

Université de Montréal

Les effets du tabagisme dans l'ischémie et la néovascularisation

Par

Sophie Élise Michaud

Département des Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la faculté des Études Supérieures

En vue de l'obtention du grade de

Philosophiae Doctor (Ph.D)

en Sciences Biomédicales

28 mars 2005

©Sophie Élise Michaud, 2005



W

4

U58

2006

V. 012

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Cette thèse intitulée:

Les effets du tabagisme dans l'ischémie et la néovascularisation

Présentée par:

Sophie Élise Michaud

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Docteur Marie-Josée Hébert

Présidente du jury

Docteur Alain Rivard

Directeur de recherche

Docteur Jean Raymond

Membre du Jury

Docteur Jacques Galipeau

Arbitre externe

Docteur François Sestier
Représentant du doyen de la FES

Thèse acceptée le 21 novembre 2005

RÉSUMÉ

L'athérosclérose constitue une cause majeure de morbidité et de mortalité dans les pays industrialisés. L'occlusion d'une artère par la plaque athérosclérotique entraîne une diminution de la perfusion tissulaire, créant ainsi une condition d'ischémie. Dans une situation d'ischémie, l'organisme s'adapte en développant un nouveau réseau vasculaire afin d'irriguer le tissu en nutriment et en oxygène et ainsi maintenir son intégrité. Chez l'adulte, cette néovascularisation survient par angiogenèse, vasculogenèse et artériogenèse. Elle est contrôlée par plusieurs facteurs angiogéniques capables de stimuler la prolifération et la différenciation des cellules endothéliales ou des cellules endothéliales progénitrices en réponse à divers stimuli tel l'hypoxie. Les patients atteints d'une cardiopathie ischémique ou d'une ischémie des membres inférieurs présentent des variations considérables quant à leur possibilité de développer une néovascularisation. Les facteurs responsables de ces variations sont mal compris mais il a récemment été proposé que différents phénotypes cliniques et facteurs de risque, associés à la maladie athérosclérotique, puissent amenuiser la néovascularisation en réponse à l'ischémie. Le tabagisme représente un important facteur de risque de l'athérosclérose et des maladies cardiovasculaires. À ce jour, l'effet du tabagisme sur la néovascularisation associée aux maladies cardiovasculaires n'a fait l'objet d'aucune étude. Ainsi, le présent ouvrage visait à élucider l'influence du tabagisme sur la néovascularisation. Nos résultats démontrent que l'exposition à la fumée de cigarette diminue la néovascularisation en réponse à l'ischémie ou suite à une stimulation avec le facteur de croissance angiogénique VEGF.

La première étude du projet de recherche visait à évaluer *in vitro* et *in vivo* l'effet de l'exposition à la fumée de cigarette sur l'angiogenèse en réponse à l'ischémie. *In vitro*,

nous avons démontré, par essai d'angiogenèse *in vitro* sur Matrigel, que les cellules endothéliales humaines de cordon ombilical (HUVEC) exposées à une solution dérivée des composantes de la fumée de cigarette (CSE) formaient moins de tubules en situation d'hypoxie. *In vivo*, nous avons utilisé un modèle murin d'ischémie du membre inférieur afin d'évaluer l'effet de l'exposition à la fumée de cigarette sur l'angiogenèse en réponse à l'ischémie. Chez les souris exposées à la fumée de cigarette, la récupération du flux sanguin évaluée par Laser Doppler était nettement inférieure à celle observée chez les souris contrôles. Cette diminution de la réponse angiogénique était associée à une altération de l'expression des facteurs VEGF et HIF-1 α en condition d'hypoxie ou dans le muscle ischémique.

Les résultats de la deuxième étude indiquent que l'exposition à la fumée de cigarette entrave la réponse endothéliale suite à une stimulation au VEGF. La migration des cellules endothéliales semble être l'étape principalement affectée par l'exposition à la fumée de cigarette. Les mécanismes évoqués dans la diminution de la migration des cellules endothéliales induite par le VEGF par le tabagisme sont: une augmentation de la production d'espèces radicalaires dérivées de l'oxygène, une diminution de l'expression de plusieurs intégrines et une altération de la voie de signalisation Akt/eNOS/NO.

L'importance de la participation des cellules endothéliales progénitrices dans le processus de néovascularisation étant maintenant bien établie, le troisième projet visait à déterminer l'impact du tabagisme sur le nombre et la fonction de ces cellules. Nos résultats démontrent que le tabagisme est associé à une diminution du nombre de cellules endothéliales progénitrices et à une altération de leur fonction. La diminution du nombre de cellules endothéliales progénitrices et l'altération de leur fonction chez le fumeur sont

associées à une diminution de l'expression de marqueur des cellules endothéliales, une augmentation de la génération intracellulaire d'espèces radicalaires dérivées de l'oxygène, une diminution des niveaux plasmatiques de NO et de vitamines antioxydantes.

En conclusion, nos études ont permis de déterminer l'impact du tabagisme sur la néovascularisation et d'évoquer certains déterminants qui semblent impliqués dans ce processus et ainsi de mieux comprendre l'implication du tabagisme dans l'évolution des maladies vasculaires ischémiques.

Mots clés: Tabagisme, néovascularisation, angiogenèse, vasculogenèse, VEGF, oxyde nitrique, stress oxydant, cellules endothéliales progénitrices.

ABSTRACT

In developed countries, atherosclerosis represents a major cause of mortality and morbidity. Severe vascular obstruction by the atherosclerotic plaque leads to reduced blood flow and tissue ischemia. In the setting of vascular obstruction with tissue ischemia, neovascularisation is seen as an attempt by the organism at improving perfusion and preserving tissue integrity. In the adult, neovascularisation occurs by angiogenesis, vasculogenesis and arteriogenesis. These processes involve several angiogenic factors stimulating endothelial cells and endothelial progenitor cells (EPC) in response to hypoxia. Patients with ischemic vascular diseases show major variations in their capacity to develop neovascularisation. Factors involved in these variations are not well understood but risk factors associated with atherosclerosis seem to inhibit neovascularisation in response to hypoxia. Cigarette smoking represents a major risk factor associated with atherosclerosis and cardiovascular diseases. However, the impact of smoking on compensatory mechanisms such as neovascularisation associated with ischemic cardiovascular diseases is currently unknown. This research project investigated the influence of smoking on neovascularisation in the setting of severe vascular obstructions and tissue ischemia. Our results demonstrate that cigarette smoking is associated with reduced neovascularisation in response to ischemia or following VEGF stimulation.

The first study investigated the effect of cigarette smoke exposure on the development of angiogenesis in response to hypoxia. Our results show that cigarette smoking inhibits hypoxia-induced angiogenesis, both in vitro and in vivo. This inhibition

is associated with reduced protein expression of HIF-1alpha and VEGF in hypoxic conditions.

In the second study, we show that cigarette smoke exposure inhibits VEGF-induced cellular migration and tube formation in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). This is associated with reduced phosphorylation of Akt and eNOS, together with a reduction of NO release and integrins expression. We also demonstrate that the impairment of VEGF-induced actions in endothelial cells exposed to cigarette smoke is at least partly due to the excessive generation of reactive oxygen species (ROS).

Finally, the presence of EPC for adult neovascularisation seems to be important. The third project investigated the impact of cigarette smoking on EPC number and function. When we compared the number and the functional activities of EPCs isolated from the peripheral blood of healthy smokers vs. nonsmokers, we found that cigarette smoking is associated with a reduced number of EPCs together with an important impairment of EPC functional activities. We also identified potential mechanisms responsible for the negative effect of smoking on EPCs including increased oxidative stress, decreased NO availability and impaired EPC differentiation towards an endothelial phenotype.

In conclusion, these studies elucidate the impact of cigarette smoke exposure on neovascularisation and help to explain the negative influence of smoking on the progression of cardiovascular ischemic diseases.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	iii
ABSTRACT.....	vi
TABLE DES MATIÈRES.....	viii
LISTE DES FIGURES.....	xi
LISTE DES TABLEAUX.....	xiv
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xv
REMERCIEMENTS.....	xviii
1.INTRODUCTION.....	2
1.1.Développement vasculaire.....	2
1.1.1.Vasculogenèse.....	3
1.1.2.Artériogenèse.....	5
1.1.3.Angiogenèse.....	7
1.1.3.1.Généralités.....	7
1.1.3.2.Étapes de l'angiogenèse.....	9
1.1.3.2.1.Vasodilatation et perméabilité endothéliale.....	10
1.1.3.2.2.Dégradation de la matrice extracellulaire.....	10
1.1.3.2.3.Prolifération et migration des cellules endothéliales.....	11
1.1.3.2.4.Formation de la lumière vasculaire.....	12
1.1.3.2.5.Survie des cellules endothéliales.....	13
1.1.3.2.6.Remodelage.....	13
1.1.3.2.7.Recrutement et croissance des cellules musculaires lisses.....	14
1.1.3.3.Principaux facteurs de croissance angiogéniques.....	15
1.1.3.3.1.Transforming Growth Factor.....	15
1.1.3.3.2.Platelet Derived Growth Factor.....	16
1.1.3.3.3.La famille des Fibroblast Growth Factor.....	17
1.1.3.3.4.Hepatocyte Growth Factor.....	19
1.1.3.3.5.Vascular Endothelial Growth Factor.....	20
1.1.3.3.5.1.Structure du VEGF.....	22
1.1.3.3.5.2.Récepteurs du VEGF.....	24

1.1.3.3.5.3.Régulation du VEGF par l'hypoxie.....	28
1.1.3.3.6.Angiopoïétine-1.....	31
1.1.3.3.7.Angiopoïétine-2.....	31
1.1.3.3.8.Monoxyde d'azote.....	32
1.1.3.4.L'hypoxie, principal facteur de régulation de l'angiogenèse	35
1.1.4.Angiogenèse associée à des pathologies.....	39
1.1.4.1.Généralités.....	39
1.1.4.2.Néovascularisation et maladies cardiovasculaires athérosclérotiques.....	41
1.1.4.2.1.Athérosclérose.....	41
1.1.4.2.1.1.Pathogenèse de l'athérosclérose.....	43
1.1.4.2.1.2.Étiologie de l'athérosclérose.....	46
1.1.4.2.1.4.1.L'hypothèse de la dysfonction endothéliale.....	47
1.1.4.2.1.4.2.L'hypothèse de l'infiltration des lipides.....	49
1.1.4.2.1.4.3.L'hypothèse du stress oxydant.....	50
1.1.4.2.1.4.4.L'hypothèse virale.....	53
1.1.4.2.1.4.5.L'hypothèse inflammatoire.....	54
1.1.4.2.2.Néovascularisation et facteurs de risque de l'athérosclérose.....	54
1.1.4.2.2.1.Hypercholestérolémie.....	57
1.1.4.2.2.2.Diabète.....	60
1.1.4.2.2.3.Hypertension artérielle.....	64
1.1.4.2.2.4.Vieillesse.....	65
1.2.Tabagisme.....	67
1.2.1.Prévalence du tabagisme au Canada.....	67
1.2.2.Association entre tabagisme et pathologies cardiovasculaires.....	71
1.2.2.1.Maladies coronariennes athérosclérotiques.....	72
1.2.2.1.1.Athérosclérose.....	72
1.2.2.1.2.Infarctus du myocarde.....	72
1.2.2.2.Hypertension artérielle.....	74
1.2.2.3.Accidents vasculaires cérébraux.....	75
1.2.2.4.Artériopathie oblitérante des membres inférieurs.....	76
1.2.2.5.Maladie de Buerger.....	77

1.2.3.Rôle du tabagisme dans la pathogenèse des maladies cardiovasculaires.....	78
1.2.3.1.Mécanismes impliqués dans le développement de l'athérosclérose par le tabagisme.....	78
1.2.3.1.1.Stress oxydant.....	80
1.2.3.1.2.Dysfonction endothéliale.....	86
1.2.3.1.3.Inflammation.....	87
1.2.3.1.4.Anomalies métaboliques.....	88
1.2.3.2.Mécanismes impliqués dans les complications aiguës reliées au tabagisme.....	91
1.2.3.2.1.Effets hématologiques.....	91
1.2.3.2.2.Effets hémodynamiques.....	94
1.2.3.2.3.Effets hypoxiques.....	97
1.3.PROBLÉMATIQUE ET HYPOTHÈSE DE TRAVAIL.....	98
2.MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS.....	102
2.1.Impairment of Hypoxia-Induced Angiogenesis by Cigarette Smoke Exposure: Impairment of the HIF-1alpha/VEGF pathway.....	103
2.2.Cigarette Smoke Exposure Impairs VEGF-induced Endothelial Cell Migration and Angiogenesis: Role of NO and Reactive Oxygen Species.....	138
2.3.Circulating Endothelial Progenitor Cells From Healthy Smokers Exhibit Impaired Functional Activities.....	169
3.DISCUSSION.....	206
4.CRITIQUE ET LIMITES.....	238
5.CONCLUSION.....	243
6.RÉFÉRENCE.....	248

LISTE DES FIGURES

Introduction

Figure 1.	La néovascularisation chez l'adulte.....	2
Figure 2.	Cascade de différenciation des cellules souches de la moelle osseuse.....	5
Figure 3.	L'artériogénèse.....	7
Figure 4.	Les principales étapes impliquées dans le processus angiogénique.....	10
Figure 5.	La structure du gène des différentes isoformes du VEGF-A.....	23
Figure 6.	Les différentes molécules apparentées au VEGF et leurs récepteurs.....	24
Figure 7.	Les mécanismes intracellulaires induits via une activation du VEGFR-2.....	27
Figure 8.	Induction de la transcription du VEGF par l'hypoxie médiée par le facteur de transcription hypoxia inducible factor.....	29
Figure 9.	Les différentes facettes de l'implication de l'hypoxie dans la régulation du VEGF et de la réponse angiogénique.....	30
Figure 10.	La synthèse du NO.....	33
Figure 11.	Les principaux gènes ciblés par le HIF-1.....	36
Figure 12.	Régulation de l'expression de HIF-1 α par l'oxygène.....	37
Figure 13.	Implication de l'angiogénèse dans certaines pathologies.....	41
Figure 14.	Étapes de la formation de la plaque athérosclérotique.....	44
Figure 15.	Effets anti-athérogéniques de l'endothélium.....	47
Figure 16.	Altération de la biodisponibilité du monoxyde d'azote par la production d'espèces radicalaires oxygénées.....	49

Figure 17.	Sources de formation des ROS.....	52
Figure 18.	Pourcentage de fumeurs dans la population canadienne selon chaque province pour l'année 2001.....	68
Figure 19.	Pourcentage de fumeurs dans la population canadienne selon le groupe d'âge en 2001.....	69
Figure 20.	La mortalité attribuable au tabagisme au Canada, 1998.....	71
Figure 21.	Intégration des mécanismes impliqués dans le développement de l'athérosclérose induit par le tabagisme.....	79
Figure 22.	Le stress oxydant induit par la fumée de cigarette comme principal agent athérothrombotique et ses mécanismes d'action.....	85
Figure 23.	Implication de l'insulino-résistance et de l'hyperinsulinisme induits par le tabagisme dans le développement de l'athérosclérose.....	91
 Article 1.		
Figure 1.	Schematic of HIF-1 α /VP16 hybrid.....	135
Figure 2.	Inhibition of hypoxia-induced angiogenesis by cigarette smoke exposure.....	136
Figure 3.	Smoke exposure inhibits hypoxia-induced protein expression of VEGF and HIF-1 α	137
 Article 2.		

Figure 1.	Inhibition of VEGF-induced angiogenesis by cigarette smoke extracts.....	165
Figure 2.	Effect of CSE on VEGF-induced HUVECs proliferation and migration.....	166
Figure 3.	ROS generation in HUVECs exposed to CSE.....	167
Figure 4.	Effect of CSE exposure on VEGF-induced Akt/eNOS/NO pathway.....	168
Article 3.		
Figure 1.	Identification of the endothelial lineage phenotype of EPCs.....	200
Figure 2.	EPC number, migration and proliferation.....	201
Figure 3.	EPC adhesion and tubulization.....	202
Figure 4.	EPC differentiation.....	203
Figure 5.	ROS generation en EPCs.....	204
Figure 6.	Effect of antioxidant and nitrite plasma concentrations on EPC number and incorporation into vascular structure.....	205
Conclusion		
Figure 24.	Synthèse des effets du tabagisme diminuant la guérison vasculaire et favorisant le développement de l'athérosclérose.....	245
Figure 25.	Synthèse des effets du tabagisme sur la néovascularisation post-ischémie.....	246

LISTE DES TABLEAUX**Introduction**

Tableau 1.	Activateurs et inhibiteurs de la croissance vasculaire.....	15
Tableau 2.	Synthèse des stades de développement de l'athérosclérose.....	45
Tableau 3.	Principaux systèmes de défenses enzymatiques.....	83
Tableau 4.	Principaux facteurs de défenses non-enzymatiques.....	84

Article 1.

Table 1.	The effect of hypoxia and cigarette smoke extract on in vitro angiogenesis in HUVECs infected or not with the Ad.HIF-1 α /VP16 or with the Ad5.-Null.....	134
-----------------	--	-----

Article 2.

Table 1.	The effect of VEGF and cigarette smoke extract on migration and in vitro angiogenesis in HUVECs.....	164
-----------------	--	-----

Article 3.

Table 1.	Clinical characteristics of the study population.....	199
-----------------	---	-----

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

ADN:	Acide désoxyribonucléotide
Ang:	Angiopoïétine
ARNm:	Acide ribonucléotide messenger
BH ₄ :	Tétrahydrobioptérine
CML:	Cellules musculaires lisses
DAG:	Diacylglycérol
EGF:	Epidermal Growth Factor
EPC:	Cellules endothéliales progénitrices
FAD:	Flavine-Adénine dinucléotide
FGF:	Fibroblast Growth Factor
Flk1/ KDR:	Fetal liver kinase-1/ Kinase insert domain region
Flt-1:	Fms-like-tyrosine kinase
FMN:	Flavine-Adénine-mononucléotide
GM-CSF:	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
H ₂ O ₂ :	Peroxyde d'hydrogène
HGF:	Hepatocyte Growth Factor
HIF:	Hypoxia Inducible Factor
HRE:	Hypoxia Responsive Element
ICAM:	Intracellular Adhesion Molecule
IP ₃ :	Inositol 1,4,5-triphosphates
IGF:	Insulin-like Growth Factor

IL:	Interleukine
MAPK:	Mitogen-Activated Protein Kinase
MCP-1:	Macrophage chemoattractant protein-1
M-CSF-1:	Macrophage-Colony Stimulating Factor-1
NAC:	N-acétylcystéine
NOS:	Synthase de l'oxyde nitrique
NO:	Oxyde nitrique
NO ₂ ⁻ :	Nitrite
NRP-1:	Neuropiline-1
O ₂ ⁻ :	Anio superoxyde
ONOO ⁻ :	Peroxynitrite
PAI-1:	Plasminogen Activator Inhibitor-1
PDGF:	Platelet-Derived Growth Factor
PECAM:	Platelet Endothelial Cell adhesion Molecule
PGI ₂ :	Prostacycline
PI3K:	Phosphatidylinositol-3 Kinase
PIGF:	Placenta Growth Factor
PLC:	Phospholipase C
SOD:	Superoxyde dismutase
TGF:	Transforming Growth Factor
Tie:	Tyrosine Kinase avec Ig et epidermal growth factor homology domain
TIMP:	Tissue Inhibitor Metalloproteinases
TNF:	Tumor Necrosis Factor

t-PA:	tissue-Plasminogen Activator
u-PA:	urokinase-Plasminogen Activator
UTR:	Untranslated Region
VEGFR:	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VEGF:	Vascular Endothelial Growth Factor
VHL:	von Hippel Lindau
VPF:	Vascular Permeability Factor
XO:	Xanthine Oxydase

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier sincèrement toutes les personnes qui, à divers titres, ont contribué à la réalisation de cette thèse.

Plus particulièrement, le Dr Alain Rivard pour ses judicieuses recommandations lors des travaux effectués au cours de ces études et son aide lors de la préparation de cet ouvrage. Je tiens aussi à le remercier pour m'avoir permis d'enrichir ma formation en m'offrant l'opportunité d'assister et de présenter mes résultats à plusieurs congrès.

Je remercie également la Fondation des Maladies du Cœur du Canada, Le Fonds de recherche en santé du Québec, la Faculté des Études Supérieures de l'Université de Montréal et le centre de recherche du CHUM pour leur supports financiers.

Enfin, je remercie sincèrement mon mari, Louis-Philippe pour son support, son soutien moral et ses conseils ainsi que ma mère et mes sœurs pour avoir cru en mes capacités tout au long de la réalisation de ce projet.

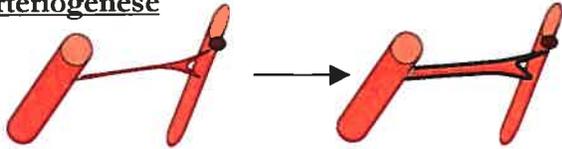
1.INTRODUCTION

1.1.Développement vasculaire

Au cours des dernières décennies, l'étude des mécanismes moléculaires de l'angiogenèse se limitait principalement aux premières étapes du bourgeonnement capillaire à partir de vaisseaux préexistants. Récemment, des expériences in vivo ont permis d'explorer d'avantage la morphologie de l'arbre vasculaire et ainsi d'identifier les mécanismes moléculaires qui la contrôlent (Sullivan and Bicknell 2003; Tonini, Rossi et al. 2003). De nouvelles molécules contrôlant la prolifération et la différenciation des cellules endothéliales ont été identifiées. D'autres facteurs récemment identifiés participent aux étapes secondaires du développement vasculaire en stabilisant les interactions entre les cellules endothéliales et les molécules de la matrice extracellulaire ou les péricytes. Ainsi, l'étude du développement vasculaire a permis de distinguer deux phénomènes distincts qui président la formation de vaisseaux sanguins chez l'embryon: la vasculogenèse et l'angiogenèse. Chez l'adulte, trois phénomènes sont responsables de la néovascularisation: la vasculogenèse, l'artériogenèse et l'angiogenèse (Figure 1).

Vasculogénèse

Moelle osseuse

Artériogénèse

1. Mobilisation des EPC
2. Différenciation des EPC
3. Intégration au réseau vasculaire

1. Occlusion vasculaire
2. Recrutement de monocytes
3. Remodellage

Angiogénèse

1. Bourgeonnement d'un vaisseau existant
2. Croissance des capillaires
3. Recrutement de cellules musculaires lisses et péricytes

Figure 1. La néovascularisation chez l'adulte peut survenir via trois processus: la vasculogénèse (mobilisation de précurseurs des cellules endothéliales, EPC), l'angiogénèse (bourgeonnement vasculaire) et l'artériogénèse (croissance des collatérales).

Au cours du développement embryonnaire, le système cardiovasculaire se forme précocement afin de répondre à la demande métabolique croissante des organes de l'embryon. Le développement de l'arbre vasculaire se fait à partir de la différenciation d'un ou de plusieurs précurseurs (figure 2). L'assemblage des cellules endothéliales conduit à la formation de tubes endothéliaux primitifs, puis le recrutement des cellules musculaires lisses à celle de plexus vasculaires primitifs. La vasculogénèse se définit donc par la différenciation d'une cellule souche et l'association de ces cellules entre elles pour former les vaisseaux sanguins alors que l'angiogénèse se définit par l'extension de l'arbre vasculaire à partir de vaisseaux préexistants. Alors que ces deux étapes ont lieu pendant la vie embryonnaire, l'extension du réseau vasculaire après la naissance concerne essentiellement le processus d'angiogénèse. Cependant, il a récemment été mis en évidence chez l'adulte des progéniteurs aux cellules endothéliales capables de se différencier dans

les sites de néovascularisation. L'artériogénèse quant à elle survient essentiellement chez l'adulte et est caractérisée par l'élargissement du diamètre d'une collatérale suite à l'obstruction d'une artère par la plaque athérosclérotique. Les trois processus seront décrits en détail.

1.1.1. Vasculogénèse

La vasculogénèse correspond à la naissance de vaisseaux sanguins suite à la différenciation et à la prolifération de précurseurs des cellules endothéliales (figure 2). Elle se produit principalement durant le développement embryonnaire (Risau and Flamme 1995). Durant ce stade de développement, les hémangioblastes, progéniteurs communs des cellules endothéliales et des cellules hématopoïétiques, apparaissent dans les îlots sanguins de l'aire extra-embryonnaire et sur la paroi ventrale de l'aorte mésodermique d'où ils migrent, prolifèrent et se différencient en capillaires (Flamme, Frolich et al. 1997). Suite à la formation du premier réseau vasculaire, les cellules endothéliales continuent de proliférer et forment de nouveaux capillaires. Des fibroblastes recrutés par les capillaires viennent ensuite se différencier au contact de leurs parois. Ils correspondent vraisemblablement à des péricytes ou à des cellules musculaires lisses. Enfin, les structures de la paroi des vaisseaux s'adaptent au débit et à la pression du flux sanguin. La diminution du flux sanguin inhibe la progression de l'arbre vasculaire. Ces données concordent bien avec de récentes études in vitro où il a été démontré que la diminution du flux sanguin peut induire l'apoptose des cellules endothéliales (Kaiser, Freyberg et al. 1997; Stempien-Otero, Karsan et al. 1999; Matsushita, Morishita et al. 2000).

Les précurseurs des cellules endothéliales (EPCs) n'existent pas uniquement durant la vie embryonnaire. En effet, des groupes de recherche ont démontré qu'il était possible d'isoler à partir du sang périphérique et de la moelle osseuse chez l'adulte des cellules sanguines progénitrices exprimant plusieurs marqueurs des cellules endothéliales et qui peuvent se différencier en cellules endothéliales (Asahara, Murohara et al. 1997; Asahara, Masuda et al. 1999; Hristov, Erl et al. 2003). La mobilisation et la différenciation des EPCs sont favorisées par divers facteurs dont le VEGF, le NO, l'angiopoïétine-1, le FGF, le GM-CSF, le MMP-9 et certains agents pharmacologiques (Hristov, Erl et al. 2003; Szmitko, Fedak et al. 2003). Les EPCs nichent aux sites d'ischémie, relâchent des facteurs de croissance (VEGF, SDF-1, IGF-1, HGF) et participent à la néovascularisation thérapeutique ou pathologique (Pearson 2003). Certaines évidences suggèrent que les EPCs peuvent représenter jusqu'à 90% des cellules endothéliales d'un capillaire nouvellement formé. Bien que le pourcentage d'incorporation dans la structure vasculaire des EPCs varie énormément d'une étude à l'autre (0% à 90%), la majorité des données proposent que la néovascularisation post-natale puisse avoir lieu par vasculogénèse, c'est-à-dire sans bourgeonnement de vaisseaux préexistants (Murayama and Asahara 2002). Les EPCs participant à la néovascularisation aux sites d'ischémie chez l'adulte, représentent un intérêt majeur pour de futures thérapies. En effet, de récentes études ont démontré qu'une transplantation de EPCs chez des patients favorisait la récupération du flot sanguin suite à l'ischémie d'un membre inférieur (Tateishi-Yuyama, Matsubara et al. 2002), protégeait contre le développement de l'athérosclérose et augmentait la viabilité du myocarde suite à un

infarctus (Assmus, Schachinger et al. 2002; Strauer, Brehm et al. 2002; Britten, Abolmaali et al. 2003; Stamm, Westphal et al. 2003). Il est aussi intéressant de noter que le nombre de EPCs ainsi que leur fonction cellulaire sont affectés par la présence de facteurs de risque de la maladie cardiovasculaire ischémique (Vasa, Fichtlscherer et al. 2001).

Malgré toutes les données sur la vasculogénèse, il reste encore à déterminer les mécanismes et la nature du signal ainsi que les facteurs qui régissent la différenciation des cellules souches. La figure 2 illustre la cascade de différenciation à partir des cellules souches de la moelle osseuse et indique le profil d'expression des marqueurs de surface généralement reconnus.

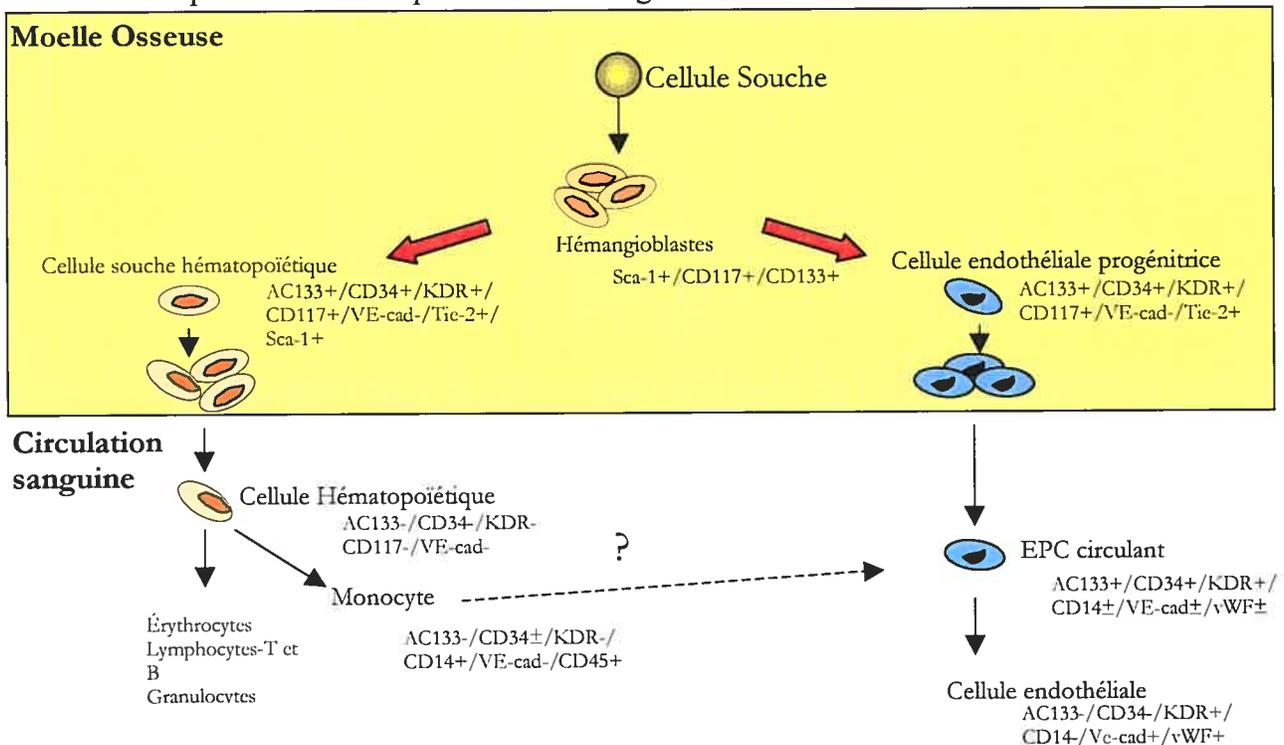


Figure 2. Cascade de différenciation à partir des cellules souches de la moelle osseuse et profil d'expression des marqueurs de surface généralement reconnus.

1.1.2. Artériogénèse

L'artériogénèse est définie comme l'élargissement de la lumière vasculaire d'un vaisseau préexistant afin de former une collatérale suite à l'obstruction d'une artère par la plaque athérosclérotique (Figures 1 et 3) (Carmeliet 2000). En effet, lorsque la sténose d'une artère compromet la circulation sanguine, le flot est redirigé vers une artériole présentant peu de résistance périphérique afin d'irriguer les muscles et les organes en nutriments et oxygène et ainsi maintenir l'intégrité tissulaire. Le processus est initié par une augmentation du flux sanguin dans la collatérale, ce qui active les cellules endothéliales et entraîne l'expression de cytokines telles que le MCP-1, le TNF- α , le GM-CSF et des molécules d'adhésion monocytaires (ICAM-1) favorisant le recrutement et l'infiltration de monocytes (Helisch and Schaper 2003). Cette étape de l'artériogénèse est le résultat d'une inflammation locale. Une fois différenciés en macrophages, les monocytes envahissent le mur vasculaire, détruisent la média en produisant des protéinases et des facteurs apoptotiques. Ces cellules inflammatoires relâchent aussi des facteurs de croissance dont le FGF, le PDGF-B et le TGF- β induisant ainsi la prolifération et la migration des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses. Le recrutement et la prolifération de cellules musculaires lisses favorisent l'augmentation de la taille du vaisseau. En effet, les cellules murales ainsi recrutées vont muscler le réseau endothélial naissant en migrant le long du vaisseau et ainsi favorisent le remodelage de celui-ci. Ce processus peut entraîner l'élargissement de plus de 20 fois du diamètre d'une artériole collatérale préexistante après occlusion de l'artère principale.

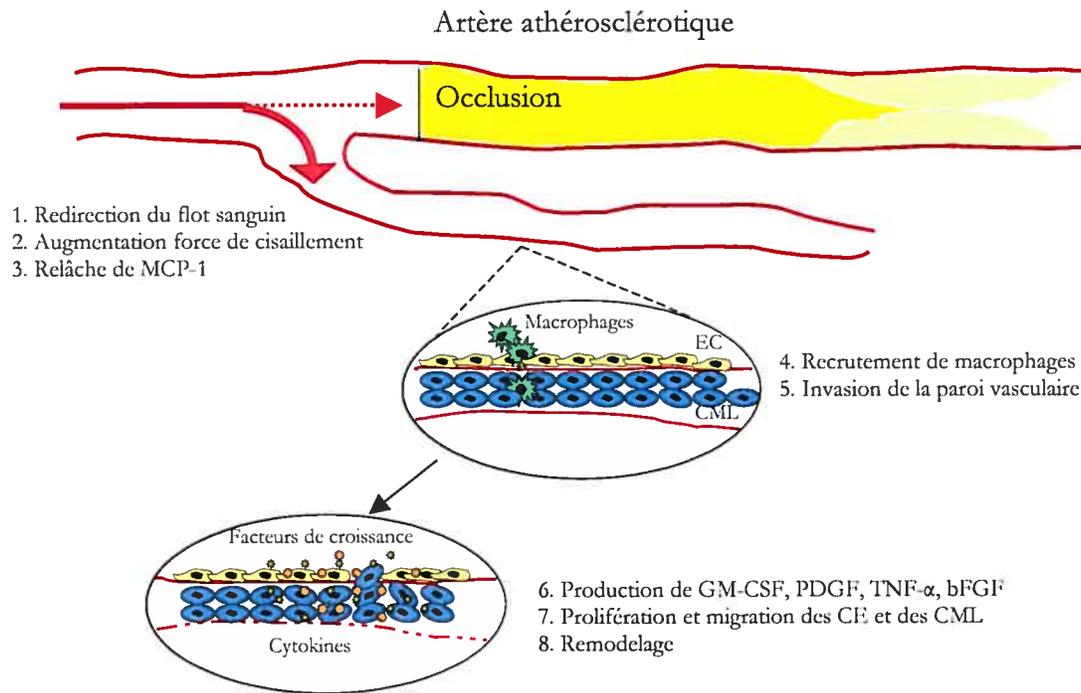


Figure 3. Représentation schématique de l'artériogénèse. CE, cellules endothéliales; CML, cellules musculaires lisses; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony stimulating factor; PDGF, platelet-derived growth factor; TNF- α , tumor necrosis factor alpha; bFGF, basic fibroblast growth factor.

1.1.3. Angiogenèse

1.1.3.1. Généralités

L'angiogenèse se définit comme le développement de nouveaux vaisseaux à partir d'une structure vasculaire préexistante (Folkman 1971). Dans un organisme adulte normal, l'angiogenèse physiologique est un événement peu fréquent. Elle survient dans l'appareil reproducteur femelle durant les cycles menstruels et durant la grossesse. En revanche, une angiogenèse survient dans certaines conditions pathologiques comme l'inflammation, la guérison des plaies, la croissance de tumeur, la rétinopathie diabétique, les arthrites rhumatoïdes et le psoriasis (Folkman and Shing 1992).

La recherche en angiogenèse fût initiée il y a 30 ans par le docteur J. Folkman, partant de l'hypothèse que la croissance d'une tumeur cancéreuse nécessitait une néovascularisation constante. Progressivement, dans les années 1970, il fût possible de

cultiver in vitro des cellules endothéliales et de développer des modèles d'angiogenèse. Les années 1980 ont vu les premières purifications de facteurs angiogéniques. En 1985, les premiers inhibiteurs d'angiogenèse furent découverts (tableau 1). Dès 1990, les découvertes des laboratoires ont pu graduellement s'appliquer en clinique avec deux objectifs: d'une part développer des marqueurs pronostics chez les patients cancéreux et, d'autre part, développer des thérapies anti-angiogéniques afin de ralentir, voire d'arrêter la progression tumorale (Folkman 1995). Si dans le champ de l'oncologie le développement de la tumeur dépend de la néovascularisation, dans le domaine cardiovasculaire les problèmes sont tout autres puisque les patients développent une néovascularisation souvent insuffisante dans les territoires ischémiques (myocarde, membres inférieurs). En effet, malgré les progrès majeurs des techniques de revascularisation chirurgicales et percutanées, il est souvent difficile de revasculariser complètement un territoire ischémique. Par ailleurs, la durée limitée de ces techniques de revascularisation fait qu'un certain nombre de patients voit leur symptomatologie réapparaître et progressivement limiter leur activité fonctionnelle du fait de la douleur (angine de poitrine ou claudication intermittente des membres inférieurs) ou de l'apparition d'une insuffisance cardiaque. Dans la quête d'un traitement alternatif ou additionnel à la revascularisation et afin d'améliorer la symptomatologie et le pronostic à long terme de ces patients, la communauté scientifique s'est récemment intéressée au processus d'angiogenèse naturelle, aussi appelée «thérapie angiogénique» (Takeshita, Pu et al. 1994; Takeshita, Weir et al. 1996). Ce concept permettrait d'induire le développement d'une néovascularisation qui irriguerait en nutriments et en oxygène les territoires ischémiques.

Le fonctionnement normal d'un tissu dépend de sa capacité à s'approvisionner en oxygène et en nutriments à partir des vaisseaux sanguins. Comprendre la formation des vaisseaux sanguins est un objectif important de cette dernière décennie. Une bonne connaissance de ces mécanismes permettrait possiblement de développer de nouvelles options thérapeutiques visant à améliorer le pronostic des maladies cardiovasculaires ischémiques. La découverte des candidats capables de stimuler ou d'inhiber la prolifération endothéliale a favorisé une avancée considérable dans la compréhension de l'angiogenèse et permet d'entrevoir une utilisation thérapeutique prochaine de ses molécules.

1.1.3.2. Étapes de l'angiogenèse

L'angiogenèse est un terme utilisé pour décrire la croissance et le remodelage du réseau vasculaire primitif en un réseau plus complexe. Chez l'adulte, les nouveaux vaisseaux naissent essentiellement par angiogenèse, bien qu'une vasculogenèse puisse aussi avoir lieu. Les mécanismes cellulaires et moléculaires de l'angiogenèse diffèrent selon les tissus. La stimulation thérapeutique ou l'inhibition de l'angiogenèse doivent donc être ajustées selon les tissus et la maladie choisie. Jusqu'à ce jour, les cellules endothéliales ont principalement fait l'objet de la recherche sur l'angiogenèse, mais celles-ci ne peuvent qu'initier et non compléter l'angiogenèse. Les cellules péri-endothéliales sont donc essentielles pour la maturation vasculaire. Elles participent au contrôle hémostatique et protègent la structure endothéliale de la rupture et de la régression (Hirschi and D'Amore 1996). Enfin durant l'étape finale, les vaisseaux se recouvrent d'une couche musculaire leur permettant d'acquérir les propriétés

viscoélastiques et vasomotrices nécessaires à l'adaptation du vaisseau à la perfusion tissulaire. Chacune de ces étapes seront décrites en détail (Figure 4).

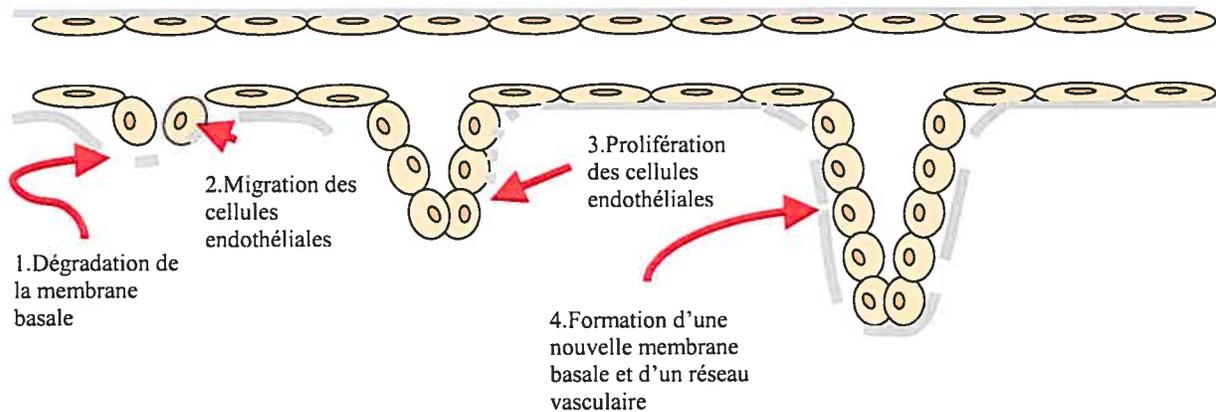


Figure 4. Schéma simplifié des principales étapes impliquées dans le processus angiogénique.

1.1.3.2.1. Vasodilatation et perméabilité endothéliale

L'angiogenèse est associée à une vasodilatation induite par le VEGF et médiée par le NO. Cette vasodilatation permet l'extravasation de protéines plasmatiques favorisant la migration des cellules endothéliales. L'angiopoïétine-1, ligand du récepteur endothélial Tie-2, est un inhibiteur naturel de la perméabilité vasculaire resserrant les jonctions cellulaires des vaisseaux (Gamble, Drew et al. 2000). Un relâchement des contacts intercellulaires endothéliaux et un relâchement des cellules péri-endothéliales sont nécessaires à la migration des cellules endothéliales. L'angiopoïétine-2 a été impliquée dans le détachement des cellules musculaires lisses et le relâchement de la matrice des vaisseaux (Maisonpierre, Suri et al. 1997).

1.1.3.2.2. Dégradation de la matrice extracellulaire

Les cellules sont reliées les unes aux autres par des molécules d'adhésion attachées aux protéines de la matrice extracellulaire. Lors de la migration des cellules

endothéliales la matrice extracellulaire est dégradée. Les protéinases de type activateur du plasminogène et les métalloprotéinases influencent l'angiogenèse en dégradant la matrice extracellulaire et en permettant la libération de facteurs emprisonnés dans cette matrice (bFGF et VEGF) (Stetler-Stevenson 1999). Les métalloprotéinases synthétisées sous forme inactive doivent être activées par la plasmine ou des facteurs de croissance pour franchir la membrane basale et créer des brèches dans la matrice extracellulaire. Les métalloprotéinases sont naturellement associées à des inhibiteurs spécifiques dont le Tissu Inhibitor Metalloproteinases (TIMP). Une sur-expression des métalloprotéinases ou une sous-expression de leurs inhibiteurs conduit à un déséquilibre favorisant la prolifération et la migration des cellules endothéliales (Haas and Madri 1999; Pepper 2001; Pepper 2001). Il existe actuellement 14 membres distincts de la famille des métalloprotéinases ayant des substrats spécifiques pour chaque composante de la matrice extracellulaire. La collagénase interstitielle (MMP-1), la collagénase (MMP-13), la gélatinase A et B (MMP-2), et la collagénase de type IV (MMP-9) sont quelques membres de la famille des métalloprotéinases associées à l'angiogenèse.

1.1.3.2.3.Prolifération et migration des cellules endothéliales

La matrice extracellulaire étant dégradée, les cellules endothéliales proliférantes vont migrer vers un site distant. Le VEGF et ses récepteurs sont largement impliqués dans cette prolifération et cette migration (Ferrara 1999). En effet, le VEGF active différentes voies de signalisation aux niveaux des cellules endothéliales (Wu, Mayo et al. 2000). Les deux principales cascades sont la voie des MAPK et la voie de PI3-K/Akt qui induisent respectivement la prolifération et la migration des cellules endothéliales

(Chavakis, Dernbach et al. 2001; Abid, Guo et al. 2004). L'angiopoïétine-1 apparaît aussi impliquée dans le chimiotactisme des cellules endothéliales en potentialisant le VEGF. L'angiopoïétine-1 permet aussi la maturation et la stabilisation du vaisseau (Suri, McClain et al. 1998). Les membres de la famille des FGF et de la famille des PDGF affectent aussi l'angiogenèse en recrutant des cellules mésenchymateuses ou des cellules inflammatoires. À cette étape, les molécules impliquées dans les interactions cellule-cellule ou cellule-matrice comme l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ permettent la migration et l'étalement des cellules endothéliales (Brooks, Clark et al. 1994; Brooks, Montgomery et al. 1994).

Le bourgeonnement angiogénique est contrôlé par l'équilibre entre activateurs et inhibiteurs. Les inhibiteurs de l'angiogenèse suppriment la prolifération et la migration des cellules endothéliales. Parmi ces molécules, on retrouve entre autre l'endostatine, l'angiostatine, l'anti-thrombine III, l'interféron- β , le *leukemia inducible factor* (LIF) et le PF-4, le thrombospondine.

1.1.3.2.4. Formation de la lumière vasculaire

Les cellules endothéliales s'assemblent en tubes pleins qui acquièrent par la suite une lumière. Le VEGF en association avec l'angiopoïétine-1 participe à la formation et l'augmentation du diamètre luminal (Suri, McClain et al. 1998). Les intégrines, molécules participant à l'interaction cellule/matrice ($\alpha_v\beta_3$ ou $\alpha_5\beta_1$) participent aussi à la formation de la lumière. La thrombospondine-1 est un inhibiteur endogène de la formation de la lumière (Lawler 2002).

1.1.3.2.5. Survie des cellules endothéliales

Assemblées en un nouveau vaisseau, les cellules endothéliales deviennent quiescentes et survivent pendant des années. Les forces hémodynamiques sont essentielles au maintien du lit vasculaire. Les forces de cisaillement physiologiques réduisent l'apoptose endothéliale (Urbich, Walter et al. 2000). Le contact cellules/matrice via les intégrines et une stimulation par le VEGF sont aussi indispensables à la survie des cellules endothéliales (Carmeliet and Collen 2000). Certains événements, dont l'apoptose, affectent la survie des cellules endothéliales et entraînent une régression vasculaire. L'apoptose des cellules endothéliales est un mécanisme physiologique de régression des vaisseaux et elle est induite par une diminution brutale de la stimulation angiogénique. L'induction de l'apoptose est une propriété fréquente des inhibiteurs de l'angiogenèse. Une rupture des interactions entre la matrice et les cellules endothéliales, en utilisant par exemple un antagoniste de l' $\alpha_v\beta_3$, induit aussi une apoptose (Yeh, Peng et al. 1998; Taga, Suzuki et al. 2002; Meeroitch, Bergeron et al. 2003).

1.1.3.2.6. Remodelage

Peu de choses sont connues en ce qui concerne les phénomènes qui guident les cellules endothéliales dans l'espace et à leur façon de s'agencer pour former un réseau en trois dimensions. La maturation du réseau endothélial implique un remodelage et une uniformisation des capillaires ainsi qu'une organisation régulière et structurée du réseau. Quelques expériences montrent que le VEGF, le récepteur Tie-1, certaines molécules d'adhésion ou des intégrines sont impliquées dans ce remodelage (Carmeliet, Ferreira et al. 1996; Patan 1998; Carmeliet, Ng et al. 1999).

1.1.3.2.7. Recrutement et croissance des cellules musculaires lisses

Le PDGF-BB est un puissant chimioattractant pour les cellules musculaires lisses. Le VEGF permet l'accumulation de ces cellules sur le mur vasculaire, sans doute via la stimulation du PDGF (Holmgren, Glaser et al. 1991; Carmeliet, Ng et al. 1999). L'angiopoïétine-1 et le récepteur Tie-2 ont un effet sur la croissance et le maintien du vaisseau sanguin en stabilisant les interactions entre les cellules murales et les cellules endothéliales et en induisant le remodelage des nouvelles branches. Des anomalies du récepteur Tie-2 chez l'humain induisent des malformations vasculaires caractérisées par des vaisseaux possédant moins de cellules musculaires lisses (Maisonpierre, Suri et al. 1997; Suri, McClain et al. 1998). Le TGF- β et son récepteur ont été impliqués dans la maturation des vaisseaux. Ils inhibent la prolifération et la migration des cellules endothéliales, induisent une différenciation des cellules musculaires lisses et stimulent la production de matrice extracellulaire, favorisant ainsi la solidification des interactions cellules endothéliales/cellules musculaires lisses (Pepper, Vassalli et al. 1993). D'autres molécules, comme l'endogline, l'endothéline-1, le facteur tissulaire, l'angiopoïétine-2 ont été décrites comme permettant le recrutement ou la différenciation des cellules musculaires lisses (Watanabe, Pakala et al. 2001; Hackett, Wiegand et al. 2002; Watanabe, Pakala et al. 2002). Les cellules musculaires lisses ainsi recrutées vont muscler le réseau endothéliale en bourgeonnant et en migrant le long du vaisseau naissant.

1.1.3.3.Principaux facteurs de croissance angiogéniques

De très nombreuses molécules ont été identifiées ces dernières années comme étant pro-angiogéniques. La liste non exhaustive est fournie dans le tableau 1. Nous décrirons en détail les molécules apparaissant comme essentielles dans les phénomènes d'angiogenèse ou les molécules dont l'inhibition dans des modèles d'animaux transgéniques ont démontré un rôle indispensable dans la formation du vaisseau sanguin.

Tableau 1. Activateurs et inhibiteurs de la croissance vasculaire. La croissance vasculaire chez l'adulte peut résulter de la vasculogenèse, de l'angiogenèse et/ou de l'artériogenèse.

	Activateurs	Inhibiteurs
Vasculogenèse (mobilisation d'hémangioblastes)	VEGF, NO, GM-CSF, IGF-1, BFGF, ang-1, MMP-9	?
Angiogenèse (bourgeonnement)	VEGF, PlGF, ang-1, ang-2, FGF, PDGF, IGF-1, HGF-SF, TNF- α , TGF- β , $\alpha v \beta_3$, $\alpha v \beta_5$, $\alpha_5 \beta_1$, MN VE-cadhérine, connexines, NO, Cyclo-oxygénases, HIF	TSP-1, TSP-2, endostatine Angiostatine, PF-4, INF, TIMP, LM609
Artériogenèse (croissance de collatéral)	MCP-1, GM-CSF, bFGF, FGF-4, PDGF-B, TNF- α , TGF- β , VCAM, Sélectines, MMP	IL-4, IL-12, PAI-1, TIMP

1.1.3.3.1.Transforming Growth Factor

Ces cytokines sont des polypeptides largement distribués dans l'organisme. Le contact entre les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses mène à l'activation de l'expression du TGF- β -1 (Heydarkhan-Hagvall, Helenius et al. 2003). L'activité du TGF- β -1 est cependant dépendante de la dégradation protéolytique de la matrice extracellulaire. En effet, les protéases uPA et tPA activent la forme latente de

TGF- β -1 permettant l'invasion des cellules endothéliales et l'interaction avec le récepteur. (Yee, JA et al. 1993). Le TGF- β -1 a de multiples fonctions biologiques et peut être inhibiteur ou inducteur de la croissance cellulaire selon le type de cellules. Le TGF- β -1 inhibe la prolifération et la migration des cellules endothéliales et induit la différenciation des cellules musculaires lisses et les péricytes (Takehara, LeRoy et al. 1987; Hirschi, Rohovsky et al. 1998). Le TGF- β -1 induit également la formation de la matrice extracellulaire et réprime l'expression du VEGFR2 (Mandriota, Menoud et al. 1996; Mann, Schmedlen et al. 2001), ce qui est en accord avec le fait que le TGF- β -1 inhibe l'angiogenèse induite par le VEGF (Pepper 1997). Les souris déficientes pour le gène TGF- β meurent autour du jour 10.5 de la vie embryonnaire et possèdent des défauts de vasculogenèse et d'hématopoïèse, essentiellement dans le sac vitellin (Dickson, Martin et al. 1995). Les cellules endothéliales sont présentes mais les capillaires sont peu différenciés. Les contacts intercellulaires sont également affectés. Le TGF- α , autre agent mitogène pour les cellules endothéliales, est relargué par les macrophages activés (Schreiber, Winkler et al. 1986; Madtes, Raines et al. 1988; Rappolee, Mark et al. 1988). Le TGF- α agit également sur la libération d'autres facteurs angiogéniques tels que le FGF et le tissue-Plasminogen Activator (Chu and Kawinski 1998; Kay, Lee et al. 1998).

1.1.3.3.2. Platelet Derived Growth Factor

Le PDGF est sécrété par les plaquettes activées lors de la coagulation. Les monocytes, spécialement lorsqu'ils sont activés, ainsi que les cellules musculaires lisses sont d'autres sources majeures de production de PDGF (Li and Eriksson 2003). Le PDGF est constitué de deux chaînes A et B qui s'associent par un pont disulfure pour former une

protéine homodimérique ou hétérodimérique. Une expression accrue des isoformes de PDGF a été associée avec une ischémie myocardique (Hughes, Clunn et al. 1996). Bell et ses collaborateurs ont montré que le PDGF était capable d'augmenter la formation des capillaires in vitro (Bell and Madri 1989). Cependant, d'autres auteurs ont nié l'effet angiogénique direct de ce facteur sur les cellules endothéliales en culture (Sato, Beitz et al. 1993). Les différentes actions du PDGF peuvent être dues à l'hétérogénéité des cellules endothéliales. En effet, les cellules d'origine capillaire exprimant le récepteur du PDGF-B répondent au PDGF alors que les cellules endothéliales provenant des vaisseaux de gros calibres ne répondent pas à l'action du PDGF (Bell and Madri 1989; Sato, Beitz et al. 1993). Le PDGF possède également un effet chimotactique important sur les cellules endothéliales (Westermarck 1990). Récemment, il a été démontré que l'induction de PDGF dans les cellules endothéliales d'origine cardiaque joue un rôle important dans l'angiogenèse (Edelberg, Aird et al. 1998). Outre son effet sur les cellules endothéliales, le PDGF agit également sur des cellules impliquées dans le processus de réparation tissulaire (Raines and Ross 1993).

1.1.3.3. La famille des Fibroblast Growth Factor

Cette large famille de facteurs de croissance comprend au moins neuf polypeptides (Friesel and Maciag 1995). L'acide FGF (aFGF ou FGF-1) et le basic FGF (bFGF ou FGF-2) sont les membres les mieux caractérisés de cette famille. Ces 2 polypeptides n'ont pas de séquence signal classique pour la sécrétion extracellulaire. L'aFGF et le bFGF sont associés à la matrice extracellulaire ou aux cellules et sont largement distribués dans les tissus adultes hors des phénomènes de croissance ou

d'angiogenèse (Friesel and Maciag 1995). In vitro, ils ne sont pas relargués dans le milieu; in vivo, le relargage du FGF pourrait avoir lieu à partir de cellules nécrotiques ou par dégradation de la matrice extracellulaire.

Les FGF partagent des propriétés communes: ils lient l'héparine avec une grande affinité, présentent un haut degré d'homologie protéique et se lient à des récepteurs de haute ou de basse affinité (Partanen, Vainikka et al. 1993). À ce jour, quatre récepteurs ont été identifiés. Le même récepteur peut fixer différents FGF et un FGF peut se fixer à différents récepteurs. La fixation du FGF à son récepteur de haute affinité stimule une activité tyrosine kinase conduisant à une phosphorylation des phospholipases C et à l'expression des gènes qui modulent le cycle cellulaire. Les récepteurs de basse affinité fournissent un site de stockage extracellulaire pour les FGF à partir duquel les facteurs de croissance peuvent être relargués par l'héparine ou lors de la dégradation de la matrice extracellulaire.

L'acidic FGF est un polypeptide exprimé par une grande variété de cellules, notamment les cardiomyocytes et les cellules musculaires lisses. C'est un facteur mitogène pour de nombreux types cellulaires dont les cellules endothéliales et il induit l'angiogenèse in vivo (Cross and Claesson-Welsh 2001).

Le basic FGF est un polypeptide se présentant sous 4 isoformes produits par un seul gène. L'isoforme de 18kDa possède une activité biologique pouvant induire l'angiogenèse in vivo. Il est produit par de nombreuses cellules normales, notamment les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les cellules myocardiques. Il est aussi produit par de nombreuses cellules tumorales. Le bFGF peut induire la prolifération des cellules endothéliales et leur migration et agit de façon synergique avec le VEGF

dans l'induction de l'angiogenèse in vivo (Asahara, Bauters et al. 1995; Bikfalvi, Klein et al. 1997).

Le FGF-3, le FGF-4, le FGF-5 et le FGF-6 ont été identifiés comme des oncogènes. Ils ne sont généralement pas trouvés dans les tissus normaux et contiennent une séquence signal pour la sécrétion extracellulaire. Ces FGF jouent un rôle important dans le développement embryonnaire et tumoral. Le FGF-4 et -5 ont été utilisés pour induire une angiogenèse thérapeutique [Giordano, 1996 #442; Grines, 2003 #890}.

1.1.3.3.4.Hepatocyte Growth Factor

Le Hepatocyte Growth Factor (HGF) aussi connu sous le nom de Scatter Factor (SF), est un polypeptide hétérodimère composé d'une chaîne alpha de 69 kDa et d'une chaîne bêta de 34 kDa. Pour être actif, le HFG/SF doit subir une hydrolyse du lien Arg-Val par une sérine protéinase. Le HGF/SF a d'abord été identifié comme étant un puissant stimulant de la croissance des hépatocytes [Jiang, 1999 #443; Nakamura, 1984 #444]. Des études subséquentes ont démontré que le HGF/SF est une cytokine exerçant diverses fonctions biologiques selon le tissu stimulé. Par exemple, une activation des cellules épithéliales par le HGF/SF entraîne une augmentation de leur motilité, de leur prolifération et de la morphogenèse (Jiang, Hiscox et al. 1999). Le caractère pro-angiogénique du HGF/SF lui a principalement été attribué suite à différentes études in vitro démontrant son effet sur les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les péricytes. En outre, une stimulation des cellules endothéliales par le HGF/SF entraîne l'expression de protéinases, de molécules d'adhésion et favorise la motilité, la

prolifération, la migration et la formation de tubules. Le HGF/SF stimule aussi le recrutement et la prolifération des cellules musculaires lisses et des péricytes (Rosen and Goldberg 1997). Les effets intracellulaires du HGF/SF sont médiés via un récepteur transmembranaire tyrosine kinase, le c-met, qui induit l'activation de plusieurs voies de signalisation (rho/rac, PI3k, MAPK, PLC, src, Grb-2-Sos). Le HGF/SF est surexprimé lors de cancer ce qui a permis d'identifier ce facteur comme étant un agent favorisant l'angiogenèse tumorale (Jiang, Hiscox et al. 1999). De récentes études portent sur la modulation de la voie de signalisation HGF/SF-c-met afin d'inhiber ou d'activer l'angiogenèse selon le besoin (Rosen, Lamszus et al. 1997; Van Belle, Witzenbichler et al. 1998).

1.1.3.3.5. Vascular Endothelium Growth Factor

Le VEGF entraîne un effet angiogénique *in vitro* et *in vivo*. *In vitro*, il induit une prolifération et une migration des cellules endothéliales ainsi que la formation de tubules (Leung, Cachianes et al. 1989). Le VEGF stimule l'expression et le relargage de différentes enzymes protéolytiques favorisant la lyse de la membrane basale et de la matrice extracellulaire, préalable indispensable à l'invasion du tissu péri-adventiciel par les néovaisseaux (Koolwijk, van Erck et al. 1996). L'effet angiogénique du VEGF se ferait en partie via la production d'oxyde nitrique (Ziche, Morbidelli et al. 1997). *In vivo*, le VEGF endogène a un rôle indispensable dans le développement des vaisseaux sanguins durant l'embryogenèse (Risau 1998). Une mutation du gène du VEGF chez la souris entraîne une mort *in utero* par absence de développement du système vasculaire. Le VEGF endogène intervient dans la stabilité et le maintien de l'homéostasie des vaisseaux

à l'âge adulte (Couffinhal, Kearney et al. 1997). L'expression du VEGF est corrélée dans le temps et dans l'espace aux phénomènes d'angiogenèse physiologique, par exemple dans l'appareil reproducteur femelle (Ferrara, Winer et al. 1993). Il joue un rôle déterminant dans la réponse angiogénique en situation d'hypoxie tissulaire comme dans la guérison des plaies, la rétinopathie proliférative, l'endométriose, le psoriasis, la progression tumorale ou la revascularisation des tissus ischémiques. Lors de ces circonstances pathologiques, il a été démontré qu'une inhibition du VEGF entraîne une réduction significative du nombre de néovaisseaux et une altération de la récupération du flux sanguin (Couffinhal, Silver et al. 1998).

Le VEGF se différencie des autres facteurs de croissance d'une part, par une séquence signale sur la région N terminale conduisant à la sécrétion de la protéine et d'autre part, par des récepteurs spécifiques sur les cellules endothéliales. Le VEGF est un facteur de croissance qui a été isolé lors de travaux effectués sur des cellules pituitaires bovines (Ferrara and Henzel 1989). Le VEGF a également été isolé comme facteur sécrété par les tumeurs, induisant une perméabilité vasculaire (Connolly, Olander et al. 1989; Keck, Hauser et al. 1989) ce qui lui a initialement valu le nom de *vascular permeability factor* (VPF).

Le VEGF est un facteur de croissance ayant comme cible les cellules endothéliales (Senger, Van de Water et al. 1993). La distribution du VEGF dans l'organisme est très large et on peut ainsi l'isoler dans les myocytes cardiaques, la glande pituitaire, le rein, le foie et l'ovaire. Le VEGF est aussi exprimé par les macrophages, les fibroblastes, les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales et plusieurs autres types cellulaires. Il a également été purifié à partir de milieux conditionnés de différentes

lignées tumorales. L'expression de l'ARNm du VEGF se juxtapose dans le temps et dans l'espace avec la prolifération vasculaire. L'expression du VEGF est induite par différents facteurs de croissance et cytokines notamment le bFGF, le TNF- α et l'IL-2. Cependant, le stimulus le plus puissant pour l'expression du VEGF est l'hypoxie (Brogi, Wu et al. 1994).

1.1.3.3.5.1. Structure du VEGF

Le VEGF est une glycoprotéine homodimérique de 45 kDa dont le gène est localisé sur le chromosome 6 (Figure 5). Il se compose de 8 exons codant pour 5 isoformes connues produites par épissages alternatif de l'ARN messenger du gène commun (121, 145, 165, 189, et 206 acides aminés) (Ferrara 1999). Le VEGF 165 est la forme prédominante. Les cinq isoformes partagent les acides aminés dans leur partie amino-terminale incluant la séquence du peptide signal, codée par les exons 1-5 et aussi les acides aminés de l'extrémité carboxy-terminale codés par l'exon 8. L'isoforme 206 possède un court exon désigné exon 6' qui est une extension de l'exon 6. Il y a très peu de données sur la distribution et le rôle des isoformes 121, 145, 189 et 206. Cependant, Houck et ses collaborateurs ont démontré que l'isoforme 121 était majoritairement exprimé dans le tissu placentaire. L'isoforme 206 représentait la forme la plus rare et elle a été identifiée seulement dans une banque d'ADNc préparée à partir du foie de fœtus d'humain. L'expression de l'isoforme 206 semble être limitée à la période embryonnaire (Houck, Ferrara et al. 1991). La région «core» de l'extrémité amino-terminale du VEGF, codée par les exons 1-5, possède 8 cystéines qui contribuent à la formation des dimères. Les isoformes du VEGF partagent des effets biologiques actifs sur les cellules

endothéliales. Cependant, les formes les plus longues comportent davantage de résidus basiques et ont une plus grande affinité pour les glycoprotéines de la matrice extracellulaires et les héparans sulfates à la surface des cellules. Les isoformes les plus longues sont donc le plus souvent trouvées fixées à la surface des cellules ou à la matrice, à la différence des deux isoformes les plus courtes qui sont sécrétées et solubles. Les différentes isoformes semblent avoir une activité biologique semblable (Takeshita, Weir et al. 1996).

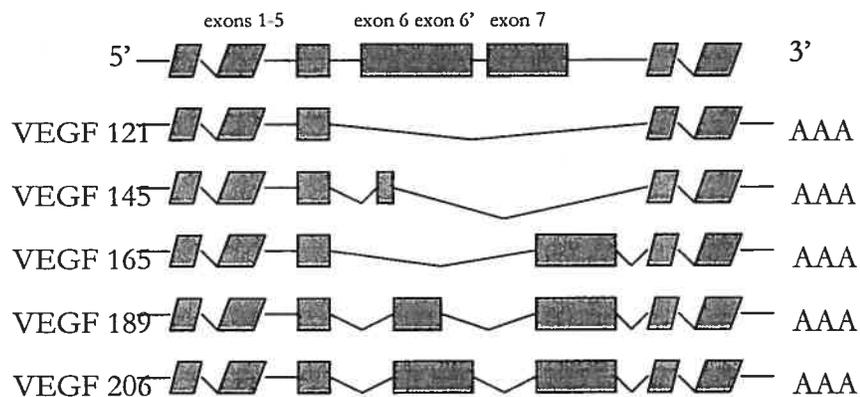


Figure 5. Représentation de la structure du gène des différentes isoformes du VEGF-A

Récemment, 5 protéines présentant une forte homologie avec le VEGF ont été découvertes. Ces protéines ont été nommées VEGF-B (21 kDa), VEGF-C (23 kDa), VEGF-D (13 kDa), VEGF-E (20 kDa) et le Placenta Growth Factor (PlGF) (23kDa) (Joukov, Pajusola et al. 1996; Olofsson, Pajusola et al. 1996; Yamada, Nezu et al. 1997; Meyer, Clauss et al. 1999). La forme initialement décrite a pris le nom de VEGF-A (Figure 6).

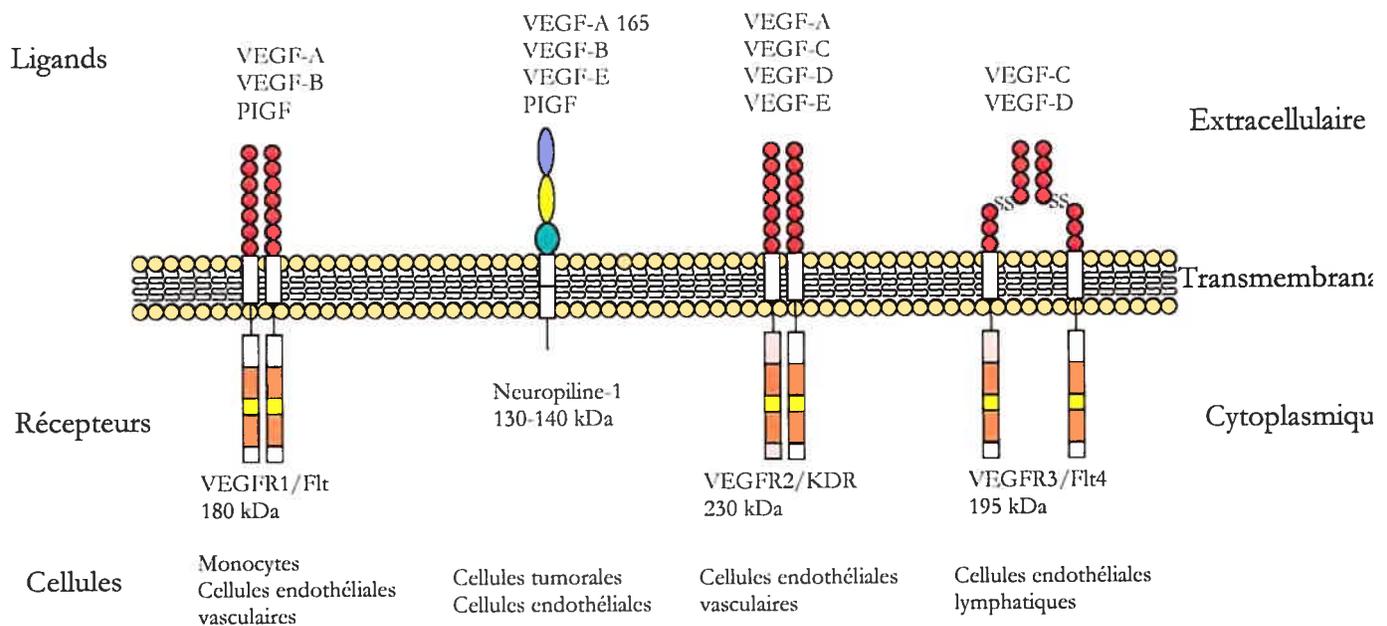


Figure 6. Les différentes molécules apparentées au VEGF et leurs récepteurs.
Figure modifiée à partir de Zachari, I 2001.

1.1.3.3.5.2. Récepteurs du VEGF

Les récepteurs du VEGF ont une répartition ubiquitaire dans tout l'arbre vasculaire. Au début, la famille des récepteurs du VEGF comprenait 3 membres: Flt1, Flk1/KDR et Flt4 (Figure 6) (Pajusola, Aprelikova et al. 1992; Galland, Earnshaw et al. 1993; Shibuya, Seetharam et al. 1994; Mustonen and Alitalo 1995; Terman and Dougherty-Vermazen 1996). Ils sont respectivement désignés VEGFR1, VEGFR2 et VEGFR3 (Figure 6). La région extracellulaire dans cette famille est composée de 7 domaines de type immunoglobuline. Flt1, Flk1 et Flt4 ont seulement 30% d'identité en acides aminés dans leur région extracellulaire, mais sont similaires à 80% dans leur domaine tyrosine kinase. La spécificité d'interaction entre les différents VEGF et leurs récepteurs est complexe (Kuzuya, Ramos et al. 2001). VEGFR-1 et VEGFR-2 sont des récepteurs de haute affinité pour le VEGF-A. Parmi les isoformes du VEGF-A, le VEGF 165 a la plus grande affinité de liaison aux VEGFR. Le VEGF-C interagit avec le VEGFR-3 et à un

moindre degré avec VEGFR-2. Bien que VEGFR-1 et VEGFR-2 partagent le même ligand, ils induisent des réponses cellulaires différentes (Kliche and Waltenberger 2001). Les activités mitogéniques et chimiotactiques de VEGFR-2 dans les cellules endothéliales ne sont pas retrouvées pour VEGFR-1. VEGFR-3 est doté d'une activité mitogénique et chimiotactique quand il est exprimé dans les cellules endothéliales ou fibroblastiques. Les fonctions spécifiques de VEGFR-1 et -2 ne sont pas clairement définies au niveau cellulaire, mais les expériences d'inactivation par recombinaison homologue des gènes codant pour VEGFR-1 et -2 ont permis de démontrer qu'ils exercent leur action au niveau de différents aspects ou phase du développement embryonnaire. L'altération du gène VEGFR-1 se traduit par une désorganisation de l'endothélium vasculaire sans affecter la différenciation des cellules endothéliales, tandis que l'altération de VEGFR-2 affecte la formation des îlots sanguins et la vasculogénèse (Shibuya 2001; Cross, Dixelius et al. 2003). Cette différence d'activité biologique est révélatrice de la mise en jeu de voies de signalisation intracellulaires spécifiques de VEGFR-1 et -2 (Shibuya 2001; Cross, Dixelius et al. 2003).

