étude	70
Conclusion	71
Bibliographie	72

Liste des tableaux

Tableau I: Les dix principales causes de décès au Canada.....	1
Tableau II : Demographic, risk factors and pharmacological characteristics of patients with stable coronary artery disease (CAD) and acute coronary syndrome (ACS).....	52
Tableau III : Factors associated with serum vascular endothelial growth factor A (VEGF) levels in patients with stable coronary artery disease (CAD) and acute coronary syndrome (ACS).....	53
Tableau IV : Multivariate analysis for independent predictors of quantitative coronary angiography (QCA) cumulative coronary stenosis score (CCSS).....	54
Tableau V: Multivariate linear regression on plaque area sum (PAS) score determined by QCA in patients with stable coronary artery disease (CAD).....	55
Tableau VI : Revue de littérature des études sur l'association du VEGF à la MCAS.....	63

Liste des figures

Figure 1 : Première documentation d'un cathétérisme cardiaque droit/gauche, démontré par Hales.....	15
Figure 2A : Imagerie intravasculaire ultrasonore démontrant une plaque d'athérosclérose excentrique	18
Figure 2B : Imagerie intravasculaire ultrasonore démontrant une plaque concentrique.....	18
Figure 3 : L'importance de la projection orthogonale dans de multiples plans afin de déterminer la sévérité de la sténose coronarienne.....	19
Figure 4 : Représentation schématisée d'une image de la plaque athérosclérotique.....	22
Figure 5 : Représentation de l'évolution d'un vaisseau atteint d'athérosclérose.....	26
Figure 6 : Serum vascular endothelial growth factor (VEGF) levels vs. coronary artery disease extent and severity measured by the cumulative coronary stenosis (CCS) score on QCA in patients with stable coronary artery disease.....	56
Figure 7: Serum vascular endothelial growth factor (VEGF) levels vs. coronary artery disease extent and severity measured by the plaque area sum (PAS) score on QCA in patients with stable coronary artery disease.....	57
Figure 8 : Serum vascular endothelial growth factor (VEGF) levels predict percent atheroma volume patients with stable coronary artery disease.....	58
Figure 9 : Serum vascular endothelial growth factor (VEGF) levels vs. platelet counts in patients with an acute coronary syndrome (ACS).....	59

Liste des abréviations

ACS : *acute coronary syndrome*

Apo-B: Apolipoprotéine B

ASA : *Acetyl-salicylic acid*/acide acétylsalicylique

CAD : *coronary artery disease*

CCSS : *cumulative coronary stenosis score*/score cumulative de sténose coronarienne

Cox : cyclooxygénase

CT: *X-ray computed tomography*/tomodensitométrie multicoupe

Dr : docteur

eNOs : *endothelial nitric oxide synthase*/ monoxyde d'azote synthase endothélial

Flt-1 : *fms-related tyrosine kinase 1*/ tyrosine kinase 1 analogue à fms

Flk- 1 : *fetal liver kinase 1*/kinase du foie 1 de type fétal

HIF : *hypoxia inducible factor*/ facteur inductible par l'hypoxie

HIF 1a : *hypoxia-inducible factor 1-alpha*/ facteur inductible par l'hypoxie 1-alpha

HMG-CoA : 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A

HU : unité de Hounsfield/*Hounsfield unit*

ICAM : *intercellular adhesion molecules*/ molécules d'adhésion intercellulaire

IVUS : *intravascular ultrasound*/ l'imagerie intravasculaire ultrasonore

J.C.: Jésus-Christ

KDR : *kinase insert domain receptor*/ domaine d'insertion de protéine kinase

LDL: *low density lipoprotein*/ lipoprotéines de basse densité

MCAS : maladie cardiaque athérosclérotique

MHz : mégahertz

mL: millilitre

NO: *nitric oxide*/monoxyde d'azote

P1GF : *placental growth factor 1* / facteur de croissance placentaire 1

PHD : *propyl hydroxylase domain*/domaine de la propyle hydroxylase

QCA : *quantitative coronary angiography*/coronarographie par analyse quantitative

rhVEGF : *recombinant human vascular endothelial growth factor*/facteur de croissance de l'endothélial vasculaire humaine recombinante

SCA : syndrome coronarien aigue

VCAM: *vascular cell adhesion molecule 1*/ molécule d'adhésion cellulaire vasculaire 1

VEGF : *vascular endothelial growth factor*/ facteur de croissance de l'endothélial vasculaire

VEGFr : *vascular endothelial growth factor receptor*/récepteur du facteur de croissance de l'endothélial vasculaire

Remerciements

Je tiens à remercier Dr Jean-Claude Tardif de m'avoir accueilli comme étudiant dans son équipe, de m'avoir conseillé, et supporté durant cette MSc.

Merci à Dr Rhéaume pour sa supervision étroite et ses précieux commentaires qui m'ont fait mieux comprendre l'écriture scientifique.

Merci à Dr Guertin pour m'avoir introduit à la statistique, et ainsi permis de compléter ce projet. Votre disponibilité et votre sens de la vulgarisation m'ont grandement aidé.

Merci à ma famille et à mes proches pour votre support pendant ma maîtrise et ma résidence.

Chapitre 1: La maladie cardiovasculaire et l'athérosclérose

Épidémiologie:

La maladie cardiovasculaire reste une cause importante de mortalité et morbidité dans les pays développés. Bien que la mortalité cardiovasculaire soit en baisse lors des dernières années dans notre pays, elle représente toujours la cause de 27% des décès au Canada aux dernières données disponibles en 2009, et demeure la cause de mortalité mondiale la plus prévalente (Tableau 1).[1]

Tableau I: Les dix principales causes de décès au Canada

Les dix principales causes de décès, selon certains groupes d'âge et le sexe, Canada 1 — Tous les âges²

	Décès									
	2009		2008		2007		2006		2005	
	rang ³	nombre								
Les deux sexes										
Total, toutes les causes de décès (A00-Y89)	...	238 418	...	238 617	...	235 217	...	228 079	...	230 132
Tumeurs malignes (C00-C97)	1	71 125	1	70 558	1	69 595	1	67 807	1	67 343
Maladies du cœur (I00-I09, I11, I13, I20-I51)	2	49 271	2	50 722	2	50 499	2	49 893	2	51 574
Maladies cérébrovasculaires (I60-I69)	3	14 105	3	13 870	3	13 981	3	13 805	3	14 054
Maladies chroniques des voies respiratoires inférieures (J40-J47)	4	10 859	4	10 923	4	10 659	4	9 786	4	10 515
Accidents (blessures involontaires) (V01-X59, Y85-Y86)	5	10 250	5	10 234	5	9 951	5	9 640	5	9 506
Diabète sucré (E10-E14)	6	6 923	6	7 521	6	7 394	6	7 261	6	7 881
Maladie d'Alzheimer (G30)	7	6 281	7	6 573	7	5 903	7	5 675	8	5 762
Grippe et pneumopathie (J09-J18)	8	5 826	8	5 386	8	5 452	8	5 152	7	5 845
Lésions auto-infligées (suicide) (X60-X84, Y87.0)	9	3 890	10	3 705	10	3 611	10	3 512	9	3 743
Néphrite, syndrome néphrotique et néphropathie (N00-N07, N17-N19, N25-N27)	10	3 609	9	3 846	9	3 803	9	3 686	10	3 643

Adapté de : Statistique Canada, *Les principales causes de décès au Canada*, produit n° 84-215-XWF au catalogue de Statistique Canada, version mise à jour en juillet 2012, Ottawa, Ontario <http://www5.statcan.gc.ca/bsolc/olc-cel/olc-cel?catno=84-215-x&lang=fra> (24 septembre 2013)

Pathophysiologie de l'athérosclérose :

La pathophysiologie de l'athérosclérose est fortement liée à un processus d'inflammation chronique de l'artère, et survient de manière préférentielle aux endroits où le flot laminaire du sang est perturbé, comme par exemple dans les embranchements entre une artère et ses branches filles ou dans les segments courbés des artères. [2, 3]

L'endothélium a un rôle clé en ce qui concerne la bonne fonction de la biologie vasculaire et de l'homéostasie circulatoire. Il est constitué d'une lignée de cellule endothéliale qui a pour fonction de permettre une interface thromborésistante entre le sang et le contenu intra-endothéliale du vaisseau, qui peut potentiellement être thrombogène.[4] L'endothélium effectue plusieurs fonctions vasoprotectrices en promouvant la vasodilatation, en inhibant la réponse inflammatoire et en inhibant la croissance des cellules de muscle lisse de la média. La plupart des effets bénéfiques de l'endothélium sont effectués par le NO (oxide nitrique).[5] La dysfonction endothéliale, objectivée par une baisse de production de NO, semble être le lien qui explique en partie la relation entre les facteurs de risque traditionnels de la maladie cardiovasculaire tels que le diabète, l'hypertension, la dyslipidémie et le tabagisme avec l'athérosclérose, qui causeraient tous la dysfonction endothéliale. [6]

Les dommages causés au niveau de la surface endothéliale font en sorte que des protéoglycanes pourront piéger les LDL (*low-density lipoprotein*) dans l'intima, en interagissant entre autres avec les Apolipoprotéines B100, composantes des LDL que l'on sait responsable du transport du LDL qui promeut l'athérosclérose de par

l'intégration du LDL à l'intima suite au contact entre l'ApoB 100 et les protéoglycanes. Une fois intégré à l'intima, le LDL devient susceptible à l'oxydation par des espèces réactives en oxygènes (ROS) ou enzymes comme la myéloperoxidase ou la lipoxygénase libérées par les cellules inflammatoires, ou le NADH/NADPH (*Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) exprimé par les cellules vasculaires. Le LDL oxydé pourra ainsi encourager l'expression de molécules d'adhésion comme les VCAM-1 (molécules d'adhésion cellulaire vasculaire 1) et les p-selectines qui permettront l'adhésion de leukocytes aux cellules endothéliales. Une fois adhérez à l'endothélium, les leukocytes devront migrer à l'intérieur de l'intima suite à l'appel fait par de nombreuses chimiokines, notamment MCP1/CCL2 (*monocyte chemoattractant protein 1/chemokine ligand 2*), qui promeut de manière sélective la migration des monocytes. De nombreuses autres chimiokines comme l'interleudin-6 ou la fractalkine sont également impliqué dans la migration des leukocytes dans les modèles expérimentaux.[7, 8] Ces dernières pourront entres autres devenir des cellules spumeuses, alors que le monocyte transformé en macrophage pourra phagocyter du LDL. Il faut ici noter l'importance du M-CSF (facteur de stimulation des colonies de macrophages) qui en plus de son pouvoir chimio attractif, mène un rôle important dans la survie des macrophages une fois présent dans la plaque athérosclérotique en y stimulant leur croissance.[9] Les cellules spumeuses sont à l'origine du début de l'athérosclérose, leur accumulation dans l'intima créant la strie lipidique, phase initiale de la plaque athéromateuse. [8]

L'athérosclérose survient précocement dans la vie, puisque l'on peut remarquer dès la fin de l'adolescence/le début de l'âge adulte la présence de stries lipidiques lors des autopsies[10].

L'athérosclérose, manifestations cliniques:

L'athérosclérose est à la base des maladies cardiovasculaires et de la maladie coronarienne, qui est une sous-catégorie des maladies cardiovasculaires. Alors que la lumière des vaisseaux sanguins se réduit progressivement avec la maladie athérosclérotique, la manifestation clinique prépondérante survient lors de la rupture ou de la thrombose de plaque. Suite à une rupture ou thrombose de plaque, on peut ainsi développer un infarctus du myocarde ou un ACV.

L'athérosclérose peut par contre avoir des manifestations cliniques multi-systémiques, de par le fait qu'elle peut atteindre les artères irrigant différents organes.

Si elle atteint les artères coronariennes, la manifestation clinique prédominante est l'angine, définie comme une douleur thoracique secondaire à un manque d'apport sanguin au myocarde.[7] Les douleurs d'angine sont décrites comme étant classiquement rétro-sternales en localisation, avec irradiation au cou/mâchoire et aux bras. Elles peuvent être accompagnées de dyspnée et de diaphorèse. Elles surviennent lors de l'effort, alors que les besoins en oxygène du myocarde augmentent, et sont soulagées par le repos. Lorsque la lumière d'une artère coronarienne devient obstruée de manière totale ou subtotale, un infarctus aigu du myocarde survient puisque l'apport

myocardique est complètement arrêté.[7] Le patient présentera alors des douleurs angineuses au repos.

Dans le cas où l'athérosclérose atteindrait les artères nourrissant le cerveau, soit classiquement les artères carotidiennes ou leurs branches, la manifestation clinique prédominante sera celle d'une ischémie cérébrale transitoire (ICT) ou d'un accident vasculo-cérébral (ACV).[11] Lorsque l'occlusion de l'artère est subtotale ou temporaire, le patient présentera des déficits neurologiques variables dépendant du territoire cérébral atteint. La liste de symptôme possible comprend : faiblesse ou paralysie d'un membre ou hémicorps, troubles du langage comprenant des difficultés d'expression/élocution ou de compréhension, troubles visuelles avec diminution de la vision et perte d'équilibre.

Si les artères affectées par l'athéroscléroses sont situées au niveau artères périphériques nourrissant les membres inférieurs (aorte descendante, iliaques, fémorales), la manifestation clinique prépondérante sera la claudication qui est définie comme une douleur secondaire à un manque d'apport sanguin aux muscles périphériques.[11] Les douleurs de claudication sont normalement intermittentes et se produisent usuellement à l'effort, lorsque l'apport sanguin aux muscles est insuffisant pour la demande en oxygène de ces derniers. Les douleurs sont classiquement soulagées par le repos. Par contre, lorsque l'obstruction endo-luminale devient critique, les patients peuvent présenter des douleurs ischémiques au repos.

Anatomie des artères :

L'athérosclérose va affecter de manière prédominante les vaisseaux de moyen et de gros calibre[12]. Les parois des vaisseaux sanguins sont constituées de trois couches distinctes : la tunica intima, la tunica média et l'adventice. La tunica intima est la couche la plus interne. Classiquement, on la disait constituée d'une couche unique de cellules endothéliales et d'une membrane basale composée entre autres de collagène de type 4, de laminine, de fibronectine et d'autres molécules de matrice extracellulaire.[7] Cependant, on sait maintenant qu'avec l'âge, les artères adultes vont voir apparaître dans l'intima des cellules de muscles lisse et des formes fibrillaires de collagène tels que les collagènes de type 1 et 3. La média est la couche située entre l'intima (interne du vaisseau) et l'adventice (couche la plus externe). La média est composée de surtout de cellules de muscles lisses, d'élastine et d'une membrane basale. Les artères plus ayant besoin d'avoir une capacité de transmettre l'énergie cinétique du ventricule, comme l'aorte, ont ainsi un média plus riche en élastine que les petites artères.[7] L'adventice est quant à elle composée de tissus collagèneux/fibroblastes, de fibres élastiques et d'une *vasa vasorum* dans les artères de plus gros calibre. La *vasa vasorum* est un réseau de petits vaisseaux sanguins responsables d'amener un apport sanguin à la paroi vasculaire (l'adventice et la média).

Le cœur est un organe disposant de 4 chambres : 2 oreillettes et 2 ventricules. William Harvey a été le premier à décrire la circulation sanguine comme étant circulaire : le sang veineux faible oxygène provenant des organes passait dans l'oreillette droite puis le ventricule droit pour ensuite être éjecter dans les poumons, site d'oxygénation.[13]

Des poumons, le sang revient oxygéné dans l'oreillette gauche puis le ventricule gauche, qui est responsable d'éjecter le sang dans l'aorte qui distribuera le sang oxygéné à tous nos organes de part le réseau artériel. Le ventricule gauche étant responsable de l'éjection du sang

Méthodes de dépistage de la MCAS

Les cliniciens ont plusieurs outils lorsque vient de le temps de déterminer si un patient est à haut risque d'avoir un événement coronarien ou d'avoir de la MCAS.

L'épreuve d'effort est le test de dépistage de la MCAS le plus fréquemment utilisé. Durant l'épreuve d'effort, des électrodes sont connectées à un patient afin d'obtenir un électrocardiogramme alors que ce dernier effectuera un effort sur un tapis roulant. Différents protocoles d'épreuve d'efforts sont utilisés, mais le principe universel est d'augmenter progressivement la consommation d'oxygène myocardique afin de voir si l'on peut éliciter des symptômes (douleurs angineuses) ou des changements ischémiques à l'électrocardiogramme.

La plus grande étude portant sur le dépistage de la MCAS chez les patients asymptomatiques a été effectuée dans la cohorte des enfants de Framingham. Chez 3043 adultes qui avaient en moyenne 45 ans, et dont 1431 étaient des hommes, une épreuve d'effort anormale étaient fortement associée à une chance 1.7-1.8X plus élevée de développer un MCAS dans le futur sur un suivi de 18 années.[14] Cette augmentation du risque était indépendante des autres facteurs de risque traditionnels de la MCAS.

Certains patients ont cependant de anomalies électriques à l'électrocardiogramme de base qui le rende ininterprétable (ex : bloc de branche gauche, rythme électro-enchainé, pré-excitation ventriculaire, anomalies de la repolarisation importante de base tel qu'un sous décalage du segment ST de plus d'un mm) ou une incapacité de fournir un effort physique (ex : amputés, troubles d'équilibre etc.).[7] Pour ces patients on peut donc offrir des moyens de dépistage ne nécessitant pas l'interprétation d'un électrocardiogramme ou un effort physique.

La scintigraphie myocardique s'effectue en médecine nucléaire. Avec l'emploi de différents isotopes radioactifs (99m-technicium-sestamibi, 99m-technicium-tetrofosmin ou plus anciennement thallium-201) qui sont extraits par les myocytes lors de leurs passages dans les artères coronaires, les isotopes émettent des rayons gamma qui seront capté par une caméra.[7] Les caméras de type SPECT (tomographie d'émission monophotonique) permettent de reconstruire des images en 3 dimensions de la perfusion myocardique de part l'information qu'elles captent. Une série d'image est faite au repos, et une série d'image et fait à l'effort ou suite à l'injection d'un agent pharmacologique pour les gens incapables d'offrir un effort.

