

2m11. 2931.5

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

**Induction de l'angiogenèse par le VEGF:  
Rôle des récepteurs Flk-1 et Flt-1**

**Par**  
**Geneviève S. Marchand**  
Département de pharmacologie  
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M.Sc.)  
en pharmacologie

26 juin 2001  
© Geneviève S. Marchand, 2001



W  
4

W58

2002

N. 017

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:  
**Induction de l'angiogenèse par le VEGF:  
Rôle des récepteurs Flk-1 et Flt-1**

Présenté par:  
**Geneviève S. Marchand**

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :  
Dr Pierre Haddad .....président rapporteur  
Dr Martin G. Sirois.....directeur de recherche  
Dr Pierre Moreau.....membre du jury

Mémoire accepté le \_\_\_\_\_

## Sommaire

L'angiogenèse consiste en la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. L'angiogenèse est un processus physiologique essentiel pour la réparation tissulaire, le développement embryonnaire et les fonctions reproductrices. Toutefois, une néo-vascularisation non-contrôlée peut être à l'origine de diverses pathologies telles que la progression tumorale, l'arthrite rhumatoïde, les rétinopathies et le psoriasis. Le "vascular endothelial growth factor" (VEGF) est un facteur mitogénique et chimiotactique capable d'induire l'angiogenèse *in vivo*. Le VEGF peut exercer ses effets en se liant à ses deux récepteurs tyrosines kinases, Flk-1 et Flt-1 qui sont présents au niveau des cellules endothéliales.

Des études antérieures effectuées dans notre laboratoire ont démontré que, *in vitro*, la prolifération et la migration des cellules endothéliales ainsi que la synthèse du facteur d'activation plaquettaire (PAF) induites par le VEGF s'effectuaient via l'activation du récepteur Flk-1. La présente étude avait comme objectif de vérifier si l'utilisation d'oligonucléotides antisens (AS) dirigés contre l'ARNm des récepteurs Flk-1 ou Flt-1 pourrait inhiber l'angiogenèse induite par le VEGF *in vivo*.

Des mini-pompes osmotiques contenant du PBS, du VEGF (1, 2.5, 5 µg/200 µl) ou du VEGF (2.5 µg/100 µl) combiné à l'AS-Flk-1 (200 µg/100 µl), l'AS-Flt-1 (200 µg/100 µl) ou l'AS-dégénéré ("scrambled") (200 µg/100 µl) ont été insérées sous la peau des souris en position dorso-latérale. Ces mini-pompes étaient reliées à un cathéter dont l'autre extrémité était insérée dans le testicule des souris et permettait ainsi la libération de la substance à cet endroit. Des photos de différentes régions du testicule ont été prises avant et après traitement (0, 14 et 17 jours) à l'aide d'une caméra digitale. Différents

paramètres ont été déterminés tels que le nombre de nouveaux vaisseaux sanguins, le diamètre et la longueur de ces vaisseaux.

L'infusion de VEGF à des concentrations de 1, 2.5 et 5  $\mu\text{g}$  sur une période de 14 jours a augmenté le nombre de nouveaux vaisseaux sanguins de 236, 246 et 287% respectivement par rapport au groupe témoin (non traité). Ces nouveaux vaisseaux formés sont des capillaires. L'ajout d'AS dirigés contre l'ARNm des récepteurs Flk-1 ou Flt-1 a réduit la formation de nouveaux vaisseaux sanguins de 87 et 85% respectivement. L'ajout d'un AS-dégénéré n'a pas inhibé la formation de nouveaux vaisseaux sanguins induite par le VEGF. De plus, un traitement avec du VEGF (2.5  $\mu\text{g}$ ) pour 14 jours a induit la dilatation de vaisseaux sanguins préexistants ayant un diamètre de 20 à 100  $\mu\text{m}$ . Cet effet a également été inhibé suite à l'ajout d'AS-Flk-1 ou d'AS-Flt-1.

Des études immunohistochimiques pour détecter l'expression des récepteurs Flk-1 et Flt-1 ont confirmé que leurs protéines respectives avaient été inhibées par les AS dirigés contre l'ARNm de ces récepteurs.

En conclusion, les résultats obtenus lors de cette étude démontrent que les AS dirigés contre l'ARNm des récepteurs Flk-1 ou Flt-1 peuvent inhiber l'angiogenèse induite par le VEGF *in vivo*. Ceci suggère que les deux récepteurs, Flk-1 et Flt-1, sont nécessaires pour induire l'angiogenèse médiée par le VEGF *in vivo*. De plus, ces résultats suggèrent que la thérapie génique inhibant l'expression des récepteurs du VEGF pourrait être une approche thérapeutique dans la prévention des pathologies associées à l'angiogenèse.

**Mots clés:** Angiogenèse, VEGF, Flk-1, Flt-1, oligonucléotides antisens

# Table des matières

<b>SOMMAIRE.....</b>	<b>iii</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>ix</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>xi</b>
<b>1 INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 ANGIOGENÈSE.....</b>	<b>2</b>
1.1.1 Étapes impliquées dans le processus de l'angiogenèse.....	3
<b>1.2 NOMENCLATURE DU GÈNE DU VEGF, DE SES ANALOGUES</b>	
<b>    ET DE SES RÉCEPTEURS.....</b>	<b>6</b>
1.2.1 VEGF.....	7
1.2.1.1 Distribution du VEGF.....	9
1.2.1.2 Activités biologiques du VEGF.....	9
1.2.1.3 Régulation de l'expression du VEGF.....	10
1.2.2 VEGF-B.....	11
1.2.3 VEGF-C.....	11
1.2.4 VEGF-D.....	12
1.2.5 VEGF-E.....	13
1.2.6 PlGF.....	13
1.2.7 Autres molécules impliquées dans l'angiogenèse.....	14
<b>1.3 RÉCEPTEURS DU VEGF.....</b>	<b>20</b>
1.3.1 Flk-1.....	20
1.3.1.1 Activités biologiques.....	20
1.3.1.2 Voies de signalisation.....	21
1.3.2 Flt-1.....	22
1.3.2.1 Activités biologiques.....	22
1.3.2.2 Voies de signalisation.....	23
1.3.3 Neuropilin-1.....	23
1.3.4 Flt-4.....	24
1.3.5 Structure des récepteurs.....	25
1.3.6 Régulation des récepteurs.....	25
<b>1.4 ANGIOGENÈSE EN CONDITIONS PATHOLOGIQUES.....</b>	<b>27</b>

<b>1.5 INDUCTION DE L' ANGIOGENÈSE DANS UN BUT THÉRAPEUTIQUE .....</b>	<b>30</b>
<b>1.6 APPROCHES UTILISÉES POUR INHIBER L' ANGIOGENÈSE .....</b>	<b>32</b>
<b>1.7 THÉRAPIE GÉNIQUE.....</b>	<b>39</b>
1.7.1 Transfert de gènes.....	39
1.7.2 Régulation à la baisse de gènes par oligonucléotides antisens.....	40
<b>1.8 MODÈLES UTILISÉS POUR ÉTUDIER L' ANGIOGENÈSE.....</b>	<b>46</b>
<b>1.9 PRÉMISSSES DE LA PRÉSENTE ÉTUDE.....</b>	<b>50</b>
<b>2 PRÉSENTATION DU MANUSCRIT.....</b>	<b>51</b>
<b>3 DISCUSSION.....</b>	<b>63</b>
<b>3.1 LA NÉCESSITÉ DE DÉVELOPPER UN NOUVEAU MODÈLE PERMETTANT L'ÉTUDE DE L' ANGIOGENÈSE <i>IN VIVO</i>.....</b>	<b>63</b>
<b>3.2 LE VEGF INDUIT LA FORMATION DE NOUVEAUX VAISSEAUX SANGUINS <i>IN VIVO</i> DE FAÇON DOSE DÉPENDANTE.....</b>	<b>66</b>
<b>3.3 INHIBITION DE L' ANGIOGENÈSE <i>IN VIVO</i> AVEC DES ANTISENS DIRIGÉS CONTRE LES RÉCEPTEURS FLK-1 ET FLT-1.....</b>	<b>67</b>
<b>3.4 AVANTAGES DE CIBLER LES RÉCEPTEURS DU VEGF.....</b>	<b>67</b>
<b>3.5 AVANTAGES D'UTILISER DES AS CIBLANT LES RÉCEPTEURS FLK-1 ET FLT-1 COMME THÉRAPIE ANTI- ANGIOGÉNIQUE.....</b>	<b>69</b>
<b>3.6 INHIBITION DE L' EFFET DILATATEUR DU VEGF À L' AIDE D' ANTISENS CONTRE LES RÉCEPTEURS FLK-1 ET FLT-1.....</b>	<b>69</b>
<b>3.7 NECESSITÉ D'ÉTUDIER L' ANGIOGENÈSE À 14 ET 17 JOURS.....</b>	<b>70</b>
<b>3.8 ÉTUDES IMMUNOHISTOCHIMIQUES.....</b>	<b>70</b>
<b>4 CONCLUSION.....</b>	<b>72</b>
<b>5 BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>73</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Molécules pro-angiogéniques.....	18
<b>Tableau 2:</b> Molécules anti-angiogéniques.....	19
<b>Tableau 3:</b> Agents anti-angiogéniques en développement clinique.....	38



## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Étapes impliquées dans le processus angiogénique.....	5
<b>Figure 2:</b> Les différents membres de la famille du VEGF et leurs récepteurs.....	7
<b>Figure 3:</b> Cascade d'activation des MMPs.....	35
<b>Figure 4:</b> Mécanisme d'action des oligonucléotides antisens au niveau cellulaire.....	41

## Liste des abréviations

aFGF: “acidic fibroblast growth factor”, facteur de croissance des fibroblastes acide

Ang-1: angiopoïétine-1

Ang-2: angiopoïétine-2

AS: oligonucléotide antisens

bFGF: “basic fibroblast growth factor”, facteur de croissance des fibroblastes basique

ecNOS: “endothelial constitutive nitric oxide synthase”, oxyde nitrique synthase constitutive de l’endothélium

FGF: “fibroblast growth factor”, facteur de croissance des fibroblastes

Flk-1: “fetal liver tyrosine kinase”

Flt-1: “fms-like tyrosine kinase”

HGF: “hepatocyte growth factor”, facteur de croissance des hépatocytes

HIF: “hypoxia-inducible transcription factor”, facteur de transcription inductible par l’hypoxie

IGF: “insulin growth factor-1”

IL: interleukine

iNOS: “inducible nitric oxide synthase”, oxyde nitrique synthase inductible

KDR: “kinase insert domain-containing receptor”

KGF: “keratinocyte growth factor”

MAPK: “mitogen-activated protein kinase”, protéine kinase activée par des mitogènes

MEC: matrice extracellulaire

MMPs: “matrix metalloproteases”, métalloprotéases de la matrice

MMPs: “matrix metalloproteases inhibitors”, inhibiteurs des métalloprotéases de la matrice

nNOS: “neuronal nitric oxide synthase”, oxyde nitrique synthase neuronale

NO: monoxyde d’azote

NOS: “nitric oxide synthase”, oxyde nitrique synthase

NP-1: neuropilin-1

PAF: “platelet activating factor”, facteur d’activation plaquettaire

PAI-1: “plasminogen activator inhibitor-1”, inhibiteur de l’activateur du plasminogène

PDGF: “platelet-derived growth factor”, facteur de croissance dérivé des plaquettes

PlGF: “placenta growth factor”, facteur de croissance du placenta

PLC- $\gamma$ : phospholipase C- $\gamma$

RTK: récepteur tyrosine kinase

uPA: “urokinase plasminogen activator”, activateur du plasminogène urokinase

TGF: “transforming growth factor”, facteur de croissance transformant

TIMP: “tissue inhibitor of metalloproteases”, inhibiteur tissulaire des métalloprotéases

TNF: “tumor necrosis factor”, facteur de nécrose tumorale

tPA: “tissue plasminogen activator”, activateur du plasminogène tissulaire

TSP-1: thrombospondine-1

VEGF: “vascular endothelial growth factor”, facteur de croissance des cellules endothéliales

## Remerciements

Je tiens à remercier sincèrement:

- Mon directeur de recherche, le Dr Martin G. Sirois, de m'avoir accueilli dans son laboratoire au cours de ma maîtrise; pour ses précieux conseils et encouragements tout au long de mon projet et de la rédaction de ce mémoire.
- Le Dr Nicolas Noiseux, qui m'a apporté une aide précieuse au début de mon projet et qui a développé avec le Dr Martin G. Sirois le modèle utilisé au cours de mon projet de maîtrise.
- Mes parents, pour leur soutien moral et psychologique, mais particulièrement pour leur aide financière grandement appréciée.
- Mes amis et collègues de travail, pour les encouragements et le divertissement; particulièrement Annie et Véro que j'adore.
- Le FCAR-FRSQ pour leur soutien financier.

## 1 Introduction

Le domaine de recherche en angiogenèse a débuté il y a plus de 30 ans avec l'hypothèse que la progression tumorale était dépendante de l'angiogenèse [1]. À partir de ce moment, des modèles *in vitro* et *in vivo* pour étudier l'angiogenèse ont commencé à être développés et les premiers facteurs angiogéniques ont été purifiés au début des années 80 [2]. C'est au milieu des années 80 que les premiers inhibiteurs de l'angiogenèse ont commencé à être découverts [3].

La séquence d'événements menant à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, les molécules impliquées dans l'angiogenèse et leurs récepteurs ainsi que la contribution de l'angiogenèse dans diverses conditions ont fait l'objet de plusieurs études dans les 30 dernières années. On sait maintenant que le "vascular endothelial growth factor" (VEGF) est l'un des facteurs de croissance les plus importants au cours de ce processus et que l'angiogenèse est impliquée dans la progression tumorale ainsi que dans diverses autres conditions pathologiques. Folkman a ainsi proposé que l'inhibition de ce processus pourrait être une cible intéressante dans le traitement des pathologies qui y sont associées [1].