Quoi qu'il en soit, ces récepteurs appartiennent à la famille des récepteurs dotés d'une activité tyrosine kinase. Ces protéines possèdent une région extracellulaire capable de lier les ligands, un domaine transmembranaire et une région cytoplasmique portant l'activité tyrosine kinase (Shibuya 2001). La liaison du VEGF provoque la dimérisation du récepteur, déclenche l'activité catalytique ce qui conduit à la phosphorylation des résidus tyrosines présents sur le récepteur lui-même et sur ses substrats cytoplasmiques (Waltenberger, Claesson-Welsh et al. 1994; Heldin 1995; Fuh, Li et al. 1998). Bien que l'affinité du VEGF soit supérieure pour le VEGFR-1, le VEGFR-2 semble être le

principal récepteur impliqué dans la signalisation intracellulaire endothéliale et dans l'activité angiogénique induite par le VEGF (Figure 7). Chez la cellule endothéliale, le VEGF induit une très forte autophosphorylation du VEGFR-2 résultant en l'activation de la PLC γ via des interactions de type SH2 et une hydrolyse de phosphatidylinositol 4,5-biphosphate en diacylglycérol (DAG) et en inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) (Takahashi and Shibuya 1997; Takahashi, Ueno et al. 1999). La synthèse de ces deux messagers mène à la relâche de calcium intracellulaire par le réticulum endoplasmique et à l'activation en cascade des protéines kinases C (PKC α β γ) sensibles au calcium et de la voie p42/44 «mitogen-activated protein kinase» (MAPK), une voie de signalisation directement impliquée dans la phosphorylation de facteurs de transcription nucléaires et dans la prolifération cellulaire (Kroll and Waltenberger 1997; Rousseau, Houle et al. 1997; Takahashi, Ueno et al. 1999).

Finalement, une stimulation du VEGFR-2 par le VEGF active la voie de la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) (Xia, Aiello et al. 1996). Tout comme PLC γ , cette enzyme possède des domaines SH2 lui permettant d'interagir avec le VEGFR-2 phosphorylé et d'activer Akt. Akt, une sérine kinase, peut promouvoir une activité anti-apoptotique maximisant l'effet mitogénique de VEGF. Aussi, elle peut phosphoryler la synthase du monoxyde d'azote endothélial (eNOS), responsable de la synthèse de monoxyde d'azote induite par le VEGF et de son effet hypotenseur (Fulton, Gratton et al. 1999).

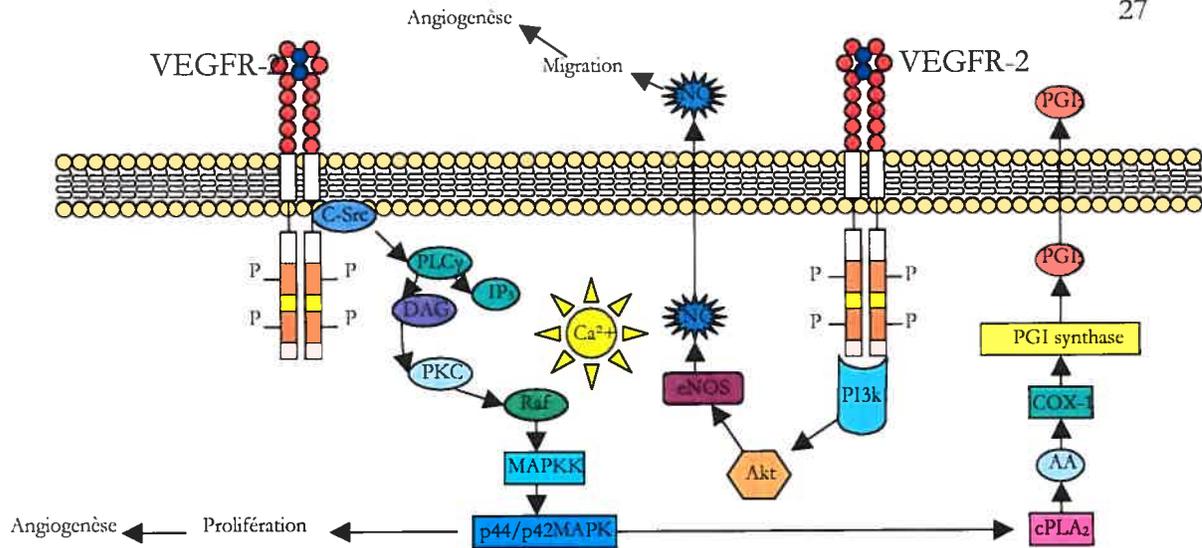


Figure 7. Représentation des mécanismes intracellulaires induits via une activation du VEGFR-2

Le dernier récepteur connu du VEGF est la neuropiline-1 (NRP-1). Elle consiste en une protéine membranaire de 140 kDa participant à la croissance axonale grâce à sa capacité de lier les séphorines/collapsines qui possèdent une activité répulsive envers les axones (He and Tessier-Lavigne 1997). Il a été récemment démontré que la NRP-1 interagit avec le VEGF. Elle se retrouve en forte concentration sur les cellules endothéliales vasculaires et sur les cellules mésenchymateuses entourant les vaisseaux sanguins. La NRP-1 agirait comme modulateur de l'activation du VEGFR-2. En effet, la première étude portant sur l'interaction entre la NRP-1 et le VEGF rapporte que la liaison du VEGF-A165 au VEGFR-2 et à la NRP-1 permet d'augmenter l'activation du VEGFR-2, comparativement à une stimulation en absence de NRP-1, ce qui a pour effet d'augmenter significativement la phosphorylation du VEGFR-2 et la migration cellulaire (Neufeld, Kessler et al. 2002). La génération de souris transgéniques exprimant la NRP-1 sous le contrôle d'un promoteur de la β -actine, entraînant une surexpression du récepteur chez l'embryon, a confirmé le rôle pro-angiogénique de la NRP-1. L'analyse morphologique de ces souris rapporte une formation excessive des capillaires ainsi

qu'une mort au stade embryonnaire (Kitsukawa, Shimono et al. 1995). En revanche, la dislocation homozygote du gène de la NRP-1 provoque des défauts majeurs de vascularisation en plus d'interférer avec le développement du système artériel (Kitsukawa, Shimizu et al. 1997; Kawasaki, Kitsukawa et al. 1999).

1.1.3.3.5.3. Régulation du VEGF par l'hypoxie

Le principal élément qui régule l'expression du VEGF-A est l'hypoxie (Figure 9). En effet, le VEGF fait partie d'une large famille de protéines dont l'expression des gènes est induite dans des conditions de stress hypoxique (Brogi, Wu et al. 1994). Cette induction fait intervenir des éléments de réponse à l'hypoxie localisés au niveau du promoteur du gène (Figure 8). Une diminution de la concentration en oxygène conduit à une cascade de signaux intracellulaires. Les éléments de réponse à l'hypoxie ont été identifiés au niveau d'un activateur dans la région 3' de ce gène (Levy, Levy et al. 1995). Ces éléments sont des sites de liaison pour un facteur de transcription spécifique le HIF (Hypoxia Inducible Factor). L'induction de la transcription de l'ARNm du VEGF est médiée, du moins en partie, par la liaison de la protéine HIF-1 à un site de liaison sur le promoteur du gène du VEGF, l'élément de réponse à l'hypoxie (hypoxia responsive element, HRE). L'induction hypoxique du VEGF semble faire intervenir les proto-oncogènes c-Src et Raf-1. Cette action serait inhibée par le gène suppresseur de tumeurs p53 (Mukhopadhyay, Tsiokas et al. 1995).

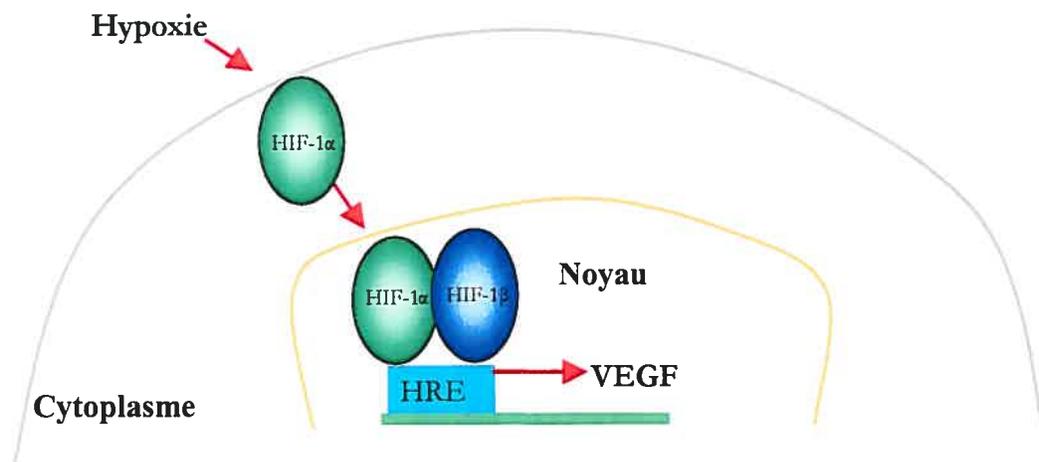


Figure 8. Représentation schématique de l'induction de la transcription du VEGF par l'hypoxie, médiée par le facteur de transcription hypoxia inducible factor (HIF-1). La voie de signalisation induite par l'hypoxie et menant à l'expression du VEGF peut être schématisée ainsi: L'hypoxie stabilise le HIF-1 α , qui sera transloqué dans le noyau et formera un dimère avec la sous-unité β avant de se lier au hypoxia responsive element (HRE) et induire la transcription du VEGF.

En plus d'induire la transcription du VEGF, l'hypoxie joue un rôle important dans la stabilisation de l'ARNm du VEGF par le biais de protéines qui lient des séquences localisées dans la région 3' UTR (untranslated region) de l'ARNm du VEGF (Stein, Neeman et al. 1995; Damert, Ikeda et al. 1997; Claffey, Shih et al. 1998). Récemment, il a été démontré que les protéines HuR et hnRNP-L lient des régions du messenger, connues comme étant importantes pour la stabilisation en hypoxie (Levy, Chung et al. 1998; Shih, and Claffey 1999). Il est clair que d'autres protéines interviennent dans la stabilisation de l'ARNm du VEGF mais leur identité n'a pas encore été élucidée. Des évidences indiquent que l'augmentation de la transcription du gène du VEGF est également médiée par des sites localisés dans les séquences encodant la région non-traduite de 5'UTR de l'ARNm de VEGF, cette dernière étant particulièrement longue (Akiri, Nahari et al. 1998; Stein, Itin et al. 1998). Finalement, la transcription du VEGF est augmentée par un «*internal ribosomal entry site*» (IRES) qui permet de

préserver la traduction de l'ARNm du VEGF suite à une diminution de l'hypoxie (Figure 9) (Akiri, Nahari et al. 1998).

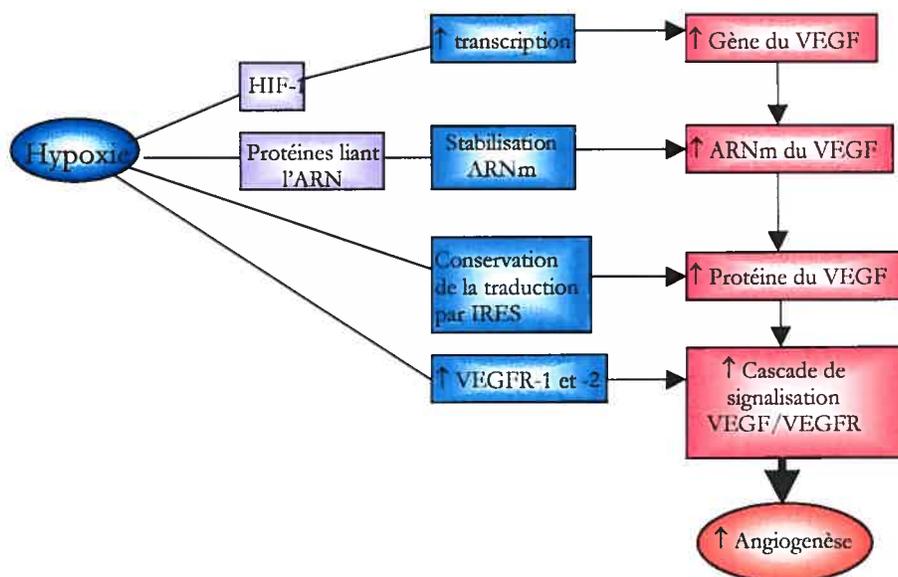


Figure 9. Les différentes facettes de l'implication de l'hypoxie dans la régulation du VEGF et de la réponse angiogénique. HIF-1, hypoxia inducible factor-1; IRES, internal ribosomal entry site. Figure modifiée Pugh, CW 2003.

1.1.3.3.6. Angiopoïétine-1

L'expression de ce gène est détectée durant l'embryogenèse dans les îlots sanguins de sac vitellin où se trouvent les précurseurs des cellules endothéliales (Suri, Jones et al. 1996). Son expression est aussi détectée dans l'endocarde et dans les cellules endothéliales. Son expression au niveau des cellules endothéliales persiste chez l'adulte à un niveau plus faible alors que ces cellules ne prolifèrent plus. L'angiopoïétine a comme récepteur Tie-2 (Davis, Aldrich et al. 1996). Une mutation du ligand ou de son récepteur entraîne une mort in utero chez la souris en inhibant le développement du système vasculaire. Les expériences d'inactivation des gènes chez la souris suggèrent que le couple angiopoïétine-1/Tie-2 intervient dans le recrutement des péricytes et dans la

stabilisation des interactions cellules endothéliales/matrice extracellulaire et péricytes durant la mise en place des vaisseaux sanguins (Suri, McClain et al. 1998). La surexpression de l'angiopoïétine-1 augmente la vascularisation et diminue la perméabilité vasculaire des animaux transgéniques. L'angiopoïétine-1 a des effets spécifiques sur les cellules endothéliales: elle induit une réponse chimiotactique, elle favorise leur différenciation et est un facteur de survie anti-apoptotique [Kim, 2000 #491; Kim, 2000 #490; Papapetropoulos, 2000 #492; Witzenbichler, 1998 #493}.

1.1.3.3.7. Angiopoïétine-2

Les séquences de l'angiopoïétine-2 et l'angiopoïétine-1 présentent 85% d'homologie. Comme l'angiopoïétine-1, l'angiopoïétine-2 est un ligand du récepteur Tie-2. La surexpression du gène induit une malformation des vaisseaux in utero et suggère que l'angiopoïétine-2 soit un antagoniste naturel de l'angiopoïétine-1. L'angiopoïétine-2 bloque l'activation de Tie-2 induite par l'angiopoïétine-1 [Maisonpierre, 1997 #86]. L'angiopoïétine-2 est exprimée par les cellules endothéliales ou les péricytes des vaisseaux embryonnaires avec une expression qui se superpose en partie à l'expression de l'angiopoïétine-1. L'angiopoïétine-2 potentialise le VEGF pour induire l'angiogenèse en empêchant que l'angiopoïétine-1 maintienne l'intégrité de l'endothélium et sa quiescence (Witzenbichler, Maisonpierre et al. 1998), mais il n'est pas capable à lui seul d'induire une réponse angiogénique. En revanche, en l'absence de VEGF, l'inhibition de l'activité de l'angiopoïétine-1 par l'angiopoïétine-2 conduirait à un détachement des cellules endothéliales de la matrice et des péricytes, à leur mort et à la régression des vaisseaux

(Maisonpierre, Suri et al. 1997). Il a été montré récemment que l'angiopoïétine-2 était exprimée au niveau du front d'invasion des néovaisseaux dans certaines tumeurs.

1.1.3.3.8. Monoxyde d'azote (NO)

Le NO a été découvert en 1980 par Furchgott et Zawadzki (Furchgott and Zawadzki 1980) qui ont démontré que la relaxation des cellules musculaires lisses (CML) artérielles en réponse à l'acétylcholine dépendait de l'intégrité anatomique de l'endothélium. Le facteur à l'origine de cette relation intercellulaire est alors dénommé endothelium derived relaxing factor (EDRF) et c'est en 1986 qu'il est identifié comme étant le NO (Ignarro 1989; Ignarro 1989; Moncada 1993; Moncada and Martin 1993; Radomski and Moncada 1993). Le NO est un gaz radicalaire, liposoluble, d'une grande diffusabilité à travers les membranes cellulaires et d'une demi-vie de quelques secondes. Il est produit par une famille d'enzymes, les *synthases du monoxyde d'azote* (NOS) (Griffith and Stuehr 1995) comprenant 3 formes soient la forme neuronale, la forme inductible et la forme endothéliale. Le NO est produit à partir de la L-arginine qui est convertie en L-citrulline et en NO en présence de certains cofacteurs dont, entre autre, le tétrahydrobioptérine (BH₄), le flavine-adenine-mononucléotide (FMN) et le flavine-adenine-dinucléotide (FAD), et le donneur d'électrons NADPH. Une fois produit, le NO diffuse rapidement et gagne les cellules adjacentes (Figure 10)(Moncada and Higgs 1993; Forstermann 1994; Forstermann, Closs et al. 1994; Forstermann, Pollock et al. 1994).

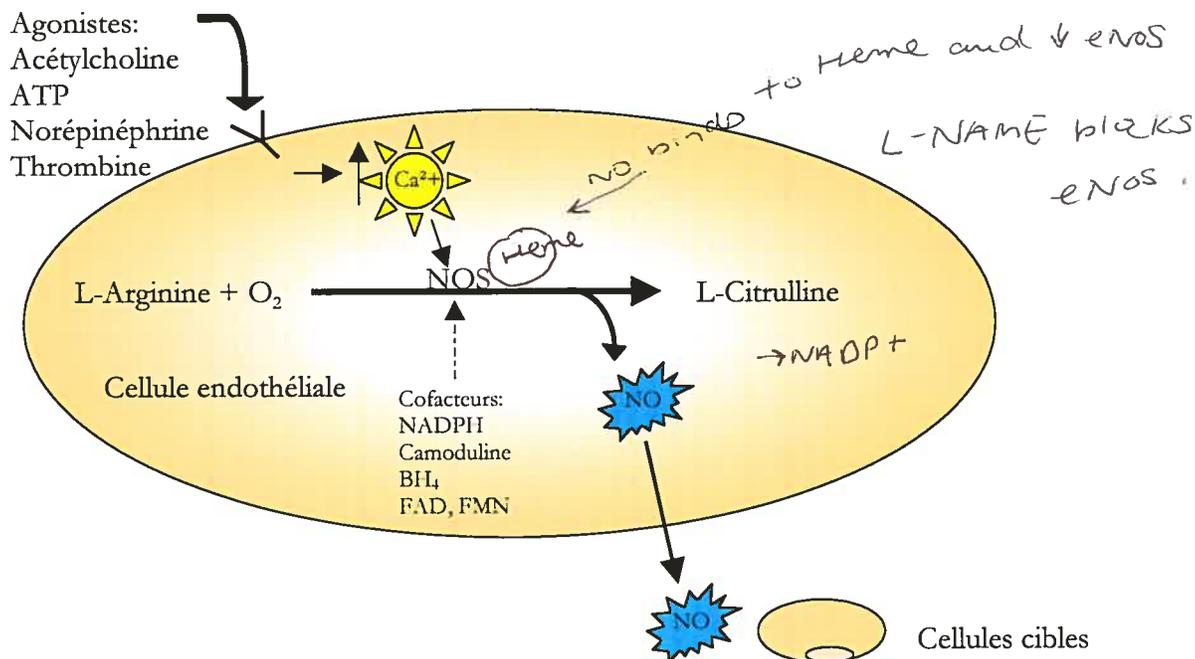


Figure 10. Représentation de la synthèse du NO. NOS, synthase du monoxyde d'azote, Ca²⁺, Calcium, O₂, oxygène, BH₄, tétrahydrobioptérine (BH₄), FAD, flavine-adénine-dinucléotide, FMN, flavine-adénide-mononucléotide.

De nombreuses cibles ont été mises en évidence: groupements thiols des protéines, groupements héminiques, ADN, mais sa cible privilégiée est sans doute la guanylate cyclase soluble (Mayer, Koesling et al. 1993). La stimulation de cette dernière aboutit à la formation de cGMP qui est responsable de la relaxation des cellules musculaires lisses et de l'inhibition de l'agrégation plaquettaire (Schmidt, Lohmann et al. 1993). Ainsi les propriétés du NO sont multiples: vasodilatation, inhibition de la prolifération des cellules musculaires lisses, de l'agrégation plaquettaire et de l'adhérence des monocytes sanguins à l'endothélium (par inhibition de la synthèse des molécules d'adhésion des leucocytes: VCAM, ICAM, MCP1 (Harrison 1997).

Il a aussi été démontré que la production de NO dérivé de l'endothélium est un médiateur de l'angiogenèse (Horowitz, Rivard et al. 1997; van der Zee, Murohara et al. 1997; Murohara, Asahara et al. 1998). L'effet angiogénique du NO a été étudié par

différents groupes de recherche et dans divers modèles expérimentaux. Ziche et coll. ont tout d'abord démontré que le NO joue un rôle de premier plan dans la réponse angiogénique médiée par la substance P, un vasodilatateur majeur dérivé de l'endothélium (Ziche, Morbidelli et al. 1994). Ensuite, Guo et coll. ont montré que l'administration exogène de donneurs de NO stimulait significativement la prolifération de cellules endothéliales en culture (Guo, Murara et al. 1996). Il est intéressant de noter que le facteur angiogénique VEGF stimule la relâche endothéliale de NO (Ku 1996; van der Zee, Murohara et al. 1997). De plus, les travaux de Morbidelli et coll., démontrent que la réponse angiogénique induite par le VEGF serait dépendante de la production endogène de NO (Morbidelli, Chang et al. 1996). Finalement, il a été rapporté que la réponse angiogénique dans un modèle d'ischémie du membre inférieur était entravée chez la souris eNOS $-/-$. La relation entre le VEGF et le NO semble irrévocable puisque la réponse angiogénique, dans ce modèle, ne pouvait être récupérée par l'administration de la protéine recombinante du VEGF ou par une stratégie de transfert de gène par l'adéno-VEGF (Murohara, Witzenbichler et al. 1999).

Les mécanismes d'action impliqués dans la promotion de la réponse angiogénique médiée par le NO ne sont pas encore clairement définis. Cependant, certaines hypothèses peuvent être avancées. Premièrement, le NO est un facteur de survie, inhibant l'apoptose et induisant la prolifération de la cellules endothéliale (Dimmeler and Zeiher 1999; Rossig, Fichtlscherer et al. 1999) vraisemblablement par l'entremise du VEGF et du FGF (Ziche, Morbidelli et al. 1997; Dulak, Jozkowicz et al. 1999; Murohara, Witzenbichler et al. 1999}. Le NO favorise aussi la migration des cellules endothéliales en augmentant l'expression de l'intégrine $\alpha\beta3$ et en stimulant la

dégradation de la matrice extracellulaire via la surexpression de la protéinase de type urokinase activateur du plasminogène (uPA) par le bFGF [Ziche, 1994 #1]. L'effet hémodynamique de ce vasodilatateur pourrait aussi intervenir dans le rôle angiogénique du NO. Il est maintenant connu qu'une augmentation du flux sanguin dans la microcirculation est associée à une induction de la prolifération des cellules endothéliales (Hudlicka 1998). Le NO en favorisant la vasodilatation des vaisseaux et entraînant une augmentation du flux sanguin, pourrait ainsi favoriser le développement de capillaires. Finalement, un nouveau mécanisme permettant d'expliquer l'effet angiogénique du NO a récemment été rapporté. Matsunaga et coll. suggèrent que le NO supprime la production de l'angiostatine, un inhibiteur spécifique de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales (O'Reilly, Holmgren et al. 1994; O'Reilly, Holmgren et al. 1994; Matsunaga, Weihrauch et al. 2002).

1.1.3.4.L'hypoxie, principal facteur de régulation de l'angiogénèse

L'hypoxie joue un rôle déterminant dans l'initiation du processus de l'angiogénèse. Physiologiquement, l'hypoxie peut être liée à une baisse de la pression partielle de l'oxygène dans l'air ambiant (haute altitude), à une augmentation de la consommation d'oxygène (exercice physique), ou au développement rapide d'un tissu (corps jaune, placenta). L'hypoxie est aussi liée à certaines pathologies dont l'ischémie vasculaire et le développement de tumeurs. L'hypoxie entraîne une série de réponses systémiques et locales: accélération du débit cardiaque, vasodilatation, hyperventilation et production accrue d'érythrocytes grâce à la synthèse d'érythropoïétine. Sur le plan cellulaire, l'hypoxie transforme la phosphorylation oxydative aérobie en un

métabolisme anaérobie avec expression sélective de gènes de la glycolyse, de la néoglucogenèse, et du transport du glucose (Semenza, Agani et al. 1999). Une grande partie de ces réponses cellulaires est coordonnée par le HIF-1 α (Semenza 2002). La principale cascade de signalisation déclenchée par l'hypoxie implique la régulation de l'activité transcriptionnelle du gène codant pour le VEGF suscitant la stimulation des cellules endothéliales et le bourgeonnement vasculaire (Liu, Cox et al. 1995; Forsythe, Jiang et al. 1996). HIF-1 favorise aussi l'expression d'autres gènes dont l'érythropoïétine et certains gènes de la glycolyse, les récepteurs du VEGF, le TGF et le PDGF potentialisant ainsi l'effet du VEGF (Figure 11).

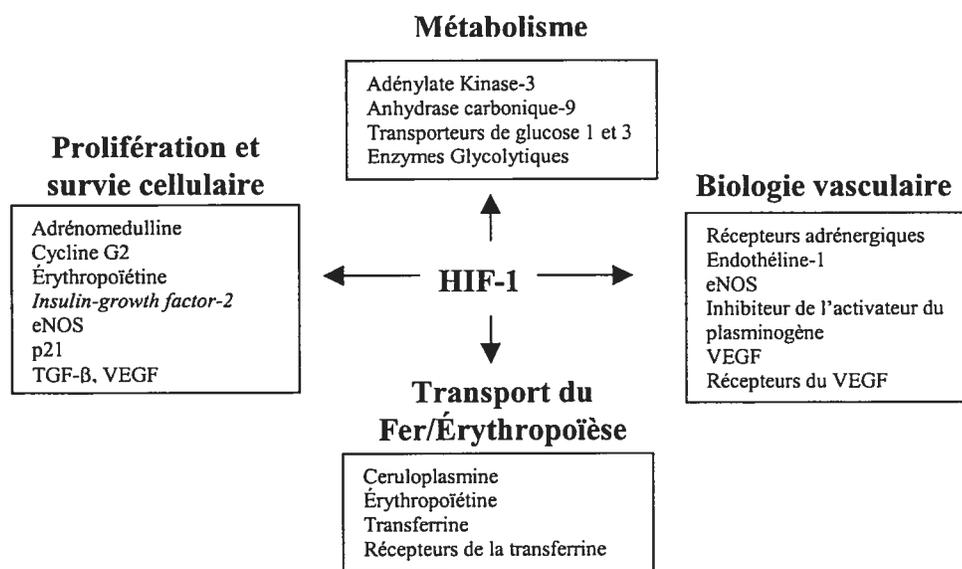


Figure 11. Représentation des principaux gènes ciblés par le HIF-1. Figure modifiée de Semenza GL, 2001.

HIF-1 α est exprimé de façon ubiquitaire et est induit lors de l'hypoxie par un mécanisme post-traductionnel. La partie C-terminale de la protéine comporte en effet un domaine sensible à l'oxygène qui, dans des conditions de normoxie, est rapidement ubiquitinyllée et dégradée dans le protéasome. Cette dégradation rapide est médiée par le

facteur Von Hippel Lindau (VHL) qui lie HIF-1 α et induit son ubiquitination (Maxwell, Wiesener et al. 1999; Tanimoto, Makino et al. 2000). Lorsqu'il existe une hypoxie, même modérée, ce domaine est stabilisé, HIF-1 α est protégé de la dégradation et s'hétérodimérise avec HIF-1 β pour induire ensuite l'expression de gènes pro-angiogéniques (Figure 12) (Semenza 2000; Semenza 2000; Semenza 2002).

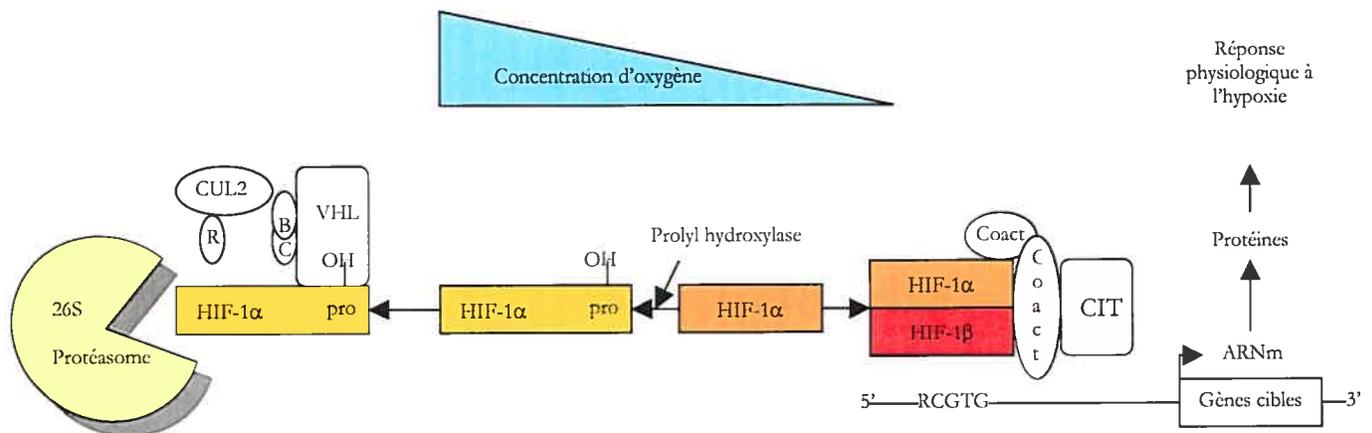


Figure 12. Régulation de l'expression de HIF-1 α par l'oxygène. Les concentrations d'oxygène déterminent la fréquence à laquelle HIF-1 α est sujet à l'hydroxylation par les prolyl hydroxylases. L'hydroxylation est nécessaire pour l'interaction avec le Von Hippel Lindau (VHL). Celui-ci recrute les élongines B et C, Cullin 2 (CUL2) et RBX1 (R) afin de former un complexe protéine ligase-ubiquitine fonctionnel. Suite à l'ubiquitination de HIF-1 α , le complexe sera dégradé par le protéasome 26S. En condition d'hypoxie, l'hétérodimère, formé par la dimérisation de HIF-1 α et de HIF-1 β , se lie au *hypoxia responsive element* contenant la séquence 5'-RCGTG-3' et recrute des coactivateurs (Coact) qui entraînent la formation du complexe initiateur de la transcription (CIT), la synthèse de l'ARNm et finalement la production de protéines qui régulent la réponse physiologique à l'hypoxie. Figure modifiée de Semenza GL, 2001.

La fonction de chacune des sous-unités de HIF-1 a été étudiée par des expériences de recombinaison homologue. L'inactivation du gène codant pour HIF-1 β a permis de montrer que cette sous-unité de HIF-1 était essentielle pour induire l'accumulation des ARNm du VEGF dans les cellules souches embryonnaires placées en hypoxie. La

présence de HIF-1 β est aussi cruciale pour le développement embryonnaire: les embryons HIF-1 β $-/-$ ne sont pas viables au-delà de E10.5 (Maltepe, Schmidt et al. 1997). L'angiogenèse est déficiente dans le sac vitellin et les arcs branchiaux, les capillaires sont peu nombreux et ils semblent fusionnés entre eux. L'inactivation du gène codant pour HIF-1 α était d'autant plus intéressante que la sous-unité α est spécifique de la réponse à l'hypoxie. Des expériences de retard sur gel avec des extraits nucléaires des cellules souches embryonnaires HIF-1 α $-/-$ ne permettent pas de mettre en évidence une activité de fixation à la séquence HRE reconnue par HIF-1. En l'absence d'HIF-1 α , il n'y a donc pas dans ces cellules d'autres protéines capables de se dimériser avec HIF-1 β et de se fixer sur la séquence HRE. Dans les cellules souches embryonnaires HIF-1 α $-/-$, l'expression des ARN du VEGF n'est plus induite (Iyer, Kotch et al. 1998) ou induite de façon partielle (Ryan, Lo et al. 1998) par l'hypoxie. Dès le jour 8, les embryons mutants homozygotes sont plus petits, le développement du tube neural est retardé et le nombre de cellules mésenchymateuses en apoptose est supérieur, par rapport aux embryons sauvages. La morphogenèse des vaisseaux sanguins dans le sac vitellin et dans l'embryon est perturbée; à E9,5 l'aorte dorsale est présente mais plus petite et le cœur bat. Les embryons HIF-1 α $-/-$ ne survivent pas au-delà de E11 (Iyer, Kotch et al. 1998; Ryan, Lo et al. 1998). Ces résultats suggèrent que HIF-1 α est nécessaire non pas à l'initiation de la formation des vaisseaux mais plutôt à l'organisation de l'arbre vasculaire dans l'embryon.

Outre la stabilisation de la protéine HIF-1 α par l'hypoxie et la dimérisation à la sous-unité β , d'autres mécanismes semblent être impliqués dans l'activité transcriptionnelle de HIF-1. En effet, la phosphorylation de HIF-1 α par les voies de

signalisation impliquant les MAPK (Minet, Arnould et al. 2000; Minet, Michel et al. 2000) et PI3K/AKT (Mazure, Chen et al. 1997), le recrutement de cofacteurs (Hsp90, SRC-1 et CBP/p300) (Mukhopadhyay, Tsiokas et al. 1995; Kallio, Okamoto et al. 1998; Minet, Ernest et al. 1999; Minet, Mottet et al. 1999) et la liaison d'autres facteurs de transcription au promoteur des gènes (Faller 1999) modulent l'activité transcriptionnelle du HIF-1.

1.1.4. Angiogenèse associée à des pathologies

1.1.4.1. Généralités

Tel que mentionné précédemment, la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins chez l'adulte fait appel à trois mécanismes : la vasculogenèse, l'angiogenèse et l'artériogenèse. Les mécanismes permettant la formation de vaisseaux sanguins en condition pathologique sont en partie similaires à ceux impliqués dans la formation des vaisseaux durant l'embryogenèse. Mais de nombreuses évidences permettent de penser que le développement d'un réseau vasculaire chez l'adulte puisse impliquer des mécanismes distincts. Chez l'embryon, les cellules endothéliales sont connectées de façon lâche et prolifèrent de façon active. Chez l'adulte, elles sont quiescentes et encapsulées dans une large musculature et une matrice extracellulaire. D'où la nécessité probable de signaux différents chez l'adulte. Par exemple, des molécules comme les cyclooxygénases, les protéinases, l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène et le NO ne semblent pas impliqués dans le développement vasculaire de l'embryon alors qu'elles affectent sensiblement l'angiogenèse chez l'adulte (Murohara, Asahara et al. 1998; Heymans, Lutun et al. 1999). Une différence notable entre l'angiogenèse physiologique

et celle associée à des pathologies réside dans le fait que cette dernière est souvent induite par l'inflammation. Monocytes, macrophages, plaquettes, cellules mastocytaires et autres leucocytes sont attirés sur les sites d'inflammation en partie par des facteurs angiogéniques. Ces cellules dérivées du sang produisent à leur tour des facteurs angiogéniques (VEGF, bFGF, TGF- β , PDGF, IGF-1, MCP-1, TNF- α) qui vont stimuler les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses (Arras, Ito et al. 1998; Couffinhal, Silver et al. 1999).

Des pathologies associées à l'angiogenèse surviennent lorsque les mécanismes d'action naturels de la formation des néovaisseaux sont hyper- ou hypo-stimulés, entraînant respectivement une croissance excessive ou insuffisante de vaisseaux sanguins. Par exemple, des conditions telles que la rétinopathie et la néphropathie diabétique, l'arthrite rhumatoïde, le cancer, l'athérosclérose, l'endométriose et le psoriasis résultent d'une prolifération excessive des vaisseaux sanguins. En contre partie, l'absence d'une angiogenèse normalement requise peut occasionner un ralentissement du processus de cicatrisation, des ulcères, l'infertilité, l'ischémie cérébrale, du myocarde et des membres inférieurs (figure 13). L'insuffisance des mécanismes de néovascularisation conduisant à une ischémie en présence d'une sténose athéromateuse sera discutée dans la section suivante.

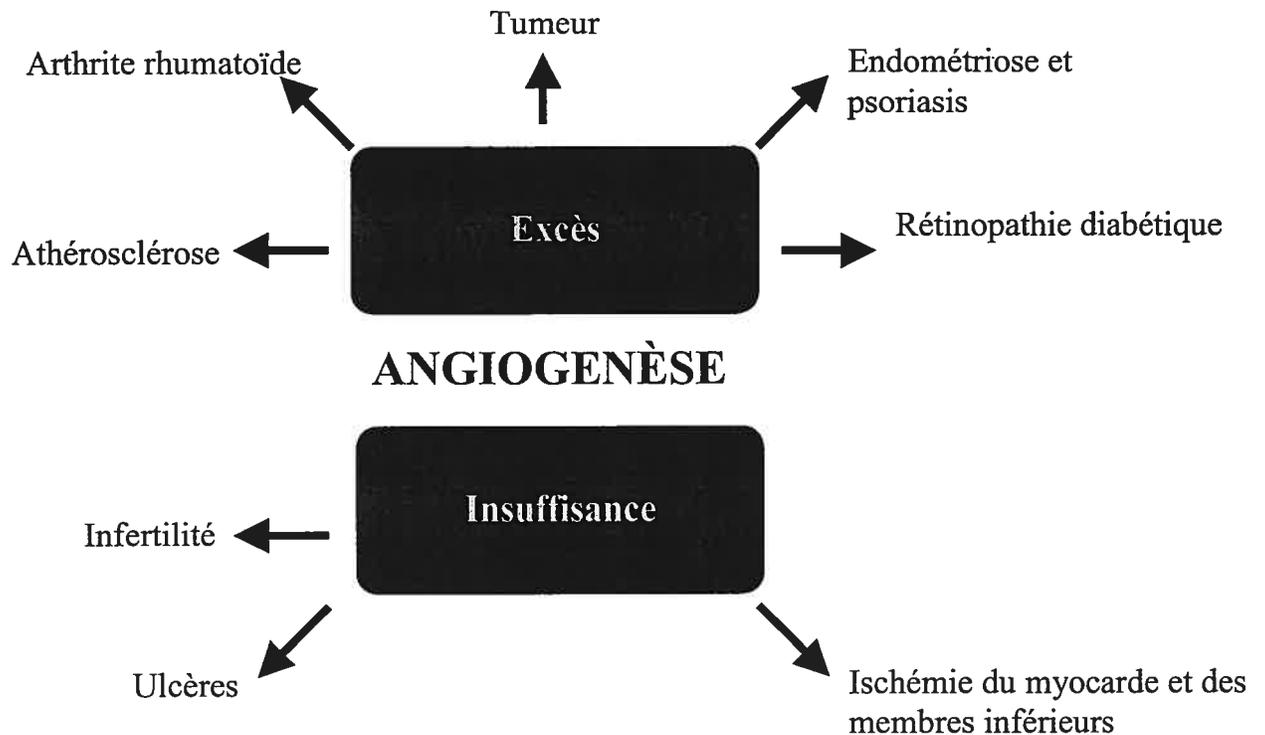


Figure 13. Implication de l'angiogénèse dans certaines pathologies

1.1.4.2. Néovascularisation et maladies cardiovasculaires athérosclérotiques

1.1.4.2.1. Athérosclérose

L'athérosclérose constitue une des principales causes de morbidité et de mortalité dans les pays industrialisés. Elle est responsable de près de 50% des décès en Amérique, en Europe et dans certaines parties de l'Asie (World Health Organization, 1985). Les manifestations cliniques de l'athérosclérose constituent un problème de santé publique majeur dans notre pays. L'athérosclérose est une maladie chronique qui débute dans l'enfance et dont le potentiel évolutif varie selon la présence de divers facteurs de risque (Ross 1995; Ross 1999). L'étude des mécanismes physiopathologiques de l'athérosclérose a débuté il y a plusieurs décennies. L'examen des événements précoces survenant au cours du processus

athéromateux démontre que les cellules inflammatoires impliquées dans la pathogenèse de l'athérosclérose sont des composantes classiques d'une réponse inflammatoire de type chronique précédant la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses (Rosenfeld 1996; Linton and Fazio 2003). L'infiltration et l'accumulation de lipides dans l'espace sous-endothélial représentent d'autres événements précoces de l'athérosclérose (Guyton and Klemp 1996; Subramanian, Ramaswamy et al. 2003). L'athérosclérose est à l'origine de plusieurs complications dont l'angine de poitrine, l'infarctus du myocarde, et ultimement l'insuffisance cardiaque et la mort subite.

Les principaux facteurs de risque modifiables de l'athérosclérose sont la dyslipidémie, l'obésité, le tabagisme, la sédentarité, l'hypertension, le diabète, l'hyperhomocystéinémie et les agents infectieux. Les antécédents familiaux, l'âge et le sexe mâle constituent des facteurs de risque non modifiables. Il est à noter que près de 80% de la population québécoise présente au moins un facteur de risque modifiable.

1.1.4.2.1.1. Pathogenèse de l'athérosclérose

L'athérosclérose est un processus pathologique chronique qui semble initié par l'accumulation de lipoprotéines dans l'espace sous-intimal du vaisseau et par l'adhésion des monocytes à l'endothélium. Suite à leur migration vers l'espace sous-endothélial, les monocytes se différencient en macrophages qui, par leur capacité à accumuler le cholestérol, se transforment en cellules spumeuses. Les facteurs de croissance, les cytokines et d'autres substances vaso-actives sécrétées par les macrophages, les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales et les

plaquettes, favorisent la progression de la lésion athéromateuse. Au stade ultérieur de la maladie, les cellules musculaires lisses modifient leur phénotype et migrent à travers la limitante élastique interne vers l'espace sous-endothélial où elles prolifèrent et sécrètent divers constituants de la matrice extracellulaire. Au stade terminal de la maladie, la plaque, surplombée d'une coiffe dense de tissu conjonctif, entraîne le rétrécissement de la lumière vasculaire (Kadar and Glasz 2001). Les stades de développement généralement reconnus de l'athérosclérose et le rôle des différents médiateurs sont résumés dans la figure 14 et le tableau 2.

De façon intéressante, l'angiogenèse participe à la pathogenèse de l'athérosclérose (Moulton 2001). En effet, il a récemment été démontré que la néovascularisation de la plaque se développe par un réseau de capillaires provenant de l'adventice, communément appelé vasa vasorum, progressant jusque dans la paroi intimale. La présence de ce réseau au niveau de la plaque a été bien démontré dans un modèle murin d'athérosclérose (apoE^{-/-}) (Moulton, Heller et al. 1999; Moulton 2001)). Le rôle des capillaires dans la lésion athérosclérotique n'est pas clairement défini mais il semble qu'ils participeraient à la croissance et à l'instabilité de la plaque (Barger and Beeuwkes 1990; Tenaglia, Peters et al. 1998) Le fait qu'un traitement chronique avec des inhibiteurs de l'angiogenèse réduit la néovascularisation intimale et diminue la taille de la lésion athérosclérotique supporte un rôle majeur de l'angiogenèse dans la pathogenèse de l'athérosclérose (Moulton, Heller et al. 1999).

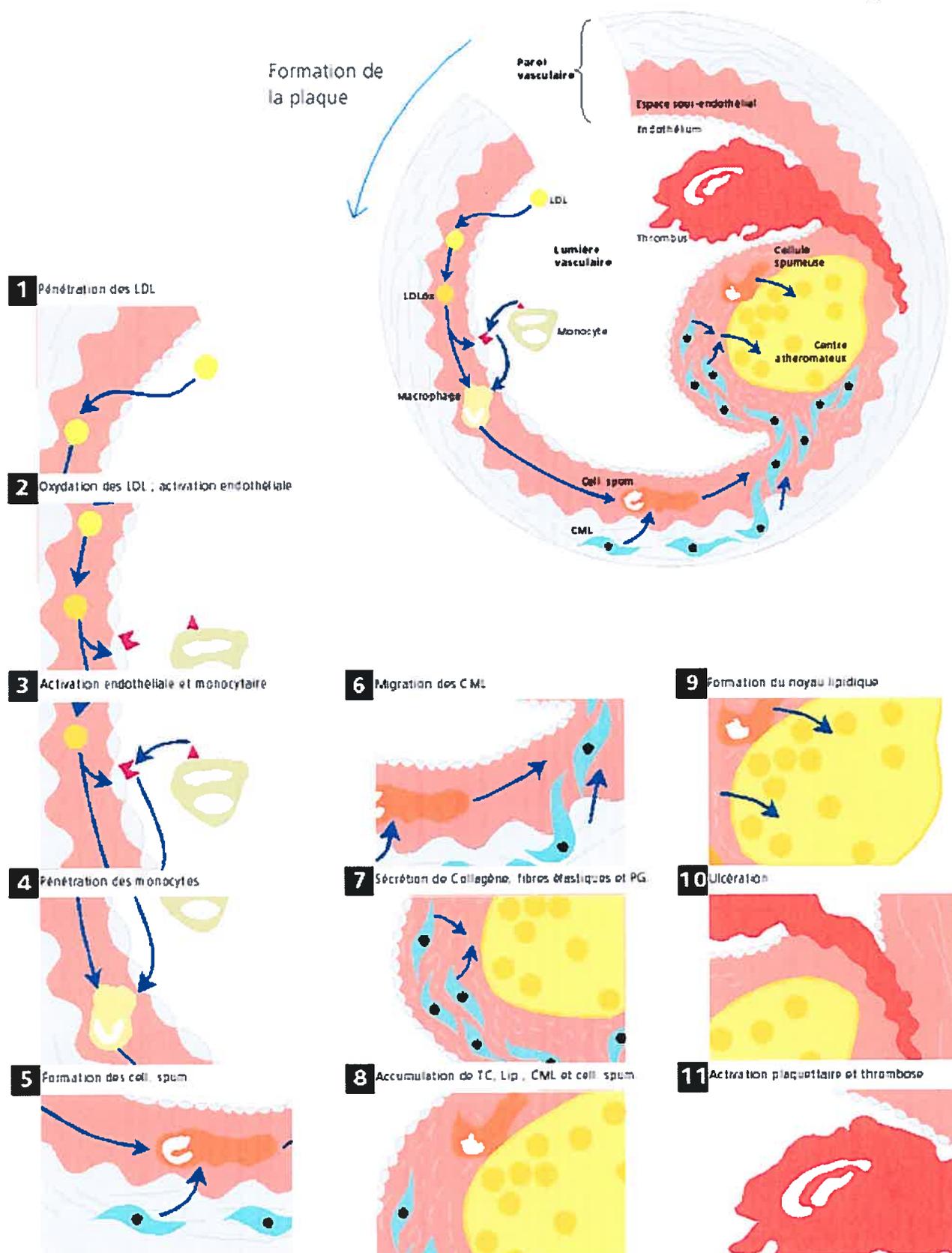


Figure 14. Étapes classiques de la formation de la plaque athérosclérotique. (Cohen, A 1997).

Tableau 2**Synthèse des stades de développement de l'athérosclérose classiquement reconnus****1. La strie lipidique****A. Infiltration des LDL et des monocytes dans l'espace sous-endothélial**

1. Infiltration des LDL dans l'espace sous-endothélial
2. Augmentation de l'expression de molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales: E-Sélectine, VCAM-1, Cs-1 Fibronectine
3. Augmentation de la production de facteurs chémoattractants: MCP-1, fractalkine
4. Augmentation de facteurs activant les monocytes: M-CSF, IL-8, GM-CSF

B. Formation de cellules spumeuses

1. Oxydation des lipoprotéines
2. Accumulation dans les macrophages des lipoprotéines oxydées par différents récepteurs: CD 36, SRA-1, SRC, LOX-1

2. La lésion fibro-lipidique

1. Augmentation de la prolifération et de la migration des cellules musculaires lisses: FGF, PDGF, TGF- β
2. Dégradation de la membrane basale: Métalloprotéinases
3. Activation lymphocytaire: TNF- α , l'IL-2 et le GM-CSF.
4. Agrégation et activation plaquettaire: intégrines, P-sélectine, fibrine, thromboxane A2, facteur tissulaire
5. Relâche de facteurs pro-inflammatoires: Leucotriènes, , thromboxane A2, TNF- α , Protéine réactive C

3. La plaque fibreuse

1. Augmentation de la synthèse de matrice extracellulaire par les cellules musculaires lisses: TGF- β
2. Nécrose et apoptose des cellules spumeuses entraînant la formation d'un centre lipidique
3. Augmentation des propriétés pro-thrombotiques des cellules endothéliales: augmentation du facteur tissulaire, augmentation de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène, diminution de l'activateur du plasminogène
4. Dégradation de la matrice de la paroi vasculaire: métalloprotéinases
5. Rupture de la plaque

1.1.4.2.1.2. Étiologie de l'athérosclérose

L'athérosclérose est une maladie très complexe dont la pathogenèse n'est pas clairement établie. Plusieurs hypothèses ont été avancées, chacune pouvant expliquer certaines observations reliées à la pathologie. Pour expliquer l'étiologie de cette pathologie. Parmi ces hypothèses on distingue l'hypothèse de la dysfonction endothéliale, l'hypothèse de l'infiltration des lipides, l'hypothèse du stress oxydant, l'hypothèse virale et l'hypothèse inflammatoire. L'intégration de ces diverses hypothèses semble requise pour pouvoir expliquer d'une meilleure façon tous les phénomènes rencontrés.

1.1.4.2.1.4.1. L'hypothèse de la dysfonction endothéliale

L'hypothèse de la réponse au dommage endothélial soutient le rôle majeur d'une altération endothéliale dans l'initiation du processus athéromateux. L'endothélium a un rôle primordial dans l'homéostasie vasculaire. Il contrôle le tonus vasculaire et exerce des propriétés anti-coagulantes, anti-inflammatoires, anti-hypertrophiques et anti-plaquettaires et favorise la fibrinolyse (Figure 15). Le maintien du tonus vasculaire est le résultat d'une balance adéquate entre la relâche d'agents vasodilatateurs ou vasoconstricteurs. La substance vasodilatatrice par excellence est sans aucun doute le monoxyde d'azote (NO). D'autres vasodilatateurs dérivés de l'endothélium semblent aussi importants dont la prostacycline et la bradykinine. La prostacycline agit en synergie avec le NO afin d'inhiber l'agrégation plaquettaire et la bradykinine stimule la relâche de NO, de prostacycline et du facteur de vasorelaxation endothélium-dépendant (EDFR). Ce dernier est aussi un

vasodilatateur qui contribue à l'inhibition de l'agrégation plaquettaire (Drexler 1998). L'endothélium produit aussi des substances vasoconstrictrices dont l'endothéline et l'angiotensine II. L'angiotensine, en plus d'être un vasoconstricteur, agit comme pro-oxydant et stimule la production d'endothéline (Sowers 2002). Ensemble, l'angiotensine et l'endothéline favorisent la prolifération des cellules musculaires lisses, contribuant au développement de la plaque athéromateuse (Drexler 1998). Les macrophages activés et les cellules musculaires lisses produisent l'endothéline en abondance (Kinlay, Behrendt et al. 2001).

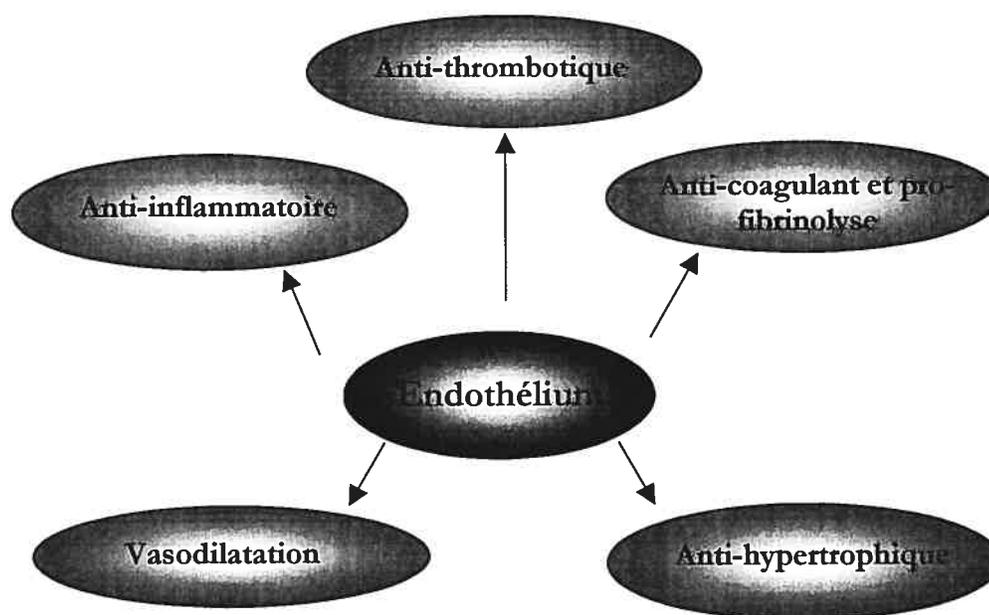


Figure 15. Effets anti-athérogéniques de l'endothélium. Modifié de Landmesser, U et coll. 2004.

La dysfonction endothéliale se traduit par divers phénomènes pathologiques tels l'expression accrue de molécules d'adhésion à la surface de l'endothélium, l'adhésion leucocytaire, l'augmentation de la perméabilité vasculaire, la perte de capacité vasodilatatrice (NO, prostacycline, bradykinine, EDRF), la sécrétion accrue

de facteurs vasoconstrictifs (endothéline, angiotensine II), la diminution de régénération des cellules endothéliales, la perte des propriétés endothéliales antithrombotiques et la production anormale de cytokines et de facteurs de croissance (Davignon and Ganz 2004).

Une altération de la synthèse, de la relâche et de l'activité du NO se manifestant par l'absence de vasodilatation est un indice précoce associé à la dysfonction endothéliale (Landmesser, Hornig et al. 2004) et contribue au développement de l'athérosclérose (Badimon, Fuster et al. 1993). L'altération de la biodisponibilité du NO dans la dysfonction endothéliale serait étroitement reliée à une augmentation de la production d'espèces radicalaires oxygénées (ROS). En effet, les ROS produits par l'activation des cellules endothéliales, en réponse à différents facteurs de risque, inhibent la disponibilité du NO via trois voies distinctes. Premièrement, les superoxydes réagissent rapidement avec le NO et forment des peroxynitrites, inactivant le NO (Sorescu and Griendling 2002). Ensuite, il a récemment été démontré qu'une augmentation des ROS entraîne l'oxydation et la dégradation du tetrahydrobioptérine (BH₄), un cofacteur majeur de la eNOS, laissant ainsi l'enzyme découplée et diminuant la production de NO mais augmentant la production de superoxydes (Tiefenbacher, Blecke et al. 2000; Laursen, Boesgaard et al. 2001; d'Uscio, Milstien et al. 2003; Landmesser, Hornig et al. 2004). Finalement de récentes études suggèrent que les ROS inhibent l'activité enzymatique de la diméthylarginine diméthylaminohydrolase (DDAH) favorisant la synthèse de l'inhibiteur endogène de la eNOS, l'asymétrique diméthylarginine (ADMA) et réduisant ainsi l'activité de la eNOS (Figure 16)(Cooke 2000).

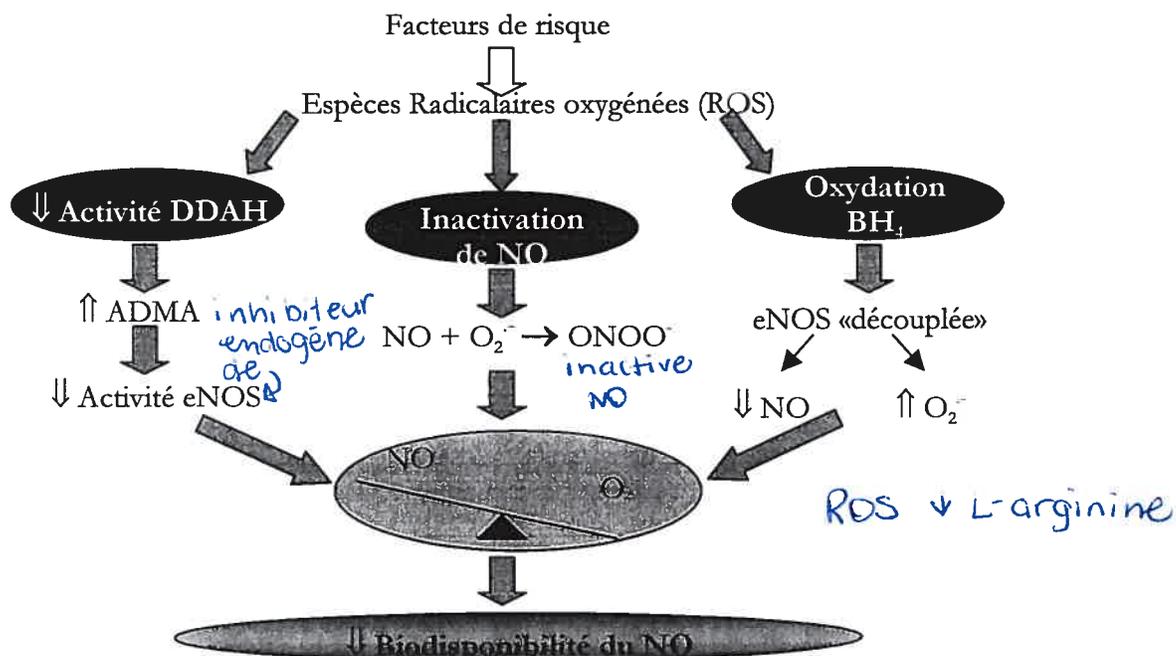


Figure 16. Représentation schématique de l'altération de la biodisponibilité du monoxyde d'azote par la production d'espèces radicalaires oxygénées. NO, monoxyde d'azote; ONOO^- , peroxy-nitrites; O_2^- , anion superoxyde; DDAH, diméthylarginine diméthylaminohydrolyase; ADMA, l'asymétrique diméthylarginine; BH_4 , tétrahydrobioptérine; eNOS, synthase du monoxyde d'azote endothélial.

Les conséquences de l'altération endothéliale sont l'adhésion et la pénétration des monocytes aux sites de lésions ainsi que l'infiltration et l'accumulation des LDL dans l'intima (Steinberg, Parthasarathy et al. 1989).

1.1.4.2.1.4.2. L'hypothèse de l'infiltration des lipides

L'hypothèse de l'infiltration des lipides suggère que des concentrations élevées de LDL plasmatiques entraînent l'accumulation de ces lipoprotéines dans la paroi artérielle et leur captation par les macrophages et les cellules musculaires lisses (Brown, Albers et al. 1990). L'accumulation de cholestérol dans ces cellules aboutit

à la formation de la strie lipidique. Cette hypothèse a pris naissance au début du siècle et a été récemment renforcée par l'étude clinique "The Framingham Study" démontrant une corrélation entre les niveaux de cholestérol sérique et les maladies cardiovasculaires (Castelli, Garrison et al. 1986).

Divers travaux appuient cette hypothèse. Premièrement, une étude exécutée chez 2073 patients (The LIPID Trial) a démontré qu'un traitement hypolipémiant en prévention primaire diminuait les événements coronariens (Colquhoun, Keech et al. 2004). Ensuite, une étude importante (The landmark Scandinavian Simvastatin Survival Study) publiée en 1994, a démontré chez 4444 patients, qu'une diminution des niveaux sanguins de LDL-cholestérol est reliée à une réduction des événements coronariens et du taux de mortalité (1994). Une autre étude récemment parue (The Prevention of Coronary Sclerosis, 2004) montre chez 329 patients atteints de maladies cardiovasculaires qu'un traitement hypolipémiant prévient le développement de l'athérosclérose (Nakagawa, Kobayashi et al. 2004). De plus, une relation entre des niveaux élevés de cholestérol plasmatique et le développement des stries lipidiques dans la lésion athéromateuse a été documentée par Napoli et coll. (Napoli, Glass et al. 1999).

1.1.4.2.1.4.3. L'hypothèse du stress oxydant

Cette hypothèse fait valoir que les mécanismes impliqués dans l'athérogenèse sont la conséquence d'une augmentation des niveaux de stress oxydant causée par une production accrue de radicaux libres et/ou par une diminution des niveaux d'antioxydants. Cette hypothèse avance en outre que le stress

oxydant induit l'activation de gènes régulés par le système redox (NF- κ B, AP-1, PPARs, MAPK...) (Kunsch and Medford 1999).

Le rôle des radicaux libres comme agents initiateurs de la lésion athéromateuse a été largement documenté. Ainsi, les radicaux libres ont été identifiés comme facteurs de risque de l'athérosclérose pouvant entraîner, entre autre, la dysfonction endothéliale, l'activation des cellules endothéliales et macrophagiques et l'oxydation des particules de LDL (Yokoyama 2004). L'effet inhibiteur des antioxydants sur le processus athérosclérotique a été imputé à une réduction de l'infiltration des monocytes dans l'intima (Marra, DeFranco et al. 1999; Marra, Romanelli et al. 1999; Rangan, Wang et al. 1999; Rangan, Wang et al. 1999; Sampson, Davies et al. 2002; Kim, Choi et al. 2004), à une inhibition d'oxydation des LDL (Aviram 2000; Norata, Pirillo et al. 2003) et à une réduction d'expression des molécules d'adhésion (Ferns, Forster et al. 1993; Ferns, Konneh et al. 1993; Marui, Offermann et al. 1993; Horvathova, Jahnova et al. 2001; Sampson, Davies et al. 2002). Les antioxydants pourraient aussi exercer leur rôle cardio-protecteur en inhibant la prolifération des cellules musculaires lisses, l'induction de l'agrégation plaquettaire, la production des cellules spumeuses et l'apoptose cellulaire (Gimdt, Lengler et al. 2000; Antoniadis, Tousoulis et al. 2003; Antoniadis, Tousoulis et al. 2003; Yokoyama 2004).

Les sources d'espèces radicalaires oxygénées (ROS) sont multiples au niveau de la cellule endothéliale. La figure 17 schématise les sources de formation de ROS. La naissance des ROS peut survenir par réaction enzymatique ou par auto-

oxydation au cours de leur métabolisme normal et parfois en réponse à un stimuli (Shihabi, Li et al. 2002).

Les recommandations quant à la supplémentation en vitamines antioxydantes à titre prophylactique des maladies cardio-vasculaires demeurent un sujet de controverse. En effet, bien que certaines études épidémiologiques aient observé une relation inverse entre les niveaux ou l'apport en vitamines antioxydantes et les événements cardiovasculaires (Losonczy 1996; Kinlay, S 2004; Hodis HN, 1995; Salonen RM, 2003), un apport accru en antioxydant n'a pu démontrer de manière constante son efficacité à diminuer l'incidence d'événements cardio-vasculaires (Yusuf, 2000; Antoniadis C, 2003; Lancet 2001;257:89-95; Lancet 1999;354:447-55; Lancet 2002;360:23-33).

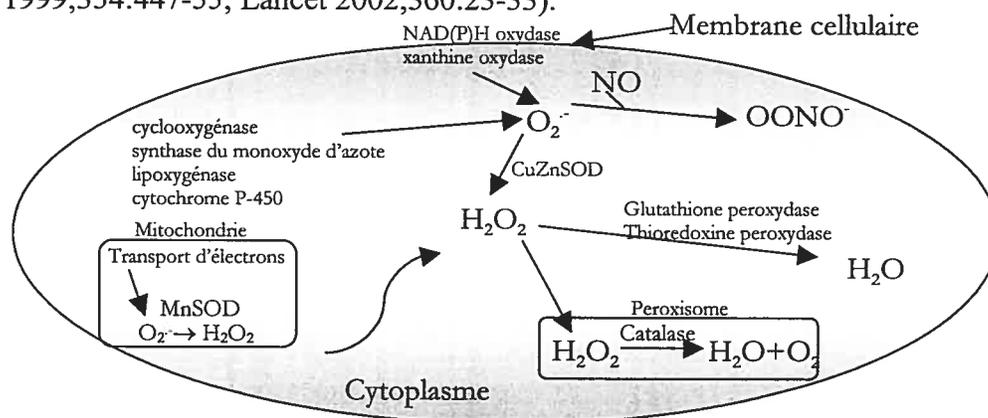


Figure 17. Sources de formation des ROS. NO, monoxyde d'azote; $ONOO^{\cdot-}$, peroxy-nitrites; $O_2^{\cdot-}$, anion superoxyde; H_2O_2 , peroxyde d'hydrogène; SOD, superoxyde dismutase.

1.1.4.2.1.4.4. L'hypothèse virale

Cette hypothèse a pris corps en 1978 avec les travaux de Fabricant et coll. Ces chercheurs ont proposé qu'une infection par le virus de l'herpès pourrait participer au développement de l'athérosclérose. Depuis lors, il a été démontré que le virus de l'herpès simplex 1 et le cytomegalovirus pouvaient, en infectant les cellules

vasculaires, altérer leurs fonctions et induire le développement de mécanismes proathérogéniques (Nicholson and Hajjar 1998; Sorlie, Nieto et al. 2000; Bason, Corrocher et al. 2003; Chen, Xiong et al. 2003).

Des études récentes suggèrent que d'autres agents infectieux incluant *Chlamydia pneumoniae* et *Helicobacter pylori* puissent aussi être impliqués dans la pathogenèse de l'athérosclérose (Franceschi, Genta et al. 2002; Adiloglu, Nazli et al. 2003; Belland, Ouellette et al. 2004; Campbell and Kuo 2004). En ce qui concerne le *Chlamydia pneumoniae*, plusieurs études histologiques rapportent sa présence dans la lésion athéromateuse (Chiu, Viira et al. 1997). Bien qu'il semble que l'infection par cette bactérie puisse accélérer le développement des lésions dans certains modèles expérimentaux, diverses études n'ont pu apporter de preuves convaincantes que *Chlamydia pneumoniae* soit capable à lui seul d'induire des lésions athérosclérotiques. Des études ont tenté de déterminer l'efficacité d'antibiotiques ciblant le virus *Chlamydia pneumoniae* à réduire le risque d'événements cardio-vasculaires chez des patients souffrant d'ischémie cardiaque. L'effet des antibiotiques semble être limité et temporaire (Kaykov, Abbou et al. 1999; Gurfinkel 2000; Gurfinkel, Bozovich et al. 2000; Sander, Winbeck et al. 2002; Sander, Winbeck et al. 2004).

Depuis 1994, plusieurs études séro-épidémiologiques ont cherché une association entre *Helicobacter pylori* et les maladies artérielles. Leur analyse n'a pu cependant démontrer l'existence d'une association forte entre ce pathogène et les maladies cardio-vasculaires (Pellicano, Leone et al. 2000; Haider, Wilson et al. 2002).

1.1.4.2.1.4.5. L'hypothèse inflammatoire

L'hypothèse inflammatoire de l'athérosclérose stipule que le processus athéromateux résulte d'une réponse inflammatoire secondaire représentant un mécanisme de protection de la paroi artérielle. Lorsque l'agression se perpétue et devient chronique, cette réponse inflammatoire devient excessive et fibro-proliférative (Ross 1999). Les lésions athérosclérotiques semblent présenter les attributs classiques de l'inflammation, c'est-à-dire, l'infiltration monocytaire, l'expression de cytokines et d'agents pro-inflammatoires, la prolifération des cellules musculaires lisses et des vaisseaux sanguins et la sclérose conjonctive (Linton and Fazio 2003; Libby and Ridker 2004; Willerson and Ridker 2004). Certains chercheurs ont tenté d'envisager qu'une thérapie anti-inflammatoire puisse pallier à la maladie (Paramo 2005; Burleigh 2005; van Oostrom 2004).

1.1.4.2.2. Néovascularisation et facteurs de risque de l'athérosclérose

L'athérosclérose est le principal responsable de l'ischémie musculaire, qu'il s'agisse du muscle cardiaque ou du muscle squelettique. L'expression clinique de cette ischémie est au niveau cardiaque l'angine de poitrine et au niveau des membres inférieurs, la claudication intermittente. Le muscle squelettique a un potentiel de réparation important et les conséquences de l'ischémie sont longtemps bien compensées. Il n'en est pas de même au niveau cardiaque où les conséquences de l'ischémie sont peu ou pas réversibles, souvent invalidantes et minent le pronostic vital du patient.

L'athérosclérose coronarienne est la principale cause d'angine de poitrine et la première cause de décès et d'invalidité chez les hommes et les femmes (Dobson, Kuulasmaa et al. 1998). Au-delà de 75 ans, un sujet sur trois est atteint d'angine de poitrine (Tunstall-Pedoe, Kuulasmaa et al. 1999).

L'occlusion d'une artère par l'athérosclérose amène une perfusion insuffisante du tissu créant une condition d'ischémie. La formation de néovaisseaux est la conséquence de cette hypoperfusion. Ce phénomène permet de réduire l'ischémie dans le territoire affecté et de maintenir l'intégrité tissulaire. La participation au débit myocardique de la néovascularisation peut atteindre jusqu'à 60% d'une perfusion normale lorsque celle-ci est bien développée. L'existence de ce type de circulation peut même entraîner une revascularisation complète du territoire ischémique. Bien que l'existence d'une telle circulation améliore les symptômes cliniques, l'effet est rarement suffisant pour une compensation complète de l'occlusion d'une artère. Les effets cliniques bénéfiques observés suite au développement de néovaisseaux ont donc motivé plusieurs groupes de chercheurs à trouver un traitement permettant de multiplier le développement de vaisseaux dans le myocarde et les membres inférieurs ischémiques, d'où le terme «angiogenèse thérapeutique» (Freedman and Isner 2001; Freedman and Isner 2002). À cet égard, les propriétés angiogéniques et physiologiques du VEGF et du FGF en font des molécules de choix. À ce jour, le VEGF a été utilisé sous 3 formes soit la protéine recombinante, le plasmide ou l'adénovirus codant pour le VEGF alors que le FGF a été utilisé sous forme de protéine recombinante et d'adénovirus. Depuis 1992, beaucoup d'articles originaux a établi la possibilité d'utiliser des facteurs de croissance angiogéniques pour accélérer le développement vasculaire, dans des modèles animaux

d'ischémie du myocarde ou des membres inférieurs. Les résultats prometteurs enregistrés lors de ces expériences ont débouché sur des études cliniques de phase I et II (Losordo and Dimmeler 2004). Bien que les résultats préliminaires de ces études semblent encourageants, de larges études randomisées seront nécessaires afin d'estimer le potentiel de ces thérapies chez des patients atteints d'ischémie vasculaire. De plus, il sera impératif de déterminer les facteurs qui influencent la réponse angiogénique chez les patients afin d'évaluer si un candidat pourra répondre de façon adéquate à cette thérapie. En effet, les patients atteints d'une cardiopathie ischémique ou d'une ischémie des membres inférieurs présentent des variations considérables quant à leur possibilité de développer une néovascularisation. Les facteurs responsables de ces variations sont mal compris mais il a récemment été proposé que différents phénotypes cliniques et facteurs de risque, associés à la maladie athérosclérotique, puissent amenuiser la néovascularisation en réponse à l'ischémie. En effet, il a été démontré que l'hypercholestérolémie, la présence de diabète, l'hypertension artérielle et le vieillissement avaient un impact négatif sur le développement vasculaire principalement au niveau du myocarde et des muscles squelettiques des membres inférieures. Il semble donc intéressant de noter que les mêmes facteurs de risque de l'athérosclérose amenuisent aussi la néovascularisation. Le bon fonctionnement des cellules endothéliales et des cellules endothéliales progénitrices semble essentiel d'une part au maintien de l'intégrité vasculaire suite à une injure et d'autre part à la formation de nouveaux capillaires en réponse à l'ischémie. Ainsi, il semble logique que les facteurs de risque entraînant une dysfonction des cellules endothéliales et des cellules endothéliales progénitrices favorisent l'athérosclérose et inhibent la néovascularisation.