Les agents pharmacologiques les plus utilisés sont l'adénosine et le dypiridamole. L'adénosine produit sont effet vasodilatateur de part l'activation des récepteurs A2A qui entraineront la production d'AMP cyclique qui a un effet vasodilatateur au niveau de l'endothélium/des cellules de muscle lisse, la stimulation des canaux potassique et la

diminution d'entrée de calcium intracellulaire, responsable de la vasoconstriction.[7] Puisque les régions où une dysfonction endothéliale est présente (ex : au niveau des régions athérosclérotiques) n'offrent pas la même vasodilatation suite à une injection d'adénosine, on peut ainsi voir les différences de perfusion entre les images de repos et les images post injection d'adénosine, qui montreront des déficits de perfusion dans les territoires myocardiques atteints d'athérosclérose. Un autre agent fréquemment utilisé est le dypiridamole.[7] Ce dernier bloque la ré-entrée cellulaire de l'adénosine et potentialise ainsi ses effets au niveau de l'endothélium. Ce faisant, de part les mécanismes d'action vasodilatateur de l'adénosine au niveau de l'endothélium sain expliqués ci-haut, on peut encore une fois noter des déficits de perfusion post injection comparé aux images acquises au repos. En terme de précision diagnostique, les examens faits avec un isotope au technicium marqué est plus sensible et spécifique que ceux fait avec du thallium (sensibilité 90% vs 82% et spécificité de 93% vs 80%)[15].

Une autre modalité diagnostique de la MCAS peut être l'échographie d'effort ou de stress. Cette modalité consiste à faire subir un effort au patient (tapis roulant ou bicyclette) et à acquérir des images échocardiographique pré et post effort afin de comparer la présence d'anomalie régionales de la contractilité se développant à l'effort. Le myocarde irrigué par une artère ayant une lésion hémodynamiquement significative devant donc ainsi présenter une détérioration de la contractilité à l'effort que l'on pourra noter lors de l'échocardiographie. Pour les patients incapables de fournir un effort, il est possible de faire l'examen sous stress pharmacologique en utilisant la dobutamine, un agent beta 1 et beta 2 agoniste qui causera une augmentation du travail myocardique de

part ses actions inotropique et chronotropiques médiées principalement par son effet beta 1 agoniste.[7] L'échographie d'effort ou de stress a comme principale limitation qu'elle demande une belle fenêtre échocardiographique afin d'obtenir des images de bonne qualité, et qu'elle est également limitée par la présence d'anomalies régionales de la contractilité au repos ou de dysfonction ventriculaire gauche sévère, puisqu'il sera alors impossible de déterminer l'effet de l'effort/stress sur ces territoires déjà anormaux au repos. En terme de sensibilité et de spécificité pour la détection de lésions coronariennes thermodynamiquement significative, on note de bons résultats avec une sensibilité à 76% et une spécificité à 88%.[16]

Finalement, la tomodensitométrie (CT-scan) coronarienne s'est développée ces dernières années et prend de plus en plus de place comme méthode de dépistage de la MCAS. Cette dernière modalité sera discutée ci-bas dans le chapitre de la discussion.

Biomarqueurs de la maladie coronarienne athérosclérotique:

Afin d'identifier les patients à risque élevé de MCAS, les cliniciens se fient sur des modèles de prédictions d'athérosclérose basés sur les facteurs de risques traditionnels (tabagisme, obésité, diabète, hypertension artérielle, antécédent familiaux précoces de MCAS, sexe masculin, dyslipidémie) de MCAS tel que le score de Framingham.[17] Les biomarqueurs font ainsi partie des outils à la disposition des cliniciens qui leur permettent de mieux préciser le risque de MCAS chez un patient donné. En 2001, un

groupe de chercheurs mandatés par le *National Institute of Health* (NIH) a donné la première définition universelle de ce qu'était un biomarqueur :

"a characteristic that is objectively measured and evaluated as an indicator of normal biological processes, pathogenic processes, or pharmacologic responses to a therapeutic intervention"[18]

Un biomarqueur peut donc être mesuré sur un bio-échantillon (ex : sang, tissu, urine) comme il peut être obtenu de par un enregistrement sur une personne (ex : électrocardiogramme, mesure de tension artérielle) ou par imagerie (ex : échocardiographie).[18]

De plus, les biomarqueurs peuvent servir différentes fonctions, en ce sens qu'ils peuvent soit prédire le risque de développer une maladie, identifier une maladie sub-clinique ou être utilisé à des fins diagnostiques de même que de servir de marqueur pronostic une fois un maladie identifiée.[19]

Différents biomarqueurs sanguins de MCAS ont déjà été décrits, on révisera ici les principaux. Le plus connu est la présence de dyslipidémie.

Effectivement, le cholestérol de type HDL et LDL ont tous deux été associés à la MCAS. Les niveaux de LDL corrént de manière log-linéaire avec le risque de MCAS, puisque des niveaux élevés de LDL sont associés à un risque augmenté de maladie

cardiovasculaire.[7] Pour ce qui est du HDL, il est quant à lui associée de manière inverse à la MCAS, des niveaux élevés de HDL étant associés avec un moindre risque de maladie cardiovasculaire. En effet, une augmentation de 1mg/dL de LDL est associée à une diminution de 2-3% du risque cardiovasculaire.[7] D'autre part, les niveaux de lipoprotéine a (Lp (a)), qui sont généralement stable chez un sujet pour le courant de sa vie et qui sont hautement héréditaires sont associés au risque de MCAS. Des niveaux élevés de Lp(a) supérieurs à 300mg/L ont été démontrés dans de nombreuses études comme étant associés à une augmentation de plus de 50% du risque de MCAS. [20, 21] Les sociétés de recommandation de prévention des évènements cardiovasculaire comme la société canadienne de cardiologie ont ainsi intégré le cholestérol (HDL et non-HDL) ainsi que l'apo-B comme biomarqueurs recommandés pour le dépistage des patients à risque de MCAS.[22] Des cibles de traitement pour le niveau de LDL à atteindre en fonction du risque cardiovasculaire globale sont également recommandées.

La protéine c-réactive de haute sensibilité (CRPhs), marqueur de l'activité inflammatoire systémique a également démontré un pouvoir prédicteur d'évènements coronarien ou d'ACV.[23] Bien qu'il n'y ait pas de lien causal entre la CRP et la MCAS, il a néanmoins été démontré que c'était un marqueur valide de risque cardiovasculaire, une large étude démontrant que chez des hommes de plus de 50 ans et les femmes de plus de 60 ans avec des valeurs de LDL <3.5mmol/L et des valeurs de CRPhs supérieures à 2.0mg/dL, le traitement avec la rosuvastatine a diminué les évènements cardiovasculaires de 50%. [24, 25] Cependant, de nombreuses études combinées incluant plus de 84 000 patients n'ont pas réussi à démontrer une valeur additionnelle

des niveaux sanguins de CRPhs afin de déterminer le risque cardiovasculaire chez un sujet donné lorsque l'on compare la CRPhs aux autres modèles cliniques d'estimation du risque cardiovasculaire comme le score de Framingham.[26]

Le fibrinogène, protéine majeure responsable de la coagulation de part sa transformation en fibrine par la thrombine, est un déterminant important de la viscosité du sang et de l'agrégation plaquettaire. Son possible rôle comme biomarqueur de MCAS a également été étudié dans plusieurs études prospectives, et une revue systématique portant sur 31 études et plus de 150 000 patients a démontré que pour chaque augmentation de 1g/L de fibrinogène, le risque de MCAS augmentait d'un facteur de 1.82 après avoir ajusté pour les facteurs de risque traditionnels de la MCAS.[27] L'homocystéine, un acide aminé qui peut influencer la coagulation et la fonction endothéliale a également largement été étudié afin de déterminer si des niveaux élevés étaient associées avec des manifestations de maladie athérosclérotique. Dans une grande méta-analyse, il a été démontré qu'une augmentation de 25% des niveaux d'homocystéine circulant est associée avec une augmentation de 12% des événements cardiovasculaires après ajustement pour les facteurs de risque traditionnels.[28] Cependant, les niveaux de fibrinogène tout comme les niveaux d'homocystéine sont étroitement reliés aux facteurs de risques classiques d'athérosclérose (âge, sexe, hypertension artérielle, diabète) ce qui limite leur utilité clinique.[29]

Les niveaux d'hémoglobine glyquées (HbA1C) ont également été associés à la présence de maladie cardiaque athérosclérotique. La fixation non enzymatique de

glucose sur l'hémoglobine permet d'avoir un reflet de la valeur moyenne de glycémie des 120 derniers jours. Une large étude prospective de plus de 11 000 patients a bien démontré que les individus ayant des niveaux d'HbA1C supérieur à 5.0% (limite supérieure de la normale) avait des risque beaucoup plus élevés de développer des évènements cardiovasculaires avec des OR de 1.23 (1.07 to 1.41) pour les individus avec des valeurs de 5.0-5.5%, 1.78 (1.48 to 2.15) pour ceux entre 5.5 et 6.0% et 1.95 (1.53 to 2.48) pour ceux ayant des valeurs supérieures à 6.5%.[30]

Coronarographie, perspective historique

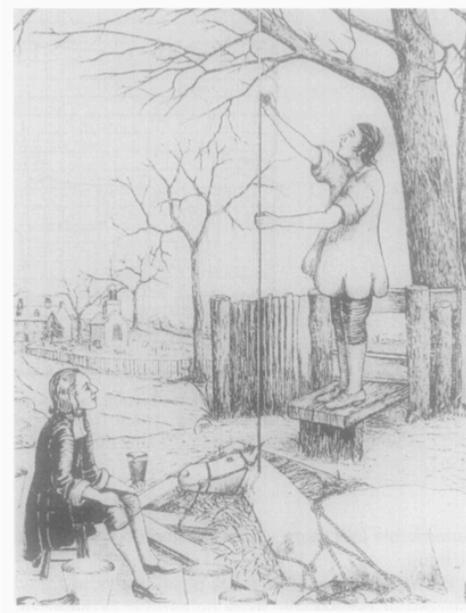
« Il faut inventer en même temps que l'on apprend »

-Plutarque

Les progrès et développements scientifiques ayant mené au développement de la cathétérisation cardiaque remontent à très loin dans l'histoire de l'humanité. Les premières documentations de tentative de cathétérisation remontent à plus de 3000 ans avant J.-C. Les Égyptiens cathétérisaient alors les vessies à l'aide de tuyaux de métal. Il faudra attendre aux années 400 avant J.-C. avant que le système circulatoire ne soit cathétérisé.[31] Les Grecs anciens du temps d'Hippocrate ont alors décrit l'insertion de liquide et d'air via des tuyaux de roseaux ou de laiton (alliage de cuivre et de zinc) dans les aortes de cadavres afin de mieux comprendre le fonctionnement des valves cardiaques.[31] C'est en 1711 que pour la première fois, Hales a conduit une

cathétérisation cardiaque sur un être vivant, alors qu'il a introduit un tuyau de laiton dans la jugulaire et dans la carotide d'un cheval. En connectant le tuyau de laiton à une colonne de verre remplie d'eau, il rapporta alors que la pression dans le ventricule dépassait neuf pieds de colonne d'eau (voir figure 1). [32]

Figure 1 : Première documentation d'un cathétérisme cardiaque droit/gauche, démontré par Hales



Source : Mueller, R.L. and T.A. Sanborn, *The history of interventional cardiology: cardiac catheterization, angioplasty, and related interventions*. Am Heart J, 1995. **129**(1): p. 146-72. (From the Bettman Archives)

La découverte des rayons X par Roentgen en 1895 a permis de documenter la position des structures anatomiques et des cathéters.[33] En 1929, Forssmann sera le premier à performer une cathétérisation cardiaque chez un être humain : il s'auto-insère

alors une sonde urologique dans sa propre veine basilique et la pousse jusqu'à son oreillette droite, position qu'il confirma par radiographie.[32] Quelques années plus tard, Cournand et Richards débuterons leurs travaux sur le cœur droit, utilisant des cathéters urologiques modifiés pour étudier la physiologie du cœur droit humain, étudiant les oxymétries, les courbes de pression et cathétérisant même l'artère pulmonaire. [32] Leurs travaux seront récompensés par le prix Nobel de la médecine en 1956, prix qu'ils partageront avec Forssmann pour la découverte de la cathétérisation cardiaque.

Les développements de techniques radiographiques dans les années 1950 ont permis d'obtenir des images radiographiques en continue grâce à la cinématographie.[32] Jumelés aux développements des agents de contrastes iodés et des intensificateurs d'images, nous étions alors capable d'obtenir des images en continu des structures vasculaires injectées d'agent de contraste, et ce en utilisant de plus faibles doses d'agents de contraste et de radiation. Les premières artériographies coronariennes seront faites en injectant de grandes quantités d'agents de contrastes dans l'aorte près de la racine aortique de manière à ce que le contraste opacifie de manière non sélective les artères coronaires.[32] Le premier accès vasculaire pour accéder à l'aorte était l'artère carotide. Sones sera le premier à injecter du contraste directement dans les coronaires humaines en 1958, alors que par erreur, son cathéter est intubé dans un ostium coronarien et qu'une quantité de 40 mL de contraste y est injecté : une image sera acquise après que le contraste soit injecté, le cathéter n'ayant pu être retiré à temps.[34] Le développement de nouveaux cathéters, dont ceux de Judkins et

Amplatz, permettront de faciliter l'intubation sélective des artères coronaires à partir d'un accès fémoral percutané (Sones avait utilisé un accès brachial), et faciliteront grandement la coronarographie telle qu'on la connaît aujourd'hui.[32]

Coronarographie : concepts de base et limitations

La coronarographie, ou angiographie coronarienne, nous permet d'observer une image en deux dimensions de la lumière du vaisseau étudié, en y injectant sélectivement du produit de contraste iodé radio-opaque. En utilisant des rayons X, le produit de contraste radio-opaque crée une image de la lumière du vaisseau que l'on peut ainsi enregistrer.

Ce faisant, l'application la plus commune de la coronarographie est d'étudier la présence de sténoses coronariennes. L'athéromatose coronarienne peut se distribuer de manière homogène/symétrique au pourtour d'un vaisseau, donnant ainsi une image de plaque concentrique. Elle peut cependant également se présenter de manière non homogène/asymétrique, pour donner une image de plaque excentrique, que l'on peut mieux observer sur les images obtenues à l'aide d'imagerie intravasculaire ultrasonore que l'on décrira dans le chapitre suivant (voir figure 2). Pour s'assurer d'obtenir une image représentant la sévérité de la sténose de manière adéquate, des incidences orthogonales doivent être prises afin de prendre en compte les effets de projection que peuvent avoir les plaques excentriques (voir figure 3).[7]

Figure 2A: Imagerie intravasculaire ultrasonore démontrant une plaque d'athérosclérose excentrique : la lumière du vaisseau est située à l'intérieur du cercle rouge, la barre blanche représente l'épaisseur de la plaque athérosclérotique. On remarque que la plaque est asymétrique en regard de sa distribution face à la circonférence du vaisseau (en bleu). Image adaptée de Mintz et al. Circulation 1996;93:924-931[35]

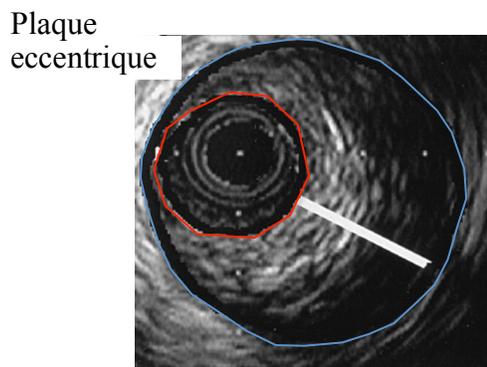


Figure 2B: Imagerie intravasculaire ultrasonore démontrant une plaque concentrique : la lumière du vaisseau est située à l'intérieur du cercle rouge, la barre blanche représente l'épaisseur de la plaque athérosclérotique. On remarque que la plaque est plutôt symétrique en regard de sa distribution face à la circonférence du vaisseau (en bleu). Image adaptée de Mintz et al. Circulation 1996;93:924-931

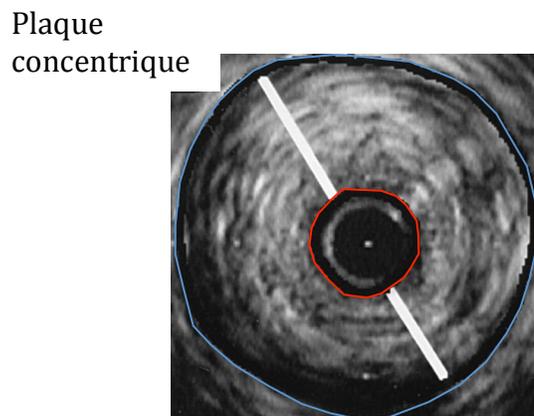
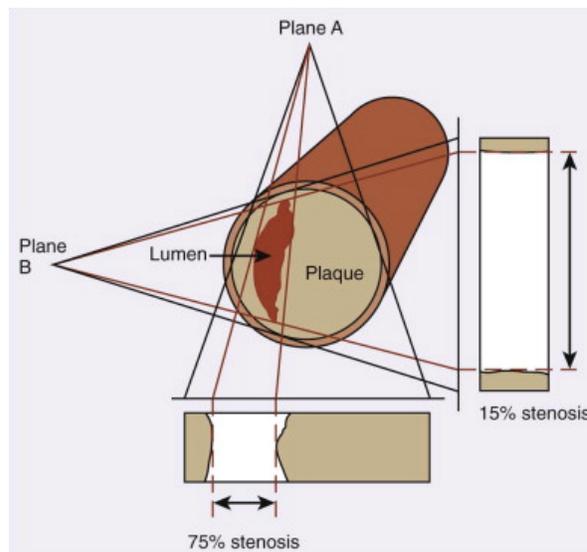


Figure 3 : L'importance de la projection orthogonale dans de multiples plans afin de déterminer la sévérité de la sténose coronarienne. Dans le plan A, la sténose coronarienne semble obstruer 75% de la surface du vaisseau alors que dans le plan B, l'effet de projection fait en sorte que la sténose est sous-estimée ne paraissant faire que 15% d'obstruction de la surface du vaisseau.