La thérapie génique est une technique récente qui peut être utilisée pour empêcher l'expression de protéines en inhibant la traduction de leur ARNm. Dans notre laboratoire, nous utilisons des oligonucléotides antisens (AS) dirigés contre l'ARNm des récepteurs du VEGF, Flk-1 ("fetal liver tyrosine kinase") et Flt-1 ("fms-like tyrosine kinase"). Récemment, nous avons démontré à l'aide de ces AS que, *in vitro*, la migration et la prolifération des cellules endothéliales ainsi que la synthèse du facteur d'activation plaquettaire (PAF) induites par le VEGF sont médiées par l'activation du récepteur Flk-1 et que le récepteur Flt-1 ne contribue pas à ces activités [4].

Ce mémoire résume les travaux effectués au cours de ma maîtrise et qui avaient pour but de déterminer si l'utilisation d'AS ciblant l'ARNm des récepteurs du VEGF, Flk-1 et Flt-1, pourrait inhiber l'angiogenèse induite par le VEGF dans un modèle *in vivo* au niveau du testicule de souris. Par le fait même, cette étude visait à déterminer la contribution de ces récepteurs dans l'induction de l'angiogenèse par le VEGF *in vivo*.

## 1.1 Angiogenèse

Au cours de l'embryogenèse, les vaisseaux sanguins sont formés à partir de cellules angioblastes qui constituent les cellules précurseurs des cellules endothéliales, ce phénomène est appelé vasculogenèse [5]. En effet, dans l'embryon, les vaisseaux sanguins se forment à partir du mésoderme par la différenciation des angioblastes qui s'assemblent pour former des vaisseaux sanguins primitifs [6]. Les facteurs de croissance des fibroblastes (FGFs) sont essentiels dans la vasculogenèse puisqu'ils permettent d'induire le mésoderme à former des angioblastes et des cellules hématopoïétiques [6]. Au cours de ce processus, le VEGF et ses récepteurs Flk-1 et Flt-1 sont également essentiels puisque le récepteur Flk-1 est nécessaire pour la formation des cellules hématopoïétiques et des angioblastes alors que le récepteur Flt-1 permet l'assemblage des cellules angioblastes en vaisseaux sanguins fonctionnels [6].

Par la suite, les nouveaux vaisseaux sanguins se forment par un processus appelé angiogenèse et qui se définit comme étant la formation de nouveaux capillaires sanguins à partir de vaisseaux préexistants [7]. L'angiogenèse est un processus essentiel lors du développement et qui est également essentiel après la naissance pour le maintien de l'intégrité fonctionnelle et structurale de l'organisme [8, 9]. En effet, elle se produit au cours du développement embryonnaire, de la réparation tissulaire lors de blessures,

dans l'inflammation, lors de l'ischémie cardiaque et périphérique ainsi que dans les organes reproducteurs femelles pour les fonctions reproductrices telles que la régénération de l'utérus ainsi que la formation du corps jaune et du placenta [10, 11]. Dans ces conditions, l'angiogenèse est hautement régulée, c'est-à-dire que le processus est activé pour de brèves périodes puis complètement inhibé [11]. C'est la balance entre des molécules pro-angiogéniques et anti-angiogéniques qui régulent la formation de nouveaux vaisseaux sanguins [5].

Un autre processus appelé artériogenèse se produit également après la naissance et consiste en la prolifération rapide d'artères collatérales préexistantes de la circulation coronaire et périphérique [12]. Au cours de ce processus, des artérioles collatérales préexistantes se développent en artères collatérales de diamètre supérieur par la prolifération des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses [12]. Plusieurs molécules telles que le "basic fibroblast growth factor" (bFGF), le "placenta growth factor" (PIGF), le "platelet-derived growth factor" (PDGF), les "matrix metalloprotéases" (MMPs) et le "transforming growth factor- $\beta$ " (TGF- $\beta$ ) participent à ce processus [12]. Ce dernier est stimulé par une augmentation du stress mécanique au niveau des artères préexistantes [12].

### **1.1.1 Étapes impliquées dans le processus de l'angiogenèse**

L'angiogenèse est un processus qui s'effectue en plusieurs étapes. Tout d'abord, des signaux pro-angiogéniques tels que l'hypoxie, l'inflammation ou la présence d'une tumeur favorisent une augmentation de l'expression des facteurs de croissance qui activent les cellules endothéliales (Figure 1, étape 1) [13, 14]. Une fois activées, les cellules endothéliales sécrètent des protéases telles que l'activateur du plasminogène et des MMPs qui causent la dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire (MEC) (Figure 1, étape 2) [15]. En effet, pour initier la formation de

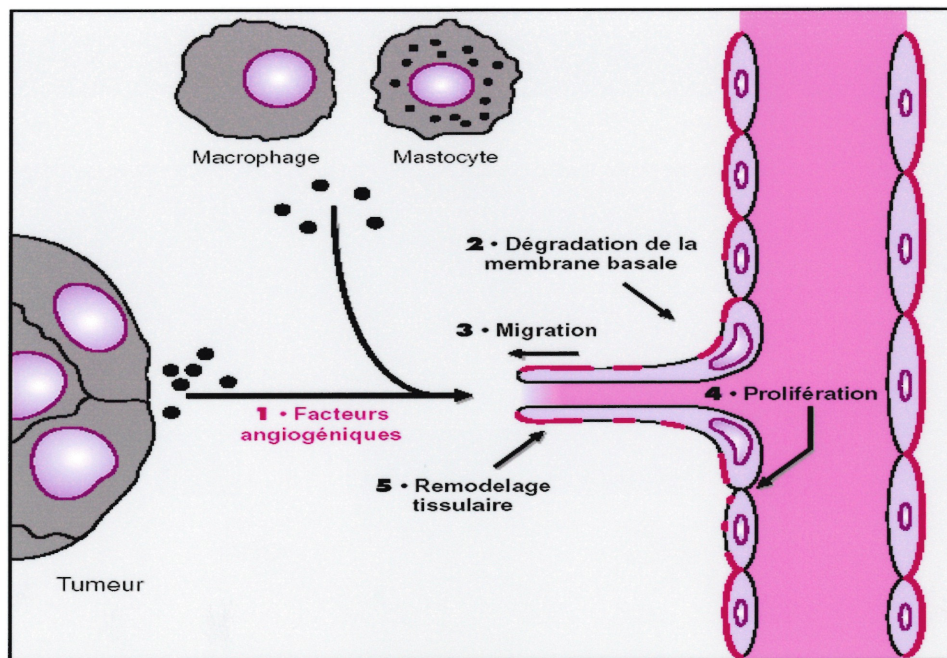
nouveaux capillaires sanguins, les cellules endothéliales des vaisseaux préexistants doivent dégrader la membrane basale et envahir le stroma du tissu adjacent [14]. Ce processus d'invasion et de migration des cellules endothéliales requière l'activité des activateurs du plasminogène et des MMPs [14]. Par exemple, l'uPA ("urokinase plasminogen activator") et la tPA ("tissu plasminogen activator") convertissent le plasminogène en plasmine qui, elle, dégrade plusieurs composantes de la MEC telles que la fibrine, la fibronectine, la laminine et la partie protéique des protéoglycans [14]. La plasmine active également plusieurs MMPs telles que la MMP-1, la MMP-3 et la MMP-9 [14]. L'expression des MMPs et de l'uPA est également augmentée par les facteurs de croissance angiogéniques [14]. Donc, au cours de l'angiogenèse, il y a augmentation de l'expression des MMPs et de protéases. De plus, il y a augmentation de l'expression d'inhibiteurs de protéases tels que le "plasminogen activator inhibitor-1" (PAI-1) [14]. Ceci suggère qu'il s'établit un équilibre entre les activités protéolytiques et anti-protéolytiques qui permettent une dégradation localisée de la MEC lors de la migration tout en évitant une destruction excessive de la matrice [14].

Le processus angiogénique favorise aussi une augmentation de facteurs de croissance comme le VEGF qui cause une augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins [16]. Ceci mène à l'extravasation du plasma et de protéines plasmatiques comme le fibrinogène [16]. Ce dernier forme un gel de fibrine servant de matrice qui favorise la migration des cellules endothéliales et des fibroblastes (Figure 1, étape 3) [16]. De plus, le VEGF active ses récepteurs au niveau des cellules endothéliales ce qui induit la migration et la prolifération des cellules endothéliales (Figure 1, étape 4) [16]. En effet, suite à la dégradation de la MEC, des cellules endothéliales commencent à migrer à travers la matrice dégradée [13]. Ceci est suivi de l'adhésion et de la prolifération des cellules endothéliales [13]. De plus, d'autres molécules telles que le bFGF, le "acidic fibroblast growth factor"



(aFGF), le TGF- $\alpha$ , le “tumor necrosis factor- $\alpha$ ” (TNF- $\alpha$ ), et le PDGF ont une action pro-angiogénique et sont sécrétées au site de formation des nouveaux vaisseaux sanguins [13]. Pour la formation de vaisseaux sanguins plus gros que les capillaires, des cellules musculaires lisses doivent également migrer et adhérer à la nouvelle matrice du vaisseau nouvellement formé [13].

Finalement, des composantes de la membrane basale telles que la tenascine, le collagène de type IV et la laminine sont produites par les cellules endothéliales en prolifération résultant en la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (Figure 1, étape 5). La formation de tubes capillaires implique un contact cellules-cellules et des interactions cellules-MEC. Ceci est médié par les intégrines, les cadhérines (VE-cadherin), les sélectines (E-selectin) et les immunoglobulines (ICAM-1 et VCAM-1).



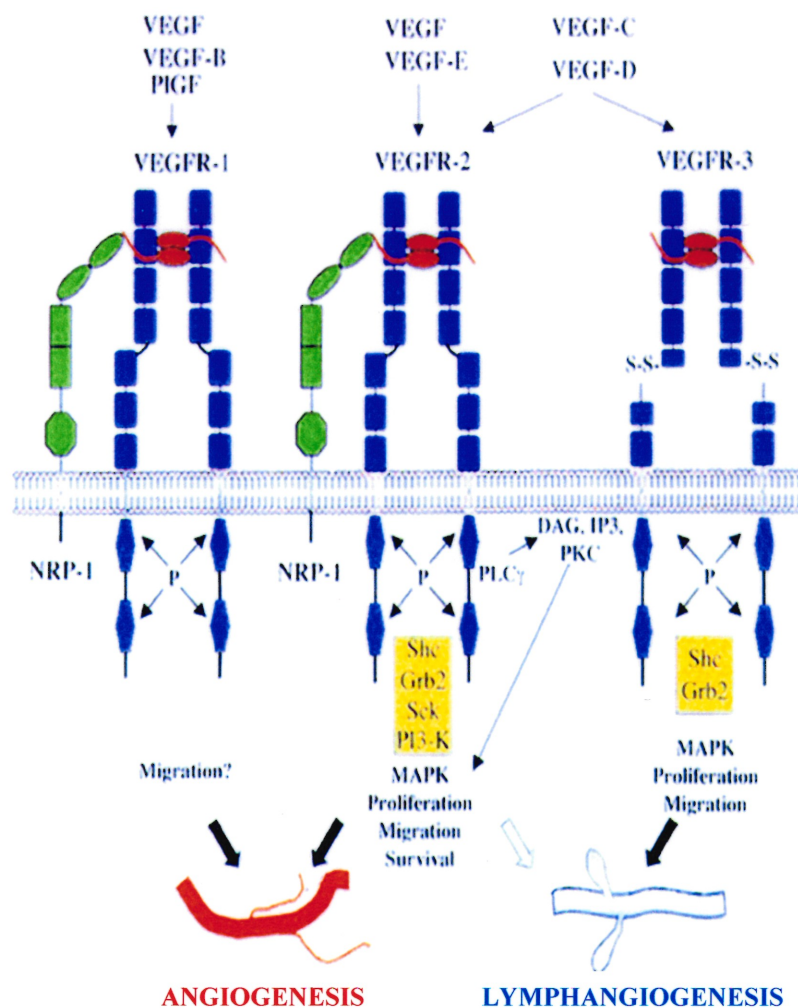
Gingras D. et Béliveau R. *Médecine Sciences* 1997

**Figure 1: Étapes impliquées dans le processus angiogénique**

## **1.2 Nomenclature du gène du VEGF, de ses analogues et de ses récepteurs**

Jusqu'en 1983, aucune molécule angiogénique n'avait encore été purifiée alors qu'aujourd'hui de nombreuses molécules stimulant l'angiogenèse ont été complètement séquencées [11]. Le VEGF a été l'un des premiers inducteurs de l'angiogenèse à être découvert [2]. C'est un régulateur clé de l'angiogenèse dû à sa capacité de stimuler la prolifération et la différenciation des cellules endothéliales [7].

D'autres facteurs de croissance appartenant à la famille du VEGF ont été identifiés, soit le PlGF, le VEGF-B, le VEGF-C, le VEGF-D et le VEGF-E. Ces facteurs de croissance sont codés par différents gènes localisés sur différents chromosomes [17, 18]. Le VEGF ainsi que d'autres membres de sa famille agissent en se liant à des récepteurs tyrosines kinases (RTK), soit Flt-1 (VEGFR-1), Flk-1 (VEGFR-2) et Flt-4 (VEGFR-3) qui sont exprimés presque exclusivement sur les cellules endothéliales [19]. La neuropilin-1 (NP-1) est une protéine transmembranaire qui a récemment été décrite comme étant un co-récepteur du récepteur Flk-1 [19]. Le VEGF se lie aux récepteurs Flk-1, Flt-1 ainsi qu'à la NP-1, le VEGF-B lie le récepteur Flt-1 ainsi que la NP-1, le VEGF-C et le VEGF-D lient les récepteurs Flk-1 et Flt-4, le VEGF-E lie le récepteur Flt-1 et la NP-1 alors que le PlGF lie le récepteur Flt-1 et la NP-1 (voir la figure 2).