1.1.4.2.2.1. Hypercholestérolémie

L'effet de l'hypercholestérolémie a premièrement été investigué par l'équipe d'Isner dans un modèle d'ischémie du membre inférieur chez le lapin Watanabe mâle homozygote (Van Belle, Rivard et al. 1997). Ce lapin présente une mutation du gène des récepteurs du LDL entraînant une augmentation de la cholestérolémie totale et une athérosclérose progressive. L'analyse de la réponse angiogénique 10 jours suivant l'induction de l'ischémie était significativement réduite chez les lapins Watanabe par rapport aux lapins contrôles. Le développement de la circulation collatérale, la densité capillaire et le flux artériel du membre ischémique étaient deux fois plus faibles chez les lapins Watanabe. Cela s'est traduit, sur le plan tissulaire par une augmentation de la nécrose tissulaire. Plus récemment, ces résultats ont été confirmés dans un modèle de rat dont l'hypercholestérolémie était induite par la diète (Duan, Murohara et al. 2000; Duan, Murohara et al. 2000).

Bien que les mécanismes impliqués dans ces observations restent à déterminer de manière précise, une revue de la littérature permet cependant de proposer certains mécanismes expliquant la diminution de la réponse angiogénique par l'hypercholestérolémie.

Premièrement, un défaut primaire semble affecter le fonctionnement de la cellule endothéliale. En effet, une diminution du nombre de cellules endothéliales et une dysfonction de celles-ci sont habituellement retrouvées en cas d'hypercholestérolémie et pourraient inhiber la néovascularisation. Ainsi, il a été documenté qu'il existe des zones non endothélialisées au niveau de l'arbre vasculaire des lapins Watanabe pouvant

entraîner une réduction de cellules endothéliales disponibles à la néovascularisation (Kolodgie, Virmani et al. 1990). Cette diminution de cellules endothéliales pourrait résulter d'une augmentation de l'apoptose induite par les LDL oxydées (Dimmeler, Haendeler et al. 1997; Harada-Shiba, Kinoshita et al. 1998). En effet, une augmentation du stress oxydant observé chez les patients hypercholestérolémiques entraîne l'oxydation des lipoprotéines. Les LDL oxydées présentes dans la paroi vasculaire altèrent ainsi le fonctionnement de la cellule endothéliale de plusieurs façons. Outre l'induction de l'apoptose des cellules endothéliales, les LDL oxydées réduisent la capacité de migration et de prolifération des cellules endothéliales en réponse à certains mitogènes (Murugesan and Fox 1996). Cet effet serait médié par l'inhibition de la production de NO (Chavakis, Dernbach et al. 2001) via une augmentation de la production de superoxydes par la cellule endothéliale (Cominacini, Rigoni et al. 2001).

De récentes études utilisant des inhibiteurs de HMG-CoA réductase supportent ces hypothèses (Kureishi, Luo et al. 2000; Weis, Heeschen et al. 2002). HMG-CoA réductase est une enzyme catalysant l'étape limitante de la biosynthèse du cholestérol. Ces auteurs ont démontré in vitro et in vivo que suite au traitement avec des inhibiteurs de cette enzyme, les statines, il y avait récupération de la formation de néovaisseaux en réponse à l'ischémie. Cette récupération s'accompagnait d'un recouvrement de la fonction endothéliale mesurée par la libération de NO.

Un déficit touchant la disponibilité ou la bioactivité des facteurs de croissance ou d'autres agents angiogéniques pourrait être un autre mécanisme impliqué dans la diminution de la réponse angiogénique par l'hypercholestérolémie. En effet, les travaux de Chen ont montré que la diminution de la croissance des structures endothéliales à

partir d'explants d'artères coronaires athéroscléreuses humaines et d'artères de lapins hypercholestérolémiques était associée à une diminution de la concentration de bFGF au sein de l'explant (Chen, Cartwright et al. 1997). De même, Couffinhal et coll., ont récemment mis en évidence une réduction de la quantité de VEGF au niveau des tissus ischémiques d'une souris déficiente pour l'Apo-E (Couffinhal, Silver et al. 1999). Dans ce modèle, où il existe une hypercholestérolémie et une athérosclérose, la réponse angiogénique à l'ischémie était aussi diminuée. La persistance des effets angiogéniques du FGF et du VEGF dans ces travaux confirme la notion de déficit de facteurs angiogéniques dans ces modèles. La diminution observée des facteurs de croissance pourrait s'expliquer par un déficit de la production de ceux-ci ou par une augmentation de leur dégradation par les LDL oxydées (Chen, Cartwright et al. 1997). De plus, Kuzuya et coll., ont récemment démontré que le VEGF protégeait les cellules endothéliales de la toxicité induite par les LDL oxydées. Ainsi, en présence d'une hypercholestérolémie, une thérapie utilisant le VEGF pourrait d'une part améliorer la fonction endothéliale et d'autre part, induire l'angiogenèse. Le fait qu'une restauration du flux sanguin soit observée suite à l'injection intramusculaire d'une protéine recombinante VEGF chez le lapin Watanabe, supporte l'hypothèse qu'une diminution de la disponibilité ou de la bioactivité du VEGF soit impliquée dans la détérioration de l'angiogenèse par la dyslipidémie (Van Belle, Rivard et al. 1997).

Finalement, une diminution du nombre de cellules endothéliales progénitrices (EPCs) et une altération de leur fonction pourrait être à l'origine de l'inhibition de la néovascularisation en réponse à l'ischémie par l'hypercholestérolémie. En effet, une récente étude mentionne que des niveaux élevés de LDL sont associés à une diminution

de EPCs et de leur capacité à migrer (Vasa, Fichtlscherer et al. 2001). La voie PI3k/Akt/eNOS semble particulièrement affectée. Ainsi lorsque l'on incube des EPCs en présence de niveaux croissants de LDL, la phosphorylation de Akt/eNOS et la migration des EPCs diminuent (Imanishi, Hano et al. 2003). De façon intéressante, un traitement avec des inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase améliore la mobilisation, la différenciation et la prolifération des EPCs ainsi que la néovascularisation au niveau du myocarde (Dimmeler, Aicher et al. 2001; Llevadot, Murasawa et al. 2001; Assmus, Urbich et al. 2003; Landmesser, Engberding et al. 2004).

1.1.4.2.2.2.Diabète

Les diabétiques de type 2 ont une espérance de vie en moyenne réduite d'environ 10 ans, essentiellement causé par une surmortalité d'origine cardiaque. Cette complication du diabète résulte du développement accéléré de l'athérosclérose. Un autre facteur important établi récemment est la moindre propension des patients diabétiques à développer une néovascularisation en présence de lésions sténosantes chroniques (Abaci, Oguzhan et al. 1999). Ceci pourrait contribuer à expliquer le moins bon pronostic associé aux syndromes aigus lorsqu'ils surviennent chez les patients diabétiques. Depuis cette découverte, plusieurs groupes de chercheurs tentent d'expliquer les causes et les mécanismes sous-jacents à cette altération de la réponse angiogénique à l'ischémie. Il a été suggéré qu'une dégradation insuffisante de la matrice extracellulaire, une altération de l'expression de facteurs de croissance et de cytokines et un problème au niveau de la transmission du signal puissent être à l'origine d'une inhibition de l'angiogénèse.

La dégradation de la matrice extracellulaire et de la membrane basale est une étape cruciale de l'angiogenèse favorisant la migration des cellules endothéliales. Chez le diabétique, des études suggèrent que cette étape soit altérée. Les protéinases de type activateur du plasminogène (uPA) et les métalloprotéinases (MMP) participent activement à cette étape et permettent la libération de facteurs emprisonnés dans cette matrice (bFGF et VEGF). Une diminution de l'expression de uPA et des MMP associée à une surexpression de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 (PAI-1) crée un état antifibrinolytique chez le diabétique diminuant la dégradation de la matrice extracellulaire.

L'expression du VEGF et de ses récepteurs (Flt-1 et KDR) semble aussi affectée chez le patient diabétique. Plusieurs auteurs, ont documenté une diminution de l'expression du VEGF et de ses récepteurs associée à l'insulino-résistance ou au diabète (Rivard, Silver et al. 1999; Chou, Suzuma et al. 2002). Les mécanismes responsables de cette diminution demeurent obscurs. Une étude réalisée à l'aide de plusieurs types cellulaires indique que l'insuline augmente l'expression de l'ARNm du VEGF via la voie de signalisation PI3-kinase/Akt. Les travaux de Jiang et coll. proposent que l'altération de cette voie soit à l'origine de l'inhibition de l'expression du VEGF associée à l'état de résistance à l'insuline ou d'intolérance au glucose (Jiang, Hiscox et al. 1999). Le rôle central du VEGF a été confirmé par une étude montrant que l'administration intramusculaire d'un adénovirus codant pour le VEGF chez la souris diabétique non obèse (NOD) restaure la néovascularisation suite à l'ischémie du membre inférieur (Rivard, Fabre et al. 1999). Cependant, les niveaux plasmatiques de VEGF chez les patients diabétiques souffrant d'ischémie du membre inférieur sont néanmoins

significativement supérieurs aux niveaux plasmatiques retrouvés chez des patients diabétiques n'ayant pas développé d'ischémie (Hochberg, Hoffman et al. 2001).

Un autre facteur angiogénique semble affecté par l'hyperglycémie. En effet, Taniyama et coll., ont récemment démontré que l'expression de l'*hepatocyte growth factor* (HGF) était réduite dans des cellules endothéliales et musculaires lisses exposées à de fortes concentrations de glucose. L'expression de la métalloprotéinase MMP-1 et du facteur de transcription ets-1 était aussi affectée par cette hyperglycémie, vraisemblablement suite à une diminution de la stimulation par le HGF (Taniyama, Morishita et al. 2001). Ces auteurs ont d'ailleurs confirmé leur hypothèse en constatant l'efficacité sur l'angiogenèse d'un vecteur codant pour le HGF dans un modèle de rat diabétique.

La glycation des protéines en présence d'une hyperglycémie prolongée est un phénomène rencontré chez les patients diabétiques. L'impact du processus de glycation sur l'activité de facteurs de croissance a fait l'objet d'une étude récente. Facchiano et coll., ont démontré, chez un modèle de souris diabétique, la présence d'une forme glycosylée du bFGF. La glycation du bFGF entraînait une moindre activité angiogénique de ce dernier lorsque comparé au bFGF non glycosilé (Facchiano, Lentini et al. 2002).

L'activation des monocytes par certains facteurs tels le monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) (Ito, Arras et al. 1997) et le LPS (Arras, Ito et al. 1998) participe à l'artériogenèse et à la formation de collatérales. Le monocyte activé migre au site d'ischémie ou d'inflammation et sécrète des facteurs de croissance, des protéinases, des cytokines et des molécules d'adhésion. Waltenberger et coll., ont récemment suggéré un mécanisme d'action impliquant la fonction monocyttaire pouvant expliquer la diminution

de la formation de néovaisseaux observée chez les patients diabétiques. Ils ont montré que la migration, induite par le VEGF des monocytes isolés de patients diabétiques est faible (Waltenberger, Lange et al. 2000). La voie de signalisation dépendante de la phosphorylation du récepteur-1 du VEGF (VEGFR-1/Flt) serait vraisemblablement altérée chez le patient diabétique expliquant la diminution de la migration des monocytes en réponse au VEGF.

La fonction endothéliale chez le patient diabétique est aussi considérablement détériorée. En effet, certaines études indiquent que la vasodilatation dépendante de l'endothélium des artères coronaires et périphériques est diminuée chez les patients insulino-dépendants (Johnstone, Creager et al. 1993; Nitenberg, Paycha et al. 1998). In vitro, une concentration élevée de glucose prolonge le cycle cellulaire, diminue la prolifération et altère la morphologie de la cellule endothéliale (Lorenzi, Nordberg et al. 1987; Curcio and Ceriello 1992; Salameh, Zinn et al. 1997). De plus, différentes caractéristiques associées à ce phénotype clinique induisent une dysfonction endothéliale importante. Ainsi, le stress oxydant et la glycation de protéine induits par l'hyperglycémie et la présence d'une dyslipidémie, fréquemment observées dans cette circonstance pathologique, forment une synergie et entravent le fonctionnement normal de la cellule endothéliale. L'observation qu'un traitement d'antioxydants restaure l'expression du VEGF et l'angiogenèse chez des souris diabétiques supporte un rôle prééminent du stress oxydant et de la fonction endothéliale dans l'inhibition de la réponse angiogénique à l'ischémie (Altavilla, Saitta et al. 2001).

Finalement, la fonction des EPCs est aussi affectée chez les patients diabétiques. Il a récemment été documenté que la prolifération des EPCs isolées de patients

diabétiques, leur adhésion à une couche de cellules endothéliales et leur incorporation dans une structure vasculaire étaient diminuées (Tepper, Galiano et al. 2002; Loomans, de Koning et al. 2004). L'altération de la fonction des EPCs chez ces patients pourrait expliquer la diminution de la néovascularisation en réponse à l'ischémie.

1.1.4.2.2.3.Hypertension artérielle

L'hypertension chronique est une maladie grave et répandue qui traduit un accroissement de la résistance vasculaire périphérique. L'hypertension prolongée est une des principales causes d'insuffisance cardiaque, des maladies vasculaires, d'insuffisance rénale et d'accident vasculaire cérébral. Ce phénotype clinique est aussi associé au développement accéléré de l'athérosclérose, aux cardiomyopathies ischémiques et à une diminution de l'angiogenèse en réponse à l'ischémie.

Les conséquences de l'hypertension artérielle sur le développement des vaisseaux collatéraux ont récemment été mises en évidence chez deux modèles de rats hypertendus (Emanuelli, Minasi et al. 2001; Sieber, Sumanovski et al. 2001). Une inhibition de la réponse angiogénique à l'ischémie ou induite par le bFGF fut observée.

La présence d'un dysfonctionnement endothélial, évalué par la vasodilatation dépendante de l'endothélium au niveau de l'avant bras à la suite d'une perfusion d'acétylcholine est aussi observée chez les hypertendus (Panza, Casino et al. 1993). La dysfonction endothéliale chez le sujet hypertendu se caractérise également par une diminution de la production de NO, une raréfaction microvasculaire, un vieillissement accéléré de la cellule et une augmentation du phénomène d'apoptose (Chen, Prewitt et al. 1981; Forte, Copland et al. 1997; Antonios, Singer et al. 1999; Asahara, Masuda et al.

1999; Boulanger 1999; Hernandez, Torres et al. 1999; Kiefer, McKenney et al. 2002). Cette dysfonction endothéliale amenuise vraisemblablement la formation de néovaisseaux dépendante de l'endothélium (Emanuelli, Minasi et al. 2001; Sieber, Sumanovski et al. 2001).

L'angiotensine II, généralement élevée chez les sujets hypertendus, pourrait aussi participer à l'altération de l'angiogenèse. Tout d'abord, il a été documenté que l'angiotensine II joue un rôle dans la lésion vasculaire en induisant l'apoptose. Une diminution des lésions pouvait être observée suite au traitement avec un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (Hamet and deBlois 2001). Ensuite, l'inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine stimule l'angiogenèse (Fabre, Rivard et al. 1999; Silvestre, Bergaya et al. 2001). Cette stimulation serait médiée par la voie de signalisation dépendante du récepteur de la bradikinine B₂ suite à l'accumulation de la bradikinine. Cet effet proangiogénique découle d'une augmentation de l'expression de eNOS mais ne semble pas impliquer le VEGF.

Finalement, la fonction des EPCs chez les patients hypertendus semble aussi affectée. En effet, une récente étude mentionne que les EPCs isolées de patients souffrant d'hypertension ont une moindre capacité à migrer en réponse à une stimulation au VEGF (Vasa, Fichtlscherer et al. 2001; Loomans, Dao et al. 2004).

1.1.4.2.2.4. Vieillessement

Le vieillissement est un facteur de risque irréversible associé au développement accéléré de l'athérosclérose. Il a été récemment associé à une détérioration de la réponse angiogénique à l'ischémie (Rivard, Silver et al. 1999). Divers mécanismes permettant

d'expliquer cette association ont été proposés. Premièrement, la fonction endothéliale est affectée par le vieillissement (Martin, Ogawa et al. 1991; Toro, Marijic et al. 2002). Cette dysfonction altère la réponse angiogénique à plusieurs niveaux. Tout d'abord, la vasodilatation et la perméabilité vasculaire, nécessaires à la migration et la prolifération des cellules endothéliales, sont diminuées par le vieillissement (Egashira, Inou et al. 1993; Tominaga, Fujii et al. 1994). Ce phénomène serait expliqué par une diminution de la réponse endothéliale suite à une stimulation par le VEGF et le NO (Amrani, Goodwin et al. 1996; Imaoka, Osanai et al. 1999) L'altération de cette réponse endothéliale induite par différents facteurs de croissance et/ou angiogéniques permet aussi d'expliquer la diminution de la migration et de la prolifération des cellules endothéliales associée au vieillissement (Drubaix, Giakoumakis et al. 1998; Rivard, Fabre et al. 1999). Outre une détérioration de la réponse endothéliale suite à une stimulation angiogénique, l'expression de multiples facteurs favorisant la néovascularisation est modifiée avec l'âge (Sarzani, Arnaldi et al. 1991; Garfinkel, Hu et al. 1996; Reed, Corsa et al. 1998; Rivard, Fabre et al. 1999; Rivard, Berthou-Soulie et al. 2000) Les mécanismes impliqués dans ce phénomène ne sont pas clairement élucidés mais il a été proposé qu'un défaut de la voie de signalisation dépendante de l'hypoxie impliquant le facteur de transcription HIF-1 α diminuerait l'expression du facteur de croissance VEGF et conséquemment la formation de néovaisseaux (Rivard, Berthou-Soulie et al. 2000).

Finalement, une diminution du nombre de cellules endothéliales progénitrices (EPCs) et une altération de leur fonction pourraient être à l'origine de l'inhibition de la néovascularisation en réponse à l'ischémie associée au vieillissement. En effet, de récentes études mentionnent qu'il existe une corrélation inverse entre le nombre de EPCs

et leur capacité de migrer et l'âge des patients (Vasa, Fichtlscherer et al. 2001; Scheubel, Zorn et al. 2003).

1.2. Tabagisme

1.2.1. Prévalence du tabagisme au Canada

À travers le monde, environ trois millions de personnes meurent chaque année en raison du tabagisme (Ezzati and Lopez 2003). L'industrie du tabac est probablement responsable de plus de décès prématurés que n'importe quelle autre entreprise commerciale excédant même le commerce des armes et des drogues illicites (Ezzati and Lopez 2003). Dans les pays industrialisés, l'usage du tabac est identifié comme étant la principale cause évitable de morbidité et de décès prématurés. En 2001, le tabagisme a été responsable de plus de 45 000 décès au Canada. Depuis 1991, le nombre de décès attribuable au tabagisme au Canada a augmenté de 8% (Makomaski Illing and Kaiserman 2004).

La prévalence du tabagisme continue de régresser globalement selon les derniers résultats de *L'Enquête de surveillance de l'usage du tabac au Canada*. En 2001, on estimait que 6 millions de personnes, ou 21,5% de la population canadienne fumaient quotidiennement, comparativement à 30% en 1991 et à 24% en 1997. Environ 23,5% des hommes fumaient, soit légèrement plus élevé que la proportion de femmes fumant (20%). Il est intéressant de noter que les plus faibles taux de tabagisme ont été observés en Colombie-Britannique et en Ontario où environ 17% et 19% respectivement de la population fume. Les taux les plus élevés ont été enregistré au Québec (27%) et à Terre-Neuve/Labrador (25%) (Figure 18).

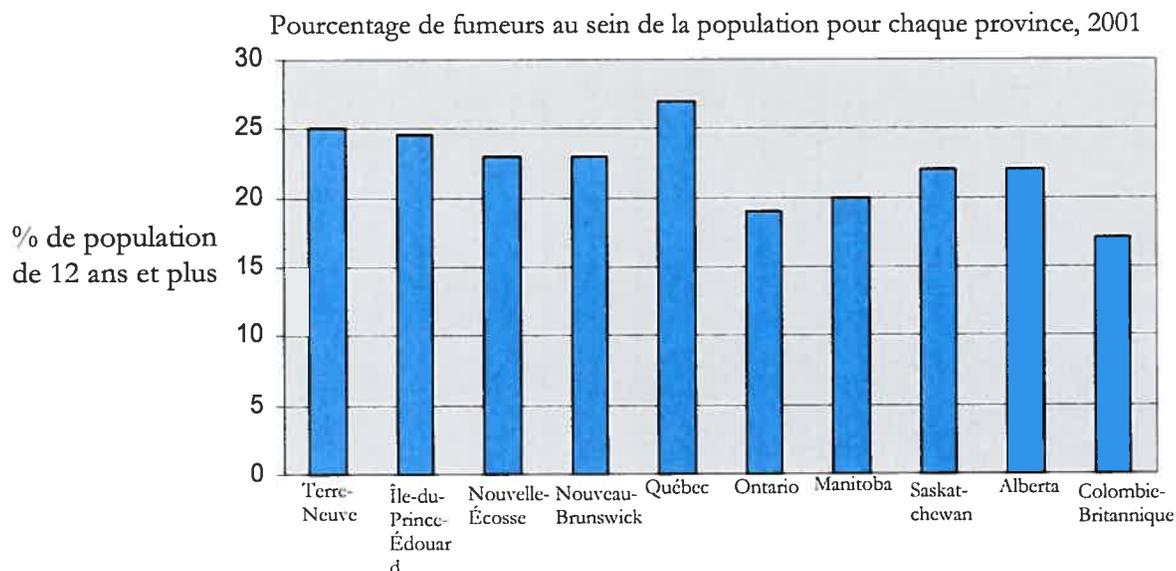


Figure 18. Pourcentage de fumeurs dans la population canadienne selon chaque province pour l'année 2001. Source; Statistique Canada, Enquête de surveillance de l'usage du tabac au Canada.

Le tabagisme commence à un jeune âge chez de nombreux Canadiens. La prévalence du tabagisme s'accroît radicalement durant l'adolescence selon une publication de santé Canada *Rapport sur l'usage de la cigarette au Canada, de 1985 à 2001*. Ce sont les jeunes adultes qui accusent les taux de tabagisme les plus élevés au Canada (groupe 20-24 ans, 33%) (Figure 19). En 2001, un pourcentage non négligeable de très jeunes Canadiens fumaient (4%), une diminution de moitié par rapport à 1994 où 8% des jeunes de 12 à 14 ans fumaient. Comme pour la population en générale, le taux de tabagisme diminue donc aussi chez les jeunes. Cependant, les filles affichent un taux de tabagisme légèrement supérieur à celui des garçons (groupe 12 à 19 ans, 16% vs 14%), et les jeunes continuent de fumer malgré les mises en garde contre les risques pour la santé

qui figurent sur les paquets de cigarettes. L'initiation précoce au tabac signifie que les jeunes fumeront plus longtemps, ce qui, combiné aux effets d'autres déterminants de la santé, peut accroître le risque de conséquences indésirables pour la santé contribuant à l'incapacité et au décès. En effet, selon une nouvelle étude, plus une personne est jeune au moment où elle commence à fumer quotidiennement, plus tôt elle court le risque que l'on diagnostique chez elle une bronchopneumopathie chronique obstructive, une maladie cardiaque ou un cancer.

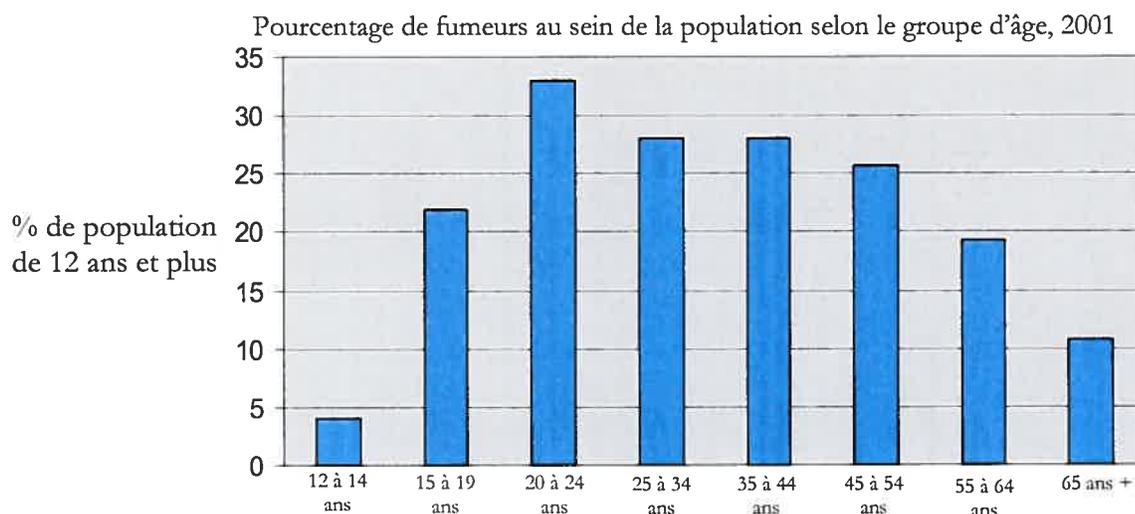


Figure 19. Pourcentage de fumeurs dans la population canadienne selon le groupe d'âge en 2001. Source; Statistique Canada, Enquête de surveillance de l'usage du tabac au Canada.

Les fumeurs passent une plus grande partie de leur vie avec des incapacités fonctionnelles lorsque l'on compare avec les non-fumeurs et ils sont beaucoup plus susceptibles de mourir prématurément (Rapport sur l'état de la population du Canada, Statistique Canada, 2000). En d'autres termes, le tabagisme

réduit d'environ 8 à 10 ans le nombre d'années qu'une personne peut espérer vivre et réduit aussi la qualité de vie.

En 1998, les trois principales causes de mortalité dans la population canadienne étaient les cardiopathies, le cancer et les maladies vasculaires cérébrales. Globalement, on estime que 39% des décès reliés à ces causes sont attribuables au tabagisme. Les tendances actuelles relatives à la mortalité attribuable au tabagisme reflètent les habitudes qui avaient cours dans la population il y a deux décennies. Chez les femmes, les taux de tabagisme ont culminés à la fin des années 70, et les taux de mortalité par cancer sont maintenant plus de quatre fois supérieurs à ce qu'ils étaient en 1969 (Institut national du cancer du Canada. *Faits saillants. Statistiques canadiennes sur le cancer, 1998* Toronto). Cependant, chez les hommes, les taux de tabagisme avaient atteint un sommet au milieu des années 60. Après des décennies de hausse continue, les taux de mortalité par cancer du poumon ont atteint un point culminant à la fin des années 80 et ont légèrement diminué depuis (Collishaw, Tostowaryk et al. 1988). La croissance démographique et le vieillissement de la population ont également une incidence sur le nombre de décès liés au tabagisme. À mesure que les membres de la génération du baby boom avancent en âge, on peut s'attendre à ce que des causes liées au tabagisme, surtout les cardiopathies, le cancer du poumon et les maladies vasculaires cérébrales continuent de faire un grand nombre de victimes chez les canadiens (Figure 20).

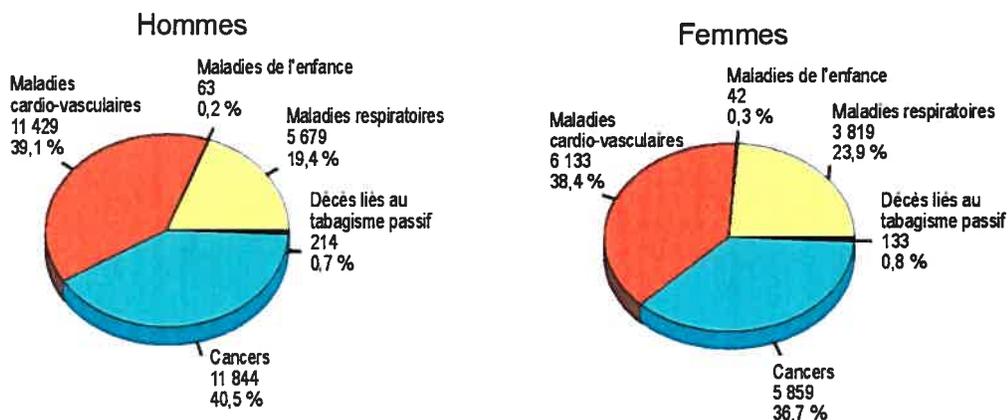


Figure 20. La mortalité attribuable au tabagisme au Canada, 1998. Source; Statistique Canada.

1.2.2. Association entre tabagisme et pathologies cardiovasculaires

Les données épidémiologiques montrent que le tabagisme chronique est associé à un risque significativement accru de maladies cardiovasculaires. Ce risque est fortement augmenté par la présence d'autres facteurs comme l'hypertension artérielle, l'hypercholestérolémie, l'hyperhomocystéinémie et le diabète. La nicotine et le monoxyde de carbone semblent jouer un rôle majeur dans les effets vasculaires reliés au tabac (Aronow 1983; Dwyer and Turino 1989; Ismail, Frishman et al. 1996; Benowitz and Gourlay 1997). L'usage du tabac constitue le facteur de risque principal pour le développement de maladies vasculaires athérosclérotiques coronariennes ou périphériques. Le tabagisme est le facteur de risque dont la correction peut apporter le maximum de bénéfice dans le cadre de la prévention cardiovasculaire primaire ou secondaire. Le sevrage tabagique doit donc toujours être une préoccupation prioritaire dans ce domaine.

1.2.2.1.Maladies coronariennes athérosclérotiques

1.2.2.1.1.Athérosclérose

L'association entre le tabagisme et l'athérosclérose est maintenant bien établi. La majorité des données épidémiologiques issues d'études de cohortes reposent sur l'évaluation de l'athérosclérose des carotides et des artères coronaires. Une étude menée en 1994 chez 5116 patients, a démontré qu'une exposition croissante à la fumée de cigarette augmentait l'épaisseur de la paroi vasculaire et la sténose carotidienne (Tell, Polak et al. 1994). En 1998, Howard et ses collaborateurs ont montré, à l'aide d'une étude longitudinale, la progression de la maladie athéromateuse en réponse à l'exposition active ou passive à la fumée de cigarette (Howard, Wagenknecht et al. 1998). Dans cette étude, le rapport des épaisseurs intima-média, déterminé au niveau de l'artère carotide sur une période de 3 ans, augmentait d'autant plus que l'exposition à la fumée de cigarette était élevée. Une autre étude a évalué l'effet du tabagisme sur le développement de l'athérosclérose au niveau des membres inférieurs. Le rapport des épaisseurs intima-média, déterminé au niveau de l'artère fémorale, était associé au tabagisme et à des niveaux élevés de protéine réactive C (Wallenfeldt, Hulthe et al. 2001). Finalement, les résultats récents d'une recherche démontrent que le tabagisme accentue la sévérité du développement de l'athérosclérose particulièrement chez les femmes (Richey Sharrett, Coady et al. 2004).

1.2.2.1.2.Infarctus du myocarde

Des études prospectives sur le tabagisme montrent que le risque relatif d'infarctus du myocarde est augmenté de 5.2 fois chez le fumeur par rapport au non fumeur (Kannel and Abbott 1984). Il est intéressant de noter que le risque d'infarctus augmente avec la quantité de cigarettes fumées quotidiennement. Paradoxalement, il a été proposé que les fumeurs avaient un meilleur pronostic que les non-fumeurs suite à un infarctus. En fait ceci s'explique par un plus jeune âge au moment du premier infarctus (10 ans de moins), une excellente réponse à la thrombolyse et un meilleur état général (les non-fumeurs sont plus souvent hypertendus et diabétiques) (Gottlieb, Boyko et al. 1996). Le risque de récurrence d'infarctus du myocarde est multiplié par 2 à 4,4 en cas de poursuite du tabagisme (Kannel and Abbott 1984). Le tabagisme pourrait être également un facteur pronostique de l'évolution de la fonction ventriculaire gauche après infarctus du myocarde. Une étude montre que les patients ayant une occlusion isolée de l'artère interventriculaire antérieure avaient des séquelles ventriculaires gauches beaucoup plus sévères s'ils étaient fumeurs au moment de l'infarctus. La poursuite du tabagisme mine également le pronostic des patients ayant bénéficiés d'un pontage aorto-coronaire et explique à elle seule la surmortalité des sujets les plus jeunes ayant subi une telle intervention. Arrêter de fumer après un infarctus du myocarde réduit le risque de récurrence d'infarctus fatal de 20 à 50% (Kawachi, Colditz et al. 1994). Une étude réalisée dans une population féminine de 25 à 64 ans montre que le sevrage tabagique diminue très rapidement le risque d'un premier infarctus du myocarde et ce risque rejoint rapidement celui des non-fumeurs après 2 ou 3 ans (Rosenberg, Palmer et al. 1990).

Le tabagisme est associé à un risque accru de mort subite. En effet, le risque de mort subite est 10 fois supérieur chez le fumeur par rapport au non fumeur (Hallstrom, Cobb et al. 1986; Escobedo and Zack 1996) et augmente selon la quantité de cigarettes fumées quotidiennement (Kannel and Abbott 1984). La survenue d'un trouble du rythme paroxystique et/ou d'un infarctus du myocarde est la cause la plus probable de ces morts subites. Même si le premier arrêt cardiaque a été «récupéré», le risque de récurrence reste majeur chez le fumeur.

1.2.2.2.Hypertension artérielle

La pression artérielle des fumeurs est statistiquement légèrement plus basse que celle des non-fumeurs (Green, Jucha et al. 1986). Si ce phénomène n'est pas clairement expliqué, nous savons par contre que le fait de fumer une cigarette entraîne une élévation moyenne de 11 mmHg pour la pression artérielle systolique et de 9 mmHg pour la pression artérielle diastolique (Imamura, Miyamoto et al. 2001). Cette élévation se prolonge pendant 20 à 40 minutes. Certains sujets particulièrement sensibles aux effets de la nicotine peuvent avoir une réaction hypertensive paroxystique plus marquée de plusieurs centimètres de mercure avec une forte tachycardie. Ce phénomène semble lié à l'effet vasopresseur de la nicotine qui stimule le système sympathique et la sécrétion de vasopressine. Cela pourrait être aussi expliqué par une diminution de la relâche de monoxyde d'azote (Mazzone, Cusa et al. 2001; Tsuchiya, Asada et al. 2002). Une étude récente montre que l'arrêt de l'usage du tabac pourrait augmenter la pression sanguine et l'hypertension (Lee, Ha et al. 2001). Par ailleurs, le tabac peut indirectement induire l'hypertension

artérielle en favorisant une sténose artérielle rénale athéroscléreuse. Près de 90% des hypertensions artérielles réno-vasculaires sont retrouvées chez des fumeurs (Stengel, Couchoud et al. 2000).

1.2.2.3. Accidents vasculaires cérébraux

Le rôle du tabagisme dans la survenue d'un accident vasculaire cérébral a été prouvé récemment. La consommation de tabac est statistiquement associée à la survenue des trois types d'accidents vasculaires cérébraux: accident vasculaire cérébral ischémique, hémorragie intracérébral et hémorragie méningée. Plusieurs études ont démontré chez les fumeurs un risque relatif d'accident vasculaire cérébral de l'ordre de 2,5 (Thulasimani and Ramaswamy 2002; Kurth, Kase et al. 2003; Kurth, Kase et al. 2003; Schwartz, Carlucci et al. 2004) indépendamment du sexe et de l'âge et ce risque pourrait dans certains cas varier en fonction de l'intensité de l'intoxication (Giroud and Dumas 1994; Schievink 1997). Dans la *Nurse Health Study* une consommation de 25 cigarettes ou plus par jour représentait un risque d'accident vasculaire cérébral 3,7 fois plus élevé que l'absence de consommation de tabac. On sait que le risque de survenue d'un accident ischémique est corrélé au degré de sténose carotidienne (Moore, Barnett et al. 1995). La consommation de tabac contribue au développement de l'athérosclérose des troncs supra-aortiques, indépendamment des autres facteurs de risque (Petrik, Gelabert et al. 1995). Les sténoses de la carotide extra- ou intracrânienne et la modification de la paroi artérielle sont associées à la consommation de tabac et corrélées aux accidents vasculaires ischémiques (Tell, Polak et al. 1994; Petrik, Gelabert et al. 1995).

L'association tabac et contraception oestroprogestative est particulièrement dangereuse. Le risque d'hémorragie méningée chez une femme qui fume et qui prend des contraceptifs augmente de 21,9 fois par rapport à celui d'une femme qui ne fume pas. Les raisons de l'association épidémiologique entre la consommation de tabac et les accidents hémorragiques ne sont pas évidentes mais elles pourraient relever d'un déséquilibre dans la balance protéase/anti-protéase et des facteurs de coagulation (Schievink 1997). Dans plusieurs études l'arrêt du tabagisme a entraîné une diminution rapide du risque de morbidité et de mortalité par accident vasculaire cérébral (Kawachi, Colditz et al. 1994).

1.2.2.4. Artériopathie oblitérante des membres inférieurs

Le tabagisme est considéré comme le facteur de risque le plus important dans la genèse des maladies vasculaires périphériques (Criqui, Browner et al. 1989). Il influence à la fois la survenue et l'évolution de l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs. Il a également un effet synergique avec les autres facteurs de risque et particulièrement avec le diabète. Environ 90% des patients ayant des lésions d'artériopathie des membres inférieurs sont des fumeurs et le risque de développer une claudication intermittente des membres inférieurs chez un sujet de plus de 45 ans qui fume plus de 15 cigarettes/jour est 9 fois supérieur à celui d'un sujet non-fumeur. L'évolution de l'artériopathie et ses complications évolutives dépendent essentiellement de la poursuite ou non du tabagisme. Le pronostic des patients souffrant d'une maladie vasculaire périphérique s'améliore lorsqu'ils cessent de fumer. Chez ceux qui continuent de fumer, les taux de complications et

d'amputations sont beaucoup plus élevés que chez ceux qui réussissent à renoncer au tabac (Ameli, Stein et al. 1989; Wiseman, Kenchington et al. 1989).

1.2.2.5.Maladie de Buerger

La thromboangéite oblitérante ou maladie de Buerger est une atteinte périphérique beaucoup plus rare survenant pratiquement uniquement chez les fumeurs. L'atteinte artérielle qui touche presque exclusivement des hommes jeunes (entre 20 et 30 ans) concerne essentiellement les artères en périphérie avec une atteinte à la fois des membres inférieurs et supérieurs (Eisen 1966). La pathogenèse de cette maladie est encore mal connue mais l'évolution semble éminemment dépendante de la poursuite ou de l'arrêt du tabagisme (Mills 2003). Des études épidémiologiques et biologiques proposent que l'arsenic présent dans la fumée de cigarette aurait un rôle majeur dans l'étiologie de la maladie de Buerger (Tseng, Chong et al. 1996; Chiou, Hsueh et al. 1997; Olin 2000). Il a été récemment démontré que l'arsenic inhibe la vascularisation en réduisant la production de VEGF et en induisant l'apoptose des cellules endothéliales (Roboz, Dias et al. 2000). Une agrégation plaquettaire et une réduction du taux de cAMP ont aussi été observés (Kumer, Damon et al. 2000). Dans la plupart des cas le sevrage tabagique complet permet d'arrêter la progression de la maladie, alors que la poursuite entraîne inévitablement des manifestations ischémiques très sévères aboutissant à la gangrène et à l'amputation.

1.2.3.Rôle du tabagisme dans la pathogenèse des maladies cardiovasculaires

Le tabagisme représente un facteur de risque particulier dans la mesure où deux ordres de complications cardiovasculaires lui sont associées, chroniques et aiguës. D'une part, le tabagisme initie et accélère le processus d'athérosclérose au niveau des artères coronaires, de l'aorte, de la carotide et des artères de la circulation périphérique. D'autre part, il favorise la survenue d'accidents cardiovasculaires aigus, infarctus du myocarde, accidents vasculaires cérébraux et mort subite d'origine cardiaque. Les mécanismes impliqués dans ces complications seront donc envisagés séparément selon leur intervention préférentielle dans les processus chroniques ou aigus.

1.2.3.1.Mécanismes impliqués dans le développement de l'athérosclérose par le tabagisme

Le fait que le tabac favorise le développement de l'athérosclérose est maintenant bien établi. De nombreux mécanismes sont potentiellement impliqués dans le processus d'athérogenèse induit par le tabac et seulement une intégration de ceux-ci nous permet de mieux comprendre l'implication de ce facteur de risque dans l'initiation et l'évolution de l'athérosclérose (figure 21).

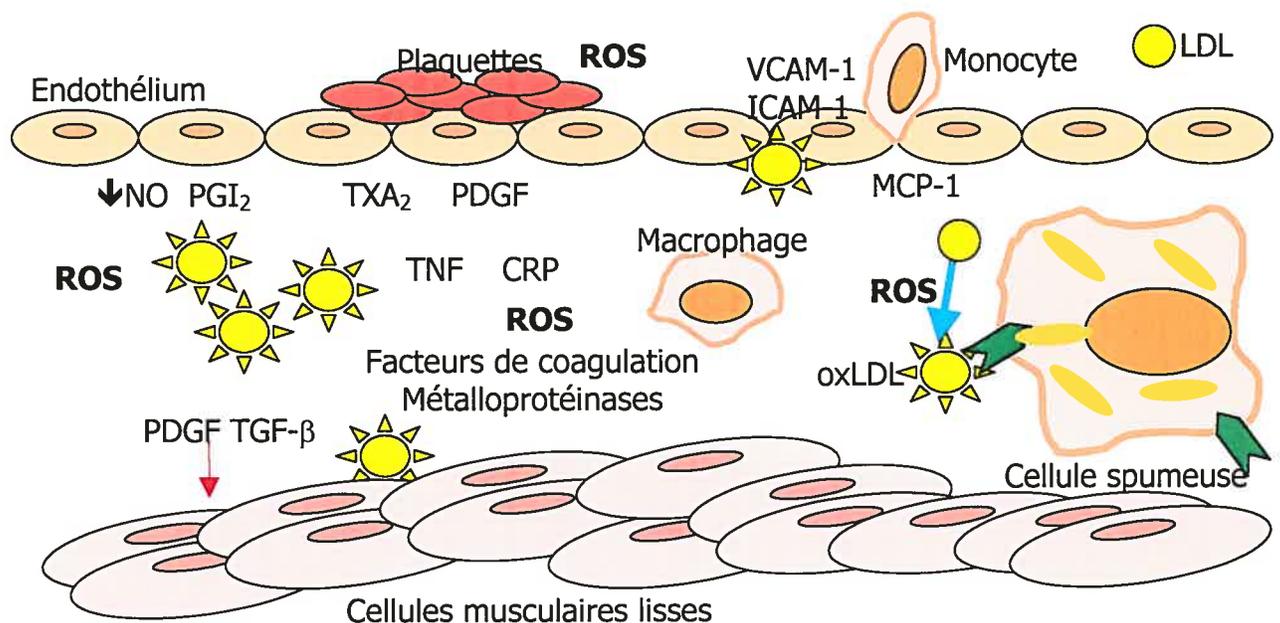


Figure 21. Intégration des mécanismes impliqués dans le développement de l'athérosclérose induit par le tabagisme. ROS, espèces radicalaires dérivées de l'oxygène, NO, monoxyde d'Azote, PGI₂, prostacycline, TXA₂, thromboxane A₂, PDGF, platelet derived growth factor, oxLDL, oxidized low density lipoprotein, MCP-1, macrophage chemoattractant protein, TNF, tumor necrosis factor, CRP, protéine C réactive, TGF, transforming growth factor.

1.2.3.1.1. Stress oxydant

Le stress oxydant correspond à une perturbation du statut oxydant intracellulaire induite soit par une production excessive de radicaux libres ou d'espèces radicalaires dérivées de l'oxygène (ROS), soit par une diminution de la capacité de défense antioxydante (enzymatique et non-enzymatique). Tel que discuté précédemment, ce phénomène est impliqué dans l'initiation de la lésion et le développement de l'athérosclérose. Les radicaux libres induits par la fumée de cigarette peuvent provenir de deux sources. La source exogène représente les radicaux libres présents dans la fumée de cigarette tandis que la source endogène est secondaire à l'effet toxique de certains composants de la fumée entraînant une

activation cellulaire (cellules inflammatoires et endothéliales) et une diminution des systèmes de défense contre les radicaux libres. Le stress oxydant semble donc être chez le fumeur le mécanisme le plus important pour l'initiation de la lésion endothéliale et de l'athérosclérose.

Dans la fumée de cigarette, plus de 4000 composés et une quantité importante de ROS ont été identifiés dont environ 92% sont sous forme de gaz et 8% sous forme de particules qui constituent le «condensat» (Smith and Fischer 2001). La phase gazeuse contient entre autre de l'eau, de l'oxygène, de l'azote, de l'oxyde de carbone, de l'anhydride carbonique, de l'acide cyanhydrique, de l'ammoniaque, divers aldéhydes et des cétones. La phase particulaire renferme une grande variété de substances dont la nicotine, la nicotimine, la nornicotine, la cotinine, l'anabesine, des quinones et semi-quinones, des hydrocarbures aromatiques, des acides organiques, des alcools, des terpènes, des composés nitré, des phénols, des métaux rares (cadmium), de l'arsenic, des corps radio-actifs, des insecticides et des éléments fongiques (Church and Pryor 1985). Certaines de ces substances sont des radicaux libres alors que d'autres, en étant cytotoxiques, vont induire l'activation cellulaire et la production de ROS. Finalement, certains composés interagissent avec des intermédiaires du métabolisme cellulaire pour produire des ROS. Par exemple, certains radicaux comme les semi-quinones peuvent rester stables plusieurs minutes. Par conséquent, ils sont encore actifs lorsqu'ils atteignent les vaisseaux de la grande circulation. Les semi-quinones peuvent réagir avec l'oxygène moléculaire pour former l'anion superoxyde. Des radicaux alcoyls et alkyls, du peroxyde et du NO sont aussi formés en abondance. Le NO réagit avec l'anion superoxyde pour former

des peroxynitrites qui sont cytotoxiques. Les composés toxiques atteignant la circulation sanguine vont aussi activer les cellules inflammatoires et endothéliales qui à leur tour vont produire des ROS via différentes voies: la voie de la xanthine oxydase, de la NADPH-oxydase, des myéloperoxydases, de la cyclooxygénase, de la lipooxygénase et de la chaîne de transport d'électrons (figure 17) (Burke and Fitzgerald 2003; Ambrose and Barua 2004; van der Vaart, Postma et al. 2004). À cet égard, les mitochondries et ses composantes jouent un rôle crucial dans la production de radicaux oxygénés et semblent particulièrement affectées par la fumée de cigarette (Aoshiba K. Tamaoki J et al. 2001; Vayssier-Taussat M et al.2001; Vayssier-Taussat M et al. 1998; Banzet N, Francois D, et al. 1999). En effet, la chaîne respiratoire mitochondriale est essentielle dans la cellule en étant responsable de la transformation de l'oxygène en deux molécules d'eau. Cette réaction de réduction impliquant la présence de quatre électrons est possible grâce à un système complexe de protéines et d'enzymes (cytochromes) localisées dans la membrane interne de la mitochondrie. Les conséquences de cette activité mitochondriale sont doubles et paradoxales. D'une part, la mitochondrie fournit à la cellule une source d'énergie importante puisque 36 molécules d'adénosine triphosphate (ATP) seront générées lors de la réduction de l'oxygène. Par contre, environ 0,4 à 4% de l'oxygène ne sera pas correctement convertis et donnera naissance à des radicaux oxygénés parmi lesquels figurent des radicaux libres comme l'anion superoxyde ou le radical hydroxyle. D'autres entités non radicalaires de l'oxygène peuvent être produites comme le peroxyde d'hydrogène ou l'oxygène singulet (Gutteridge et al. 1992). Notre organisme produit donc en permanence ces espèces oxygénées. En

faible concentration, elles possèdent un rôle physiologique important en agissant comme second messager capable de réguler le phénomène d'apoptose (Curtin JF, Donovan M et al. 2002), d'activer des facteurs de transcription (Owuor ED, Kong AN, 2002) ou de moduler l'expression de gènes de structure codant pour des enzymes antioxydantes (Holgrem A 2003). Cependant, le tabagisme semble affecter le fonctionnement adéquat de la mitochondrie entraînant une production excessive de ROS induisant un phénomène d'apoptose dans les cellules saines (Aoshiba K. Tamaoki J et al. 2001; Vayssier-Taussat M et al.2001; Vayssier-Taussat M et al. 1998; Banzet N, Francois D, et al. 1999) ou activant divers gènes codant pour l'expression de cytokines pro-inflammatoires ou de molécules d'adhésion (Vayssier-Taussat M et al. 1998; Andreassi MG, 2003). De plus, les ROS ainsi produits, de par leur nature instable, sont particulièrement réactionnels et seront capables de provoquer des altérations cellulaires importantes: cassures ou mutations de l'ADN, inactivation de protéines et d'enzymes, oxydation du glucose, peroxydation lipidique (Andreassi MG, 2003).

Les cellules survivront à cette production continue de ROS pendant un certain temps grâce à l'équilibre entre la production d'oxydants et le maintien des défenses antioxydantes. Il existe principalement deux mécanismes de défenses antioxydantes soit enzymatique (tableau 3) et non-enzymatique (tableau 4). Ils fonctionnent de façon complémentaire et synergique selon une compartimentation bien précise pour protéger les cellules contre les métabolites cytotoxiques dérivés de l'oxygène. Cependant, lorsque la production de radicaux est récurrente ou chronique

les mécanismes de défense s'épuisent, l'équilibre est perturbé et le stress oxydant s'installe. À cet effet, il est intéressant de noter que chez le fumeur la présence d'un stress oxydant est reflétée par la diminution tissulaire et plasmatique des vitamines antioxydantes (Alberg 2002; Kelly 2002; Kelly 2002; Barua, Ambrose et al. 2003; Kelly 2003). De plus, plusieurs marqueurs du stress oxydant sont retrouvés en abondance au niveau plasmatique, tissulaire et urinaire (Yamaguchi, Kagota et al. 2000; Chehne, Oguogho et al. 2001; Nia, Van Schooten et al. 2001; Dietrich, Block et al. 2002; Miller, Pankow et al. 2003; Yamaguchi, Matsuno et al. 2004). Ainsi, plusieurs auteurs soutiennent que les effets délétères du tabagisme seraient essentiellement la conséquence de l'action des ROS et des radicaux libres. Les ROS moduleraient principalement la génération et la biodisponibilité de NO (Figure 16) affectant la fonction endothéliale et favorisant l'activation des cellules endothéliales et macrophagiques et l'oxydation des particules de LDL (Figure 22) (Yokoyama 2004).

Tableau 3. Principaux systèmes de défenses enzymatiques

Antioxydants		Fonctions
Glutathion peroxydase (GSHpx)		Réduire le peroxyde d'hydrogène en eau et les hydroperoxydes en acides hydroxyle
Glutathion réductase		Réduire le glutathion oxydé en glutathion réduit en présence du co-facteur NADPH
Superoxyde dismutase (SOD)		Dismuter l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène
Catalase (CAT)		Réduire le peroxyde d'hydrogène en eau

Tableau 4. Principaux facteurs de défenses non-enzymatiques

Antioxydants	Fonctions
Transferrine, céruloplasmine et albumine	Séquestrer les ions métalliques
Histidine	Piéger les radicaux hydroxyles et l'oxygène singulet
Taurine	Piéger l'acide hypochlorique (HOCl) et les radicaux hydroxyles
Ubiquinone	Prévenir la peroxydation lipidique
Flavonoïdes	Prévenir la peroxydation lipidique et séquestrer les ions métalliques
Vitamine E (tocophérol)	Piéger les radicaux peroxydes et l'oxygène singulet
Vitamine C (acide ascorbique)	Recycler le radical tocophéryl en tocophérol
Bêta-Carotène	Piéger l'oxygène singulet
Glutathion réduit	Co-enzyme de la glutathion peroxydase, piègeurs de radicaux hydroxyles et d'oxygène singulet

Plusieurs études montrent que les fumeurs bénéficient d'un supplément d'antioxydants. En effet, un supplément de vitamines antioxydantes (Vitamine C et E surtout) diminuerait la présence plasmatique, tissulaire et urinaire des marqueurs du stress oxydant, modulerait la fonction endothéliale, diminuerait l'oxydation des LDL et inhiberait la réponse inflammatoire (Antoniades, Tousoulis et al. 2003; Antoniades, Tousoulis et al. 2003; d'Uscio, Milstien et al. 2003).

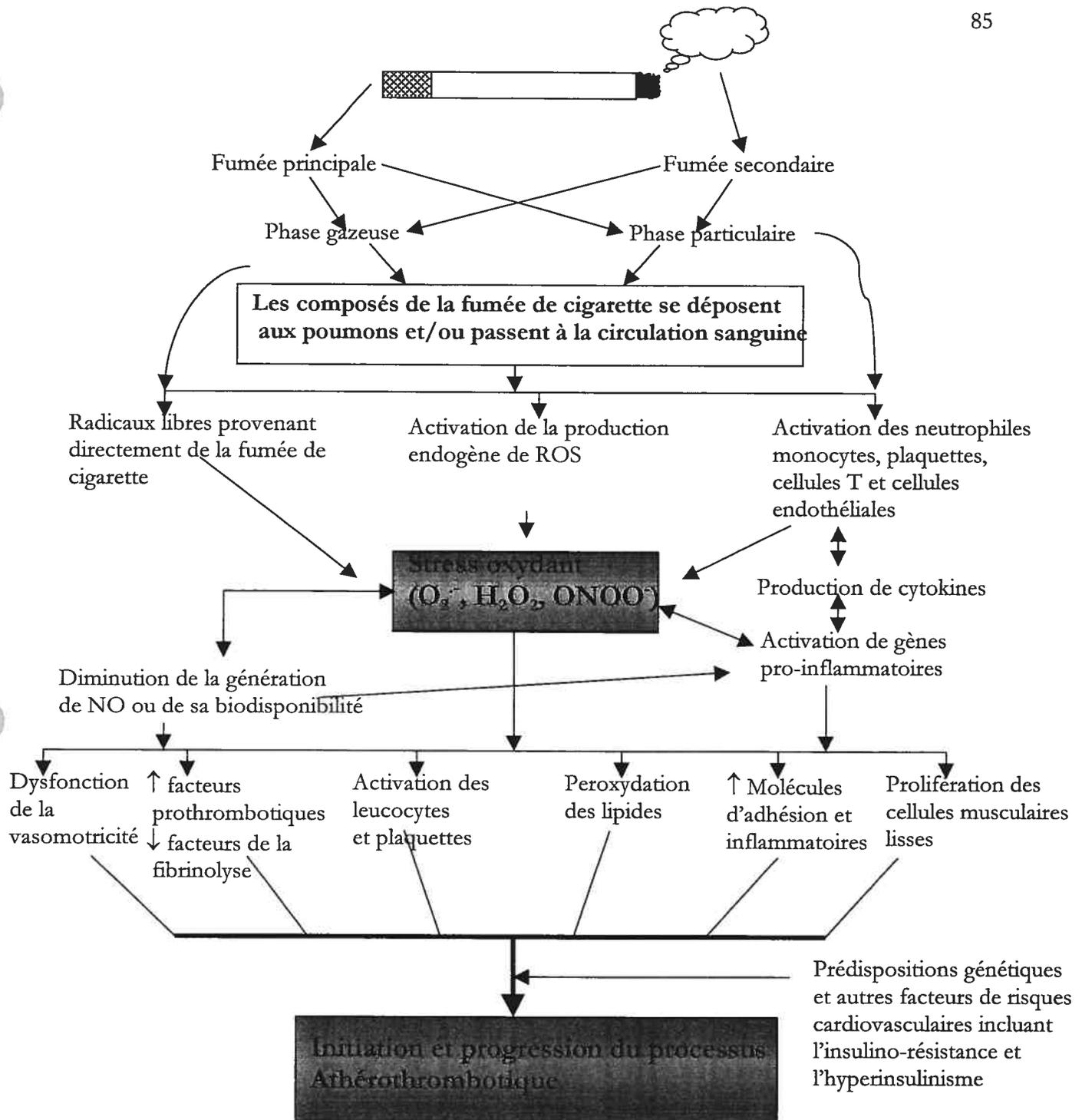


Figure 22. Le stress oxydant induit par la fumée de cigarette comme principal agent athérotrombotique et ses mécanismes d'action. ROS, espèces radicalaires oxygénées, NO, monoxyde d'azote, O₂⁻, anion superoxyde, H₂O₂, peroxyde d'hydrogène, ONOO⁻, peroxyinitrites.

1.2.3.1.2. Dysfonction endothéliale

Le tabagisme s'accompagne d'une dysfonction endothéliale caractérisée par une réduction de la production de facteurs protecteurs, notamment le NO. Cette altération des fonctions endothéliales se manifeste par l'apparition d'une vasoconstriction à l'acétylcholine (effet direct sur les cellules musculaires lisses et non contre-balançé par la production endothéliale de NO), et par une réduction de la vasodilatation flux-dépendante (Heitzer, Yla-Herttuala et al. 1996; Rajj, DeMaster et al. 2001; Burke and Fitzgerald 2003; Ambrose and Barua 2004). Différentes hypothèses ont été proposées pour expliquer cette diminution de la biodisponibilité du monoxyde d'azote par le tabagisme: réduction de l'expression de la NO synthase ou modification post-traductionnelle diminuant son activité, réduction de la disponibilité en substrat (L-arginine), en cofacteurs (BH4), altération des systèmes transmembranaires de transduction des signaux (récepteur, PI3k/Akt, protéine G) ou enfin une majoration de la dégradation du NO par l'augmentation du stress oxydant (anion superoxyde) (Wang 2000; Wang, Sim et al. 2000; Tsuchiya, Asada et al. 2002; Vleeming, Rambali et al. 2002; Barua, Ambrose et al. 2003; Tentolouris, Tousoulis et al. 2004).

Une perte de fonction de l'endothélium est ainsi à l'origine d'une augmentation de la réponse inflammatoire, hypertrophique et thrombotique se manifestant par l'activation des plaquettes, l'expression accrue de molécules d'adhésion, une augmentation de l'adhésion et de l'infiltration des monocytes dans l'espace sous-intimal, une augmentation de l'oxydation et de la captation des LDL par les monocytes/macrophages, la relâche de facteurs thrombotiques et la

prolifération des cellules musculaires lisses (Davignon and Ganz 2004; Landmesser, Hornig et al. 2004). L'ensemble de ces phénomènes aboutit à la majoration des stries lipidiques et à l'apparition de complications cardiovasculaires.

Le dysfonctionnement endothélial associé au tabagisme est cependant réversible. En effet, l'administration continue de vitamines antioxydantes, notamment la vitamine C et E, corrige le dysfonctionnement endothélial mesuré par la réponse vasculaire suite à une stimulation à l'acétylcholine (Heitzer, Just et al. 1996; Neunteufl, Priglinger et al. 2000; Antoniades, Tousoulis et al. 2003). Ceci est d'autant plus intéressant que les fumeurs ont habituellement une diminution de taux sanguins de vitamines antioxydantes (Alberg 2002; Tsuchiya, Asada et al. 2002). La L-arginine, la taurine, le BH4 et certains inhibiteurs d'enzymes produisant des radicaux libres peuvent également normaliser la vasodilatation chez le fumeur (Heitzer, Just et al. 1996; Campisi, Czernin et al. 1999; d'Uscio, Milstien et al. 2003; Fennessy, Moneley et al. 2003; Guthikonda, Sinkey et al. 2003).

1.2.3.1.3. Inflammation

La réponse inflammatoire est un événement essentiel participant à l'initiation et à l'évolution de l'athérosclérose. Plusieurs études indiquent que le tabagisme augmente de 20 à 25% le nombre de leucocytes dans la circulation sanguine (Parulkar, Barua et al. 1973; Mercelina-Roumans, Ubachs et al. 1994). In vivo, le tabagisme est associé à une augmentation des niveaux de multiples marqueurs de l'inflammation dont la protéine C réactive, le ligand CD 40, l'interleukine-6 et -8, la protéine inflammatoire dérivée des macrophages (MIP) et le

TNF- α (Tappia, Troughton et al. 1995; Mendall, Patel et al. 1997; Tracy, Lemaitre et al. 1997; Bermudez, Rifai et al. 2002; Bermudez, Rifai et al. 2002; Harding, Sarma et al. 2004; Harding, Sommerfield et al. 2004). Le recrutement de leucocytes au niveau de la lésion endothéliale est un événement précoce de l'athérosclérose. Une augmentation de molécules d'adhésion favorise l'interaction leucocytes-cellules endothéliales induisant leur infiltration dans la paroi vasculaire. Chez le fumeur une augmentation de l'expression de VCAM-1, ICAM-1 et de E-selectine a été rapportée (Schaberg, Lauer et al. 1992; Zoppini, Targher et al. 1999; Lesperance, Frasure-Smith et al. 2004). L'élévation de cytokines pro-inflammatoires associée à une expression accrue des molécules d'adhésion chez le fumeur entraîne une augmentation de l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales de l'ordre de 70 à 90% et une infiltration monocyttaire de 200% supérieure à celle des non-fumeurs (Kalra, Ying et al. 1994; Shen, Rattan et al. 1996). De façon intéressante, ces anomalies sont diminuées chez le fumeur par la prise d'antioxydants notamment la vitamine C, ce qui militerait encore en faveur d'une altération des mécanismes protecteurs secondaire à un stress oxydant favorisant l'interaction cellules inflammatoires-cellules endothéliales (Weber, Erl et al. 1996).

1.2.3.1.4. Anomalies métaboliques

Le tabagisme pourrait contribuer au développement de l'athérosclérose en modifiant le profil lipidique. On note chez le fumeur une augmentation du cholestérol total (2,2%), des LDL (5,5%) et des triglycérides (8,1%) avec une diminution des HDL (8,1%) et de l'apoprotéine-B100 (Craig, Palomaki et al. 1989;

Pech-Amsellem, Myara et al. 1996; Schuitemaker, Dinant et al. 2002). Une inhibition des mécanismes de transport inverse du cholestérol serait vraisemblablement à l'origine des niveaux élevés de cholestérol chez le fumeur (Zaratin, Quintao et al. 2004). De plus, le tabagisme favorise l'oxydation/peroxydation des LDL, modifie le contenu des LDL en malondialdéhyde et en vitamine E et augmente la sécrétion de F2-Isoprostane, un marqueur de la peroxydation des lipoprotéines (Harats, Ben-Naim et al. 1989; Morrow, Frei et al. 1995; Kharb and Singh 2000; Kharb, Singh et al. 2001; Altuntas, Dane et al. 2002).

À l'arrêt de l'intoxication tabagique, on note une augmentation rapide et prononcée du niveau des HDL alors que les triglycérides, le cholestérol et les LDL restent inchangés (Stubbe, Eskilsson et al. 1982). Ces observations, qui pourraient être liées à une modification du régime alimentaire, suggèrent que les anomalies lipidiques induites par le tabac sont partiellement réversibles à l'arrêt de l'exposition à la fumée de cigarette.

Une autre anomalie métabolique observée chez le fumeur impliquée dans la genèse de l'athérosclérose est l'insulino-résistance. En effet, plusieurs études démontrent que les fumeurs ont une certaine insulino-résistance et une hyperinsulinémie compensatoire par rapport aux non-fumeurs (Eliasson, Attvall et al. 1994; Kong, Nimmo et al. 2001; Fagerberg, Hulten et al. 2003; Reaven and Tsao 2003; Borissova, Tankova et al. 2004). Cette insulino-résistance est probablement secondaire à la libération de catécholamine par la nicotine (Eliasson, Taskinen et al. 1996). Le lien entre l'insulino-résistance, l'hyperinsulinisme l'hyperglycémie et l'athérogenèse, a été démontré par plusieurs études épidémiologiques et différents

mécanismes ont été proposés pour expliquer cette association. Premièrement, l'insuline favorise la prolifération des cellules musculaires lisses et la fixation des LDL à leur récepteurs sur les monocytes et les cellules musculaires lisses (Pfeifle and Ditschuneit 1980; Glass, Stewart et al. 1987; Kazama, Noguchi et al. 1989). Deuxièmement, l'insulino-résistance et l'hyperinsulinisme créent un profil athérogène des lipoprotéines (augmentation des VLDL et diminution des HDL) (Bagdade, Buchanan et al. 1990; Taskinen 1990). Ensuite, l'insuline favorise la libération de facteurs de croissance locaux qui contribuent à l'hypertrophie de la paroi artérielle (Bayes-Genis, Conover et al. 2000; Doronzo, Russo et al. 2004). L'hyperinsulinisme peut aussi exercer un effet thrombogénique en particulier une hypofibrinolyse (Juhan-Vague, Alessi et al. 1996) par l'intermédiaire d'une élévation du taux de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène et de la diminution du taux de plasminogène et d'activateur du plasminogène (Juhan-Vague, Alessi et al. 2003; Vulin and Stanley 2004). Finalement, l'hyperglycémie subséquente à l'insulino-résistance, entraîne une multitude de conséquences favorisant l'athérosclérose: la glycation des protéines, l'activation des monocytes avec production accrue de cytokines et de facteurs de croissance, diminution de la fibrinolyse, lésion endothéliale et l'activation plaquettaire. L'ensemble de ces anomalies, retrouvées chez le fumeurs, contribue sans doute au développement de l'athérosclérose (figure 23).

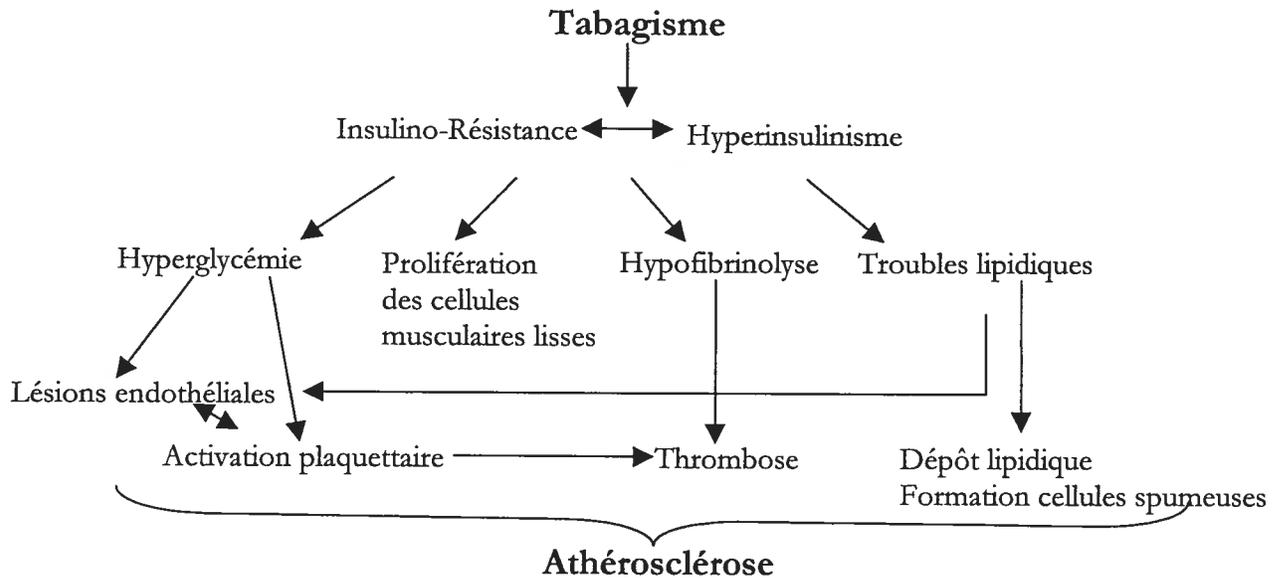


Figure 23. Représentation de l'implication de l'insulino-résistance et de l'hyperinsulinisme induites par le tabagisme dans le développement de l'athérosclérose

1.2.3.2. Mécanismes impliqués dans les complications aiguës reliées au tabagisme

1.2.3.2.1. Effets hématologiques

L'usage du tabac entraîne plusieurs effets hématologiques. Premièrement, l'intoxication tabagique chronique entraîne une augmentation de la viscosité sanguine. Ce phénomène est expliqué par une augmentation des éléments figurés du sang (leucocytes, plaquettes et érythrocytes) (Muhlhauser, Verhasselt et al. 1993; Mercelina-Roumans, Ubachs et al. 1994; Salbas 1994; David and Eaton 2003). Divers composés toxiques présents dans la fumée de cigarette et atteignant la circulation sanguine déclenchent une réponse inflammatoire, activent les leucocytes et les plaquettes en augmentant ainsi leur nombre. Outre une augmentation du nombre de plaquettes, le tabac favorise aussi l'agrégation et l'adhésion plaquettaires, effet qui serait lié à la lésion endothéliale (Inoue, Hayashi et al. 2001; Suwansaksri, Wiwanitkit et al. 2004). Les plaquettes ainsi activées produisent davantage de

thromboxane A₂ et de bêta-thromboglobuline favorisant encore leur agrégation (Duncan, DePratti et al. 1981; Rangemark, Ciabattini et al. 1993; Weber, Liesener et al. 2000; Newby and Fox 2001, Mennen, 1999 #668). D'autre part, l'élévation des érythrocytes résulte d'une augmentation de l'érythropoïèse déclenchée afin de compenser l'effet hypoxique entraîné par le tabagisme.

Une corrélation entre le tabagisme et des niveaux élevés de fibrinogène a aussi été clairement démontrée tant chez l'homme que chez la femme (Mennen, Balkau et al. 1999; Hunter, Garlick et al. 2001; Nascetti, Elosua et al. 2001; Tuut and Hense 2001). Cette élévation du taux de fibrinogène est un facteur prédisposant important pour le développement de maladies vasculaires, en particulier de cardiopathies ischémiques. Toutes ces modifications hématologiques, en augmentant la viscosité du sang et l'agrégation plaquettaire, favorisent le développement du thrombus qui est à l'origine des événements vasculaires aigus.

Plusieurs observations épidémiologiques suggèrent qu'une augmentation de la thrombogénèse est impliquée dans la survenue d'événements cardiovasculaires aigus induits par le tabagisme (Burns 2003; Metz and Waters 2003; Ambrose and Barua 2004; Lowe 2004). Tel que discuté précédemment, le risque de faire un infarctus du myocarde ou une mort subite chez le fumeur est supérieur par rapport au non-fumeur. Ces événements surviendraient suite à une rupture de la plaque athéromateuse et à la formation d'un thrombus, processus accentués chez le fumeur (Burke, Farb et al. 1997; Burke, Farb et al. 1998). Par ailleurs, au moment de la survenue de l'infarctus, les fumeurs sont plus jeunes, ont moins de facteurs de risque et moins d'anomalies coronariennes que les non-fumeurs. Réciproquement, le

pronostic immédiat de l'infarctus du myocarde traité par thrombolyse est meilleur chez le fumeur que chez le non-fumeur. Cela s'explique par une meilleure perfusion coronaire après thrombolyse, un moindre degré de sténose résiduelle coronaire et une incidence plus grande de localisation inférieure de l'infarctus. En revanche, l'arrêt du tabagisme diminue immédiatement la survenue d'événements thrombotiques (Rosenberg, Kaufman et al. 1985; Lightwood and Glantz 1997). Ces observations épidémiologiques appuient le rôle d'un mécanisme thrombogène prépondérant dans le déclenchement des complications coronaires aiguës chez les fumeurs. Les effets pro-thrombotiques de l'exposition à la fumée de cigarette semblent être médiés via l'activation plaquettaire, l'altération de la balance entre l'expression de facteurs pro- et anti-thrombotiques et une altération de la fibrinolyse (Inoue, Hayashi et al. 2001; Burns 2003; Metz and Waters 2003; Suwansaksri, Wiwanitkit et al. 2004).