Adapté de: *Braunwald's heart disease, a textbook of cardiovascular medicine*. 9th ed. 2012, Philadelphia[7]

Les limites de l'angiographie coronarienne sont diverses. Tout d'abord, la sévérité des sténoses coronariennes observées est évaluée de manière subjective par l'opérateur de la procédure. Ceci laisse place à une grande variabilité inter et intra-observateur dans l'interprétation de la sévérité des sténoses.[36-38] Une étude avec une bonne méthodologie a même démontré qu'entre 11 observateurs, étudié prospectivement, des marges d'erreur de 36% dans l'estimation visuelle de la sévérité des sténoses par rapport au diamètre de l'artère étaient présentes.[36] Il a également

été démontré que la discordance dans l'interprétation de la sévérité des sténoses coronariennes est beaucoup plus faible lorsque la sévérité des sténoses sont très sévères ou très légère (>80% et <20% du diamètre de l'artère).[39] Une étude plus récente a démontré que les cardiologues experts n'étaient pas meilleurs que des novices afin de déterminer la sévérité des sténoses coronariennes en utilisant la coronarographie par analyse quantitative comme étalon d'or (voir coronarographie par analyse quantitative ci-bas).[40] De plus, cette même étude a démontré que les lecteurs avaient tendance à sous-estimer les sténoses de moins de 50% et à surestimer les lésions de plus de 50%.

Une des limites les plus importantes de la coronarographie est qu'elle n'est qu'une étude purement anatomique de l'arbre coronarien. Effectivement, pour un même pourcentage de sténose en terme de diamètre d'une artère coronarienne, de l'ischémie pourra se développer ou non. L'ischémie cardiaque survient lorsqu'il y a un déséquilibre entre les apports sanguins aux cellules myocardiques et les dépenses cellulaires. En grossissant, la sténose coronarienne mènera éventuellement à une baisse de l'apport myocardique, mais il y a d'autres déterminants comme le tonus vagal/sympathique, l'augmentation de l'activité cellulaire myocardique, et les facteurs modulateurs comme le dioxyde de carbone, les prostaglandines et le monoxyde d'azote qui feront également en sorte que les cellules myocardiques se retrouveront en situation d'ischémie.[7]

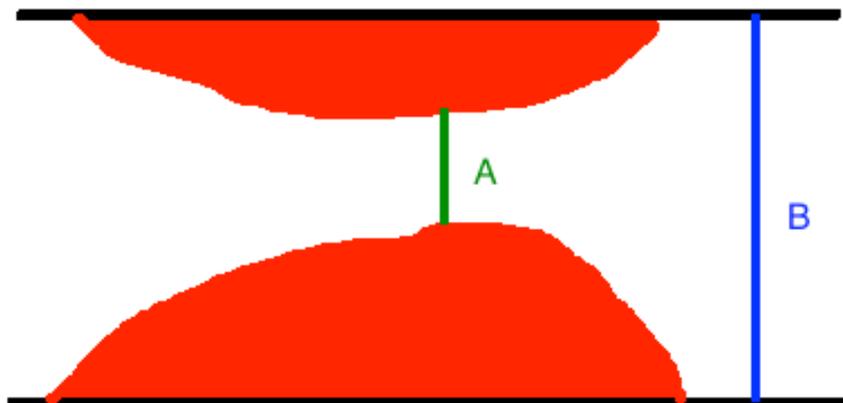
Coronarographie par analyse quantitative

En 1977, face à la grande variabilité inter-observateur dans l'interprétation des sténoses dans l'angiographie coronarienne, Brown et collaborateurs décriront pour la première fois une nouvelle méthode plus objective permettant l'estimation de la sévérité des sténoses coronariennes : la coronarographie par analyse quantitative.[41] Elle se fait à partir de l'intégration de multiples incidences d'une même lésion (minimum de 2 incidences orthogonales).

Cette méthode consiste en 3 parties. Tout d'abord, il faut convertir les images en format digital (si nécessaire), ensuite agrandir et calibrer les images sur un ordinateur, et enfin tracer les contours du vaisseau et de la plaque.[7, 42] Bien que la détection des contours se faisait autrefois manuellement, et nécessitait ainsi beaucoup de temps (5 minutes par tracé selon la description originale de Brown), l'informatisation du système a permis d'économiser énormément de temps puisque les logiciels récents permettent une détection automatisée des contours de vaisseaux et des lésions athérosclérotiques, lesquels peuvent être ajustés manuellement au besoin. Pour obtenir une bonne calibration, il est possible de prendre le cathéter utilisé pour l'injection des agents de contraste et de mesurer son extrémité.[43] Celle-ci étant de dimension connue, il est ainsi possible d'assigner une valeur centimétrique aux pixels de l'image digitalisée que l'on étudie.

L'analyse d'angiographie coronarienne quantitative peut se faire en 2 dimensions ou en 3 dimensions. Lorsque faite en 2 dimensions, l'incidence représentant le segment d'intérêt du vaisseau/la sténose de manière la plus sévère, sans contamination par image de superposition d'une autre branche coronarienne, et sans *foreshortening* (effet de perception visuelle de raccourcissement secondaire à une incidence/vue) est utilisée pour mesurer objectivement le diamètre de référence de l'artère, le diamètre minimal présent au niveau de la lésion coronarienne, et d'ainsi obtenir un pourcentage de sténose plus objectif (voir figure 4).[7]

Figure 4 : Représentation schématisée d'une image de la plaque athérosclérotique (en rouge) dans un vaisseau (contours du vaisseau en noir). A représente le diamètre minimal de la lumière du vaisseau. B représente le diamètre du vaisseau de référence. Le pourcentage de sténose sera ainsi calculé ici comme étant $(B-A)/B \times 100$.



Lorsque faite en 3 dimensions, à partir des images acquises en 2 dimensions, un logiciel permet la reconstruction des images afin de créer une image trois dimensions du segment d'intérêt du vaisseau étudié, et d'ainsi effectuer les mesures d'intérêt.

Dans sa publication originale, Brown et collaborateurs rapporteront ainsi une précision de l'ordre de 100-150 microns en terme de déviation standard par rapport à la mesure effectuée.[41] Ce faisant, sur un vaisseau de 3 mm, on aurait donc une déviation standard de 4% pour ce qui concerne la précision de la mesure d'une lésion. D'autres études de validation sont ensuite venues confirmer la précision de l'angiographie coronarienne quantitative, avec certaines études démontrant des précisions de l'ordre de 30 microns lorsque les mesures d'angiographie coronarienne quantitative sont faites sur des angiographies de sténoses et d'artères de dimensions connues (synthétiquement fabriquées).[44]

Il y a eu plusieurs applications cliniques à la coronarographie par analyse quantitative. Par exemple, l'évolution naturelle de la maladie coronarienne a ainsi pu être étudiée de manière plus objective grâce à cette approche, en effectuant des coronarographies par analyse quantitative sériées.[45-47] Les effets de différents traitements comme les inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase (statines) sur la progression ou la régression de l'athérosclérose ont également pu être étudiés de manière objective grâce à la coronarographie par analyse quantitative. [48-50] La coronarographie par analyse quantitative a aussi été utilisée de manière privilégiée afin de bien documenter les résultats obtenus directement après les interventions coronariennes percutanées et à

plus long terme (resténose, *late-lumen loss*). En effet, que ce soit des angioplasties uniquement au ballon[51, 52], des angioplasties avec tuteurs coronariens (*stent*)[53, 54], ou des angioplasties utilisant des techniques plus avancées (laser, Rotablator)[55, 56], la coronarographie par analyse quantitative a trouvé sa place comme méthode de choix pour démontrer les répercussions à court et moyen terme des intervention percutanées.

Néanmoins, la coronarographie par analyse quantitative reste peu utilisée dans la clinique courante. La plus grande limitation à son utilisation est qu'elle demeure une modalité d'imagerie anatomique, sans information fonctionnelle supplémentaire à ajouter à la coronarographie diagnostique en termes de savoir si une lésion particulière peut produire de l'ischémie ou non. Pour ce faire, d'autres méthodes d'imagerie fonctionnelle invasive ou non peuvent mieux compléter l'examen de coronarographie diagnostique.

Le cumulative coronary stenosis score

Historiquement, avec la coronarographie diagnostique, la sévérité de l'atteinte de la maladie coronarienne était souvent décrite comme étant une maladie de 1, 2, ou 3 vaisseaux.[57] Cependant, avec ce genre de description, il est difficile d'apprécier le fardeau global d'athérosclérose d'un individu. On peut voir que plusieurs lésions considérées comme non significatives (<50%) ne seraient pas incluses dans cette description, et qu'un patient ayant uniquement trois lésions avec chacune d'entre elles situées sur une artère coronaire différente ne représente pas le même fardeau d'athérosclérose qu'un patient qui a de multiples lésions sévères sur trois artères

coronaires différentes même si ces deux patients seraient classifiés comme patients avec maladie de trois vaisseaux.

Le *Cumulative Coronary Stenosis Score* utilisé en coronarographie par analyse quantitative, a été créé afin de bien prendre en compte l'ensemble des lésions coronariennes, et de bien refléter le fardeau global d'athérosclérose d'un individu donné. Cela nous permet de quantifier de manière objective la charge d'athérosclérose totale. Pour ce faire, le score consiste à additionner les sténoses répertoriées sur les artères épicaudiques ex : 2 sténoses de 50% donnerait un score de $0.50+0.50 = 1$. Un score plus élevé représente un fardeau d'athérosclérose globale plus élevé, et ce score prend en compte toutes les lésions coronariennes, qu'elles soient considérées comme significative (>50%) ou non. Cette méthode a déjà été décrite et utilisée lorsque l'on voulait évaluer le fardeau global d'athérosclérose chez des patients.[58-60]

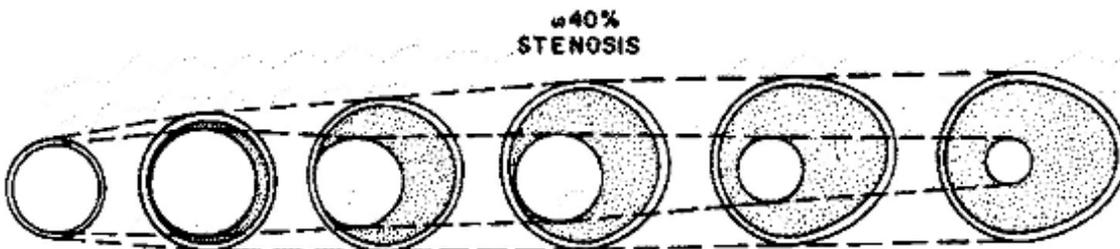
L'imagerie intravasculaire ultrasonore /*Intravascular Ultrasound (IVUS)*

Contrairement à la coronarographie, qui ne permet que d'évaluer la lumière à l'intérieur d'une artère sans voir sa paroi, l'IVUS nous permet de bien visualiser la paroi artérielle de par l'intérieur du vaisseau. Pour ce faire, une sonde à ultrason miniaturisée qui est placée à l'extrémité d'un cathéter de moins d'un millimètre est montée sur un guide de 0.014 pouce, et est avancée dans la région d'intérêt du vaisseau que l'on veut étudier.[7] Une fois arrivé à la région d'intérêt, le cathéter, qui est relié à un moteur, tournera sur lui-même à une vitesse d'environ 1800 tours par minute (dépendant de l'appareil utilisé). Ce faisant, le transducteur d'ultrason transmettra les images

circulaires ainsi acquises. En retirant progressivement le cathéter, normalement de manière automatisée à une vitesse de 0.5 mm/sec, il est possible d'étudier la longueur désirée d'une artère coronarienne. Les images récoltées de l'ultrason (normalement à une fréquence de 40 MHz), qui ont une excellente résolution spatiale de 125 micron à 40 MHz, seront ensuite intégrées pour présenter la paroi vasculaire vue de l'intérieur du vaisseau.[7]

En 1987, Glagov a révolutionné la compréhension de l'évolution de l'athérosclérose en établissant que le vaisseau dans lequel la plaque athérosclérotique se trouvait pouvait se développer en ayant un remodelage positif, et que la lumière du vaisseau commençait à se rétrécir seulement lorsque la plaque composait plus de 40% de la surface. [61](voir figure 5)

Figure 5 : Représentation de l'évolution d'un vaisseau atteint d'athérosclérose. Le vaisseau va initialement s'agrandir pour accommoder la plaque athérosclérotique sans diminuer la lumière de l'artère, mais lorsque la plaque devient sténosante à la hauteur de 40% du diamètre du vaisseau, la lumière commence à se rétrécir puisque la paroi du vaisseau ne peut plus s'agrandir. Adapté de Glagov et al. [61]



En comprenant ce concept, il devient facile de comprendre que la coronarographie n'est pas un bon outil pour évaluer l'athérosclérose de manière complète, puisqu'elle ne fait qu'évaluer la présence de plaques assez sévères pour causer un rétrécissement de la lumière, alors que l'IVUS peut quant à lui voir la plaque dès ses phases les plus primitives.

L'excellente résolution spatiale de l'IVUS lui a permis d'avoir une utilisation plus acceptée/utile en clinique comparée à la coronarographie par analyse quantitative. Effectivement, la validation de certaines données avec l'IVUS nous permet de l'utiliser pour évaluer les lésions du tronc commun et les lésions qui présentent une discordance angiographique avec les tests d'imagerie non invasive ou les symptômes des patients. De plus, l'IVUS permet de bien évaluer le déploiement/l'apposition des tuteurs (stents) [62, 63] permettant ainsi de bien documenter et d'en diminuer la resténose.[64] Finalement, l'IVUS a été grandement utilisé et demeure utilisé dans l'évaluation des traitements pharmacologiques de l'athérosclérose, afin d'évaluer l'effet médicamenteux sur la progression/régression de l'athérosclérose.[65-67]

Le vascular endothelial growth factor (VEGF)

Le VEGF est une protéine de très grande importance dans la régulation de l'angiogénèse. C'est en 1983 que pour la première fois cette protéine sera décrite. Chez des rongeurs souffrant de tumeurs cancéreuses, on isola une protéine de 34 000 à 42 000 daltons qui était différente de tout ce qu'on avait identifié auparavant et qui était responsable d'augmenter la perméabilité microvasculaire.[68] On appela cette protéine Facteur de Perméabilité Vasculaire (*Vascular Permeability Factor - VPF*). En 1989 la

nomenclature de Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) fera son entrée officielle dans la littérature, alors qu'une protéine de 23 000 à 45 000 daltons sera isolée d'un médium conditionné par des cellules pituitaire bovines.[69] On remarqua alors que ce facteur avait un effet mitogénique important et spécifique aux cellules endothéliales vasculaires. Cette même année, le lien sera fait entre le VEGF et le VPF, alors que l'on décrira que ces deux protéines étaient en fait les mêmes et qu'une même protéine pouvait ainsi avoir deux effets : l'augmentation de la perméabilité vasculaire ainsi qu'un effet mitogénique vasculaire. [70]

Il y a plusieurs membres qui font partis de la famille du VEGF. Le VEGF-A, également connu sous le nom de VEGF165 (composé de 165 acides aminés et qui est son isoforme la plus commune) ou de simplement VEGF est le membre le plus étudié de cette famille, et le reste de cette thèse porte sur cette dernier.[71] On retrouve cependant également le VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F et le facteur de croissance du placenta/*placental growth factor* (P1GF)[72]. Le VEGF-A se lie principalement à deux récepteurs de type tyrosine kinase : le VEGFR1/Flt1 et le VEGFR2/Flk1/KDR (KDR chez l'humain, Flk1 chez les rongeurs).[71] Les effets les plus importants du VEGF sont effectués via son action en se liant au VEGFR2, qui est le médiateur principal des effets angiogéniques, mitogéniques et de perméabilité vasculaire du VEGF.[73]

Rapidement, dans les années suivant sa découverte, des études ont confirmé l'importance cruciale du VEGF dans l'embryogénèse et l'angiogénèse lors du développement de l'embryon.[74, 75] Des modèles de souris invalidées pour le gène

VEGF ont vite démontrés que l'inactivation d'un seul allèle menait à la mort de l'embryon dans les jours 11-12 du développement, secondairement à des anomalies congénitales causées par des défauts de la vascularisation de plusieurs organes. Son rôle dans le développement post-natal a également été bien étudié alors que l'inhibition *in vivo* du VEGF chez la souris post-natale à l'aide d'anticorps anti-VEGF menait également rapidement au décès de cette dernière, cette fois surtout par insuffisance rénale, démontrant le rôle important du VEGF dans le développement rénal.[76] Chez les primates juvéniles, l'inhibition du VEGF a été démontrée comme étant nocive pour l'angiogenèse ovarienne et l'inhibition des plaques de croissances.[77]

Le VEGF et ses implications thérapeutiques

En 1971, le Dr Folkman a publié un article qui deviendra classique dans le *New England Journal of Medicine* dans lequel il reconnaîtra l'importance et le besoin de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et de l'angiogenèse dans la croissance des tumeurs cancéreuses et donc comme nouvelle cible potentielle dans la thérapie du cancer.[78] La découverte que les niveaux de VEGF étaient élevés dans de nombreuses néoplasies humaines[79-81] a ainsi mené à de nombreux essais cliniques dans lesquels des agents anti-VEGF ont pu démontrer certains bénéfices cliniques dans le traitement contre certains cancers.[82]

Le VEGF a également été impliqué dans le développement de la néovascularisation oculaire pathologique, que ce soit la rétinopathie diabétique, l'occlusion de la veine rétinienne centrale, ou la rétinopathie chez les enfants

prématurés.[83] La dégénérescence maculaire, première cause de cécité et d'handicap visuel sévère chez les adultes de pays industrialisée[84], peut également être traitée avec des inhibiteurs de VEGF.[85-87]

Les chercheurs en sciences cardiovasculaires ont vu dans le VEGF un agent potentiellement prometteur : un patient souffrant de maladie cardiaque athérosclérotique qui présente de l'angine réfractaire au traitement médical conventionnel et non éligible à une thérapie de revascularisation conventionnelle (chirurgie de pontage ou intervention coronarienne percutanée) devrait bénéficier d'angiogenèse, puisque la formation de branches collatérales permettrait de venir vasculariser les territoires ischémiques responsables des symptômes. C'est ainsi que plusieurs études tentant d'injecter du VEGF humain recombinant ou des plasmides exprimant VEGF intra-coronarien ou intra-myocardique ont été conduites mais sans jamais pouvoir démontrer de bénéfice clinique.[88-90]

VEGF plasmatique vs sérique, et la méthode de mesure

Le sérum et le plasma sont tous deux dérivés du sang. Le sérum est constitué du liquide surnageant centrifugé du sang collecté qui a eu le temps de coaguler et qui a donc été collecté dans un tube sans anticoagulants. Puisque le sang a eu le temps de coaguler, le contenu des plaquettes qui ont été activées durant le processus est libéré dans le sérum. Le plasma est quant à lui la partie liquide récoltée après la centrifugation de sang non coagulé, il représente donc le sérum moins les facteurs libérés par l'activation plaquettaire ou certaines molécules produites par la coagulation mais avec en plus les

facteurs de coagulation non «consommés» lors de la préparation du sérum tels le fibrinogène.[91]