Alitalo et Coll. *Exp Cell Res* 1999

**Figure 2: Les différents membres de la famille du VEGF et leurs récepteurs**

### 1.2.1 VEGF

Le VEGF (aussi appelé VEGF-A), un mitogène spécifique pour les cellules endothéliales, est normalement produit lors de l'embryogenèse et après la naissance. Il est produit par divers types de cellules telles que les fibroblastes [20], les cellules musculaires lisses vasculaires [21, 22], les

cellules endothéliales [23], les cellules épithéliales [20, 24], les cellules polymorphonucléaires [25] et les macrophages [26]. Le VEGF est un médiateur important de l'angiogenèse dans une variété de processus normaux et pathologiques. Ce facteur de croissance possède deux activités biologiques importantes, soit un effet mitogénique sur les cellules endothéliales induisant ainsi l'angiogenèse et un effet inflammatoire amenant une augmentation de la perméabilité vasculaire [27].

Le VEGF est sécrété sous la forme d'une glycoprotéine homodimérique de 45 kD. Il existe six isoformes différents de 206, 189, 183, 165, 145 et 121 acides aminés qui sont produits par épissage alternatif d'un gène localisé sur le chromosome 6p21.3 [19, 28]. Le VEGF<sub>165</sub> est la forme la plus abondante qui est produite par une variété de cellules normales et tumorales [29, 30]. Les VEGF<sub>121</sub> et VEGF<sub>189</sub> sont retrouvés dans diverses cellules et tissus qui expriment le gène du VEGF [31]. Les VEGF<sub>206</sub> et VEGF<sub>145</sub> sont des formes plus rares. Le VEGF<sub>145</sub> est exprimé au niveau des cellules dérivées du système reproducteur femelle [32] ainsi que dans d'autres organes comme la peau et les reins [33-35].

Les différents isoformes du VEGF se distinguent par la présence ou non de domaines de liaison à l'héparine codés par les exons 6 et 7 [36]. Les isoformes de 189 et 206 acides aminés ont une forte affinité pour les héparanes sulfates. Ils sont associés à la surface cellulaire ou à la MEC et leurs effets sont donc plus localisés que les plus petites formes solubles [37]. Le VEGF<sub>165</sub> a une plus faible affinité pour les héparanes sulfates et est par conséquent partiellement associé à la surface cellulaire ou à la MEC et partiellement relâché dans le milieu extracellulaire [37]. Quant au VEGF<sub>121</sub>, il ne lie pas l'héparine et est donc sécrété dans le milieu extracellulaire [31].

### **1.2.1.1 Distribution du VEGF**

La distribution du VEGF au niveau de l'organisme est très large puisqu'il est retrouvé dans le myocyte cardiaque, le cerveau, la glande pituitaire, le foie, le rein, les ovaires et les cellules musculaires lisses [38]. Également, le VEGF est fortement exprimé au niveau du placenta [39-41], dans de nombreux tissus foetaux [42, 43] ainsi que dans plusieurs tissus adultes où il y a formation de nouveaux vaisseaux sanguins dans un contexte physiologique comme au niveau de l'utérus et dans le corps jaune [44, 45].

### **1.2.1.2 Activités biologiques du VEGF**

Le VEGF est un facteur de croissance essentiel pour la vasculogenèse et l'angiogenèse [46]. Des défauts dans la différenciation et la prolifération cellulaire ainsi que dans la formation des vaisseaux sanguins sont observés chez des souris déficientes en VEGF [47]. En fait, les embryons de ces souris ne survivent pas au-delà du 9e jour de gestation, démontrant ainsi que le VEGF est essentiel au développement du système vasculaire [46, 48]. Ce facteur de croissance est également essentiel à la survie des cellules endothéliales en culture et induit ainsi l'expression de protéines anti-apoptotiques telles que le Bcl-2 et A1 dans des cellules endothéliales humaines [49, 50].

Le VEGF est l'une des cytokines les plus angiogéniques; de plus, il est impliqué dans toutes les étapes du processus angiogénique, soit la dégradation de la MEC par des protéases, la migration et la prolifération des cellules endothéliales et l'organisation des cellules endothéliales en structures tubulaires qui formeront des vaisseaux sanguins [51]. De plus, le VEGF augmente la perméabilité des veines et des capillaires favorisant ainsi l'exsudation de protéines comme le fibrinogène qui permet la

formation d'un gel de fibrine nécessaire à la migration et à l'organisation des cellules endothéliales [52].

Également, il a été démontré que le VEGF, via l'activation du récepteur Flk-1, cause une augmentation de l'ARNm de l'"endothelial constitutive nitric oxide synthase" (ecNOS) et stimule la production de monoxyde d'azote (NO) qui participe à l'induction de l'angiogenèse et à la régulation de la fonction endothéliale [53, 54].

### 1.2.1.3 Régulation de l'expression du VEGF

L'expression du VEGF est induite par divers stimuli micro-environnementaux, systémiques et oncogéniques comme l'hypoxie et les facteurs de croissance [55]. L'hypoxie cause une régulation à la hausse du VEGF *in vivo* et *in vitro* [56]. En effet, une augmentation du taux de transcription [57] ainsi que de l'expression et de la stabilité de l'ARNm du VEGF est observée *in vitro* [58] et *in vivo* [59] en réponse à l'hypoxie. L'induction de l'expression du VEGF par l'hypoxie est causée par une augmentation du taux de transcription du gène médié par le "hypoxia-inducible transcription factor-1" (HIF-1) [60, 61].

L'expression du VEGF est également médiée par diverses molécules telles que différentes cytokines, hormones et facteurs de croissance qui augmentent l'expression de l'ARNm du VEGF [30]. En effet, divers facteurs extracellulaires tels que le FGF-4, le PDGF, le TNF- $\alpha$ , le TNF- $\beta$ , le TGF- $\alpha$ , le TGF- $\beta$ , le "keratinocyte growth factor" (KGF), l'"insulin growth factor-1" (IGF), la PGE2, l'interleukin (IL)-1, l'IL-6 et le NO causent une régulation à la hausse du VEGF [62]. Toutefois, l'IL-10 et l'IL-13 inhibent l'expression du VEGF [63].

De plus, les niveaux de protéines et d'ARNm du VEGF sont surexprimés dans plusieurs tumeurs animales et humaines [2, 64-69] ainsi que dans des lignées de cellules tumorales [70]. En effet, une augmentation du VEGF est observée suite à des mutations oncogéniques ou une augmentation de l'activité *Ras* [71-73]. Finalement, l'expression du VEGF est augmentée dans divers types cellulaires lors de l'ischémie du myocarde, dans l'athérosclérose [74], la rétinopathie ischémique ou diabétique [75], l'arthrite rhumatoïde, le psoriasis et la réparation tissulaire [76].

### 1.2.2 VEGF-B

Le VEGF-B comporte deux isoformes de 167 et 186 acides aminés qui lient les récepteurs Flt-1 et la NP-1 [29, 77-80]. Il est exprimé particulièrement dans le cœur et le muscle squelettique, mais on le retrouve également dans les os, le pancréas, la glande surrénale et les cellules musculaires lisses des gros vaisseaux sanguins [81]. Le VEGF-B<sub>167</sub> lie l'héparine et demeure attaché à la cellule musculaire lisse ou à la MEC et n'est donc pas relâché dans le milieu extracellulaire [82]. Le VEGF-B<sub>186</sub> est quant à lui sécrété dans le milieu extracellulaire [81]. Le VEGF-B possède une activité mitogénique sur les cellules endothéliales [81].

### 1.2.3 VEGF-C

Le VEGF-C est produit sous forme d'une longue protéine précurseur qui subit un clivage protéolytique générant ainsi différentes formes qui ont des propriétés de liaison différentes [83]. Le VEGF-C est fortement exprimé dans les poumons, le placenta, les ovaires, le muscle, l'intestin grêle, les reins et le cœur chez l'adulte [14].

Alors que le VEGF stimule uniquement la prolifération des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins [84], le VEGF-C induit non

seulement la prolifération des cellules endothéliales via l'activation du récepteur Flk-1, mais aussi la prolifération des cellules endothéliales de l'endothélium lymphatique via l'activation du récepteur Flt-4 [85, 86]. Le VEGF-C est initialement responsable du développement du système veineux [14]. Il cause également la migration des cellules endothéliales de manière comparable au VEGF et pourrait également avoir un rôle dans la régulation de l'angiogenèse [87]. De plus, le VEGF-C stimule la relâche de NO des cellules endothéliales ce qui contribue également au processus angiogénique [87-90]. Également, le VEGF-C augmente la perméabilité vasculaire. En effet, lorsque le VEGF-C est administré *in vivo* sous forme de protéine recombinante ou de plasmide d'ADN, il y a augmentation de la perméabilité vasculaire et formation de nouveaux vaisseaux sanguins dans un modèle d'ischémie des membres inférieurs chez le lapin [87].

#### 1.2.4 VEGF-D

Le VEGF-D, tout comme le VEGF-C, est produit sous forme d'une longue protéine précurseur qui subit un clivage protéolytique générant ainsi différentes formes qui ont des propriétés de liaison différentes [83]. Le VEGF-D est surtout exprimé au niveau des poumons [91], mais on le retrouve également dans le coeur, l'intestin grêle, le rein, le foie et la peau [92]. Il diffère des autres VEGF car c'est le seul facteur angiogénique régulé par l'oncogène *c-fos* [93]. Le VEGF-D possède une activité angiogénique et mitogénique au niveau des cellules endothéliales (Flk-1) [94, 95]. Il stimule également la croissance des vaisseaux sanguins et lymphatiques (Flt-4) et stimule la migration et la prolifération des cellules endothéliales tant *in vitro* qu'*in vivo* [96].



### 1.2.5 VEGF-E

Le VEGF-E est un terme utilisé pour regrouper des protéines ayant une homologie significative avec le VEGF et qui sont codées par certaines souches du virus *orf*, un pathogène pouvant affecter les moutons, les chèvres et parfois les humains [97, 98]. Ces protéines virales semblent être aussi efficaces que le VEGF<sub>165</sub> pour stimuler la prolifération des cellules endothéliales via l'activation du récepteur Flk-1 [98-100].

### 1.2.6 PlGF

Le PlGF est exprimé dans les cellules endothéliales humaines en culture, dans les tumeurs trophoblastiques et dans le placenta [17, 101, 102]. Il existe trois isoformes du PlGF, soit le PlGF-1 (131 acides aminés), le PlGF-2 (152 acides aminés) et le PlGF-3 (183 acides aminés) [17, 102]. Le PlGF lie uniquement le récepteur Flt-1 [103].

Le PlGF a peu ou pas d'activité mitogénique et n'augmente pas la perméabilité vasculaire [103]. Il a toutefois été démontré qu'il pouvait former un hétérodimère avec le VEGF et avoir un faible effet mitogénique sur les cellules endothéliales [81]. Également, Park et coll. ont suggéré que le PlGF potentialiserait l'action du VEGF à faibles concentrations pour stimuler la prolifération des cellules endothéliales [103].

### 1.2.7 Autres molécules impliquées dans l'angiogenèse

Le processus angiogénique est contrôlé par un ensemble d'inducteurs et d'inhibiteurs de l'angiogenèse qui sont produits par les cellules normales ou tumorales [7].

Molécules pro-angiogéniques:

Plusieurs autres facteurs de croissance incluant les FGFs, le PDGF, le "hepatocyte growth factor" (HGF), l'angiopoïétine-1 (ang-1) et -2 (ang-2) ainsi que différentes molécules de surface endothéliale telles que le CD31 (PECAM), CD144 (VE-cadherin) et les intégrines  $\alpha_v\beta_3$  sont impliquées dans différentes étapes du processus angiogénique [104]. *In vitro*, ces facteurs de croissance et cytokines ont des effets différents sur la migration et la prolifération des cellules endothéliales, deux éléments essentiels à la formation de nouveaux capillaires sanguins [105].

FGFs. Les FGFs stimulent la prolifération des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses, des fibroblastes et de certaines cellules épithéliales [11]. Les FGFs stimulent également la production de diverses protéases telles que l'activateur du plasminogène et la collagénase qui ont comme propriété de dégrader la MEC [13, 106, 107]. Deux molécules principales font parties de cette famille: le aFGF ou FGF-1 et le bFGF ou FGF-2 [108]. Les récepteurs des FGFs sont des RTK présents au niveau des cellules endothéliales et sur les cellules musculaires lisses [109].

HGF. Le HGF est un facteur de croissance ayant une structure hétérodimérique [110, 111]. Il est synthétisé par les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses [112]. Il est l'un des principaux médiateurs des interactions entre les cellules mésenchymateuses et les cellules épithéliales ou endothéliales au cours de l'embryogenèse, la cicatrisation et l'angiogenèse [113].

PDGF. Le PDGF est relâché principalement par les plaquettes, mais également par les macrophages, les cellules endothéliales ainsi que par les cellules musculaires lisses [114]. Il agit comme agent chimiotactique pour les neutrophiles et les macrophages [114]. *In vitro*, le PDGF agit comme un facteur mitogénique et chimiotactique au niveau des cellules musculaires lisses [114]. *In vivo*, il cause la migration de celles-ci vers l'intima [114]. Il participe à l'angiogenèse en causant la production de cytokines et en participant à l'organisation des cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire [22, 115].

Angiopoïétines. Les angiopoïétines sont des facteurs de croissance impliqués dans l'assemblage et la maturation des vaisseaux sanguins [116]. L'ang-1 lie le récepteur Tie-2 et régule la maturation des vaisseaux sanguins. L'ang-2 lie le récepteur Tie-1, mais ne traduit pas de signal [117]. L'ang-2 agit davantage comme un antagoniste de l'ang-1 [116]. Les angiopoïétines stimulent également la production de facteurs impliqués dans le recrutement des cellules environnantes telles que les péricytes et les cellules musculaires lisses [7]. Les angiopoïétines sont donc impliquées dans les stades avancés du développement vasculaire donc dans le remodelage vasculaire et la maturation [118-120].