L'activation et l'agrégation plaquettaires sont des éléments déterminants intervenant dans l'évolution vers la thrombose. Le tabagisme est associé à une dysfonction plaquettaire. Les plaquettes sanguines isolées de fumeurs relâchent différents facteurs pro-thrombotiques (thromboxane A₂, platelet activating factor, Von Willebrand factor) et démontrent une hyperagrégabilité (Rival, Riddle et al. 1987; Blache 1995; Fusegawa, Goto et al. 1999). En contre partie, le tabagisme diminue aussi la relâche de cyclooxygénase, de prostacycline PGI₂, et de NO dérivé des plaquettes et inhibe la sensibilité des plaquettes au NO exogène entraînant l'activation et l'adhésion de celles-ci (Blann, Adams et al. 1996; Ichiki, Ikeda et al. 1996; Lehr, Weyrich et al. 1997; Taylor, Oudit et al. 1998; Sawada, Kishi et al. 2002).

Chez le fumeur, il semble exister une surexpression de facteurs pro-thrombotiques, une diminution des facteurs anti-thrombotiques et une altération de la fibrinolyse (Inoue, Hayashi et al. 2001; Burns 2003; Suwansaksri, Wiwanitkit et al. 2004). Chez le fumeur, les niveaux de fibrinogène, d'inhibiteur de l'activateur du plasminogène, de thromboxane A2 et du facteur tissulaire sont élevés alors que les niveaux de prostacycline PGI2, de NO, d'activateur du plasminogène et d'inhibiteur du facteur tissulaire sont diminués (Kannel 1987; Kannel, Wolf et al. 1987; Smith, Lee et al. 1997; Newby, Wright et al. 1999; Matetzky, Tani et al. 2000; Barua, Ambrose et al. 2002; Pretorius, Rosenbaum et al. 2002; Sambola, Osende et al. 2003). Ce déséquilibre, accompagné de niveaux élevés d'érythrocytes, d'une viscosité sanguine accrue et de la présence d'une inflammation potentialisent l'effet pro-thrombotique associé au tabagisme (Glantz and Parmley 1991; Powell 1998; Smith, Fischer et al. 2001).

1.2.3.2. Effets hémodynamiques

Les conséquences immédiates de l'inhalation de la fumée de cigarette sont bien connues, incluant à la fois une élévation de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque (Bernaards, Twisk et al. 2003; Moolchan, Hudson et al. 2004). On observe simultanément une réduction de distensibilité et de la compliance artérielle évaluées au niveau de la carotide et de l'artère humérale (Wang, Jin et al. 1992; Kool, Hoeks et al. 1993; Fushimi, Kubo et al. 1998). Ces effets sont surtout importants lors des premières cigarettes de la journée puis s'estompent progressivement. Cette dernière observation, illustrant le processus d'accoutumance,

semble liée aux effets pharmacologiques de la nicotine (Benowitz and Gourlay 1997). Tous ces paramètres, augmentation des résistances vasculaires périphériques, réduction de la compliance artérielle et augmentation de la contractilité myocardique sont à l'origine d'une augmentation de la consommation en oxygène du myocarde favorisant l'ischémie. Ces effets seraient vraisemblablement médiés par la libération de catécholamines (Westfall, Cipolloni et al. 1966; Walker, Collins et al. 1999). Effectivement, il est bien connu que l'inhalation de la fumée de cigarette s'accompagne d'une libération aiguë de catécholamines (noradrénaline surtout) à l'origine de l'augmentation de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque (Cryer, Haymond et al. 1976). Ces effets hémodynamiques résultent donc en majeure partie d'une vasoconstriction périphérique et d'une stimulation cardiaque bêta-adrénergique. La stimulation adrénergique induite par la fumée de cigarette semble également à l'origine des effets arythmogènes du tabac, notamment des troubles du rythme supra-ventriculaire (Peters, Benowitz et al. 1987). Un même mécanisme a été invoqué pour expliquer le risque de mort subite noté chez les patients fumeurs (Escobedo and Zack 1996).

Le NO, un puissant vasodilatateur, pourrait aussi intervenir dans la résistance vasculaire ou vasoconstriction. Effectivement, il a été récemment démontré que l'inhalation de la fumée d'une seule cigarette diminuait significativement la relâche de NO mesurée par les niveaux plasmatiques de nitrites et de nitrates (Tsuchiya, Asada et al. 2002). Les niveaux de nitrites et de nitrates revenaient à la normale une heure après l'exposition à la fumée de cigarette. De plus, de multiples études in vitro et in vivo soutiennent que l'exposition à la fumée de

cigarette inhibe la synthèse et la biodisponibilité du NO (Celermajer, Sorensen et al. 1994; Su, Han et al. 1998; Ito, Tsao et al. 1999; Heitzer, Brockhoff et al. 2000; Barua, Ambrose et al. 2001; Barua, Ambrose et al. 2003). De cette façon, une inhibition de la synthèse et/ou la disponibilité du NO par le tabagisme contribue à la résistance vasculaire.

Le tabac n'est pas seulement un facteur de risque pour l'insuffisance coronaire obstructive mais favorise aussi le spasme coronarien (Caralis, Deligonul et al. 1992). La libération de catécholamines, tel que mentionné précédemment, semble aussi intervenir dans ce processus mais un débalancement du métabolisme des prostaglandines pourrait agir en synergie et causer cet effet spasmatique du tabac très bien démontré au niveau des artères coronariennes. En effet, plusieurs études ont démontré que la nicotine inhibe la production endothéliale de prostacycline PGI₂, puissant vasodilatateur et inhibiteur de l'agrégation plaquettaire, et augmente la synthèse par les plaquettes de la thromboxane A₂, agent vasoconstricteur et agrégant plaquettaire (Barrow, Ward et al. 1989; Wennmalm, Benthin et al. 1993; Roy 1999; Weber, Liesener et al. 2000). Ces modifications du métabolisme des prostaglandines associées à l'effet vasoconstricteur d'origine neuro-hormonale et adrénergique expliquent la possibilité d'un spasme artériel.

1.2.3.2.3.Effet hypoxique

L'effet hypoxique vasculaire du tabagisme est lié à l'augmentation du monoxyde de carbone (CO) couplé à l'hémoglobine qui devient la carboxyhémoglobine. Les niveaux de carboxyhémoglobine sont habituellement compris entre 5 et 10% chez le fumeur, en comparaison à 0,5 à 2% chez le non-fumeur (Istvan and Cunningham 1992; Butnaru, Mircea et al. 2002). Cette liaison de l'oxyde de carbone à l'hémoglobine réduit sa capacité de transport de l'oxygène. Par ailleurs, l'oxyde de carbone augmente l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène ce qui a pour conséquence une réduction de sa capacité à libérer l'oxygène en périphérie et une diminution de l'apport tissulaire en oxygène. Ces derniers effets sont potentiellement à l'origine de la réduction des capacités d'exercice notées chez les patients après inhalation de monoxyde de carbone (Allred, Bleecker et al. 1989; Allred, Bleecker et al. 1989). Chez les patients coronariens fumeurs, le seuil de déclenchement des signes d'ischémie à l'électrocardiogramme est abaissé de 12% en réponse à une augmentation de la carboxyhémoglobine de 0,6 à 3,9%. À l'état chronique, cet effet de réduction du transport d'oxygène par l'hémoglobine est partiellement compensé par l'augmentation de l'érythropoïèse et de la masse des globules rouges (Istvan and Cunningham 1992; Butnaru, Mircea et al. 2002).

1.3. PROBLÉMATIQUE ET HYPOTHÈSE DE TRAVAIL

Les maladies cardiovasculaires athérosclérotiques sont une cause majeure de morbidité et de mortalité dans les pays industrialisés (Ross 1995; Ross 1999). L'obstruction d'une artère par la plaque athérosclérotique entraîne une diminution de la perfusion tissulaire, créant ainsi une condition d'ischémie. En réponse à l'ischémie, l'organisme s'adapte en développant un nouveau réseau vasculaire afin d'irriguer le tissu en nutriments et en oxygène et ainsi maintenir son intégrité (Folkman and Shing 1992). Chez l'adulte, cette néovascularisation survient par angiogenèse, vasculogenèse et artériogenèse. Elle est contrôlée par plusieurs facteurs angiogéniques capables de stimuler la prolifération et la différenciation des cellules endothéliales ou des cellules endothéliales progénitrices en réponse à divers stimuli dont l'hypoxie. Cependant la réponse à l'ischémie est souvent insuffisante, ce qui entraîne une ischémie résiduelle et favorise la survenue de différents symptômes dont l'angine de poitrine et la claudication intermittente. Les patients atteints d'une cardiopathie ischémique ou d'une ischémie des membres inférieurs présentent des variations considérables quant à leur possibilité de développer une néovascularisation. Les facteurs responsables de ces variations sont mal compris. Cependant, il a récemment été proposé que les différents facteurs de risque associés à la maladie athérosclérotique puissent aussi amenuiser la néovascularisation en réponse à l'ischémie. Par exemple, une étude indique que l'hypercholestérolémie inhibe le développement de vaisseaux collatéraux suite à l'ischémie chez le lapin (Van Belle, Rivard et al. 1997). De plus, Rivard et coll. ont rapporté *in vivo* que le vieillissement ou la présence de diabète étaient associés à une réduction de la

réponse angiogénique à l'ischémie (Rivard, Fabre et al. 1999; Rivard, Silver et al. 1999). Dans ces études, l'administration exogène de VEGF était associée à une amélioration très significative de la réponse angiogénique. Finalement, l'hypertension artérielle est aussi associée à une inhibition de l'angiogenèse en réponse à l'ischémie (Emanueli, Salis et al. 2001). Le tabagisme représente un autre important facteur de risque cardiovasculaire. Son rôle sur la néovascularisation dans les maladies cardiovasculaires ischémiques est mal connu. Cependant, plusieurs données nous suggèrent que le tabagisme pourrait avoir une influence sur la formation de nouveaux vaisseaux en réponse à l'ischémie. En effet, plusieurs études épidémiologiques et toxicologiques indiquent que l'inhalation de la fumée de cigarette altère une multitude de fonctions biologiques, incluant la fonction des cellules endothéliales (Reinders, Brinkman et al. 1986; Noronha-Dutra, Epperlein et al. 1993; Shen, Rattan et al. 1996; Rajj, DeMaster et al. 2001). La dysfonction endothéliale observée chez les fumeurs résulterait principalement d'une diminution de la relâche de NO. Outre son influence sur la fonction endothéliale, le tabagisme semble affecter l'angiogenèse. En effet, Ma et coll. ont démontré que l'inhalation de la fumée de cigarette retardait la guérison des ulcères gastriques en diminuant la prolifération cellulaire et l'angiogenèse (Ma, Chow et al. 1999). De plus, chez les femmes enceintes fumeuses, Blake et coll. ont noté que les niveaux plasmatiques de VEGF étaient moindre que chez les femmes enceintes non-fumeuses. Widschwendter et coll. ont suggéré que l'inhibition de ce facteur angiogénique pourrait être responsable de la diminution de l'angiogenèse et de malformations embryonnaires signalées chez la mère fumeuse (Widschwendter, Hermann et al.

1999; Blake, Gurrin et al. 2000). Ensuite, Volm et coll. ont démontré que les tumeurs pulmonaires de fumeurs étaient nettement plus résistantes à la chimiothérapie, avaient un nombre réduit de vaisseaux sanguins et exprimaient peu le VEGF en comparaison aux tumeurs pulmonaires de non-fumeurs (Volm, Koomagi et al. 1999). Cependant, le tabagisme semble aussi promouvoir l'angiogénèse dans certaines situations. À cet égard, plusieurs publications supportent une augmentation de la prolifération des cellules tumorales, une augmentation de la densité capillaire dans certaines tumeurs et une production accrue de VEGF (Ye YN Wu WK et al. 2005; Liu ES, Shin VY et al. 2005 et 2004). Cette dualité concernant le rôle du tabagisme dans le développement de nouveaux vaisseaux sanguins serait vraisemblablement expliquée par le types cellulaires et le modèle expérimental utilisés. Cependant, à ce jour, l'effet du tabagisme sur la néovascularisation en relation avec les maladies cardiovasculaires ischémiques n'a fait l'objet d'aucune étude. L'hypothèse de notre projet de recherche est que l'exposition à la fumée de cigarette diminue la génération de nouveaux vaisseaux sanguins en réponse à l'ischémie tissulaire. Afin de tester cette hypothèse, différents objectifs spécifiques sont proposés. 1) Étudier *in vivo* l'effet de l'inhalation de fumée de cigarette sur l'angiogénèse en réponse à l'ischémie tissulaire 2) Investiguer *in vitro* l'effet de la fumée de cigarette sur les étapes de l'angiogénèse: a) migration des cellules endothéliales; b) prolifération des cellules endothéliales; c) formation de tubules; 3) Établir *in vivo* et *in vitro* l'influence de la fumée de cigarette sur l'expression de différents facteurs angiogéniques et l'activation de voies de signalisation impliquées dans la réponse

angiogénique; 4) Déterminer l'influence du tabagisme sur le nombre et la fonction des cellules endothéliales progénitrices chez l'humain.

2.MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS

2.1 Inhibition of Hypoxia-Induced Angiogenesis by Cigarette Smoke Exposure: Impairment of the HIF-1alpha/VEGF Pathway

Sophie-Élise Michaud, Catherine Ménard, Louis-Georges Guy, Giuseppa Gennaro, and Alain Rivard. FASEB J. 2003 Jun;17(9):1150-2.

From the Department of Cardiovascular Research

Centre Hospitalier de l'Université de Montréal

Montréal, Québec

Canada

Address for correspondence:

Alain Rivard, MD
Centre Hospitalier de l'Université de Montréal
1560 Sherbrooke Est
Suite Y-3605
Montreal, Que, H2L 4M1
Tel (514) 890-8000 ext: 25776
Fax (514) 412-7611 [REDACTED]

ABSTRACT

Smoking is a major risk factor for atherosclerotic diseases. However, the impact of cigarette smoke exposure on neovascularization that develops in response to tissue ischemia is unknown. Here we demonstrate that cigarette smoke extracts inhibit hypoxia-induced in vitro angiogenesis (matrigel assay) in human umbilical vascular endothelial cells. In vivo, mice exposed to cigarette smoke (MES) were shown to have a significant impairment of angiogenesis following surgically-induced hindlimb ischemia. The reduced angiogenic response in MES was documented by Laser Doppler flow perfusion studies and capillary density analyses in ischemic hindlimbs. Inhibition of angiogenesis by cigarette smoke in vitro and in vivo was associated with a reduced expression of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in hypoxic conditions. Administration of an adenoviral vector encoding for HIF-1 α /VP16, a hybrid transcription factor that is stable in hypoxic and normoxic conditions, restored VEGF expression and completely reversed the cigarette smoke inhibition of angiogenesis in hypoxic conditions. Taken together, these results suggest that cigarette smoke exposure impairs angiogenesis by inhibiting VEGF through decreased expression of HIF-1 α in hypoxic conditions.

Key words: Neovascularization, Smoking, Ischemia.

INTRODUCTION

In developed countries, cigarette smoking is the leading modifiable risk factor associated with premature death (1). Smokers die on average 8 years earlier than non-smokers, and this increased mortality is mainly attributed to the promoting effect of cigarette smoke exposure on the incidence of ischemic vascular diseases (2). Although the association between smoking and atherosclerosis is well established, the precise mechanisms involved are not completely understood. Cigarette smoke exposure has previously been shown to have a negative effect on endothelial function, lipid profile and haemostatic factors (1). However, the effects of smoking on compensatory mechanisms such as angiogenesis in the setting of severe vascular obstructions and tissue ischemia are currently unknown.

Angiogenesis is responsible for the development of the circulatory system in the embryo, and is also involved in many postnatal physiological and pathological processes (3). In the setting of severe ischemic vascular diseases, reactive angiogenesis is thought to represent a protective defense mechanism against tissue ischemia (4). This process is modulated by the microenvironment and by different growth factors. Vascular endothelial growth factor (VEGF), which acts specifically on endothelial cells via its receptors (VEGFR1 or Flt-1, and VEGFR2 or Flk-1/KDR), has a critical role in the induction of angiogenesis (5). The expression of VEGF is regulated by different mechanisms, among which hypoxia plays a major role. Hypoxic transcriptional regulation of VEGF expression in the 5'-promoter region is conferred by a sequence that is known as the hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) binding site (6). HIF-1 is a

heterodimeric (HIF-1 α and HIF-1 β) basic helix-loop-helix (bHLH)-Per-ARNT-Sim (PAS) protein rapidly degraded under normoxic conditions. Under hypoxic conditions, HIF-1 α is stabilized and can bind to VEGF promoter to enhance transcription (7). Cotransfection of reporter genes containing VEGF sequences with expression vectors encoding HIF-1 α leads to higher transcription of the reporter genes in normoxic or hypoxic cells compared to cells transfected with the reporter gene alone (8). Furthermore, gene-targeting experiments demonstrated that HIF-1 α deficiency is associated with a complete loss of VEGF gene induction under hypoxic conditions, marked reduction in vascularization of embryos and early lethality (9). Therefore, the induction of HIF-1 α and VEGF appears to be essential for the development of reactive angiogenesis in hypoxic conditions such as those encountered in ischemic vascular diseases.

In this study, we investigated the effect of cigarette smoking on the development of angiogenesis in response to hypoxia. Our results demonstrate that cigarette smoke exposure inhibits hypoxia-induced angiogenesis, both in vitro and in vivo. Inhibition of the angiogenic response following cigarette smoke exposure is associated with a reduced expression of HIF-1 α and VEGF in hypoxic conditions. Finally, we show that the cigarette smoke inhibition of VEGF expression and angiogenesis in hypoxic conditions can be completely reversed by an adenoviral vector encoding for a stable form of HIF-1 α . Our study shows for the first time that cigarette smoke exposure impairs angiogenesis by inhibiting VEGF through decreased expression of HIF-1 α in hypoxic conditions.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

HUVECs were purchased from Clonetics (Walkerville, MA) and cultured in EBM complete medium (Clonetics) supplemented with 10% fetal bovine serum, bovine brain extracts, hydrocortisone, human epidermal growth factor, gentamicin sulfate and amphotericin-B. Cells were grown at 37°C and 5% CO₂, and the medium was changed every 2 days. Cells were passaged when they reached 80% confluence. Passages 2-4 were used for all experiments.

Preparation of cigarette smoke extracts (CSE)

CSE was prepared by a modification of the method described by Carp and Janoff (10). Briefly, two cigarettes were combusted with a modified syringe-driven apparatus. The smoke was bubbled through 50 ml of EBM. The resulting suspension was adjusted to pH 7.4 with concentrated NaOH and then filtered through a 0.20- μ m pore filter (Millipore Corporation, Bedford, MA) to remove bacteria and large particles. CSE was applied to HUVECs in culture within 30 minutes of preparation to obtain a final concentration of 10%. This concentration was chosen based on previous reports showing physiological responses at this level (10-12). In preliminary experiments, HUVECs exposed to 10% CSE showed no sign of toxicity (trypan blue exclusion) and no apoptosis was detected (TUNEL).

Capillary-like tube formation on Matrigel and Cell Migration Assay

HUVECs in growth factor and serum deprived EBM were plated (5000 cells per well) in 96-well plates that had been precoated with 60 μ l of growth factor reduced Matrigel Matrix (Becton Dickinson Labware, Bedford, MA). To determine the effect of hypoxia and CSE on angiogenesis, cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere of normoxic conditions (5% CO₂, 21% O₂, and 74% N₂), or hypoxic conditions (5% CO₂, 1% O₂, and 94% N₂) in presence or absence of 10% CSE for 6h, 12h and 24h. Tube formation was quantified by counting the number of branches in each well under 200 X magnification. A branch was defined as a straight cellular segment connecting two cell masses (nodes) (13).

Cell migration was assessed using a modified Boyden chamber assay as previously described (14). HUVECs (25 000) were allowed to migrate from the upper to the lower chamber for 8 h at 37 °C in normoxic or hypoxic conditions and in the presence or absence of 10% CSE. The number of cells that had migrated was counted in three different representative high power (200X) fields per insert. The data are presented as number of cells migrating \pm standard error of the mean.

Western blot analysis of VEGF, HIF-1 α and VP-16 protein expression

Serum-starved HUVECs were cultured for 6h at 37°C in normoxic or hypoxic conditions in the absence or presence of 10% CSE. After treatments, HUVECs were washed with PBS and lysed in a lysis buffer containing 62.5 mM ethylenediaminetetraacetic acid; 50 mM Tris-HCL, pH 8.0; 0.4% deoxycholic acid; 1% Nonidet P-40; 0.5 μ g/ml leupeptine; 0.5 μ g/ml pepstatin; 0.5 μ g/ml aprotinin; 0.2mM phenylmethsulfonyl fluoride; 0.05

aminoethyl benzene sulfonyl fluoride; and 0.1 sodium vanate. For in vivo experiments, whole-cell protein extracts were obtained after homogenization of muscles from whole hindlimbs of control mice or MES in the same lysis buffer. A total of 50 μ g of protein per sample was separated in non reducing 10% polyacrylamide gel and electroblotted on nitrocellulose membranes (15). Protein concentrations were measured according to the Bradford method. The membrane was blocked with 5% non-fat dry milk in 0.2% Tween PBS (T-PBS) and then probed with 1:200 VEGF antibody (Santa Cruz Biotechnology) or 1:400 HIF-1 α antibody (Novus Biologicals) or 1:100 VP-16 antibody (Santa Cruz, Biotechnology). Specific protein was detected by chemiluminescent reaction (Amersham) followed by exposure to Kodak XAR-5 film. Protein expression was quantified by high-resolution optical densitometry (Alpha Imager 2000; Packard Instruments). Results are expressed as density values normalized to β -actin.

Electromobility shift assay (EMSA)

EMSA was performed in a buffer containing 10mM Tris-HCl (pH 7.5), 4% glycerol, 1mM MgCl₂, 0.5mM EDTA, 0.5mM dithiothreitol, 50mM NaCl, and 0.05 mg/ml poly(dI-dC)/poly(dI-dC). After 15 min of preincubation on ice, 20 μ g of whole-cell protein extracts were incubated for 30 min with 1 pmol (4×10^4 cpm) of ³²P-labeled double-stranded oligonucleotide probe spanning the VEGF HIF-1 α binding site (5'-TGCATACGTGGGCTCCAACAG-3'; HIF-1 α site is underlined) (8). Unlabeled oligonucleotide was added to the preincubation mixture for competition assay (1,000-fold molar excess). Binding reactions were performed with a final volume of 15 μ l, separated at 4° C in non-denaturing 4% acrylamide gels in 0.5X TBE-running buffer. Each

condition was performed in duplicate. The gel was dried and exposed to Kodak XAR-5 films.

Metabolic labeling, Pulse-chase and Immunoprecipitation.

HUVECs were incubated for 1h with methionine-free medium. Cells were then metabolically labeled with 100 $\mu\text{Ci/ml}$ [S^{35}] methionine for 4h under either 21% O_2 , 1% O_2 or 1% O_2 and 10% CSE and chase for 1/2h, 1h and 2h with complete EGM. Immunoprecipitation of HIF-1 α in cell lysates was performed using the specific anti-HIF-1 α (Novus Biologicals) antibody followed by incubation with anti-mouse IgG antiserum (Amersham). The immunocomplexes were collected on protein A/G PLUS-agarose beads (Santa Cruz Biotechnology) and subjected to 8% SDS-PAGE. After autoradiography the intensity of the bands was quantified by densitometry using an image analysis scanning system (Alpha Imager 2000; Packard Instruments).

Adenovirus vector construction

HIF-1 α /VP16 fusion protein is shown in [Fig.1](#). Ad.HIF-1 α /VP16 was constructed by ligating the 5' part of the human HIF-1 α gene (*Bam*HI-*A*fIII fragment from hHIF-1 α /pcDNA3 plasmid, kindly provided by SL McKnight) (16) in frame with herpes virus VP16 transactivation domain (*B*gIII-*E*coRI fragment blunt ended from pVP16 plasmid, ClonTech). The fusion gene (*B*amHI-*X*baI fragment) was inserted into pShuttle-CMV plasmid (QBiogen) and Ad.HIF-1 α /VP16 was created using the Ad.Easy technology. Integrity of all constructs was confirmed by sequencing. Ad5.Null was purchased from QBiogen.

Adenoviral vector infection

HUVECs (1×10^6 cells par 100 mm dish, 70% confluency) were infected with the Ad.HIF-1 α /VP16 and the Ad5.Null vectors at a multiplicity of infection of 300. After infection, cells were incubated for 48h at 37°C/5% CO₂ to allow gene and protein expression. 48h after the infection, HUVECs were trypsinized and cultured for 6h in normoxic or hypoxic conditions and in the presence or absence of 10% CSE.

Murine ischemic hindlimb model

The protocol was approved by the Comité Institutionnel de Protection des Animaux (CIPA) of Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM).

Unilateral hindlimb ischemia was created in C57Bl/6mice as previously described (17). The animals were anesthetized with Ketamine-Midazolam solution (100 mg/kg-5mg/kg, intraperitoneally), after which an incision was performed in the skin overlying the middle portion of the left hindlimb. After ligation of the proximal end of the femoral artery, the distal portion of the saphenous artery was ligated, and the artery and all side branches were dissected free and excised. The skin was closed with a surgical stapler.

Smoke exposure

C57BL/6 female mice 8 weeks of age were maintained on *ad libitum* chow and water. Fourteen days prior to surgery, mice were started on cigarette exposure (1 cigarette, twice a day) via a smoking machine previously described (18). All exposures were 10 puffs/cigarette with puff time set at 60s. Total smoking time for 1 cigarette was 10 min (20 min/day). Commercial cigarettes (Player's Plain, tar: 17mg, nicotine: 1.5mg, carbon

monoxide: 12mg) were used. Smoke exposure was withheld the day of the surgery, restarted the following day at 2 cigarettes/day, and maintained at this level for the duration of the study. This exposure was associated with carboxyhemoglobin blood levels that are similar to those of chronic smokers (8-14%) (18). The mice appeared normal during the entire experimental period. Control mice were restrained in the smoking machine for the same period of time but were not exposed to cigarette smoke.

Monitoring of hindlimb blood flow

Hindlimb perfusion was measured with a laser Doppler perfusion imager (LDPI) system (Moor Instruments Ltd). After anesthesia, consecutive measurements were obtained after scanning of the same region of interest (leg and foot) with the LDPI (17). The perfusion signal was split into 6 different intervals, each displayed in a separate colour. Low and/or no perfusion was displayed in dark blue, whereas the highest perfusion interval was displayed in red. Color photographs were recorded and analyses performed by calculating the average perfusion of the ischemic and nonischemic hindlimb. To account for variables such as ambient light and temperature, the results are expressed as the ratio of perfusion in the left (ischemic) versus right (normal) hindlimb.

Tissue preparation

The mice were killed at predetermined arbitrary time points after surgery with an overdose of sodium pentobarbital. For immunohistochemistry, whole ischemic and nonischemic hindlimbs were immediately fixed in methanol overnight. After bones had been carefully removed, 3- μ m-thick tissue transverse sections of the hindlimbs were cut

and paraffin-embedded so that the whole leg, including all muscle groups, could be analyzed on each section as previously described (17). For total protein extraction, isolated muscles from whole hindlimbs were rinsed in PBS to remove excess blood, snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until use. Whole-cell protein extracts were obtained after homogenization of ischemic muscles.

Immunohistochemistry and capillary density analysis

Histological sections prepared from paraffin-embedded transverse-cut tissue samples of whole legs were used for immunohistochemical analysis. Identification of endothelial cell was performed by immunohistochemical staining for platelet endothelial cells adhesion molecule-1 (PECAM-1 or CD31) with a rat monoclonal antibody directed against mouse CD31 (Pharmigen). Capillaries, identified by positive staining of CD31 and appropriate morphology, were counted by single observer blinded to the treatment regimen under a 20 X objective and a 5X lens to determine the capillary density (mean number of capillaries per square millimetre) (19). The entire leg from each animal was examined. Serial sections were cut at two different levels and a total of 90 representative fields were analyzed by counting the number of capillaries in each field.

Adenoviral vector injection

Local infection with Ad.HIF-1 α /VP16 or Ad5.Null was performed by four direct injections into the thigh muscles of the ischemic hindlimb at the time of surgery. The dose chosen (3.6×10^8 pfu) was based on previous reports using the same animal model (20, 21).

Statistical analysis

All results are expressed as mean \pm SEM. Statistical significance was evaluated by one-way ANOVA. Newman-Keuls multiple comparison test was performed to identify which group differences accounted for the significant overall ANOVA. A value of $p < 0.05$ was interpreted to denote statistical significance.

RESULTS

Cigarette smoke exposure inhibits hypoxia-induced angiogenesis

We investigated the effect of cigarette smoke exposure on angiogenesis in vitro and in vivo. As determined using the Matrigel assay, hypoxia significantly increased capillary-like tube formation in HUVECs. However, the induction of in vitro angiogenesis by hypoxia was almost completely abolished when HUVECs were exposed to CSE ([Fig. 2A](#) and [Table 1](#)). This was associated with a significant inhibition of hypoxia-induced cellular migration, as assessed by the Boyden chamber migration assay ([Fig. 2B](#)). In vivo, blood flow perfusion in surgically-induced ischemic hindlimbs was impaired in mice exposed to cigarette smoke (MES) compared to control mice ([Fig. 2C](#)). At day 21 after surgery, the Doppler flow ratio was significantly reduced in MES compared to controls (0.60 ± 0.03 vs. 0.78 ± 0.02 , $p < 0.05$) and this difference was still present at day 28 after surgery (0.62 ± 0.03 vs. 0.80 ± 0.03 , $p < 0.05$). Capillary density was assessed by CD31 immunostaining in ischemic muscles at 28 days after surgery, and was significantly reduced in MES compared to controls (477 ± 34 vs. 681 ± 54 , $p < 0.01$) ([Fig. 2D](#)).

Cigarette smoke exposure inhibits VEGF and HIF-1 α protein expression in hypoxic conditions

In order to identify potential mechanisms involved in the impairment of neovessel formation by cigarette smoke exposure, the protein expression of VEGF and HIF-1 α was determined in HUVECs and skeletal muscles under normoxic or hypoxic conditions and in the presence or absence of cigarette smoke. The influence of these factors on HIF-1 DNA binding activity was determined by EMSA. The expression of VEGF and HIF-1 α

in HUVECs is low under normoxic conditions and is not influenced by the presence of CSE (Fig.3A). Both VEGF and HIF-1 α are significantly induced after 6 hours of hypoxia. However, the induction of VEGF and HIF-1 α by hypoxia is significantly impaired in the presence of CSE (Fig. 3A, $p<0.05$). EMSA studies demonstrate that the induction of HIF-1 DNA binding activity by hypoxia in HUVECs is also significantly reduced by CSE (Fig. 3A, lower panel). In vivo, a similar response was also observed (Fig. 3B). The expression of VEGF and HIF-1 α in the hindlimb muscles of control mice is very low. In ischemic hindlimbs, VEGF and HIF-1 α are markedly induced from day 3 to 14 after surgery. However, the expression of these proteins in ischemic muscles is significantly reduced in MES vs. controls ($p<0.01$). In addition, the induction of HIF-1 DNA binding activity in ischemic muscles is also significantly compromised in MES (Fig. 3B, lower panel). Globally, these findings suggest that cigarette smoke exposure interferes with the stabilization of HIF-1 α by hypoxia. This hypothesis was confirmed in pulse-chase experiments, which showed reduced HIF-1 α protein half-life when HUVECs in hypoxic conditions are exposed to CSE (Fig. 3C).

HIF-1 α /VP16 gene transfer completely reverses the cigarette smoke inhibition of VEGF expression and angiogenesis in hypoxic conditions

We used an adenoviral vector encoding for HIF-1 α /VP16 (Fig. 1), a hybrid transcription factor that is stable in normoxic and hypoxic conditions, to rescue cigarette smoke related impairment of VEGF expression and angiogenesis in vitro and in vivo. HUVECs infected with this adenoviral vector show high levels of HIF-1 α /VP16 protein expression that are not influenced by oxygen concentration or CSE exposure (Fig. 3D). This leads to high

levels of VEGF expression, even under normoxic conditions or in hypoxic HUVECs exposed to CSE (Fig. 3D). VEGF protein up-regulation by Ad.HIF-1 α /VP16 in HUVECs increases capillary-like tubules formation under normoxic conditions and rescues the CSE inhibition of in vitro angiogenesis under hypoxic conditions (Table 1). In vivo, MES injected intramuscularly with Ad.HIF-1 α /VP16 at the time of surgery show maximal expression of the hybrid transcription factor at day 3 and demonstrate increased VEGF expression in ischemic muscles when compared to MES injected with Ad5.Null (Fig. 3E). This leads to a significant increase in blood flow perfusion (Doppler ratio) in MES treated with Ad.HIF-1 α /VP16 vs. Ad5.Null at day 21 (0.76 ± 0.04 vs. 0.66 ± 0.03 , $p<0.05$) and at day 28 (0.88 ± 0.04 vs. 0.68 ± 0.03 , $p<0.05$) after surgery (Fig. 3F). These results were confirmed at the microvascular level. At 28 days after surgery, the capillary density in the ischemic muscles of MES injected with Ad.HIF-1 α /VP16 was significantly increased compared with MES that received the Ad5.Null vector (695 ± 109 vs. 413 ± 76 capillaries/mm², $p<0.01$) (Fig. 3G).

DISCUSSION

Hypoxia is a major factor involved in tissue injury following vascular insufficiency and ischemia. On the other hand, hypoxia also triggers compensatory mechanisms that are important for tissue protection, such as angiogenesis. In the setting of severe vascular obstructions with reduced blood flow, the angiogenic response is seen as an attempt by the organism at improving perfusion and preserving tissue integrity. In fact, the possibility of increasing the "natural" angiogenic response in order to improve tissue perfusion has been tested in different animal models and in recent clinical trials (4). Here we demonstrated that smoking, a major risk factor for atherosclerotic diseases, also impairs the protective angiogenic response in the setting of vascular insufficiency and hypoxia.

Previous studies have shown that cigarette smoke exposure impairs endothelium-dependent vasorelaxation and inhibits endothelial cell migration in vitro (22, 23). Our experiments extend these findings by demonstrating that HUVECs exposed to CSE also lose their ability to organize in a capillary-like tubule network in response to hypoxia. In vivo, we used a well-described model of hindlimb ischemia (17) to investigate the effect of cigarette smoke exposure on angiogenesis. We found that smoking significantly impairs blood flow recuperation (Laser-Doppler imaging) after surgically-induced ischemia. At the microvascular level, smoking was associated with an important reduction of capillary density in ischemic muscles. Therefore, our study is the first one to document the negative effect of smoking on post-natal angiogenesis in the context of ischemic vascular diseases.

Angiogenesis is a complex process that includes activation, migration and proliferation of endothelial cells (24). VEGF, an endothelial cell specific mitogen, has been shown to be a critical factor for the induction of angiogenesis (5). In the setting of vascular ischemia, the angiogenic response is dependent on the stabilization of HIF-1 α by hypoxia and the subsequent transcriptional activation of VEGF by HIF-1 (7). Here we showed that cigarette smoke exposure significantly reduces the expression of VEGF in HUVECs under hypoxic conditions and in ischemic muscles. Cigarette smoke exposure was also associated with a reduction in HIF-1 α expression, DNA-binding activity, and protein half-life under hypoxic conditions. To compensate for the defect in HIF-1 α expression associated with cigarette smoke exposure, we used an adenoviral vector encoding for HIF-1 α /VP16, a hybrid transcription factor that is stable both in normoxic and hypoxic conditions. We found that this vector could completely rescue the cigarette smoke related impairment of VEGF expression under hypoxic conditions, both in vitro and in vivo. Moreover, smoking-induced defect in angiogenesis following hypoxia was completely reversed in HUVECs and in ischemic muscles treated with the HIF-1 α /VP16 vector.

Globally, our findings suggest that cigarette smoke exposure interferes with the stabilization of HIF-1 α by hypoxia, which reduces HIF-1 α accumulation and impairs VEGF activation under hypoxic conditions. In normoxic conditions, HIF-1 α is a cytosolic protein rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome pathway. This degradation is mediated by the oxygen-dependent degradation domain (ODD, residues 401-603) (25). In hypoxic conditions the degradation of HIF-1 α is inhibited, potentially

via the activation of different kinases and/or redox-induced changes (25-27). Whether these mechanisms are compromised by cigarette smoke exposure remains to be determined.

The exact components of cigarette smoke that are responsible for the impairment of angiogenesis are unknown. Cigarette smoke is composed of nearly 4000 different chemicals, many of them (carbon monoxide, cadmium, hydrocarbons, acetaldehyde, etc.) being toxic to endothelial cells and detrimental to health (28). Interestingly, carbon monoxide has been shown to destabilize HIF-1 α and suppress the activation of target genes (29). This could contribute to explain the findings of the present study. Nicotine, on the other hand, was shown to promote angiogenesis in different models in vitro and in vivo (30). Nevertheless, our experiments suggest that the cumulative effect of the different components of cigarette smoke has a negative impact on angiogenesis. This is consistent with a previous study that reported reduced capillary density in squamous cell carcinomas of smokers compared to non-smokers (31). Moreover, recent studies have suggested that cigarette smoke exposure could inhibit angiogenesis in healing gastric ulcers, female reproductive organs and in chick chorioallantoic membranes (32-35).

Although the HIF-1 α /VEGF pathway is an essential component of the response to hypoxia, other factors might also be involved in the cigarette smoke inhibition of angiogenesis. For example, smoking has been shown to reduce the bioavailability of NO (22, 36, 37), an important factor for efficient angiogenesis (38, 39). Although this might constitute a separate pathway by which cigarette smoke impairs angiogenesis, NO

production has also been shown to be involved in the angiogenic properties of VEGF (40, 41). Whether NO supplementation (or other strategies to improve endothelial dysfunction) can rescue the cigarette smoke impairment of angiogenesis is currently unknown.

It is also important to realize that impaired angiogenesis might not be the only mechanism by which smoking reduces neovascularization in the setting of vascular ischemia. For instance, it has been shown that circulating endothelial progenitor cells (EPCs) originating from the bone marrow can differentiate into mature endothelial cells in areas of vascular remodeling and promote neovascularization (postnatal vasculogenesis) (42). Recently, it was found that smokers have significantly reduced levels of EPCs compared to non-smokers (43). Therefore, defective vasculogenesis could constitute another mechanism by which smoking impairs neovascularization.

In summary, our study demonstrates for the first time that smoking has a detrimental effect on the protective angiogenic response in the setting of vascular insufficiency and hypoxia. We propose that cigarette smoke exposure impairs angiogenesis by inhibiting VEGF through decreased expression of HIF-1 α in hypoxic conditions. We also show that the cigarette smoke inhibition of angiogenesis can be completely reversed by the administration of an adenoviral vector encoding for a stable form of HIF-1 α . These findings could have important clinical implications for patients with severe ischemic vascular diseases that are exposed to cigarette smoke. Moreover, the elucidation of specific mechanisms that negatively modulate angiogenesis could lead to the



development of novel therapeutic strategies to protect against hypoxia and maintain tissue integrity.



Legends

Figure 1. Schematic of HIF-1 α /VP16 hybrid. Top, Full-length HIF-1 α protein. bHLH(striped box) and PAS (gray box) domains are in amino-terminal half of protein and transactivation domains (black boxes) are in carboxyl-terminus. Bottom, HIF-1 α /VP16 hybrid protein. HIF-1 α portion (aa 1 to 390) contains bHLH and PAS domains responsible for DNA binding and dimerization with HIF-1 β (ARNT). Transactivation and hypoxic stability domains are replaced with transactivation domain from herpes virus VP16 (aa 413 to 490).

Figure 2. **A)** Inhibition of hypoxia-induced angiogenesis by smoke exposure in vitro. HUVECs formed capillary-like structures when cultured for 24h on growth factor-reduced Matrigel, in the absence of serum or exogenous growth factors, under normoxia. Formation of capillary structures was further increased by hypoxia but inhibited by 10% cigarette-smoke extract (CSE). One representative experiment of three is shown. **B)** Inhibition of hypoxia-induced migration of HUVECs by CSE (modified Boyden chamber). Cells that had migrated were counted in three representative fields. Assays were conducted in triplicate and repeated three times. Data are presented as the mean \pm SE ** $p < 0.001$. **C,D)** Inhibition of ischemia-induced angiogenesis by smoking in vivo. Angiogenesis was evaluated in a murine ischemic hindlimb model. **C)** Representative results of laser Doppler measurements recorded at serial time points after surgery in control mice (n=15) and MES (n=16, left panel). A colour scale illustrates blood flow variations from minimal (dark blue) to maximal (red) values. NI indicates nonischemic (right) limb; T, tail; and I, ischemic (left) limb. The right panel represents laser Doppler

perfusion ratio over time after surgery in control mice and MES. Data are presented as the mean \pm SE * $p < 0.05$ vs. control mice. **D)** CD31 immunostaining of ischemic muscles from control mice and MES at time of sacrifice (28 days) showed a significant reduction in the capillary density in MES. Data are presented as the mean \pm SE, * $p < 0.05$ vs. control mice.

Figure 3. A-C) Smoke exposure inhibits hypoxia-induced protein expression of VEGF and HIF-1 α in vitro and in vivo. **A)** Western blot analysis of VEGF and HIF-1 α (top panel) in HUVECs after 6h under various conditions. VEGF indicates VEGF-specific band (~ 46 kDa). VEGF and HIF-1 α density values were normalized to β -Actin (middle panel). Values are mean \pm SE * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$. Electromobility shift assay (EMSA) of HIF-1 in HUVECs after 6h under various conditions (bottom panel). One representative experiment of four is shown. **B)** Western blot analysis of VEGF and HIF-1 α (top panel) in ischemic muscles harvested at different time points after surgery in MES and control mice. VEGF and HIF-1 α density values normalized to β -Actin (middle panel). Values are mean \pm SE * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$. EMSA of HIF-1 in ischemic muscles harvested at different time points after surgery in MES and control mice (bottom panel). One representative experiment of four is shown. **C)** Pulse-chase metabolic labeling with [S^{35}]methionine in HUVECs shows that CSE decreases HIF-1 α half-life under hypoxic conditions. **D-G)** Ad.HIF-1 α /VP16 restores VEGF expression and reverses the cigarette smoke inhibition of angiogenesis. **D)** Western blot analysis of HIF-1 α /VP16 and VEGF in HUVECs infected with Ad.HIF-1 α /VP16 or Ad5.Null (control) after 6h under the various conditions. **E)** Western blot analysis of HIF-1 α /VP16 and

VEGF in ischemic muscles harvested at different time points in mice locally infected with Ad.HIF-1 α /VP16 or Ad5.Null. **F)** Laser Doppler perfusion ratios over time and capillary density analysis at day 28 after surgery **(G)** in mice locally infected with Ad.HIF-1 α /VP16 (n=6) or Ad5.Null (n=6). Data are presented as the mean \pm SE, * p<0.05 vs. Ad5.Null mice.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grant from the Canadian Institute of Health Research (CIHR) to AR (#57767). Dr Rivard is a scholar from the Fédération de Recherche en Santé du Québec (FRSQ). SE Michaud is a Doctoral research awardee from the Heart and Stroke Foundation of Canada and the Fédération de Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

REFERENCES

1. Villablanca, A. C., McDonald, J. M., and Rutledge, J. C. (2000) Smoking and cardiovascular disease. *Clin Chest Med* 21, 159-172.
2. Doll, R., Peto, R., Wheatley, K., Gray, R., and Sutherland, I. (1994) Mortality in relation to smoking: 40 years' observations on male British doctors. *Bmj* 309, 901-911.
3. Folkman, J., and Shing, Y. (1992) Angiogenesis. *J Biol Chem* 267, 10931-10934.
4. Freedman, S. B., and Isner, J. M. (2001) Therapeutic angiogenesis for ischemic cardiovascular disease. *J Mol Cell Cardiol* 33, 379-393.
5. Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., and Poltorak, Z. (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb J* 13, 9-22.
6. Levy, A. P., Levy, N. S., Wegner, S., and Goldberg, M. A. (1995) Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J Biol Chem* 270, 13333-13340.
7. Jiang, B. H., Rue, E., Wang, G. L., Roe, R., and Semenza, G. L. (1996) Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 271, 17771-17778.
8. Forsythe, J. A., Jiang, B. H., Iyer, N. V., Agani, F., Leung, S. W., Koos, R. D., and Semenza, G. L. (1996) Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 16, 4604-4613.
9. Iyer, N. V., Kotch, L. E., Agani, F., Leung, S. W., Laughner, E., Wenger, R. H., Gassmann, M., Gearhart, J. D., Lawler, A. M., Yu, A. Y., and Semenza, G. L.

- (1998) Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev* 12, 149-162.
10. Janoff, A., and Carp, H. (1977) Possible mechanisms of emphysema in smokers: cigarette smoke condensate suppresses protease inhibition in vitro. *Am Rev Respir Dis* 116, 65-72.
 11. Wang, H., Liu, X., Umino, T., Skold, C. M., Zhu, Y., Kohyama, T., Spurzem, J. R., Romberger, D. J., and Rennard, S. I. (2001) Cigarette smoke inhibits human bronchial epithelial cell repair processes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25, 772-779.
 12. Su, Y., Han, W., Giraldo, C., De Li, Y., and Block, E. R. (1998) Effect of cigarette smoke extract on nitric oxide synthase in pulmonary artery endothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19, 819-825.
 13. Pollman, M. J., Naumovski, L., and Gibbons, G. H. (1999) Endothelial cell apoptosis in capillary network remodeling. *J Cell Physiol* 178, 359-370.
 14. Kim, S., Harris, M., and Varner, J. A. (2000) Regulation of integrin alpha vbeta 3-mediated endothelial cell migration and angiogenesis by integrin alpha5beta1 and protein kinase A. *J Biol Chem* 275, 33920-33928.
 15. Tsurumi, Y., Murohara, T., Krasinski, K., Chen, D., Witzenbichler, B., Kearney, M., Couffinhal, T., and Isner, J. M. (1997) Reciprocal relation between VEGF and NO in the regulation of endothelial integrity. *Nat Med* 3, 879-886.
 16. Tian, H., McKnight, S. L., and Russell, D. W. (1997) Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev* 11, 72-82.

17. Couffinhal, T., Silver, M., Zheng, L. P., Kearney, M., Witzendichler, B., and Isner, J. M. (1998) Mouse model of angiogenesis. *Am J Pathol* 152, 1667-1679.
18. Petrik, P. V., Gelabert, H. A., Moore, W. S., Quinones-Baldrich, W., and Law, M. M. (1995) Cigarette smoking accelerates carotid artery intimal hyperplasia in a dose-dependent manner. *Stroke* 26, 1409-1414.
19. Takeshita, S., Weir, L., Chen, D., Zheng, L. P., Riessen, R., Bauters, C., Symes, J. F., Ferrara, N., and Isner, J. M. (1996) Therapeutic angiogenesis following arterial gene transfer of vascular endothelial growth factor in a rabbit model of hindlimb ischemia. *Biochem Biophys Res Commun* 227, 628-635.
20. Emanuelli, C., Minasi, A., Zacheo, A., Chao, J., Chao, L., Salis, M. B., Straino, S., Tozzi, M. G., Smith, R., Gaspa, L., Bianchini, G., Stillo, F., Capogrossi, M. C., and Madeddu, P. (2001) Local delivery of human tissue kallikrein gene accelerates spontaneous angiogenesis in mouse model of hindlimb ischemia. *Circulation* 103, 125-132.
21. Rivard, A., Silver, M., Chen, D., Kearney, M., Magner, M., Annex, B., Peters, K., and Isner, J. M. (1999) Rescue of diabetes-related impairment of angiogenesis by intramuscular gene therapy with adeno-VEGF. *Am J Pathol* 154, 355-363.
22. Rajj, L., DeMaster, E. G., and Jaimes, E. A. (2001) Cigarette smoke-induced endothelium dysfunction: role of superoxide anion. *J Hypertens* 19, 891-897.
23. Snajdar, R. M., Busuttil, S. J., Averbook, A., and Graham, D. J. (2001) Inhibition of endothelial cell migration by cigarette smoke condensate. *J Surg Res* 96, 10-16.
24. D'Amore, P. A., and Thompson, R. W. (1987) Mechanisms of angiogenesis. *Annu Rev Physiol* 49, 453-464

25. Huang, L. E., Gu, J., Schau, M., and Bunn, H. F. (1998) Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O₂- dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7987-7992.
26. Hur, E., Chang, K. Y., Lee, E., Lee, S. K., and Park, H. (2001) Mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor PD98059 blocks the trans-activation but not the stabilization or DNA binding ability of hypoxia-inducible factor-1alpha. *Mol Pharmacol* 59, 1216-1224.
27. Mazure, N. M., Chen, E. Y., Laderoute, K. R., and Giaccia, A. J. (1997) Induction of vascular endothelial growth factor by hypoxia is modulated by a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in Ha-ras- transformed cells through a hypoxia inducible factor-1 transcriptional element. *Blood* 90, 3322-3331.
28. Powell, J. T. (1998) Vascular damage from smoking: disease mechanisms at the arterial wall. *Vasc Med* 3, 21-28
29. Huang, L. E., Willmore, W. G., Gu, J., Goldberg, M. A., and Bunn, H. F. (1999) Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activation by carbon monoxide and nitric oxide. Implications for oxygen sensing and signaling. *J Biol Chem* 274, 9038-9044.
30. Heeschen, C., Jang, J. J., Weis, M., Pathak, A., Kaji, S., Hu, R. S., Tsao, P. S., Johnson, F. L., and Cooke, J. P. (2001) Nicotine stimulates angiogenesis and promotes tumor growth and atherosclerosis. *Nat Med* 7, 833-839.

31. Volm, M., Koomagi, R., and Mattern, J. (1999) Angiogenesis and cigarette smoking in squamous cell lung carcinomas: an immunohistochemical study of 28 cases. *Anticancer Res* 19, 333-336.
32. Ma, L., Chow, J. Y., Liu, E. S., and Cho, C. H. (1999) Cigarette smoke and its extract delays ulcer healing and reduces nitric oxide synthase activity and angiogenesis in rat stomach. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26, 828-829.
33. Magers, T., Talbot, P., DiCarlantonio, G., Knoll, M., Demers, D., Tsai, I., and Hoodbhoy, T. (1995) Cigarette smoke inhalation affects the reproductive system of female hamsters. *Reprod Toxicol* 9, 513-525.
34. Melkonian, G., Le, C., Zheng, W., Talbot, P., and Martins-Green, M. (2000) Normal patterns of angiogenesis and extracellular matrix deposition in chick chorioallantoic membranes are disrupted by mainstream and sidestream cigarette smoke. *Toxicol Appl Pharmacol* 163, 26-37.
35. Melkonian, G., Cheung, L., Marr, R., Tong, C., and Talbot, P. (2002) Mainstream and sidestream cigarette smoke inhibit growth and angiogenesis in the day 5 chick chorioallantoic membrane. *Toxicol Sci* 68, 237-248.
36. Tsuchiya, M., Asada, A., Kasahara, E., Sato, E. F., Shindo, M., and Inoue, M. (2002) Smoking a single cigarette rapidly reduces combined concentrations of nitrate and nitrite and concentrations of antioxidants in plasma. *Circulation* 105, 1155-1157.
37. Heitzer, T., Yla-Herttuala, S., Luoma, J., Kurz, S., Munzel, T., Just, H., Olschewski, M., and Drexler, H. (1996) Cigarette smoking potentiates endothelial

- dysfunction of forearm resistance vessels in patients with hypercholesterolemia. Role of oxidized LDL. *Circulation* 93, 1346-1353.
38. Smith, R. S., Jr., Lin, K. F., Agata, J., Chao, L., and Chao, J. (2002) Human endothelial nitric oxide synthase gene delivery promotes angiogenesis in a rat model of hindlimb ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22, 1279-1285.
 39. Ziche, M., Morbidelli, L., Masini, E., Amerini, S., Granger, H. J., Maggi, C. A., Geppetti, P., and Ledda, F. (1994) Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. *J Clin Invest* 94, 2036-2044.
 40. Papapetropoulos, A., Garcia-Cardena, G., Madri, J. A., and Sessa, W. C. (1997) Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest* 100, 3131-3139.
 41. Fukumura, D., Gohongi, T., Kadambi, A., Izumi, Y., Ang, J., Yun, C. O., Buerk, D. G., Huang, P. L., and Jain, R. K. (2001) Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2604-2609.
 42. Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., Witzenbichler, B., Schatteman, G., and Isner, J. M. (1997) Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275, 964-967.
 43. Vasa, M., Fichtlscherer, S., Aicher, A., Adler, K., Urbich, C., Martin, H., Zeiher, A. M., and Dimmeler, S. (2001) Number and migratory activity of circulating

endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 89, E1-7.

Table 1

The effect of hypoxia and cigarette smoke extract (CSE) on in vitro angiogenesis (reflected by tube formation) in HUVECs infected or not with the Ad.HIF-1 α /VP16 or with the Ad5.-Null.

Treatments ^a	Tube formation (branches per well) ^b		
	6h	12h	24h
Control HUVECs			
Normoxia	24.0 \pm 2.9	43.3 \pm 0.9	61.0 \pm 2.1
Hypoxia	39.0 \pm 3.8	111.3 \pm 1.5 ^c	163.3 \pm 6.0 ^c
Hypoxia with 10% CSE	21.7 \pm 2.0	51.3 \pm 2.6 ^d	73.0 \pm 4.9 ^d
Ad.HIF-1α/VP16 infected HUVECs			
Normoxia	31.7 \pm 4.3	100.0 \pm 4.6	137.7 \pm 7.2
Hypoxia	38.0 \pm 2.3	99.3 \pm 5.8	152.3 \pm 5.8
Hypoxia with 10% CSE	41.0 \pm 3.5	106.7 \pm 7.7 ^e	145.0 \pm 7.5 ^e
Ad5.-Null infected HUVECs			
Normoxia	18.0 \pm 2.3	37.3 \pm 3.2	51.7 \pm 3.2
Hypoxia	36.3 \pm 2.6	99.0 \pm 6.1	148.0 \pm 6.4
Hypoxia with 10% CSE	16.3 \pm 1.5	43.7 \pm 2.3	43.0 \pm 2.7

^a HUVECs infected or not were serum starved for 24h and plated in 96-well plates on growth factor reduced Matrigel Matrix in serum deprived EBM in presence or absence of 10% CSE and cultured under normoxia or hypoxia as described in material and methods.

^b Tube (branch) formation was determined by counting the number of branches in each well under 200 X magnification. A branch was defined as a straight cellular segment connecting two cell masses (nodes). Data are means \pm SE of three experiments.

^c $P < 0.001$ vs. Control HUVECs in normoxic conditions.

^d $P < 0.001$ vs. Control HUVECs in hypoxic conditions.

^e $P < 0.001$ vs. Control or Ad5.-Null infected HUVECs in hypoxic conditions with 10% CSE.

Fig. 1

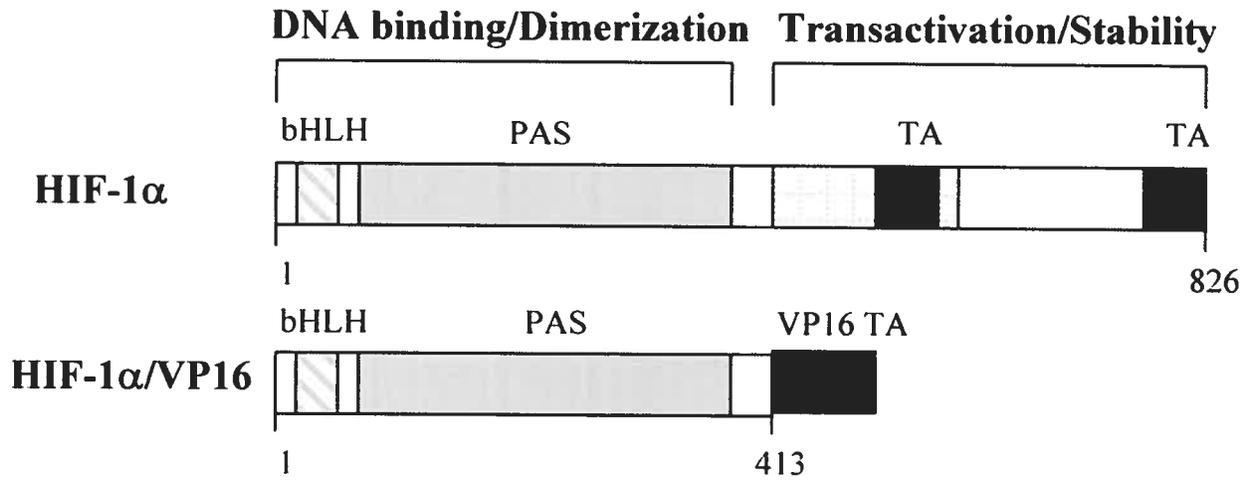


Figure 1. Schematic of HIF-1 α VP16 hybrid. Top, Full-length HIF-1 α protein. bHLH (striped box) and PAS (gray box) domains are in amino-terminal half of protein and transactivation domains (black boxes) are in carboxyl-terminus. Bottom, HIF-1 α /VP16 hybrid protein. HIF-1 α portion (aa 1 to 390) contains bHLH and PAS domains responsible for DNA binding and dimerization with HIF-1 β (ARNT). Transactivation and hypoxic stability domains are replaced with transactivation domain from herpes virus VP16 (aa 413 to 490).

Fig. 2

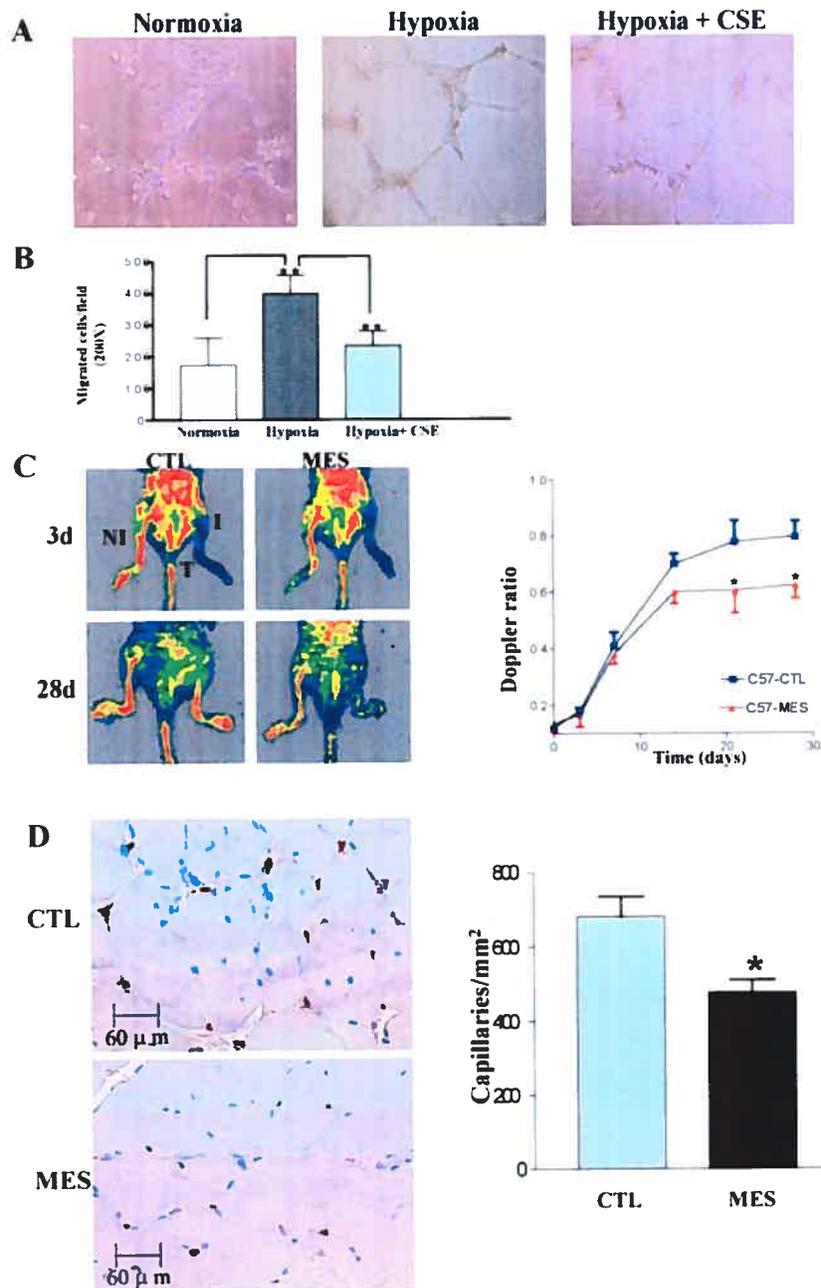


Figure 2. A) Inhibition of hypoxia-induced angiogenesis by smoke exposure *in vitro*. HUVECs formed capillary-like structures when cultured for 24 h on growth factor-reduced Matrigel, in the absence of serum or exogenous growth factors, under normoxia. Formation of capillary structures was increased further by hypoxia but inhibited by 10% cigarette-smoke extract (CSE). One representative experiment of three is shown. B) Inhibition of hypoxia-induced migration of HUVECs by CSE (modified Boyden chamber). Cells that had migrated were counted in three representative fields. Assays were conducted in triplicate and repeated three times. Data are presented as the mean \pm SEM ** $P < 0.001$. C, D) Inhibition of ischemia-induced angiogenesis by smoking *in vivo*. Angiogenesis was evaluated in a murine ischemic hindlimb model. C) Representative results of laser Doppler measurements recorded at serial time points after surgery in control mice ($n=15$) and MES ($n=16$, left panel). A color scale illustrates blood flow variations from minimal (dark blue) to maximal (red) values. NI indicates nonischemic (right) limb; T, tail; and I, ischemic (left) limb. The right panel represents laser Doppler perfusion ratio over time after surgery in control mice and MES. Data are presented as the mean \pm SE * $P < 0.05$ vs. control mice. D) CD31 immunostaining of ischemic muscles from control mice and MES at time of killing (28 days) showed a significant reduction in the capillary density in MES. Data are presented as the mean \pm SEM, * $P < 0.05$ vs. control mice.

Fig. 3

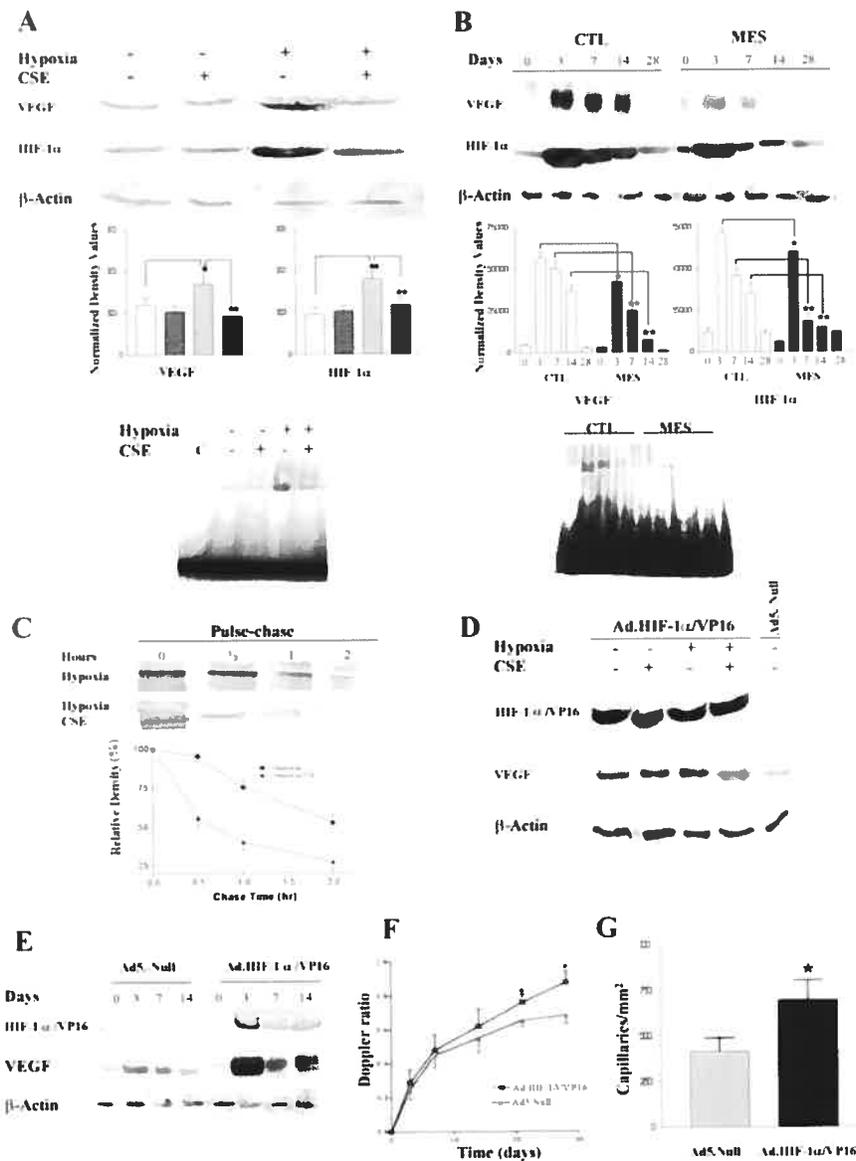


Figure 3. A-C) Smoke exposure inhibits hypoxia-induced protein expression of VEGF and HIF-1 α *in vitro* and *in vivo*. **A)** Western blot analysis of VEGF and HIF-1 α (top panel) in HUVECs after 6 h under various conditions. VEGF indicates VEGF-specific band (~46 kDa). VEGF and HIF-1 α density values were normalized to β -Actin (middle panel). Values are mean \pm SEM * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$. Electromobility shift assay (EMSA) of HIF-1 in HUVECs after 6 h under various conditions (bottom panel). One representative experiment of four is shown. **B)** Western blot analysis of VEGF and HIF-1 α (top panel) in ischemic muscles harvested at different time points after surgery in MES and control mice. VEGF and HIF-1 α density values normalized to β -Actin (middle panel). Values are mean \pm SEM * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$. EMSA of HIF-1 in ischemic muscles harvested at different time points after surgery in MES and control mice (bottom panel). One representative experiment of four is shown. **C)** Pulse-chase metabolic labeling with [S^{35}]methionine in HUVECs shows that CSE decreases HIF-1 α half-life under hypoxic conditions. **D–G)** Ad.HIF-1 α /VP16 restores VEGF expression and reverses the cigarette smoke inhibition of angiogenesis. **D)** Western blot analysis of HIF-1 α /VP16 and VEGF in HUVECs infected with Ad.HIF-1 α /VP16 or Ad5.Null (control) after 6 h under the various conditions. **E)** Western blot analysis of HIF-1 α /VP16 and VEGF in ischemic muscles harvested at different time points in mice locally infected with Ad.HIF-1 α /VP16 or Ad5.Null. **F)** Laser Doppler perfusion ratios over time and capillary density analysis at Day 28 after surgery **(G)** in mice locally infected with Ad.HIF-1 α /VP16 ($n=6$) or Ad5.Null ($n=6$). Data are presented as the mean \pm SEM, * $P < 0.05$ vs. Ad5.Null mice.



Cigarette Smoke Exposure Impairs VEGF-induced Endothelial Cell Migration: Role of NO and Reactive Oxygen Species

Sophie Élise Michaud M.S., Sylvie Dussault M.S., Jessika Groleau B.S., Paola Haddad B.S., and Alain Rivard M.D. En révision pour *Journal of molecular and cellular cardiology*. Septembre 2005

Department of Cardiovascular Research, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Corresponding Author:
Alain Rivard, MD
Centre Hospitalier de l'Université de Montréal
1560 Sherbrooke Est,
Montréal, Que, Canada, H2L 4M1
Tel (514) 890-8000 Fax (514) 412-7611


Short title: ***Smoking and VEGF-induced endothelial cell migration***



Abstract

Objective: Endothelial dysfunction is one of the earliest pathological effects of cigarette smoking. Vascular endothelial growth factor (VEGF) has been shown to be an important regulator of endothelial healing and growth. Accordingly, we tested the hypothesis that cigarette smoke exposure impairs VEGF actions in endothelial cells.

Methods and Results: In human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), cigarette smoke extracts (CSE) inhibited VEGF-induced tube formation in the matrigel assay. CSE did not affect HUVECs proliferation, but significantly reduced cellular migration in response to VEGF. This impaired migratory activity was associated with a reduced expression of $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$, and $\alpha_2\beta_1$ integrins. The Akt/eNOS/NO pathway has been shown to be important for VEGF-induced endothelial cell migration. We found that CSE significantly inhibited Akt/eNOS phosphorylation and NO release in VEGF-stimulated HUVECs. This was associated with an increased generation of ROS. Importantly, in HUVECs exposed to CSE, treatment with antioxidants (NAC, vitamin C) reduced ROS formation and rescued VEGF-induced NO release, cellular migration and tube formation.

Conclusions: 1) Cigarette smoke exposure impairs VEGF-induced endothelial cell migration and tube formation. 2) This is associated with increased generation of ROS, decreased expression of surface integrins together with a blockade of the Akt/eNOS/NO pathway. 3) These findings could contribute to explain the negative effect of cigarette smoking on endothelial function and vessel growth.

Key words: VEGF, cigarette smoking, endothelial cell migration, nitric oxide, oxidative stress.

Introduction

Cigarette smoking is the leading modifiable risk factor associated with ischemic vascular diseases and premature death in developed countries[1]. Although the association between cigarette smoking and atherosclerotic vascular diseases is well established, the precise mechanisms involved are not completely understood. According to the response to injury hypothesis, risk factors such as smoking act on a final common pathway that culminates in endothelial damage and/or endothelial dysfunction[2]. This endothelial injury is seen as the initial stimulus that ultimately leads to the development of the atherosclerotic lesion. Endothelial dysfunction is one of the earliest pathological effects of cigarette smoking, preceding atherosclerotic morphological changes in the vessel wall[3]. However, the specific mechanisms that might impair endothelial integrity in cigarette smokers are not fully understood.

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) is the most potent activators of endothelial cells[4]. VEGF is induced by hypoxia in ischemic tissues, where it has been shown to have a critical role for the induction of angiogenesis[4]. Interestingly, VEGF is also induced locally following arterial injury in different animal models[5, 6]. Moreover, local VEGF supplementation has been shown to promote reendothelialization and reduces neointimal formation after angioplasty [6-8]. Therefore, VEGF can be seen as a survival and maintenance factor that preserves endothelial integrity. VEGF acts specifically on endothelial cells via its receptors VEGFR1 (Flt-1), and VEGFR2 (Flk-1/KDR) to induce vascular permeability, cellular proliferation, cellular migration and tube formation[9]. Importantly, recent studies have shown that nitric oxide (NO) is an essential mediator of

endothelial cell migration and VEGF-induced angiogenesis[10, 11]. NO seems to function as a maintenance factor for integrins such as $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$, which are critical regulators of endothelial cell migration, survival, and angiogenesis[12-15]. VEGF has been shown to induce eNOS via the PI3k/Akt pathway, which leads to the generation of NO in a calcium-dependent manner[16, 17]. Inhibition of endothelial NO synthase (eNOS) attenuates endothelial cell migration in vitro[10, 18] and VEGF-induced angiogenesis in vivo[18]. Moreover, NO was shown to be absolutely required for ischemia-induced angiogenesis in a mouse model of hindlimb ischemia[19].