La méthode pour mesurer le VEGF est également très importante, car des variations de mesures importantes peuvent survenir selon la méthodologie employée.[92] Ainsi, les niveaux sériques de VEGF rapportés peuvent varier en fonction de la température à laquelle le spécimen a été traité, la durée, la vitesse et la force de la centrifugation, et la durée entre la collecte du spécimen et sa quantification.[93] Puisque le VEGF semble être libéré par les plaquettes *in vitro* après la collection du sérum, certains auteurs recommandent d'utiliser le plasma pour mesurer les niveaux de VEGF.[92, 94] Cependant, le fait que les plaquettes puissent « séquestrer » une partie du VEGF circulant ne devrait pas occulter le fait que l'expression globale de VEGF a tout de même été stimulée par l'organisme étudié. Plusieurs études ont ainsi démontrées que pour la biologie des cancers, les niveaux sériques de VEGF corrèlent mieux avec l'agressivité/l'extension de certains cancers.[95-97]

Le VEGF et l'athérosclérose

La relation entre le VEGF et l'athérosclérose demeure non élucidée. En effet, on peut voir des effets protecteurs tout comme des effets délétères du VEGF dans sa relation avec l'athérosclérose.[98]

Pour ce qui est de ses effets bénéfiques, il a été démontré que le VEGF pouvait augmenter la production de NO en augmentant l'activité de l'*endothelial NO synthase*

(eNOS).[98] Ce faisant, le VEGF maintient l'intégrité et la fonction endothéliale et diminue les forces pro-athérosclérotiques comme l'adhésion des leucocytes et l'agrégation plaquettaire. C'est ainsi que l'on explique potentiellement l'augmentation d'évènements thrombotiques associés aux thérapies anti-VEGF observés dans les études de cancer et de dégénérescence maculaire.[99]

Du côté de ses effets délétères, on sait que la progression de la plaque athérosclérotique est caractérisée par la présence d'inflammation, qui augmente la consommation d'oxygène, et d'une augmentation de l'épaisseur de l'intima, qui diminue l'apport en oxygène à la plaque athérosclérotique.[100] Ceci a été confirmé alors qu'en étudiant la concentration en oxygène de plaques athérosclérotiques par microélectrodes, on observait des pressions d'oxygène nettement diminuées dans les plaques athérosclérotiques par rapport à leur adventice.[101] Ce faisant, les conditions idéales sont créées pour avoir un degré maximal d'hypoxie, qui est le moyen le plus puissant de déclencher l'angiogenèse et l'expression de VEGF via l'expression du facteur de transcription *hypoxia inducible factor* HIF-1 α ; ce dernier n'étant plus inhibé puisque l'hypoxie va diminuer l'activité des enzymes responsables du marquage de HIF (les *prolyl hydroxylase domain*-PHD) pour la dégradation intracellulaire via l'appareil protosomal de dégradation.[102-104]

Le VEGF est un puissant inducteur de la perméabilité vasculaire qui promeut l'expression de molécules d'adhésion comme les VCAM1 et les ICAM1.[105] Ces dernières peuvent promouvoir l'infiltration de cellules inflammatoires comme les

leucocytes dans la plaque athérosclérotique.[106] De plus le VEGF stimule la migration et l'activation des monocytes.[107] Ces deux éléments sont cruciaux dans le développement de la plaque athérosclérotique, puisque leur implication dans la cascade inflammatoire et la pathogénèse de l'athérosclérose est essentielle.[108] Le VEGF pourrait donc potentiellement participer à la croissance des plaques athérosclérotique via sa participation au processus inflammatoire.

D'autre part, le VEGF a été fortement lié à une autre hypothèse de croissance des plaques d'athérosclérose : l'hémorragie intra-plaque. La plaque d'athérosclérose étant hypoxique, tel que mentionné plus haut, l'expression de VEGF permet de créer de la néovascularisation intra-plaque à partir du vasa vasorum provenant de l'adventice.[109] Cependant, ces nouveaux vaisseaux sont plus fragiles et plus enclins à la rupture et à ainsi permettre à des globules rouges de se retrouver dans la plaque athérosclérotique.[110] La paroi de globules rouges étant riches en lipides, qui constituent 40% de son poids, ces derniers peuvent être phagocytés par les cellules inflammatoires et ainsi contribuer à la croissance de la plaque.[111]

Quelques études cliniques se sont penchées sur la relation entre le VEGF et l'athérosclérose coronarienne. Cependant, des résultats contradictoires ont émergé dans la littérature, avec certaines études qui démontrent un lien entre le VEGF et la sévérité de la maladie athérosclérotique alors que d'autres ne voient pas de relation entre les niveaux sanguins de VEGF et la sévérité de l'athérosclérose coronarienne.[112-122] Cependant, aucune de ces études n'a utilisé un outil permettant de calculer de manière

objective et reproductible la charge totale de l'athérosclérose coronarienne: la coronarographie par analyse quantitative et le CCSS. De plus, peu de données concernant le lien entre les niveaux de VEGF et l'IVUS sont disponibles.

Puisque les résultats concernant le lien entre les niveaux sanguins de VEGF et l'athérosclérose coronarienne dans la littérature sont contradictoires et qu'aucune des études n'a utilisé une méthode plus reproductible permettant de bien quantifier l'athérosclérose coronarienne globale, nous avons choisi d'étudier la relation entre le VEGF et l'athérosclérose coronarienne en utilisant la coronarographie par analyse quantitative comme outil de mesure, et avons également obtenu des données en utilisant l'IVUS.

Notre hypothèse étant que des niveaux sanguins élevés de VEGF pourraient être corrélés à la sévérité de la maladie coronarienne athérosclérotique. Nous pensons effectivement qu'une charge globale d'athérosclérose amènerait une augmentation des niveaux de VEGF de part les effets ischémiques de l'athérosclérose, l'ischémie étant un puissant stimulateur de la production de VEGF. De plus, nous pensons que le VEGF entretiendrait l'athérosclérose de part ses effets pro-inflammatoires mentionnés ci-haut.

Circulating VEGF Levels are Associated with Coronary Atherosclerosis Burden in Patients with Stable Coronary Artery Disease

Remi Kouz,¹ Colin Berry,² Eric Rhéaume,^{1,3} Geneviève Brand,¹ Anne-Elen Kernaleguen,¹ Jean C. Grégoire,^{1,3} Reda Ibrahim,^{1,3} Jacques Lespérance,¹ Philippe L. L'Allier,^{1,3} Stéphane Noble,⁴ Philippe Meyer,⁵ Marie-Claude Guertin,⁶ Jean-Claude Tardif^{1,3}

¹ Research Centre of the Montreal Heart Institute, Montreal, Canada

² BHF Glasgow Cardiovascular Research Centre, Institute of Cardiovascular and Medical Sciences, University of Glasgow; West of Scotland Heart and Lung Centre, Golden Jubilee National Hospital

³ Department of Medicine, Université de Montréal

⁴ Department of Medical Specialties, Interventional Cardiology Unit, University Hospital of Geneva

⁵ Cardiology Service, University Hospital of Geneva

⁶ Montreal Heart Institute Coordinating Centre (MHICC), Montreal, Canada

Corresponding author:

Jean-Claude Tardif, MD

Montreal Heart Institute

5000 Belanger Street, Montreal, H1T 1C8, Canada

Phone: (514)376-3330 ext. 3612, Fax: (514)593-2500

Abstract:

Background: The role of vascular endothelial growth factor A (VEGF) in atherogenesis remains controversial. By promoting inflammation and neovascularization of atherosclerotic plaques, VEGF is hypothesized to contribute to their development. We investigated the association between VEGF serum levels and coronary artery disease (CAD).

Methods: We performed a cross-sectional study of 56 patients with stable CAD and 112 patients with an acute coronary syndrome (ACS). We investigated the relationship between atherosclerosis plaque burden and serum VEGF concentration using quantitative coronary angiography (QCA) and intravascular ultrasonography (IVUS).

Results: Stable CAD patients had higher VEGF levels than patients with ACS. In stable CAD patients, serum VEGF concentrations were correlated with the extent and severity of coronary atherosclerotic disease measured by the Cumulative Coronary Stenosis (CCS) score and the Plaque Area Sum (PAS) score on QCA ($r=0.423$, $p=0.001$ and $r=0.354$, $p=0.007$). In a multivariate analysis, serum VEGF levels remained associated with CCS and PAS score ($p=0.003$ and $p=0.002$ respectively), with age being the only other significant factor ($p=0.007$ and $p=0.010$). In that same population, serum VEGF concentrations were also positively correlated with coronary plaque volume ($r=0.381$, $p=0.035$) and percent atheroma volume ($r=0.466$, $p=0.008$).

Conclusion: Circulating VEGF concentrations are related to CAD presentation type and disease burden in stable CAD patients.

Keywords

Atherosclerosis, coronary artery disease, vascular endothelial growth factor

Introduction:

Coronary heart disease and acute coronary syndromes (ACS) are leading causes of death.[1] Atherosclerosis is an inflammatory disease and rupture of coronary artery plaque is the main cause of ACS.[2] Leukocyte recruitment and activation participate in the development of the atherosclerotic plaque. Adhesion molecules play an important role in mediating the passage of leukocytes from the circulation toward the atherosclerotic plaque.[3] Factors that can promote the expression of adhesion molecules and increase vascular permeability through pro-inflammatory effects could therefore potentially promote atherosclerosis.

Vascular endothelium growth factor A (VEGF) is an important mediator of angiogenesis and is essential for the formation and development of new blood vessels (neovascularization). However, VEGF is also a potent inducer of vascular permeability [4, 5] and might exert this effect through up-regulation of the expression of adhesion molecules, thereby promoting leukocyte infiltration in atherosclerotic plaques.[6-8] Previous studies have indicated that excess VEGF may contribute to neovascularization of atherosclerotic lesions.[9] Plaque neovascularization is associated with intra-plaque haemorrhage/rupture [10-14] and plaque progression.[15-17] Therefore, high VEGF levels might promote plaque growth through inflammation.[18]

VEGF concentrations (plasma and serum) have been associated with multiple cardiovascular risk factors such as dyslipidemia [19], hypertension [20], diabetes [21, 22] and age.[23] A large population-based prospective case-control study found that baseline VEGF levels were associated with cardiovascular mortality.[23] The association between VEGF levels and coronary artery disease (CAD) severity has been controversial,

with some studies showing that VEGF levels correlate with CAD severity [24-27] while others have failed to demonstrate any association.[28-32] However, these studies assessed the severity of CAD by its most severe clinical presentation in patients' history and/or by the number of diseased coronary vessels without taking into account a global detailed quantitative assessment of CAD. Therefore, we aimed to study the relationship between VEGF and CAD severity using both quantitative coronary angiography (QCA) of all coronary arteries and intravascular ultrasonography (IVUS). QCA provides a global evaluation of coronary atherosclerotic disease including all angiographically detectable lesions. We also assessed coronary plaque morphology and atheroma burden using IVUS. We hypothesized that coronary atherosclerosis burden revealed by IVUS and QCA would be associated with circulating VEGF concentrations. Our main findings reveal the association between VEGF concentrations and clinical status (stable CAD vs Acute Coronary Syndrome) as well as with CAD severity in stable CAD patients.

Methods:

Patient population

We performed a cross-sectional analysis of a subset of patients enrolled in the previously published ERASE (baseline data)[33], NIRS [34] and MDCT studies [35] and of patients from the REsearch into Progenitor Angiogenesis cells In atherosclerosis (REPAIR) study, with 56 patients presenting with stable CAD and 112 patients with an ACS.[36] Patients were considered to have an ACS if they presented with unstable angina, ST segment elevation MI (STEMI) or non-STEMI (NSTEMI). All patients underwent coronary angiography for either stable CAD or ACS.

Clinical follow-up

Medical records of all patients were reviewed to determine if cardiovascular events occurred during follow-up. We considered myocardial infarction, angina requiring hospitalisation, heart failure requiring hospitalisation, stroke, need for further revascularization (PCI or CABG) and death as cardiovascular events.

Quantitative coronary angiography (QCA) and intravascular ultrasonography (IVUS)

Coronary angiography was performed as previously described.[33, 37-42] All angiograms were analyzed at the Montreal Heart Institute QCA core laboratory using the Clinical Measurements Solutions system (MEDIS, Leiden, the Netherlands) by experienced technicians supervised by a physician. The coronary artery segments that

were analyzed included all those with a reference diameter >1.5 mm. End-diastolic frames showing the most severe degree of stenosis were selected from angiograms. The cumulative coronary stenosis (CCS) score was obtained by measuring and adding the percentages of stenosis of lumen diameter ; this is an index of the anatomic extent and severity of CAD, with higher values reflecting more severe disease.[43] The CCS score has previously been used to assess global atherosclerotic plaque burden in other studies.[37, 44, 45] The plaque area sum (PAS) score was obtained by measuring and adding the plaque area of all the coronary stenosis present in the analyzed segments. It is also an index of the anatomic extent and severity of CAD, with higher values also reflecting more severe disease.

IVUS examinations of one target coronary artery per patient were performed using 40-MHz catheters as previously described.[37] Intracoronary nitroglycerin (0.15 mg) was administered prior to IVUS examination. To facilitate the IVUS examination, we examined target coronary arteries with a reference diameter >2.5 mm by visual angiographic assessment and with stenosis of 50% or less. In addition, this target artery should not have been the subject of previous or present revascularization and had to be free of radiographic contrast filling defects. The lumen and external elastic membrane borders were manually traced on digitized cross-sections along the 30-mm segment of interest. Plaque, lumen, and total vessel volumes were computed for the entire length of the analyzed segments by multiplying the corresponding areas of each cross-section by the distance between neighboring slices and then adding all the products. Percent atheroma (plaque) volume was computed by dividing plaque volume by total vessel volume and then multiplying by 100.

VEGF measurements

Serum was collected prior to coronary angiography and VEGF-A was measured using human VEGF Quantikine ELISA kit (R&D systems).

Statistical analysis

Patients' baseline characteristics are presented as mean and standard deviation for continuous variables and numbers and percentages for categorical variables. VEGF levels were compared between stable CAD and ACS patients using a Student's t-test. Pearson's (or Spearman's depending on data distribution) correlation coefficients were used to study the relationship between VEGF levels and different characteristics including CCS score and IVUS parameters. In addition, multivariate linear regressions were used to study the relationship between VEGF levels, CCS score and PAS score in the presence of other potential determinants (traditional CAD risk factors: age, hypertension, diabetes, body mass index, dyslipidemia, smoking status) of this score, with the CCS score and PAS score as the dependent variables. Serum VEGF levels were compared using logistic regression between patients who had a clinical event during follow-up and those who did not. Statistical analyses were conducted using SPSS version 21 and $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results:

Clinical characteristics

The clinical characteristics of stable CAD patients (n=56) and ACS patients (n=112) were similar as were the drug therapies, except for the use of clopidogrel which was more common in patients with ACS (Table 1). In ACS patients, mean time from ACS presentation to blood sampling was 3.2 days (standard deviation of 4.0 days).

VEGF and cardiovascular risk factors / drug treatments

Serum VEGF concentrations were higher in stable CAD patients compared to ACS patients (288 ± 208 pg/ml vs 182 ± 157 pg/ml, $p=0.001$). There was no association between VEGF levels and both cardiovascular risk factors and drug treatments (Table 2) with the exception of platelet level that was positively associated with VEGF levels ($p=0.016$) in ACS patients (Figure 4).

VEGF levels and CAD severity measured by QCA and IVUS

Serum VEGF concentrations correlated with the extent and severity of coronary atherosclerotic disease measured by the CCS score on QCA in stable CAD patients ($r=0.423$, $p=0.001$; Figure 1) but not in ACS patients ($r=0.010$, $p=0.920$). In a multivariate analysis, serum VEGF levels remained significantly associated with CCS score ($p=0.003$), along with age ($p=0.007$), in patients with stable CAD (Table 3), with every increase of 100 pg/ml of VEGF associated with an increase of 40.3 in the CCS score. A multivariate analysis also confirmed that VEGF serum levels were also associated with PAS score ($p=0.002$), along with age ($p=0.010$) in patients with stable CAD (Table 4), with every increase of 100 pg/ml of VEGF associated with an increase of 42.1 in the PAS score. In

addition, serum VEGF concentration correlated with IVUS-determined coronary artery plaque volume ($r=0.381$, $p=0.035$) as well as percent atheroma volume ($r=0.466$, $p=0.008$) in patients with stable CAD (Figure 2). There was no association between IVUS measurements and CAD severity in patients presenting with an ACS.

VEGF levels and clinical events at follow-up

Follow-up data were available for 83 patients with ACS and 50 patients with stable CAD. Mean follow-up duration was 740 days. Sixteen patients with ACS had at least one clinical cardiovascular event reported during follow-up, 4 MIs, 7 hospitalisations for angina, 4 strokes/transient ischemic attacks, 4 CABGs and 5 PCIs. In the stable CAD group, 11 patients had at least one cardiovascular event reported during follow-up, with 2 deaths, 1 MI, 9 hospitalisations for angina, 1 stroke, 1 heart failure hospitalisation, 3 CABGs and 4 PCIs. There was no statistically significant difference in serum VEGF levels between patients with cardiovascular events and patients with no cardiovascular events

Discussion

The main findings of our study are that 1) serum VEGF concentrations are higher in patients with stable CAD than those with ACS; 2) VEGF concentrations in patients with stable CAD were associated with global coronary atherosclerotic plaque burden as assessed by QCA and IVUS; and 3) the relationship between VEGF and CAD burden was independent of cardiovascular risk factors. To our knowledge, this is the first study showing the association between serum VEGF levels and global coronary atherosclerotic

plaque burden measured by the CCS and PAS scores on QCA, coronary plaque volume and percent atheroma volume on IVUS.

VEGF is a pro-inflammatory angiogenic vascular growth factor.[18] Interestingly, in our cross-sectional study, VEGF was quantitatively associated with CAD severity, suggesting that VEGF might be involved in the pathophysiology of coronary atherosclerosis. This relationship was apparent in patients with stable CAD, whereas VEGF concentrations were not associated with coronary disease severity in ACS patients. We think this observation could be explained by the natural history of CAD. In stable CAD, the natural history involves plaque progression and as we have shown in this analysis, CAD severity is also independently associated with age. In contrast, ischemic symptoms in ACS patients are provoked by acute limitation in coronary blood flow due to rupture of an atherosclerotic coronary artery plaque. Many ACS events occur due to rupture of relatively mild lesions. Furthermore, we did not find any association between circulating VEGF concentration and peak troponin concentration. Therefore, we conclude that VEGF is related to the burden of stable CAD but not with the processes leading to ACS.