TGF- $\beta$ . Le TGF- $\beta$  est un homodimère sécrété par les tumeurs ainsi que par les cellules normales telles que dans le foie, le placenta et au niveau des plaquettes sanguines [105]. Lorsqu'il est injecté chez la souris, le TGF- $\beta$  stimule une augmentation des macrophages, des fibroblastes, de la production de collagène et la formation de nouveaux capillaires sanguins [121].

Monoxyde d'azote (NO). Le NO est un médiateur important de la fonction endothéliale et un régulateur du tonus vasculaire [122]. Il est produit par la conversion de la L-arginine en citrulline par l'enzyme NO-synthase (NOS) dont il existe trois isoformes, soit la eNOS ("endothelial NOS"), la iNOS ("inducible NOS") et la nNOS ("neuronal NOS") [123]. Il a été démontré que le NO agissait comme intermédiaire dans le processus angiogénique induit par le VEGF [124]. En effet, des études démontrent que le VEGF cause la relâche de NO à partir de cellules endothéliales vasculaires de lapin, de cochon, de porc et d'humain et que l'activation du récepteur du VEGF Flk-1 *in vitro* cause une augmentation de l'expression de eNOS et de iNOS [125]. De plus, *in vitro*, le NO cause la prolifération des cellules endothéliales et *in vivo*, il induit l'angiogenèse ce qui a été démontré dans un modèle d'implant cornéen [90]. Également, l'inhibition de la production de NO à l'aide d'inhibiteurs de eNOS atténue de façon significative les effets angiogéniques et mitogéniques induits par le VEGF [125]. Le NO produit par la eNOS est également un médiateur important des changements hémodynamiques des vaisseaux sanguins et de la perméabilité vasculaire induits par le VEGF.

#### Molécules anti-angiogéniques:

Thrombospondine-1 (TSP-1). La TSP-1 est une protéine d'adhérence cellulaire principalement sécrétée par les plaquettes et qui inhibe l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo* [7]. En effet, il a été démontré que la TSP-1 inhibe directement la prolifération de cellules de mélanome [126]. La TSP-1 est produite de façon constitutive par les cellules normales et diminue en présence de tumeurs [127]. Son expression dans les cellules est stimulée par le gène suppresseur de tumeur *p53* [7]. Une mutation de *p53* cause une inhibition de la production de TSP-1 menant à l'activation du phénotype angiogénique [128]. Donc, une surexpression de TSP-1 cause une diminution de l'angiogenèse et une inhibition de la croissance tumorale [129-132].

Angiostatine. L'angiostatine est un fragment protéolytique du plasminogène [133]. Il s'agit d'un inhibiteur spécifique de la prolifération des cellules endothéliales et un inhibiteur de l'angiogenèse ainsi que de la croissance tumorale [134]. En effet, des études *in vivo* chez des souris ont démontré que l'angiostatine pouvait inhiber la croissance de diverses tumeurs humaines ainsi que la formation de métastases [135]. L'angiostatine s'accumule dans la circulation en présence d'une tumeur en croissance puis disparaît lorsque l'on retire la tumeur [136].

Endostatine. L'endostatine est un fragment de 20 kDa de la région c-terminale du collagène de type XVIII [137]. Cette protéine peut maintenir la latence tumorale et peut également provoquer la régression tumorale *in vitro* et *in vivo* [7]. L'endostatine est également un inhibiteur de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales et augmente le taux d'apoptose de l'ordre de 7 fois dans les tumeurs sans toutefois affecter le taux de prolifération des cellules tumorales [138, 139]. De plus, cette molécule anti-angiogénique inhibe la collagénase ce qui prévient le remodelage de la MEC. Il a récemment été démontré que l'administration systémique d'endostatine pouvait ralentir la croissance tumorale chez des souris [138]. L'activité anti-tumorale de l'endostatine est maintenant évaluée dans des études cliniques de phase I dans une variété de tumeurs humaines [140].

**Tableau 1: Molécules pro-angiogéniques [326].**

<b>Molécules pro-angiogéniques</b>	<b>Fonctions</b>
VEGF	Stimule la prolifération et la migration des cellules endothéliales, augmente la perméabilité vasculaire et l'adhésion des leucocytes.
Ang-1	Stabilise les vaisseaux, inhibe la perméabilité.
PDGF-BB	Recrute les cellules musculaires lisses.
TGF- $\beta$ 1, endogline	Stimule la production de la MEC.
FGFs (aFGF et bFGF), HGF, "monocyte chemoattractant protein-1"	Stimule la prolifération et la migration des cellules endothéliales.
TNF	Augmente l'expression de l'ARNm du VEGF.
Angiogénine	Possède une activité Rnase qui est essentielle à l'angiogenèse.
PIGF	Potentialise l'effet du VEGF.
IL-8	Stimule la prolifération et la migration des cellules endothéliales.
Fibrinogène, facteur von Willebrand, vitronectine et collagène qui lient les intégrines $\alpha_v\beta_3$ , $\alpha_v\beta_5$ , $\alpha_5\beta_1$	Médie les interactions des cellules endothéliales avec la MEC locale.
VE-cadherin, PECAM (CD31)	Responsable de l'adhésion, de la formation des jonctions de communication et de la transmigration.
Ephrines	Régule la spécification artérielle et veineuse.
Activateurs de plasminogène, MMPs	Remodelage de la MEC, relâche et activation des facteurs de croissance.
NOS, cyclo-oxygénase-2	Induit une vasodilatation et la prolifération des cellules endothéliales.
Chemokines	Rôle pleiotropique dans l'angiogenèse.
"inhibitors of differentiation 1/3"	Détermine la plasticité endothéliale.

**Tableau 2: Molécules anti-angiogéniques [326].**

<b>Molécules anti-angiogéniques</b>	<b>Fonctions</b>
VEGFR-1 soluble, NP-1 soluble	Rend le VEGF, VEGF-B et PlGF non disponible.
Ang-2	Antagoniste de l'Ang-1.
TSP-1, -2	Inhibe la migration et la prolifération des cellules endothéliales.
Angiostatine	Inhibe la prolifération des cellules endothéliales et l'angiogenèse tumorale.
Endostatine	Inhibe la survie et la migration des cellules endothéliales.
Vasostatine, calréticuline	Inhibe la prolifération endothéliale.
"Platelet factor-4"	Inhibe la liaison du VEGF et du bFGF à leur récepteur.
TIMPs "tissue inhibitors of matrix metalloproteases", inhibiteurs de MMPs, "proteolytic fragment of MMP2"	Inhibe l'angiogenèse en conditions pathologiques.
IFN- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ , "inducible protein-10", IL-4, IL-12, IL-18	Inhibe la migration endothéliale, cause une régulation à la baisse du bFGF.
Prolactine	Inhibe la relâche de bFGF et de VEGF.
Fragment de "secreted protein acidic and rich in cteine/osteonectin/BM-40"	Inhibe la liaison et l'activité du VEGF.
Fragment d'ostéopontine	Interfère avec la signalisation des intégrines.
Maspine	Inhibiteur de protéases.
Canstatine, restine, protéine reliée à la proliférine	Mécanisme inconnu.

## 1.3 Récepteurs du VEGF

Le VEGF exerce ses effets en agissant sur ses récepteurs KDR (“kinase insert domain-containing receptor”) ou son homologue murin Flk-1 (VEGFR-2) et Flt-1 (VEGFR-1) qui sont présents au niveau des cellules endothéliales [6, 75, 141]. Les récepteurs du VEGF sont également présents au niveau de certaines cellules non-endothéliales suggérant ainsi une action du VEGF à ce niveau [142]. Par exemple, le récepteur Flt-1 est présent au niveau des monocytes et son activation cause leur migration.

### 1.3.1 Flk-1

Le gène humain codant pour le récepteur Flk-1 est situé dans la région du chromosome 13q12-q13 [143-148]. Le récepteur Flk-1 a un poids moléculaire d'environ 200 kDa [143, 149] et une valeur de Kd d'environ 75-125 pmol/L pour la liaison avec le VEGF [143]. Il est fortement exprimé par les cellules endothéliales et est donc facile à détecter [150, 151].

#### 1.3.1.1 Activités biologiques

Les réponses biologiques engendrées par la liaison du VEGF aux récepteurs Flk-1 ou Flt-1 sont différentes [152]. La majorité des réponses au niveau des cellules endothéliales sont médiées via l'activation du récepteur Flk-1 par le VEGF [152]. Cette activation engendre la prolifération, la migration, la différenciation, la formation de tubes, l'augmentation de la perméabilité vasculaire et le maintien de l'intégrité vasculaire [152]. Le récepteur Flk-1 est donc responsable de l'effet mitogénique au niveau des cellules endothéliales et est nécessaire pour le développement de cellules endothéliales matures [153, 154]. Le récepteur Flk-1 induit également l'expression de eNOS et iNOS qui produisent le



NO [53, 151]. Celui-ci joue un rôle dans la prolifération, la migration, la formation de tubes, l'augmentation de la perméabilité, l'hypotension et l'angiogenèse *in vivo* engendrées par le VEGF [54, 124, 125, 155]. Le récepteur Flk-1 est également nécessaire à l'angiogenèse tumorale et est donc impliqué dans la croissance tumorale, l'invasion tumorale et la formation de métastases [156]. De plus, l'activation du récepteur Flk-1 par le VEGF cause la synthèse de PAF qui est également responsable de l'augmentation de perméabilité engendrée par le VEGF [4, 157]. Le PAF est un phospholipide impliqué dans l'inflammation, la dégranulation et l'aggrégation des plaquettes ainsi que dans l'adhérence, la migration et/ou l'activation de différentes cellules telles que les neutrophiles, les éosinophiles, les macrophages, les lymphocytes et les cellules endothéliales [158, 159].

### 1.3.1.2 Voies de signalisation

La liaison du VEGF à son récepteur Flk-1 induit un changement de conformation du récepteur suivi de la dimérisation et de l'auto-phosphorylation de résidus tyrosines sur le récepteur [151, 160]. Au niveau du récepteur Flk-1, ce sont les résidus Tyr-951, Tyr-996, Tyr-1054 et Tyr-1059 qui sont phosphorylés [161]. L'activation du récepteur Flk-1 par le VEGF cause la phosphorylation de la phospholipase C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ), de p120-GAP et de Nck dans des cellules endothéliales [162, 163]. De plus, la phosphorylation de la PLC- $\gamma$  cause la relâche d'IP<sub>3</sub> ce qui permet la libération de calcium intracellulaire résultant en une augmentation de la perméabilité cellulaire [163, 164]. La stimulation de Flk-1 par le VEGF engendre également l'association et la phosphorylation des isoformes de 46, 52 et 66 kDa de Shc ainsi que l'association du récepteur avec Grb2 [162, 165]. Le Grb2 est une molécule adaptatrice qui recrute Sos à la membrane et active Ras et la cascade MAPK ("mitogen activated protein kinase") résultant en la prolifération des cellules endothéliales [162, 165].

Également, l'activation de Flk-1 par le VEGF cause l'activation de la p38 MAPK et de la FAK ("focal adhesion kinase") qui mènent à la migration des cellules endothéliales [166]. Finalement, il a été démontré que le VEGF activait la voie de signalisation PI3K (phosphatidyl-inositol-3-kinase)-Akt dans des cellules endothéliales d'aortes bovines et de veines ombilicales humaines causant la survie de ces cellules [49].

### **1.3.2 Flt-1**

Le gène humain codant pour le récepteur Flt-1 est situé dans la région du chromosome 4q11-q13 [143-148]. Le récepteur Flt-1 a un poids moléculaire d'environ 180 kDa [167] et a une plus grande affinité pour le VEGF que le récepteur Flk-1 avec une valeur de Kd d'environ 10-20 pmol/L [143]. Toutefois, le récepteur Flt-1 est peu exprimé par les cellules endothéliales et est donc difficile à détecter contrairement au récepteur Flk-1 [150, 151]. Le récepteur Flt-1 lie le VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub>, le VEGF-B et le PlGF [143, 149, 167].

#### **1.3.2.1 Activités biologiques**

L'activation du récepteur Flt-1 par le VEGF ou le PlGF cause la production de facteurs tissulaires et la migration des monocytes par une voie de signalisation GTP-dépendante [158, 159]. Flt-1 est également impliqué dans l'assemblage des nouveaux vaisseaux sanguins et est un médiateur important de l'angiogenèse car un gène défectueux de ce récepteur cause une désorganisation des vaisseaux sanguins et la mort embryonnaire au jour 8.5-9.0 [168]. Des souris déficientes pour le gène du récepteur Flt-1 développent des cellules endothéliales, mais elles ne sont pas organisées [165].

Des études récentes ont également suggéré que le récepteur Flt-1 régule négativement les activités induites par le VEGF [152]. Cette régulation négative du Flt-1 sur les activités biologiques du VEGF serait due au fait que le Flt-1 a une haute affinité pour le VEGF le rendant ainsi moins disponible pour le récepteur Flk-1 [152].

### **1.3.2.2 Voies de signalisation**

La liaison du VEGF à son récepteur Flt-1 induit un changement de conformation du récepteur suivi de la dimérisation et l'auto-phosphorylation de résidus tyrosines sur le récepteur [151, 160]. Au niveau du récepteur Flt-1, ce sont surtout les résidus Tyr-1213, Tyr-1242, Tyr-1327 et Tyr-1333 qui sont phosphorylés [163]. L'activation du récepteur Flt-1 par le VEGF mène également à la phosphorylation de GAP, de PLC- $\gamma$ , de Shc, de Fyn et de Yes [151]. Le Flt-1 n'induit pas l'activation de la p42/44 MAPK et n'est donc pas impliqué dans l'effet mitogénique engendré par le VEGF [63].

### **1.3.3 Neuropilin-1**

Récemment, un autre récepteur pour le VEGF de 130-135 kDa a été identifié, il s'agit de la NP-1 présente sur les cellules endothéliales et tumorales et qui lie le VEGF<sub>165</sub> [37, 169]. La NP-1 lie également le PlGF-2 et le VEGF-B [79, 80]. La NP-1 est une glycoprotéine de surface cellulaire impliquée dans la croissance et le guidage axonal lors du développement du système nerveux [170]. Également, la NP-1 est grandement exprimée dans les tissus adultes humains [29]. En effet, la NP-1 est exprimée dans le cœur, le placenta, les poumons, le foie, le muscle squelettique, les reins et le pancréas [29].