The precise effects of cigarette smoking on endothelial cell function and endothelium repair are not well known and controversial. Moreover, the modulation of VEGF-induced actions in endothelial cells exposed to cigarette smoke remains to be determined. In the present study, we show that cigarette smoke exposure inhibits VEGF-induced cellular migration and tube formation in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). This is associated with reduced phosphorylation of Akt and eNOS, together with a reduction of NO release and surface integrins expression. We also demonstrate that the impairment of VEGF-induced actions in endothelial cells exposed to cigarette smoke is at least partly due to the excessive generation of reactive oxygen species (ROS).

Material and Methods

Cell culture

HUVECs were purchased from Clonetics (Walkerville, MA) and cultured in EBM complete medium (Clonetics) supplemented with 10% fetal bovine serum, bovine brain extracts, hydrocortisone, human epidermal growth factor, gentamicin sulfate and amphotericin-B. Cells were grown at 37°C and 5% CO₂, and the medium was changed every 2 days. Cells were passaged when they reached 80% confluence. Passages 2-5 were used for all experiments.

Preparation of cigarette smoke extracts (CSE)

CSE was prepared by a modification of the method described by Carp and Janoff[20]. Briefly, two cigarettes were combusted with a modified syringe-driven apparatus. The smoke was bubbled through 50 ml of EBM. The resulting suspension was adjusted to pH 7.4 with concentrated NaOH and then filtered through a 0.20- μ m pore filter (Millipore Corporation, Bedford, MA) to remove bacteria and large particles. The filtered CSE was shown to be free of endotoxin (Gel clot LAL, Cambrex). CSE was applied to HUVEC in culture within 30 minutes of preparation to obtain a final concentration of 10%. This concentration corresponds approximately to exposure associated with smoking 1.5 pack per day[21]. We also performed a dose-response to assess the effect of different CSE concentrations on HUVEC migration. CSE concentrations of 2.5%, 5%, and 10% were associated with an inhibition of endothelial cell migration of 37.5%, 58.9%, and 74.35% respectively. Higher CSE concentrations did not increase the inhibition of HUVEC migration: 15% CSE was associated with a similar inhibition of migration (76.6%) compared to 10% CSE and 20% CSE exposure resulted in a significant reduction of cellular viability. Accordingly, a concentration of 10% CSE was used

in all our experiments. No toxic effect of 10% CSE was found since viability was consistently established to be >80% (trypan blue exclusion). Moreover, using 3 different techniques (TUNEL staining, Hoechst - PI staining, and annexinV FACS analysis), we found that exposure to 10% CSE does not increase the rate of apoptosis in our HUVECs (data not shown).

Capillary-like tube formation on Matrigel

To determine the effect of CSE on VEGF-induced tube formation, cells were pretreated for 12h with or without 10% CSE. After 12h, HUVECs were washed and plated in 96-well plates that had been precoated with 60µl of growth factor reduced Matrigel Matrix (Becton Dickinson Labware, Bedford, MA) and cultured at 37° for 24h with either 0.1% FBS (control) or 10ng/ml of VEGF. Rescue experiments were conducted using different antioxidants (NAC 1 mM, vitamine C 100 µM). After the different treatments, capillary-like tubes were photographed under a dissecting microscope and all side branches were counted by a single investigator in a blinded manner [22].

Cell Migration Assay

Cell migration was assessed using a modified Boyden chamber assay[23]. Polyvinylpyrrolidone-free polycarbonate filter Transwell inserts (6.4 mm diameter, 8 µm pores; Costar, Cambridge, MA) were incubated with 0.1% gelatin and dried. Inserts were placed in a 24-well plate containing either 500 µl EBM medium 0.1% FBS (control) or EBM with 10ng/ml of VEGF. After 12h of pretreatment in the presence or absence of 10% CSE and different antioxidants (NAC 1 mM, vitamine C 100 µM), HUVECs (15

000) were added to the upper chamber of the inserts in EBM medium. Cells were allowed to migrate from the upper to the lower chamber for 8h at 37 °C. Non-migratory cells were removed from the upper chamber by wiping the upper surface with an absorbant tip. Cells that had migrated to the lower side of the Transwell insert were fixed for 10 minutes with 3.7 % formaldehyde and stained with hematoxin. After extensive PBS washing to remove excess hematoxin, the number of cells that had migrated was counted in three different representative high power (200X) fields per insert. The data are presented as number of cells migrating + standard error of the mean.

96 well plates were coated with 0.1% gelatin (Sigma). Plates were then washed and the remaining binding sites blocked with 1.0% BSA for 1h at 37°C. After 12h of pretreatment in the presence or absence of 10% CSE, HUVECs (40 000) were added to each well. Cells were allowed to adhere for 1h at 37°C in the presence of 10ng/ml of VEGF. Cells were then stained with crystal violet and counted in three different representative high power (200X) fields.

MTS Assay

MTS (Celltiter 96 aqueous non radioactive cell-proliferation assay) was obtained from Promega (Madison,WI). After a 12h pretreatment in the presence or absence of 10% CSE, HUVECs (1000) were incubated for 24h with either 0.1% FBS (control) or 10ng/ml of VEGF. After the treatments, MTS was added to each well to achieve final concentrations of 0.04 mg/ml. HUVECs proliferation was quantified after 2h by densitometric analysis of MTS tetrazolium compound. Optical density was recorded with a microplate reader at 490 nm. Readings were corrected for background optical density by subtracting the readings from

EBM/MTS incubated at the same time in the absence of HUVEC. The results of three independent experiments performed in triplicates are represented.

Nitric oxide release

NO production was determined indirectly by measuring the concentration of the stable end product nitrite in the supernatant taken from endothelial cells treated using a commercial kit (R&D systems) based on the Griess reaction[24]. HUVECs were exposed to 10% CSE for 12 hours. The CSE-containing media was then replace by fresh media and NO concentrations were measured after 6 hours.

Measurements of intracellular Reactive Oxygen Species (ROS) generation

Intracellular ROS generation was assessed using 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA). ROS in the cells oxidize DCFH-DA, yielding the fluorescent compound 2',7'-dichlorofluorescein (DCF). HUVECs were plated at a density of 10^5 /well in a 24-well plate in complete EGM 10% FBS. 16h later adherent cells were washed with warm PBS and treated for 12h in the presence or absence of 10% CSE and with or without the different antioxidants. After 12h, cells were washed and DCF-DA ($10\mu\text{mol/L}$) was added for 30 minutes. The media was removed, cells were detached with trypsin and quickly analyzed for fluorescence (excitation at 498 nm and emission at 522 nm)[25]. Intensities are reported as percent of unstimulated samples after subtracting the background. Data are presented as the mean + standard error of the mean.

Western blot analysis

For the analyses of the phosphorylated forms of eNOS (Ser 1177) and Akt (Ser 473), HUVECs were pretreated for 12h in the presence or absence of 10% CSE and with or without different antioxidants. Cells were washed with PBS and cultured for 1h at 37°C with either 0.1% FBS (control) or 10ng/ml of VEGF. After the different treatments, HUVECs were washed with PBS and lysed. Protein concentrations were measured according to the Bradford method. A total of 30 µg of protein per sample was loaded onto SDS-PAGE and electroblotted on nitrocellulose membranes[5]. Western blots were performed using antibodies directed against phospho-Akt or phospho-eNOS (Cell Signalling). Specific proteins were detected by chemiluminescent reaction (Amersham) followed by exposure to Kodak XAR-5 film. The blots were reprobred for total Akt (Cell Signalling) or eNOS protein expression (Santa Cruz). Protein expressions were quantified by high-resolution optical densitometry (Alpha Imager 2000; Packard Instruments), corrected for total Akt or eNOS protein expression, and expressed as a percentage of controls.

Flow Cytometric Analysis of Integrin Expression

Integrin expression was assessed by fluorescent-activated cell sorting (FACS) with antibodies recognizing human $\alpha_v\beta_3$ (Santa Cruz), $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_5\beta_1$ and α_2 (Chemicon). All antibodies were added to 2×10^5 cells for 1 hour at 4° C and a FITC-conjugated anti-mouse antibody (Santa Cruz) was added. After incubation, cells were fixed with 1% paraformaldehyde and quantitative analysis was performed on a FACStar flow cytometer (Becton Dickinson) measuring 10 000 cells per sample. A minimum of 3 experiments per integrin was performed. The results are expressed in relative amount compared to controls.

Statistical Analysis

All results are expressed as mean + SEM. Statistical significance was evaluated by ANOVA or 2-tailed unpaired Student's t test for comparisons between the mean of 2 groups. A value of $p < 0.05$ was interpreted to denote statistical significance.

Results

Effect of CSE on Endothelial Cell Proliferation, Migration and Tube formation

We studied the effect of CSE exposure on tube formation in vitro. As determined using the Matrigel assay, VEGF significantly increased capillary-like tube formation in HUVECs. However, the induction of tube formation by VEGF was almost completely abolished when HUVECs were exposed to 10% CSE (Figure 1 and Table 1). We next investigated the effect of CSE exposure on more specific endothelial functions. As expected, VEGF treatment significantly induced both migration and proliferation in HUVECs (Figure 2A-B and Table 1). Interestingly, CSE exposure was associated with a selective inhibition of VEGF-induced HUVEC migration, whereas cellular proliferation was not significantly affected (Figure 2A-B and Table 1). Surface integrins have been shown to be critical regulators of endothelial cell migration in response to VEGF and NO. Here we found that VEGF-stimulated HUVECs exposed to CSE had a significant reduction in the expression of several surface integrins including $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$, and $\alpha_2\beta_1$ (Figure 2C). Moreover, the adhesion of VEGF-stimulated HUVECs was significantly reduced following exposure to 10% CSE, suggesting an impairment of integrin activity/function (Figure 2D).

CSE Induces Reactive Oxygen Species Generation in HUVECs

The negative effects of cigarette smoke exposure on endothelial function and vascular integrity have been largely attributed to the excessive generation of reactive oxygen species (ROS) such as superoxide and hydrogen peroxide[26, 27]. HUVECs exposed to 10% CSE show an important increase of intracellular ROS, as assessed by 2', 7'-

dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) (Figure 3). Importantly, antioxidants such as NAC and vitamin C can significantly reduce the generation of ROS in HUVECs exposed to CSE (Figure 3).

CSE impairs VEGF-dependent activation of the Akt/eNOS/NO pathway

Because NO is an essential mediator of endothelial cell migration and VEGF-induced angiogenesis, we investigate the effect of CSE exposure on VEGF-dependent Akt/eNOS/NO pathway. VEGF-stimulated HUVECs exposed to CSE show a dose-dependent inhibition of phosphorylated Akt and eNOS (Figure 4A). Importantly, the activation of Akt and eNOS by VEGF can be rescued following treatment with the antioxidants NAC and vitamin C (Figure 4B). Similarly we found that the induction of NO by VEGF in endothelial cell cultures was severely compromised in the presence of CSE, but that NO levels could be normalized with antioxidants (Figure 4C). Globally, these data suggest that ROS are involved in the impairment of VEGF-induced Akt/eNOS/NO pathway by CSE.

Antioxidants rescue functions of VEGF-stimulated HUVECs exposed to CSE.

As previously shown, HUVECs exposed to CSE show an important inhibition of VEGF-induced cellular migration and capillary-like tube formation (Figure 1 and Table 1). However treatment with the antioxidants NAC and Vitamin C led to a near complete restitution of endothelial functions, as demonstrated by the significant increase in both parameters (Table 1). These data suggest that CSE prevents VEGF-induced endothelial

cell migration and tube formation by increasing oxidative stress.

Discussion

The results of our experiments demonstrate that cigarette smoke exposure impairs VEGF-induced endothelial cell migration and tube formation. Previous studies regarding the effect of cigarette smoke exposure on endothelial cell migration/regeneration have used different experimental designs and reported conflicting results[28, 29]. In the present study, we specifically investigated the role of cigarette smoke exposure for the modulation of VEGF actions in endothelial cells. VEGF is a potent and specific growth factor for endothelial cells[4]. The importance of VEGF for the maintenance of endothelial integrity has recently been highlighted by the findings that VEGF is induced following arterial injury[5, 6], and that VEGF supplementation can accelerate reendothelialisation and reduce neointimal formation after angioplasty in different animal models[6-8]. Our study suggests that the endothelial dysfunction associated with cigarette smoking could at least in part be related to an impaired response to VEGF.

Our data further reveal that VEGF-induced NO release by endothelial cells is inhibited by cigarette smoke exposure. Dysfunctional NO biosynthesis has been shown to be associated with impaired endothelium-dependent vasodilation in healthy smokers[30]. Moreover, NO production is known to contribute to the angiogenic properties of VEGF in endothelial cells[10, 16, 18]. In fact, the importance of NO for post-natal angiogenesis has previously been documented in mice deficient for eNOS and in rabbits supplemented with L-arginine [11, 19]. Interestingly, we found that CSE exposure selectively inhibited endothelial cell migration whereas cellular proliferation was not affected. This selective impairment of endothelial cell migration following CSE exposure was associated with a

reduced expression of several integrins that have been shown to be critical for NO-dependent endothelial cell migration[12-15]. Whether there is a direct (causal) relationship between impaired NO release and reduced integrin expression/activity remains to be determined. However, our findings are consistent with previous studies demonstrating that the inhibition of endothelial NO synthase by L-NAME attenuates endothelial cell migration but not proliferation in vitro[12]. Globally, our results suggest that cigarette smoke exposure could impair VEGF-induced migration and tube formation through the inhibition of NO generation in endothelial cells.

The mechanism by which cigarette smoke impairs VEGF-induced NO release and tube formation appears to involve the generation of ROS. Cigarette smoke contains more than 4000 known constituents, including large amounts of free radicals and prooxidants[31]. In addition, endogenous ROS could be generated by endothelial cells exposed to cigarette smoke constituents via the NADPH oxidase and the mitochondria pathways[26]. Here we demonstrate that endothelial cells exposed to CSE show an important increase of intracellular ROS that can be prevented by treatment with NAC and vitamin C (see Figure 3). Moreover, NAC and vitamin C can rescue VEGF-induced NO release, cellular migration and tube formation in HUVECs exposed to CSE. Consistent with our data, previous studies have shown that ROS inhibit endothelial cell migration and angiogenesis[32, 33]. However, ROS may also in certain situations be critical for endothelial cell proliferation, migration, and angiogenesis [34-36]. This double-edged role of ROS might be related to the magnitude and/or the duration of exposure to oxidative stress.

The precise mechanisms responsible for the inhibition of VEGF-induced NO release by ROS in endothelial cells exposed to cigarette smoke remain to be determined. However, hypotheses can be proposed. One possibility is that ROS directly interact with NO to form peroxynitrite, which reduces NO availability and in turn increases the oxidative injury to endothelial cells. However, in certain situations, ROS can also induce the dephosphorylation of Akt[37-39], a serine/threonine kinase that has been shown to be essential for calcium dependent generation of NO by VEGF. This mechanism would be consistent with our data demonstrating decreased levels of phosphorylated Akt and eNOS following CSE exposure, and rescue of Akt/eNOS activities by antioxidants.

Globally, our study proposes a mechanism by which VEGF-dependent actions in endothelial cells can be impaired by cigarette smoke exposure. This in turn could contribute to promote endothelial dysfunction, the development of atherosclerotic lesions, and the triggering of acute ischemic events in patients exposed to cigarette smoke. However, the findings of the present study could have additional clinical implications. VEGF is a critical factor for the induction of angiogenesis during embryonic development but also in postnatal physiological and pathological situations[40]. In fact, in the setting of severe vascular diseases, the possibility of using VEGF supplementation in order to improve tissue perfusion has been tested in different animal models and in recent clinical trials[41]. We have recently shown in a mouse model of hindlimb ischemia that cigarette smoking impairs angiogenesis, and that this is associated with a reduced expression of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) and VEGF in ischemic tissues[42].

The results of the present study further demonstrate that the downstream effects of VEGF on endothelial cells are also severely compromised following cigarette smoke exposure. This could contribute to impair neovascularization in patients with severe ischemic vascular diseases that continue to be exposed to cigarette smoke. Moreover, cigarette smoking could be a limiting factor for the efficacy of VEGF supplementation therapies aiming at blood flow restoration or the prevention of restenosis.

In conclusion, the present study demonstrates that cigarette smoke exposure impairs VEGF-induced endothelial cell migration and tube formation. The inhibitory effect of cigarette smoke is associated with an increased level of ROS together with a blockade of the Akt/eNOS/NO pathway. Finally, treatment with antioxidants can rescue VEGF-dependent NO release and tube formation in endothelial cells exposed to CSE. The results of this study could contribute to explain the mechanisms involved in the development of smoking-related vascular diseases, and the inhibition of angiogenesis following cigarette smoke exposure. These findings could have important clinical implications for the development of novel therapies for patients with severe ischemic vascular diseases.

Acknowledgements

This study was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to AR (#57767). AR is a scholar from the Fédération de Recherche en Santé du Québec (FRSQ). SEM is a Doctoral research awardee from the Heart and Stroke Foundation of Canada and the Fédération de Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

Bibliography

- [1] Villablanca AC, McDonald JM, Rutledge JC. Smoking and cardiovascular disease. *Clin Chest Med.* 2000; 21: 159-72.
- [2] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature (London).* 1993; 362: 801-809.
- [3] Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D, Bull C, Thomas O, Robinson J, Deanfield JE. Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation.* 1993; 88: 2149-55.
- [4] Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb J.* 1999; 13: 9-22.
- [5] Tsurumi Y, Murohara T, Krasinski K, Chen D, Witzendichler B, Kearney M, Couffinhal T, Isner JM. Reciprocal relation between VEGF and NO in the regulation of endothelial integrity. *Nat Med.* 1997; 3: 879-86.
- [6] Gennaro G, Menard C, Michaud SE, Rivard A. Age-dependent impairment of reendothelialization after arterial injury: role of vascular endothelial growth factor. *Circulation.* 2003; 107: 230-3.
- [7] Asahara T, Chen D, Tsurumi Y, Kearney M, Rossow S, Passeri J, Symes JF, Isner JM. Accelerated restitution of endothelial integrity and endothelium-dependent function after phVEGF165 gene transfer. *Circulation.* 1996; 94: 3291-302.
- [8] Asahara T, Bauters C, Pastore C, Kearney M, Rossow S, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. Local delivery of vascular endothelial growth factor accelerates

reendothelialization and attenuates intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery. *Circulation*. 1995; 91: 2793-801.

[9] Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003; 9: 669-76.

[10] Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Madri JA, Sessa WC. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest*. 1997; 100: 3131-9.

[11] Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A, Izumi Y, Ang J, Yun CO, Buerk DG, Huang PL, Jain RK. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98: 2604-9.

[12] Murohara T, Witzenbichler B, Spyridopoulos I, Asahara T, Ding B, Sullivan A, Losordo DW, Isner JM. Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999; 19: 1156-61.

[13] Eliceiri BP. Integrin and growth factor receptor crosstalk. *Circ Res*. 2001; 89: 1104-10.

[14] Lee PC, Kibbe MR, Schuchert MJ, Stolz DB, Watkins SC, Griffith BP, Billiar TR, Shears LL, 2nd. Nitric oxide induces angiogenesis and upregulates alpha(v)beta(3) integrin expression on endothelial cells. *Microvasc Res*. 2000; 60: 269-80.

[15] Liu ZJ, Snyder R, Soma A, Shirakawa T, Ziober BL, Fairman RM, Herlyn M, Velazquez OC. VEGF-A and alphaVbeta3 integrin synergistically rescue angiogenesis via N-Ras and PI3-K signaling in human microvascular endothelial cells. *Faseb J*. 2003; 17: 1931-3.

- [16] Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*. 1999; 399: 601-5.
- [17] Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*. 1999; 399: 597-601.
- [18] Ziche M, Morbidelli L, Choudhuri R, Zhang HT, Donnini S, Granger HJ, Bicknell R. Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *J Clin Invest*. 1997; 99: 2625-34.
- [19] Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, Kalka C, Kearney M, Chen D, Symes JF, Fishman MC, Huang PL, Isner JM. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest*. 1998; 101: 2567-78.
- [20] Janoff A, Carp H. Possible mechanisms of emphysema in smokers: cigarette smoke condensate suppresses protease inhibition in vitro. *Am Rev Respir Dis*. 1977; 116: 65-72.
- [21] Su Y, Han W, Giraldo C, De Li Y, Block ER. Effect of cigarette smoke extract on nitric oxide synthase in pulmonary artery endothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1998; 19: 819-25.
- [22] Pollman MJ, Naumovski L, Gibbons GH. Endothelial cell apoptosis in capillary network remodeling. *J Cell Physiol*. 1999; 178: 359-70.

- [23] Kim S, Harris M, Varner JA. Regulation of integrin alpha vbeta 3-mediated endothelial cell migration and angiogenesis by integrin alpha5beta1 and protein kinase A. *J Biol Chem.* 2000; 275: 33920-8.
- [24] Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *Faseb J.* 1992; 6: 3051-64.
- [25] Tarpey MM, Fridovich I. Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Circ Res.* 2001; 89: 224-36.
- [26] Barua RS, Ambrose JA, Srivastava S, DeVoe MC, Eales-Reynolds LJ. Reactive oxygen species are involved in smoking-induced dysfunction of nitric oxide biosynthesis and upregulation of endothelial nitric oxide synthase: an in vitro demonstration in human coronary artery endothelial cells. *Circulation.* 2003; 107: 2342-7.
- [27] Heitzer T, Just H, Munzel T. Antioxidant vitamin C improves endothelial dysfunction in chronic smokers. *Circulation.* 1996; 94: 6-9.
- [28] Sarkar R, Gelabert HA, Mohiuddin KR, Thakor DK, Santibanez-Gallerani AS. Effect of cigarette smoke on endothelial regeneration in vivo and nitric oxide levels. *J Surg Res.* 1999; 82: 43-7.
- [29] Snajdar RM, Busuttill SJ, Averbook A, Graham DJ. Inhibition of endothelial cell migration by cigarette smoke condensate. *J Surg Res.* 2001; 96: 10-6.
- [30] Barua RS, Ambrose JA, Eales-Reynolds LJ, DeVoe MC, Zervas JG, Saha DC. Dysfunctional endothelial nitric oxide biosynthesis in healthy smokers with impaired endothelium-dependent vasodilatation. *Circulation.* 2001; 104: 1905-10.
- [31] Smith CJ, Fischer TH. Particulate and vapor phase constituents of cigarette mainstream smoke and risk of myocardial infarction. *Atherosclerosis.* 2001; 158: 257-67.

- [32] Urbich C, Dernbach E, Aicher A, Zeiher AM, Dimmeler S. CD40 ligand inhibits endothelial cell migration by increasing production of endothelial reactive oxygen species. *Circulation*. 2002; 106: 981-6.
- [33] Marikovsky M, Nevo N, Vadai E, Harris-Cerruti C. Cu/Zn superoxide dismutase plays a role in angiogenesis. *Int J Cancer*. 2002; 97: 34-41.
- [34] Moldovan L, Moldovan NI, Sohn RH, Parikh SA, Goldschmidt-Clermont PJ. Redox changes of cultured endothelial cells and actin dynamics. *Circ Res*. 2000; 86: 549-57.
- [35] Abid MR, Kachra Z, Spokes KC, Aird WC. NADPH oxidase activity is required for endothelial cell proliferation and migration. *FEBS Lett*. 2000; 486: 252-6.
- [36] Shono T, Ono M, Izumi H, Jimi SI, Matsushima K, Okamoto T, Kohno K, Kuwano M. Involvement of the transcription factor NF-kappaB in tubular morphogenesis of human microvascular endothelial cells by oxidative stress. *Mol Cell Biol*. 1996; 16: 4231-9.
- [37] Yu C, Rahmani M, Almenara J, Sausville EA, Dent P, Grant S. Induction of apoptosis in human leukemia cells by the tyrosine kinase inhibitor adaphostin proceeds through a RAF-1/MEK/ERK- and AKT-dependent process. *Oncogene*. 2004; 23: 1364-76.
- [38] Hermann C, Assmus B, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S. Insulin-mediated stimulation of protein kinase Akt: A potent survival signaling cascade for endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20: 402-9.
- [39] Chavakis E, Dernbach E, Hermann C, Mondorf UF, Zeiher AM, Dimmeler S. Oxidized LDL inhibits vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell

migration by an inhibitory effect on the Akt/endothelial nitric oxide synthase pathway. *Circulation*. 2001; 103: 2102-7.

[40] Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem*. 1992; 267: 10931-4.

[41] Freedman SB, Isner JM. Therapeutic angiogenesis for ischemic cardiovascular disease. *J Mol Cell Cardiol*. 2001; 33: 379-93.

[42] Michaud SE, Menard C, Guy LG, Gennaro G, Rivard A. Inhibition of hypoxia-induced angiogenesis by cigarette smoke exposure: impairment of the HIF-1alpha/VEGF pathway. *Faseb J*. 2003; 17: 1150-2.

Figure Legends

Figure 1. Inhibition of VEGF-induced tube formation by cigarette smoke extracts. (A)

Evaluation of tube formation was performed using a 24h Matrigel assay in HUVECs pre-treated for 12h with 10% CSE or not. One representative experiment of three is shown. **(B)** The lower panel represents statistical analysis of tube formation by HUVECs. Data are mean \pm SEM. * $p < 0.001$.

Figure 2. Effect of CSE on VEGF-induced HUVECs proliferation and migration

(A) Cell proliferation was assessed using the MTS assay in HUVECs exposed to the different conditions. **(B)** Cell migration was assessed using a modified Boyden chamber assay in HUVECs exposed to the different conditions. The results of three independent experiments performed in triplicates are represented. Data are mean \pm SEM. **(C)** The expression of $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_2\beta_1$ integrins was assessed using FACS analysis in HUVECs exposed to 10% CSE (gray) or not (black). A minimum of 3 experiments per integrin was performed and the results are expressed in relative amount compared to controls. **(D)** Cell adhesion was assessed in VEGF stimulated HUVECs exposed to 10% CSE or not. Data are mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and # $p < 0.001$.

Figure 3. ROS generation in HUVECs exposed to CSE. Intracellular ROS generation was assessed using 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA). HUVECs were treated for 12 h in the presence or absence of 10% CSE and with or without the different antioxidants. Intensities are reported as percentage of unstimulated samples after subtracting the background. Data are mean \pm SEM. * $p < 0.01$ vs CSE. ** $p < 0.001$ vs CTL.

Figure 4. Effect of CSE exposure on VEGF-induced Akt/eNOS/NO pathway. Akt and eNOS activation were evaluated by phospho-specific Western blots in VEGF-stimulated HUVECs exposed to different concentrations of CSE (A) and treated or not with antioxidants (B). Representative blots of at least three independent experiments are shown. The graph represents statistical analysis of Akt/eNOS phosphorylation corrected for total Akt or eNOS protein expression, and expressed as a percentage of the control values. Data are mean \pm SEM. * $p < 0.01$ vs VEGF. # $p < 0.01$ vs VEGF CSE, II $p < 0.001$ vs VEGF CSE. (C) NO production was determined indirectly by measuring the concentration of the stable end product nitrite based on the Griess reaction in the supernatant taken from HUVECs exposed to the different conditions. Data are mean \pm SEM. * $p < 0.01$ vs CTL. ** $p < 0.01$ vs VEGF. # $p < 0.01$ vs VEGF CSE.

Table 1.

The effect of VEGF and cigarette smoke extract (CSE) on migration and in vitro angiogenesis (reflected by tube formation) in HUVECs.

Treatments*	Migrated cells per field (200X) [†]	Tube formation (branches per well) [‡]
Control	86.5 ± 6.03	54.6 ± 3.76
VEGF	323.0 ± 21.86 [§]	123.3 ± 7.54 [§]
VEGF 10% CSE	171.5 ± 11.12	65.3 ± 5.36
VEGF 10% CSE NAC	258.5 ± 19.60 [#]	118.7 ± 10.04 [#]
VEGF 10% CSE Vit C	269.3 ± 16.06 [#]	125.7 ± 8.99 [#]

* HUVECs were pretreated for 12h with or without 10% CSE and different antioxidants and then cultured at 37° for 24h with or without VEGF on growth factor reduced Matrigel Matrix as described in material and methods.

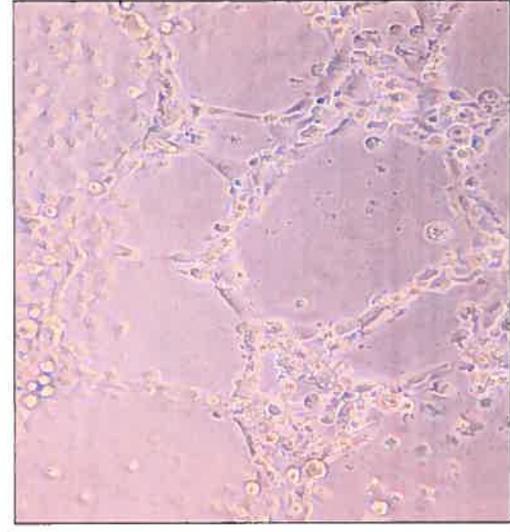
[†] Cell migration was assessed by using a Boyden chamber assay. HUVECs were allowed to migrate from the upper to the lower chamber in presence or absence of VEGF, for 8h as described in material and methods.

[‡] Tube (branch) formation was determined by counting the number of branches in each well under 200 X magnification. A branch was defined as a straight cellular segment connecting two cell masses (nodes). Data are means ± SE of three experiments.

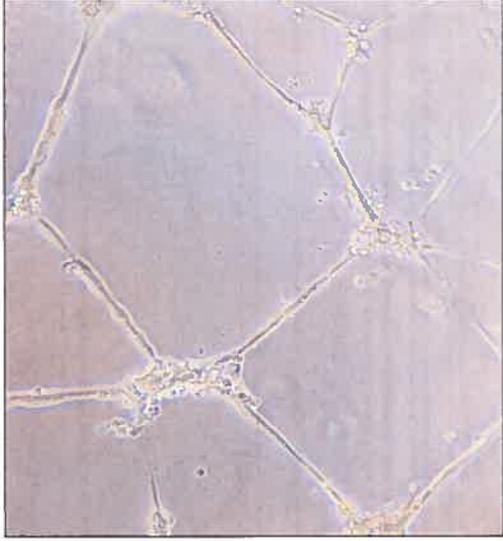
[§] $P < 0.001$ vs. Control HUVECs.

^{||} $P < 0.001$ vs. HUVECs treated with VEGF

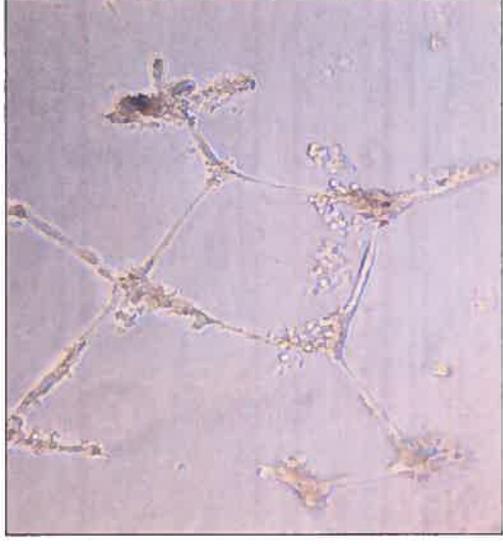
[#] $P < 0.001$ vs. HUVECs treated with VEGF and 10% CSE



CTL

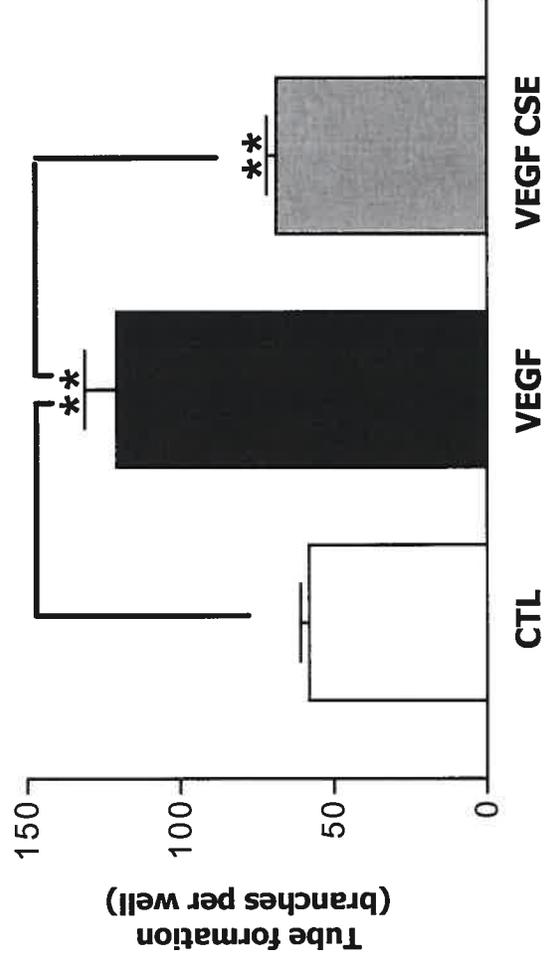


VEGF



VEGF CSE

A



B

Figure 1.

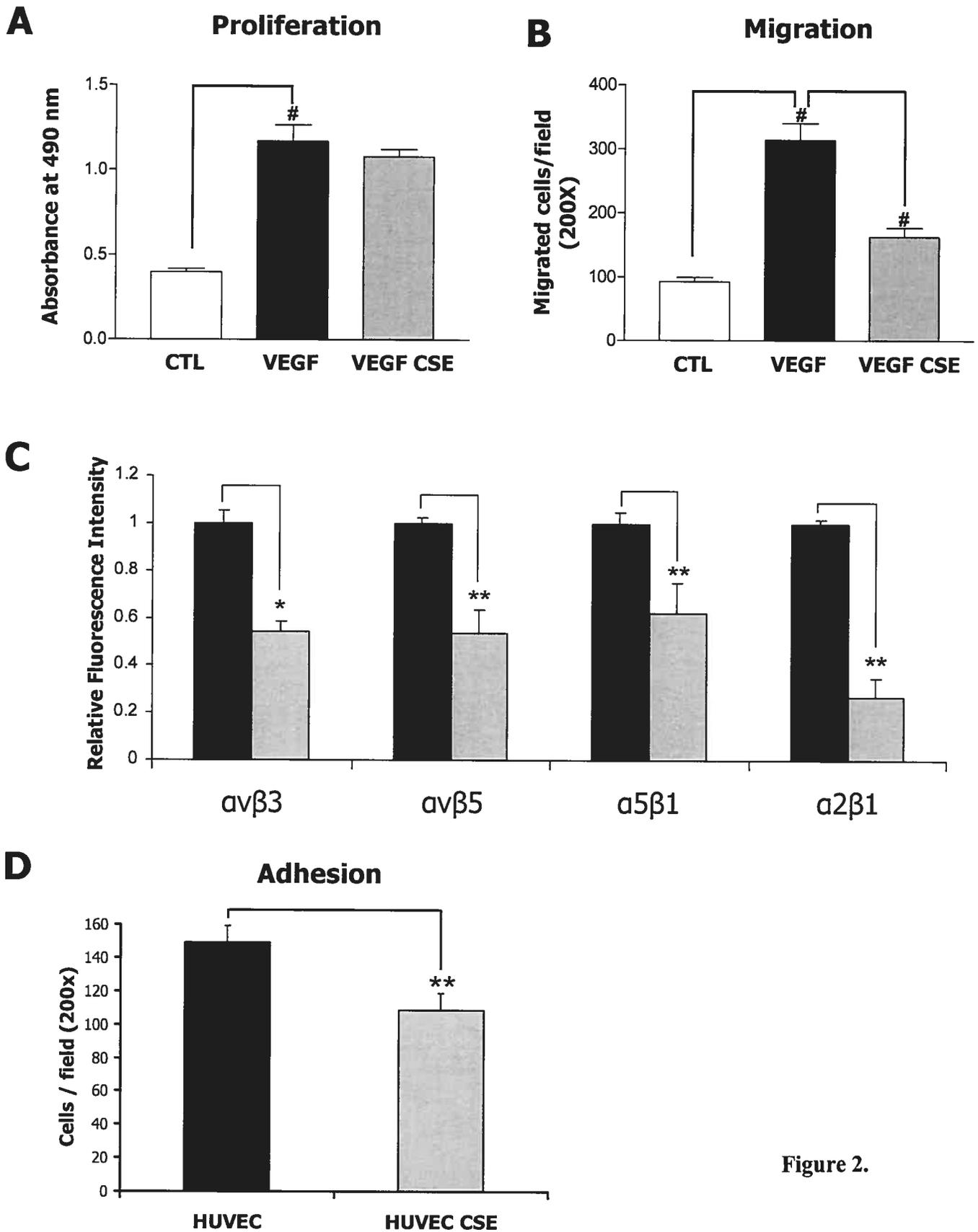


Figure 2.

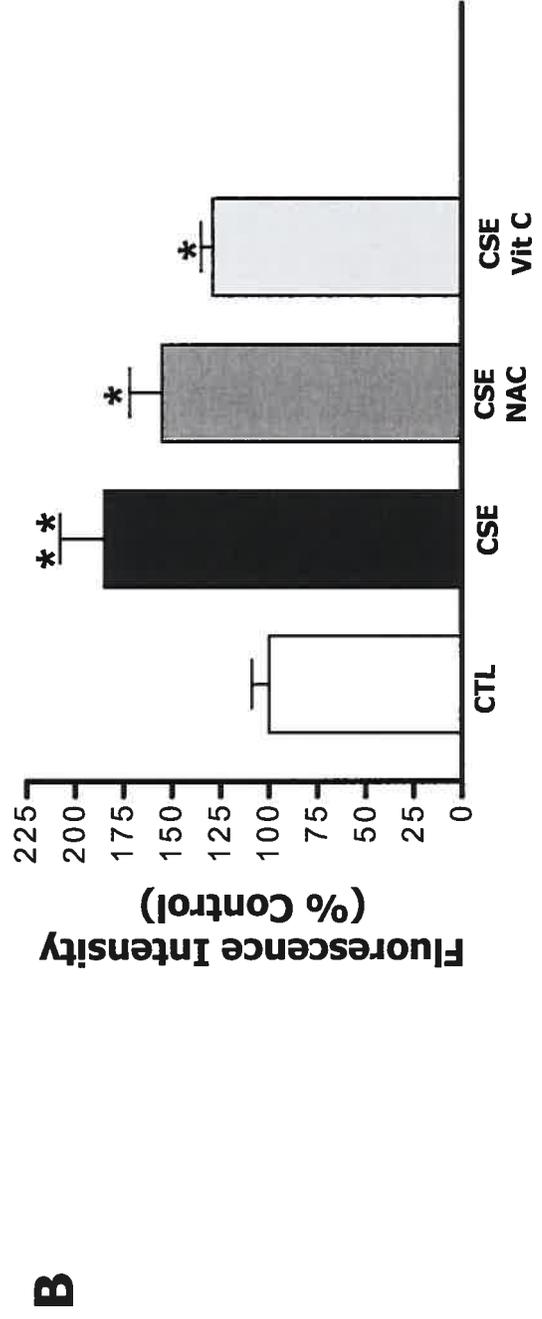
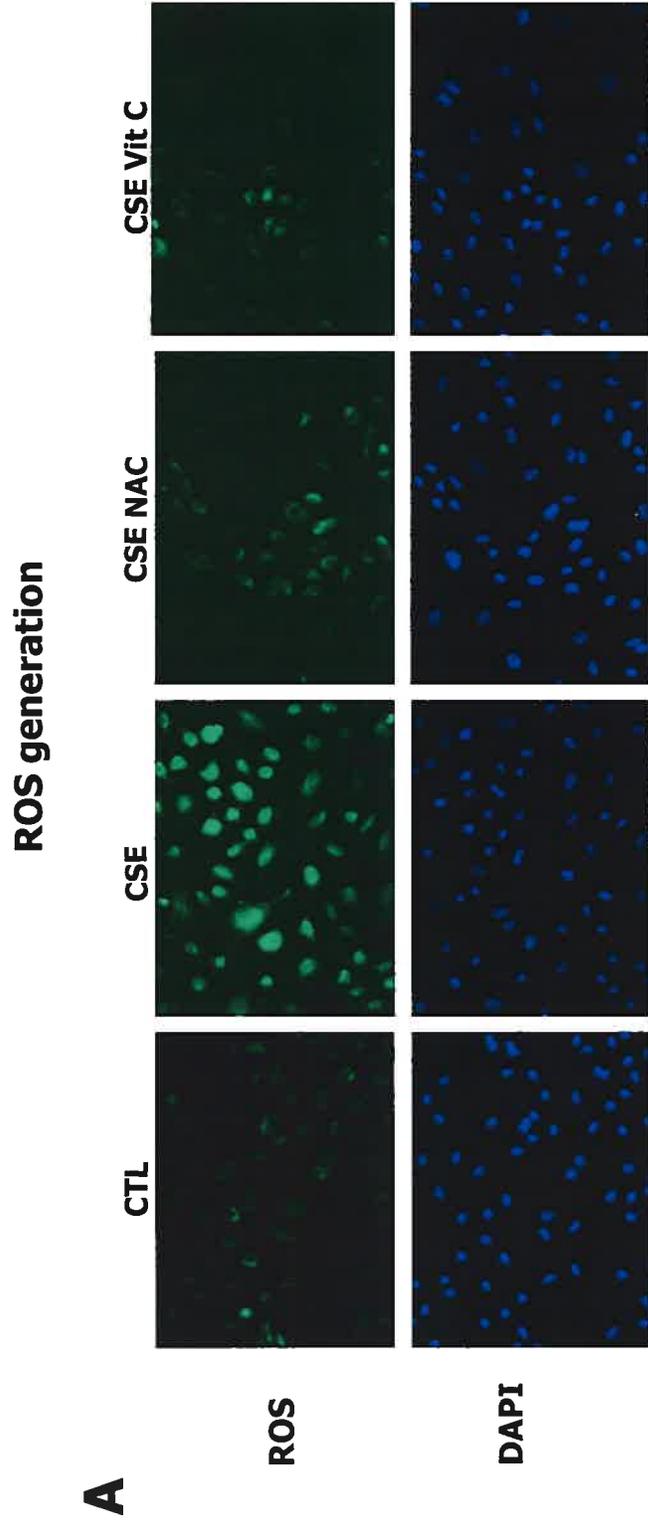


Figure 3.

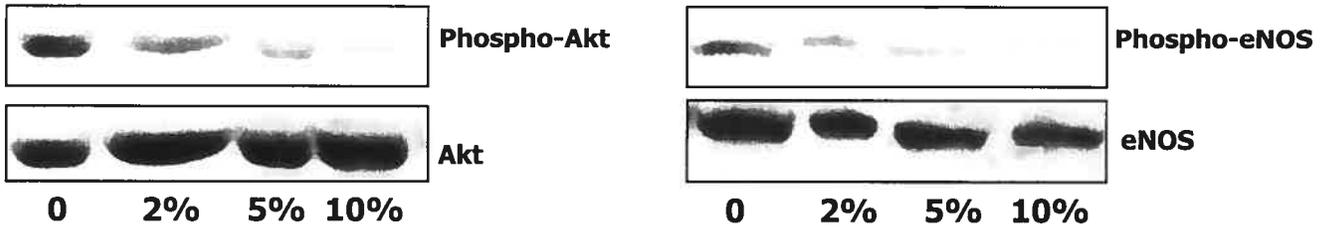
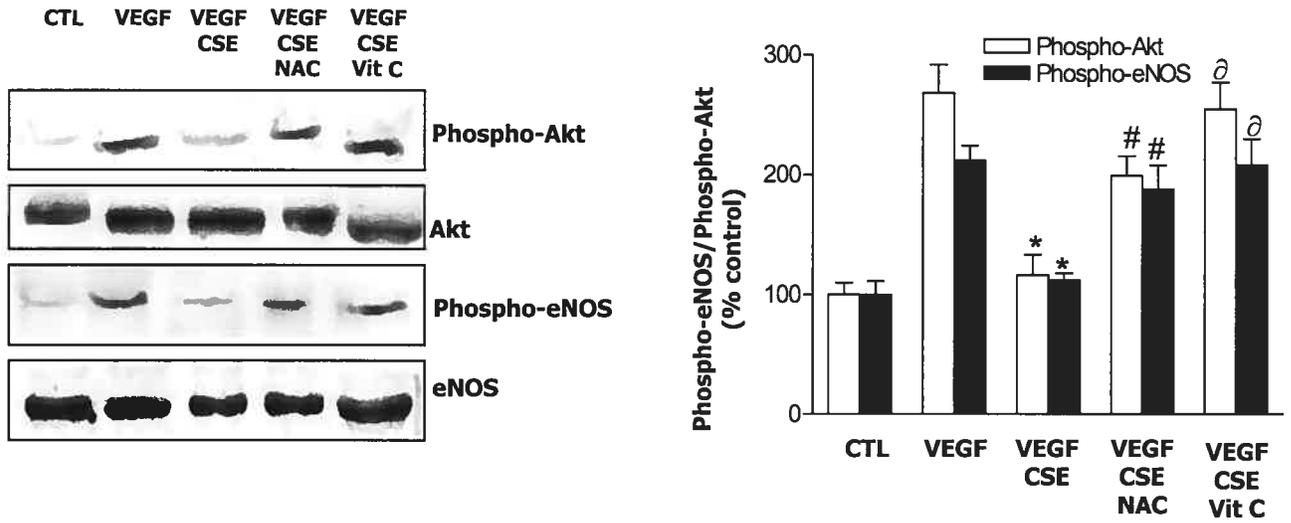
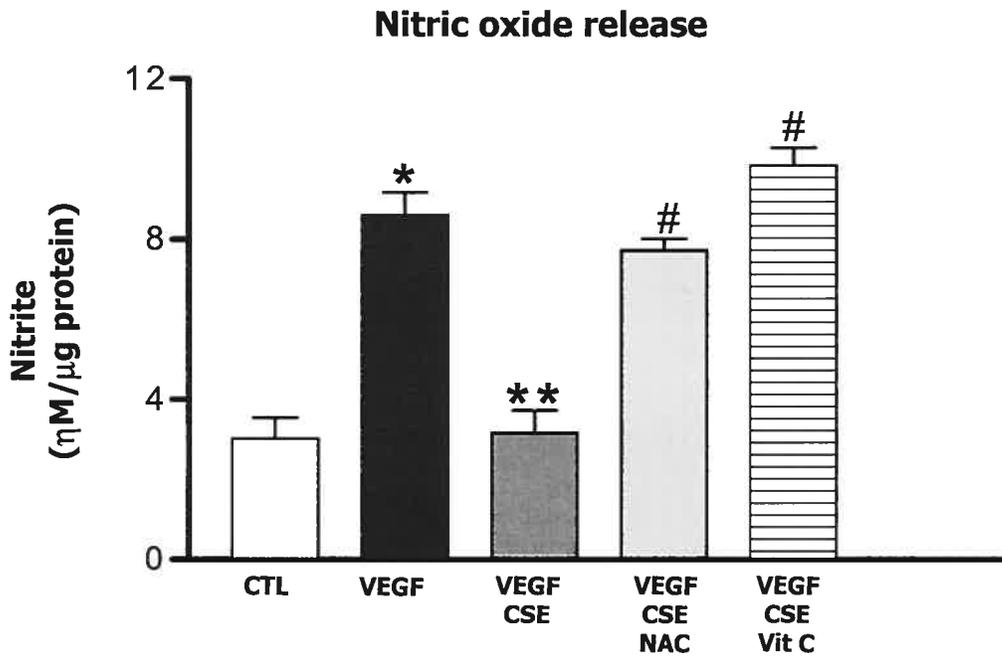
A**B****C**

Figure 4.

2.3 Circulating Endothelial Progenitor Cells From Healthy Smokers Exhibit Impaired Functional Activities

Michaud *Smoking and EPC dysfunction*

Sophie Élise Michaud M.S., Sylvie Dussault M.S., Jonas Lefèvre M.S., and Alain Rivard M.D. Accepted for publication in *Atherosclerosis* September 2005.

Department of Cardiovascular Research, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, H2L 4M1

Word count: 5391

Corresponding Author:

Alain Rivard, MD
Centre Hospitalier de l'Université de Montréal
1560 Sherbrooke Est
Montréal, Que, Canada, H2L 4M1
Tel (514) 890-8000
Fax (514) 412-7611
[REDACTED]

Abstract

Background: Endothelial dysfunction is one of the earliest pathological effects of cigarette smoking. It has recently been suggested that endothelial progenitor cells (EPCs) could contribute to ongoing endothelial maintenance and repair. Accordingly, we tested the hypothesis that cigarette smoking is associated with EPC dysfunction.

Methods and Results: EPCs were isolated from the peripheral venous blood of 15 healthy smokers and 11 age-matched nonsmokers. The number of EPCs was significantly reduced in smokers vs. control subjects (51.6 ± 1.9 vs 120.3 ± 10.0 per power field, $p < 0.001$). Moreover, the functional activities of EPCs isolated from smokers were severely compromised. First, the proliferative and migratory response of EPCs isolated from smokers were reduced by 75 % and 19 % respectively ($p < 0.05$). Second, EPCs from smokers showed an important decreased adherence to HUVECs that had been previously activated with tumor necrosis factor- α (TNF- α) ($p < 0.01$). Finally, the participation of EPCs to tube formation in a matrigel assay was reduced by 38 % in smokers vs. control subjects ($p < 0.001$). We found that EPCs from smokers had a significant reduction in the expression of the endothelial cell-specific markers (VE-cadherin, KDR, and vWF). Moreover, ROS formation was significantly increased in EPCs from smokers whereas the serum antioxidant and nitrite levels of smokers were reduced and correlated with impaired EPC number and functional activity.

Conclusions: Cigarette smoking is associated with a reduced number of EPCs together with an important impairment of EPC differentiation and functional activities. Our results suggest that EPC dysfunction could contribute to impair blood vessel healing and growth in smokers.



Condensed Abstract

We compared the number and the functional activities of EPCs isolated from the peripheral blood of healthy smokers vs. nonsmokers. We found that cigarette smoking is associated with a reduced number of EPCs together with an important impairment of EPC functional activities. We also identified potential mechanisms responsible for the negative effect of smoking on EPCs including increased oxidative stress, decreased NO availability and impaired EPC differentiation towards an endothelial phenotype.

Key words: Smoking, endothelial progenitor cells, endothelium

Introduction

Cigarette smoking is the leading modifiable risk factor associated with ischemic vascular diseases and premature death in developed countries¹. Although the association between cigarette smoking and atherosclerotic vascular diseases is well established, the precise mechanisms involved are not completely understood. According to the response to injury hypothesis, risk factors such as smoking act on a final common pathway that culminates in endothelial damage and/or endothelial dysfunction². This endothelial injury is seen as the initial stimulus that ultimately leads to the development of the atherosclerotic lesion. In agreement with this mechanistic view, endothelial dysfunction is one of the earliest pathological effects of cigarette smoking, preceding atherosclerotic morphological changes in the vessel wall³.

It has recently been suggested that endothelial progenitor cells (EPCs) could contribute to ongoing endothelial maintenance and repair⁴⁻⁸. EPCs can be cultured from circulating mononuclear cell fraction⁹⁻¹¹, bone marrow¹², and cord blood¹³. They express a number of endothelial specific cell-surface markers and exhibit several endothelial properties^{9,14}. EPCs are important for adult neovascularization in response to ischemia¹⁵, contributing as much as 25% of endothelial cells in the newly formed capillaries¹⁶. Moreover, EPCs have recently been shown to participate in endothelial repair following arterial injury in different experimental models^{4,8}. Therefore, EPCs may constitute a circulating pool of cells that could contribute to replace injured or dysfunctional endothelium⁵.

The levels of circulating EPCs have previously been shown to be inversely correlated with the number of cardiovascular risk factors^{5,17}. However, the direct effect of smoking on EPC number and functional activities is not well known. Moreover, the mechanisms involved in the modulation of EPCs by cigarette smoking remain to be determined. Here we compared the number and the functional activities of EPCs isolated from the peripheral blood of healthy smokers vs. nonsmokers. These subjects had no symptoms associated with atherosclerosis and did not present any other conventional cardiovascular risk factors. The goal of our study was to characterize EPCs in processes that are critical for blood vessel healing and growth, and to elucidate potential mechanisms that may contribute to the pathogenesis of atherosclerotic vascular diseases in smokers.

Methods

Study Population

The total study population included 15 chronic smokers and 11 control subjects. Smokers were included in the study if they were smoking 20 cigarettes per day for at least 1 year. All subjects were free of other traditional cardiovascular risk factors (hypertension, diabetes mellitus, low HDL, hyperlipidemia or a family history of premature vascular disease) and were not taking any medication including vitamins. The study protocol was approved by the local ethics committee and informed consent was obtained from each subject. As shown in table 1, the groups did not differ in terms of blood pressure, total cholesterol, HDL, LDL, fasting blood sugar and body mass index (BMI).

EPC Isolation

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by density gradient centrifugation with Ficoll-Paque (Amersham biosciences) from 80 mL of peripheral blood, and 1×10^6 /mL mononuclear cells were plated on different culture dishes coated with fibronectin (Sigma) in endothelial basal medium (EBM) (Clonetics) supplemented with endothelial growth medium Single Quots and 20% FCS¹⁷.

EPC Characterization

After 4 days in culture, nonadherent cells were removed by thorough washing with PBS and adherent cells underwent cytochemical analysis. To detect the uptake of 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine-labeled acetylated LDL (DiI-acLDL),

cells were incubated with DiI-acLDL (2.5 $\mu\text{g/ml}$) (molecular probe) at 37° C for 1 hour. Cells were then fixed with 2% paraformaldehyde for 10 minutes and incubated with FITC-labeled *Ulex europaeus* agglutinin I (lectin, 10 $\mu\text{g/ml}$) (Sigma) for 1 hour. Dual-staining cells positive for both lectin and DiILDL were judged as EPCs and counted per high power field¹⁷. Endothelial identity was further confirmed by fluorescent-activated cell sorting (FACS) with antibodies recognizing human vascular endothelium (VE)-cadherin, CD 34, KDR (Santa Cruz) and vWF (BD pharmingen). All antibodies were added to 2×10^5 cells for 1 hour at 4° C and a FITC-conjugated anti-mouse antibody (Santa Cruz) was added. After incubation, cells were fixed with 1% paraformaldehyde and quantitative analysis was performed on a FACStar flow cytometer (Becton Dickinson) measuring 10 000 cells per sample.

Proliferation Assay

EPC proliferation was assessed using the MTS Celltiter 96 aqueous non radioactive cell-proliferation assay (Promega). After 4 days in culture, EPCs (1000) were incubated for 24h with 50 ng/ml of VEGF. After the treatments, MTS was added to each well to achieve final concentrations of 0.04 mg/ml. EPC proliferation was quantified after 4h by densitometric analysis of MTS tetrazolium compound. Optical density was recorded with a microplate reader at 490 nm. Readings were corrected for background optical density by subtracting the readings from EBM/MTS incubated at the same time in the absence of EPCs. The results of three independent experiments performed in triplicates are represented. The data are presented as average absorbance \pm standard error of the mean.

Migration Assay

EPC migration was assessed using a modified Boyden chamber assay. Polyvinylpyrrolidone-free polycarbonate filter Transwell inserts (6.4 mm diameter, 8 μ m pores; Costar, Cambridge, MA) were incubated with 0.1% gelatin and dried. Inserts were placed in a 24-well plate containing 500 μ l EBM medium with 50ng/ml of VEGF. After 4 days in culture, isolated EPCs (15 000) were added to the upper chamber of the inserts in EBM medium. Cells were allowed to migrate from the upper to the lower chamber for 6h at 37 °C. Non-migratory cells were removed from the upper chamber by wiping the upper surface with an absorbent tip. Cells that had migrated to the lower side of the Transwell insert were fixed for 10 minutes with 3.7 % formaldehyde and stained with hematoxin. After extensive PBS washing to remove excess hematoxin, the number of cells that had migrated was counted in three different representative high power (200X) fields per insert. The data are presented as number of cells migrating \pm standard error of the mean.

EPCs Adhesion to Endothelial Cells

A monolayer of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) was prepared 48 hours before the assay by plating 2×10^5 cells (passage 2 to 5) in each well of 4-well glass slides. HUVECs were pretreated for 12 hours with tumor necrosis factor- α (BD Biosciences) (1 η g/ml). EPCs were labeled with DiI and 2×10^5 EPCs were added to each well and incubated for 3 hours at 37 °C. Nonattached cells were gently removed with PBS and adherent EPCs were fixed with 2% paraformaldehyde and counted in 6

random fields. The data are presented as number of adherent EPCs \pm standard error of the mean.

Matrigel Tubule Assay

Growth factor reduced Matrigel Matrix (Becton Dickinson Labware) was thawed and placed in 96-well plates at 37° C to allow solidification. DiI-labeled EPCs (3000) were coplated with HUVECs (12 000) and cultured at 37° for 8h with 50 ng/ml of VEGF. The number of incorporated EPCs in tubules was determined in 10 random fields. The data are presented as number of incorporated EPCs \pm standard error of the mean.

Nitric Oxide Release

Nitric oxide (NO) production was determined indirectly by measuring the concentration of the stable end product nitrite in the plasma of the subjects using a commercial kit (R&D systems) based on the Griess reaction. The data are presented as plasma nitrite concentration \pm standard error of the mean.

Measurements of Intracellular Reactive Oxygen Species (ROS) Generation

Intracellular ROS generation was assessed using 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA). ROS in the cells oxidize DCFH-DA, yielding the fluorescent compound 2',7'-dichlorofluorescein (DCF). After 4 days in culture, the adherent EPCs were washed and DCFH-DA (10 μ mol/L) was added for 30 minutes at 37°C in the dark. The media was removed, cells were washed twice with PBS, detached with trypsin and washed in PBS. After centrifugation, the pellet was suspended in PBS and formation of ROS was detected

by the fluorescent signal obtained using a FACStar flow cytometer (Becton Dickinson) measuring 10 000 cells per sample. The data are presented as fluorescence intensity units \pm standard error of the mean.

Apoptosis and Necrosis

For determination of apoptotic and necrotic cells, EPCs were washed with PBS, detached with trypsin, washed in PBS, and resuspended in binding buffer (Intergen Company) according to the manufacturer instructions. After centrifugation, the pellet was suspended in binding buffer and incubated for 15 minutes with 5 μ l Annexin-FITC (Intergen Company) and 5 μ l of propidium iodide (PI) (Intergen Company) and the samples were quickly analyzed by flow cytometry (see above).

Plasma Antioxidant Levels

Plasma antioxidant concentration was determined using the total antioxidant status assay kit (Calbiochem). The assay relies on the ability of the antioxidants in the sample to inhibit the oxidation of 2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazoline sulphonate) (ABTS) to ABTS⁺ by metmyoglobin, a peroxidase. The amount of ABTS⁺ is monitored by reading the absorbance at 600 nm. The antioxidants in the sample cause suppression of the absorbance to a degree proportional to their concentration. The data are presented as plasma antioxidant concentration \pm standard error of the mean.

Statistical Analysis

All results are expressed as mean \pm SEM. Statistical significance was evaluated by ANOVA or 2-tailed unpaired Student's t test for comparisons between the mean of 2 groups. Linear regression analyses and Pearson correlation were used for comparison of the number of EPCs or incorporated EPCs with plasma nitrite or antioxidant levels. A value of $p < 0.05$ was interpreted to denote statistical significance.

Results

EPC Characterization

EPCs were isolated from PBMC as previously described¹⁷. Culture of total PBMCs resulted in the emergence of characteristic spindle-shape cells and the stem/progenitor cell characteristics of EPCs is evidenced by their proliferative capacity to form endothelial colonies (Figure 1A). After 4 days in culture, the supernatant including the suspending cells was removed and the adherent cells were washed twice. Adherent cells grown from total mononuclear cells (MNC) were found to endocytose acLDL and bind UEA-1 lectin (Figure 1B). In addition, FACS analysis confirmed that the vast majority of cells express markers consistent with endothelial lineage including VE-cadherin, KDR and vWF (Figure 1C).

EPC Numbers, Migration and Proliferation

We compared the number of EPCs isolated from the peripheral blood of 15 smokers and 11 control subjects with similar characteristics (Table 1). As illustrated in Fig. 2A-B, the number of EPCs was significantly reduced in smokers compared to controls (51.6 ± 1.9 vs 120.3 ± 10.0 EPCs per power field, $p < 0.001$). The lower number of EPCs in smokers could not be explained by an excessive cellular death, as similar low levels (3-5%) of apoptosis and necrosis were found in both groups of subjects (data not shown). To specifically investigate the effect of smoking on EPC functional activities, EPCs were isolated after 4 days in culture and equal numbers of EPCs from smokers and controls were used in the following experiments. Using the MTS assay, the proliferative activity of EPCs in response to VEGF was found to be severely compromised in smokers compared to controls (75% reduction, $p < 0.05$, Fig. 2C). Migration of isolated EPCs in response to VEGF was also determined using

a modified Boyden chamber. As illustrated in figure 2D, the migratory capacity of EPCs isolated from smokers was significantly impaired compared to controls (140.8 ± 7.7 vs 173.1 ± 9.4 EPCs per power field, $p < 0.01$).

EPC Adhesion to Mature Endothelial Cells

Adhesion to both activated endothelial cells and the extracellular matrix is believed to be important during vascular healing and new blood vessel growth¹⁸. Therefore, we assessed the adhesion of EPCs from smokers and control subjects to a TNF- α stimulated HUVEC monolayer. EPCs from smokers were found to be significantly impaired in their ability to adhere to a HUVEC monolayer activated with TNF- α (31.5 ± 1.6 vs 51.9 ± 3.9 EPCs per high power field, $p < 0.0001$) as shown in figure 3A and 3B.

Matrigel Tubule Assay

A Matrigel tubule assay was performed to investigate the ability of EPCs to integrate and incorporate into vascular structures. Cocultures of EPCs and HUVECs on Matrigel matrix led to the formation of an extensive tubule network in both smoker and control samples. Fluorescent labeling of EPCs with DiI enabled distinction from HUVECs, and analysis under fluorescence revealed that fewer EPCs from smokers were incorporated into tubules when compared with EPCs from controls (260.4 ± 15.8 vs. 162.1 ± 9.7 per high power field, $p < 0.0001$) (Figure 3 C-G).

Expression of EC-Specific Markers

To study the effect of smoking on EPC differentiation, we compared the expression of EC-specific markers (Ve-Cadherin, KDR, and vWF) in EPCs isolated from smokers and control subjects. Smoking had no effect on the percentage of positive cells for the different markers (data not shown). However, the fluorescence intensity for each marker was significantly attenuated in EPCs from smokers when compared to control subjects, indicating reduced expression of each marker per cell (Figures 4A and 4B). Therefore, cigarette smoking seems to have a negative impact on EPC differentiation towards an endothelial phenotype.

Oxidative stress and ROS formation.

Endothelial dysfunction induced by cigarette smoking has been associated with an increased vascular production of reactive oxygen species (ROS) together with a reduced endothelial NO availability¹⁹⁻²¹. Accordingly, we investigated the relationship between oxidative stress, NO levels and EPC number and functional activity. ROS generation in EPCs was assessed by flow cytometry and microscopy using the fluorescent compound DCF. As illustrated in figure 5, EPCs from smokers demonstrated significantly higher ROS production as compared to EPCs from control subjects. In addition, the plasma antioxidant activity was significantly reduced in smokers (Figure 6A), and lower antioxidant activities were correlated with a reduced number of EPCs together with a reduced incorporation of EPCs into vascular structures (Figures 6B and 6C). Similarly, we found a significant reduction of plasma nitrite concentration in smokers (Figure 6D). Lower nitrite concentrations were correlated with reduced number of EPCs and impaired



EPC functional activity (Figures 6E and 6F).



Discussion

Endothelial integrity depends on a balance between the magnitude of injury and the capacity for repair. Although endothelial healing was previously thought to occur solely through the extension of neighboring mature endothelial cells, there is growing evidence that EPCs also contribute to this process⁵⁻⁸. Cigarette smoking represents a major cardiovascular risk factor that leads to endothelial injury and dysfunction. The results of the present study suggest that EPC dysfunction could contribute to impair endothelial integrity and promote the development of atherosclerotic vascular diseases in smokers.

Previous studies regarding the effect of smoking on EPCs have been inconclusive. In patients with a variety of risk factors, cigarette smoking was found to be the most important independent predictor of reduced EPC levels, although smoking by itself did not have a significant effect on EPC migration¹⁷. In contrast, in another study involving patients with or without conventional cardiovascular risk factors, smoking was not found to be an independent predictor of endothelial-progenitor-cell counts⁵. These discrepancies might be explained by the relatively small proportion of smokers in some studies⁵, and the difficulty of isolating the specific role of smoking in the presence of other confounding cardiovascular risk factors^{5,17}. Here we studied the direct effect of smoking on EPCs in healthy subjects that had no symptoms associated with atherosclerosis and did not present any other conventional cardiovascular risk factors.

The number of EPCs that we could isolate from the peripheral blood of chronic smokers was reduced by more than 50% compared to controls. Low levels of circulating EPCs in smokers could be caused by a number of mechanisms. Cigarette smoke contains more than 4000 known constituents, including large amounts of free radicals and prooxidants. Oxidative stress is associated with reduced NO production and endothelial dysfunction following cigarette smoke exposure²⁰. Here we found that ROS formation was significantly increased in EPCs isolated from smokers. Although this was not associated with an increased cellular death in culture, high levels of oxidative stress in smokers could potentially influence the mobilization and/or the survival of EPCs in vivo. Interestingly, decreased plasma antioxidant levels and EPC counts in smokers were correlated with reduced availability of NO, a factor that has recently been shown to be essential for the mobilization of EPCs from bone marrow²². Therefore, lower NO levels could contribute to the reduction of peripheral EPCs in smokers. Another possibility for the reduced number of EPCs is that continuous endothelial damage or dysfunction caused by cigarette smoking eventually leads to exhaustion of EPC supply. This mechanism was previously suggested in subjects at high risk for cardiovascular disease⁵. Although this hypothesis was not directly tested here, it seems logical to believe that reduced EPC levels in smokers is the consequence of decreased supply in the setting of increased progenitor cell utilization for vascular repair.

The results of the present study clearly indicate that cigarette smoking does not only influence the absolute number of EPCs, but also significantly modulates their functional activities. Cellular proliferation and migration in response to VEGF were significantly

impaired in EPCs isolated from smokers. Moreover, EPCs from smokers were found to exhibit a reduced ability to adhere to a HUVEC monolayer that had been activated with TNF- α . These processes are obviously important for vascular healing and reendothelialization following injury, but are also essential in the setting of neovascularization in response to ischemia. Several experimental studies indicate that EPCs make a significant contribution to postnatal neovascularization^{9,15}. Therefore, a reduction in the number and/or the functional activities of EPCs might impair vascularization in patients with coronary artery diseases. In the present study, we found that EPCs from smokers were significantly impaired in their ability to incorporate into tubules with HUVECs. Because this assay evaluates multiple cellular processes involved in blood vessel growth, our results suggest that impaired EPC functional activities might contribute to explain the previously described reduced neovascularization response in animals exposed to cigarette smoke²³.

Several mechanisms could contribute to impair EPC functional activities in smokers. Cigarette smoking seems to have a negative impact on EPC differentiation towards an endothelial phenotype. More specifically, EPCs isolated from smokers had a significant reduction in the expression of the VEGF receptor KDR, which mediates VEGF-induced proliferation, migration, and angiogenesis in endothelial cells²⁴. EPCs from smokers also demonstrated a significant downregulation of VE-cadherin, an endothelium specific cadherin that is required for cell adhesion and normal vascularization in the embryo and in adults^{25,26}. Another important factor that could modulate EPC functional activities in smokers is oxidative stress. EPCs have been shown to express higher levels of anti-oxidative enzymes and enhanced protection against oxidative stress compared to mature endothelial cells²⁷.

Moreover, the inhibition of anti-oxidative enzymes in EPCs leads to increased ROS formation together with impaired migratory capacity²⁷. In the present study, we found that EPCs isolated from smokers exhibit higher ROS expression compared to controls. We also demonstrated that lower serum antioxidant levels in smokers correlate with reduced EPC functional activity. Taken together, these results suggest that increased oxidative stress in smokers is at least partly responsible for EPC impaired functional activities. Finally, recent studies have demonstrated that NO is an essential mediator of endothelial cell migration²⁸, VEGF-induced neovascularization^{29,30}, and EPC mobilization²². Here we showed that nitrite levels are reduced in smokers and that lower serum nitrite levels correlate with impaired EPC functional activity. Accordingly, reduced NO availability in smokers could contribute to impair both the number and the functional activities of peripheral EPCs.

The results of the present study could have important clinical implications. There has been growing interest in using autologous EPC administration to restore blood flow in patients with vascular diseases^{14,30}. Our studies suggest that cigarette smoking could constitute a significant limitation for this type of therapy because of its negative effects on EPC number and functional activities. In a recent study, smoking cessation was shown to rapidly increase EPCs in chronic smokers³¹. However, the improvement in EPC counts after smoking cessation was smaller in heavy smokers compared to light smokers, which suggests that there might be long-term negative effects of cigarette smoking on EPCs. Accordingly, the time that is necessary to regenerate the pool of circulating EPCs after smoking cessation is currently unknown. Moreover, the effect of smoking cessation on the recuperation of EPC functional activities remains to be determined.

In summary, this study demonstrates that cigarette smoking is associated with a reduced number of EPCs together with an important impairment of EPC functional activities. Potential mechanisms responsible for the negative effect of smoking on EPCs include increased oxidative stress, decrease NO availability and impaired EPC differentiation towards an endothelial phenotype. We propose that EPC dysfunction associated with smoking impairs vascular healing following injury and therefore contributes to the pathogenesis of atherosclerotic vascular diseases. Moreover, EPC dysfunction in smokers might significantly impair neovascularization in response to ischemia and limit the efficacy of cellular therapies aiming at blood flow restoration.

Acknowledgments

This study was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to AR (#57767). AR is a scholar from the Fédération de Recherche en Santé du Québec (FRSQ). SEM is a Doctoral research awardee from the Heart and Stroke Foundation of Canada and the Fédération de Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

References

1. Villablanca AC, McDonald JM, Rutledge JC. Smoking and cardiovascular disease. *Clin Chest Med.* 2000;21:159-72.
2. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature (London).* 1993;362:801-809.
3. Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D, Bull C, Thomas O, Robinson J, Deanfield JE. Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation.* 1993;88:2149-55.
4. Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, Kirchmair R, Silver M, Murayama T, Nishimura H, Losordo DW, Asahara T, Isner JM. Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation.* 2002;105:3017-24.
5. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med.* 2003;348:593-600.
6. Shi Q, Wu MH, Hayashida N, Wechezak AR, Clowes AW, Sauvage LR. Proof of fall-out endothelialization of impervious Dacron grafts in the aorta and inferior vena cava of the dog. *J Vasc Surg.* 1994;20:546-56; discussion 556-7.
7. Kaushal S, Amiel GE, Guleserian KJ, Shapira OM, Perry T, Sutherland FW, Rabkin E, Moran AM, Schoen FJ, Atala A, Soker S, Bischoff J, Mayer JE, Jr.

- Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo. *Nat Med.* 2001;7:1035-40.
8. Iwakura A, Luedemann C, Shastry S, Hanley A, Kearney M, Aikawa R, Isner JM, Asahara T, Losordo DW. Estrogen-mediated, endothelial nitric oxide synthase-dependent mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells contributes to reendothelialization after arterial injury. *Circulation.* 2003;108:3115-21.
 9. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997;275:964-7.
 10. Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest.* 2000;105:71-7.
 11. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood.* 2000;95:952-8.
 12. Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest.* 2002;109:337-46.
 13. Murohara T, Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki K, Eguchi H, Onitsuka I, Matsui K, Imaizumi T. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest.* 2000;105:1527-36.

14. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res*. 2004;95:343-53.
15. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*. 1999;85:221-8.
16. Murayama T, Tepper OM, Silver M, Ma H, Losordo DW, Isner JM, Asahara T, Kalka C. Determination of bone marrow-derived endothelial progenitor cell significance in angiogenic growth factor-induced neovascularization in vivo. *Exp Hematol*. 2002;30:967-72.
17. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res*. 2001;89:E1-7.
18. Bischoff J. Cell adhesion and angiogenesis. *J Clin Invest*. 1997;100:S37-9.
19. Raij L, DeMaster EG, Jaimes EA. Cigarette smoke-induced endothelium dysfunction: role of superoxide anion. *J Hypertens*. 2001;19:891-7.
20. Tsuchiya M, Asada A, Kasahara E, Sato EF, Shindo M, Inoue M. Smoking a single cigarette rapidly reduces combined concentrations of nitrate and nitrite and concentrations of antioxidants in plasma. *Circulation*. 2002;105:1155-7.
21. Barua RS, Ambrose JA, Srivastava S, DeVoe MC, Eales-Reynolds LJ. Reactive oxygen species are involved in smoking-induced dysfunction of nitric oxide biosynthesis and upregulation of endothelial nitric oxide synthase: an in vitro

- demonstration in human coronary artery endothelial cells. *Circulation*. 2003;107:2342-7.
22. Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ihling C, Technau-Ihling K, Zeiher AM, Dimmeler S. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med*. 2003;9:1370-6.
 23. Michaud SE, Menard C, Guy LG, Gennaro G, Rivard A. Inhibition of hypoxia-induced angiogenesis by cigarette smoke exposure: impairment of the HIF-1 α /VEGF pathway. *Faseb J*. 2003;17:1150-2.
 24. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb J*. 1999;13:9-22.
 25. Carmeliet P, Collen D. Molecular basis of angiogenesis. Role of VEGF and VECadherin. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;902:249-62; discussion 262-4.
 26. Dejana E. Endothelial adherens junctions: implications in the control of vascular permeability and angiogenesis. *J Clin Invest*. 1997;100:S7-10.
 27. Dernbach E, Urbich C, Brandes RP, Hofmann WK, Zeiher AM, Dimmeler S. Antioxidative stress-associated genes in circulating progenitor cells: evidence for enhanced resistance against oxidative stress. *Blood*. 2004;104:3591-7.
 28. Murohara T, Witzendichler B, Spyridopoulos I, Asahara T, Ding B, Sullivan A, Losordo DW, Isner JM. Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:1156-61.
 29. Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Madri JA, Sessa WC. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest*. 1997;100:3131-9.

30. Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A, Izumi Y, Ang J, Yun CO, Buerk DG, Huang PL, Jain RK. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:2604-9.
31. Kondo T, Hayashi M, Takeshita K, Numaguchi Y, Kobayashi K, Iino S, Inden Y, Murohara T. Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:1442-7.

Figure Legends

Figure 1. Identification of the endothelial lineage phenotype of EPCs. A) Culture of peripheral blood mononuclear cells resulted in the emergence of characteristic spindle-shaped EPCs and EPC colonies characterized by a cluster of rounded cells surrounded by radiating spindle-shaped cells. B) EPCs were shown to uptake acetylated LDL and bind lectin-FITC. Merged images show that cells are dual positive. C) Representative Side scatterplot of cultured EPCs showing one cell population. Expression of endothelial marker proteins on EPCs was analyzed by FACS. VE-cadherin, KDR, and vWF staining are shown compared to isotype controls.

Figure 2. EPC number, proliferation and migration. A) Representative pictures of stained EPCs (acLDL, lectin-FITC and DAPI) from controls and smokers. B) Quantification of these cultures revealed that smoking significantly reduces EPC number. C) Cell proliferation was assessed using the MTS assay. Statistical analysis revealed that EPCs from smokers have significant impairment in proliferation. D) Cell migration was assessed using a modified Boyden chamber assay. Statistical analysis demonstrated that EPC migratory function is impaired in smokers. Data are mean \pm SEM * $p < 0.01$.

Figure 3. EPC adhesion and tubulization. A) EPCs were labeled with a DiI fluorescent marker (red) and allowed to adhere to a monolayer of TNF- α -stimulated HUVECs (blue, nuclear stain DAPI) for 3 hours. Representative pictures illustrating adhesion of control EPCs vs smoker EPCs are shown. B) Significantly fewer EPCs from smokers adhere to

HUVECs. C-F) Fluorescent-labeled EPCs (red) were coplated with HUVECs (transparent) to form tubule structures on Matrigel. Superimposed light and fluorescent images of identical fields reveal that control EPCs (C-D) integrated more the vascular structure when compared to EPCs from smokers (E-F). This is more clearly shown in a high power fields where arrows represent incorporated EPCs (D-F). G) Quantification of incorporated EPCs showed that significant fewer EPCs from smokers integrated into tubules. Data are mean \pm SEM * $p < 0.01$.

Figure 4. EPC differentiation. A) Expression of EC-specific markers (Ve-cadherin, KDR, vWF) on EPCs from control subjects versus EPCs from smokers analyzed by flow cytometry. B) The mean fluorescence intensity was analyzed and revealed that all markers were less expressed on EPCs from the smoker group. Data are mean \pm SEM * $p < 0.01$.

Figure 5. ROS generation in EPCs. Intracellular ROS generation was assessed using 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) and analyzed by flow cytometry. A) Representative histogram showing the levels of ROS expression in controls and smokers compared to unstained EPCs. The difference in mean fluorescent intensity is statistically significant. Data are mean \pm SEM * $p < 0.01$. B) Representative pictures of ROS generation in controls and smokers after counterstaining with the nuclear dye DAPI.

Figure 6. Effect of antioxidant and nitrite plasma concentrations on EPC number and incorporation into vascular structure. The number of EPCs and their incorporation into

vascular structures are directly correlated with plasma antioxidant and nitrite concentrations. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

TABLE 1. Clinical Characteristics of the Study Population

	Control Subjects (n=11)	Smokers (n=15)	P
Age, years	36 ±2.8	37 ±1.9	0.89
Sex, % men	40	40	0.86
Systolic BP, mm Hg	113 ±3.6	110 ±3.4	0.51
Diastolic BP, mm Hg	70 ±2.7	68 ±2.3	0.49
Weight, kg	70.0 ±2.3	71 ±4.7	0.96
Height, m	1.7 ±0.036	1.7 ±0.027	0.60
BMI, kg/m ²	24.5 ±0.68	25.0 ±1.3	0.71
Glucose, mmol/L	4.8 ±0.12	4.8 ±0.14	0.86
Total Cholesterol, mmol/L	4.9 ±0.23	4.9 ±0.21	0.93
LDL, mmol/L	3.0 ±0.22	3.0 ±0.18	0.92
HDL, mmol/L	1.4 ±0.10	1.3 ±0.071	0.62
Total Chol/HDL	3.7 ±0.36	3.8 ±0.26	0.84
Triglyceride mmol/L	1.0 ±0.19	1.0 ±0.16	0.97
Years of Smoking		18 ±2.3	
Cigarettes/Day		22 ±1.3	

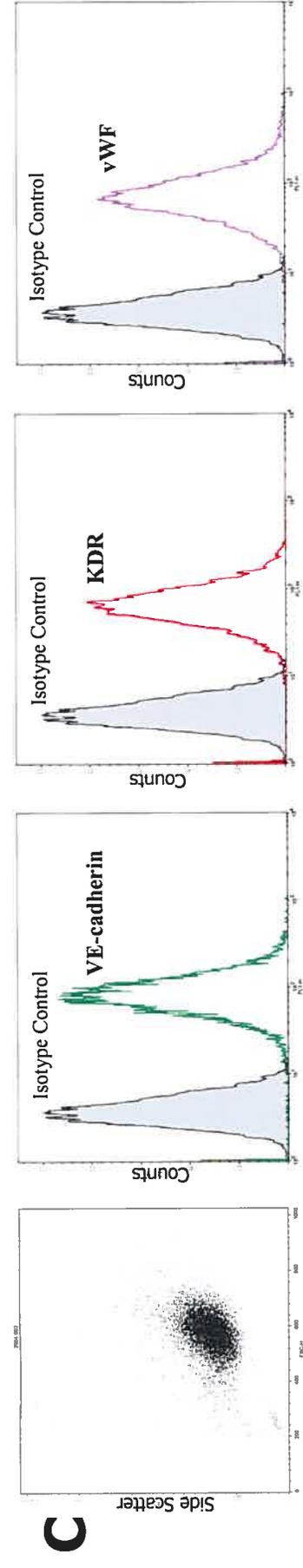
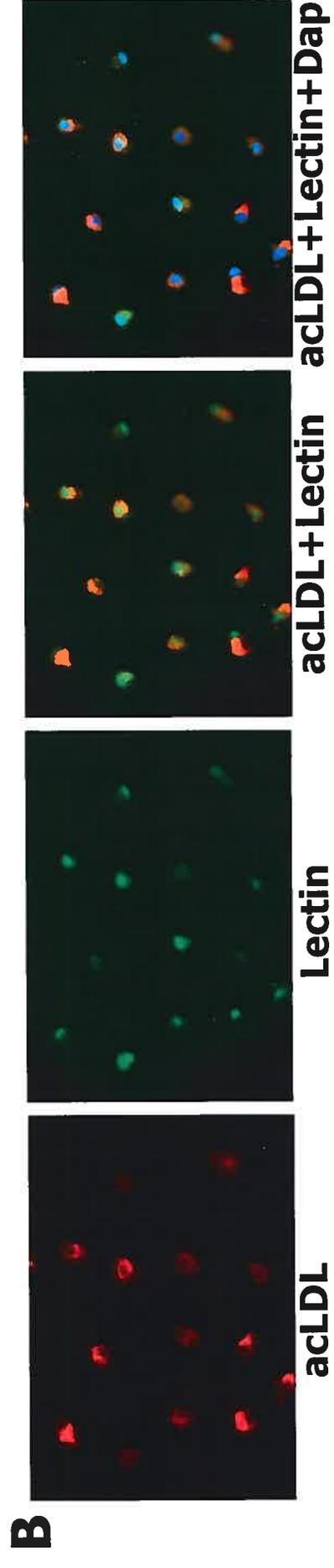
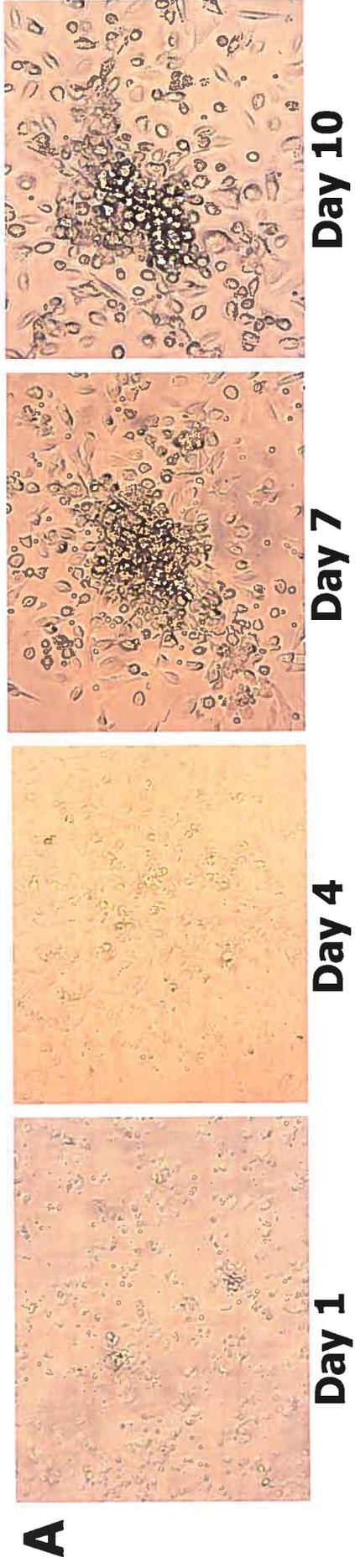


Figure 1.

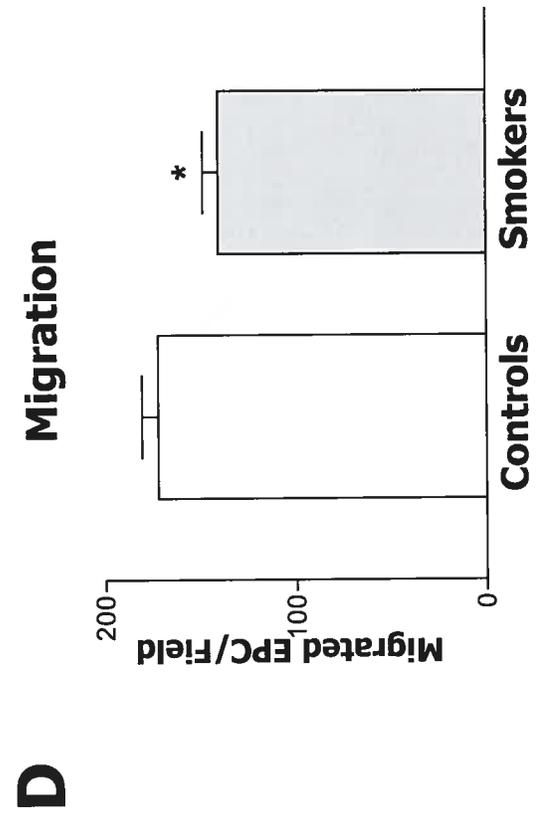
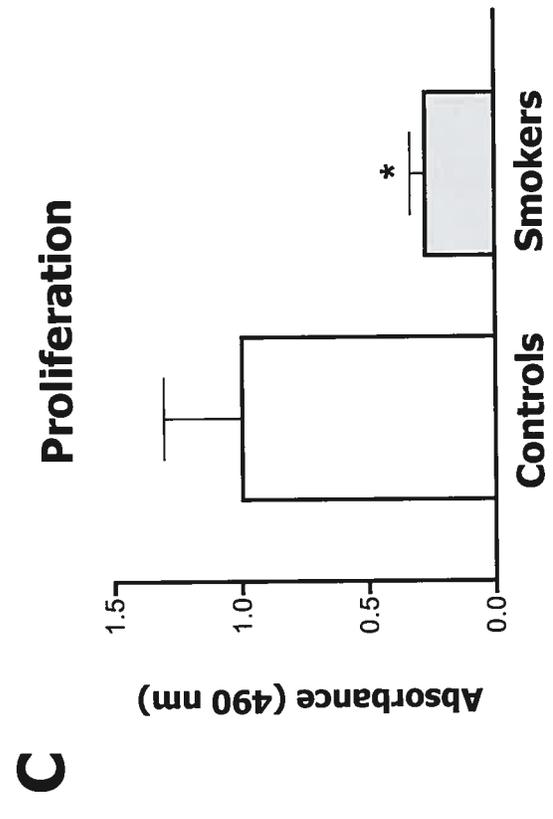
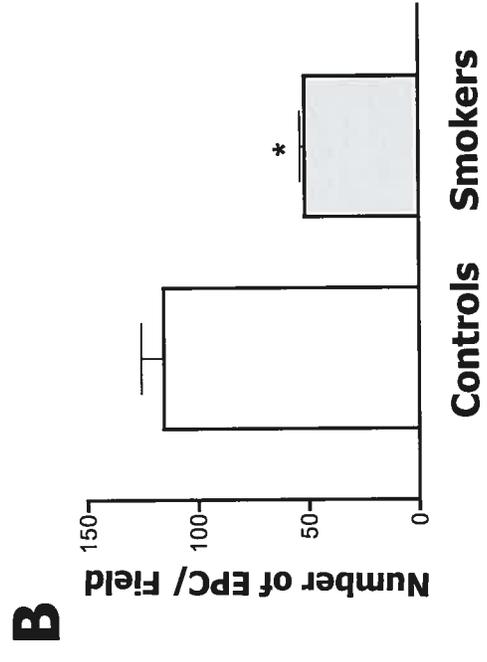
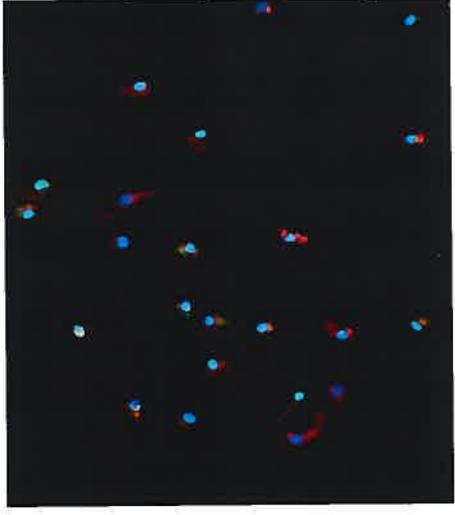
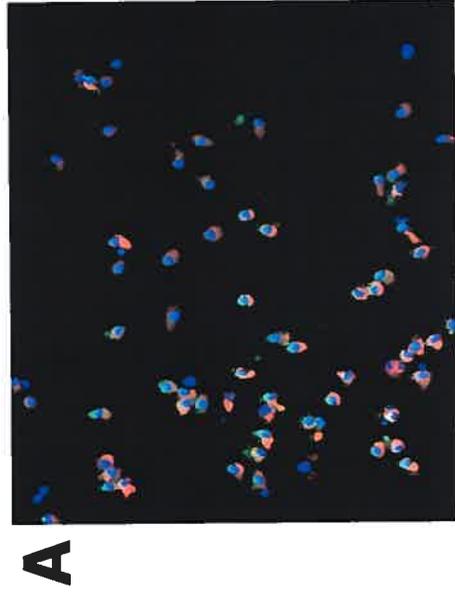


Figure 2.

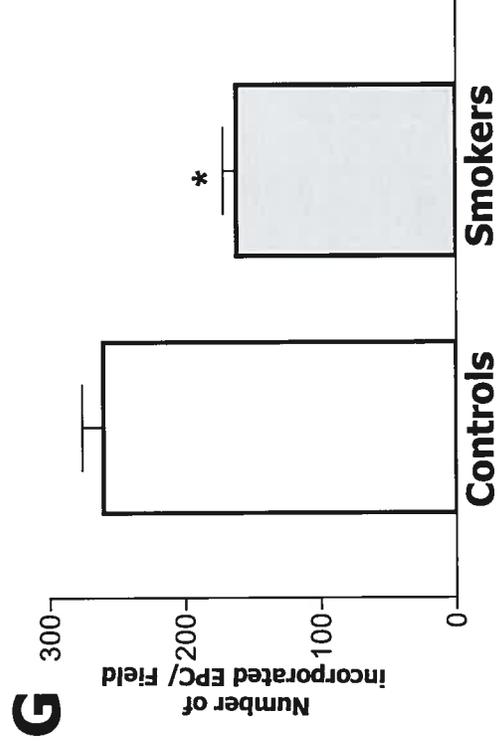
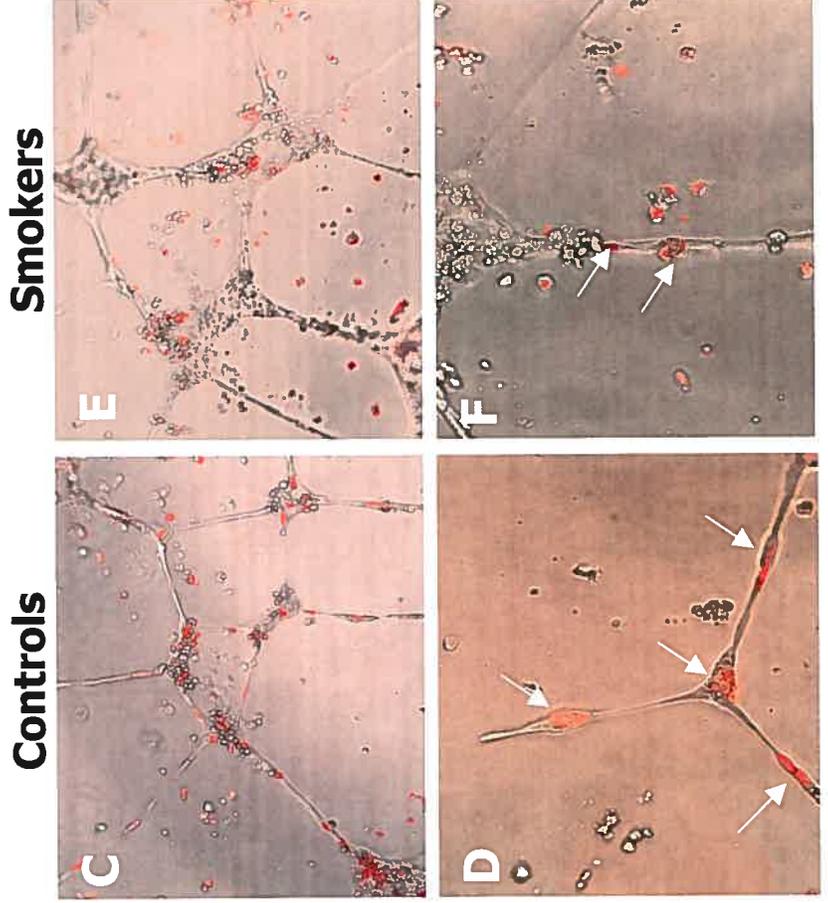
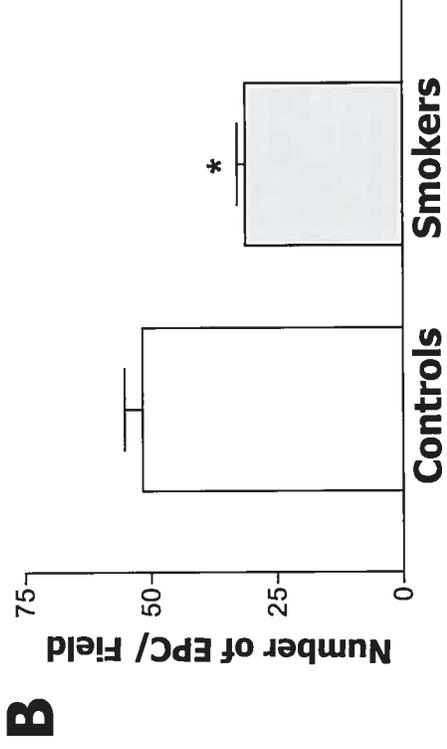
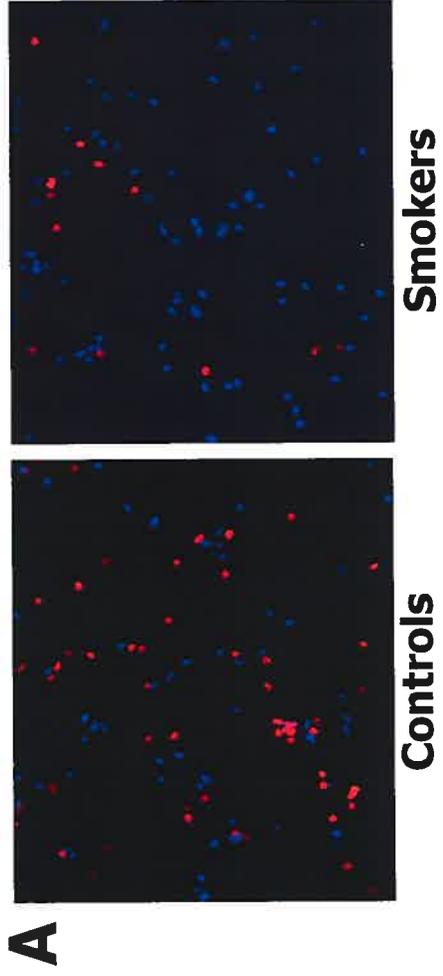


Figure 3.

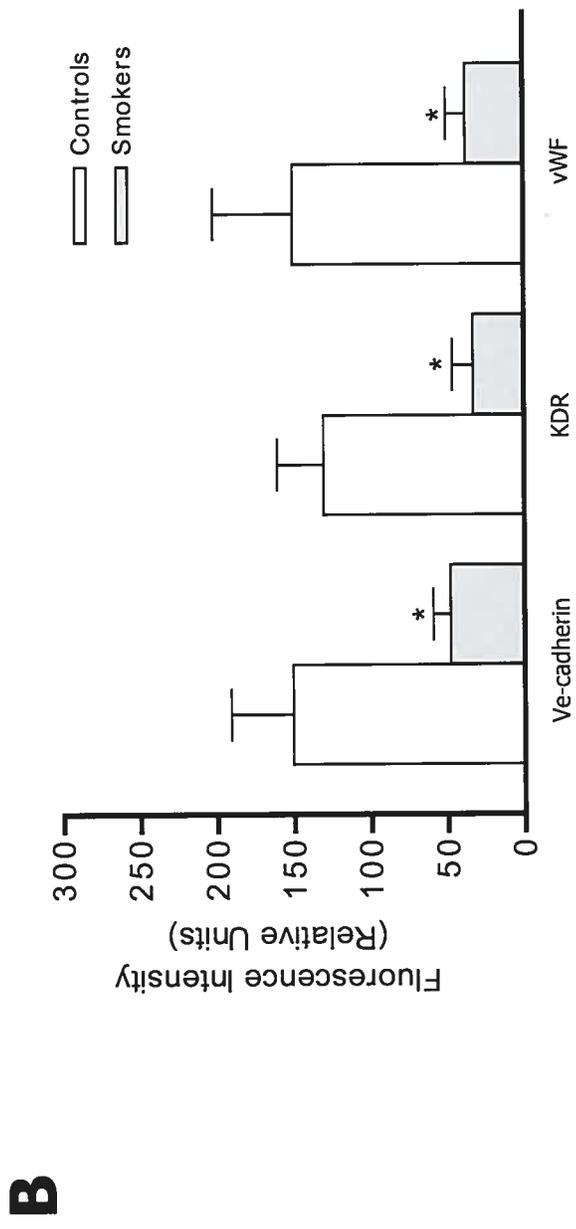
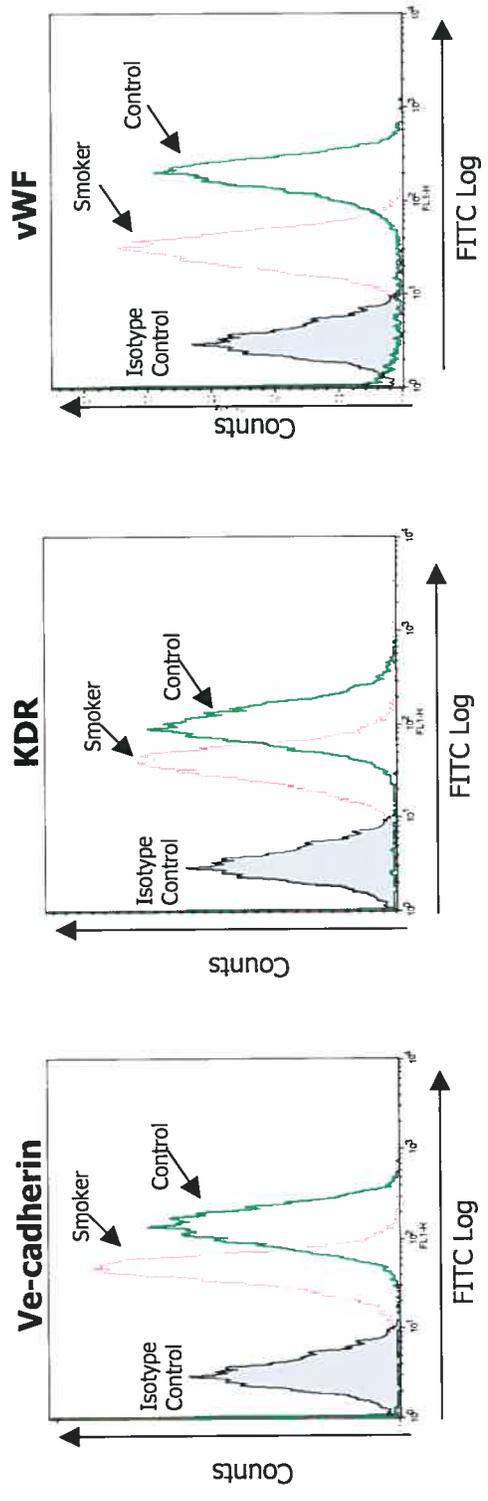
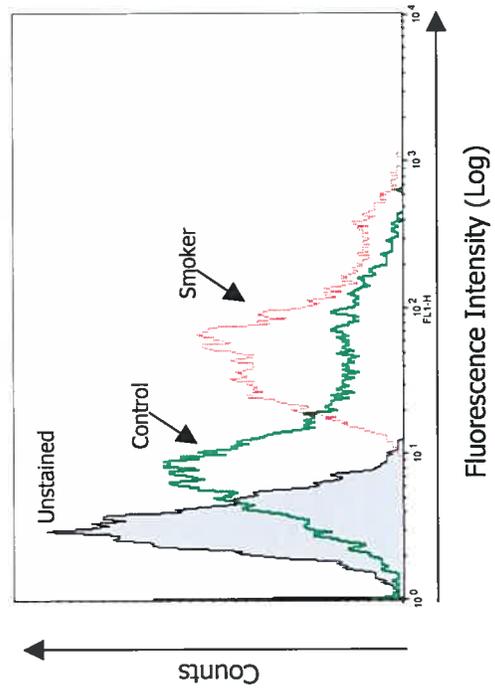
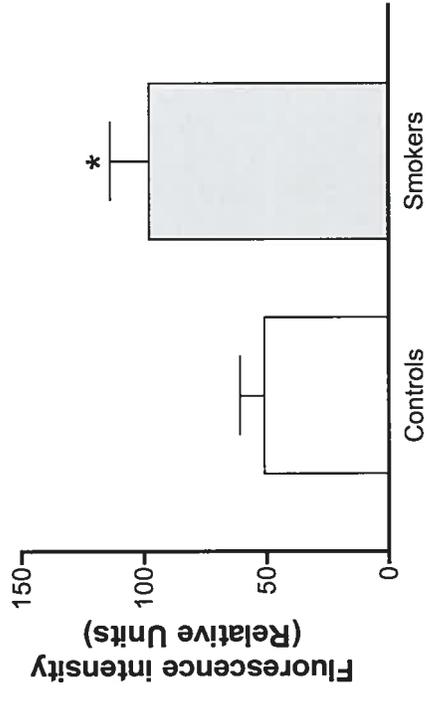


Figure 4.

A



ROS Generation

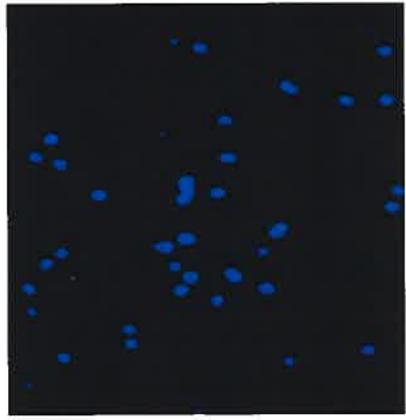
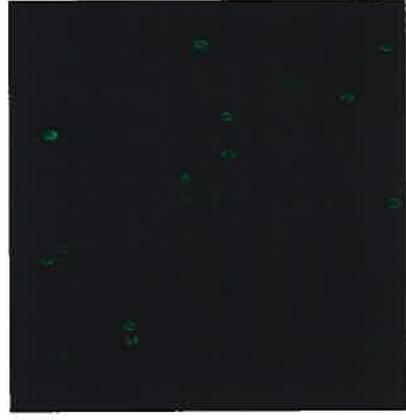


B

Controls

ROS

DAPI



Smokers

ROS

DAPI

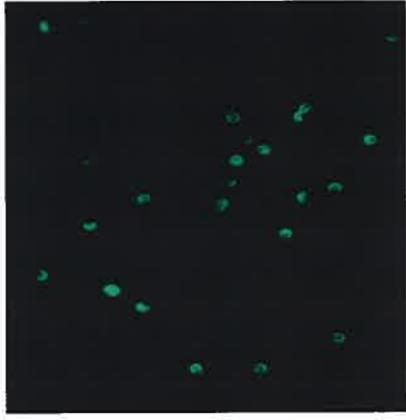
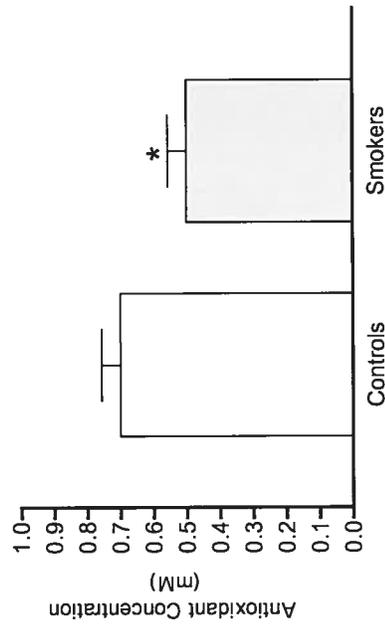


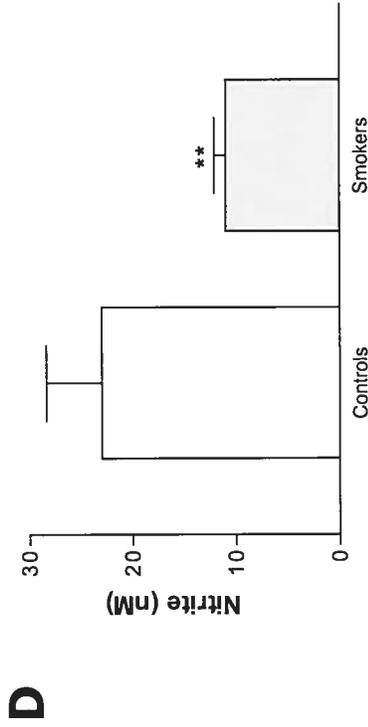
Figure 5.

Plasma Antioxidant Levels

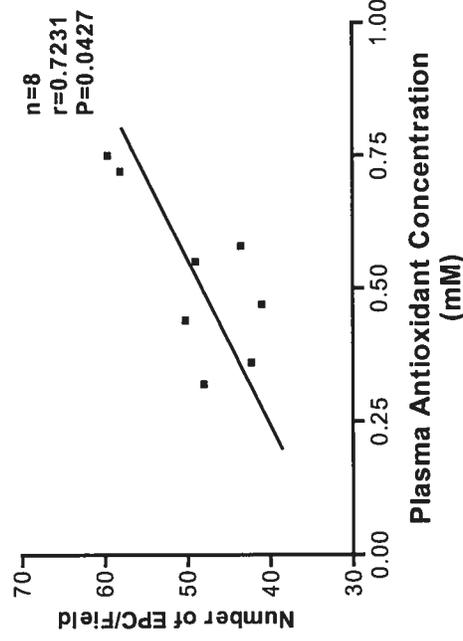


A

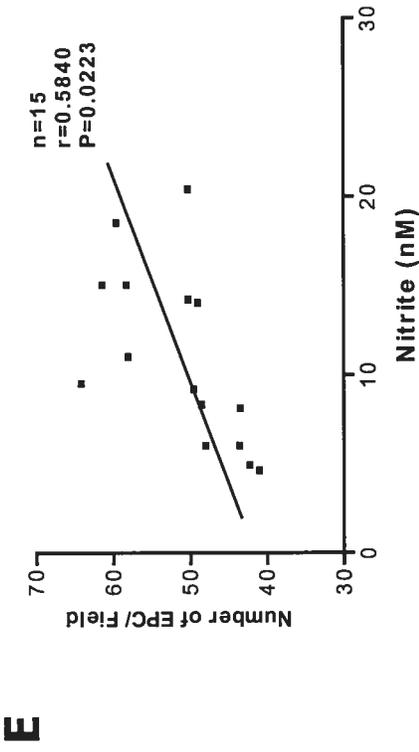
Nitric Oxide Release From Plasma



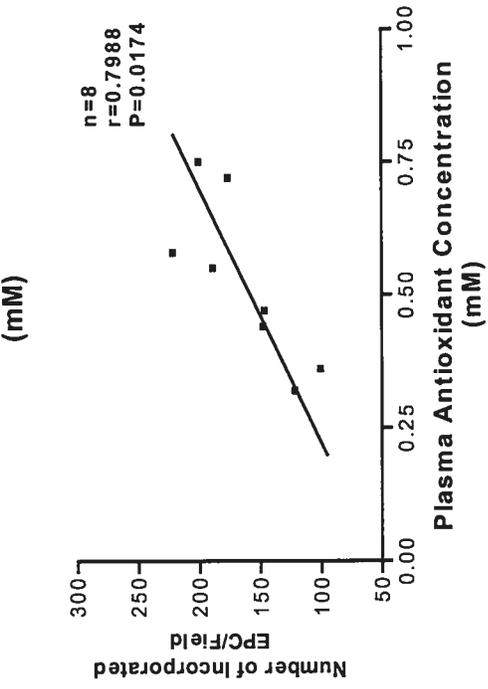
D



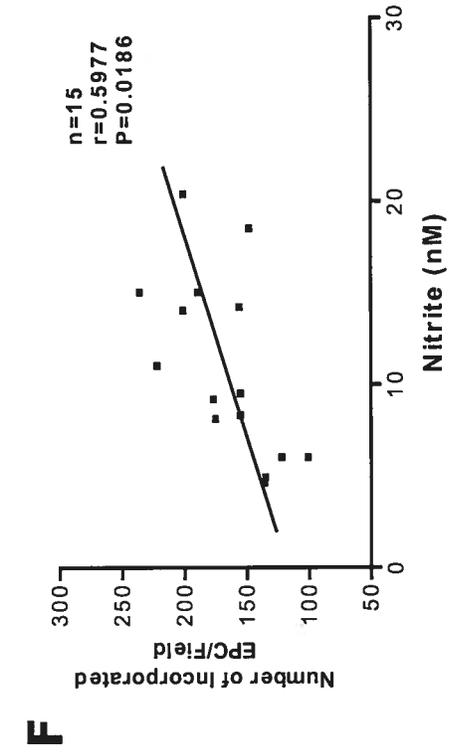
B



E



C



F

Figure 6.

3.DISCUSSION

Le tabagisme représente l'une des causes majeures de morbidité et de mortalité des pays industrialisés. Les fumeurs meurent en moyenne 8 ans avant les non-fumeurs (Ezzati and Lopez 2003). La principale cause de mortalité liée au tabagisme est l'infarctus du myocarde (Kannel and Abbott 1984). Cette surmortalité semble donc principalement attribuable à l'augmentation de la prévalence des maladies cardiovasculaires ischémiques. Il est maintenant bien établi que le tabagisme accélère le processus d'athérosclérose (Howard, Wagenknecht et al. 1998). Son action athérogène semble liée à de nombreuses altérations portant sur la fonction endothéliale, le tonus vasculaire, l'hémostase, les lipides et les cellules inflammatoires. Outre une accélération du développement de l'athérosclérose, le tabagisme favorise également la survenue d'accidents cardiovasculaires aigus. Les complications aiguës du tabagisme sont le résultat d'effets complexes qui se caractérisent par l'induction d'un état d'hypercoagulabilité, une réduction du transport et de la délivrance de l'oxygène, une libération de catécholamines et une vasoconstriction. Les effets néfastes aigus et chroniques du tabagisme entraînent donc une augmentation des besoins en oxygène, alors que les apports sanguins sont diminués. Cette altération de la balance en oxygène est à l'origine de l'hypoxie au niveau du myocarde et des muscles périphériques. Dans une situation d'ischémie et d'hypoxie, l'organisme s'adapte en développant un nouveau réseau vasculaire afin d'irriguer le tissu en nutriments et en oxygène et ainsi maintenir son intégrité. Bien que plusieurs phénotypes cliniques semblent reconnus comme modulateurs de la formation de nouveaux vaisseaux en réponse à l'ischémie, l'effet du tabagisme sur la

néovascularisation post-ischémie demeure obscur. Les résultats du présent projet de recherche démontrent que l'exposition à la fumée de cigarette entraîne une diminution de la néovascularisation en réponse à l'hypoxie ou suite à une stimulation par le VEGF. Nos études démontrent aussi que le tabagisme diminue la néovascularisation en inhibant à la fois l'angiogenèse et la vasculogenèse.

La première étude du projet de recherche visait à évaluer *in vitro* et *in vivo* l'effet de l'exposition à la fumée de cigarette sur l'angiogenèse en réponse à l'ischémie. *In vitro*, nous avons démontré au moyen d'essais de matrigel que les cellules endothéliales humaines de veine ombilicale (HUVECs) exposées à une solution d'extraits de fumée de cigarette (CSE) formaient moins de tubules en situation d'hypoxie. *In vivo*, nous avons utilisé un modèle murin d'ischémie du membre inférieur afin d'évaluer l'effet de l'exposition à la fumée de cigarette sur l'angiogenèse en réponse à l'ischémie. Chez les souris exposées à la fumée de cigarette, la récupération du flux sanguin (évaluée par Laser Doppler) était nettement inférieure à celle observée chez les souris contrôles. Cet effet néfaste du tabagisme a pu être confirmé au niveau microvasculaire en évaluant la densité capillaire à l'aide d'un marquage immuno-histologique des cellules endothéliales, le CD31. Ainsi, la densité capillaire était également substantiellement réduite chez les souris exposées à la fumée de cigarette. Plusieurs mécanismes potentiellement impliqués dans l'inhibition de l'angiogenèse par le tabagisme peuvent être suggérés.

L'angiogenèse est un processus complexe considéré comme la succession de plusieurs étapes dans lesquelles les cellules endothéliales jouent un rôle central: 1)

dissolution de la matrice de soutien des cellules endothéliales; 2) migration, adhésion et prolifération des cellules endothéliales; 3) différenciation des cellules mésenchymateuses et production d'une nouvelle matrice extracellulaire; 4) formation d'une nouvelle structure tubulaire (Munoz-Chapuli, Quesada et al. 2004). Le VEGF est un facteur de croissance angiogénique ayant comme cible principale les cellules endothéliales. Ainsi, il participe à chacune des étapes de l'angiogenèse (Shibuya 2001). En présence d'une ischémie vasculaire chronique, le VEGF est induit via des éléments de réponse à l'hypoxie localisés au niveau du promoteur du gène. Ces éléments sont des sites de liaison pour un facteur de transcription spécifique, le HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor). Suite à la stabilisation du HIF-1 α par l'hypoxie et à sa dimérisation avec le HIF-1 β , l'induction de la transcription de l'ARNm du VEGF est médiée par la liaison de ce dimère (HIF-1) à un site de liaison sur le promoteur du gène du VEGF, l'élément de réponse à l'hypoxie (hypoxia responsive element, HRE) (Semenza 2000). La réponse angiogénique à l'ischémie semble être dépendante de cette voie de signalisation. Nos résultats démontrent que l'exposition à la fumée de cigarette inhibe l'expression protéique du VEGF en condition d'hypoxie ou dans le muscle ischémique. L'exposition à la fumée de cigarette est également associée à une réduction de l'expression protéique du HIF-1 α , à une diminution de l'activité de liaison à l'élément de réponse à l'hypoxie (HRE), et à une diminution de la demi-vie du HIF-1 α . Afin de renverser l'inhibition de l'expression du HIF-1 α par l'exposition à la fumée de cigarette en réponse à l'ischémie, nous avons utilisé un vecteur adénovirus. Le ad.HIF-1 α /VP-16 est un vecteur codant pour un facteur de transcription hybride (HIF-1 α /VP-16) qui, contrairement au HIF-1 α , est stable en

normoxie et en hypoxie. Ce facteur de transcription se lie au site sur le promoteur du gène du VEGF (HRE) afin d'induire la transcription de l'ARNm du VEGF. Lorsque les HUVECs exposées au CSE sont infectées avec ce vecteur, l'expression du VEGF est récupérée ainsi que la formation de tubules. De la même façon, lorsque ce vecteur est injecté au moment de la chirurgie dans le muscle de souris exposées à la fumée de cigarette, l'expression musculaire du VEGF et le flot sanguin sont récupérés.

Ces résultats suggèrent que l'exposition à la fumée de cigarette interfère avec la stabilisation du HIF-1 α dans des conditions d'hypoxie, empêchant son accumulation et entravant l'activation transcriptionnelle du VEGF. La dégradation du HIF-1 α est un processus complexe qui fait intervenir différents médiateurs. HIF-1 α est induit lors de l'hypoxie par un mécanisme post-traductionnel. La partie C-terminale de la protéine comporte un domaine sensible à l'oxygène (oxygen dependent degradation domain, ODD) qui, dans des conditions de normoxie, est rapidement ubiquitinylée et dégradée dans le protéasome. Cette dégradation rapide est médiée par le facteur Von Hippel Lindau (VHL) qui lie HIF-1 α et induit son ubiquitination (Maxwell, Wiesener et al. 1999; Tanimoto, Makino et al. 2000). En condition d'hypoxie, la stabilité du HIF-1 α est assurée par différents mécanismes (Semenza 2000; Semenza 2000; Semenza 2002). La voie de signalisation PI-3K/PIP₃/Akt semble être particulièrement impliquée dans la stabilisation de la protéine HIF-1 α par l'hypoxie (Minet, Michel et al. 2001). En effet, il a été rapporté que l'utilisation de mutants dominants négatifs soit pour le PI-3K ou pour l'Akt inhibe l'activation du HIF-1 et empêche la surexpression du VEGF en réponse à l'hypoxie (Zundel, Schindler et al. 2000; Minet, Michel et al. 2001). D'après

plusieurs études, l'hypoxie active cette voie via deux mécanismes. Premièrement, il semble que l'hypoxie induise la production de petites quantités d'espèces radicalaires dérivées de l'oxygène (ROS) par les mitochondries ou par la voie dépendante de la NADPH-oxydase. Une stimulation ponctuelle du PI-3K par les ROS activerait la voie de signalisation et empêcherait la dégradation du HIF-1 α par le protéasome (Chandel, Maltepe et al. 1998; Ushio-Fukai, Alexander et al. 1999; Chandel, McClintock et al. 2000). Il a aussi été démontré qu'en normoxie, le phospho-inositol-triphosphates (PIP₃) était dégradé par une phosphatase, la PTEN (tumor suppressor factor phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10). Cette dégradation empêche l'activation de l'Akt et l'expression du VEGF (Sun, Lesche et al. 1999; Zhong, Chiles et al. 2000; Zundel, Schindler et al. 2000). L'hypoxie inhibe le PTEN ce qui entraîne la phosphorylation d'Akt, la stabilisation du HIF-1 α et l'expression du VEGF (Iyer, Kotch et al. 1998). Dans cette étude, bien que nous démontrons que l'exposition à la fumée de cigarette accélère la dégradation du HIF-1 α , les mécanismes impliqués dans ce processus demeurent obscurs. Cependant, une étude parue en 1999 indique que le monoxyde de carbone inhibe l'activité de liaison de HIF-1 au HRE en entravant l'accumulation de la protéine HIF-1 α (Huang, Willmore et al. 1999). Le monoxyde de carbone est un constituant important de la fumée de cigarette. L'augmentation de la dégradation du HIF-1 α par l'exposition à la fumée de cigarette observée dans notre étude pourrait ainsi être expliquée par la présence du monoxyde de carbone. De plus, à la lueur des résultats obtenus au cours de la deuxième étude, d'autres hypothèses peuvent être avancées pour expliquer la dégradation du HIF-1 α par la fumée de cigarette. Dans notre modèle *in vitro*, nous

avons démontré que l'exposition des HUVECs au CSE augmentait substantiellement la génération intracellulaire de ROS. Cette production excessive de ROS était associée à une altération de l'activation de la voie de signalisation PI-3K/Akt. Le tabagisme, en augmentant la génération intracellulaire de ROS, pourrait donc inhiber l'activation de la voie de signalisation PI-3K/Akt et ultimement la stabilisation du HIF-1 α en situation d'hypoxie. Cette hypothèse pourrait être investiguée premièrement en évaluant les niveaux de stress oxydant dans le muscle ischémique à différents temps (avant la chirurgie, et aux jours 3, 7 et 14 post-ischémie) en mesurant le degré de nitration des protéines (un bon indice de la présence de ROS particulièrement de peroxynitrites). De plus, il serait très intéressant de tester l'impact d'un traitement d'antioxydants sur ces niveaux de ROS et ultimement sur la récupération du flux sanguin, la densité capillaire et la voie de signalisation VEGF/HIF-1 α .

Il a aussi été démontré que le tabagisme entraînait des mutations pouvant modifier l'activité de la PTEN (Anderson and Bozinovski 2003). De cette façon, une augmentation de l'activité de la PTEN favoriserait la dégradation du PIP₃, empêchant ainsi la phosphorylation de l'Akt et la stabilisation du HIF-1 α . Cette hypothèse pourraient être investiguée en évaluant l'expression et l'activité de la PTEN dans notre modèle.

En plus de son effet délétère sur la voie de signalisation HIF-1 α /VEGF, d'autres mécanismes peuvent être impliqués dans l'inhibition de la néovascularisation par le tabagisme. Notre deuxième étude visait à évaluer l'effet de

l'exposition à la fumée de cigarette sur la réponse endothéliale suite à une stimulation par le VEGF. Tel que discuté précédemment, l'angiogenèse est un processus complexe dans lequel les cellules endothéliales jouent un rôle primordial. L'intégrité de la fonction endothéliale est donc essentielle afin de s'assurer d'une réponse angiogénique adéquate. Le VEGF agit via ses récepteurs (Flt-1/KDR) situés sur les cellules endothéliales et active plusieurs voies intracellulaires qui induisent la perméabilité vasculaire, la migration, la prolifération endothéliale et la formation de tubules (Gerber, McMurtrey et al. 1998). De récentes études indiquent que le NO est un important médiateur des effets induits par le VEGF, notamment en ce qui concerne la perméabilité vasculaire, la migration endothéliale et la formation de tubules (Morbidelli, Chang et al. 1996; Murohara, Witzenbichler et al. 1999). En effet, il a été démontré que le VEGF active la synthèse du monoxyde d'azote (eNOS) via la voie de signalisation PI-3K/Akt, entraînant la relâche de NO. L'inhibition de l'activité de eNOS atténue la migration des cellules endothéliales *in vitro* et l'angiogenèse *in vivo* suite à une stimulation avec le VEGF. Ainsi, l'importance du NO dans l'angiogenèse post-natale semble bien documentée.

Le tabagisme est associé à une dysfonction endothéliale caractérisée par une réduction de la production de facteurs protecteurs, notamment le NO (Higman, Strachan et al. 1996; Tsuchiya, Asada et al. 2002; Tentolouris, Tousoulis et al. 2004). Cette altération des fonctions endothéliales se manifeste par l'apparition d'une vasoconstriction à l'acétylcholine et par une réduction de la vasodilatation flux-dépendante (Heitzer, Yla-Herttuala et al. 1996; Rajj, DeMaster et al. 2001; Burke and Fitzgerald 2003; Ambrose and Barua 2004). Différentes hypothèses ont été

proposées pour expliquer cette diminution de la biodisponibilité du monoxyde d'azote par le tabagisme: réduction de l'expression de la NO synthase ou modification post-traductionnelle diminuant son activité, réduction de la disponibilité en substrat (L-arginine), en cofacteurs (BH4), altération des systèmes transmembranaires de transduction des signaux (récepteur, protéine G) ou enfin une majoration de la dégradation du NO par l'augmentation du stress oxydant (anion superoxyde) (Wang 2000; Wang, Sim et al. 2000; Tsuchiya, Asada et al. 2002; Vleeming, Rambali et al. 2002; Barua, Ambrose et al. 2003; Tentolouris, Tousoulis et al. 2004).

Les résultats de notre deuxième étude indiquent que l'exposition à la fumée de cigarette entrave la réponse endothéliale suite à une stimulation au VEGF. De plus, nous démontrons que l'exposition à la fumée de cigarette réduit la relâche endothéliale de NO induite par le VEGF, vraisemblablement via la voie Akt/eNOS. De façon intéressante, l'exposition des cellules endothéliales à la fumée de cigarette inhibait sélectivement la migration et non la prolifération. Cette observation est supportée par d'autres études démontrant que l'inhibition de la eNOS atténue principalement la migration endothéliale mais non la prolifération (Murohara, Witzenbichler et al. 1999; Chavakis, Dernbach et al. 2001; Urbich, Dernbach et al. 2002). Globalement, nos résultats indiquent que l'exposition à la fumée de cigarette compromet la réponse angiogénique induite par le VEGF via une diminution de la libération de NO par les cellules endothéliales.

Le mécanisme par lequel l'exposition à la fumée de cigarette entrave la libération de NO et la réponse angiogénique induite par le VEGF semble impliquer

la formation d'espèces radicalaires dérivées de l'oxygène. Dans la fumée de cigarette, plus de 4000 composés et une quantité importante de ROS ont été identifiés. (Smith and Fischer 2001). Certaines de ces substances sont des radicaux libres alors que d'autres, en étant cytotoxiques, vont induire l'activation cellulaire et la production de ROS via différentes voies: chaîne de transport d'électrons, la voie de la xanthine oxydase, de la NADPH-oxydase, des myéloperoxydases, de la cyclooxygénase et de la lipooxygénase (Burke and Fitzgerald 2003; Ambrose and Barua 2004; van der Vaart, Postma et al. 2004). Finalement, certains composés interagissent avec des intermédiaires du métabolisme cellulaires pour produire des ROS. Nos résultats démontrent que les cellules endothéliales exposées au CSE génèrent davantage de ROS et que cette surproduction peut être prévenue par un traitement antioxydant avec le N-acétylcystéine (NAC) ou la vitamine C. De plus, le NAC et la vitamine C récupèrent la relâche endothéliale de NO ainsi que la migration et la formation de tubules par les HUVECs exposées au CSE. Ces résultats corroborent ceux obtenus par d'autres groupes de recherche démontrant que le stress oxydant inhibe la migration endothéliale et l'angiogenèse. En effet, Urbich et coll. ont démontré qu'une induction de la synthèse intracellulaire de ROS par le ligand CD40 inhibait la migration des cellules endothéliales et la formation de tubules (Urbich, Dernbach et al. 2002). Dans cette étude, l'effet délétère observé suite à une augmentation intracellulaire de ROS pouvait aussi être renversé par un traitement avec le NAC et la vitamine C. Une autre étude démontre que les LDL oxydées inhibent la migration des cellules endothéliales induite par le VEGF via une déphosphorylation de Akt/eNOS et la relâche de NO (Chavakis, Dernbach et al.

2001). Globalement, ces résultats et nos données indiquent que le stress oxydant diminue la réponse angiogénique médiée par le VEGF en compromettant l'activation de la voie de signalisation Akt/eNOS/NO dans les cellules endothéliales. À cet égard, les peroxynitrites pourraient être particulièrement impliqués dans l'inhibition de cette voie de signalisation par le tabagisme. Les peroxynitrites sont produits suite à l'interaction entre l'anion superoxyde et le NO et leurs niveaux sont fortement augmentés chez les fumeurs (Yamaguchi, Kagota et al. 2000; Chehne, Oguogho et al. 2001; Nia, Van Schooten et al. 2001; Dietrich, Block et al. 2002; Miller, Pankow et al. 2003; Yamaguchi, Matsuno et al. 2004). Certains auteurs ont démontré que les peroxynitrites inactivent la fonction de survie cellulaire induite par le VEGF en inhibant la phosphorylation de Akt et eNOS et en activant la MAPK p38 (Zou MH, Hou XY et al 2002; El-Remmessy AB, Bartoli M, et al 2004). En contre partie, des groupes de chercheurs soutiennent que la formation de peroxynitrites pourrait ne pas être cytotoxique tel que suggéré. En effet, en présence de niveaux suffisants de glutathione, les peroxynitrites se transformeraient en nitroso-glutathione, une molécule libérant du NO (Navarro-Antolin J, Lopez-Munoz MJ et al 2001; Moro MA, Darley-Usmar VM et al. 1994).

Afin d'évaluer cette hypothèse, les niveaux de peroxynitrites pourraient être évalué de différentes façons soit via l'évaluation de la nitration des protéines, l'oxydation du composé dihydrorhodamine 123 ou via une réaction de chemiluminescence en utilisant le LumH₂ (Tarpey MM, Fridovich I., 2001). De plus, l'effet d'un traitement antioxydant sur les niveaux de peroxynitrites ainsi que sur

l'activité de Akt et eNOS dans notre système pourrait être évalué afin de cerner l'implication de ce radical oxygéné.

Chez le fumeur la présence d'un stress oxydant est reflétée par la diminution tissulaire et plasmatique des vitamines antioxydantes (Alberg 2002; Kelly 2002; Kelly 2002; Barua, Ambrose et al. 2003; Kelly 2003). De plus, plusieurs marqueurs du stress oxydant sont retrouvés en abondance aux niveaux plasmatique, tissulaire et urinaire (Yamaguchi, Kagota et al. 2000; Chehne, Oguogho et al. 2001; Nia, Van Schooten et al. 2001; Dietrich, Block et al. 2002; Miller, Pankow et al. 2003; Yamaguchi, Matsuno et al. 2004). Ainsi, plusieurs auteurs soutiennent que les effets délétères du tabagisme seraient essentiellement la conséquence de l'action des ROS et des radicaux libres. De plus, plusieurs études montrent que les fumeurs bénéficient d'un supplément d'antioxydants. En effet, le dysfonctionnement endothélial associé au tabagisme semble être réversible par l'administration continue de vitamines antioxydantes, notamment la vitamine C et E. La L-arginine, la taurine, le BH4 et certains inhibiteurs d'enzymes produisant des radicaux libres peuvent également normaliser la vasodilatation chez le fumeur (Heitzer, Just et al. 1996; Campisi, Czernin et al. 1999; d'Uscio, Milstien et al. 2003; Fennessy, Moneley et al. 2003; Guthikonda, Sinkey et al. 2003). Nos résultats démontrant qu'un traitement d'antioxydants diminue la génération de ROS, récupère la phosphorylation de Akt et eNOS et préserve la réponse angiogénique appuient ces études.

Jusqu'à maintenant nous avons convenu que les ROS avaient principalement un effet néfaste sur la fonction endothéliale. Cependant, une certaine libération de ROS semble être essentielle pour la physiologie vasculaire normale et la réponse

angiogénique. En effet, bien qu'initialement les ROS aient été associés à des effets cellulaires principalement toxiques et pro-apoptotiques, un nombre croissant d'études suggèrent que les ROS agissent aussi comme d'importants médiateurs de la réponse physiologique cellulaire. Ainsi, il a été démontré que les ROS jouaient un rôle majeur dans la prolifération, la migration endothéliale et l'angiogenèse (Shono, Ono et al. 1996; Abid, Kachra et al. 2000; Moldovan, Moldovan et al. 2000). Cette dualité dans le rôle des ROS sur la fonction endothéliale s'expliquerait principalement par la quantité de ROS produite et la durée de la stimulation. Ainsi, les effets délétères induits par les ROS ont été observés suite à une production importante de ROS sur un laps de temps considérable alors qu'à l'inverse, une petite production ponctuelle favoriserait une réponse cellulaire physiologique (Finkel 1998; Moldovan, Moldovan et al. 2000).

L'effet délétère du tabagisme sur la migration endothéliale semble aussi impliquer les intégrines. Les intégrines constituent une famille de récepteurs transmembranaires formés de deux chaînes: alpha et bêta. Elles sont impliquées dans les interactions cellules-cellules et cellules-matrice extracellulaire et jouent un rôle important dans la différenciation, l'adhésion, la migration cellulaire et l'angiogenèse (Horton 1997; Lee, Kibbe et al. 2000; Zheng, Woodard et al. 2000). Une diminution de l'expression des intégrines $\alpha v \beta_3$, $\alpha v \beta_5$ et $\alpha 5 \beta_1$ par des mutants dominants négatifs ou par l'utilisation d'anticorps neutralisant antagonise la néovascularisation induite par le VEGF et le bFGF. De façon intéressante, le NO augmente l'expression de l'intégrine $\alpha v \beta_3$ et favorise la migration des cellules endothéliales (Lee, Kibbe et al. 2000). Nos résultats indiquent que l'exposition des cellules endothéliales au CSE

diminue l'expression des intégrines $\alpha v\beta_3$, $\alpha v\beta_5$, $\alpha 5\beta_1$, $\alpha 2\beta_1$. Ainsi, l'inhibition de l'expression de ces intégrines pourrait être impliquée dans le défaut de migration des cellules endothéliales et l'inhibition de la formation tubulaire suite à l'exposition au CSE. Étant donné qu'une réduction de la relâche de NO par le CSE est observée dans notre modèle, celle-ci pourrait être à l'origine de la diminution d'expression des intégrines $\alpha v\beta_3$ et $\alpha v\beta_5$ tel que décrit par d'autres groupes de recherche (Lee, Kibbe et al. 2000; Yaroslavskiy, Li et al. 2004).

L'influence du stress oxydant sur l'expression des intégrines dans notre modèle n'est pas complètement élucidé. En effet, bien qu'un traitement au NAC et à la vitamine C récupère la relâche endothéliale de NO, l'expression des intégrines n'est que très légèrement augmentée par ce traitement. Outre le NO, les intégrines sont régulées par diverses voies de signalisation et/ou des molécules de surface et certains récepteurs de facteurs de croissance. Ainsi, il a été rapporté que l'activité des intégrines dépendait de l'activité d'autres intégrines et de leur coopération avec les récepteurs au PDGF, au VEGF et à l'insuline (Schneller, Vuori et al. 1997; Borges, Jan et al. 2000). D'autres molécules de surface, voies de signalisation ou récepteurs pourraient être affectés par l'exposition à la fumée de cigarette et diminuer l'expression des intégrines dans notre modèle.

Cette deuxième étude propose donc un autre mécanisme par lequel le tabagisme altère la néovascularisation. Alors que la première étude démontrait que la réponse à l'hypoxie et l'expression du HIF-1 α et du VEGF étaient diminuées par l'exposition à la fumée de cigarette, la seconde étude démontre que les cellules endothéliales exposées à la fumée de cigarette ont un défaut de réponse suite à une

stimulation par le VEGF. Cette découverte a différentes implications cliniques. Il est bien connu que le tabagisme est associé au développement précoce de l'athérosclérose. Cependant, les mécanismes impliqués dans cette physiopathologie ne sont pas encore entièrement élucidés. L'intégrité endothéliale est primordiale afin de maintenir la fonction de la paroi vasculaire. Une conséquence de la lésion endothéliale est le développement accéléré de l'athérosclérose. Ainsi, suite à une insulte vasculaire, il est impératif de restaurer l'endothélium afin de préserver l'équilibre vasculaire. La migration endothéliale est une étape essentielle à la restauration de l'endothélium. De façon intéressante, l'expression du VEGF se trouve augmentée suite à une insulte endothéliale dans différents modèles animaux (Tsurumi, Murohara et al. 1997; Gennaro, Menard et al. 2003). De plus, il a été démontré que la supplémentation locale de VEGF au niveau de l'insulte endothéliale favorise la réendothélialisation et réduit la formation néointimale suite à une angioplastie (Asahara, Bauters et al. 1995; Asahara, Bauters et al. 1995; Asahara, Chen et al. 1996; Gennaro, Menard et al. 2003). Par conséquent, il peut être proposé que l'exposition à la fumée de cigarette inhibe la migration endothéliale induite par le VEGF et la réendothélialisation suite à une insulte vasculaire. Ce phénomène pourrait donc contribuer au développement de l'athérosclérose et à la survenue d'événements ischémiques aigus chez les patients exposés à la fumée de cigarette. Ensuite, les patients atteints de maladies cardiovasculaires et qui continuent de fumer risquent de présenter davantage de symptômes associés à l'ischémie (angine de poitrine et claudication intermittente) car la néovascularisation post-ischémie est

compromise chez le fumeur. Finalement, le tabagisme pourrait être un facteur limitant pour l'efficacité de l'angiogenèse thérapeutique basée sur le VEGF.

La néovascularisation était classiquement perçue comme étant la conséquence de l'action locale de cellules endothéliales matures. Cependant, il a récemment été démontré que certaines cellules non différenciées participaient à la formation des vaisseaux sanguins chez l'adulte. En effet, des groupes de recherche ont démontré qu'il était possible d'isoler à partir du sang périphérique et de la moelle osseuse des cellules sanguines progénitrices qui expriment plusieurs marqueurs spécifiques aux cellules endothéliales et qui peuvent se différencier en cellules endothéliales matures *in vitro* (Asahara, Murohara et al. 1997; Asahara, Masuda et al. 1999; Hristov, Erl et al. 2003). La mobilisation et la différenciation des EPCs sont favorisées par divers facteurs dont le VEGF, le NO, l'angiopoïétine-1, le FGF, le GM-CSF, le MMP-9 et certains agents pharmacologiques (Hristov, Erl et al. 2003; Szmítko, Fedak et al. 2003). Une fois mobilisées, les EPCs nichent aux sites d'ischémie, relâchent des facteurs de croissance (VEGF, SDF-1, IGF-1, HGF) et participent à la néovascularisation physiologique ou pathologique (Pearson 2003). Certaines évidences suggèrent que les EPCs peuvent représenter jusqu'à 90% des cellules endothéliales d'un capillaire nouvellement formé. Bien que le pourcentage d'incorporation dans la structure vasculaire des EPCs varie beaucoup d'une étude à l'autre (0% à 90%), l'ensemble des données suggère que la néovascularisation post-natale puisse avoir lieu par vasculogénèse, c'est-à-dire sans bourgeonnement de vaisseaux préexistants (Murayama and Asahara 2002). Les EPCs représentent un

intérêt majeur pour l'élaboration de thérapies cellulaires novatrices. En effet, de récentes études ont démontré qu'une transplantation d'EPCs pouvait favoriser la récupération du flot sanguin suite à l'ischémie d'un membre inférieur (Tateishi-Yuyama, Matsubara et al. 2002), protéger contre le développement de l'athérosclérose et augmenter la viabilité du myocarde suite à un infarctus (Assmus, Schachinger et al. 2002; Strauer, Brehm et al. 2002; Britten, Abolmaali et al. 2003; Stamm, Westphal et al. 2003). Il est aussi intéressant de noter que le nombre des EPCs ainsi que leur fonction sont affectés par la présence de facteurs de risque de la maladie cardiovasculaire ischémique (Vasa, Fichtlscherer et al. 2001). L'effet spécifique du tabagisme sur le nombre et la fonction des EPCs a fait l'objet de quelques études mais les résultats obtenus demeurent contradictoires. Une première étude réalisée chez des patients présentant une multitude de facteurs de risque de maladies cardiovasculaires démontre que le tabagisme est le principal facteur de risque diminuant les niveaux de EPCs. Cependant, dans cette étude le tabagisme n'avait aucune influence sur la migration des EPCs (Vasa, Fichtlscherer et al. 2001). En contre partie, une autre étude menée chez des patients présentant ou non des facteurs de risque cardiovasculaires démontre que le tabagisme n'influence pas le nombre de EPCs (Hill, Zalos et al. 2003). Finalement, une dernière étude démontre que les niveaux de EPCs sont diminués chez les fumeurs et propose que l'arrêt du tabagisme restaure les EPCs en circulation (Kondo, Hayashi et al. 2004). Ces divergences peuvent possiblement être expliquées par le nombre limité de fumeurs dans certaines études (Hill, Zalos et al. 2003) et/ou la difficulté d'isoler le rôle spécifique du tabagisme en présence d'autres facteurs de risque confondants (Vasa,

Fichtlscherer et al. 2001; Hill, Zalos et al. 2003) et/ou la technique et les marqueurs spécifiques utilisés pour isoler et compter les EPCs (Kondo, Hayashi et al. 2004)

Notre troisième projet de recherche visait donc à évaluer directement l'impact du tabagisme sur le nombre et la fonction des cellules endothéliales progénitrices chez des sujets exempts de symptômes associés à l'athérosclérose et ne présentant aucun facteur de risque cardiovasculaire. Dans cette étude, nous démontrons que les EPCs isolées de fumeurs sains sont diminuées en nombre et possèdent une activité angiogénique moindre que les EPCs isolées de sujets contrôles. La néovascularisation impliquant les cellules endothéliales dérivées de la moelle osseuse est divisée en trois étapes principales soit la mobilisation des cellules souches, la différenciation des cellules souches en cellules endothéliales, et finalement leur incorporation dans la structure vasculaire ou l'endothélium du vaisseau nouvellement formé. Les résultats de notre étude indiquant que le nombre de EPCs est diminué chez les fumeurs impliquent que la mobilisation, la différenciation ou la demi-vie des EPCs puissent être affectées par l'exposition à la fumée de cigarette. Les mécanismes responsables de la diminution du nombre de EPCs par le tabagisme ne sont pas encore élucidés mais certaines hypothèses peuvent être avancées.

Premièrement, il est à noter que le décompte de EPCs est fait suite à la différenciation des cellules mononucléées provenant du sang périphérique grâce au double marquage DiI-acLDL et FITC-Lectin. Ainsi, la diminution du nombre de EPCs observée dans notre étude pourrait être attribuée à une augmentation de la

mortalité cellulaire dans nos conditions de culture, à une altération de la capacité des EPCs à adhérer à la fibronectine, ou à une incapacité des EPCs à se différencier dans nos conditions de culture cellulaire.

Plusieurs études soutiennent que l'exposition in vivo ou in vitro à la fumée de cigarette est toxique/létale et induit une mortalité cellulaire prématurée. Le mécanisme de mort cellulaire impliqué dans ce processus ne fait pas l'unanimité. Ainsi, plusieurs groupes mentionnent que l'exposition à la fumée de cigarette aurait un effet pro-apoptotique (Kasahara, Tuder et al. 2001; Tithof, Elgayyar et al. 2001; Wang, Wilcken et al. 2001; Tithof, Elgayyar et al. 2002; Carnevali, Petruzzelli et al. 2003) alors que d'autres auteurs soutiennent que le tabagisme induit la nécrose cellulaire (Bernhard, Pfister et al. 2003; Wickenden, Clarke et al. 2003). À la lueur de ces résultats, nous avons d'abord cru que le nombre diminué de EPC observé dans notre modèle puisse être le reflet d'une mortalité cellulaire accrue. Cependant, suite à l'analyse de l'apoptose (Annexine V et TUNEL) et de la nécrose (marquage de l'ADN au propidium iodide) au premier jour et 4 jours après l'isolation des EPCs, aucune différence significative n'a pu être détectée entre le groupe de sujets contrôles (n=8) et le groupe de fumeurs (n=8). Il semble donc improbable qu'une augmentation de l'apoptose ou de la nécrose soient des mécanismes impliqués dans la diminution du nombre de EPCs observée dans notre étude.

Une incapacité des EPCs à se différencier dans nos conditions de culture cellulaire ou une altération de la capacité des EPCs à adhérer à la fibronectine seraient d'autres mécanismes envisageables. Les résultats obtenus en cytométrie (FACS) nous indiquent en effet que certains marqueurs spécifiques aux cellules

endothéliales dont le VE-cadherine, le KDR et le vWF sont sous-exprimés chez les EPCs de fumeurs par rapport aux EPCs de sujets contrôles. Ces résultats indiquent que le tabagisme altère la différenciation des cellules souches dans nos conditions de culture. De plus, il est intéressant de noter que le VE-cadhérine exprimé à la surface de la membrane plasmique des cellules endothéliales est essentiel pour l'adhésion de la cellule à la fibronectine. Par conséquent, les EPCs exprimant moins les marqueurs spécifiques des cellules endothéliales auront plus de difficulté à adhérer à la fibronectine, expliquant possiblement leur nombre moins élevé.