Mechanistically, the partial pressure of oxygen is reduced in atherosclerotic plaque and in tissue subtended by narrowed arteries. Therefore, since VEGF production is triggered by hypoxia,[46] local hypoxia within myocardial tissue related to flow-limiting coronary disease could be the driver for higher circulating VEGF levels in patients with a greater burden of CAD. Therefore, since our study is cross-sectional, we cannot draw a conclusion on whether higher VEGF concentrations reflect a cause or an effect of greater coronary disease burden.

VEGF serum and plasma levels have been associated with increased triglycerides and LDL-cholesterol levels.[19, 47] It has recently been demonstrated that VEGF might exert its pro-atherogenic lipid effects by lowering plasma lipoprotein lipase activity.[48] Statin therapy has been associated with a reduction in plasma VEGF levels [19, 49], but contradictory studies have yielded different results with regards to statin effects on serum VEGF levels.[47, 50] We did not observe any differences in serum VEGF levels between statin-treated and non-statin-treated stable CAD patients.

Although we used serum VEGF levels for our study, it has been advocated that serum concentrations might be a reflection of platelet and leukocyte counts rather than a true measure of free circulating VEGF, as platelets and leukocytes could release VEGF during clotting.[51] However, we did not observe any association between the levels of platelets or leukocytes and serum VEGF levels in stable CAD patients. In contrast, we observed a significant, albeit not very strong, correlation between circulating platelet levels and serum VEGF levels ($r=0.234$, $p=0.016$) in patients with ACS (Figure 4). This could be explained by the known release of VEGF by platelets when they are activated, as platelet activation is heightened in the ACS setting.[52, 53]

Previous studies that failed to demonstrate a relationship between VEGF levels and CAD severity were different from this study, as some measured plasma and not serum VEGF concentration. [28-30] Serum VEGF levels, but not plasma concentrations, have been associated with cardiovascular events and mortality.[23, 54] Furthermore, the studies which could not show a link between VEGF levels and CAD severity did not include a quantitative angiographic assessment of CAD. We also reported in this study that serum VEGF levels were correlated with coronary plaque volume and percent atheroma volume

on IVUS. Our results support the findings of Fuchs et al. who recently reported that higher VEGF levels were associated with larger plaque volume.[55] We have previously shown that IVUS measurements of percent atheroma volume and plaque volume in a single coronary artery are correlated to the CCS score by QCA in all major coronary arteries.[37]

Limitations

Our study has limitations, including its relatively small size. Heparin administration is routinely used in the treatment of ACS, and heparin can bind to VEGF and potentially greatly reduce its serum concentration [56-58]. The use of heparin in our ACS patients might therefore explain the lack of correlation between serum VEGF levels and the severity and extent of CAD in this group. There were a few patients who were lost at follow-up (9%). Finally, the cross-sectional design of the study does not allow for the determination of causality.

In conclusion, our study supports the potential value of serum VEGF level as a marker of CAD severity patients with stable CAD.

References

1. Roger, V.L., et al., *Heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association*. Circulation, 2012. **125**(1): p. e2-e220.
2. Libby, P., *Mechanisms of acute coronary syndromes*. N Engl J Med, 2013. **369**(9): p. 883-4.
3. Braunwald, E. and R.O. Bonow, *Braunwald's heart disease : a textbook of cardiovascular medicine*. 9th ed. 2012, Philadelphia: Saunders. xxiv, 1961 p.
4. Murohara, T., et al., *Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin*. Circulation, 1998. **97**(1): p. 99-107.
5. Neagoe, P.E., C. Lemieux, and M.G. Sirois, *Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A165-induced prostacyclin synthesis requires the activation of VEGF receptor-1 and -2 heterodimer*. The Journal of biological chemistry, 2005. **280**(11): p. 9904-12.
6. de Boer, O.J., et al., *Leucocyte recruitment in rupture prone regions of lipid-rich plaques: a prominent role for neovascularization?* Cardiovascular research, 1999. **41**(2): p. 443-9.
7. O'Brien, K.D., et al., *Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content*. Circulation, 1996. **93**(4): p. 672-82.
8. O'Brien, K.D., et al., *Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques. Implications for the mode of progression of advanced coronary atherosclerosis*. The Journal of clinical investigation, 1993. **92**(2): p. 945-51.
9. Celletti, F.L., et al., *Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression*. Nat Med, 2001. **7**(4): p. 425-9.
10. Burke, A.P., et al., *Plaque rupture and sudden death related to exertion in men with coronary artery disease*. JAMA : the journal of the American Medical Association, 1999. **281**(10): p. 921-6.
11. Mofidi, R., et al., *Association between plaque instability, angiogenesis and symptomatic carotid occlusive disease*. The British journal of surgery, 2001. **88**(7): p. 945-50.
12. Jeziorska, M. and D.E. Woolley, *Local neovascularization and cellular composition within vulnerable regions of atherosclerotic plaques of human carotid arteries*. The Journal of pathology, 1999. **188**(2): p. 189-96.
13. Kockx, M.M., et al., *Phagocytosis and macrophage activation associated with hemorrhagic microvessels in human atherosclerosis*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2003. **23**(3): p. 440-6.
14. Fleiner, M., et al., *Arterial neovascularization and inflammation in vulnerable patients: early and late signs of symptomatic atherosclerosis*. Circulation, 2004. **110**(18): p. 2843-50.
15. Inoue, M., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerotic lesions: possible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis*. Circulation, 1998. **98**(20): p. 2108-16.

16. Celletti, F.L., et al., *Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression*. *Nature medicine*, 2001. **7**(4): p. 425-9.
17. Virmani, R., et al., *Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage*. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 2005. **25**(10): p. 2054-61.
18. Holm, P.W., et al., *Atherosclerotic plaque development and instability: a dual role for VEGF*. *Ann Med*, 2009. **41**(4): p. 257-64.
19. 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*. *The American journal of cardiology*, 2001. **87**(10): p. 1160-3.
20. Belgore, F.M., et al., *Plasma levels of vascular endothelial growth factor and its soluble receptor (SFlt-1) in essential hypertension*. *The American journal of cardiology*, 2001. **87**(6): p. 805-7, A9.
21. Chiarelli, F., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) in children, adolescents and young adults with Type 1 diabetes mellitus: relation to glycaemic control and microvascular complications*. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*, 2000. **17**(9): p. 650-6.
22. Wasada, T., et al., *Plasma concentration of immunoreactive vascular endothelial growth factor and its relation to smoking*. *Metabolism: clinical and experimental*, 1998. **47**(1): p. 27-30.
23. Eaton, C.B., et al., *Prospective association of vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) with coronary heart disease mortality in southeastern New England*. *Atherosclerosis*, 2008. **200**(1): p. 221-7.
24. Fleisch, M., et al., *Physiologically assessed coronary collateral flow and intracoronary growth factor concentrations in patients with 1- to 3-vessel coronary artery disease*. *Circulation*, 1999. **100**(19): p. 1945-50.
25. Kucukardali, Y., et al., *The relationship between severity of coronary artery disease and plasma level of vascular endothelial growth factor*. *Cardiovascular revascularization medicine : including molecular interventions*, 2008. **9**(2): p. 66-70.
26. Nissen, S.E., et al., *Effect of very high-intensity statin therapy on regression of coronary atherosclerosis: the ASTEROID trial*. *JAMA*, 2006. **295**(13): p. 1556-65.
27. Nakajima, K., et al., *Plasma vascular endothelial growth factor level is elevated in patients with multivessel coronary artery disease*. *Clinical cardiology*, 2004. **27**(5): p. 281-6.
28. Alber, H.F., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) plasma concentrations in coronary artery disease*. *Heart*, 2005. **91**(3): p. 365-6.
29. Chung, N.A., et al., *Angiogenesis, thrombogenesis, endothelial dysfunction and angiographic severity of coronary artery disease*. *Heart*, 2003. **89**(12): p. 1411-5.
30. Kim, S.Y., et al., *Vascular endothelial growth factor, soluble fms-like tyrosine kinase 1, and the severity of coronary artery disease*. *Angiology*, 2011. **62**(2): p. 176-83.
31. Karu, I., et al., *Growth factors serum levels in coronary artery disease patients scheduled for bypass surgery: perioperative dynamics and comparisons with healthy volunteers*. *Biomed Res Int*, 2013. **2013**: p. 985404.

32. Yao, Y.Y., et al., *Tissue kallikrein is related to the severity of coronary artery disease*. Clin Chim Acta, 2013. **423**: p. 90-8.
33. Tardif, J.C., et al., *Effects of reconstituted high-density lipoprotein infusions on coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial*. JAMA : the journal of the American Medical Association, 2007. **297**(15): p. 1675-82.
34. Waxman, S., et al., *In vivo validation of a catheter-based near-infrared spectroscopy system for detection of lipid core coronary plaques: initial results of the SPECTACL study*. JACC Cardiovasc Imaging, 2009. **2**(7): p. 858-68.
35. Ugolini, P., et al., *Evaluation of coronary atheroma by 64-slice multidetector computed tomography: Comparison with intravascular ultrasound and angiography*. Can J Cardiol, 2009. **25**(11): p. 641-7.
36. !!! INVALID CITATION !!!
37. Berry, C., et al., *Comparison of intravascular ultrasound and quantitative coronary angiography for the assessment of coronary artery disease progression*. Circulation, 2007. **115**(14): p. 1851-7.
38. Cote, G., et al., *Effects of probucol on vascular remodeling after coronary angioplasty*. Multivitamins and Protocol Study Group. Circulation, 1999. **99**(1): p. 30-5.
39. Nissen, S.E., et al., *Effect of very high-intensity statin therapy on regression of coronary atherosclerosis: the ASTEROID trial*. JAMA : the journal of the American Medical Association, 2006. **295**(13): p. 1556-65.
40. Tardif, J.C., et al., *Effects of the acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase inhibitor avasimibe on human atherosclerotic lesions*. Circulation, 2004. **110**(21): p. 3372-7.
41. Tardif, J.C., et al., *Design features of the Avasimibe and Progression of coronary Lesions assessed by intravascular UltraSound (A-PLUS) clinical trial*. American heart journal, 2002. **144**(4): p. 589-96.
42. Tardif, J.C., et al., *Effects of AGI-1067 and probucol after percutaneous coronary interventions*. Circulation, 2003. **107**(4): p. 552-8.
43. Solymoss, B.C., et al., *Effect of increasing metabolic syndrome score on atherosclerotic risk profile and coronary artery disease angiographic severity*. The American journal of cardiology, 2004. **93**(2): p. 159-64.
44. Solymoss, B.C., et al., *Incidence and clinical characteristics of the metabolic syndrome in patients with coronary artery disease*. Coron Artery Dis, 2003. **14**(3): p. 207-12.
45. Solymoss, B.C., et al., *Effect of increasing metabolic syndrome score on atherosclerotic risk profile and coronary artery disease angiographic severity*. Am J Cardiol, 2004. **93**(2): p. 159-64.
46. Zempenyi, T., D.W. Crawford, and M.A. Cole, *Adaptation to arterial wall hypoxia demonstrated in vivo with oxygen microcathodes*. Atherosclerosis, 1989. **76**(2-3): p. 173-9.
47. Trape, J., et al., *Vascular endothelial growth factor serum concentrations in hypercholesterolemic patients*. Scand J Clin Lab Invest, 2006. **66**(3): p. 261-7.
48. Heinonen, S.E., et al., *The effects of VEGF-A on atherosclerosis, lipoprotein profile, and lipoprotein lipase in hyperlipidaemic mouse models*. Cardiovasc Res, 2013. **99**(4): p. 716-23.

49. Alber, H.F., et al., *Atorvastatin decreases vascular endothelial growth factor in patients with coronary artery disease*. Journal of the American College of Cardiology, 2002. **39**(12): p. 1951-5.
50. Vasa, M., et al., *Increase in Circulating Endothelial Progenitor Cells by Statin Therapy in Patients With Stable Coronary Artery Disease*. Circulation, 2001. **103**(24): p. 2885-2890.
51. Jelkmann, W., *Pitfalls in the measurement of circulating vascular endothelial growth factor*. Clinical chemistry, 2001. **47**(4): p. 617-23.
52. Wartiovaara, U., et al., *Peripheral blood platelets express VEGF-C and VEGF which are released during platelet activation*. Thromb Haemost, 1998. **80**(1): p. 171-5.
53. Schlingemann, R.O., et al., *VEGF levels in plasma in relation to platelet activation, glycemic control, and microvascular complications in type 1 diabetes*. Diabetes Care, 2013. **36**(6): p. 1629-34.
54. Hahn, R.G., et al., *Vascular endothelial growth factor in serum indicates cardiovascular risk in urology patients*. Scand J Urol Nephrol, 2006. **40**(2): p. 144-8.
55. Fuchs, S., et al., *Intracoronary monocyte chemoattractant protein 1 and vascular endothelial growth factor levels are associated with necrotic core, calcium and fibrous tissue atherosclerotic plaque components: an intracoronary ultrasound radiofrequency study*. Cardiology, 2012. **123**(2): p. 125-32.
56. 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.
57. Tamura, K., et al., *Elevated circulating levels of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in patients with acute myocardial infarction*. Japanese circulation journal, 1999. **63**(5): p. 357-61.
58. Soeki, T., et al., *Serial changes in serum VEGF and HGF in patients with acute myocardial infarction*. Cardiology, 2000. **93**(3): p. 168-74.

Figure legends:

Figure 1: Serum vascular endothelial growth factor (VEGF) levels vs. coronary artery disease extent and severity measured by the cumulative coronary stenosis (CCS) score on QCA in patients with stable coronary artery disease.

Figure 2: Serum vascular endothelial growth factor (VEGF) levels vs. coronary artery disease extent and severity measured by the plaque area sum (PAS) score on QCA in patients with stable coronary artery disease.

Figure 3: Serum vascular endothelial growth factor (VEGF) levels vs. coronary percent atheroma volume as assessed by IVUS in patients with stable coronary artery disease.

Figure 4: Serum vascular endothelial growth factor (VEGF) levels vs. platelet counts in patients with an acute coronary syndrome (ACS).

Table 1: Demographic characteristics, risk factors and drug treatments of patients with stable coronary artery disease (CAD) and acute coronary syndrome (ACS)

	Stable CAD patients (n=56)	ACS patients (n=112)
Age (years)	61 ± 8	57 ± 9
BMI (kg/m²)	30 ± 5	28 ± 5
% Women	14 (25%)	22 (20%)
% Diabetics	2 (4%)	11 (10%)
% Smokers	20 (36%)	47 (42%)
% Dyslipidemics	46 (82%)	84 (75%)
% Hypertensive	36 (64%)	60 (54%)
% Prior MI	6 (10%)	12 (11%)
% Prior PCI	3 (5%)	10 (9%)
% Prior CABG	0 (0%)	0 (0%)
% Aspirin use	53 (95%)	110 (98%)
% Clopidogrel use	27 (48%)	100 (89%)
% Prior statin	33 (59%)	55 (49%)
% ACEi	17 (31%)	44 (39%)
% ARB	3 (5%)	10 (9%)
% Beta-blocker	47 (84%)	88 (79%)
% Nitrate	10 (18%)	29 (26%)
% Calcium channel blocker	6 (11%)	21 (19%)

Abbreviations: ACEi, angiotensin converting enzyme inhibitor; ARB, angiotensin-receptor blocker; BMI, body mass index; CABG, coronary artery bypass graft; MI, myocardial infarction; PCI, percutaneous coronary intervention.

Continuous variables are presented as mean ± standard deviation, categorical variables are presented as n (%).

Table 2: Factors associated with serum vascular endothelial growth factor A (VEGF) levels in patients with stable coronary artery disease (CAD) and acute coronary syndrome (ACS)

	Stable CAD patients (n=56)	ACS patients (n=112)
	<i>p</i>	<i>p</i>
Age	0.251	0.809
Gender	0.430	0.571
BMI	0.661	0.624
Prior MI	0.175	0.743
Diabetes	0.917	0.502
Hypertension	0.411	0.728
Dyslipidemia	0.916	0.441
Smoking status	0.284	0.843
Aspirin	0.069	0.627
Clopidogrel	0.407	0.658
Statin	0.132	0.557
ACEi	0.632	0.261
ARB	0.554	0.266
Nitrate	0.487	0.343
Calcium channel blocker	0.744	0.195
Beta-Blocker	0.646	0.431
Hemoglobin	0.874	0.870
Platelets	0.363	0.016
Lymphocytes	0.948	0.702
Creatinine	0.985	0.702
Total cholesterol	0.693	0.154
HDL	0.461	0.769
Triglycerides	0.454	0.197
LDL	0.584	0.633

Abbreviations: ACEi, angiotensin converting enzyme inhibitor; ARB, angiotensin-receptor blocker; BMI, body mass index; HDL, high-density lipoprotein; MI, myocardial infarction; LDL, low-density lipoprotein.

Pearson correlations were performed for continuous variables and Spearman correlations were performed for categorical variables

Table 3: Multivariate linear regression on cumulative coronary stenosis (CCS) score

determined by QCA in patients with stable coronary artery disease (CAD)

Independent variables	Coefficient	<i>p</i>
VEGF serum levels (pg/ml)	0.403	0.003
Age (years)	11.927	0.007

Abbreviations: VEGF, vascular endothelial growth factor.

Table 4: Multivariate linear regression on plaque area sum (PAS) score determined by QCA in patients with stable coronary artery disease (CAD)

Independent variables	Coefficient	<i>p</i>
VEGF serum levels (pg/ml)	0.421	0.002
Age (years)	11.519	0.010

Abbreviations: VEGF, vascular endothelial growth factor.