La liaison du VEGF<sub>165</sub> à la NP-1 n'induit pas de signalisation intracellulaire, pas d'autophosphorylation et donc pas de migration ou de prolifération cellulaire [29]. La NP-1 agit comme co-récepteur et augmente ainsi la liaison du VEGF<sub>165</sub> au récepteur Flk-1 ainsi que les effets mitogéniques et chimiotactiques engendrés par l'activation du récepteur Flk-1 au niveau des cellules endothéliales [29].

La NP-1 est impliquée dans la vasculogénèse et dans l'angiogénèse et joue un rôle dans la maturation des vaisseaux sanguins [171]. Des souris dont le gène pour la NP-1 a été muté, meurent au jour embryonnaire 10.5-12.5 à cause d'anomalies dans le système cardiovasculaire [172].

#### **1.3.4 Flt-4**

Un autre récepteur, le Flt-4 (VEGFR-3), lie des membres de la famille du VEGF. Le gène humain codant pour le récepteur Flt-4 est situé dans la région du chromosome 5q33-q35 [143-148]. Le récepteur Flt-4 a un poids moléculaire d'environ 180 kDa et lie le VEGF-C, le VEGF-D, mais pas le VEGF [173]. Le récepteur Flt-4 est présent de façon constitutive au niveau de l'endothélium des vaisseaux lymphatiques et est impliqué dans la lymphangiogénèse [174]. Un gène Flt-4 muté n'empêche pas la vasculogénèse ou l'angiogénèse, mais cause des défauts dans le développement vasculaire normal causant une accumulation de fluide provenant de vaisseaux hyper-perméables [175].

### 1.3.5 Structure des récepteurs

Les récepteurs du VEGF sont des récepteurs à activité tyrosine kinase. Les RTK sont une grande famille de protéines qui jouent un rôle dans la régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire [176]. Les protéines kinases consistent en une famille d'enzymes qui transfèrent le phosphate terminal de l'ATP à un substrat [156].

Les récepteurs du VEGF sont composés de 7 domaines "IgG-like" dans la partie extracellulaire, d'un domaine transmembranaire, d'un domaine juxtamembranaire et d'un domaine kinase intracellulaire [177]. Le VEGF se lie sur le 2e domaine "IgG-like" des récepteurs Flk-1 et Flt-1 [178, 179].

### 1.3.6 Régulation des récepteurs

L'expression de l'ARNm des récepteurs Flk-1 et Flt-1 est présente dans les cellules endothéliales fœtales. En effet, tous les récepteurs du VEGF sont exprimés au tout début du développement, surtout au niveau des cellules endothéliales [180, 181]. Le récepteur Flt-1 est également retrouvé dans les monocytes, les macrophages [158, 159] et les trophoblastes [182] ainsi que dans les cellules mésangiales rénales [183]. Quant au récepteur Flk-1, il est présent au niveau des cellules hématopoïétiques, les mégacaryocytes, les plaquettes et les cellules progénitrices de la rétine [184-186]. En ce qui concerne le récepteur Flt-4, il est exprimé sur les cellules endothéliales embryonnaires pour ensuite être exprimé surtout au niveau de l'endothélium lymphatique dans les tissus adultes [187, 188].

Il y a une faible expression du VEGF et de ses récepteurs au niveau des vaisseaux sanguins des tissus adultes normaux (le récepteur Flk-1 étant tout de même plus exprimé que le récepteur Flt-1) [189] alors que dans les

tumeurs, au cours de la réparation tissulaire et dans l'hypoxie, il y a une régulation à la hausse du VEGF et de ses récepteurs.

De plus, en présence d'ischémie aiguë et chronique du myocarde, il y a une augmentation de l'expression des récepteurs du FGF (FGFR-1) et du VEGF (Flt-1 et Flk-1) [190, 191]. En effet, l'hypoxie cause une augmentation de l'expression des récepteurs du VEGF par un mécanisme paracrine [192]. L'hypoxie augmente l'expression des récepteurs Flt-1 par un mécanisme transcriptionnel et des récepteurs Flk-1 par un mécanisme post-transcriptionnel dans des cellules endothéliales en culture [193, 194]. De plus, le VEGF augmente l'expression des deux récepteurs, Flk-1 et Flt-1, alors que le TGF- $\beta$  diminue l'expression du récepteur Flk-1 [84, 195-198]. Également, l'activation des récepteurs de la thrombine cause une régulation à la hausse des récepteurs du VEGF [15].

Le VEGF et ses récepteurs sont également surexprimés dans la majorité des cancers humains tels que les carcinomes du tractus gastro-intestinal [69], du pancréas [69], du sein [199], de la vessie [200], du rein [200], des ovaires [201] et dans le syndrome de Kaposi. Une régulation à la hausse de l'ARNm des récepteurs Flk-1 et Flt-1 est également observée dans les cellules endothéliales tumorales, mais pas dans les vaisseaux sanguins du tissu normal environnant [69, 200, 202].

## 1.4 Angiogenèse en conditions pathologiques

L'inhibition de l'angiogenèse a été proposée comme stratégie pour le traitement de pathologies qui dépendent de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins [1]. En condition physiologique, l'angiogenèse constitue un phénomène rare [203]. Dans ces cas, les facteurs anti-angiogéniques prédominent sur les facteurs pro-angiogéniques [203].

En conditions normales, les cellules endothéliales ont un temps de renouvellement qui peut aller jusqu'à 1000 jours, mais au cours de l'angiogenèse ce temps peut être réduit à 5 jours [204]. Aussi, en condition physiologique, le taux de prolifération des cellules endothéliales n'est que de 0.01 % [5] et les cellules demeurent en état non-prolifératif jusqu'à ce qu'elles soient activées par diverses conditions telles qu'une blessure, l'inflammation ou autres conditions pathologiques qui stimulent l'angiogenèse [13]. L'hypoxie constitue un puissant stimulus de l'angiogenèse dans de nombreuses pathologies [5]. En effet, l'hypoxie active des HIFs qui agissent en induisant l'expression de plusieurs facteurs angiogéniques incluant le VEGF, le NO, le PDGF et l'ang-2 [205].

La néo-vascularisation est également sous le contrôle de l'inflammation qui se produit au niveau de la région ischémique [206]. En effet, il y a accumulation de monocytes et de macrophages dans les tissus ischémiques ce qui amène la sécrétion de facteurs angiogéniques tels que l'IL-2, le TNF- $\alpha$ , le VEGF, le bFGF et des MMPs [207, 208].

L'angiogenèse constitue un processus physiologique essentiel dans diverses situations, mais une néo-vascularisation non-contrôlée peut être impliquée dans diverses pathologies telles que la progression tumorale, l'athérosclérose, l'arthrite rhumatoïde, les rétinopathies, les hémangiomes infantiles et le psoriasis [11, 134].

La néo-vascularisation de l'oeil constitue la plus importante cause de cécité dans le monde et est impliquée dans plus de 20 pathologies de l'œil [11]. Lors du diabète, les nouveaux capillaires dans la rétine envahissent l'humeur vitrée causant un détachement de la rétine et la cécité [11]. Le VEGF serait le principal facteur angiogénique impliqué dans la formation de nouveaux vaisseaux sanguins dans cette condition pathologique [52].

Au cours de l'arthrite rhumatoïde, de nouveaux capillaires sanguins envahissent et détruisent le cartilage des jointures [11]. Également, il y a production de facteurs angiogéniques par les macrophages, les cellules immunitaires et les cellules inflammatoires qui s'infiltrent au niveau des jointures [209]. Les facteurs angiogéniques impliqués dans cette pathologie sont le aFGF, le bFGF, le PDGF, le TGF- $\alpha$ , le TGF- $\beta$ , l'angiogénine et le VEGF [11, 105, 210]. En effet, on détecte dans le liquide synovial de personnes atteintes d'arthrite rhumatoïde, de hauts taux de VEGF [211], de FGF-2 [212] et de PlGF [213].

En ce qui concerne la néo-vascularisation au niveau de la plaque athérosclérotique, elle peut causer la croissance ainsi que la rupture de la plaque pouvant mener à une thrombose ou un spasme vasculaire [214]. Ceci est médié par une surexpression de VEGF et par l'hypoxie au site de la plaque athérosclérotique [215].

C'est en 1968 que l'hypothèse que les tumeurs produisent une substance angiogénique diffusible a été proposée [216, 217]. Puis, en 1971, Folkman proposa que la croissance tumorale et la formation de métastases dépendent de l'angiogenèse et donc, que l'inhibition de ce processus pourrait être utilisée dans le traitement de cancers [1]. Ceci a mené à la recherche de composés anti-angiogéniques qui pourraient être utilisés dans le traitement de pathologies associées à l'angiogenèse [5].



En 1976, Gullino a démontré que les cellules précancéreuses acquièrent la capacité angiogénique au cours de leur transformation en cellules cancéreuses [218]. Sans vaisseaux sanguins, il est impossible pour la tumeur de croître ou de former des métastases au niveau d'autres organes [5]. Au cours du développement tumoral, il y a donc une période au cours de laquelle la tumeur demeure non angiogénique et est restreinte à un volume de quelques  $\text{mm}^3$ . Cette période peut durer quelques semaines chez la souris et des années chez l'humain [11]. Puis, lorsqu'un nombre suffisant de cellules tumorales adoptent le phénotype angiogénique, la néo-vascularisation de la tumeur débute [11]. La formation de nouveaux capillaires sanguins permet ainsi à la tumeur de grossir et permet également aux cellules tumorales d'entrer en circulation et d'aller former des métastases chez des organes distants [11]. Dans plusieurs types de tumeurs, la progression tumorale et la formation de métastases sont reliées à une densité vasculaire élevée [219].

Le phénotype angiogénique est activé lorsque l'effet des molécules pro-angiogéniques est supérieur à l'effet des molécules anti-angiogéniques et donc que la balance est en faveur de l'angiogenèse [220, 221]. L'activation du phénotype angiogénique peut se faire via plusieurs signaux tels que le stress métabolique (exemples: faible  $\text{pO}_2$ , acidose ou hypoglycémie), le stress mécanique (exemples: pression générée par les cellules en prolifération, forces de cisaillement, augmentation du flot sanguin), une réponse immunitaire ou inflammatoire (exemple: cellules immunitaires ou inflammatoires qui s'infiltrent dans le tissu) et des mutations génétiques (exemples: activation d'oncogènes ou délétion de gènes suppresseurs de tumeurs qui contrôlent la production de régulateurs de l'angiogenèse) [222, 223]. Les molécules pro- et anti-angiogéniques peuvent provenir de différentes sources comme les cellules cancéreuses, les cellules endothéliales, les cellules du stroma, du sang ainsi que de la MEC [224].

Les cellules tumorales augmentent l'expression de facteurs pro-angiogéniques et inhibent l'expression des inhibiteurs ce qui favorise l'acquisition du phénotype angiogénique [203]. L'acquisition du phénotype angiogénique dépend donc de la balance nette entre des facteurs angiogéniques positifs et négatifs qui sont relâchés par la tumeur [127, 225, 226]. Les facteurs angiogéniques positifs comprennent l'aFGF [227], le bFGF [228], le VEGF [229] et l'angiogénine [230]. Parmi les facteurs négatifs naturels de l'angiogenèse, on retrouve la TSP et l'angiostatine [127, 136].

### **1.5 Induction de l'angiogenèse dans un but thérapeutique**

L'inhibition de l'angiogenèse est une approche considérée dans le traitement de diverses pathologies, mais l'activation du processus angiogénique peut également être utilisée dans certaines conditions comme lors de l'ischémie.

La pathologie vasculaire périphérique et l'ischémie des membres sont des problèmes de santé majeurs dans le monde occidental [231]. Chez plusieurs patients, la chirurgie et les techniques de revascularisation ne permettent pas d'empêcher ou de limiter les complications [231]. Il a été proposé que l'utilisation de facteurs de croissance tels que le VEGF et le bFGF pourraient améliorer la perfusion tissulaire [1, 232].

C'est en 1992 que les premières études ont démontré un effet angiogénique dans un modèle d'ischémie des membres avec le bFGF [232]. Depuis, plusieurs autres études ont confirmé ces résultats avec le bFGF et le VEGF. Également, d'autres études ont démontré l'efficacité du aFGF pour induire l'angiogenèse [233]. L'utilisation de ces facteurs de croissance permet d'augmenter la densité capillaire et la circulation collatérale dans la région ischémique [233].

Par la suite, des études pré-cliniques ont démontré que des facteurs de croissance angiogéniques pouvaient être utilisés en angiogénèse thérapeutique pour augmenter le développement d'artères collatérales chez des modèles animaux d'ischémie périphérique et myocardique [13]. Les facteurs utilisés dans ces études sont le VEGF, le aFGF et l'HGF qui ont été administrés sous forme de protéine recombinante ou par transfert de gènes [234]. Il a été démontré que l'administration d'un bolus intra-artériel de 500 à 1000 µg de VEGF était suffisant pour augmenter le développement artériel collatéral et était efficace pour améliorer l'ischémie dans un modèle d'ischémie des membres inférieurs chez le lapin [235, 236]. Une amélioration de la fonction et de la perfusion du myocarde suite à l'administration de facteurs de croissance angiogéniques a d'ailleurs été démontrée dans des modèles animaux d'ischémie myocardique [237]. De plus, des études animales ont démontré que l'injection de bFGF diminue la taille de l'infarctus et augmente le nombre de capillaires et d'artéioles [238].