Un autre mécanisme qui pourrait permettre d'expliquer la diminution du nombre des EPCs chez les fumeurs est l'inhibition de la mobilisation des cellules souches à partir de la moelle osseuse. Plusieurs études ont démontré l'importance de l'activité de la eNOS et la relâche de NO dans la mobilisation des cellules souches (Aicher, Heeschen et al. 2003; Iwakura, Luedemann et al. 2003; Landmesser, Engberding et al. 2004). Il est bien connu que le tabagisme diminue l'activité de la eNOS et la relâche de NO (Higman, Strachan et al. 1996; Barua, Ambrose et al. 2003; Tentolouris, Tousoulis et al. 2004). Les résultats obtenus dans cette étude démontrant que les concentrations plasmatiques de NO sont diminuées chez les fumeurs corroborent ces données. Conséquemment, nous suggérons que le tabagisme pourrait affecter la mobilisation des EPCs à partir de la moelle osseuse en diminuant la relâche de NO. Cette hypothèse pourrait être évaluée en mesurant directement, par cytométrie en flux, les EPCs en circulation dans le sang des sujets fumeurs ou non-fumeurs et corrélés avec les niveaux de NO mesurés au même moment. De plus, des

donneurs de NO pourraient être administrés chez les fumeurs afin d'évaluer si la restauration de NO chez ces sujets influence les EPCs en circulation.

Finalement, de récentes données indiquent que les EPCs peuvent adhérer aux vaisseaux présentant des lésions endothéliales, ce qui peut favoriser la réendothélialisation et diminuer le développement de l'athérosclérose (Iwakura, Luedemann et al. 2003; Dimmeler and Zeiher 2004; Kong, Melo et al. 2004). Le tabagisme est un facteur de risque important associé au dommage endothélial et au développement accéléré de l'athérosclérose. Ainsi, la diminution du nombre de EPCs observée dans notre étude pourrait être expliquée par le fait que les EPCs mobilisées de la moelle osseuse sont utilisées aux sites de lésions endothéliales afin de favoriser la réendothélialisation et le maintien de l'intégrité vasculaire. Cette hypothèse pourrait être investiguée à l'aide d'un modèle animal exposé de façon chronique à la fumée de cigarette, dans lequel on injecterait systématiquement des EPCs marqués avec un agent fluorescent par exemple. L'emplacement des EPCs pourrait être par la suite évalué grâce à la microscopie en fluorescence.

Outre une diminution du nombre de EPCs chez les fumeurs, nous avons tenté de déterminer si le tabagisme pouvait aussi altérer leur fonction. Jusqu'à présent quelques études ont étudié le phénomène de la dysfonction des EPCs. Premièrement, il a été rapporté que la migration des EPCs isolées de patients atteints de maladies cardiovasculaires était diminuée (Vasa, Fichtlscherer et al. 2001). La capacité de migrer des EPCs était négativement corrélée au nombre de facteur de risque de maladies cardiovasculaires présents chez le patient. Cependant, la migration n'était pas affectée par le tabagisme dans cette étude. Ensuite, la fonction des EPCs isolées

de patients diabétiques semble particulièrement affectée. Ainsi, deux groupes de chercheurs ont démontré que les EPCs de patients diabétiques ont une moindre propension à proliférer, à adhérer à une couche de cellules endothéliales, à incorporer la structure vasculaire et à induire une réponse angiogénique (Tepper, Galiano et al. 2002; Loomans, de Koning et al. 2004). Une récente étude mentionne aussi que les niveaux de LDL sont inversement proportionnels à la capacité des EPCs de migrer (Vasa, Fichtlscherer et al. 2001). La voie PI3k/Akt/eNOS semble particulièrement affectée. Ainsi, lorsqu'on incube des EPCs en présence de niveaux croissants de LDL, la phosphorylation de Akt/eNOS et la migration des EPCs diminuent (Imanishi, Hano et al. 2003). De façon intéressante, un traitement avec des inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase améliore la mobilisation, la différenciation et la prolifération des EPCs ainsi que la néovascularisation au niveau du myocarde (Dimmeler, Aicher et al. 2001; Llevadot, Murasawa et al. 2001; Assmus, Urbich et al. 2003; Landmesser, Engberding et al. 2004). Finalement, une étude menée par Choi et coll. chez des patients atteints d'insuffisance rénale chronique démontre que les EPCs isolées de ces patients migrent moins et incorporent difficilement un réseau vasculaire formé de cellules endothéliales matures (Choi, Kim et al. 2004). Nos résultats montrent qu'outre une diminution du nombre de EPCs, le tabagisme altère aussi leur fonction. Suite à une stimulation avec le VEGF, la prolifération, la migration et l'incorporation dans la structure vasculaire des EPCs de fumeurs sont diminuées lorsque l'on compare aux EPCs isolées de sujets contrôles. Tel qu'observé en cytométrie, cette diminution de l'activité angiogénique en réponse au VEGF peut sans doute être expliquée par la sous-expression du récepteur au VEGF, le KDR.

Une fois stimulé par le VEGF, le KDR médie une réponse angiogénique en activant plusieurs voies de signalisation (MAPK, PI3k/Akt, eNOS/NO) (Murohara, Horowitz et al. 1998; Mendelsohn and Karas 1999; Cross, Dixelius et al. 2003). Logiquement, en présence d'une expression réduite du récepteur KDR, l'intensité du signal induit par le VEGF et ultimement la réponse angiogénique des EPCs sont compromis.

D'autres mécanismes semblent aussi intervenir dans la dysfonction des EPCs chez les fumeurs. L'adhésion des EPCs à une couche de cellules endothéliales stimulées par le TNF- α (un essai réalisé sans stimulation au VEGF), est diminuée. L'essai d'adhésion des EPCs à une monocouche de cellules endothéliales matures nous permet de préciser certains mécanismes par lesquels les EPCs fonctionnent in vivo. Les EPCs vont d'abord s'attacher à l'endothélium et sécréter des facteurs de croissance afin de favoriser l'extension du réseau vasculaire (Bischoff J 1997). L'adhésion des EPCs à l'endothélium activé implique différentes molécules présentes à la surface des cellules responsables des interactions cellules-cellules et cellules-matrice extracellulaire (Bischoff 1997). Le VE-cadhérine est une molécule spécifique à l'endothélium et essentielle pour le développement de la vasculature chez l'embryon et pour la néovascularisation chez l'adulte (Carmeliet and Collen 2000). Le domaine extracellulaire du VE-cadhérine initie l'adhésion cellulaire alors que son domaine cytosolique favorise les interactions avec le cytosquelette et les cohésions aux jonctions cellulaires (Dejana 1997). Conséquemment, tel qu'observé en cytométrie, nous pouvons spéculer que la diminution de la capacité des EPCs isolées de fumeurs à adhérer à la couche de cellules endothéliales activées s'explique par la diminution de l'expression de certaines molécules d'adhésion, en particulier le

VE-cadhérine. Cette découverte peut avoir certaines implications cliniques. Tel que discuté précédemment, les EPCs peuvent adhérer aux sites présentant des lésions endothéliales, ce qui favorise la réendothélialisation et inhibe le développement de l'athérosclérose. Le développement accéléré de l'athérosclérose chez le fumeur pourrait donc être expliqué, du moins en partie, par une incapacité des EPCs à adhérer à la surface vasculaire lésée afin d'initier le processus de réendothélialisation.

Une autre observation majeure de ce projet de recherche est la génération intracellulaire accrue d'espèces radicalaires dérivées de l'oxygène (ROS) dans les EPCs isolées de fumeurs. Cette découverte pourrait expliquer la dysfonction des EPCs observée dans cette étude. Une augmentation vasculaire du stress oxydant est un mécanisme sous-jacent bien établi favorisant la dysfonction endothéliale et la maladie athérosclérotique (Landmesser, Hornig et al. 2004). Une diminution de la biodisponibilité NO, qui se manifeste par l'absence de vasodilatation à l'acétylcholine, est un indice précoce associé à la dysfonction endothéliale (Landmesser, Hornig et al. 2004) et il contribue au développement de l'athérosclérose (Badimon, Fuster et al. 1993). La diminution du NO dans la dysfonction endothéliale serait étroitement liée à une augmentation de la production d'espèces radicalaires oxygénées (ROS). Les ROS générés par l'activation des cellules endothéliales en réponse à différents facteurs de risque inhibent la disponibilité du NO via différentes voies. Premièrement, les superoxydes réagissent rapidement avec le NO et forment des peroxynitrites, ce qui inactive le NO (Sorescu and Griendling 2002). Ensuite, il a récemment été démontré qu'une

augmentation des ROS entraîne l'oxydation et la dégradation du tetrahydrobioptérine (BH₄), un cofacteur majeur de la eNOS, laissant ainsi l'enzyme découplée et diminuant la production de NO mais augmentant la production de superoxydes (Tiefenbacher, Bleeke et al. 2000; Laursen, Boesgaard et al. 2001; d'Uscio, Milstien et al. 2003; Landmesser, Hornig et al. 2004). Finalement, de récentes études suggèrent que les ROS inhibent l'activité enzymatique de la diméthylarginine diméthylaminohydrolase (DDAH) ce qui favoriserait la synthèse de l'inhibiteur endogène de la eNOS, l'asymétrique diméthylarginine (ADMA), réduisant ainsi l'activité de la eNOS (Cooke 2000).

Le NO a également été identifié comme étant un médiateur crucial de la néovascularisation induite par les EPCs. Premièrement, les souris déficientes pour la eNOS et présentant des niveaux significativement diminués de NO démontrent une altération de la néovascularisation corollée à une mobilisation réduite des EPCs (Murohara, Asahara et al. 1998; Aicher, Heeschen et al. 2003). Ensuite, les statines, en induisant la relâche de NO dépendante de l'activité de la eNOS via une stimulation de la voie de signalisation PI3k/Akt, améliorent la mobilisation, la différenciation et la prolifération des EPCs ainsi que la néovascularisation au niveau du myocarde (Dimmeler, Aicher et al. 2001; Llevadot, Murasawa et al. 2001; Assmus, Urbich et al. 2003; Landmesser, Engberding et al. 2004). Finalement, les estrogènes, en favorisant la relâche de NO dérivé de l'endothélium, induisent aussi le nombre de EPCs et l'angiogenèse (Strehlow, Werner et al. 2003). Globalement, ces observations suggèrent donc qu'une diminution de la biodisponibilité du NO par une production accrue de ROS pourrait être responsable des effets délétères observés sur

la fonction des EPCs chez les fumeurs. De plus, une récente étude menée par Dernbach et coll. révèle que les EPCs présentent une expression plus élevée d'enzymes anti-oxydantes et une protection supérieure contre le stress oxydant par rapport aux cellules endothéliales matures (Dernbach, Urbich et al. 2004). De façon intéressante, les auteurs démontrent qu'une inhibition combinée des enzymes anti-oxydantes induit la génération intracellulaire de radicaux libres dans les EPCs et diminue la migration des EPCs en réponse au VEGF, suggérant que la production excessive de ROS influence la fonction des EPCs. Mises ensemble, ces données nous indiquent qu'une altération de l'équilibre dans la génération intracellulaire de ROS puisse être à l'origine de la dysfonction des EPCs et de la diminution de la néovascularisation. Afin de mieux définir l'importance du stress oxydant sur le nombre et la fonction des EPCs chez les fumeurs, une nouvelle étude utilisant un traitement antioxydant pourrait être entreprise.

Nous avons aussi évalué si les niveaux plasmatiques de NO et de vitamines antioxydantes, deux marqueurs de la dysfonction endothéliale (Tsuchiya, Asada et al. 2002; Landmesser, Hornig et al. 2004), corrélaient avec le nombre de EPCs et leur incorporation dans la structure vasculaire. Dans notre étude, comme rapporté par d'autres groupes de chercheurs (Barua, Ambrose et al. 2001; Alberg 2002; Tsuchiya, Asada et al. 2002), les niveaux plasmatiques de vitamines antioxydantes et la concentration de nitrites étaient significativement diminués chez les fumeurs lorsque comparés aux niveaux plasmatiques provenant du groupe de sujets contrôles. De façon intéressante nous avons déterminé qu'il existait une relation directe entre ces

deux marqueurs, le nombre de EPCs et leur incorporation dans la structure vasculaire. Cette observation est importante et suggère que des marqueurs de la fonction endothéliale reflètent aussi la fonction des EPCs et/ou que la fonction des EPCs est directement influencée par des facteurs périphériques associés à la dysfonction endothéliale.

D'autres groupes de recherches ont aussi tenté d'établir une relation entre la fonction endothéliale et le nombre de EPCs. Ainsi, Hill et coll., ont premièrement montré qu'il existait une relation inverse entre le nombre de EPCs dans la circulation périphérique et les indices de risque cardiovasculaires Framingham (Hill, Zalos et al. 2003). Ils ont aussi démontré que le nombre de EPCs dans la circulation corrélaient avec la fonction endothéliale mesurée par la vasodilatation flux-dépendante d'un vaisseau de l'avant-bras. Réunis, ces résultats et nos observations indiquent que l'évaluation des EPCs dans la circulation périphérique puisse être un marqueur potentiel de la fonction endothéliale et/ou un indice de la prévalence du risque d'événements cardiovasculaires chez un patient. Étant donné la pertinence clinique croissante de la vasculogénèse chez l'adulte, déterminer les facteurs qui gouvernent le nombre et la fonction des cellules endothéliales progénitrices s'avère primordial.

Les composés de la fumée de cigarette responsables des effets spécifiques observés au cours de ces projets de recherche demeurent inconnus. Dans la fumée de cigarette, plus de 4000 composés et une quantité importante de ROS ont été identifiés soit sont sous forme de gaz ou sous forme de particules (Smith and Fischer 2001). La phase gazeuse contient entre autre de l'eau, de l'oxygène, de l'azote, de l'oxyde de carbone, de l'anhydride carbonique, de l'acide cyanhydrique, de

l'ammoniaque, divers aldéhydes et des cétones. La phase particulaire renferme une grande variété de substances dont la nicotine, la nicotimine, la normicotine, la cotinine, l'anabasine, des quinones et semi-quinones, des hydrocarbures aromatiques, des acides organiques, des alcools, des terpènes, des composés nitrés, des phénols, des métaux rares (cadmium), de l'arsenic, des corps radio-actifs, des insecticides et des éléments fongiques (Church and Pryor 1985).

La nicotine est un élément important de la fumée de cigarette et elle a fait l'objet de plusieurs études. L'action de la nicotine vient de sa liaison aux récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine présents aux synapses du cerveau, des ganglions sympathiques, de la médullosurrénale et de la jonction neuromusculaire. Un effet majeur lié à l'activation de ces récepteurs par l'acétylcholine est une stimulation sympathique avec libération massive de catécholamines. Outre l'adrénaline et la noradrénaline, d'autres neuromédiateurs sont libérés en réponse à la nicotine tels la dopamine, la sérotonine, le glutamate et certains neuropeptides (Benowitz 1988; Benowitz 1993; Benowitz, Fitzgerald et al. 1993; Benowitz and Gourlay 1997). Sur le plan pharmacologique, l'action hémodynamique de la nicotine est caractérisée par une stimulation sympathique, incluant une vasoconstriction des territoires cutanés et splanchiques, une vasodilatation musculaire, une action inotrope et chronotrope positive se manifestant par une augmentation de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque (Cryer, Haymond et al. 1976). Les études expérimentales donnent des résultats nuancés sur le rôle direct de la nicotine dans le processus d'athérogenèse. La nicotine aggrave l'athérome du lapin soumis à un régime hypercholestérolémique (Benowitz and Gourlay 1997). Par ailleurs, elle aggrave

l'hyperplasie néo-intimale induite par désendothélialisation de la paroi artérielle chez le rat. Les doses utilisées dans ces modèles animaux semblent cependant éloignées des concentrations mesurées chez le fumeur. Chez l'homme, la prise chronique de nicotine semble sans effet sur les concentrations plasmatiques de triglycérides, de cholestérol HDL ou LDL et sur les apolipoprotéines A1 et B. Les études *in vitro* donnent des résultats assez variables en ce qui concerne les effets de la nicotine sur l'induction de l'apoptose et de la nécrose cellulaire, l'activation plaquettaire, la fonction endothéliale, la synthèse de facteurs de croissance ou de molécules pro-inflammatoires et de la synthèse de prostaglandines (Totti, McCusker et al. 1984; Csonka, Somogyi et al. 1985; Clarke 1987; Quensel, Agardh et al. 1989; Strohschneider, Oberhoff et al. 1994; Benowitz 1996; Carty, Huribal et al. 1997). La concentration de nicotine utilisée et la durée de la stimulation seraient vraisemblablement à l'origine des variations observées dans la littérature.

Le rôle de la nicotine dans le processus de néovascularisation a aussi fait l'objet de plusieurs études. Cooke et son équipe ont montré dans des modèles murins d'angiogenèse que la nicotine possédait une activité angiogénique puissante. Ils ont premièrement démontré dans un modèle d'inflammation que la nicotine induisait l'angiogenèse à l'intérieur d'un disque de polymère implanté sous la peau des souris. Ils ont aussi montré dans un modèle d'ischémie vasculaire que la nicotine induisait la densité capillaire et la récupération du flot sanguin. La nicotine favorise également la vascularisation et la croissance de carcinomes de poumons (un modèle reflétant l'angiogenèse tumorale). De plus, la nicotine induit la vascularisation et la croissance de la plaque athérosclérotique chez des souris ApoE^{-/-}. Finalement, la nicotine

améliore la cicatrisation dans un modèle de souris diabétique (Heeschen, Jang et al. 2001; Jacobi, Jang et al. 2002). L'activité angiogénique de la nicotine serait associée à une augmentation de la libération de VEGF, PDGF, bFGF, TGF-beta, eNOS et prostacyclines. Ces données indiquent que la nicotine pourrait d'une part promouvoir l'angiogenèse tumorale et l'athérogenèse, et d'autre part favoriser le développement d'un réseau vasculaire en réponse à l'ischémie. Cependant, d'autres groupes de recherche ont aussi étudié l'effet de la nicotine sur l'angiogenèse. Ainsi, il a été démontré dans le modèle de membrane chorio-allantoïque de poussin qu'une solution de nicotine n'affectait pas l'angiogenèse et que des rats sains inhalant de la nicotine sur une période de deux ans n'avaient pas de différence majeure dans le nombre et la morphologie de leurs vaisseaux sanguins (Waldum, Nilsen et al. 1996; Melkonian, Le et al. 2000). De plus, l'administration transdermique de nicotine chez des patients atteints de maladies cardiovasculaires ischémiques n'a pas induit le nombre de collatérales ni la survenue d'événements coronaires ischémiques (Joseph, Norman et al. 1996). Finalement, une récente étude mentionne que la nicotine augmente la prolifération, la migration, l'adhésion des EPCs et leur capacité à former une réseau vasculaire in vitro (Wang, Zhu et al. 2004). L'effet de la nicotine sur la néovascularisation ne semble pas encore complètement élucidé. Quoi qu'il en soit, aucune étude ne rapporte une diminution de la néovascularisation par la nicotine seule. Ainsi, l'effet délétère du tabagisme sur la néovascularisation observée dans nos différents modèles ne semble pas pouvoir être expliqué par une action directe de la nicotine.

L'oxyde de carbone (CO) est un autre composé de la fumée de cigarette impliqué dans la toxicité vasculaire induite par le tabagisme. Le mécanisme invoqué pour expliquer son effet néfaste est habituellement la concentration élevée de carboxyhémoglobine circulante, ce qui réduit la capacité de transport de l'oxygène et induit un effet hypoxémiant. Mais les mécanismes par lesquels le CO agit au niveau des tissus sont cependant assez complexes. Il a été suggéré que dans des conditions de stress, notamment de stress hypoxique, le CO inhibe l'expression de médiateurs comme l'endothéline ou de certains facteurs de croissance comme le PDGF (Morita and Kourembanas 1995; Morita, Perrella et al. 1995). Cette action n'est pas clairement élucidée mais une hypothèse générale est que le CO inhiberait l'expression de gènes sensibles à l'hypoxie et ainsi diminuerait le capacité d'adaptation de l'organisme à l'hypoxie. À cet effet, une étude parue en 1999 indique que le CO inhibe l'activité de liaison de HIF-1 au HRE en entravant l'accumulation de la protéine HIF-1 α (Huang, Willmore et al. 1999). L'augmentation de la dégradation du HIF-1 α par l'exposition à la fumée de cigarette observée dans notre étude pourrait ainsi être expliquée par l'action du CO.

L'arsenic est un autre composé de la fumée de cigarette. Il a été récemment démontré que l'arsenic inhibe l'angiogenèse en réduisant la production de VEGF et en induisant une apoptose de l'endothélium (Roboz, Dias et al. 2000). Une agrégation plaquettaire et une réduction du taux de cAMP ont aussi été observées (Kumar and Bhattacharya 2000). L'effet puissant anti-vasculaire de certains composés arsenicaux est actuellement utilisé en oncologie dans le traitement de la leucémie promyélocytaire aiguë et en cours d'évaluation dans certains cas de

tumeurs solides (Griffin, Lee et al. 2000; Novick and Warrell 2000). L'effet anti-angiogénique de l'exposition à la fumée de cigarette observé dans nos différents modèles pourrait être en partie le résultat d'un effet délétère de l'arsenic sur les cellules endothéliales.

Outre l'effet de ces composés sur le développement vasculaire, peu d'études ont tenté de déterminer l'agent présent dans la fumée de cigarette responsable des effets néfastes du tabagisme sur la fonction endothéliale. Nous croyons que l'effet anti-vasculaire observé dans nos modèles est le résultat d'une synergie entre les différents composants de la fumée de cigarette sur la fonction endothéliale et son environnement. Certaines de ces substances sont des radicaux libres alors que d'autres sont cytotoxiques et vont induire l'activation cellulaire, la production de ROS et une réponse inflammatoire. Ces trois mécanismes sont impliqués dans l'augmentation de l'expression de plusieurs molécules qui reflètent l'état de stress et d'inflammation observés chez le fumeur. Le tabagisme est notamment associé à une augmentation des niveaux de multiples marqueurs de l'inflammation dont la protéine C réactive, le ligand CD 40, l'interleukine-6 et -8, la protéine inflammatoire dérivée des macrophages (MIP) et le TNF- α (Tappia, Troughton et al. 1995; Mendall, Patel et al. 1997; Tracy, Lemaitre et al. 1997; Bermudez, Rifai et al. 2002; Bermudez, Rifai et al. 2002; Harding, Sarma et al. 2004; Harding, Sommerfield et al. 2004). Ces cytokines ont presque toutes été associées à la dysfonction endothéliale. Ainsi ces marqueurs pourraient être indirectement responsables de l'effet anti-angiogénique observé dans nos études. De façon intéressante, l'expression de ces cytokines est diminuée chez le fumeur par la prise d'antioxydants, ce qui militerait encore en

faveur d'une altération des mécanismes protecteurs en réponse au stress oxydant et à l'induction d'un état inflammatoire (Weber, Erl et al. 1996).

4. CRITIQUES ET LIMITES

Le présent ouvrage suggère donc que le tabagisme inhibe la néovascularisation. Au cours des différentes études, les résultats ont été obtenus grâce à différents modèles. Il n'existe pas de modèle idéal pour étudier l'angiogenèse que ce soit in vitro ou in vivo. À un extrême se trouvent des configurations expérimentales in vitro très simplifiées (migration, prolifération, différenciation), à l'opposé se situent les modèles intégrant la complexité du processus angiogénique en transposant l'expérimentation chez l'animal. La multiplicité de ces modèles expérimentaux complique le choix d'une stratégie simple pour identifier avec certitude le caractère pro-ou anti-angiogénique d'une molécule ou d'un facteur de risque tel que le tabagisme. Ainsi, certaines failles ou limites à la méthodologie utilisée durant les différentes études seront brièvement discutées.

Les modèles in vitro renseignent sur certains aspects de l'angiogenèse permettant de décortiquer le processus angiogénique. Les essais de prolifération, de migration, de différenciation et d'angiogenèse in vitro sur Matrigel utilisés au cours des études sont très faciles à exécuter mais revêtent certaines limites. Un problème des modèles in vitro réside dans le choix des cellules endothéliales à utiliser pour les tests. Les HUVECs sont des cellules veineuses provenant d'un macrovaisseau mais elles ne sont pas immortalisées. Certaines difficultés potentielles ont été liées à l'origine histologique des cellules utilisées. Ainsi, certains travaux montrent l'incapacité des cellules endothéliales issues de gros vaisseaux à exhiber un phénotype angiogénique in vitro. Cependant, il est intéressant de noter que la plupart des cellules

endothéliales en culture ont le même aspect morphologique qu'elles soient issues d'artère, de veine ou de capillaire (Belloni and Tressler 1990). Si l'utilisation de cellules endothéliales veineuses est critiquable, cette critique concernant l'aspect non représentatif du phénotype vasculaire pendant l'angiogenèse s'applique principalement pour les cellules immortalisées.

Une autre critique légitime des modèles *in vitro* concerne, dans la majorité des cas, l'absence de micro-environnement et d'interaction cellulaire rencontrée lors de l'angiogenèse. L'angiogenèse est un processus résultant de la participation d'une multitude de facteurs (cytokines, chémokines, métalloprotéinases, facteurs de croissance etc.) sécrétés par différents types cellulaires. Nos études utilisant un type cellulaire unique ne permettent pas d'évaluer l'influence du micro-environnement et de l'interaction cellulaire. Les résultats obtenus pourraient ne pas représenter la réalité *in vivo*.

Ensuite, la culture de cellules endothéliales sur Matrigel permet d'accélérer de façon drastique la formation de structures pseudo-vasculaires organisées en cordons reliés les uns aux autres. Cependant, bien que l'aspect des structures obtenues fasse penser à une formation capillaire, les mécanismes sous-jacents diffèrent sans doute quelque peu de ceux impliqués dans la néovascularisation. De plus, nous pouvons nous demander s'il s'agit vraiment de développement de vaisseaux ou simplement d'un réarrangement purement mécanique suite à l'implantation des cellules sur la matrice.

Le modèle *in vivo* d'ischémie du membre inférieur présente aussi certaines limites. Premièrement, l'acte chirurgical dans ce modèle est associé à une réaction inflammatoire représentant un important stimulus angiogénique. Ainsi, il peut parfois s'avérer difficile de dissocier l'effet de notre traitement sur la récupération du flux sanguin. De plus, ce modèle présente certaines difficultés d'analyse notamment à cause de problème de reproductibilité et de quantification causé par la présence de vaisseaux préexistants.

L'étude *in vitro* et *in vivo* des effets du tabagisme sur la néovascularisation possède plusieurs limites. *In vitro*, l'incubation des HUVECs avec un milieu conditionné à la fumée de cigarette (CSE) n'est pas entièrement représentative des complications systémiques retrouvées chez le fumeur. Toute la complexité physiologique des affections entraînées par l'usage du tabac est très difficile voire impossible à représenter *in vitro*. Les résultats obtenus ne sont sans doute pas garants de la réalité *in vivo*. De plus, la composition du CSE ne reflète pas exactement toutes les composantes et leurs concentrations respectives de la fumée de cigarette. Il est difficile d'estimer la concentration appropriée de CSE à utiliser *in vitro*. Ce paramètre est important car des concentrations élevées s'avèrent toxiques/létales pour les cellules. Les effets obtenus pourraient alors être le résultat d'une toxicité excessive et non représentative des effets physiologiques du tabagisme. Cependant, afin de limiter au minimum les effets toxiques du CSE dans notre modèle, une concentration de 10% a été choisie en fonction d'un taux de viabilité cellulaire de 90%. Finalement, *in vivo* les cellules ne sont pas directement exposées à la fumée de cigarettes. La fumée est inhalée et filtrée par les poumons. Certaines composantes

seront retenues par ceux-ci et n'entreront pas dans la circulation sanguine. Les poumons semblent ainsi jouer un rôle protecteur. Cependant plusieurs molécules seront rapidement absorbées et transportées dans différents organes où elles subiront certaines modifications avant d'interagir avec les cellules endothéliales. C'est le cas notamment de la nicotine et du benzo(a)pyrène qui sont modifiés en nitrosonornicotine et en quinones, respectivement, des molécules hautement toxiques, mutagènes et carcinogènes. À cet égard, une fois de plus, l'incubation de cellules en présence de CSE n'est pas pleinement représentative de la réalité *in vivo* car les composantes du CSE n'ont pas subi les modifications métaboliques avant d'interagir avec les cellules.

Néanmoins, quoi que très criticable, le modèle utilisant le CSE semble prédictif de la réalité *in vivo*. Plusieurs équipes de recherche utilisant ce modèle et ayant comparé leurs résultats à des résultats obtenus *in vivo* supportent la fiabilité de ce modèle (Carnevali, Nakamura et al. 1998 ; Koethe, Kuhnmuensch et al. 2000; Wang, Wilcken et al. 2001). Une alternative au CSE, serait d'incuber les cellules en présence de plasma isolé de fumeurs. Ainsi, les paramètres physiologiques modifiés chez les fumeurs pourraient interagir avec les cellules et mieux représenter la réalité *in vivo*. Cependant, la quantité de cigarettes fumées par jour, la présence d'autres facteurs de risque, les habitudes de vie (exercice, alimentation, prise d'antioxydants) des donneurs doivent être examinées consciencieusement afin de s'assurer d'une certaine homogénéité des composantes du plasma des donneurs.

In vivo, l'évaluation de l'exposition à la fumée de cigarette est aussi complexe. Lors de notre première étude, nous avons exposé des souris à la fumée de cigarette dans un système ouvert (deux fois 10 minutes, matin et soir). La principale limite de ce modèle est d'évaluer si cette exposition représente adéquatement la réalité. Pour ce faire, les niveaux de carboxyhémoglobines dans le sang sont habituellement mesurés. Bien que nous n'ayions pas mesuré ce paramètre, certains groupes de recherche utilisant ce même modèle soutiennent que les niveaux de carboxyhémoglobines sont de l'ordre de 8 à 14% et reflètent les niveaux observés chez les fumeurs chroniques.

En ce qui a trait au troisième projet, la principale limite de l'étude concerne l'origine et la caractérisation des cellules endothéliales progénitrices. Tel qu'illustré à la figure 2 dans l'introduction, les cellules dérivées de la moelle osseuse expriment différents marqueurs de surface qui se retrouvent à la fois sur les cellules endothéliales progénitrices circulantes, sur les cellules endothéliales matures circulantes et sur les monocytes. Ainsi, il peut sembler difficile d'identifier la nature exacte ou la spécificité des cellules isolées durant nos expériences. Cependant, les marqueurs utilisés afin d'identifier le phénotype endothélial des cellules isolées durant notre projet de recherche semblent généralement reconnus dans la littérature (Hill, Zalos et al. 2003; Dimmeler, Aicher et al. 2001; Llevadot, Murasawa et al. 2001; Assmus, Urbich et al. 2003; Landmesser, Engberding et al. 2004).

5.CONCLUSION

Les maladies cardiovasculaires représentent la principale cause de morbidité et de mortalité dans les pays industrialisés. Le tabagisme demeure un facteur de risque considérable qui contribue au développement et aux manifestations cliniques de l'athérosclérose. L'occlusion d'une artère par la plaque athérosclérotique entraîne une perfusion tissulaire insuffisante, créant ainsi une condition d'hypoxie. Dans une situation d'ischémie, l'organisme s'adapte en développant un nouveau réseau vasculaire afin d'irriguer le tissu en nutriments et en oxygène et ainsi maintenir son intégrité. Chez l'adulte cette néovascularisation survient par angiogenèse, vasculogenèse et artériogenèse. Ainsi, l'ensemble de mes travaux de doctorat portaient sur l'impact du tabagisme sur la néovascularisation. Nos résultats démontrent que:

- L'exposition à la fumée de cigarette inhibe la réponse angiogénique induite par l'hypoxie in vitro et in vivo.
- Cette altération de la réponse angiogénique par le tabagisme est associée à une diminution de l'expression du HIF-1 α et du VEGF dans des conditions d'hypoxie.
- L'administration d'un vecteur adénovirus codant pour une forme stable du HIF-1 α restaure la réponse angiogénique.
- Outre une diminution de la réponse angiogénique induite par l'hypoxie, le tabagisme altère aussi la néovascularisation induite par le VEGF.
- La migration des cellules endothéliales par le VEGF est l'étape de l'angiogenèse qui est principalement affectée par l'exposition à la fumée de cigarette.

- Les mécanismes impliqués dans la diminution de la migration des cellules endothéliales par le tabagisme sont: une augmentation de la production d'espèces radicalaires dérivées de l'oxygène, une diminution des intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$ et une altération de la voie de signalisation Akt/eNOS/NO.

- Un traitement aux antioxydants préserve la réponse angiogénique induite par le VEGF.

- Le tabagisme est associé à une diminution du nombre de cellules endothéliales progénitrices et à une altération de leur fonction.

- La diminution du nombre de cellules endothéliales progénitrices et l'altération de leur fonction chez le fumeur sont associées à une diminution de l'expression de marqueur des cellules endothéliales, une augmentation de la génération intracellulaire d'espèces radicalaires dérivées de l'oxygène, ainsi qu'une diminution des niveaux plasmatiques de NO et de vitamines antioxydantes.

Globalement, nos études suggèrent que le tabagisme pourrait contribuer au développement des maladies cardiovasculaires de deux façons:

- 1) En diminuant la guérison artérielle suite à une lésion vasculaire, favorisant ainsi le développement de l'athérosclérose et la survenue d'événements cardiovasculaires ischémiques aigus (figure 24).

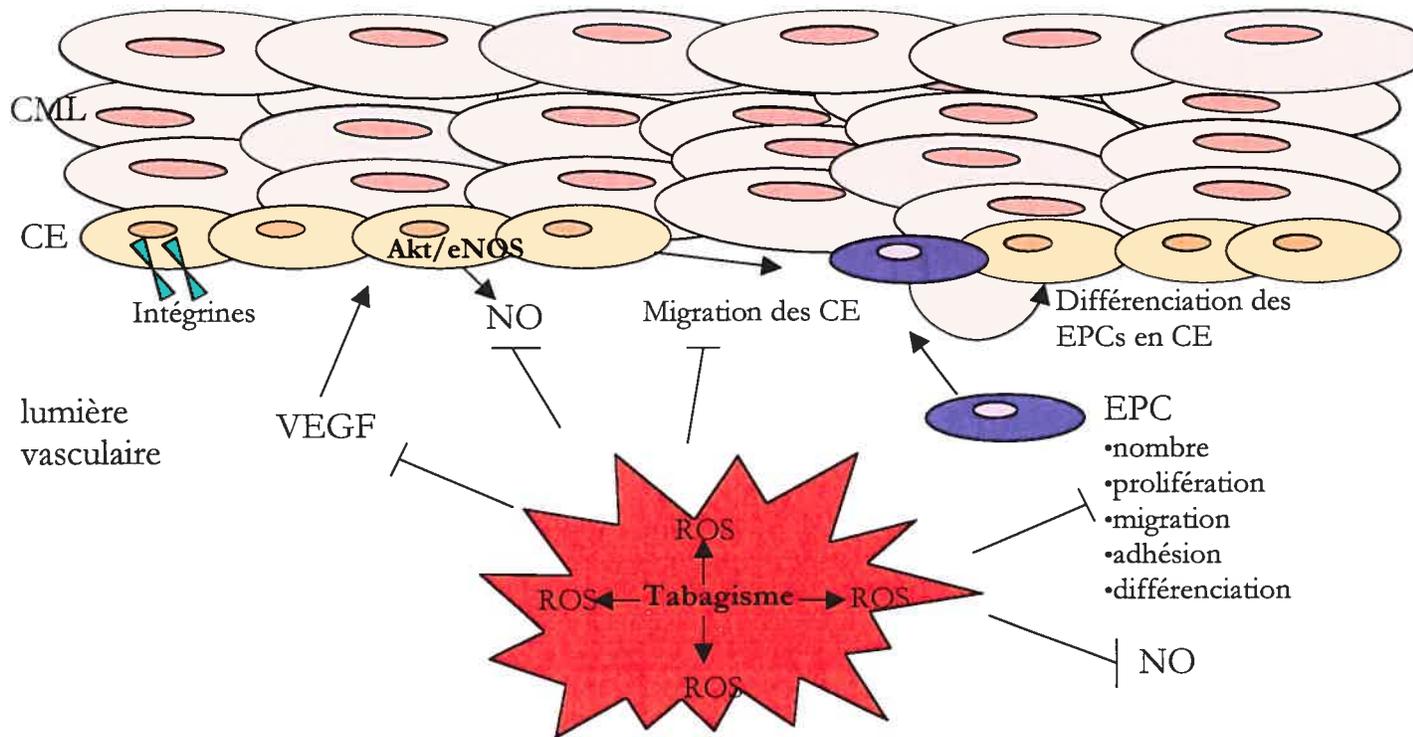


Figure 24. Le tabagisme diminue la guérison vasculaire et favorise le développement de l'athérosclérose. D'une part, le tabagisme augmente la génération intracellulaire de ROS ce qui interfère avec la voie de signalisation VEGF/Akt/eNOS, diminue la relâche de NO et la migration des cellules endothéliales (CE). De plus, le tabagisme diminue l'expression endothéliale des intégrines $\alpha v \beta_3$ et $\alpha v \beta_5$ ce qui compromet aussi la migration des CE. D'autre part, le tabagisme affecte le nombre de EPCs en circulation et altère leur fonction ce qui empêche la participation des EPCs à la réendothélialisation.

2) En compromettant la néovascularisation compensatrice suite à une ischémie tissulaire (figure 25).

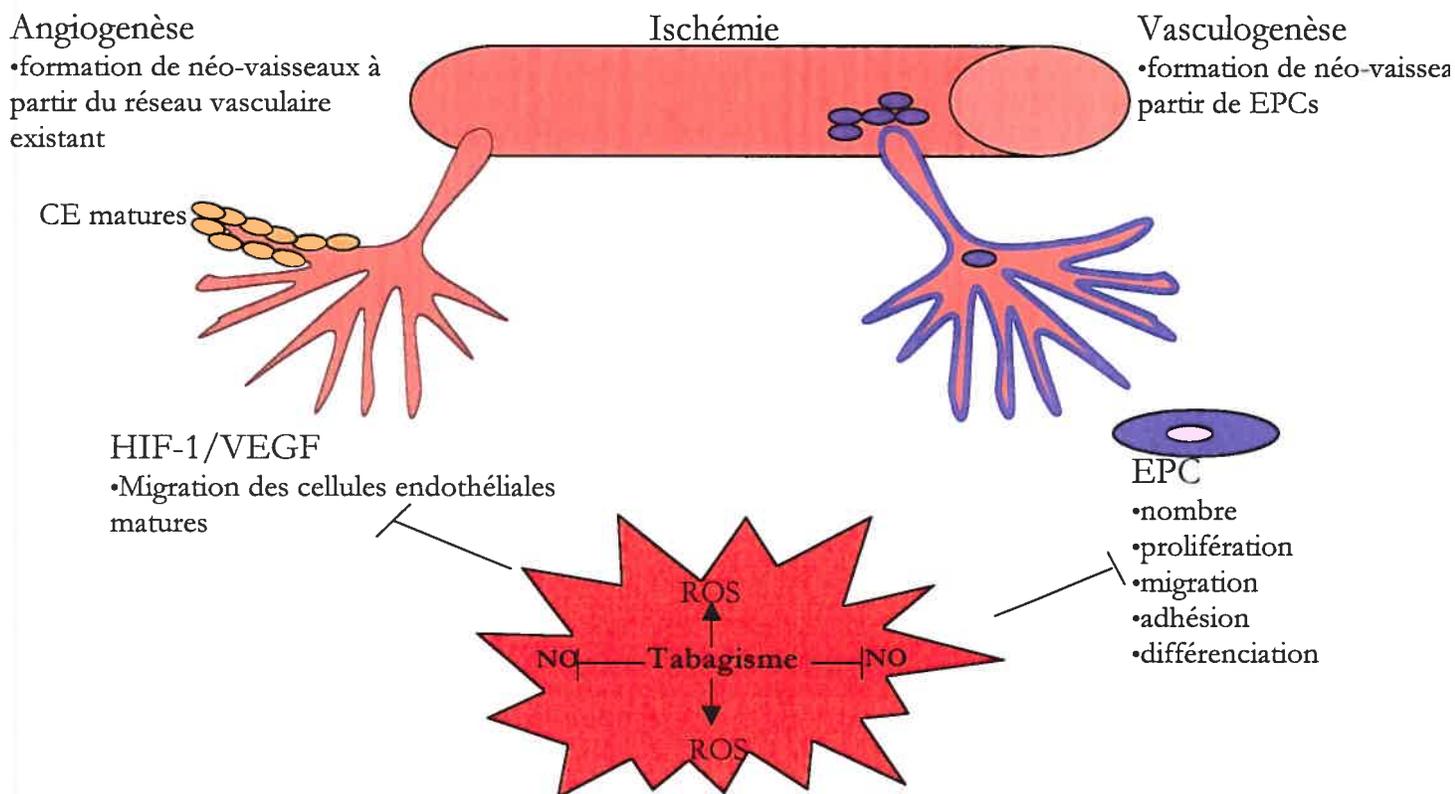


Figure 25. Les résultats de nos études nous indiquent que le tabagisme inhibe la néovascularisation post-ischémie en diminuant la réponse angiogénique et la vasculogénèse.

Ces données améliorent l'état des connaissances concernant l'impact du tabagisme sur la biologie des vaisseaux et contribuent à la compréhension des mécanismes impliqués dans la néovascularisation post-ischémie. Ultiment, nos résultats pourraient contribuer à l'élaboration de thérapies novatrices pour le traitement des maladies cardiovasculaires ischémiques. Toutefois, il est important de souligner que le sevrage tabagique est probablement la mesure de prévention cardiovasculaire (primaire et secondaire) la plus efficace. Il permet de rapidement freiner la progression de la maladie athérosclérotique et de prévenir ses complications. Nos travaux permettent de proposer de nouvelles voies par lesquelles

le sevrage tabagique pourrait être bénéfique pour la guérison artérielle et la réponse à l'ischémie.

6. RÉFÉRENCES

- (1994). "Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S)." Lancet **344**(8934): 1383-9.
- Abaci, A., A. Oguzhan, et al. (1999). "Effect of diabetes mellitus on formation of coronary collateral vessels." Circulation **99**(17): 2239-42.
- Abid, M. R., S. Guo, et al. (2004). "Vascular endothelial growth factor activates PI3K/Akt/forkhead signaling in endothelial cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(2): 294-300.
- Abid, M. R., Z. Kachra, et al. (2000). "NADPH oxidase activity is required for endothelial cell proliferation and migration." FEBS Lett **486**(3): 252-6.
- Adiloglu, A. K., C. Nazli, et al. (2003). "Gastroduodenal Helicobacter pylori infection diagnosed by Helicobacter pylori stool antigen is related to atherosclerosis." Acta Cardiol **58**(4): 335-9.
- Aicher, A., C. Heeschen, et al. (2003). "Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells." Nat Med **9**(11): 1370-6.
- Akiri, G., D. Nahari, et al. (1998). "Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression is mediated by internal initiation of translation and alternative initiation of transcription." Oncogene **17**(2): 227-36.

- Alberg, A. (2002). "The influence of cigarette smoking on circulating concentrations of antioxidant micronutrients." Toxicology **180**(2): 121-37.
- Allred, E. N., E. R. Bleecker, et al. (1989). "Acute effects of carbon monoxide exposure on individuals with coronary artery disease." Res Rep Health Eff Inst(25): 1-79.
- Allred, E. N., E. R. Bleecker, et al. (1989). "Short-term effects of carbon monoxide exposure on the exercise performance of subjects with coronary artery disease." N Engl J Med **321**(21): 1426-32.
- Altavilla, D., A. Saitta, et al. (2001). "Inhibition of lipid peroxidation restores impaired vascular endothelial growth factor expression and stimulates wound healing and angiogenesis in the genetically diabetic mouse." Diabetes **50**(3): 667-74.
- Altuntas, I., S. Dane, et al. (2002). "Effects of cigarette smoking on lipid peroxidation." J Basic Clin Physiol Pharmacol **13**(1): 69-72.
- Ambrose, J. A. and R. S. Barua (2004). "The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: an update." J Am Coll Cardiol **43**(10): 1731-7.
- Ameli, F. M., M. Stein, et al. (1989). "Effects of cigarette smoking on outcome of femoral popliteal bypass for limb salvage." J Cardiovasc Surg (Torino) **30**(4): 591-6.

- Amrani, M., A. T. Goodwin, et al. (1996). "Ageing is associated with reduced basal and stimulated release of nitric oxide by the coronary endothelium." Acta Physiol Scand **157**(1): 79-84.
- Anderson, G. P. and S. Bozinovski (2003). "Acquired somatic mutations in the molecular pathogenesis of COPD." Trends Pharmacol Sci **24**(2): 71-6.
- Antoniades, C., D. Tousoulis, et al. (2003). "Effects of antioxidant vitamins C and E on endothelial function and thrombosis/fibrinolysis system in smokers." Thromb Haemost **89**(6): 990-5.
- Antoniades, C., D. Tousoulis, et al. (2003). "Oxidative stress, antioxidant vitamins, and atherosclerosis. From basic research to clinical practice." Herz **28**(7): 628-38.
- Antonios, T. F., D. R. Singer, et al. (1999). "Structural skin capillary rarefaction in essential hypertension." Hypertension **33**(4): 998-1001.
- Aronow, W. S. (1983). "Carbon monoxide and cardiovascular disease." Compr Ther **9**(10): 21-6.
- Arras, M., W. D. Ito, et al. (1998). "Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb." J Clin Invest **101**(1): 40-50.
- Asahara, T., C. Bauters, et al. (1995). "Local delivery of vascular endothelial growth factor accelerates reendothelialization and attenuates intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery." Circulation **91**(11): 2793-801.

Asahara, T., C. Bauters, et al. (1995). "Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo." Circulation **92**(9 Suppl): II365-71.

Asahara, T., D. Chen, et al. (1996). "Accelerated restitution of endothelial integrity and endothelium-dependent function after phVEGF165 gene transfer." Circulation **94**(12): 3291-302.

Asahara, T., H. Masuda, et al. (1999). "Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization." Circ Res **85**(3): 221-8.

Asahara, T., T. Murohara, et al. (1997). "Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis." Science **275**(5302): 964-7.

Assmus, B., V. Schachinger, et al. (2002). "Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI)." Circulation **106**(24): 3009-17.

Assmus, B., C. Urbich, et al. (2003). "HMG-CoA reductase inhibitors reduce senescence and increase proliferation of endothelial progenitor cells via regulation of cell cycle regulatory genes." Circ Res **92**(9): 1049-55.

Aviram, M. (2000). "Review of human studies on oxidative damage and antioxidant protection related to cardiovascular diseases." Free Radic Res **33** Suppl: S85-97.

- Badimon, J. J., V. Fuster, et al. (1993). "Coronary atherosclerosis. A multifactorial disease." Circulation **87**(3 Suppl): II3-16.
- Bagdade, J. D., W. E. Buchanan, et al. (1990). "Persistent abnormalities in lipoprotein composition in noninsulin-dependent diabetes after intensive insulin therapy." Arteriosclerosis **10**(2): 232-9.
- Barger, A. C. and R. Beeuwkes, 3rd (1990). "Rupture of coronary vasa vasorum as a trigger of acute myocardial infarction." Am J Cardiol **66**(16): 41G-43G.
- Barrow, S. E., P. S. Ward, et al. (1989). "Cigarette smoking: profiles of thromboxane- and prostacyclin-derived products in human urine." Biochim Biophys Acta **993**(1): 121-7.
- Barua, R. S., J. A. Ambrose, et al. (2001). "Dysfunctional endothelial nitric oxide biosynthesis in healthy smokers with impaired endothelium-dependent vasodilatation." Circulation **104**(16): 1905-10.
- Barua, R. S., J. A. Ambrose, et al. (2002). "Smoking is associated with altered endothelial-derived fibrinolytic and antithrombotic factors: an in vitro demonstration." Circulation **106**(8): 905-8.
- Barua, R. S., J. A. Ambrose, et al. (2003). "Reactive oxygen species are involved in smoking-induced dysfunction of nitric oxide biosynthesis and upregulation of endothelial nitric oxide synthase: an in vitro demonstration in human coronary artery endothelial cells." Circulation **107**(18): 2342-7.

- Bason, C., R. Corrocher, et al. (2003). "Interaction of antibodies against cytomegalovirus with heat-shock protein 60 in pathogenesis of atherosclerosis." Lancet **362**(9400): 1971-7.
- Bayes-Genis, A., C. A. Conover, et al. (2000). "The insulin-like growth factor axis: A review of atherosclerosis and restenosis." Circ Res **86**(2): 125-30.
- Bell, L. and J. A. Madri (1989). "Effect of platelet factors on migration of cultured bovine aortic endothelial and smooth muscle cells." Circ Res **65**(4): 1057-65.
- Belland, R. J., S. P. Ouellette, et al. (2004). "Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis." Cell Microbiol **6**(2): 117-27.
- Benowitz, N. L. (1988). "Toxicity of nicotine: implications with regard to nicotine replacement therapy." Prog Clin Biol Res **261**: 187-217.
- Benowitz, N. L. (1993). "Smoking-induced coronary vasoconstriction: implications for therapeutic use of nicotine." J Am Coll Cardiol **22**(3): 648-9.
- Benowitz, N. L. (1996). "Pharmacology of nicotine: addiction and therapeutics." Annu Rev Pharmacol Toxicol **36**: 597-613.
- Benowitz, N. L., G. A. Fitzgerald, et al. (1993). "Nicotine effects on eicosanoid formation and hemostatic function: comparison of transdermal nicotine and cigarette smoking." J Am Coll Cardiol **22**(4): 1159-67.

- Benowitz, N. L. and S. G. Gourlay (1997). "Cardiovascular toxicity of nicotine: implications for nicotine replacement therapy." J Am Coll Cardiol **29**(7): 1422-31.
- Bermudez, E. A., N. Rifai, et al. (2002). "Interrelationships among circulating interleukin-6, C-reactive protein, and traditional cardiovascular risk factors in women." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(10): 1668-73.
- Bermudez, E. A., N. Rifai, et al. (2002). "Relation between markers of systemic vascular inflammation and smoking in women." Am J Cardiol **89**(9): 1117-9.
- Bernaards, C. M., J. W. Twisk, et al. (2003). "A longitudinal study on smoking in relationship to fitness and heart rate response." Med Sci Sports Exerc **35**(5): 793-800.
- Bernhard, D., G. Pfister, et al. (2003). "Disruption of vascular endothelial homeostasis by tobacco smoke: impact on atherosclerosis." Faseb J **17**(15): 2302-4.
- Bikfalvi, A., S. Klein, et al. (1997). "Biological roles of fibroblast growth factor-2." Endocr Rev **18**(1): 26-45.
- Bischoff, J. (1997). "Cell adhesion and angiogenesis." J Clin Invest **100**(11 Suppl): S37-9.
- Blache, D. (1995). "Involvement of hydrogen and lipid peroxides in acute tobacco smoking-induced platelet hyperactivity." Am J Physiol **268**(2 Pt 2): H679-85.

- Blake, K. V., L. C. Gurrin, et al. (2000). "Maternal cigarette smoking during pregnancy, low birth weight and subsequent blood pressure in early childhood." Early Hum Dev **57**(2): 137-47.
- Blann, A. D., R. A. Adams, et al. (1996). "Haematology and coagulation indices in paired samples of arterial and venous blood from patients with arterial disease." Haemostasis **26**(2): 72-8.
- Borges, E., Y. Jan, et al. (2000). "Platelet-derived growth factor receptor beta and vascular endothelial growth factor receptor 2 bind to the beta 3 integrin through its extracellular domain." J Biol Chem **275**(51): 39867-73.
- Borissova, A. M., T. Tankova, et al. (2004). "The effect of smoking on peripheral insulin sensitivity and plasma endothelin level." Diabetes Metab **30**(2): 147-52.
- Boulanger, C. M. (1999). "Secondary endothelial dysfunction: hypertension and heart failure." J Mol Cell Cardiol **31**(1): 39-49.
- Britten, M. B., N. D. Abolmaali, et al. (2003). "Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging." Circulation **108**(18): 2212-8.
- Brogi, E., T. Wu, et al. (1994). "Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only." Circulation **90**(2): 649-52.

- Brooks, P. C., R. A. Clark, et al. (1994). "Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis." Science **264**(5158): 569-71.
- Brooks, P. C., A. M. Montgomery, et al. (1994). "Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels." Cell **79**(7): 1157-64.
- Brown, G., J. J. Albers, et al. (1990). "Regression of coronary artery disease as a result of intensive lipid-lowering therapy in men with high levels of apolipoprotein B." N Engl J Med **323**(19): 1289-98.
- Burke, A. and G. A. Fitzgerald (2003). "Oxidative stress and smoking-induced vascular injury." Prog Cardiovasc Dis **46**(1): 79-90.
- Burke, A. P., A. Farb, et al. (1998). "Effect of risk factors on the mechanism of acute thrombosis and sudden coronary death in women." Circulation **97**(21): 2110-6.
- Burke, A. P., A. Farb, et al. (1997). "Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary disease who died suddenly." N Engl J Med **336**(18): 1276-82.
- Burns, D. M. (2003). "Epidemiology of smoking-induced cardiovascular disease." Prog Cardiovasc Dis **46**(1): 11-29.
- Busse, R. and I. Fleming (1996). "Endothelial dysfunction in atherosclerosis." J Vasc Res **33**(3): 181-94.

- Butnaru, E., C. Mircea, et al. (2002). "Variation of carboxyhemoglobin and of thiocyanates in smokers." Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi **106**(4): 782-6.
- Campbell, L. A. and C. C. Kuo (2004). "Chlamydia pneumoniae--an infectious risk factor for atherosclerosis?" Nat Rev Microbiol **2**(1): 23-32.
- Campisi, R., J. Czernin, et al. (1999). "L-Arginine normalizes coronary vasomotion in long-term smokers." Circulation **99**(4): 491-7.
- Caralis, D. G., U. Deligonul, et al. (1992). "Smoking is a risk factor for coronary spasm in young women." Circulation **85**(3): 905-9.
- Carmeliet, P. (2000). "Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis." Nat Med **6**(4): 389-95.
- Carmeliet, P. and D. Collen (2000). "Molecular basis of angiogenesis. Role of VEGF and VE-cadherin." Ann N Y Acad Sci **902**: 249-62; discussion 262-4.
- Carmeliet, P., V. Ferreira, et al. (1996). "Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele." Nature **380**(6573): 435-9.
- Carmeliet, P., Y. S. Ng, et al. (1999). "Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188." Nat Med **5**(5): 495-502.
- Carnevali, S., S. Petruzzelli, et al. (2003). "Cigarette smoke extract induces oxidative stress and apoptosis in human lung fibroblasts." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **284**(6): L955-63.

- Carty, C. S., M. Huribal, et al. (1997). "Nicotine and its metabolite cotinine are mitogenic for human vascular smooth muscle cells." J Vasc Surg **25**(4): 682-8.
- Castelli, W. P., R. J. Garrison, et al. (1986). "Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study." Jama **256**(20): 2835-8.
- Celermajer, D. S., K. E. Sorensen, et al. (1994). "Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction." J Am Coll Cardiol **24**(6): 1468-74.
- Chandel, N. S., E. Maltepe, et al. (1998). "Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(20): 11715-20.
- Chandel, N. S., D. S. McClintock, et al. (2000). "Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia: a mechanism of O2 sensing." J Biol Chem **275**(33): 25130-8.
- Chavakis, E., E. Dernbach, et al. (2001). "Oxidized LDL inhibits vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration by an inhibitory effect on the Akt/endothelial nitric oxide synthase pathway." Circulation **103**(16): 2102-7.

- Chehne, F., A. Oguogho, et al. (2001). "Increase of isoprostane 8-epi-PGF(2alpha) after restarting smoking." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **64**(6): 307-10.
- Chen, H. R. L. Prewitt, et al. (1981). "Microvascular rarefaction in spontaneously hypertensive rat cremaster muscle." Am J Physiol **241**(3): H306-10.
- Chen, C. H., J. Cartwright, Jr., et al. (1997). "Inhibitory effects of hypercholesterolemia and ox-LDL on angiogenesis-like endothelial growth in rabbit aortic explants. Essential role of basic fibroblast growth factor." Arterioscler Thromb Vasc Biol **17**(7): 1303-12.
- Chen, R., S. Xiong, et al. (2003). "The relationship between human cytomegalovirus infection and atherosclerosis development." Mol Cell Biochem **249**(1-2): 91-6.
- Chiou, H. Y., Y. M. Hsueh, et al. (1997). "Arsenic methylation capacity, body retention, and null genotypes of glutathione S-transferase M1 and T1 among current arsenic-exposed residents in Taiwan." Mutat Res **386**(3): 197-207.
- Chiu, B., E. Viira, et al. (1997). "Chlamydia pneumoniae, cytomegalovirus, and herpes simplex virus in atherosclerosis of the carotid artery." Circulation **96**(7): 2144-8.
- Choi, J. H., K. L. Kim, et al. (2004). "Decreased number and impaired angiogenic function of endothelial progenitor cells in patients with chronic renal failure." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(7): 1246-52.

- Chou, E., I. Suzuma, et al. (2002). "Decreased cardiac expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in insulin-resistant and diabetic States: a possible explanation for impaired collateral formation in cardiac tissue." Circulation **105**(3): 373-9.
- Chu, T. M. and E. Kawinski (1998). "Plasmin, substilisin-like endoproteases, tissue plasminogen activator, and urokinase plasminogen activator are involved in activation of latent TGF-beta 1 in human seminal plasma." Biochem Biophys Res Commun **253**(1): 128-34.
- Church, D. F. and W. A. Pryor (1985). "Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications." Environ Health Perspect **64**: 111-26.
- Claffey, K. P., S. C. Shih, et al. (1998). "Identification of a human VPF/VEGF 3' untranslated region mediating hypoxia-induced mRNA stability." Mol Biol Cell **9**(2): 469-81.
- Clarke, P. B. (1987). "Nicotine and smoking: a perspective from animal studies." Psychopharmacology (Berl) **92**(2): 135-43.
- Collishaw, N. E., W. Tostowaryk, et al. (1988). "Mortality attributable to tobacco use in Canada." Can J Public Health **79**(3): 166-9.
- Colquhoun, D., A. Keech, et al. (2004). "Effects of pravastatin on coronary events in 2073 patients with low levels of both low-density lipoprotein cholesterol and high-density lipoprotein cholesterol: results from the LIPID study." Eur Heart J **25**(9): 771-7.

- Cominacini, L., A. Rigoni, et al. (2001). "The binding of oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) to ox-LDL receptor-1 reduces the intracellular concentration of nitric oxide in endothelial cells through an increased production of superoxide." J Biol Chem **276**(17): 13750-5.
- Connolly, D. T., J. V. Olander, et al. (1989). "Human vascular permeability factor. Isolation from U937 cells." J Biol Chem **264**(33): 20017-24.
- Cooke, J. P. (2000). "Does ADMA cause endothelial dysfunction?" Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(9): 2032-7.
- Couffinhal, T., M. Kearney, et al. (1997). "Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) in normal and atherosclerotic human arteries." Am J Pathol **150**(5): 1673-85.
- Couffinhal, T., M. Silver, et al. (1999). "Impaired collateral vessel development associated with reduced expression of vascular endothelial growth factor in ApoE^{-/-} mice." Circulation **99**(24): 3188-98.
- Couffinhal, T., M. Silver, et al. (1998). "Mouse model of angiogenesis." Am J Pathol **152**(6): 1667-79.
- Craig, W. Y., G. E. Palomaki, et al. (1989). "Cigarette smoking and serum lipid and lipoprotein concentrations: an analysis of published data." Bmj **298**(6676): 784-8.

- Criqui, M. H., D. Browner, et al. (1989). "Peripheral arterial disease in large vessels is epidemiologically distinct from small vessel disease. An analysis of risk factors." Am J Epidemiol **129**(6): 1110-9.
- Cross, M. J. and L. Claesson-Welsh (2001). "FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition." Trends Pharmacol Sci **22**(4): 201-7.
- Cross, M. J., J. Dixelius, et al. (2003). "VEGF-receptor signal transduction." Trends Biochem Sci **28**(9): 488-94.
- Cryer, P. E., M. W. Haymond, et al. (1976). "Norepinephrine and epinephrine release and adrenergic mediation of smoking-associated hemodynamic and metabolic events." N Engl J Med **295**(11): 573-7.
- Csonka, E., A. Somogyi, et al. (1985). "The effect of nicotine on cultured cells of vascular origin." Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol **407**(4): 441-7.
- Curcio, F. and A. Ceriello (1992). "Decreased cultured endothelial cell proliferation in high glucose medium is reversed by antioxidants: new insights on the pathophysiological mechanisms of diabetic vascular complications." In Vitro Cell Dev Biol **28A**(11-12): 787-90.
- Damert, A., E. Ikeda, et al. (1997). "Activator-protein-1 binding potentiates the hypoxia-induciblefactor-1-mediated hypoxia-induced transcriptional activation of vascular-endothelial growth factor expression in C6 glioma cells." Biochem J **327** (Pt 2): 419-23.

- David, S. P. and C. B. Eaton (2003). "Comment on "The public health implications of smoking-induced decreased serum and red blood cell folate levels"." Nicotine Tob Res 5(3): 397-9.
- Davignon, J. and P. Ganz (2004). "Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis." Circulation 109(23 Suppl 1): III27-32.
- Davis, S., T. H. Aldrich, et al. (1996). "Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning." Cell 87(7): 1161-9.
- Dejana, E. (1997). "Endothelial adherens junctions: implications in the control of vascular permeability and angiogenesis." J Clin Invest 100(11 Suppl): S7-10.
- Dernbach, E., C. Urbich, et al. (2004). "Anti-oxidative stress-associated genes in circulating progenitor cells: evidence for enhanced resistance against oxidative stress." Blood.
- Dickson, M. C., J. S. Martin, et al. (1995). "Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice." Development 121(6): 1845-54.
- Dietrich, M., G. Block, et al. (2002). "Antioxidant supplementation decreases lipid peroxidation biomarker F(2)-isoprostanes in plasma of smokers." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 11(1): 7-13.

- Dimmeler, S., A. Aicher, et al. (2001). "HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway." J Clin Invest **108**(3): 391-7.
- Dimmeler, S., J. Haendeler, et al. (1997). "Oxidized low-density lipoprotein induces apoptosis of human endothelial cells by activation of CPP32-like proteases. A mechanistic clue to the 'response to injury' hypothesis." Circulation **95**(7): 1760-3.
- Dimmeler, S. and A. M. Zeiher (1999). "Nitric oxide-an endothelial cell survival factor." Cell Death Differ **6**(10): 964-8.
- Dimmeler, S. and A. M. Zeiher (2004). "Vascular repair by circulating endothelial progenitor cells: the missing link in atherosclerosis?" J Mol Med **82**(10): 671-7.
- Dobson, A. J., K. Kuulasmaa, et al. (1998). "Changes in cigarette smoking among adults in 35 populations in the mid-1980s. WHO MONICA Project." Tob Control **7**(1): 14-21.
- Doronzo, G., I. Russo, et al. (2004). "Insulin activates vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells: influence of nitric oxide and of insulin resistance." Eur J Clin Invest **34**(10): 664-73.
- Drexler, H. (1998). "Factors involved in the maintenance of endothelial function." Am J Cardiol **82**(10A): 3S-4S.

- Drubaix, I., A. Giakoumakis, et al. (1998). "Preliminary data on the age-dependent decrease in basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor in the human vein wall and in their influence on cell proliferation." Gerontology 44(1): 9-14.
- Duan, J., T. Murohara, et al. (2000). "Hypercholesterolemia inhibits angiogenesis in response to hindlimb ischemia: nitric oxide-dependent mechanism." Circulation 102(19 Suppl 3): III370-6.
- Duan, J., T. Murohara, et al. (2000). "Hyperhomocysteinemia impairs angiogenesis in response to hindlimb ischemia." Arterioscler Thromb Vasc Biol 20(12): 2579-85.
- Dulak, J., A. Jozkowicz, et al. (1999). "Gene transfer of vascular endothelial growth factor and endothelial nitric oxide synthase--implications for gene therapy in cardiovascular diseases." Pol J Pharmacol 51(3): 233-41.
- Duncan, A., V. J. DePratti, et al. (1981). "Elevated beta-thromboglobulin levels associated with smoking and oral contraceptive agents in normal healthy women." Thromb Res 21(4-5): 425-30.
- d'Uscio, L. V., S. Milstien, et al. (2003). "Long-term vitamin C treatment increases vascular tetrahydrobiopterin levels and nitric oxide synthase activity." Circ Res 92(1): 88-95.
- Dwyer, E. M., Jr. and G. M. Turino (1989). "Carbon monoxide and cardiovascular disease." N Engl J Med 321(21): 1474-5.

- Edelberg, J. M., W. C. Aird, et al. (1998). "PDGF mediates cardiac microvascular communication." J Clin Invest **102**(4): 837-43.
- Egashira, K., T. Inou, et al. (1993). "Effects of age on endothelium-dependent vasodilation of resistance coronary artery by acetylcholine in humans." Circulation **88**(1): 77-81.
- Eisen, M. E. (1966). "Coexistence of thromboangiitis obliterans and arteriosclerosis: relationship to smoking." J Am Geriatr Soc **14**(8): 846-58.
- Eliasson, B., S. Attvall, et al. (1994). "The insulin resistance syndrome in smokers is related to smoking habits." Arterioscler Thromb **14**(12): 1946-50.
- Eliasson, B., M. R. Taskinen, et al. (1996). "Long-term use of nicotine gum is associated with hyperinsulinemia and insulin resistance." Circulation **94**(5): 878-81.
- Emanuelli, C., A. Minasi, et al. (2001). "Local delivery of human tissue kallikrein gene accelerates spontaneous angiogenesis in mouse model of hindlimb ischemia." Circulation **103**(1): 125-32.
- Emanuelli, C., M. B. Salis, et al. (2001). "Rescue of impaired angiogenesis in spontaneously hypertensive rats by intramuscular human tissue kallikrein gene transfer." Hypertension **38**(1): 136-41.

- Emanuelli, C., A. Zacheo, et al. (2000). "Adenovirus-mediated human tissue kallikrein gene delivery induces angiogenesis in normoperfused skeletal muscle." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(11): 2379-85.
- Escobedo, L. G. and M. M. Zack (1996). "Comparison of sudden and nonsudden coronary deaths in the United States." Circulation **93**(11): 2033-6.
- Ezzati, M. and A. D. Lopez (2003). "Estimates of global mortality attributable to smoking in 2000." Lancet **362**(9387): 847-52.
- Fabre, J. E., A. Rivard, et al. (1999). "Tissue inhibition of angiotensin-converting enzyme activity stimulates angiogenesis in vivo." Circulation **99**(23): 3043-9.
- Facchiano, F., A. Lentini, et al. (2002). "Sugar-induced modification of fibroblast growth factor 2 reduces its angiogenic activity in vivo." Am J Pathol **161**(2): 531-41.
- Fagerberg, B., L. M. Hulten, et al. (2003). "Plasma ghrelin, body fat, insulin resistance, and smoking in clinically healthy men: the atherosclerosis and insulin resistance study." Metabolism **52**(11): 1460-3.
- Faller, D. V. (1999). "Endothelial cell responses to hypoxic stress." Clin Exp Pharmacol Physiol **26**(1): 74-84.
- Fennessy, F. M., D. S. Moneley, et al. (2003). "Taurine and vitamin C modify monocyte and endothelial dysfunction in young smokers." Circulation **107**(3): 410-5.

- Ferns, G. A., L. Forster, et al. (1993). "Probucol inhibits mononuclear cell adhesion to vascular endothelium in the cholesterol-fed rabbit." Atherosclerosis **100**(2): 171-81.
- Ferns, G. A., M. Konneh, et al. (1993). "Vitamin E: the evidence for an anti-atherogenic role." Artery **20**(2): 61-94.
- Ferrara, N. (1999). "Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis." Kidney Int **56**(3): 794-814.
- Ferrara, N. and W. J. Henzel (1989). "Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells." Biochem Biophys Res Commun **161**(2): 851-8.
- Ferrara, N., J. Winer, et al. (1993). "Expression of vascular endothelial growth factor does not promote transformation but confers a growth advantage in vivo to Chinese hamster ovary cells." J Clin Invest **91**(1): 160-70.
- Finkel, T. (1998). "Oxygen radicals and signaling." Curr Opin Cell Biol **10**(2): 248-53.
- Flamme, I., T. Frolich, et al. (1997). "Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis." J Cell Physiol **173**(2): 206-10.
- Folkman, J. (1971). "Tumor angiogenesis: therapeutic implications." N Engl J Med **285**(21): 1182-6.

- Folkman, J. (1995). "Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease." Nat Med 1(1): 27-31.
- Folkman, J. and Y. Shing (1992). "Angiogenesis." J Biol Chem 267(16): 10931-4.
- Fong, G. H., J. Rossant, et al. (1995). "Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium." Nature 376(6535): 66-70.
- Forstermann, U. (1994). "Biochemistry and molecular biology of nitric oxide synthases." Arzneimittelforschung 44(3A): 402-7.
- Forstermann, U., E. I. Closs, et al. (1994). "Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions." Hypertension 23(6 Pt 2): 1121-31.
- Forstermann, U., J. S. Pollock, et al. (1994). "Isoforms of nitric-oxide synthase: purification and regulation." Methods Enzymol 233: 258-64.
- Forsythe, J. A., B. H. Jiang, et al. (1996). "Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1." Mol Cell Biol 16(9): 4604-13.
- Forte, P., M. Copland, et al. (1997). "Basal nitric oxide synthesis in essential hypertension." Lancet 349(9055): 837-42.
- Franceschi, F., R. M. Genta, et al. (2002). "Helicobacter pylori infection and expression of the angiogenic factor platelet-derived endothelial cell growth

factor by pre-neoplastic gastric mucosal lesions and gastric carcinoma." Dig Liver Dis **34**(9): 621-5.

Freedman, S. B. and J. M. Isner (2001). "Therapeutic angiogenesis for ischemic cardiovascular disease." J Mol Cell Cardiol **33**(3): 379-93.

Freedman, S. B. and J. M. Isner (2002). "Therapeutic angiogenesis for coronary artery disease." Ann Intern Med **136**(1): 54-71.

Friedlander, M., P. C. Brooks, et al. (1995). "Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins." Science **270**(5241): 1500-2.

Friesel, R. E. and T. Maciag (1995). "Molecular mechanisms of angiogenesis: fibroblast growth factor signal transduction." Faseb J **9**(10): 919-25.

Fuh, G., B. Li, et al. (1998). "Requirements for binding and signaling of the kinase domain receptor for vascular endothelial growth factor." J Biol Chem **273**(18): 11197-204.

Fulton, D., J. P. Gratton, et al. (1999). "Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt." Nature **399**(6736): 597-601.

Furchgott, R. F. and J. V. Zawadzki (1980). "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine." Nature **288**(5789): 373-6.

Fusegawa, Y., S. Goto, et al. (1999). "Platelet spontaneous aggregation in platelet-rich plasma is increased in habitual smokers." Thromb Res **93**(6): 271-8.