Figure 1

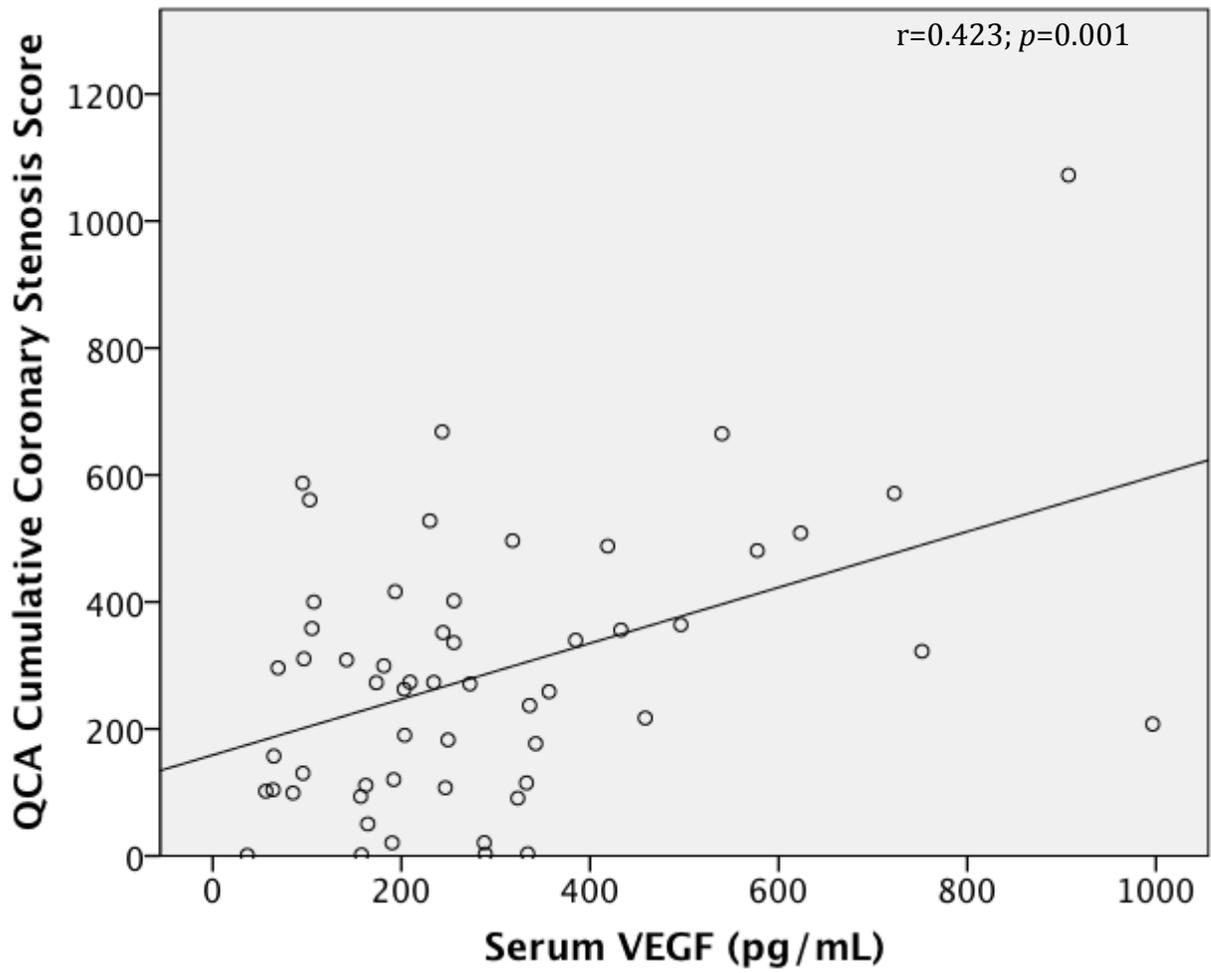


Figure 2

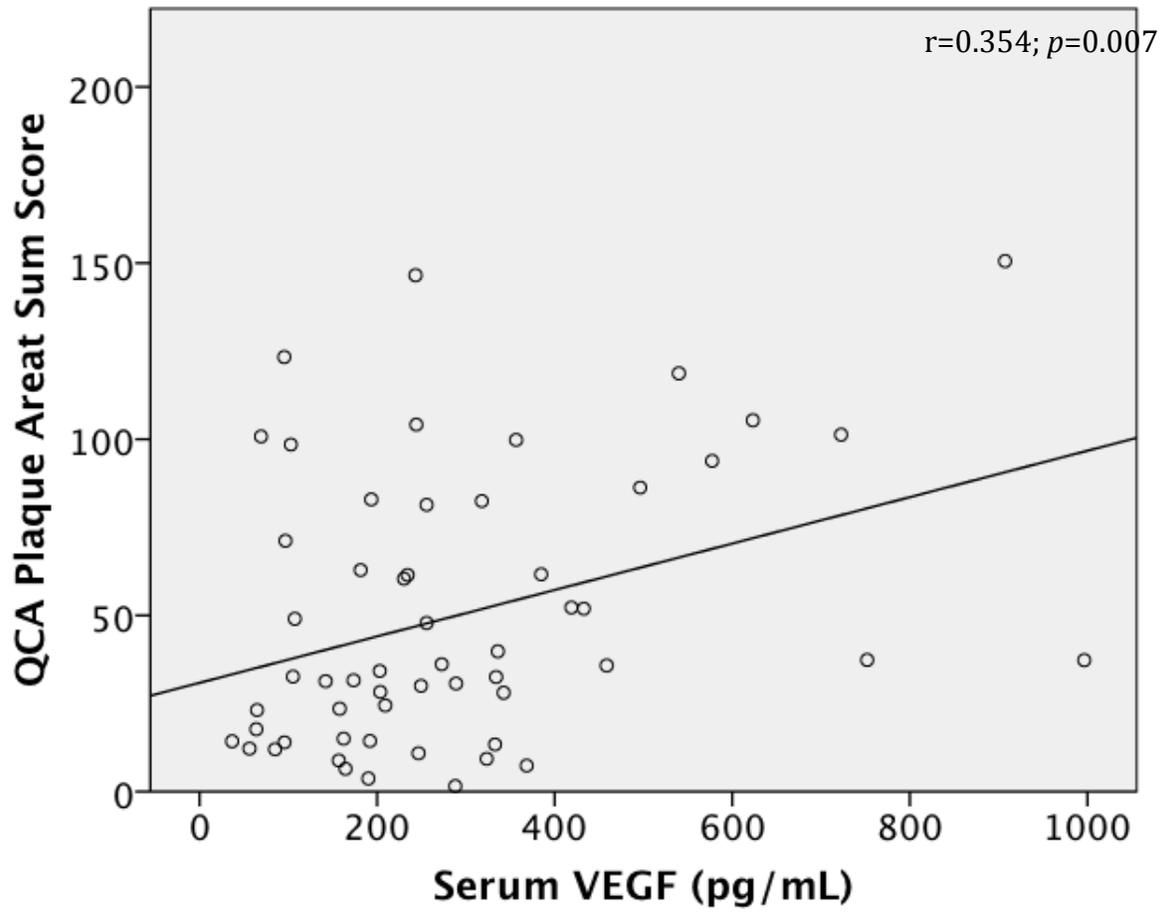


Figure 3

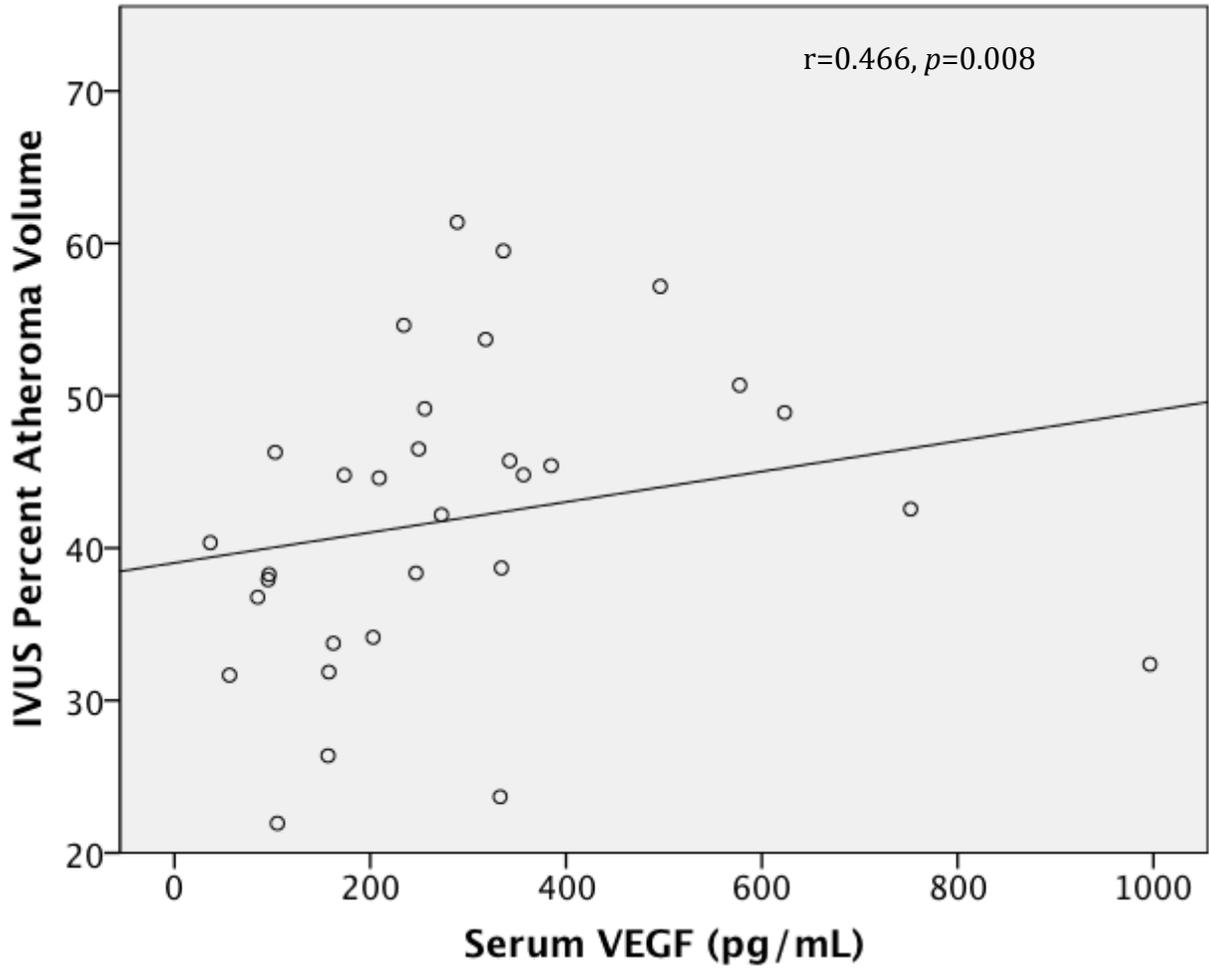
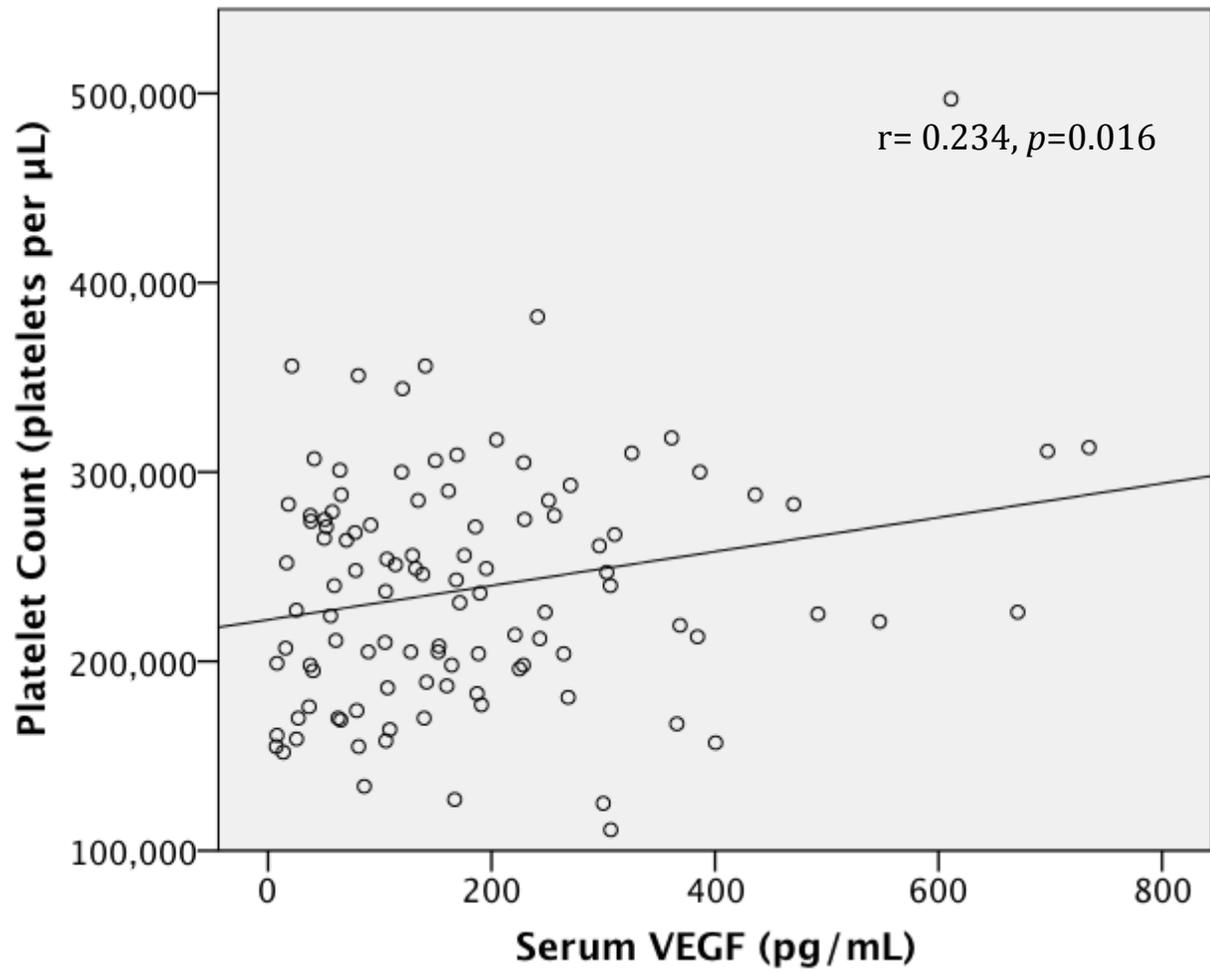


Figure 4



Chapitre 3 : Discussion

VEGF et QCA, patient avec MCAS stable

Nous avons observé une association significative entre les niveaux sériques de VEGF et le fardeau global d'athérosclérose mesuré par QCA CCSS chez les patients avec une maladie cardiaque athérosclérotique stable. Il s'agit de la première étude utilisant un marqueur objectif d'athérosclérose globale qu'est le QCA CCSS score effectuée et démontrant une association positive entre les niveaux de VEGF et la sévérité globale de la MCAS. Dans une analyse multivariée qui incluait les facteurs de risque cardiovasculaire traditionnels, le niveau de VEGF sérique demeurait un prédicteur indépendant du fardeau de MCAS global estimé par le CCSS.

VEGF et sévérité de la MCAS : Comparaison avec la littérature

La plausibilité biologique derrière l'utilisation du VEGF comme bio-marqueur d'athérosclérose a été présenté dans l'introduction. Puisque le VEGF contribue à l'inflammation et la néovascularisation des plaques athérosclérotiques, il pourrait contribuer à la croissance de ces dernières. Les plaques d'athérosclérose non significatives ont été exclues des études précédentes publiées sur la relation entre les niveaux de VEGF et la sévérité globale de la MCAS. Cependant, si on lance comme hypothèse que le VEGF peut avoir un lien de causalité avec l'athérosclérose, les plus petites lésions, définies comme <50 à 70%, ne devraient pas être épargnées par les effets du VEGF. Notre étude corrige ces lacunes, tout en ajoutant/corrigant pour la subjectivité et le manque de reproductibilité reconnus de la mesure de la

sévérité des lésions coronariennes lorsqu'elles sont évaluées par estimation visuelle.

De plus, certaines études précédentes ont pu être faussées dans l'interprétation de leurs résultats par certains facteurs confondants. Les méthodes de manipulation d'analyse et de manipulation des spécimens ainsi que l'administration d'héparine faite lors des syndromes coronariens aigus peuvent grandement changer les résultats de mesure de VEGF (voir ci-bas). Bien que les niveaux de VEGF soient abaissés par l'administration d'héparine en SCA, puisque que le SCA lui-même pouvait faire monter les niveaux de sanguins de VEGF suivant un infarctus, avec des montés de niveaux VEGF observés en 48h et continuant jusqu'à 6 semaines.[123]

Finalement, la relation entre les niveaux de VEGF et la MCAS pourrait être différente selon que l'on utilise les niveaux sériques de VEGF vs les niveaux plasmatiques (voir ci-bas).

Nous avons donc résumé les publications présentes dans la littérature portant sur l'association entre les niveaux circulant de VEGF en précisant la nature du prélèvement (plasmatique vs sérique), le nombre de patients, les trouvailles associatives (association positive ou manque d'association), la méthode de mesure de la sévérité de la MCAS et la présentation clinique du patient. (Voir tableau VI) Sur les 11 études, on voit ainsi que 7 ont étudiés les niveaux plasmatiques de VEGF par rapport à 4 qui ont étudiées les niveaux sériques. Quatre études ont trouvé une association positive entre les niveaux de VEGF et la sévérité de la MCAS. Il y avait cependant une très grande hétérogénéité de définition de la sévérité de la MCAS,

certaines études utilisant un score de Gensini modifié, d'autres le nombre de vaisseaux atteints, et d'autres la présence ou l'absence de MCAS. Même le % de sténose utilisé pour définir la sévérité de la MCAS variait d'une étude à l'autre. (50% vs 70% vs 75%). Devant autant d'hétérogénéité, plus de données comme les nôtres sont donc nécessaires pour mieux définir l'association entre les niveaux de VEGF et la MCAS.