Ces résultats ont permis de développer plusieurs approches thérapeutiques qui sont présentement en études cliniques et visent à promouvoir l'angiogénèse en conditions d'ischémie [239, 240]. La plupart des approches visent à libérer du VEGF ou du bFGF au tissu ischémique dans le but de stimuler la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Les études cliniques utilisant le VEGF et le bFGF ont démontré une amélioration des symptômes et une amélioration de la qualité de vie chez des patients présentant une ischémie du myocarde ou des membres périphériques [239, 240]. De plus, le transfert d'ADN nu du VEGF administré dans le myocarde chez des patients atteint d'angine chronique sévère a engendré une amélioration des symptômes et une augmentation de la perfusion au myocarde, une diminution de la fréquence et de la sévérité d'angines et une amélioration du flot collatéral dans les régions ischémiques du myocarde

[239, 240]. Également, le groupe de Isner a administré un plasmide codant pour le VEGF humain dans la veine fémorale proximale chez des patients présentant une ischémie chronique des membres inférieurs et ceci a augmenté le nombre de vaisseaux collatéraux dans les membres ischémiques [241]. Un autre groupe a quant à lui injecté un plasmide codant le VEGF<sub>165</sub> humain dans des jambes de patients avec une ischémie critique ce qui a diminué la douleur au repos et a permis la guérison des ulcères cutanés d'origine ischémique [242]. Aussi, il y a eu formation de nouveaux vaisseaux collatéraux et augmentation du flot sanguin dans le membre traité [242]. L'administration intra-vasculaire de VEGF peut donc accélérer la formation de nouveaux vaisseaux sanguins collatéraux pour le traitement de membres ischémiques ou d'un myocarde ischémique.

### **1.6 Approches utilisées pour inhiber l'angiogenèse**

Plusieurs composés anti-angiogéniques sont présentement en phases cliniques pour le traitement de tumeurs en combinaison ou non avec les thérapies conventionnelles. Ces composés utilisent différentes stratégies telles qu'interférer avec les molécules angiogéniques, leurs récepteurs ou leurs voies de signalisation; activer ou libérer des inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse; ou cibler directement le réseau vasculaire des tumeurs [5]. Les avantages de la thérapie anti-angiogénique sont une faible toxicité, une action ciblée principalement au niveau des cellules endothéliales des capillaires en prolifération et l'absence d'effets secondaires [134]. La combinaison de traitements anti-angiogéniques et cytotoxiques (pour les cellules tumorales) est envisagée comme étant plus efficace car cela vise à la fois le compartiment tumoral et les vaisseaux sanguins qui alimentent la tumeur [134].

Agents ciblant le VEGF. Des agents anti-angiogéniques ciblant les facteurs de croissance impliqués dans l'angiogenèse sont en développement. Il a été démontré qu'un anticorps monoclonal spécifique pour le VEGF inhibait l'angiogenèse induite par le VEGF et inhibait la croissance de tumeurs chez des souris [243]. Suite à cela, un anticorps ciblant le VEGF, le "recombinant humanised monoclonal antivasculair endothelial growth factor antibody" a été développé et est présentement en cours d'études cliniques chez des patients avec des carcinomes de poumon, du sein et de la prostate [244].

Agents ciblant les récepteurs des facteurs de croissance. Des anticorps ciblant le récepteur Flk-1 ont été développés comme molécules anti-angiogéniques. L'anticorps c-p1C11 est un anticorps chimérique humain/souris qui lie de façon efficace le récepteur Flk-1 [245]. Cet anticorps bloque l'interaction du VEGF avec son récepteur Flk-1 et bloque la phosphorylation de Flk-1 et de MAPK p42/p44 inhibant ainsi l'effet mitogénique du VEGF dans des cellules endothéliales de veines ombilicales humaines [245]. Un autre anticorps dirigé contre le récepteur Flk-1, le Mab 6.64 réduit la densité des vaisseaux sanguins humains dans les tumeurs [246]. Également, le DC101 est un anticorps dirigé contre le domaine extracellulaire du récepteur Flk-1 qui bloque l'interaction du VEGF avec ce récepteur [247]. Cet anticorps inhibe l'activation du récepteur par le VEGF et inhibe l'effet mitogénique du VEGF *in vitro*. [248]. De plus, il inhibe la croissance tumorale dans des modèles de tumeurs chez la souris [248]. Le DC101 ne démontre pas de toxicité et n'affecte pas les vaisseaux sanguins normaux [248].

Également, Kendall et coll. ont démontré qu'une forme soluble du récepteur Flt-1 qui ne possède pas le 7<sup>e</sup> domaine extracellulaire, la région transmembranaire et le domaine cytoplasmique du récepteur inhibe la mitogenèse induite par le VEGF *in vitro* et l'angiogenèse tumorale *in vivo*

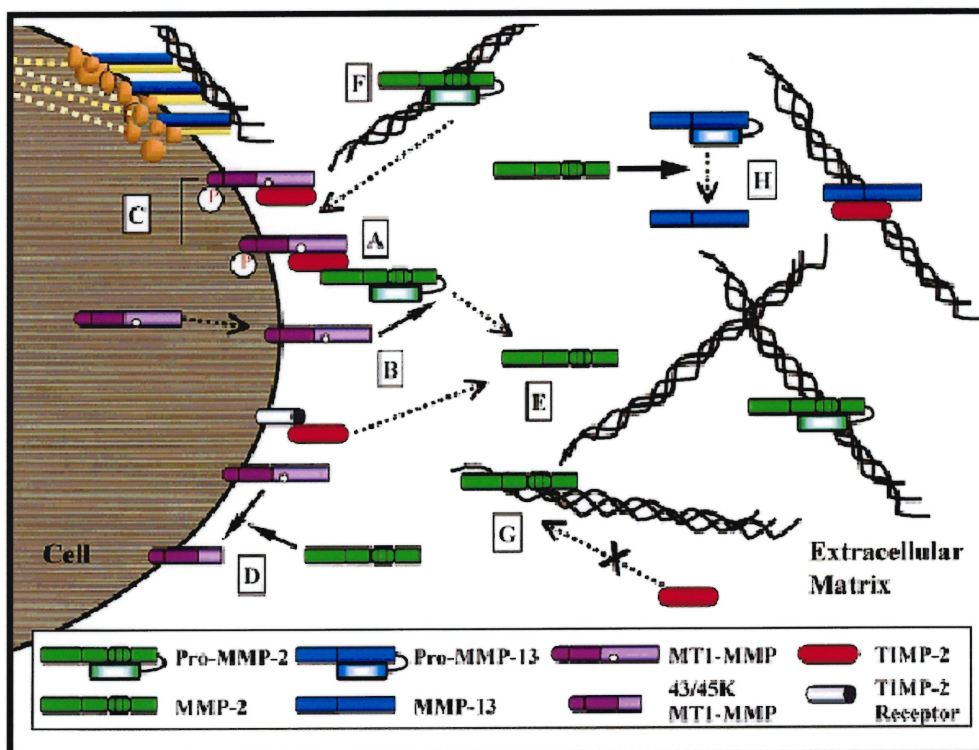
[153]. De plus, un ribozyme anti-angiogénique qui cible l'ARNm des récepteurs du VEGF (Flk-1 et Flt-1) est également en développement clinique [244].

Finalement, le blocage du récepteur Flt-4 à l'aide d'un anticorps monoclonal inhibe la croissance tumorale en inhibant l'angiogenèse induite dans le tissu tumoral [174]. Ceci démontre que le récepteur Flt-4 est impliqué dans la formation de nouveaux vaisseaux sanguins dans la tumeur [174].

Agents ciblant les MMPs. La dégradation de la MEC est essentielle pour la croissance et l'invasion tumorale, pour la formation de métastases ainsi que pour l'angiogenèse tumorale [249]. Les MMPs représentent une famille d'endopeptidases neutres qui dégradent les composantes de la MEC et par conséquent jouent un rôle important dans le développement des tumeurs [249]. Les MMPs jouent également un rôle dans le remodelage de la MEC dans diverses conditions physiologiques comme dans le développement tissulaire fœtal et la réparation tissulaire postnatale [249]. Une dégradation non contrôlée de la MEC mène toutefois à certaines pathologies telles que les tumeurs, l'arthrite rhumatoïde et les ulcérations chroniques par exemple [249].

Les MMPs sont exprimées par les cellules endothéliales, les cellules tumorales et les cellules du stroma [244]. Il y a plus de 20 MMPs qui sont responsables de la dégradation de la MEC et qui permettent la croissance et l'invasion des vaisseaux sanguins au niveau de la tumeur [250, 251]. Dans la majorité des cas, l'expression des MMPs est induite par divers signaux dont les cytokines, certains facteurs de croissance ou un contact cellule-cellule ou cellule-matrice altéré [252, 253]. Il existe un inhibiteur naturel des MMPs qui est le TIMP [254]. On compte quatre membres dans la famille des TIMP qui sont TIMP-1, -2, -3 et -4 [249].

Des inhibiteurs de ces MMPs (MMPIs) ont été développés et ceux-ci inhibent l'angiogenèse et bloquent ainsi la croissance tumorale et la formation de métastases [244]. Les MMPIs sont les agents anti-angiogéniques les plus avancés en développement clinique [244]. Parmi les MMPIs en développement, on retrouve le Batimastat, le Marimastat, le Solimastat, le AG3340, le BAY12-9566, le COL-3, le Neovastat, le BMS-275291 et le CGS27023A [244]. Des études pré-cliniques ont démontré que l'utilisation de MMPIs dans différents modèles animaux permet de réduire la croissance tumorale ainsi que le nombre et la taille des métastases [254]. La figure 3 présente un schéma démontrant la complexité de différentes voies d'activation possible des MMPs. Chaque lettre (A à H) représente une voie possible d'activation qui ne seront pas décrites ici afin d'alléger la lecture de ce mémoire.



Johansson et coll. *Cell Mol Life Sci* 2000

**Figure 3: Cascade d'activation des MMPs**

Agents ciblant l'activation des cellules endothéliales. Des agents anti-angiogéniques inhibant l'activation des cellules endothéliales sont en développement [244]. L'analogue de la fumagillin, le TNP-470, est un inhibiteur sélectif de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales et est sous investigation en études cliniques comme agent anti-cancéreux [255]. Dans cette classe de composés, on retrouve également la squalamine et l'endostatine [244]. Des études ont démontré qu'un traitement à long-terme avec l'endostatine et le TNP-470 réduisait de façon significative la croissance de la plaque athérosclérotique [255]. Également, la vasostatine est composée du domaine n-terminal de la calréticuline humaine et peut inhiber la prolifération cellulaire endothéliale et l'angiogénèse ainsi qu'inhiber la croissance tumorale [256, 257].

De plus, des anticorps dirigés contre l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  induisent l'apoptose des cellules endothéliales en prolifération *in vitro* et ont une activité anti-angiogénique *in vivo* [258]. Ces anticorps inhibent la croissance tumorale dans le modèle de membrane chorioallantoïque chez le poulet [258].

Inhibiteurs des tyrosines kinases. Des inhibiteurs des protéines tyrosines kinases capables de bloquer la signalisation intracellulaire induite par le VEGF sont également en cours de développement [244]. Le SU5416 est un inhibiteur du récepteur Flk-1 [150, 259]. Ce composé agit en se liant au site de liaison de l'ATP sur le récepteur Flk-1 [150, 259]. Une autre molécule, le SU6668, est également un inhibiteur des récepteurs tyrosines kinases qui agit sur le récepteur Flk-1, le récepteur du PDGF et le récepteur du FGF [152]. Cette molécule a donc différentes cibles et permet un effet à la fois anti-angiogénique et cytostatique sur les tumeurs [152].

Autres. Finalement, il existe plusieurs agents anti-angiogéniques dont la Thalidomide™, le IM862, la suramine, la penicillamine, l'IL-12 et l'interféron- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) qui ont un mécanisme d'action inconnu [244]. De



plus, l'IFN- $\alpha$ -2a est un facteur anti-angiogénique étudié pour le traitement des hémangiomes infantiles qui permet la régression de tumeurs [260].

Plusieurs évidences suggèrent que les meilleures cibles anti-angiogéniques seraient le VEGF et son récepteur Flk-1 [152]. Tout d'abord, le VEGF est le facteur de croissance le plus souvent retrouvé dans les pathologies associées à l'angiogenèse [152]. Également, le VEGF et ses récepteurs sont surexprimés au niveau de plusieurs tumeurs [152]. Aussi, le récepteur Flk-1 est exprimé principalement sur les cellules endothéliales activées telles que dans les tumeurs [69, 200, 202, 261]. Donc l'inhibition de Flk-1 serait une cible spécifique contrairement à l'inhibition de Flt-1, ce récepteur étant exprimé tant sur les cellules endothéliales quiescentes que sur les cellules en prolifération [152, 262]. L'inhibition de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, de la croissance tumorale et de la formation de métastases a déjà été démontrée en utilisant des inhibiteurs du VEGF ou du récepteur Flk-1 [152]

**Tableau 3: Agents anti-angiogéniques en développement clinique [325]**

<b>Agent anti-angiogénique</b>	<b>Mécanismes d'action</b>
AG-3340	Inhibiteur des MMPs
Anticorps anti-VEGF	Bloque la liaison du VEGF à ses récepteurs
BAY 12-9566	Inhibiteur des MMPs
Benefin	Inconnu
CAI (carboxy-amido imidazole)	Inhibiteur des canaux calciques
CM101	Agent ciblant le réseau vasculaire
Col-3	Dérivé de la tétracycline
Flavopuridol	Inhibiteur de la PKC
“Human chorio-gonadotrophin”	Inconnu
Interféron alpha-2a	Augmente IP-10
IL-12	Inconnu
ISV-120 (Batimastat)	Inhibiteur des MMPs
Marimastat	Inhibiteur des MMPs
Metaret (suramine)	Antagoniste des facteurs de croissance
Neoretna	Inhibiteur des MMPs
Neovastat	Inhibiteur des MMPs
Octréotide	Antagoniste des facteurs de croissance
Paclitaxel (Taxol, Docetaxel, Paxene)	Cytotoxique, anti-prolifératif
Pentosan polysulphate	Antagoniste des facteurs de croissance
PI-88	Antagoniste des facteurs de croissance
Psorvastat	Inhibiteur des MMPs
Razoxane	Cytotoxique, anti-prolifératif
Replistatatin (Platelet factor-4)	Inconnu
Squalamine	Bloqueur des canaux Na <sup>+</sup> -Ca <sup>2+</sup>
SU101	Antagoniste du PDGF
SU5416	Antagoniste du VEGF
Tamoxifène	Cytotoxique, anti-prolifératif
Tecogalan sodique	Antagoniste des facteurs de croissance
Thalidomide	Inconnu
TNP-470 (AGM-1470)	Inconnu
Vitaxine	Anticorps monoclonal anti-intégrine

## **1.7 Thérapie génique**

La thérapie génique consiste soit à insérer un gène fonctionnel dans les cellules humaines pour corriger une déficience ou encore à inhiber l'expression d'une protéine dans un but thérapeutique. C'est en 1990 que le premier protocole clinique a été approuvé pour traiter la déficience en adénosine déaminase [263]. Depuis, plus de 300 protocoles ont été approuvés à travers le monde [263].