- Fushimi, H., M. Kubo, et al. (1998). "Peripheral vascular reactions to smoking--profound vasoconstriction by atherosclerosis." Diabetes Res Clin Pract **42**(1): 29-34.
- Galland, R. B., J. J. Earnshaw, et al. (1993). "Acute limb deterioration during intra-arterial thrombolysis." Br J Surg **80**(9): 1118-20.
- Gamble, J. R., J. Drew, et al. (2000). "Angiopoietin-1 is an antipermeability and anti-inflammatory agent in vitro and targets cell junctions." Circ Res **87**(7): 603-7.
- Garfinkel, S., X. Hu, et al. (1996). "FGF-1-dependent proliferative and migratory responses are impaired in senescent human umbilical vein endothelial cells and correlate with the inability to signal tyrosine phosphorylation of fibroblast growth factor receptor-1 substrates." J Cell Biol **134**(3): 783-91.
- Gennaro, G., C. Menard, et al. (2003). "Age-dependent impairment of reendothelialization after arterial injury: role of vascular endothelial growth factor." Circulation **107**(2): 230-3.
- Gerber, H. P., A. McMurtrey, et al. (1998). "Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation." J Biol Chem **273**(46): 30336-43.
- Girndt, M., S. Lengler, et al. (2000). "Prospective crossover trial of the influence of vitamin E-coated dialyzer membranes on T-cell activation and cytokine induction." Am J Kidney Dis **35**(1): 95-104.

- Giroud, M. and R. Dumas (1994). "[Effect of smoking in cerebral vascular accidents]." Presse Med **23**(22): 1037-9.
- Glantz, S. A. and W. W. Parmley (1991). "Passive smoking and heart disease. Epidemiology, physiology, and biochemistry." Circulation **83**(1): 1-12.
- Glass, E. J., J. Stewart, et al. (1987). "Impairment of monocyte "lectin-like" receptor activity in type 1 (insulin-dependent) diabetic patients." Diabetologia **30**(4): 228-31.
- Gottlieb, S., V. Boyko, et al. (1996). "Smoking and prognosis after acute myocardial infarction in the thrombolytic era (Israeli Thrombolytic National Survey)." J Am Coll Cardiol **28**(6): 1506-13.
- Gray, J., A. Majeed, et al. (2000). "Identifying patients with ischaemic heart disease in general practice: cross sectional study of paper and computerised medical records." Bmj **321**(7260): 548-50.
- Green, M. S., E. Jucha, et al. (1986). "Blood pressure in smokers and nonsmokers: epidemiologic findings." Am Heart J **111**(5): 932-40.
- Griffin, R. J., S. H. Lee, et al. (2000). "Use of arsenic trioxide as an antivasular and thermosensitizing agent in solid tumors." Neoplasia **2**(6): 555-60.
- Griffith, O. W. and D. J. Stuehr (1995). "Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism." Annu Rev Physiol **57**: 707-36.

- Guo, J. P., T. Murohara, et al. (1996). "Direct measurement of nitric oxide release from vascular endothelial cells." J Appl Physiol **81**(2): 774-9.
- Gurfinkel, E. (2000). "Inflammation, infection, or both in atherosclerosis: the ROXIS trial in perspective." J Infect Dis **181 Suppl 3**: S566-8.
- Gurfinkel, E., G. Bozovich, et al. (2000). "Chlamydia pneumoniae in coronary artery disease." Circulation **101**(12): E118-9.
- Guthikonda, S., C. Sinkey, et al. (2003). "Xanthine oxidase inhibition reverses endothelial dysfunction in heavy smokers." Circulation **107**(3): 416-21.
- Guyton, J. R. and K. F. Klemp (1996). "Development of the lipid-rich core in human atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **16**(1): 4-11.
- Haas, T. L. and J. A. Madri (1999). "Extracellular matrix-driven matrix metalloproteinase production in endothelial cells: implications for angiogenesis." Trends Cardiovasc Med **9**(3-4): 70-7.
- Hackett, S. F., S. Wiegand, et al. (2002). "Angiopoietin-2 plays an important role in retinal angiogenesis." J Cell Physiol **192**(2): 182-7.
- Haider, A. W., P. W. Wilson, et al. (2002). "The association of seropositivity to Helicobacter pylori, Chlamydia pneumoniae, and cytomegalovirus with risk of cardiovascular disease: a prospective study." J Am Coll Cardiol **40**(8): 1408-13.

- Hallstrom, A. P., L. A. Cobb, et al. (1986). "Smoking as a risk factor for recurrence of sudden cardiac arrest." N Engl J Med **314**(5): 271-5.
- Hamet, P. and D. deBlois (2001). "Endothelial and myocyte apoptosis--role of angiotensin II." Can J Cardiol **17 Suppl A**: 26A-8A.
- Harada-Shiba, M., M. Kinoshita, et al. (1998). "Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis in cultured human umbilical vein endothelial cells by common and unique mechanisms." J Biol Chem **273**(16): 9681-7.
- Harats, D., M. Ben-Naim, et al. (1989). "Cigarette smoking renders LDL susceptible to peroxidative modification and enhanced metabolism by macrophages." Atherosclerosis **79**(2-3): 245-52.
- Harding, S. A., J. Sarma, et al. (2004). "Upregulation of the CD40/CD40 ligand dyad and platelet-monocyte aggregation in cigarette smokers." Circulation **109**(16): 1926-9.
- Harding, S. A., A. J. Sommerfield, et al. (2004). "Increased CD40 ligand and platelet-monocyte aggregates in patients with type 1 diabetes mellitus." Atherosclerosis **176**(2): 321-5.
- Harrison, D. G. (1997). "Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction." J Clin Invest **100**(9): 2153-7.
- He, Z. and M. Tessier-Lavigne (1997). "Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III." Cell **90**(4): 739-51.

- Heeschen, C., J. J. Jang, et al. (2001). "Nicotine stimulates angiogenesis and promotes tumor growth and atherosclerosis." Nat Med 7(7): 833-9.
- Heitzer, T., C. Brockhoff, et al. (2000). "Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation in chronic smokers : evidence for a dysfunctional nitric oxide synthase." Circ Res 86(2): E36-41.
- Heitzer, T., H. Just, et al. (1996). "Antioxidant vitamin C improves endothelial dysfunction in chronic smokers." Circulation 94(1): 6-9.
- Heitzer, T., S. Yla-Herttuala, et al. (1996). "Cigarette smoking potentiates endothelial dysfunction of forearm resistance vessels in patients with hypercholesterolemia. Role of oxidized LDL." Circulation 93(7): 1346-53.
- Heldin, C. H. (1995). "Dimerization of cell surface receptors in signal transduction." Cell 80(2): 213-23.
- Helisch, A. and W. Schaper (2003). "Arteriogenesis: the development and growth of collateral arteries." Microcirculation 10(1): 83-97.
- Henry, P., P. Richard, et al. (1999). "[Diabetic coronary disease and risk of myocardial infarction]." Arch Mal Coeur Vaiss 92(2): 219-23.
- Hernandez, N., S. H. Torres, et al. (1999). "Capillary changes in skeletal muscle of patients with essential hypertension." Anat Rec 256(4): 425-32.

- Heydarkhan-Hagvall, S., G. Helenius, et al. (2003). "Co-culture of endothelial cells and smooth muscle cells affects gene expression of angiogenic factors." J Cell Biochem **89**(6): 1250-9.
- Heymans, S., A. Luttun, et al. (1999). "Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure." Nat Med **5**(10): 1135-42.
- Higman, D. J., A. M. Strachan, et al. (1996). "Smoking impairs the activity of endothelial nitric oxide synthase in saphenous vein." Arterioscler Thromb Vasc Biol **16**(4): 546-52.
- Hill, J. M., G. Zalos, et al. (2003). "Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk." N Engl J Med **348**(7): 593-600.
- Hirschi, K. K. and P. A. D'Amore (1996). "Pericytes in the microvasculature." Cardiovasc Res **32**(4): 687-98.
- Hirschi, K. K., S. A. Rohovsky, et al. (1998). "PDGF, TGF-beta, and heterotypic cell-cell interactions mediate endothelial cell-induced recruitment of 10T1/2 cells and their differentiation to a smooth muscle fate." J Cell Biol **141**(3): 805-14.
- Hochberg, I., A. Hoffman, et al. (2001). "Regulation of VEGF in diabetic patients with critical limb ischemia." Ann Vasc Surg **15**(3): 388-92.

Holmgren, L., A. Glaser, et al. (1991). "Angiogenesis during human extraembryonic development involves the spatiotemporal control of PDGF ligand and receptor gene expression." Development 113(3): 749-54.

Horowitz, J. R., A. Rivard, et al. (1997). "Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor produces nitric oxide-dependent hypotension. Evidence for a maintenance role in quiescent adult endothelium." Arterioscler Thromb Vasc Biol 17(11): 2793-800.

Horton, M. A. (1997). "The alpha v beta 3 integrin "vitronectin receptor"." Int J Biochem Cell Biol 29(5): 721-5.

Horvathova, M., E. Jahnova, et al. (2001). "Detection of intracellular cytokines during antioxidant supplementation in corticoid-dependent asthmatics and modulation of adhesion molecule expression on cultured endothelial cells." Biol Trace Elem Res 83(1): 17-30.

Houck, K. A., N. Ferrara, et al. (1991). "The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA." Mol Endocrinol 5(12): 1806-14.

Howard, G., L. E. Wagenknecht, et al. (1998). "Cigarette smoking and progression of atherosclerosis: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study." Jama 279(2): 119-24.

- Howard, G., L. E. Wagenknecht, et al. (1998). "Cigarette smoking and other risk factors for silent cerebral infarction in the general population." Stroke **29**(5): 913-7.
- Hristov, M., W. Erl, et al. (2003). "Endothelial progenitor cells: isolation and characterization." Trends Cardiovasc Med **13**(5): 201-6.
- Hristov, M., W. Erl, et al. (2003). "Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(7): 1185-9.
- Huang, L. E., W. G. Willmore, et al. (1999). "Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activation by carbon monoxide and nitric oxide. Implications for oxygen sensing and signaling." J Biol Chem **274**(13): 9038-44.
- Hudlicka, O. (1998). "Is physiological angiogenesis in skeletal muscle regulated by changes in microcirculation?" Microcirculation **5**(1): 5-23.
- Hughes, A. D., G. F. Clunn, et al. (1996). "Platelet-derived growth factor (PDGF): actions and mechanisms in vascular smooth muscle." Gen Pharmacol **27**(7): 1079-89.
- Hunter, K. A., P. J. Garlick, et al. (2001). "Effects of smoking and abstention from smoking on fibrinogen synthesis in humans." Clin Sci (Lond) **100**(4): 459-65.
- Ichiki, K., H. Ikeda, et al. (1996). "Long-term smoking impairs platelet-derived nitric oxide release." Circulation **94**(12): 3109-14.

- Ignarro, L. J. (1989). "Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein." Circ Res **65**(1): 1-21.
- Ignarro, L. J. (1989). "Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties." Faseb J **3**(1): 31-6.
- Imamura, H., N. Miyamoto, et al. (2001). "Cigarette smoking, blood pressure and serum lipids and lipoproteins in middle-aged women." J Physiol Anthropol Appl Human Sci **20**(1): 1-6.
- Imanishi, T., T. Hano, et al. (2003). "Oxidized low-density lipoprotein inhibits vascular endothelial growth factor-induced endothelial progenitor cell differentiation." Clin Exp Pharmacol Physiol **30**(9): 665-70.
- Imaoka, Y., T. Osanai, et al. (1999). "Nitric oxide-dependent vasodilator mechanism is not impaired by hypertension but is diminished with aging in the rat aorta." J Cardiovasc Pharmacol **33**(5): 756-61.
- Inoue, T., M. Hayashi, et al. (2001). "Significance of platelet aggregability immediately after blood sampling and effect of cigarette smoking." Platelets **12**(7): 415-8.
- Ismail, A., W. H. Frishman, et al. (1996). "Smoking, Nicotine, Nicotine Replacement, and Cardiovascular Disease." Am J Ther **3**(5): 348-357.

- Istvan, J. A. and T. W. Cunningham (1992). "Smoking rate, carboxyhemoglobin, and body mass in the Second National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES II)." J Behav Med **15**(6): 559-72.
- Ito, A., P. S. Tsao, et al. (1999). "Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase." Circulation **99**(24): 3092-5.
- Ito, W. D., M. Arras, et al. (1997). "Monocyte chemotactic protein-1 increases collateral and peripheral conductance after femoral artery occlusion." Circ Res **80**(6): 829-37.
- Iwakura, A., C. Luedemann, et al. (2003). "Estrogen-mediated, endothelial nitric oxide synthase-dependent mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells contributes to reendothelialization after arterial injury." Circulation **108**(25): 3115-21.
- Iyer, N. V., L. E. Kotch, et al. (1998). "Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha." Genes Dev **12**(2): 149-62.
- Iyer, N. V., L. E. Kotch, et al. (1998). "Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha." Genes Dev **12**(2): 149-62.
- Jacobi, J., J. J. Jang, et al. (2002). "Nicotine accelerates angiogenesis and wound healing in genetically diabetic mice." Am J Pathol **161**(1): 97-104.

- Jiang, W., S. Hiscox, et al. (1999). "Hepatocyte growth factor/scatter factor, its molecular, cellular and clinical implications in cancer." Crit Rev Oncol Hematol **29**(3): 209-48.
- Johnstone, M. T., S. J. Creager, et al. (1993). "Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus." Circulation **88**(6): 2510-6.
- Joseph, A. M., S. M. Norman, et al. (1996). "The safety of transdermal nicotine as an aid to smoking cessation in patients with cardiac disease." N Engl J Med **335**(24): 1792-8.
- Joukov, V., K. Pajusola, et al. (1996). "A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases." Embo J **15**(7): 1751.
- Juhan-Vague, I., M. C. Alessi, et al. (2003). "Plasminogen activator inhibitor-1, inflammation, obesity, insulin resistance and vascular risk." J Thromb Haemost **1**(7): 1575-9.
- Juhan-Vague, I., M. C. Alessi, et al. (1996). "Thrombogenic and fibrinolytic factors and cardiovascular risk in non-insulin-dependent diabetes mellitus." Ann Med **28**(4): 371-80.
- Kadar, A. and T. Glasz (2001). "Development of atherosclerosis and plaque biology." Cardiovasc Surg **9**(2): 109-21.

- Kaiser, D., M. A. Freyberg, et al. (1997). "Lack of hemodynamic forces triggers apoptosis in vascular endothelial cells." Biochem Biophys Res Commun **231**(3): 586-90.
- Kallio, P. J., K. Okamoto, et al. (1998). "Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha." Embo J **17**(22): 6573-86.
- Kalra, V. K., Y. Ying, et al. (1994). "Mechanism of cigarette smoke condensate induced adhesion of human monocytes to cultured endothelial cells." J Cell Physiol **160**(1): 154-62.
- Kannel, W. B. (1987). "Epidemiology and prevention of cardiac failure: Framingham Study insights." Eur Heart J **8 Suppl F**: 23-6.
- Kannel, W. B. and R. D. Abbott (1984). "Incidence and prognosis of unrecognized myocardial infarction. An update on the Framingham study." N Engl J Med **311**(18): 1144-7.
- Kannel, W. B., P. A. Wolf, et al. (1987). "Fibrinogen and risk of cardiovascular disease. The Framingham Study." Jama **258**(9): 1183-6.
- Kasahara, Y., R. M. Tuder, et al. (2001). "Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema." Am J Respir Crit Care Med **163**(3 Pt 1): 737-44.

- Kawachi, I., G. A. Colditz, et al. (1994). "Smoking cessation and time course of decreased risks of coronary heart disease in middle-aged women." Arch Intern Med **154**(2): 169-75.
- Kawasaki, T., T. Kitsukawa, et al. (1999). "A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation." Development **126**(21): 4895-902.
- Kay, E. P., M. S. Lee, et al. (1998). "TGF-beta s stimulate cell proliferation via an autocrine production of FGF-2 in corneal stromal fibroblasts." Curr Eye Res **17**(3): 286-93.
- Kaykov, E., B. Abbou, et al. (1999). "Chlamydia pneumoniae in ischemic heart disease." Isr Med Assoc J **1**(4): 225-7.
- Kazama, Y., T. Noguchi, et al. (1989). "Effect of insulin on the production of prostacyclin and cell proliferation in cultured smooth muscle cells." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **37**(2): 129-34.
- Keck, P. J., S. D. Hauser, et al. (1989). "Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF." Science **246**(4935): 1309-12.
- Kelly, G. (2003). "The interaction of cigarette smoking and antioxidants. Part III: ascorbic acid." Altern Med Rev **8**(1): 43-54.
- Kelly, G. S. (2002). "The interaction of cigarette smoking and antioxidants. Part 2: alpha-tocopherol." Altern Med Rev **7**(6): 500-11.

- Kelly, G. S. (2002). "The interaction of cigarette smoking and antioxidants. Part I: diet and carotenoids." Altern Med Rev 7(5): 370-88.
- Kharb, S. and G. P. Singh (2000). "Effect of smoking on lipid profile, lipid peroxidation and antioxidant status in normal subjects and in patients during and after acute myocardial infarction." Clin Chim Acta 302(1-2): 213-9.
- Kharb, S., V. Singh, et al. (2001). "Plasma lipid peroxidation and vitamin E levels in smokers." Indian J Med Sci 55(6): 309-12.
- Kiefer, C. R., J. B. McKenney, et al. (2002). "Maturation-dependent acquired coronary structural alterations and atherogenesis in the Dahl sodium-sensitive hypertensive rat." Circulation 106(19): 2486-90.
- Kim, J. Y., C. Y. Choi, et al. (2004). "Induction of inducible nitric oxide synthase and proinflammatory cytokines expression by o,p'-DDT in macrophages." Toxicol Lett 147(3): 261-9.
- Kim, S., M. Harris, et al. (2000). "Regulation of integrin alpha v beta 3-mediated endothelial cell migration and angiogenesis by integrin alpha5beta1 and protein kinase A." J Biol Chem 275(43): 33920-8.
- Kinlay, S., D. Behrendt, et al. (2001). "Role of endothelin-1 in the active constriction of human atherosclerotic coronary arteries." Circulation 104(10): 1114-8.

- Kitsukawa, T., M. Shimizu, et al. (1997). "Neuropilin-semaphorin III/D-mediated chemorepulsive signals play a crucial role in peripheral nerve projection in mice." Neuron **19**(5): 995-1005.
- Kitsukawa, T., A. Shimono, et al. (1995). "Overexpression of a membrane protein, neuropilin, in chimeric mice causes anomalies in the cardiovascular system, nervous system and limbs." Development **121**(12): 4309-18.
- Kliche, S. and J. Waltenberger (2001). "VEGF receptor signaling and endothelial function." IUBMB Life **52**(1-2): 61-6.
- Kolodgie, F. D., R. Virmani, et al. (1990). "Vascular reactivity during the progression of atherosclerotic plaque. A study in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits." Circ Res **66**(4): 1112-26.
- Kong, C., L. Nimmo, et al. (2001). "Smoking is associated with increased hepatic lipase activity, insulin resistance, dyslipidaemia and early atherosclerosis in Type 2 diabetes." Atherosclerosis **156**(2): 373-8.
- Kong, D., L. G. Melo, et al. (2004). "Cytokine-induced mobilization of circulating endothelial progenitor cells enhances repair of injured arteries." Circulation **110**(14): 2039-46.
- Kool, M. J., A. P. Hoeks, et al. (1993). "Short- and long-term effects of smoking on arterial wall properties in habitual smokers." J Am Coll Cardiol **22**(7): 1881-6.

- Koolwijk, P., M. G. van Erck, et al. (1996). "Cooperative effect of TNF α , bFGF, and VEGF on the formation of tubular structures of human microvascular endothelial cells in a fibrin matrix. Role of urokinase activity." J Cell Biol **132**(6): 1177-88.
- Kroll, J. and J. Waltenberger (1997). "The vascular endothelial growth factor receptor KDR activates multiple signal transduction pathways in porcine aortic endothelial cells." J Biol Chem **272**(51): 32521-7.
- Ku, D. D. (1996). "Nitric oxide- and nitric oxide donor-induced relaxation." Methods Enzymol **269**: 107-19.
- Kumar, S. V. and S. Bhattacharya (2000). "In vitro toxicity of mercury, cadmium, and arsenic to platelet aggregation: influence of adenylate cyclase and phosphodiesterase activity." In Vitro Mol Toxicol **13**(2): 137-44.
- Kumer, S. C., D. N. Damon, et al. (2000). "Patterns of conducted vasomotor response in the mouse." Microvasc Res **59**(2): 310-5.
- Kunsch, C. and R. M. Medford (1999). "Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature." Circ Res **85**(8): 753-66.
- Kureishi, Y., Z. Luo, et al. (2000). "The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals." Nat Med **6**(9): 1004-10.

- Kurth, T., C. S. Kase, et al. (2003). "Smoking and risk of hemorrhagic stroke in women." Stroke 34(12): 2792-5.
- Kurth, T., C. S. Kase, et al. (2003). "Smoking and the risk of hemorrhagic stroke in men." Stroke 34(5): 1151-5.
- Kuzuya, M., M. A. Ramos, et al. (2001). "VEGF protects against oxidized LDL toxicity to endothelial cells by an intracellular glutathione-dependent mechanism through the KDR receptor." Arterioscler Thromb Vasc Biol 21(5): 765-70.
- Landmesser, U., N. Engberding, et al. (2004). "Statin-induced improvement of endothelial progenitor cell mobilization, myocardial neovascularization, left ventricular function, and survival after experimental myocardial infarction requires endothelial nitric oxide synthase." Circulation 110(14): 1933-9.
- Landmesser, U., B. Hornig, et al. (2004). "Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis?" Circulation 109(21 Suppl 1): II27-33.
- Laursen, J. B., S. Boesgaard, et al. (2001). "Endothelium-dependent vasorelaxation is inhibited by in vivo depletion of vascular thiol levels: role of endothelial nitric oxide synthase." Free Radic Res 35(4): 387-94.
- Lawler, J. (2002). "Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth." J Cell Mol Med 6(1): 1-12.

- Lee, D. H., M. H. Ha, et al. (2001). "Effects of smoking cessation on changes in blood pressure and incidence of hypertension: a 4-year follow-up study." Hypertension **37**(2): 194-8.
- Lee, P. C., M. R. Kibbe, et al. (2000). "Nitric oxide induces angiogenesis and upregulates alpha(v)beta(3) integrin expression on endothelial cells." Microvasc Res **60**(3): 269-80.
- Lehr, H. A., A. S. Weyrich, et al. (1997). "Vitamin C blocks inflammatory platelet-activating factor mimetics created by cigarette smoking." J Clin Invest **99**(10): 2358-64.
- Lesperance, F., N. Frasure-Smith, et al. (2004). "The association between major depression and levels of soluble intercellular adhesion molecule 1, interleukin-6, and C-reactive protein in patients with recent acute coronary syndromes." Am J Psychiatry **161**(2): 271-7.
- Leung, D. W., G. Cachianes, et al. (1989). "Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen." Science **246**(4935): 1306-9.
- Levy, A. P., N. S. Levy, et al. (1995). "Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia." J Biol Chem **270**(22): 13333-40.
- Levy, N. S., S. Chung, et al. (1998). "Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR." J Biol Chem **273**(11): 6417-23.

- Li, X. and U. Eriksson (2003). "Novel PDGF family members: PDGF-C and PDGF-D." Cytokine Growth Factor Rev **14**(2): 91-8.
- Libby, P. and P. M. Ridker (2004). "Inflammation and atherosclerosis: role of C-reactive protein in risk assessment." Am J Med **116 Suppl 6A**: 9S-16S.
- Lightwood, J. M. and S. A. Glantz (1997). "Short-term economic and health benefits of smoking cessation: myocardial infarction and stroke." Circulation **96**(4): 1089-96.
- Linton, M. F. and S. Fazio (2003). "Macrophages, inflammation, and atherosclerosis." Int J Obes Relat Metab Disord **27 Suppl 3**: S35-40.
- Liu, Y., S. R. Cox, et al. (1995). "Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer." Circ Res **77**(3): 638-43.
- Llevadot, J., S. Murasawa, et al. (2001). "HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow--derived endothelial progenitor cells." J Clin Invest **108**(3): 399-405.
- Loomans, C. J., H. H. Dao, et al. (2004). "Is endothelial progenitor cell dysfunction involved in altered angiogenic processes in patients with hypertension?" Curr Hypertens Rep **6**(1): 51-4.

- Loomans, C. J., E. J. de Koning, et al. (2004). "Endothelial progenitor cell dysfunction: a novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type 1 diabetes." Diabetes **53**(1): 195-9.
- Lorenzi, M., J. A. Nordberg, et al. (1987). "High glucose prolongs cell-cycle traversal of cultured human endothelial cells." Diabetes **36**(11): 1261-7.
- Losordo, D. W. and S. Dimmeler (2004). "Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease: part I: angiogenic cytokines." Circulation **109**(21): 2487-91.
- Lowe, G. D. (2004). "Venous and arterial thrombosis: epidemiology and risk factors at various ages." Maturitas **47**(4): 259-63.
- Ma, L., J. Y. Chow, et al. (1999). "Cigarette smoke and its extract delays ulcer healing and reduces nitric oxide synthase activity and angiogenesis in rat stomach." Clin Exp Pharmacol Physiol **26**(10): 828-9.
- Madtes, D. K., E. W. Raines, et al. (1988). "Induction of transforming growth factor-alpha in activated human alveolar macrophages." Cell **53**(2): 285-93.
- Maisonpierre, P. C., C. Suri, et al. (1997). "Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis." Science **277**(5322): 55-60.
- Makomaski Illing, E. M. and M. J. Kaiserman (2004). "Mortality attributable to tobacco use in Canada and its regions, 1998." Can J Public Health **95**(1): 38-44.

- Maltepe, E., J. V. Schmidt, et al. (1997). "Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT." Nature **386**(6623): 403-7.
- Mandriota, S. J., P. A. Menoud, et al. (1996). "Transforming growth factor beta 1 down-regulates vascular endothelial growth factor receptor 2/flk-1 expression in vascular endothelial cells." J Biol Chem **271**(19): 11500-5.
- Mann, B. K., R. H. Schmedlen, et al. (2001). "Tethered-TGF-beta increases extracellular matrix production of vascular smooth muscle cells." Biomaterials **22**(5): 439-44.
- Marra, F., R. DeFranco, et al. (1999). "Expression of monocyte chemotactic protein-1 precedes monocyte recruitment in a rat model of acute liver injury, and is modulated by vitamin E." J Investig Med **47**(1): 66-75.
- Marra, F., R. G. Romanelli, et al. (1999). "Monocyte chemotactic protein-1 as a chemoattractant for human hepatic stellate cells." Hepatology **29**(1): 140-8.
- Martin, W. H., 3rd, T. Ogawa, et al. (1991). "Effects of aging, gender, and physical training on peripheral vascular function." Circulation **84**(2): 654-64.
- Marui, N., M. K. Offermann, et al. (1993). "Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells." J Clin Invest **92**(4): 1866-74.

Matetzky, S., S. Tani, et al. (2000). "Smoking increases tissue factor expression in atherosclerotic plaques: implications for plaque thrombogenicity." Circulation **102**(6): 602-4.

Matsunaga, T., D. W. Weihrauch, et al. (2002). "Angiostatin inhibits coronary angiogenesis during impaired production of nitric oxide." Circulation **105**(18): 2185-91.

Matsushita, H., R. Morishita, et al. (2000). "Hypoxia-induced endothelial apoptosis through nuclear factor-kappaB (NF-kappaB)-mediated bcl-2 suppression: in vivo evidence of the importance of NF-kappaB in endothelial cell regulation." Circ Res **86**(9): 974-81.

Maxwell, P. H., M. S. Wiesener, et al. (1999). "The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis." Nature **399**(6733): 271-5.

Mayer, B., D. Koesling, et al. (1993). "Characterization of nitric oxide synthase, soluble guanylyl cyclase, and Ca²⁺/calmodulin-stimulated cGMP phosphodiesterase as components of neuronal signal transduction." Adv Second Messenger Phosphoprotein Res **28**: 111-9.

Mazure, N. M., E. Y. Chen, et al. (1997). "Induction of vascular endothelial growth factor by hypoxia is modulated by a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in Ha-ras-transformed cells through a hypoxia inducible factor-1 transcriptional element." Blood **90**(9): 3322-31.

- Mazzone, A., C. Cusa, et al. (2001). "Cigarette smoking and hypertension influence nitric oxide release and plasma levels of adhesion molecules." Clin Chem Lab Med **39**(9): 822-6.
- Meerovitch, K., F. Bergeron, et al. (2003). "A novel RGD antagonist that targets both α v β 3 and α 5 β 1 induces apoptosis of angiogenic endothelial cells on type I collagen." Vascul Pharmacol **40**(2): 77-89.
- Melkonian, G., C. Le, et al. (2000). "Normal patterns of angiogenesis and extracellular matrix deposition in chick chorioallantoic membranes are disrupted by mainstream and sidestream cigarette smoke." Toxicol Appl Pharmacol **163**(1): 26-37.
- Mendall, M. A., P. Patel, et al. (1997). "Relation of serum cytokine concentrations to cardiovascular risk factors and coronary heart disease." Heart **78**(3): 273-7.
- Mendelsohn, M. E. and R. H. Karas (1999). "The protective effects of estrogen on the cardiovascular system." N Engl J Med **340**(23): 1801-11.
- Mennen, L. I., B. Balkau, et al. (1999). "Gender differences in the relation between fibrinogen, tissue-type plasminogen activator antigen and markers of insulin resistance: effects of smoking. D.E.S.I.R. Study Group. Data from an Epidemiological Study on Insulin Resistance Syndrome." Thromb Haemost **82**(3): 1106-11.

- Mercelina-Roumans, P. E., J. M. Ubachs, et al. (1994). "Leucocyte count and leucocyte differential in smoking and non-smoking females during pregnancy." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **55**(3): 169-73.
- Metz, L. and D. D. Waters (2003). "Implications of cigarette smoking for the management of patients with acute coronary syndromes." Prog Cardiovasc Dis **46**(1): 1-9.
- Meyer, M., M. Clauss, et al. (1999). "A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases." Embo J **18**(2): 363-74.
- Miller, E. A., J. S. Pankow, et al. (2003). "Glutathione-S-transferase genotypes, smoking, and their association with markers of inflammation, hemostasis, and endothelial function: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study." Atherosclerosis **171**(2): 265-72.
- Mills, J. L., Sr. (2003). "Buerger's disease in the 21st century: diagnosis, clinical features, and therapy." Semin Vasc Surg **16**(3): 179-89.
- Minet, E., T. Arnould, et al. (2000). "ERK activation upon hypoxia: involvement in HIF-1 activation." FEBS Lett **468**(1): 53-8.
- Minet, E., I. Ernest, et al. (1999). "HIF1A gene transcription is dependent on a core promoter sequence encompassing activating and inhibiting sequences located

upstream from the transcription initiation site and cis elements located within the 5'UTR." Biochem Biophys Res Commun **261**(2): 534-40.

Minet, E., G. Michel, et al. (2001). "Transduction pathways involved in Hypoxia-Inducible Factor-1 phosphorylation and activation." Free Radic Biol Med **31**(7): 847-55.

Minet, E., G. Michel, et al. (2000). "Role of HIF-1 as a transcription factor involved in embryonic development, cancer progression and apoptosis (review)." Int J Mol Med **5**(3): 253-9.

Minet, E., D. Mottet, et al. (1999). "Hypoxia-induced activation of HIF-1: role of HIF-1alpha-Hsp90 interaction." FEBS Lett **460**(2): 251-6.

Moldovan, L., N. I. Moldovan, et al. (2000). "Redox changes of cultured endothelial cells and actin dynamics." Circ Res **86**(5): 549-57.

Moncada, S. (1993). "The L-arginine: nitric oxide pathway, cellular transduction and immunological roles." Adv Second Messenger Phosphoprotein Res **28**: 97-9.

Moncada, S. and A. Higgs (1993). "The L-arginine-nitric oxide pathway." N Engl J Med **329**(27): 2002-12.

Moncada, S. and J. F. Martin (1993). "Evolution of nitric oxide." Lancet **341**(8859): 1511.

- Moolchan, E. T., D. L. Hudson, et al. (2004). "Heart rate and blood pressure responses to tobacco smoking among African-American adolescents." J Natl Med Assoc **96**(6): 767-71.
- Moore, W. S., H. J. Barnett, et al. (1995). "Guidelines for carotid endarterectomy. A multidisciplinary consensus statement from the Ad Hoc Committee, American Heart Association." Circulation **91**(2): 566-79.
- Morbidelli, L., C. H. Chang, et al. (1996). "Nitric oxide mediates mitogenic effect of VEGF on coronary venular endothelium." Am J Physiol **270**(1 Pt 2): H411-5.
- Morita, T. and S. Kourembanas (1995). "Endothelial cell expression of vasoconstrictors and growth factors is regulated by smooth muscle cell-derived carbon monoxide." J Clin Invest **96**(6): 2676-82.
- Morita, T., M. A. Perrella, et al. (1995). "Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(5): 1475-9.
- Morrish, N. J., L. K. Stevens, et al. (1990). "A prospective study of mortality among middle-aged diabetic patients (the London Cohort of the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetics) II: Associated risk factors." Diabetologia **33**(9): 542-8.
- Morrow, J. D., B. Frei, et al. (1995). "Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage." N Engl J Med **332**(18): 1198-203.

- Moulton, K. S. (2001). "Plaque angiogenesis and atherosclerosis." Curr Atheroscler Rep 3(3): 225-33.
- Moulton, K. S., E. Heller, et al. (1999). "Angiogenesis inhibitors endostatin or TNP-470 reduce intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein E-deficient mice." Circulation 99(13): 1726-32.
- Muhlhauser, I., R. Verhasselt, et al. (1993). "Leucocyte count, proteinuria and smoking in type 1 diabetes mellitus." Acta Diabetol 30(2): 105-7.
- Mukhopadhyay, D., L. Tsiokas, et al. (1995). "Hypoxic induction of human vascular endothelial growth factor expression through c-Src activation." Nature 375(6532): 577-81.
- Munoz-Chapuli, R., A. R. Quesada, et al. (2004). "Angiogenesis and signal transduction in endothelial cells." Cell Mol Life Sci 61(17): 2224-43.
- Murayama, T. and T. Asahara (2002). "Bone marrow-derived endothelial progenitor cells for vascular regeneration." Curr Opin Mol Ther 4(4): 395-402.
- Murohara, T., T. Asahara, et al. (1998). "Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia." J Clin Invest 101(11): 2567-78.
- Murohara, T., J. R. Horowitz, et al. (1998). "Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin." Circulation 97(1): 99-107.

- Murohara, T., B. Witzendichler, et al. (1999). "Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell migration." Arterioscler Thromb Vasc Biol **19**(5): 1156-61.
- Murugesan, G. and P. L. Fox (1996). "Role of lysophosphatidylcholine in the inhibition of endothelial cell motility by oxidized low density lipoprotein." J Clin Invest **97**(12): 2736-44.
- Mustonen, T. and K. Alitalo (1995). "Endothelial receptor tyrosine kinases involved in angiogenesis." J Cell Biol **129**(4): 895-8.
- Nakagawa, T., T. Kobayashi, et al. (2004). "Randomized, controlled trial of secondary prevention of coronary sclerosis in normocholesterolemic patients using pravastatin: final 5-year angiographic follow-up of the Prevention of Coronary Sclerosis (PCS) study." Int J Cardiol **97**(1): 107-14.
- Napoli, C., C. K. Glass, et al. (1999). "Influence of maternal hypercholesterolaemia during pregnancy on progression of early atherosclerotic lesions in childhood: Fate of Early Lesions in Children (FELIC) study." Lancet **354**(9186): 1234-41.
- Nascetti, S., R. Elosua, et al. (2001). "Variables associated with fibrinogen in a population-based study: interaction between smoking and age on fibrinogen concentration." Eur J Epidemiol **17**(10): 953-8.

- Neufeld, G., O. Kessler, et al. (2002). "The interaction of Neuropilin-1 and Neuropilin-2 with tyrosine-kinase receptors for VEGF." Adv Exp Med Biol **515**: 81-90.
- Neunteufl, T., U. Priglinger, et al. (2000). "Effects of vitamin E on chronic and acute endothelial dysfunction in smokers." J Am Coll Cardiol **35**(2): 277-83.
- Newby, D. E. and K. A. Fox (2001). "Unstable angina: the first 48 hours and later in-hospital management." Br Med Bull **59**: 69-87.
- Newby, D. E., R. A. Wright, et al. (1999). "Endothelial dysfunction, impaired endogenous fibrinolysis, and cigarette smoking: a mechanism for arterial thrombosis and myocardial infarction." Circulation **99**(11): 1411-5.
- Nia, A. B., F. J. Van Schooten, et al. (2001). "A multi-biomarker approach to study the effects of smoking on oxidative DNA damage and repair and antioxidative defense mechanisms." Carcinogenesis **22**(3): 395-401.
- Nicholson, A. C. and D. P. Hajjar (1998). "Herpesvirus in atherosclerosis and thrombosis: etiologic agents or ubiquitous bystanders?" Arterioscler Thromb Vasc Biol **18**(3): 339-48.
- Nitenberg, A., F. Paycha, et al. (1998). "Coronary artery responses to physiological stimuli are improved by deferoxamine but not by L-arginine in non-insulin-dependent diabetic patients with angiographically normal coronary arteries and no other risk factors." Circulation **97**(8): 736-43.

- Norata, G. D., A. Pirillo, et al. (2003). "Statins and oxidative stress during atherogenesis." J Cardiovasc Risk **10**(3): 181-9.
- Noronha-Dutra, A. A., M. M. Epperlein, et al. (1993). "Effect of cigarette smoking on cultured human endothelial cells." Cardiovasc Res **27**(5): 774-8.
- Novick, S. C. and R. P. Warrell, Jr. (2000). "Arsenicals in hematologic cancers." Semin Oncol **27**(5): 495-501.
- Olin, J. W. (2000). "Thromboangiitis obliterans (Buerger's disease)." N Engl J Med **343**(12): 864-9.
- Olofsson, B., K. Pajusola, et al. (1996). "Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(6): 2576-81.
- O'Reilly, M. S., L. Holmgren, et al. (1994). "Angiostatin: a circulating endothelial cell inhibitor that suppresses angiogenesis and tumor growth." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **59**: 471-82.
- O'Reilly, M. S., L. Holmgren, et al. (1994). "Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma." Cell **79**(2): 315-28.
- Pajusola, K., O. Aprelikova, et al. (1992). "FLT4 receptor tyrosine kinase contains seven immunoglobulin-like loops and is expressed in multiple human tissues and cell lines." Cancer Res **52**(20): 5738-43.

- Panza, J. A., P. R. Casino, et al. (1993). "Role of endothelium-derived nitric oxide in the abnormal endothelium-dependent vascular relaxation of patients with essential hypertension." Circulation **87**(5): 1468-74.
- Partanen, J., S. Vainikka, et al. (1993). "Structural and functional specificity of FGF receptors." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **340**(1293): 297-303.
- Parulkar, V. G., M. J. Barua, et al. (1973). "Smoking and leucocyte counts." J Postgrad Med **19**(3): 132-5.
- Patan, S. (1998). "TIE1 and TIE2 receptor tyrosine kinases inversely regulate embryonic angiogenesis by the mechanism of intussusceptive microvascular growth." Microvasc Res **56**(1): 1-21.
- Pearson, J. D. (2003). "Using endothelial progenitor cells for gene therapy." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(12): 2117-8.
- Pech-Amsellem, M. A., I. Myara, et al. (1996). "Enhanced modifications of low-density lipoproteins (LDL) by endothelial cells from smokers: a possible mechanism of smoking-related atherosclerosis." Cardiovasc Res **31**(6): 975-83.
- Pellicano, R., N. Leone, et al. (2000). "Helicobacter pylori seroprevalence in hepatitis C virus positive patients with cirrhosis." J Hepatol **33**(4): 648-50.

- Pepper, M. S. (1997). "Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity." Cytokine Growth Factor Rev **8**(1): 21-43.
- Pepper, M. S. (2001). "Extracellular proteolysis and angiogenesis." Thromb Haemost **86**(1): 346-55.
- Pepper, M. S. (2001). "Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **21**(7): 1104-17.
- Pepper, M. S., J. D. Vassalli, et al. (1993). "Biphasic effect of transforming growth factor-beta 1 on in vitro angiogenesis." Exp Cell Res **204**(2): 356-63.
- Peters, R. W., N. L. Benowitz, et al. (1987). "Electrophysiologic effects of cigarette smoking in patients with and without chronic beta-blocker therapy." Am J Cardiol **60**(13): 1078-82.
- Petrik, P. V., H. A. Gelabert, et al. (1995). "Cigarette smoking accelerates carotid artery intimal hyperplasia in a dose-dependent manner." Stroke **26**(8): 1409-14.
- Pfeifle, B. and H. Ditschuneit (1980). "The effect of insulin and insulin-like growth factors on cell proliferation of human smooth muscle cells." Artery **8**(4): 336-41.

- Powell, J. T. (1998). "Vascular damage from smoking: disease mechanisms at the arterial wall." Vasc Med 3(1): 21-8.
- Pretorius, M., D. A. Rosenbaum, et al. (2002). "Smoking impairs bradykinin-stimulated t-PA release." Hypertension 39(3): 767-71.
- Quensel, M., C. D. Agardh, et al. (1989). "Nicotine does not affect plasma lipoprotein concentrations in healthy men." Scand J Clin Lab Invest 49(2): 149-53.
- Radomski, M. W. and S. Moncada (1993). "Regulation of vascular homeostasis by nitric oxide." Thromb Haemost 70(1): 36-41.
- Raij, L., E. G. DeMaster, et al. (2001). "Cigarette smoke-induced endothelium dysfunction: role of superoxide anion." J Hypertens 19(5): 891-7.
- Raines, E. W. and R. Ross (1993). "Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis." Br Heart J 69(1 Suppl): S30-7.
- Rangan, G. K., Y. Wang, et al. (1999). "Inhibition of NFkappaB activation with antioxidants is correlated with reduced cytokine transcription in PTC." Am J Physiol 277(5 Pt 2): F779-89.
- Rangan, G. K., Y. Wang, et al. (1999). "Inhibition of nuclear factor-kappaB activation reduces cortical tubulointerstitial injury in proteinuric rats." Kidney Int 56(1): 118-34.

- Rangemark, C., G. Ciabattini, et al. (1993). "Excretion of thromboxane metabolites in healthy women after cessation of smoking." Arterioscler Thromb **13**(6): 777-82.
- Rappolee, D. A., D. Mark, et al. (1988). "Wound macrophages express TGF-alpha and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping." Science **241**(4866): 708-12.
- Reaven, G. and P. S. Tsao (2003). "Insulin resistance and compensatory hyperinsulinemia: the key player between cigarette smoking and cardiovascular disease?" J Am Coll Cardiol **41**(6): 1044-7.
- Reed, M. J., A. Corsa, et al. (1998). "Neovascularization in aged mice: delayed angiogenesis is coincident with decreased levels of transforming growth factor beta1 and type I collagen." Am J Pathol **152**(1): 113-23.
- Reinders, J. H., H. J. Brinkman, et al. (1986). "Cigarette smoke impairs endothelial cell prostacyclin production." Arteriosclerosis **6**(1): 15-23.
- Richey Sharrett, A., S. A. Coady, et al. (2004). "Smoking and diabetes differ in their associations with subclinical atherosclerosis and coronary heart disease-the ARIC Study." Atherosclerosis **172**(1): 143-9.
- Risau, W. (1998). "Angiogenesis is coming of age." Circ Res **82**(8): 926-8.
- Risau, W. and I. Flamme (1995). "Vasculogenesis." Annu Rev Cell Dev Biol **11**: 73-91.

- Rival, J., J. M. Riddle, et al. (1987). "Effects of chronic smoking on platelet function." Thromb Res **45**(1): 75-85.
- Rivard, A., L. Berthou-Soulie, et al. (2000). "Age-dependent defect in vascular endothelial growth factor expression is associated with reduced hypoxia-inducible factor 1 activity." J Biol Chem **275**(38): 29643-7.
- Rivard, A., J. E. Fabre, et al. (1999). "Age-dependent impairment of angiogenesis." Circulation **99**(1): 111-20.
- Rivard, A., M. Silver, et al. (1999). "Rescue of diabetes-related impairment of angiogenesis by intramuscular gene therapy with adeno-VEGF." Am J Pathol **154**(2): 355-63.
- Roboz, G. J., S. Dias, et al. (2000). "Arsenic trioxide induces dose- and time-dependent apoptosis of endothelium and may exert an antileukemic effect via inhibition of angiogenesis." Blood **96**(4): 1525-30.
- Rosen, E. M. and I. D. Goldberg (1997). "Regulation of angiogenesis by scatter factor." Exs **79**: 193-208.
- Rosen, E. M., K. Lamszus, et al. (1997). "HGF/SF in angiogenesis." Ciba Found Symp **212**: 215-26; discussion 227-9.
- Rosenberg, L., D. W. Kaufman, et al. (1985). "The risk of myocardial infarction after quitting smoking in men under 55 years of age." N Engl J Med **313**(24): 1511-4.

- Rosenberg, L., J. R. Palmer, et al. (1990). "Decline in the risk of myocardial infarction among women who stop smoking." N Engl J Med **322**(4): 213-7.
- Rosenfeld, M. E. (1996). "Cellular mechanisms in the development of atherosclerosis." Diabetes Res Clin Pract **30 Suppl**: 1-11.
- Ross, R. (1995). "Cell biology of atherosclerosis." Annu Rev Physiol **57**: 791-804.
- Ross, R. (1999). "Atherosclerosis is an inflammatory disease." Am Heart J **138**(5 Pt 2): S419-20.
- Ross, R., J. Glomset, et al. (1977). "Response to injury and atherogenesis." Am J Pathol **86**(3): 675-84.
- Rossig, L., B. Fichtlscherer, et al. (1999). "Nitric oxide inhibits caspase-3 by S-nitrosation in vivo." J Biol Chem **274**(11): 6823-6.
- Rousseau, S., F. Houle, et al. (1997). "p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells." Oncogene **15**(18): 2169-77.
- Roy, S. (1999). "Effects of smoking on prostacyclin formation and platelet aggregation in users of oral contraceptives." Am J Obstet Gynecol **180**(6 Pt 2): S364-8.
- Ryan, H. E., J. Lo, et al. (1998). "HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization." Embo J **17**(11): 3005-15.

- Salameh, A., M. Zinn, et al. (1997). "High D-glucose induces alterations of endothelial cell structure in a cell-culture model." J Cardiovasc Pharmacol **30**(2): 182-90.
- Salbas, K. (1994). "Effect of acute smoking on red blood cell deformability in healthy young and elderly non-smokers, and effect of verapamil on age- and acute smoking-induced change in red blood cell deformability." Scand J Clin Lab Invest **54**(6): 411-6.
- Sambola, A., J. Osende, et al. (2003). "Role of risk factors in the modulation of tissue factor activity and blood thrombogenicity." Circulation **107**(7): 973-7.
- Sampson, M. J., I. R. Davies, et al. (2002). "Monocyte and neutrophil adhesion molecule expression during acute hyperglycemia and after antioxidant treatment in type 2 diabetes and control patients." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(7): 1187-93.
- Sander, D., K. Winbeck, et al. (2002). "Reduced progression of early carotid atherosclerosis after antibiotic treatment and Chlamydia pneumoniae seropositivity." Circulation **106**(19): 2428-33.
- Sander, D., K. Winbeck, et al. (2004). "Progression of early carotid atherosclerosis is only temporarily reduced after antibiotic treatment of Chlamydia pneumoniae seropositivity." Circulation **109**(8): 1010-5.

- Sarzani, R., G. Arnaldi, et al. (1991). "Effects of hypertension and aging on platelet-derived growth factor and platelet-derived growth factor receptor expression in rat aorta and heart." Hypertension **18**(5 Suppl): III93-9.
- Sato, N., J. G. Beitz, et al. (1993). "Platelet-derived growth factor indirectly stimulates angiogenesis in vitro." Am J Pathol **142**(4): 1119-30.
- Sawada, M., Y. Kishi, et al. (2002). "Smokers lack morning increase in platelet sensitivity to nitric oxide." J Cardiovasc Pharmacol **40**(4): 571-6.
- Schaberg, T., C. Lauer, et al. (1992). "Increased number of alveolar macrophages expressing adhesion molecules of the leukocyte adhesion molecule family in smoking subjects. Association with cell-binding ability and superoxide anion production." Am Rev Respir Dis **146**(5 Pt 1): 1287-93.
- Scheubel, R. J., H. Zorn, et al. (2003). "Age-dependent depression in circulating endothelial progenitor cells in patients undergoing coronary artery bypass grafting." J Am Coll Cardiol **42**(12): 2073-80.
- Schievink, W. I. (1997). "Intracranial aneurysms." N Engl J Med **336**(1): 28-40.
- Schmidt, H. H., S. M. Lohmann, et al. (1993). "The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action." Biochim Biophys Acta **1178**(2): 153-75.

- Schneller, M., K. Vuori, et al. (1997). "Alphavbeta3 integrin associates with activated insulin and PDGFbeta receptors and potentiates the biological activity of PDGF." Embo J **16**(18): 5600-7.
- Schreiber, A. B., M. E. Winkler, et al. (1986). "Transforming growth factor-alpha: a more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor." Science **232**(4755): 1250-3.
- Schuitemaker, G. E., G. J. Dinant, et al. (2002). "Relationship between smoking habits and low-density lipoprotein-cholesterol, high-density lipoprotein-cholesterol, and triglycerides in a hypercholesterolemic adult cohort, in relation to gender and age." Clin Exp Med **2**(2): 83-8.
- Schwartz, S. W., C. Carlucci, et al. (2004). "Synergism between smoking and vital exhaustion in the risk of ischemic stroke: evidence from the ARIC study." Ann Epidemiol **14**(6): 416-24.
- Semenza, G. (2002). "Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1." Biochem Pharmacol **64**(5-6): 993-8.
- Semenza, G. L. (2000). "Expression of hypoxia-inducible factor 1: mechanisms and consequences." Biochem Pharmacol **59**(1): 47-53.
- Semenza, G. L. (2000). "HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia." J Appl Physiol **88**(4): 1474-80.

- Semenza, G. L., F. Agani, et al. (1999). "Regulation of cardiovascular development and physiology by hypoxia-inducible factor 1." Ann N Y Acad Sci **874**: 262-8.
- Senger, D. R., L. Van de Water, et al. (1993). "Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology." Cancer Metastasis Rev **12**(3-4): 303-24.
- Shalaby, F., J. Ho, et al. (1997). "A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis." Cell **89**(6): 981-90.
- Shen, Y., V. Rattan, et al. (1996). "Cigarette smoke condensate-induced adhesion molecule expression and transendothelial migration of monocytes." Am J Physiol **270**(5 Pt 2): H1624-33.
- Shibuya, M. (2001). "Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis." Cell Struct Funct **26**(1): 25-35.
- Shibuya, M., L. Seetharam, et al. (1994). "Possible involvement of VEGF-FLT tyrosine kinase receptor system in normal and tumor angiogenesis." Princess Takamatsu Symp **24**: 162-70.
- Shih, S. C. and K. P. Claffey (1999). "Regulation of human vascular endothelial growth factor mRNA stability in hypoxia by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L." J Biol Chem **274**(3): 1359-65.

- Shihabi, A., W. G. Li, et al. (2002). "Antioxidant therapy for atherosclerotic vascular disease: the promise and the pitfalls." Am J Physiol Heart Circ Physiol **282**(3): H797-802.
- Shono, T., M. Ono, et al. (1996). "Involvement of the transcription factor NF-kappaB in tubular morphogenesis of human microvascular endothelial cells by oxidative stress." Mol Cell Biol **16**(8): 4231-9.
- Sieber, C. C., L. T. Sumanovski, et al. (2001). "In vivo angiogenesis in normal and portal hypertensive rats: role of basic fibroblast growth factor and nitric oxide." J Hepatol **34**(5): 644-50.
- Silvestre, J. S., S. Bergaya, et al. (2001). "Proangiogenic effect of angiotensin-converting enzyme inhibition is mediated by the bradykinin B(2) receptor pathway." Circ Res **89**(8): 678-83.
- Smith, C. J. and T. H. Fischer (2001). "Particulate and vapor phase constituents of cigarette mainstream smoke and risk of myocardial infarction." Atherosclerosis **158**(2): 257-67.
- Smith, C. J., T. H. Fischer, et al. (2001). "Urinary thromboxane, prostacyclin, cortisol, and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in nonsmokers exposed and not exposed to environmental tobacco smoke." Toxicol Sci **59**(2): 316-23.
- Smith, F. B., A. J. Lee, et al. (1997). "Hemostatic factors as predictors of ischemic heart disease and stroke in the Edinburgh Artery Study." Arterioscler Thromb Vasc Biol **17**(11): 3321-5.

- Sorescu, D. and K. K. Griendling (2002). "Reactive oxygen species, mitochondria, and NAD(P)H oxidases in the development and progression of heart failure." Congest Heart Fail **8**(3): 132-40.
- Sorlie, P. D., F. J. Nieto, et al. (2000). "A prospective study of cytomegalovirus, herpes simplex virus 1, and coronary heart disease: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study." Arch Intern Med **160**(13): 2027-32.
- Sowers, J. R. (2002). "Hypertension, angiotensin II, and oxidative stress." N Engl J Med **346**(25): 1999-2001.
- Stamm, C., B. Westphal, et al. (2003). "Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration." Lancet **361**(9351): 45-6.
- Stein, I., A. Itin, et al. (1998). "Translation of vascular endothelial growth factor mRNA by internal ribosome entry: implications for translation under hypoxia." Mol Cell Biol **18**(6): 3112-9.
- Stein, I., M. Neeman, et al. (1995). "Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia and hypoglycemia and coregulation with other ischemia-induced genes." Mol Cell Biol **15**(10): 5363-8.
- Steinberg, D., S. Parthasarathy, et al. (1989). "Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity." N Engl J Med **320**(14): 915-24.

- Stempien-Otero, A., A. Karsan, et al. (1999). "Mechanisms of hypoxia-induced endothelial cell death. Role of p53 in apoptosis." J Biol Chem **274**(12): 8039-45.
- Stengel, B., C. Couchoud, et al. (2000). "Age, blood pressure and smoking effects on chronic renal failure in primary glomerular nephropathies." Kidney Int **57**(6): 2519-26.
- Stetler-Stevenson, W. G. (1999). "Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention." J Clin Invest **103**(9): 1237-41.
- Strauer, B. E., M. Brehm, et al. (2002). "Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans." Circulation **106**(15): 1913-8.
- Strehlow, K., N. Werner, et al. (2003). "Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation." Circulation **107**(24): 3059-65.
- Strohschneider, T., M. Oberhoff, et al. (1994). "Effect of chronic nicotine delivery on the proliferation rate of endothelial and smooth muscle cells in experimentally induced vascular wall plaques." Clin Investig **72**(11): 908-12.
- Stubbe, I., J. Eskilsson, et al. (1982). "High-density lipoprotein concentrations increase after stopping smoking." Br Med J (Clin Res Ed) **284**(6328): 1511-3.

- Su, Y., W. Han, et al. (1998). "Effect of cigarette smoke extract on nitric oxide synthase in pulmonary artery endothelial cells." Am J Respir Cell Mol Biol 19(5): 819-25.
- Subramanian, R., M. Ramaswamy, et al. (2003). "Role of lipid and lipoprotein metabolizing enzymes in the development of atherosclerosis." Indian J Exp Biol 41(1): 14-25.
- Sullivan, D. C. and R. Bicknell (2003). "New molecular pathways in angiogenesis." Br J Cancer 89(2): 228-31.
- Sun, H., R. Lesche, et al. (1999). "PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5,-trisphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway." Proc Natl Acad Sci U S A 96(11): 6199-204.
- Suri, C., P. F. Jones, et al. (1996). "Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis." Cell 87(7): 1171-80.
- Suri, C., J. McClain, et al. (1998). "Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1." Science 282(5388): 468-71.
- Suwansaksri, J., V. Wiwanitkit, et al. (2004). "Effect of smoking on platelet count and platelet parameters: an observation." Clin Appl Thromb Hemost 10(3): 287-8.

- Szmitko, P. E., P. W. Fedak, et al. (2003). "Endothelial progenitor cells: new hope for a broken heart." Circulation **107**(24): 3093-100.
- Taga, T., A. Suzuki, et al. (2002). "alpha v-Integrin antagonist EMD 121974 induces apoptosis in brain tumor cells growing on vitronectin and tenascin." Int J Cancer **98**(5): 690-7.
- Takahashi, T. and M. Shibuya (1997). "The 230 kDa mature form of KDR/Flk-1 (VEGF receptor-2) activates the PLC-gamma pathway and partially induces mitotic signals in NIH3T3 fibroblasts." Oncogene **14**(17): 2079-89.
- Takahashi, T., H. Ueno, et al. (1999). "VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells." Oncogene **18**(13): 2221-30.
- Takehara, K., E. C. LeRoy, et al. (1987). "TGF-beta inhibition of endothelial cell proliferation: alteration of EGF binding and EGF-induced growth-regulatory (competence) gene expression." Cell **49**(3): 415-22.
- Takeshita, S., L. Q. Pu, et al. (1994). "Intramuscular administration of vascular endothelial growth factor induces dose-dependent collateral artery augmentation in a rabbit model of chronic limb ischemia." Circulation **90**(5 Pt 2): II228-34.
- Takeshita, S., L. Weir, et al. (1996). "Therapeutic angiogenesis following arterial gene transfer of vascular endothelial growth factor in a rabbit model of hindlimb ischemia." Biochem Biophys Res Commun **227**(2): 628-35.

- Tanimoto, K., Y. Makino, et al. (2000). "Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein." Embo J **19**(16): 4298-309.
- Taniyama, Y., R. Morishita, et al. (2001). "Therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte growth factor gene in rat and rabbit hindlimb ischemia models: preclinical study for treatment of peripheral arterial disease." Gene Ther **8**(3): 181-9.
- Tappia, P. S., K. L. Troughton, et al. (1995). "Cigarette smoking influences cytokine production and antioxidant defences." Clin Sci (Lond) **88**(4): 485-9.
- Taskinen, M. R. (1990). "Mechanisms behind the abnormalities of plasma lipids and lipoproteins in noninsulin-dependent diabetes." J Diabet Complications **4**(2): 49-52.
- Tateishi-Yuyama, E., H. Matsubara, et al. (2002). "Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial." Lancet **360**(9331): 427-35.
- Taylor, B. V., G. Y. Oudit, et al. (1998). "Clinical and pathophysiological effects of active and passive smoking on the cardiovascular system." Can J Cardiol **14**(9): 1129-39.
- Tell, G. S., J. F. Polak, et al. (1994). "Relation of smoking with carotid artery wall thickness and stenosis in older adults. The Cardiovascular Health Study. The

Cardiovascular Health Study (CHS) Collaborative Research Group." Circulation **90**(6): 2905-8.

Tenaglia, A. N., K. G. Peters, et al. (1998). "Neovascularization in atherectomy specimens from patients with unstable angina: implications for pathogenesis of unstable angina." Am Heart J **135**(1): 10-4.

Tentolouris, C., D. Tousoulis, et al. (2004). "Effects of smoking on nitric oxide synthesis in epicardial normal and atheromatous coronary arteries." Int J Cardiol **95**(1): 69-73.

Tepper, O. M., R. D. Galiano, et al. (2002). "Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures." Circulation **106**(22): 2781-6.

Terman, B. I. and M. Dougher-Vermazen (1996). "Biological properties of VEGF/VPF receptors." Cancer Metastasis Rev **15**(2): 159-63.

Thulasimani, M. and S. Ramaswamy (2002). "Combined effects of systolic blood pressure, serum cholesterol and smoking on coronary heart disease and stroke." Eur Heart J **23**(23): 1887-8.

Tiefenbacher, C. P., T. Bleeke, et al. (2000). "Endothelial dysfunction of coronary resistance arteries is improved by tetrahydrobiopterin in atherosclerosis." Circulation **102**(18): 2172-9.

- Tithof, P. K., M. Elgayyar, et al. (2002). "Polycyclic aromatic hydrocarbons present in cigarette smoke cause endothelial cell apoptosis by a phospholipase A2-dependent mechanism." Faseb J **16**(11): 1463-4.
- Tithof, P. K., M. Elgayyar, et al. (2001). "4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, a nicotine derivative, induces apoptosis of endothelial cells." Am J Physiol Heart Circ Physiol **281**(5): H1946-54.
- Tominaga, M., K. Fujii, et al. (1994). "Hypertension and ageing impair acetylcholine-induced vasodilation in rats." J Hypertens **12**(3): 259-68.
- Tonini, T., F. Rossi, et al. (2003). "Molecular basis of angiogenesis and cancer." Oncogene **22**(42): 6549-56.
- Toro, L., J. Marijic, et al. (2002). "Aging, ion channel expression, and vascular function." Vascul Pharmacol **38**(1): 73-80.
- Totti, N., 3rd, K. T. McCusker, et al. (1984). "Nicotine is chemotactic for neutrophils and enhances neutrophil responsiveness to chemotactic peptides." Science **223**(4632): 169-71.
- Tracy, R. P., R. N. Lemaitre, et al. (1997). "Relationship of C-reactive protein to risk of cardiovascular disease in the elderly. Results from the Cardiovascular Health Study and the Rural Health Promotion Project." Arterioscler Thromb Vasc Biol **17**(6): 1121-7.

- Tseng, C. H., C. K. Chong, et al. (1996). "Dose-response relationship between peripheral vascular disease and ingested inorganic arsenic among residents in blackfoot disease endemic villages in Taiwan." Atherosclerosis **120**(1-2): 125-33.
- Tsuchiya, M., A. Asada, et al. (2002). "Smoking a single cigarette rapidly reduces combined concentrations of nitrate and nitrite and concentrations of antioxidants in plasma." Circulation **105**(10): 1155-7.
- Tsurumi, Y., T. Murohara, et al. (1997). "Reciprocal relation between VEGF and NO in the regulation of endothelial integrity." Nat Med **3**(8): 879-86.
- Tunstall-Pedoe, H., K. Kuulasmaa, et al. (1999). "Contribution of trends in survival and coronary-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA project populations. Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease." Lancet **353**(9164): 1547-57.
- Tuut, M. and H. W. Hense (2001). "Smoking, other risk factors and fibrinogen levels. evidence of effect modification." Ann Epidemiol **11**(4): 232-8.
- Urbich, C., E. Dernbach, et al. (2002). "CD40 ligand inhibits endothelial cell migration by increasing production of endothelial reactive oxygen species." Circulation **106**(8): 981-6.
- Urbich, C., D. H. Walter, et al. (2000). "Laminar shear stress upregulates integrin expression: role in endothelial cell adhesion and apoptosis." Circ Res **87**(8): 683-9.



- Ushio-Fukai, M., R. W. Alexander, et al. (1999). "Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/protein kinase B by angiotensin II in vascular smooth muscle cells." J Biol Chem **274**(32): 22699-704.
- Van Belle, E., A. Rivard, et al. (1997). "Hypercholesterolemia attenuates angiogenesis but does not preclude augmentation by angiogenic cytokines." Circulation **96**(8): 2667-74.
- Van Belle, E., B. Witzendichler, et al. (1998). "Potentiated angiogenic effect of scatter factor/hepatocyte growth factor via induction of vascular endothelial growth factor: the case for paracrine amplification of angiogenesis." Circulation **97**(4): 381-90.
- van der Vaart, H., D. S. Postma, et al. (2004). "Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review." Thorax **59**(8): 713-21.
- van der Zee, R., T. Murohara, et al. (1997). "Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor augments nitric oxide release from quiescent rabbit and human vascular endothelium." Circulation **95**(4): 1030-7.
- Vasa, M., S. Fichtlscherer, et al. (2001). "Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease." Circ Res **89**(1): E1-7.
- Vleeming, W., B. Rambali, et al. (2002). "The role of nitric oxide in cigarette smoking and nicotine addiction." Nicotine Tob Res **4**(3): 341-8.

- Volm, M., R. Koomagi, et al. (1999). "Angiogenesis and cigarette smoking in squamous cell lung carcinomas: an immunohistochemical study of 28 cases." Anticancer Res **19**(1A): 333-6.
- Vulin, A. I. and F. M. Stanley (2004). "Oxidative stress activates the plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) promoter through an AP-1 response element and cooperates with insulin for additive effects on PAI-1 transcription." J Biol Chem **279**(24): 25172-8.
- Waldum, H. L., O. G. Nilsen, et al. (1996). "Long-term effects of inhaled nicotine." Life Sci **58**(16): 1339-46.
- Walker, J. F., L. C. Collins, et al. (1999). "The effect of smoking on energy expenditure and plasma catecholamine and nicotine levels during light physical activity." Nicotine Tob Res **1**(4): 365-70.
- Wallenfeldt, K., J. Hulthe, et al. (2001). "Carotid and femoral atherosclerosis, cardiovascular risk factors and C-reactive protein in relation to smokeless tobacco use or smoking in 58-year-old men." J Intern Med **250**(6): 492-501.
- Waltenberger, J., L. Claesson-Welsh, et al. (1994). "Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor." J Biol Chem **269**(43): 26988-95.
- Waltenberger, J., J. Lange, et al. (2000). "Vascular endothelial growth factor-A-induced chemotaxis of monocytes is attenuated in patients with diabetes

- mellitus: A potential predictor for the individual capacity to develop collaterals." Circulation **102**(2): 185-90.
- Wang, D. X., X. R. Jin, et al. (1992). "Effect of cigarette smoking on hypoxic pulmonary vasoconstriction and its relation to animal species and period of smoking." J Tongji Med Univ **12**(2): 75-9.
- Wang, J., D. E. Wilcken, et al. (2001). "Cigarette smoke activates caspase-3 to induce apoptosis of human umbilical venous endothelial cells." Mol Genet Metab **72**(1): 82-8.
- Wang, X., J. Zhu, et al. (2004). "Effects of nicotine on the number and activity of circulating endothelial progenitor cells." J Clin Pharmacol **44**(8): 881-9.
- Wang, X. L. (2000). "Cigarette smoking, DNA variants in endothelial nitric oxide synthase gene and vascular disease." Contrib Nephrol **130**: 53-67.
- Wang, X. L., A. S. Sim, et al. (2000). "Genotype dependent and cigarette specific effects on endothelial nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity." FEBS Lett **471**(1): 45-50.
- Watanabe, T., R. Pakala, et al. (2001). "Angiotensin II and serotonin potentiate endothelin-1-induced vascular smooth muscle cell proliferation." J Hypertens **19**(4): 731-9.
- Watanabe, T., R. Pakala, et al. (2002). "Lysophosphatidylcholine is a major contributor to the synergistic effect of mildly oxidized low-density

lipoprotein with endothelin-1 on vascular smooth muscle cell proliferation." J Cardiovasc Pharmacol **39**(3): 449-59.

Weber, A. A., S. Liesener, et al. (2000). "Habitual smoking causes an abnormality in platelet thromboxane A2 metabolism and results in an altered susceptibility to aspirin effects." Platelets **11**(3): 177-82.

Weber, C., W. Erl, et al. (1996). "Increased adhesiveness of isolated monocytes to endothelium is prevented by vitamin C intake in smokers." Circulation **93**(8): 1488-92.

Weis, M., C. Heeschen, et al. (2002). "Statins have biphasic effects on angiogenesis." Circulation **105**(6): 739-45.

Wennmalm, A., G. Benthin, et al. (1993). "Maintained hyperexcretion of thromboxane A2 metabolite in healthy young cigarette smokers: results from a prospective study in randomly sampled males with stable smoking habits." Clin Physiol **13**(3): 257-64.

Westermarck, B. (1990). "The molecular and cellular biology of platelet-derived growth factor." Acta Endocrinol (Copenh) **123**(2): 131-42.

Westfall, T. C., P. B. Cipolloni, et al. (1966). "Influence of propranolol on hemodynamic changes and plasma catecholamine levels following cigarette smoking and nicotine." Proc Soc Exp Biol Med **123**(1): 174-9.

- Wickenden, J. A., M. C. Clarke, et al. (2003). "Cigarette smoke prevents apoptosis through inhibition of caspase activation and induces necrosis." Am J Respir Cell Mol Biol **29**(5): 562-70.
- Widschwendter, M., M. Hermann, et al. (1999). "Smoking in pregnancy." Lancet **354**(9187): 1390.
- Willerson, J. T. and P. M. Ridker (2004). "Inflammation as a cardiovascular risk factor." Circulation **109**(21 Suppl 1): II2-10.
- Wiseman, S., G. Kenchington, et al. (1989). "Influence of smoking and plasma factors on patency of femoropopliteal vein grafts." Bmj **299**(6700): 643-6.
- Witzenbichler, B., P. C. Maisonpierre, et al. (1998). "Chemotactic properties of angiopoietin-1 and -2, ligands for the endothelial-specific receptor tyrosine kinase Tie2." J Biol Chem **273**(29): 18514-21.
- Wu, L. W., L. D. Mayo, et al. (2000). "Utilization of distinct signaling pathways by receptors for vascular endothelial cell growth factor and other mitogens in the induction of endothelial cell proliferation." J Biol Chem **275**(7): 5096-103.
- Xia, P., L. P. Aiello, et al. (1996). "Characterization of vascular endothelial growth factor's effect on the activation of protein kinase C, its isoforms, and endothelial cell growth." J Clin Invest **98**(9): 2018-26.
- Yamada, Y., J. Nezu, et al. (1997). "Molecular cloning of a novel vascular endothelial growth factor, VEGF-D." Genomics **42**(3): 483-8.

- Yamaguchi, Y., S. Kagota, et al. (2000). "Peroxynitrite-generating species: good candidate oxidants in aqueous extracts of cigarette smoke." Jpn J Pharmacol **82**(1): 78-81.
- Yamaguchi, Y., S. Matsuno, et al. (2004). "Peroxynitrite-mediated oxidative modification of low-density lipoprotein by aqueous extracts of cigarette smoke and the preventive effect of fluvastatin." Atherosclerosis **172**(2): 259-65.
- Yaroslavskiy, B. B., Y. Li, et al. (2004). "Autocrine and paracrine nitric oxide regulate attachment of human osteoclasts." J Cell Biochem **91**(5): 962-72.
- Yeh, C. H., H. C. Peng, et al. (1998). "A new short chain RGD-containing disintegrin, accutin, inhibits the common pathway of human platelet aggregation." Biochim Biophys Acta **1425**(3): 493-504.
- Yokoyama, M. (2004). "Oxidant stress and atherosclerosis." Curr Opin Pharmacol **4**(2): 110-5.
- Zaratin, A. C., E. C. Quintao, et al. (2004). "Smoking prevents the intravascular remodeling of high-density lipoprotein particles: implications for reverse cholesterol transport." Metabolism **53**(7): 858-62.
- Zheng, D. Q., A. S. Woodard, et al. (2000). "Substrate specificity of alpha(v)beta(3) integrin-mediated cell migration and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway activation." J Biol Chem **275**(32): 24565-74.

- Zhong, H., K. Chiles, et al. (2000). "Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics." Cancer Res 60(6): 1541-5.
- Ziche, M., L. Morbidelli, et al. (1997). "Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis." J Clin Invest 99(11): 2625-34.
- Ziche, M., L. Morbidelli, et al. (1994). "Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P." J Clin Invest 94(5): 2036-44.
- Zoppini, G., G. Targher, et al. (1999). "Chronic cigarette smoking is associated with increased plasma circulating intercellular adhesion molecule 1 levels in young type 1 diabetic patients." Diabetes Care 22(11): 1871-4.
- Zundel, W., C. Schindler, et al. (2000). "Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression." Genes Dev 14(4): 391-6.