Tableau VI : Revue de littérature des études sur l'association du VEGF à la MCAS

Premier auteur de l'étude	Journal, année de publication	Nombre de patients	MCAS Stable vs SCA	Méthode de mesure sévérité de MCAS	Sérum vs Plasma VEGF	Association positive entre les niveaux de VEGF et la MCAS vs pas de corrélation
Kawamoto [119]	International journal of cardiology 1998	75	45 patients avec SCA 30 sans MCAS	Contrôles vs ACS ils n'ont pas fait la corrélation avec nb de vaisseau mx	Sérum	Négative
Fleisch[112]	Circulation 1999	76	Stable	Sévérité en fonction du nombre de vaisseaux atteints (>50%)	Sérum	Positive
Blann[114]	Clinical Science 2002	140	70 MCAS Stable 70 patients contrôles	MCAS présente ou non	Plasma	Positive
Chung[115]	Heart 2003	144	111 MCAS Stable 34 patients contrôles	Sévérité en fonction du nombre de vaisseaux atteints (>50%) et <i>Coronary atheroma score</i>	Plasma	Négative
Nakajima [121]	Clinical cardiology 2004	143	73 patients avec MCAS stable 70 patients sans MCAS	Nombre de vaisseaux atteints (>75%) et score de Gensini modifié	Plasma	Positive (nombre de vaisseaux atteints) Négative (Score de Gensini modifié)
Alber[118]	Heart 2005	178	MCA stable	Score de Gensini modifié et nombre de vaisseaux avec des lésions >50%	Plasma	Négative

Kucukardali[116]	Cardiovascular revascularization medicine 2008	77	39 MCAS stable 38 pas de MCAS	Pas de lésion vs lésion > 70 % vs lésions < 70%	Plasma	Positive chez patients avec lésions > 70%
Battah[113]	Egypt Heart Journal 2009	78	57 ACS 21 patients contrôles	Score de Gensini modifié	Sérum	Négative
Kim[117]	Angiology 2011	224	112 CAD (mais mélange de MCAS stable et SCA) 112 patients contrôles	Nombre de vaisseaux avec des lésions >50%	Plasma	Négative
Karu[120]	Biomed research international 2013	78	39 patients avec MCAS stable 39 patients sans MCAS	CAD vs control	Sérum	Négative
Yao[122]	Clinica chimica acta 2013	133	68 patients avec MCAS stable 32 patients avec SCA	Score de Gensini modifié	Plasma	Négative

VEGF et aspirine

Nous avons observé une que les niveaux de VEGF sérique étaient plus bas chez les patients avec MCAS stable prenant de l'aspirine (276 pg/ml chez les patients prenant de l'aspirine vs 500 pg/ml pour les patients ne prenant pas d'aspirine, $p = 0.069$). Ces résultats sont à interpréter avec caution puisque seulement 3 patients n'avaient pas de prise d'aspirine dans le groupe avec MCAS stable. Néanmoins, les résultats observés vont dans le sens de ce qui est rapporté dans la littérature, en ce sens que les niveaux de VEGF sont diminués par la prise d'ASA. Dans la littérature cardiovasculaire, chez les patients en attente de chirurgie de pontage, les niveaux sériques de VEGF étaient 2.6 fois plus bas chez les patients prenant de l'ASA que chez ceux qui n'en prenaient pas.[124] De plus, chez les patients souffrant d'hypertension, il a également été démontré que les niveaux plasmatiques de VEGF étaient plus élevés chez les patients qui ne prenaient pas d'ASA comparé à ceux qui en prenaient.[125] L'ASA est un inhibiteur de la cyclo-oxygénase (COX) 1 et 2, qui ont été impliquées dans le développement de l'angiogenèse et la production de VEGF.[126-129] De plus en inhibant la COX-2, il a été démontré que l'on pouvait baisser les niveaux de VEGF dans plusieurs cancers.[130] Notre tendance observée va donc dans le sens des données présentes dans la littérature.

VEGF et héparine

Le site de l'affinité/liaison entre le VEGF et l'héparine a été décrit en 1998, et il se situe dans les 55 derniers acides aminés de sa portion carboxy-terminale.[131]

Plusieurs études ont démontré que l'administration d'héparine diminuait rapidement les niveaux de VEGF en syndrome coronarien aigué.[119, 132-134] Des baisses de l'ordre de 93% des niveaux sériques de VEGF étant même rapportées 30 minutes après l'administration d'héparine non-fractionnée.[135] Vu l'administration routinière d'héparine non fractionnée dans le traitement de l'infarctus du myocarde, la prescription d'héparine non fractionnée en SCA étant une recommandation de classe 1 de l'ACC/AHA,[136, 137] l'administration d'héparine explique probablement les plus faibles niveaux de VEGF sérique observés chez notre population de patients avec SCA et nous empêche ainsi possiblement d'observer une corrélation entre l'extension de la MCAS et les niveaux de VEGF. Moins de données sont disponibles dans la littérature concernant les effets des héparines de faible poids moléculaire sur les niveaux de VEGF. Dans une étude chez des patients dialysés, l'énoxaparine donnée durant les séances de dialyse ne démontraient pas de diminution dose-dépendante des niveaux de VEGF, alors que c'était le cas pour l'héparine non fractionnée.[138] Dans une étude avec des patients post-opératoire de chirurgie orthopédique, les niveaux de VEGF étaient peu influencés au suivi chez les patients recevant de l'énoxaparine. [139]

VEGF et IVUS

Nous avons trouvé que les niveaux sériques de VEGF corrélaient avec l'importance de la MCAS du vaisseau étudié en termes de *plaque volume* et % *atheroma burden*. Nos résultats confirment les seules données IVUS présentes dans la littérature à ce jour à ce sujet, puisque le groupe de Fuchs et coll. avaient rapporté

des résultats similaires, alors que le *plaque burden*/fardeau d'athérosclérose corrélait également de manière positive avec les niveaux sériques de VEGF.[140] La faiblesse principale de l'IVUS est qu'il n'est pas performé sur l'ensemble du réseau coronarien comme la coronarographie par analyse quantitative, mais seulement sur 1 vaisseau présentant une plaque acceptable pour la procédure (voir méthode). Ce faisant, il ne mesure pas directement le fardeau global d'athérosclérose coronarienne. Néanmoins, une large étude a démontré que prises simultanément, les mesures d'IVUS en terme de % *atheroma volume* et *plaque burden* faites sur un seul vaisseau corrélaient avec le CCSS, ce qui va dans le sens de nos résultats.[60]

VEGF et risque/mortalité cardiovasculaire

Une étude faite par Eaton et coll. en 2008 a démontré de manière prospective une association entre les niveaux sériques de VEGF et la mortalité cardiovasculaire.[141] Rapportée comme étant la première étude démontrant une telle relation, les niveaux sériques de VEGF obtenus prospectivement ont été comparés entre 46 patients décédés de MCAS et 325 contrôles sur un suivi de 13 ans. Ils ont remarqué que les niveaux sériques de VEGF plus élevés augmentaient le risque de mortalité cardiovasculaire, et que cette prédiction demeurait valide même après l'ajustement pour les facteurs de risque cardiovasculaires traditionnels définis dans le score de Framingham. Cette étude ne disposait malheureusement pas de données sur les évènements cardiovasculaires.

En 2006, Hanh et coll. avaient également rapportés que les niveaux sériques de VEGF pouvaient prédire non seulement la mortalité cardiovasculaire, mais également les évènements cardiovasculaires.[142] De manière prospective, dans une cohorte souffrant de trouble urologiques, les niveaux de VEGF avaient été collectés et la durée du suivi clinique était d'en moyenne 6 ans.

VEGF vs autres biomarqueurs de la MCAS

Le VEGF n'offre présentement pas d'avantage supplémentaire comparé aux autres biomarqueurs de la MCAS. Son intérêt principal comme biomarqueur pourrait grandir si de grandes études prospectives en venaient à démontrer une précision du VEGF supérieure aux biomarqueurs déjà connu. Il faudrait également vérifier si ce biomarqueur offre un avantage sur les outils de dépistage clinique de prédiction de la probabilité de la MCAS comme le score de Framingham qui combine des données cliniques (âge, sexe, pression artérielle, status tabagique, présence de diabète) ainsi que le biomarqueur qui reste le plus utilisé pour la prédiction du risque cardiovasculaire : le cholestérol.[143]

Limites de notre étude

Tout d'abord, la limite principale de notre étude se situe au niveau du lien de causalité qui est impossible à établir avec certitude puisque la nature rétrospective transversale de notre étude ne permet pas d'établir directement un lien de causalité entre les niveaux sériques de VEGF et la sévérité de la MCAS globale mesurée par

CCSS. Néanmoins, que le VEGF soit impliqué de manière causale ou bien qu'il soit la conséquence d'un fardeau ischémique plus élevé relié à la MCAS ne nous empêche pas de l'utiliser comme biomarqueur potentiel de l'extension de la MCAS.

Une autre limite de l'étude se situe au niveau de la manipulation des échantillons de VEGF, puisque bien que le protocole de laboratoire soit standardisé pour l'analyse des échantillons, le temps entre la collection et l'analyse des niveaux de VEGF sérique aurait pu varier d'un patient à l'autre. De plus, nous aurions aimé comparer les niveaux sériques et plasmatiques de VEGF mais puisque nous ne disposons pas de suffisamment de données pour les niveaux plasmatiques, cette comparaison a été impossible.

Le petit nombre de patient de notre étude est également une limite importante en ce sens qu'un plus grand nombre de patient nous aurait peut-être permis d'avoir une relation plus forte ou établie avec un plus grand niveau de confiance entre les niveaux sériques de VEGF et la sévérité de la MCAS mesurée par CCSS. De plus, vu le faible nombre de décès et d'évènements cardiovasculaires au suivi, un plus grand nombre de patients et d'évènements aurait possiblement pu nous donner la puissance de déceler une différence statistiquement significative au lieu de voir seulement les tendances observées en ce qui à trait à la relation entre les niveaux de VEGF et les décès/évènements cardiovasculaires.

Comme mentionné plus haut, l'utilisation d'héparine en SCA a également probablement biaisé nos données récoltées; puisque l'héparine peut abaisser drastiquement les niveaux de VEGF, la possibilité de voir une différence entre des groupes en est ainsi grandement diminuée.

Forces de notre étude

La force principale de notre étude réside dans l'innovation de notre évaluation de la sévérité globale de la MCAS. Le CCSS a déjà été utilisé dans d'autres études afin de mesurer le fardeau global de la MCAS, mais il s'agit de sa première utilisation pour valider le VEGF comme biomarqueur d'athérosclérose. Notre étude est également seulement la deuxième dans la littérature à décrire une relation entre les données obtenues par IVUS et la sévérité de la MCAS.

Chapitre 4 : Conclusions

En conclusion, nous rapportons une relation positive entre les niveaux sériques de VEGF et la sévérité de la MCAS étudiée avec le CCSS. Notre étude ouvre la voie pour une utilisation potentielle du VEGF sérique comme biomarqueur d'athérosclérose coronarienne chez les patients ayant une MCAS stable. Cependant, vu notre petit nombre de patients présents dans notre cohorte, une plus large étude serait nécessaire pour confirmer nos trouvailles. Vu l'utilisation de plus en plus répandue du CT cardiaque et du score de calcification des artères coronariennes, une étude prospective dans laquelle les niveaux sériques de VEGF seraient collectés de manière standardisée lors des examens au CT cardiaque nous permettraient de valider cette relation de manière non invasive et avec un plus grand échantillon de patients. Cela nous permettrait également de mieux évaluer la signification du VEGF sérique comme marqueur d'évènements coronariens.

Bibliographie

1. Canada, S. *Les principales causes de décès au Canada - 2009*. 2013 2013-09-24 [cited 2013 2013-09-24].
2. Moore, K.J. and I. Tabas, *Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis*. Cell, 2011. **145**(3): p. 341-55.
3. Chiu, J.J. and S. Chien, *Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives*. Physiol Rev, 2011. **91**(1): p. 327-87.
4. Mohler, E.R., *Endothelial Dysfonction*, ed. Uptodate. 2013: Uptodate.
5. Davignon, J. and P. Ganz, *Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis*. Circulation, 2004. **109**(23 Suppl 1): p. III27-32.
6. Cai, H. and D.G. Harrison, *Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress*. Circ Res, 2000. **87**(10): p. 840-4.
7. Braunwald, E. and R.O. Bonow, *Braunwald's heart disease : a textbook of cardiovascular medicine*. 9th ed. 2012, Philadelphia: Saunders. xxiv, 1961 p.
8. Weber, C. and H. Noels, *Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options*. Nat Med, 2011. **17**(11): p. 1410-22.
9. Kleemann, R., S. Zadelaar, and T. Kooistra, *Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice*. Cardiovasc Res, 2008. **79**(3): p. 360-76.
10. Strong, J.P., et al., *Prevalence and extent of atherosclerosis in adolescents and young adults: implications for prevention from the Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth Study*. JAMA : the journal of the American Medical Association, 1999. **281**(8): p. 727-35.
11. Fauci, A.S. *Harrison's principles of internal medicine*. 2008; 17th:[2 v. (various pagings) ill. (some col.) 29 cm. + 1 DVD (4 3/4 in.)].
12. Loscalzo, J. and T.R. Harrison, *Harrison's cardiovascular medicine*. 2nd ed. 2013, New York: McGraw-Hill Medical. p.
13. Harvey, W. and E.T. McMullen, *William Harvey's De motu cordis : a new translation and Latin edition*. 2005, Bethesda, MD: Academica Press. xxiii, 236 p.
14. Balady, G.J., et al., *Usefulness of exercise testing in the prediction of coronary disease risk among asymptomatic persons as a function of the Framingham risk score*. Circulation, 2004. **110**(14): p. 1920-5.
15. Maddahi, J., et al., *Myocardial perfusion imaging with technetium-99m sestamibi SPECT in the evaluation of coronary artery disease*. Am J Cardiol, 1990. **66**(13): p. 55E-62E.
16. Garber, A.M. and N.A. Solomon, *Cost-effectiveness of alternative test strategies for the diagnosis of coronary artery disease*. Ann Intern Med, 1999. **130**(9): p. 719-28.
17. Kannel, W.B., D. McGee, and T. Gordon, *A general cardiovascular risk profile: the Framingham Study*. Am J Cardiol, 1976. **38**(1): p. 46-51.
18. Biomarkers Definitions Working, G., *Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework*. Clin Pharmacol Ther, 2001. **69**(3): p. 89-95.

19. Vasan, R.S., *Biomarkers of cardiovascular disease: molecular basis and practical considerations*. Circulation, 2006. **113**(19): p. 2335-62.
20. Kamstrup, P.R., et al., *Genetically elevated lipoprotein(a) and increased risk of myocardial infarction*. JAMA, 2009. **301**(22): p. 2331-9.
21. Emerging Risk Factors, C., et al., *Lipoprotein(a) concentration and the risk of coronary heart disease, stroke, and nonvascular mortality*. JAMA, 2009. **302**(4): p. 412-23.
22. Anderson, T.J., et al., *2012 update of the Canadian Cardiovascular Society guidelines for the diagnosis and treatment of dyslipidemia for the prevention of cardiovascular disease in the adult*. Can J Cardiol, 2013. **29**(2): p. 151-67.
23. Emerging Risk Factors, C., et al., *C-reactive protein concentration and risk of coronary heart disease, stroke, and mortality: an individual participant meta-analysis*. Lancet, 2010. **375**(9709): p. 132-40.
24. Zacho, J., et al., *Genetically elevated C-reactive protein and ischemic vascular disease*. N Engl J Med, 2008. **359**(18): p. 1897-908.
25. Ridker, P.M., et al., *Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein*. N Engl J Med, 2008. **359**(21): p. 2195-207.
26. Shah, T., et al., *Critical appraisal of CRP measurement for the prediction of coronary heart disease events: new data and systematic review of 31 prospective cohorts*. Int J Epidemiol, 2009. **38**(1): p. 217-31.
27. Fibrinogen Studies, C., et al., *Plasma fibrinogen level and the risk of major cardiovascular diseases and nonvascular mortality: an individual participant meta-analysis*. JAMA, 2005. **294**(14): p. 1799-809.
28. Homocysteine Studies, C., *Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis*. JAMA, 2002. **288**(16): p. 2015-22.
29. Dent, T.H., *Predicting the risk of coronary heart disease I. The use of conventional risk markers*. Atherosclerosis, 2010. **213**(2): p. 345-51.
30. Selvin, E., et al., *Glycated hemoglobin, diabetes, and cardiovascular risk in nondiabetic adults*. N Engl J Med, 2010. **362**(9): p. 800-11.
31. Topol, E.J. and P.S. Teirstein, *Textbook of interventional cardiology*. 6th ed. 2012, Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders. xvii, 909 p.
32. Mueller, R.L. and T.A. Sanborn, *The history of interventional cardiology: cardiac catheterization, angioplasty, and related interventions*. Am Heart J, 1995. **129**(1): p. 146-72.
33. Fye, W.B., *Coronary arteriography--it took a long time!* Circulation, 1984. **70**(5): p. 781-7.
34. Sones, F.M., Jr. and E.K. Shirey, *Cine coronary arteriography*. Mod Concepts Cardiovasc Dis, 1962. **31**: p. 735-8.
35. Mintz, G.S., et al., *Limitations of angiography in the assessment of plaque distribution in coronary artery disease: a systematic study of target lesion eccentricity in 1446 lesions*. Circulation, 1996. **93**(5): p. 924-31.
36. DeRouen, T.A., J.A. Murray, and W. Owen, *Variability in the analysis of coronary arteriograms*. Circulation, 1977. **55**(2): p. 324-8.
37. Goldberg, R.K., et al., *Comparison of quantitative coronary angiography to visual estimates of lesion severity pre and post PTCA*. Am Heart J, 1990. **119**(1): p. 178-84.