### **1.7.1 Transfert de gènes**

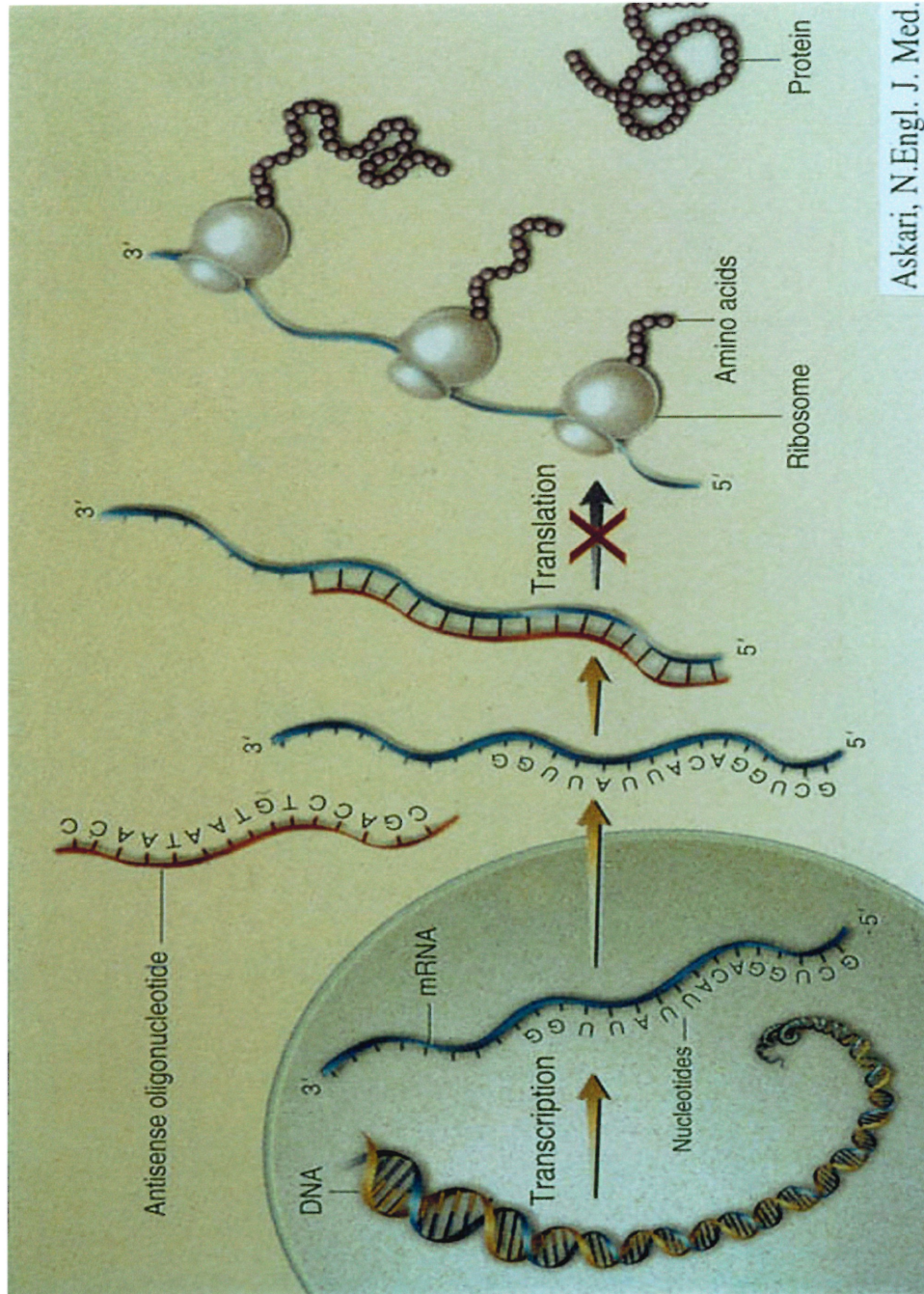
Le transfert de gènes consiste à insérer un gène fonctionnel à l'aide d'un vecteur afin d'augmenter ou d'induire la synthèse d'un gène déficient et ceci dans un but thérapeutique. Le transfert de gènes peut s'effectuer de différentes façons, soit par l'injection directe d'ADN plasmique, l'utilisation de rétrovirus, d'adénovirus ou d'un virus adéno-associé. La thérapie génique peut être utilisée pour libérer des facteurs angiogéniques [237]. La transfection d'ADN codant pour le VEGF a été utilisée dans des modèles animaux d'ischémie chronique du myocarde [237]. L'utilisation de plasmides permet le transfert de gènes et est une méthode très sécuritaire [264]. Toutefois les plasmides ne sont pas incorporés par les cellules de façon efficace et ne sont pas protégés contre les systèmes de surveillance cellulaire [264]. Plusieurs autres informations concernant le transfert de gènes pourraient être données, mais dans le contexte de ce mémoire, je me limiterai à fournir seulement ces informations.

### **1.7.2 Régulation à la baisse de gènes par oligonucléotides antisens**

En ce qui concerne l'inhibition de la synthèse protéique par thérapie génique, il est possible d'utiliser un oligonucléotide antisens (AS), un ribozyme (molécule d'ARN avec une activité catalytique) ou encore un fragment d'ADN qui se lie dans la boucle majeure du duplex d'ADN et empêche ainsi la transcription de l'ADN en ARN [265]. Une des techniques beaucoup employée est l'utilisation d'AS qui consiste en une courte séquence d'ADN ou d'ARN complémentaire à l'ARNm d'une protéine d'intérêt et avec lequel il forme un dimère hybride empêchant ainsi la traduction de l'ARNm en une protéine fonctionnelle [265] (voir figure 4).

Les AS doivent posséder certaines caractéristiques afin de causer une inhibition efficace [266]:

- La séquence d'ADN de l'AS doit être spécifique et unique.
- L'AS doit pénétrer dans les cellules de façon efficace.
- L'effet de l'AS dans les cellules doit être stable.
- L'AS ne doit pas se lier de façon non spécifique avec des protéines.
- La formation d'un complexe hybride entre l'AS et son ARNm ciblé doit être spécifique.
- La protéine ciblée et/ou le niveau d'ARNm doit diminuer.
- L'AS ne doit pas démontrer de toxicité.
- L'AS ne doit pas causer de réponse immunitaire ou inflammatoire.
- L'AS doit démontrer une bonne efficacité comparativement à des séquences sens ou dégénérée qui servent de témoins.



Askari, N. Engl. J. Med.

Askari FK. *N Engl J Med* 1996

Figure 4: Mécanisme d'action des oligonucléotides antisens au niveau cellulaire

Les AS inhibent donc l'expression de protéines en interférant au niveau de l'épissage, de la stabilité et/ou de la traduction de l'ARNm [267]. Les AS peuvent donc agir de différentes façons. La majorité des effets de l'AS serait attribuable à l'activation de la RNase H [265]. La RNase H est une enzyme retrouvée dans le noyau et le cytoplasme [265]. La formation d'un complexe hybride entre un fragment d'ARNm et un AS d'ADN cause l'activation de la RNase H qui reconnaît l'hybride anormal ARNm-AS d'ADN, clive l'ARNm et libère l'AS intact [265]. L'avantage de ce procédé est que suite au clivage de l'ARN, l'AS est toujours intact et libre d'aller se lier à un autre ARNm [265]. Également, les AS, en se liant à l'ARNm qui leur est spécifique, préviennent l'assemblage du ribosome ou la lecture de l'ARNm par le ribosome [265]. Les AS peuvent aussi se lier à l'ARNm dans le noyau empêchant son transport dans le cytoplasme et donc sa traduction [265]. Finalement, les AS peuvent empêcher la maturation de l'ARN en se liant aux sites de jonctions intron-exon ce qui empêche l'épissage [265].

L'interaction des oligonucléotides avec l'ARNm de protéines cibles dépend de la charge, de la longueur de la séquence et de la concentration des oligonucléotides [268-270]. Donc, lors du développement d'AS, il faut prendre en considération l'affinité de l'oligonucléotide pour sa séquence cible qui dépend du nombre et de la composition des bases complémentaires [271]. Également, il faut considérer la disponibilité de la séquence cible qui dépend de la structure secondaire de l'ARNm [271]. En effet, il a été démontré que des AS ciblant différentes régions de l'ARNm avaient des efficacités variables dues à la structure secondaire adoptée par l'ARNm [272, 273]. Également, les AS sont généralement développés pour cibler une des trois régions suivantes: la région 5', le codon initial AUG ou la région 3' non traduite de l'ARNm [274-276]. De plus, lorsqu'un AS est synthétisé, sa séquence ne doit pas comporter plus de trois guanosines (G) en ligne car la répétition de G peut causer des liaisons non spécifiques de

l'AS [266]. En effet, il a été démontré que des AS phosphorothioates avec une séquence quartet de guanosines (GGGG) pouvaient former des complexes avec le bFGF, le PDGF et le VEGF qui sont des facteurs de croissance liant l'héparine et ainsi affecter la physiologie normale [277]. De plus, il a été démontré que l'administration *in vivo* d'AS phosphorothioates ayant une séquence non spécifique pouvait inhiber la croissance de glioblastomes dans des souris immunodéficientes [278]. C'est pour ces raisons qu'il faut utiliser des contrôles tels que des séquences sens ou dégénérées pour s'assurer que l'effet observé est bien dû à l'AS [266].

Généralement, pour obtenir une activité pharmacologique spécifique, les oligonucléotides doivent avoir un minimum de 12 à 15 bases [266]. Des séquences d'oligonucléotides plus longues démontrent plus de spécificité mais, s'ils ont plus de 20 bases, la capture cellulaire de ces oligonucléotides sera moins efficace [266]. Un des avantages d'utiliser des AS est leur spécificité et un oligonucléotide de 12 à 15 bases est suffisamment spécifique pour être complémentaire à une seule séquence génique [266].

Dans leur forme naturelle, soit des phosphodiesters, les AS sont rapidement dégradés par des exonucléases et des endonucléases présentes dans le sang, le fluide intracellulaire et le fluide cérébrospinal [266]. Dans le sang et le milieu de culture tissulaire, la demi-vie des phosphodiesters est de quelques minutes seulement. Toutefois, dans le liquide cérébrospinal, la demi-vie est beaucoup plus longue et peut aller jusqu'à 24 heures. Afin d'augmenter leur demi-vie et leur capture par les cellules, il est possible de faire des modifications chimiques sur les AS. Une classe d'AS modifiés beaucoup utilisée sont des AS phosphorothioates où un atome d'oxygène dans le lien phosphodiester est remplacé par un atome de soufre [265]. Ces AS sont plus stables (demi-vie 10 à 50 fois plus longue que les AS phosphodiesters)

dans les fluides biologiques. Il est également possible de changer un atome d'oxygène du lien phosphodiester par des groupes méthyls, alkyl phosphotriester, phosphoramidate ou boranophosphate et qui augmentent la demi-vie des AS. Des modifications dans la synthèse des oligonucléotides a donc permis de créer des molécules stables pour plusieurs jours et qui sont non toxiques à des concentrations efficaces [279, 280]. Les oligonucleotides phosphorothioates sont donc plus stables et résistent davantage aux nucléases par rapport aux oligonucléotides phosphodiesters. De plus, ils permettent l'importante activation de la RNase H [281]. Des oligonucléotides modifiés appelé "mixed-backbone oligonucleotide" et qui consistent en un hybride d'ADN et d'ARN ont été synthétisés [282]. Des études sont également en cours à divers niveaux afin d'améliorer les divers paramètres reliés à l'utilisation des AS.

Des études utilisant des AS ont été effectuées pour vérifier leur efficacité dans diverses pathologies. Par exemple, l'inhibition de la protéine kinase A de type I (PKAI) à l'aide d'AS qui cible sa sous-unité RI $\alpha$  permet d'inhiber la croissance et la différenciation cellulaire dans une variété de lignées de cellules tumorales [283, 284] et démontre une activité anti-tumorale chez des souris immunodéficientes [285]. Également, les AS ciblant la sous-unité RI $\alpha$  de la PKAI ont démontré très peu de toxicité au terme d'études cliniques de phase I chez des patients cancéreux [286]. Il reste à voir si ces AS s'avéreront efficaces pour augmenter la survie des patients cancéreux.

Également, des études ont démontré que des AS phosphorothioates dirigés contre le VEGF murin et injectés dans l'humeur vitrée inhibent la néo-vascularisation dans la rétine [287]. Une baisse du taux de VEGF suite au traitement avec les AS est également observée [287]. Ces AS peuvent donc être considéré comme une voie thérapeutique pour les pathologies causées par une néo-vascularisation au niveau de la rétine [287]. De plus, la



transfection d'AS contre le VEGF dans des lignées de cellules tumorales a inhibé l'expression du VEGF *in vitro* ainsi que la migration des cellules endothéliales [288].