38. Zir, L.M., *Observer variability in coronary angiography*. Int J Cardiol, 1983. **3**(2): p. 171-3.
39. Shub, C., et al., *The unpredictable progression of symptomatic coronary artery disease: a serial clinical-angiographic analysis*. Mayo Clin Proc, 1981. **56**(3): p. 155-60.
40. Fleming, R.M., et al., *Patterns in visual interpretation of coronary arteriograms as detected by quantitative coronary arteriography*. J Am Coll Cardiol, 1991. **18**(4): p. 945-51.
41. Brown, B.G., et al., *Quantitative coronary arteriography: estimation of dimensions, hemodynamic resistance, and atheroma mass of coronary artery lesions using the arteriogram and digital computation*. Circulation, 1977. **55**(2): p. 329-37.
42. Kern, M.J., *Quantitative coronary angiography: Technical Issues*. 2013, Waltham, MA: UpToDate.
43. Chatterjee, K., *Cardiology : an illustrated textbook*. 1st ed. 2013, New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publisher.
44. Kishon, Y., et al., *Measurement of coronary arterial lumen by densitometric analysis of angiograms*. Angiology, 1979. **30**(5): p. 304-12.
45. Terres, W., et al., *Rapid angiographic progression of coronary artery disease in patients with elevated lipoprotein(a)*. Circulation, 1995. **91**(4): p. 948-50.
46. Quinn, T.G., et al., *Development of new coronary atherosclerotic lesions during a 4-year multifactor risk reduction program: the Stanford Coronary Risk Intervention Project (SCRIP)*. J Am Coll Cardiol, 1994. **24**(4): p. 900-8.
47. Stone, P.H., et al., *Natural history of coronary atherosclerosis using quantitative angiography in men, and implications for clinical trials of coronary regression. The Harvard Atherosclerosis Reversibility Project Study Group*. Am J Cardiol, 1993. **71**(10): p. 766-72.
48. Ballantyne, C.M., et al., *Effect of rosuvastatin therapy on coronary artery stenoses assessed by quantitative coronary angiography: a study to evaluate the effect of rosuvastatin on intravascular ultrasound-derived coronary atheroma burden*. Circulation, 2008. **117**(19): p. 2458-66.
49. *Effect of simvastatin on coronary atheroma: the Multicentre Anti-Atheroma Study (MAAS)*. Lancet, 1994. **344**(8923): p. 633-8.
50. Choi, S.H., et al., *Relationship between biomarkers of oxidized low-density lipoprotein, statin therapy, quantitative coronary angiography, and atheroma: volume observations from the REVERSAL (Reversal of Atherosclerosis with Aggressive Lipid Lowering) study*. J Am Coll Cardiol, 2008. **52**(1): p. 24-32.
51. Serruys, P.W., et al., *Restenosis revisited: insights provided by quantitative coronary angiography*. Am Heart J, 1993. **126**(5): p. 1243-67.
52. Foley, D.P., et al., *Prevention of restenosis after coronary balloon angioplasty: rationale and design of the Fluvastatin Angioplasty Restenosis (FLARE) Trial. The FLARE Study Group*. Am J Cardiol, 1994. **73**(14): p. 50D-61D.
53. Foley, J.B., et al., *Safety, success, and restenosis after elective coronary implantation of the Palmaz-Schatz stent in 100 patients at a single center*. Am Heart J, 1993. **125**(3): p. 686-94.

54. Ellis, S.G., et al., *Restenosis after placement of Palmaz-Schatz stents in native coronary arteries. Initial results of a multicenter experience.* *Circulation*, 1992. **86**(6): p. 1836-44.
55. Strikwerda, S., et al., *Immediate and late outcome of excimer laser and balloon coronary angioplasty: a quantitative angiographic comparison based on matched lesions.* *J Am Coll Cardiol*, 1995. **26**(4): p. 939-46.
56. Umans, V.A., et al., *Clinical, histologic and quantitative angiographic predictors of restenosis after directional coronary atherectomy: a multivariate analysis of the renarrowing process and late outcome.* *J Am Coll Cardiol*, 1994. **23**(1): p. 49-58.
57. Gensini, G.G., *A more meaningful scoring system for determining the severity of coronary heart disease.* *Am J Cardiol*, 1983. **51**(3): p. 606.
58. Solymoss, B.C., et al., *Effect of increasing metabolic syndrome score on atherosclerotic risk profile and coronary artery disease angiographic severity.* *Am J Cardiol*, 2004. **93**(2): p. 159-64.
59. Solymoss, B.C., et al., *Incidence and clinical characteristics of the metabolic syndrome in patients with coronary artery disease.* *Coron Artery Dis*, 2003. **14**(3): p. 207-12.
60. Berry, C., et al., *Comparison of intravascular ultrasound and quantitative coronary angiography for the assessment of coronary artery disease progression.* *Circulation*, 2007. **115**(14): p. 1851-7.
61. Glagov, S., et al., *Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries.* *N Engl J Med*, 1987. **316**(22): p. 1371-5.
62. Nakamura, S., et al., *Intracoronary ultrasound observations during stent implantation.* *Circulation*, 1994. **89**(5): p. 2026-34.
63. Goldberg, S.L., et al., *Benefit of intracoronary ultrasound in the deployment of Palmaz-Schatz stents.* *J Am Coll Cardiol*, 1994. **24**(4): p. 996-1003.
64. Oemrawsingh, P.V., et al., *Intravascular ultrasound guidance improves angiographic and clinical outcome of stent implantation for long coronary artery stenoses: final results of a randomized comparison with angiographic guidance (TULIP Study).* *Circulation*, 2003. **107**(1): p. 62-7.
65. Nissen, S.E., et al., *Effect of intensive compared with moderate lipid-lowering therapy on progression of coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial.* *JAMA*, 2004. **291**(9): p. 1071-80.
66. Nissen, S.E., et al., *Effect of very high-intensity statin therapy on regression of coronary atherosclerosis: the ASTEROID trial.* *JAMA*, 2006. **295**(13): p. 1556-65.
67. Okazaki, S., et al., *Early statin treatment in patients with acute coronary syndrome: demonstration of the beneficial effect on atherosclerotic lesions by serial volumetric intravascular ultrasound analysis during half a year after coronary event: the ESTABLISH Study.* *Circulation*, 2004. **110**(9): p. 1061-8.
68. Senger, D.R., et al., *Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid.* *Science*, 1983. **219**(4587): p. 983-5.
69. Ferrara, N. and W.J. Henzel, *Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1989. **161**(2): p. 851-8.

70. Keck, P.J., et al., *Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF*. Science, 1989. **246**(4935): p. 1309-12.
71. Roskoski, R., Jr., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression*. Crit Rev Oncol Hematol, 2007. **62**(3): p. 179-213.
72. Hoeben, A., et al., *Vascular endothelial growth factor and angiogenesis*. Pharmacol Rev, 2004. **56**(4): p. 549-80.
73. Ferrara, N., H.P. Gerber, and J. LeCouter, *The biology of VEGF and its receptors*. Nat Med, 2003. **9**(6): p. 669-76.
74. Ferrara, N., et al., *Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene*. Nature, 1996. **380**(6573): p. 439-42.
75. Carmeliet, P., et al., *Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele*. Nature, 1996. **380**(6573): p. 435-9.
76. Kitamoto, Y., H. Tokunaga, and K. Tomita, *Vascular endothelial growth factor is an essential molecule for mouse kidney development: glomerulogenesis and nephrogenesis*. J Clin Invest, 1997. **99**(10): p. 2351-7.
77. Ryan, A.M., et al., *Preclinical safety evaluation of rhuMAbVEGF, an antiangiogenic humanized monoclonal antibody*. Toxicol Pathol, 1999. **27**(1): p. 78-86.
78. Folkman, J., *Tumor angiogenesis: therapeutic implications*. N Engl J Med, 1971. **285**(21): p. 1182-6.
79. Ferrara, N. and T. Davis-Smyth, *The biology of vascular endothelial growth factor*. Endocr Rev, 1997. **18**(1): p. 4-25.
80. Dvorak, H.F., et al., *Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis*. Am J Pathol, 1995. **146**(5): p. 1029-39.
81. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
82. Jayson, G.C., D.J. Hicklin, and L.M. Ellis, *Antiangiogenic therapy--evolving view based on clinical trial results*. Nat Rev Clin Oncol, 2012. **9**(5): p. 297-303.
83. Garner, A. and G.K. Klintworth, *Pathobiology of ocular disease : a dynamic approach*. 2nd ed. 1994, New York: M. Dekker.
84. Bressler, N.M., *Age-related macular degeneration is the leading cause of blindness*. JAMA, 2004. **291**(15): p. 1900-1.
85. Rosenfeld, P.J., et al., *Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration*. N Engl J Med, 2006. **355**(14): p. 1419-31.
86. Abraham, P., H. Yue, and L. Wilson, *Randomized, double-masked, sham-controlled trial of ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration: PIER study year 2*. Am J Ophthalmol, 2010. **150**(3): p. 315-324 e1.
87. Heier, J.S., et al., *Intravitreal aflibercept (VEGF trap-eye) in wet age-related macular degeneration*. Ophthalmology, 2012. **119**(12): p. 2537-48.
88. Hedman, M., et al., *Safety and feasibility of catheter-based local intracoronary vascular endothelial growth factor gene transfer in the prevention of postangioplasty and in-stent restenosis and in the treatment of chronic myocardial ischemia: phase II results of the Kuopio Angiogenesis Trial (KAT)*. Circulation, 2003. **107**(21): p. 2677-83.

89. Henry, T.D., et al., *The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis*. *Circulation*, 2003. **107**(10): p. 1359-65.
90. Kastrup, J., et al., *Direct intramyocardial plasmid vascular endothelial growth factor-A165 gene therapy in patients with stable severe angina pectoris A randomized double-blind placebo-controlled study: the Euroinject One trial*. *J Am Coll Cardiol*, 2005. **45**(7): p. 982-8.
91. Strasinger, S.K. and M.S. Di Lorenzo, *The phlebotomy textbook*. 3rd ed. 2011, Philadelphia: F.A. Davis Co. xxiii, 470 p.
92. Jelkmann, W., *Pitfalls in the measurement of circulating vascular endothelial growth factor*. *Clinical chemistry*, 2001. **47**(4): p. 617-23.
93. Hormbrey, E., et al., *A critical review of vascular endothelial growth factor (VEGF) analysis in peripheral blood: is the current literature meaningful?* *Clin Exp Metastasis*, 2002. **19**(8): p. 651-63.
94. Webb, N.J., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) is released from platelets during blood clotting: implications for measurement of circulating VEGF levels in clinical disease*. *Clin Sci (Lond)*, 1998. **94**(4): p. 395-404.
95. Karayiannakis, A.J., et al., *Circulating VEGF levels in the serum of gastric cancer patients: correlation with pathological variables, patient survival, and tumor surgery*. *Ann Surg*, 2002. **236**(1): p. 37-42.
96. Cooper, B.C., et al., *Preoperative serum vascular endothelial growth factor levels: significance in ovarian cancer*. *Clin Cancer Res*, 2002. **8**(10): p. 3193-7.
97. Lee, J.K., et al., *Clinical usefulness of serum and plasma vascular endothelial growth factor in cancer patients: which is the optimal specimen?* *Int J Oncol*, 2000. **17**(1): p. 149-52.
98. Holm, P.W., et al., *Atherosclerotic plaque development and instability: a dual role for VEGF*. *Ann Med*, 2009. **41**(4): p. 257-64.
99. Kamba, T. and D.M. McDonald, *Mechanisms of adverse effects of anti-VEGF therapy for cancer*. *Br J Cancer*, 2007. **96**(12): p. 1788-95.
100. 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.
101. Zemplyeni, T., D.W. Crawford, and M.A. Cole, *Adaptation to arterial wall hypoxia demonstrated in vivo with oxygen microcathodes*. *Atherosclerosis*, 1989. **76**(2-3): p. 173-9.
102. Sluimer, J.C. and M.J. Daemen, *Novel concepts in atherogenesis: angiogenesis and hypoxia in atherosclerosis*. *J Pathol*, 2009. **218**(1): p. 7-29.
103. Carmeliet, P. and R.K. Jain, *Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis*. *Nature*, 2011. **473**(7347): p. 298-307.
104. Majmundar, A.J., W.J. Wong, and M.C. Simon, *Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress*. *Mol Cell*, 2010. **40**(2): p. 294-309.
105. Melder, R.J., et al., *During angiogenesis, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor regulate natural killer cell adhesion to tumor endothelium*. *Nat Med*, 1996. **2**(9): p. 992-7.
106. O'Brien, K.D., et al., *Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis*

- and their relation to intimal leukocyte content. *Circulation*, 1996. **93**(4): p. 672-82.
107. 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.
 108. Libby, P., *Inflammation in atherosclerosis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012. **32**(9): p. 2045-51.
 109. Chen, C.H. and J.P. Walterscheid, *Plaque angiogenesis versus compensatory arteriogenesis in atherosclerosis*. *Circ Res*, 2006. **99**(8): p. 787-9.
 110. Virmani, R., et al., *Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(10): p. 2054-61.
 111. Kolodgie, F.D., et al., *Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma*. *N Engl J Med*, 2003. **349**(24): p. 2316-25.
 112. Fleisch, M., et al., *Physiologically assessed coronary collateral flow and intracoronary growth factor concentrations in patients with 1- to 3-vessel coronary artery disease*. *Circulation*, 1999. **100**(19): p. 1945-50.
 113. Battah, A.O., E.; El Gohary, T.; Mowafie, A.; El-Gengehy, S.; Hamdy, M.; Mowafi, H. , *Correlation between VEGF and the Severity of Non ST Elevation Acute Coronary Syndrome*. *The Egyptian Heart Journal*, 2009. **61**(4): p. 451-457.
 114. Blann, A.D., et al., *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): p. 187-94.
 115. Chung, N.A., et al., *Angiogenesis, thrombogenesis, endothelial dysfunction and angiographic severity of coronary artery disease*. *Heart*, 2003. **89**(12): p. 1411-5.
 116. Kucukardali, Y., et al., *The relationship between severity of coronary artery disease and plasma level of vascular endothelial growth factor*. *Cardiovasc Revasc Med*, 2008. **9**(2): p. 66-70.
 117. Kim, S.Y., et al., *Vascular endothelial growth factor, soluble fms-like tyrosine kinase 1, and the severity of coronary artery disease*. *Angiology*, 2011. **62**(2): p. 176-83.
 118. Alber, H.F., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) plasma concentrations in coronary artery disease*. *Heart*, 2005. **91**(3): p. 365-6.
 119. Kawamoto, A., et al., *Serum levels of VEGF and basic FGF in the subacute phase of myocardial infarction*. *Int J Cardiol*, 1998. **67**(1): p. 47-54.
 120. Karu, I., et al., *Growth factors serum levels in coronary artery disease patients scheduled for bypass surgery: perioperative dynamics and comparisons with healthy volunteers*. *Biomed Res Int*, 2013. **2013**: p. 985404.
 121. Nakajima, K., et al., *Plasma vascular endothelial growth factor level is elevated in patients with multivessel coronary artery disease*. *Clin Cardiol*, 2004. **27**(5): p. 281-6.
 122. Yao, Y.Y., et al., *Tissue kallikrein is related to the severity of coronary artery disease*. *Clin Chim Acta*, 2013. **423**: p. 90-8.

123. Lee, K.W., G.Y. Lip, and A.D. Blann, *Plasma angiopoietin-1, angiopoietin-2, angiopoietin receptor tie-2, and vascular endothelial growth factor levels in acute coronary syndromes*. *Circulation*, 2004. **110**(16): p. 2355-60.
124. Gerrah, R., M. Fogel, and D. Gilon, *Aspirin decreases vascular endothelial growth factor release during myocardial ischemia*. *Int J Cardiol*, 2004. **94**(1): p. 25-9.
125. Nadar, S., A.D. Blann, and G.Y. Lip, *Effects of aspirin on intra-platelet vascular endothelial growth factor, angiopoietin-1, and p-selectin levels in hypertensive patients*. *Am J Hypertens*, 2006. **19**(9): p. 970-7; discussion 978.
126. Leahy, K.M., A.T. Koki, and J.L. Masferrer, *Role of cyclooxygenases in angiogenesis*. *Curr Med Chem*, 2000. **7**(11): p. 1163-70.
127. Sales, K.J., et al., *Cyclooxygenase-1 is up-regulated in cervical carcinomas: autocrine/paracrine regulation of cyclooxygenase-2, prostaglandin e receptors, and angiogenic factors by cyclooxygenase-1*. *Cancer Res*, 2002. **62**(2): p. 424-32.
128. Miura, S., et al., *Cyclooxygenase-2-regulated vascular endothelial growth factor release in gastric fibroblasts*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2004. **287**(2): p. G444-51.
129. Fosslien, E., *Review: molecular pathology of cyclooxygenase-2 in cancer-induced angiogenesis*. *Ann Clin Lab Sci*, 2001. **31**(4): p. 325-48.
130. Toomey, D.P., J.F. Murphy, and K.C. Conlon, *COX-2, VEGF and tumour angiogenesis*. *Surgeon*, 2009. **7**(3): p. 174-80.
131. Fairbrother, W.J., et al., *Solution structure of the heparin-binding domain of vascular endothelial growth factor*. *Structure*, 1998. **6**(5): p. 637-48.
132. Bhatia, L., G.J. Clesham, and D.R. Turner, *Effect of intravenous heparin on serum levels of endostatin, VEGF and HGF*. *Clin Sci (Lond)*, 2004. **107**(4): p. 423; author reply 424.
133. Seko, Y., *Effect of intravenous heparin on serum levels of endostatin, VEGF and HGF: author's reply*. *Clin Sci (Lond)*, 2004. **107**(4): p. 424.
134. Tamura, K., et al., *Elevated circulating levels of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in patients with acute myocardial infarction*. *Jpn Circ J*, 1999. **63**(5): p. 357-61.
135. Kapur, N.K., et al., *Distinct effects of unfractionated heparin versus bivalirudin on circulating angiogenic peptides*. *PLoS One*, 2012. **7**(4): p. e34344.
136. O'Gara, P.T., et al., *2013 ACCF/AHA guideline for the management of ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines*. *Circulation*, 2013. **127**(4): p. e362-425.
137. Writing Committee, M., et al., *2012 ACCF/AHA focused update of the guideline for the management of patients with unstable angina/Non-ST-elevation myocardial infarction (updating the 2007 guideline and replacing the 2011 focused update): a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines*. *Circulation*, 2012. **126**(7): p. 875-910.

138. Naumnik, B., K. Pawlak, and M. Mysliwiec, *Different effect of unfractionated heparin and enoxaparin on circulating proangiogenic factors during hemodialysis: A cross-over study*. Cytokine, 2007. **40**(2): p. 98-104.
139. Sarahrudi, K., et al., *The influence of low molecular weight heparin on the expression of osteogenic growth factors in human fracture healing*. Int Orthop, 2012. **36**(5): p. 1095-8.
140. Fuchs, S., et al., *Intracoronary monocyte chemoattractant protein 1 and vascular endothelial growth factor levels are associated with necrotic core, calcium and fibrous tissue atherosclerotic plaque components: an intracoronary ultrasound radiofrequency study*. Cardiology, 2012. **123**(2): p. 125-32.
141. Eaton, C.B., et al., *Prospective association of vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) with coronary heart disease mortality in southeastern New England*. Atherosclerosis, 2008. **200**(1): p. 221-7.
142. Hahn, R.G., et al., *Vascular endothelial growth factor in serum indicates cardiovascular risk in urology patients*. Scand J Urol Nephrol, 2006. **40**(2): p. 144-8.
143. Wilson, P.W., et al., *Prediction of coronary heart disease using risk factor categories*. Circulation, 1998. **97**(18): p. 1837-47.