Par ailleurs, des études ont démontré que l'administration locale de ribozymes inhibe l'angiogenèse induite par le VEGF dans le modèle de cornée chez le rat [289]. De plus, des ribozymes ciblant les récepteurs Flt-1 ou Flk-1 ont inhibé l'angiogenèse induite par le VEGF *in vivo* dans un modèle de cornée [290]. Lorsqu'administrés par voie intra-veineuse de façon continue, ces ribozymes inhibent la croissance tumorale dans un modèle de carcinome du poumon [290]. De plus, des études ont démontré que des ribozymes dirigés contre le récepteur Flt-1 pouvaient inhiber la formation de métastases au foie dans un modèle de cancer colorectal humain. Suite à ces résultats, un ribozyme anti-Flt-1 (ANGIOZYME) a été développé pour le traitement de cancers en clinique. Ce dernier n'a pas montré de toxicité dans les études cliniques et les résultats d'efficacité sont attendus à la fin de l'année 2001 [291]. Récemment, Isis Pharmaceuticals Inc. a développé le Vitravene qui est le premier agent thérapeutique basé sur la technologie AS à être approuvé pour la mise en marché aux Etats-Unis. Le Vitravene est utilisé pour le traitement local de la rétinite causée par le cytomégalovirus chez des patients sidatiques.

La thérapie génique anti-angiogénique procure divers avantages tels qu'une relâche soutenue et une forte concentration locale de l'agent thérapeutique ainsi qu'une faible résistance au médicament étant donné la stabilité génétique des cellules endothéliales [292].

## 1.8 Modèles utilisés pour étudier l'angiogenèse

Plusieurs modèles permettant l'étude de l'angiogenèse ont été développés. Un modèle d'étude qui permet la quantification de l'angiogenèse doit posséder les caractéristiques suivantes [293]:

- Le taux de relâchement ainsi que la concentration spatiale et temporelle de l'agent angiogénique ou anti-angiogénique distribué doivent être connus afin d'évaluer la relation dose-réponse.
- Si des cellules tumorales sont utilisées comme source de facteurs angiogéniques, elles doivent être bien définies au point de vue de l'expression d'oncogènes et de la production de facteurs de croissance (stimulateurs ou inhibiteurs de l'angiogenèse).
- Le modèle doit permettre une mesure quantitative de la néo-vascularisation.
- Il doit y avoir une distinction claire entre les nouveaux vaisseaux sanguins et les vaisseaux sanguins pré-existants.
- Les réponses observées *in vitro* doivent pouvoir être confirmées *in vivo*.
- Le modèle doit permettre un suivi de la néo-vascularisation à long-terme et de façon non-invasive.
- Le modèle doit être facile à utiliser et reproductible.

Modèles *in vitro*. La majorité des étapes impliquées dans l'angiogenèse peuvent être observées *in vitro*, mais la recherche en angiogenèse s'est attardée particulièrement à la prolifération et à la migration des cellules endothéliales [293]. Les études de migration utilisent surtout des chambres de Boyden alors que les études de prolifération se basent sur le comptage des cellules, l'incorporation de thymidine ou des techniques de coloration pour la mort ou la prolifération cellulaire (PCNA, TUNEL) [294-296]. Des modèles *in vitro* pour étudier l'angiogenèse comprennent également des cultures de cellules endothéliales, seules ou en combinaison avec d'autres types de cellules et de MECs, de même que des cultures de vaisseaux

sanguins [297]. Un autre modèle *in vitro* est le gel de collagène qui permet d'observer la transformation des cellules endothéliales en structures tubulaires, soit des capillaires [298-303]. Les avantages des modèles *in vitro* sont que l'on peut contrôler les variables expérimentales, qu'ils permettent de suivre les événements avec facilité, qu'ils offrent la possibilité de disséquer un événement complet en ses composantes et qu'ils ont un faible coût comparativement aux approches *in vivo* [293].

Modèles *in vivo*. La quantification de la néo-vascularisation *in vivo* se fait surtout à l'aide de trois approches, soit des préparations microcirculatoires, la vascularisation dans des implants matriciels de polymères biocompatibles et l'excision de tissus vascularisés d'animaux ou de tissus humains [293].

#### Préparations microcirculatoires:

Parmi les préparations microcirculatoires, on compte trois catégories. Tout d'abord, on utilise parfois des chambres transparentes implantées par exemple au niveau de l'oreille de lapin, dans le dos de souris, de rats, de hamsters et de lapins, dans la joue de hamsters ou encore au niveau du crâne de souris ou de rats [293]. Chaque chambre transparente possède différents avantages et inconvénients et la combinaison de plusieurs d'entre elles dans l'étude de l'angiogenèse permet d'étudier l'effet du microenvironnement tissulaire sur la formation des nouveaux vaisseaux sanguins [293].

Une autre catégorie consiste en des préparations de tissu extérieur comme la joue de hamster, le mésentère de souris, de rats ou de lapins, le foie de souris ou de rats ou la membrane chorioallantoïque du poulet [293]. Dans ces préparations, un nombre de cellules défini ou un dispositif contenant l'agent angiogénique est injecté de façon sous-cutannée ou intradermique suite à une séparation non-traumatique de la peau et de la membrane sous-

jacente [293]. À différents temps, la couche de peau est retirée pour mesurer la réponse angiogénique puis elle est replacée en son endroit initial [293]. Un des problèmes avec cette technique est le traumatisme causé par le retraitement de la couche de peau [293]. Également, il est impossible de voir tous les nouveaux vaisseaux sanguins formés [293]. Un autre modèle qui est le plus utilisé dans cette catégorie est celui de la membrane chorioallantoïque du poulet. Ce modèle est bien établi pour étudier l'angiogenèse normale et tumorale *in vivo* [304, 305]. Il permet d'étudier l'activité des facteurs de croissance endogènes et exogènes [306]. Toutefois, ce modèle comporte certaines limitations comme la difficulté de quantifier les nouveaux vaisseaux sanguins et il peut se produire de l'inflammation [307, 308]. Aussi, il est considéré comme un modèle d'embryogenèse et représente un modèle non-mammifère.

La troisième catégorie consiste en des préparations *in situ* au niveau de la cornée ou de l'iris de l'œil. Le modèle de la cornée est celui qui est le plus utilisé et qui consiste à créer une petite chambre dans la cornée, dans laquelle des facteurs angiogéniques peuvent être placés [214]. Cette technique permet la croissance capillaire vers une substance angiogénique implantée dans la cornée de lapin, de souris ou de rat [105]. En effet, le VEGF ou le bFGF stimulent la formation de vaisseaux sanguins sur une période de 3 à 7 jours dans ce modèle. Toutefois, c'est une technique relativement difficile à effectuer et la quantification est également difficile [293].

#### Implants matriciels:

En ce qui concerne la vascularisation dans des implants matriciels, ceci requière une matrice de polymère tel un gel ou une éponge contenant une quantité connue de facteurs angiogéniques ou de cellules que l'on attache à un lit vasculaire [309-311]. Par exemple, une telle matrice peut être placée

sur la membrane chorioallantoïque du poulet et la surface relative occupée par des vaisseaux sanguins dans la matrice peut être mesurée [310].

Excision de tissus:

Avec l'excision de tissus, les paramètres qui caractérisent l'angiogenèse sont mesurés par une variété de techniques une fois le tissu excisé [312]. Les mesures se font à l'aide de la microscopie, de l'examen histologique de sections de tissus colorés afin de détecter les cellules endothéliales ou la membrane basale ou encore à l'aide de la perfusion de marqueurs intravasculaires [313]. Les méthodes histologiques peuvent être remplacées par des techniques d'imagerie *in vivo* telles que le PET (tomographie à émission par positron) et le IRM (imagerie par résonance magnétique) qui ont été adaptées pour étudier l'angiogenèse [314]. Ces techniques permettent une étude non-invasive de l'angiogenèse dans le temps [314] et permettent d'évaluer différents paramètres physiologiques tels que le flot sanguin [312], le volume sanguin [315-317] et la perméabilité capillaire [318].

Un autre modèle d'angiogenèse *in vivo* est la rétinopathie induite par l'oxygène. C'est un modèle de rétinopathie proliférative où une néovascularisation est causée par une exposition à un environnement riche en oxygène suivi d'une exposition à des conditions normales d'oxygène chez des souris ou des rats néonataux [319, 320].

L'angiogenèse *in vivo* peut également être évaluée de façon qualitative en mesurant les concentrations plasmatiques ou urinaires de facteurs angiogéniques [293]. La libération de facteurs angiogéniques est une étape initiale de l'angiogenèse, mais elle n'est toutefois pas suffisante pour la formation de vaisseaux sanguins [293].

Au cours de cette étude nous avons développé notre propre modèle permettant d'étudier l'angiogenèse *in vivo* au niveau du testicule de souris. Ce modèle consiste à insérer une mini-pompe osmotique sous la peau des souris dans une position dorso-latérale. Cette mini-pompe, préalablement remplie de la substance que l'on veut libérer au niveau du testicule, est reliée à un cathéter inséré dans le testicule et qui libère la substance à ce niveau. Il nous est ensuite possible d'observer la formation de nouveaux vaisseaux sanguins causée par la substance au niveau de la tunica vaginalis du testicule. Notre modèle permet donc d'induire une angiogenèse modérée à la surface de la tunica vaginalis qui est facilement quantifiable. De plus, il permet d'obtenir des résultats reproductibles et la manipulation chirurgicale est relativement simple, rapide et ne cause pas de réponse inflammatoire au site d'angiogenèse.

### **1.9 Prémisses de la présente étude**

Le but principal de la présente étude était de vérifier si l'utilisation d'oligonucléotides antisens (AS) dirigés contre l'ARNm des récepteurs Flk-1 et Flt-1 pourrait inhiber l'angiogenèse induite par le VEGF *in vivo* au niveau du testicule de souris. Par le fait même, l'étude visait à déterminer la contribution des récepteurs Flk-1 et Flt-1 dans l'induction de l'angiogenèse par le VEGF *in vivo* et à vérifier si les AS réduisaient l'expression des récepteurs Flk-1 et Flt-1. Pour ce faire, nous avons utilisé le nouveau modèle décrit plus haut permettant d'étudier l'angiogenèse *in vivo* dans le testicule de souris. Si les AS réduisent l'angiogenèse *in vivo*, l'utilisation de la thérapie génique visant les récepteurs du VEGF pourrait donc être envisagée comme une nouvelle thérapie dans le traitement des pathologies associées à l'angiogenèse.

## 2 Présentation du manuscrit

Blockade of *in vivo* VEGF-mediated angiogenesis by antisense gene therapy: role of Flk-1 and Flt-1 receptors

Geneviève S. Marchand, Nicolas Noiseux, Jean-François Tanguay  
and Martin G. Sirois\*

Montreal Heart Institute & Department of Pharmacology, University of  
Montreal, Montreal, Canada

Running title: Inhibition of VEGF-mediated angiogenesis

\*Correspondence should be addressed to:

Martin G. Sirois PhD

Montreal Heart Institute

5000 Belanger Street

Montreal (QC) Canada, H1T 1C8

Phone: (514) 376-3330 (ext: 3583)

Fax: (514) 376-1355

E-mail: [mgsirois@icm.umontreal.ca](mailto:mgsirois@icm.umontreal.ca)

(N.B. Cet article a été accepté pour publication dans le journal "American Journal of Physiology" en janvier 2002)

# Blockade of in vivo VEGF-mediated angiogenesis by antisense gene therapy: role of Flk-1 and Flt-1 receptors

GENEVÈVE S. MARCHAND, NICOLAS NOISEUX,  
JEAN-FRANÇOIS TANGUAY, AND MARTIN G. SIROIS  
*Montreal Heart Institute and Department of Pharmacology,  
University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada H1T 1C8*

Received 14 March 2001; accepted in final form 4 September 2001

**Marchand, Geneviève S., Nicolas Noiseux, Jean-François Tanguay, and Martin G. Sirois.** Blockade of in vivo VEGF-mediated angiogenesis by antisense gene therapy: role of Flk-1 and Flt-1 receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: H000–H000, 2002.—Angiogenesis, the formation of new blood vessels from preexisting ones, is a critical component of various pathologies such as tumor progression, rheumatoid arthritis, and retinopathies. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a mitogenic and chemotactic factor capable of inducing angiogenesis through the activation of its receptors, fetal liver kinase-1 (Flk-1) and fms-like tyrosine kinase-1 (Flt-1) expressed on endothelial cells. The purpose of the present study was to assess if a treatment with antisense (AS) oligonucleotides directed against VEGF receptors Flk-1 or Flt-1 mRNA could prevent VEGF-mediated angiogenesis. With the use of miniosmotic pumps, phosphate-buffered saline, VEGF, or VEGF combined with AS-Flk-1, AS-Flt-1, or AS-scrambled oligonucleotides were released in mouse testis for 14 days. VEGF (1, 2.5, and 5  $\mu\text{g}$ ) increased the formation of new capillary blood vessels by 236, 246, and 287%, respectively. The combination of AS-Flk-1 or AS-Flt-1 (200  $\mu\text{g}$ ) to VEGF (2.5  $\mu\text{g}$ ) reduced by 87 and 85% the formation of new blood vessels, respectively, and the expression of their corresponding proteins. These data demonstrate the therapeutical potential of AS-Flk-1 or AS-Flt-1 to prevent VEGF-mediated angiogenesis in vivo.

**AQ: 2** antisense oligonucleotides; gene therapy

ANGIOGENESIS CAN BE DEFINED as the growth of new blood vessels from preexisting vessels and capillaries and is controlled by the balance between proangiogenic and antiangiogenic molecules (11, 43). It differs from vasculogenesis, which consists on an embryonic phenomenon, in which new blood vessels are formed de novo from blood islands composed of committed stem cells (11). Angiogenesis plays an important role in a variety of physiological processes such as wound healing, corpus luteum formation, and embryonic development (19). However, uncontrolled neovascularization can be associated with human diseases, including growth of solid tumors, retinopathies, rheumatoid arthritis, psoriasis, and atherosclerotic plaque growth (19). Angiogenesis is a complex process that includes proliferation

and migration of endothelial cells, disruption of the capillary basal membrane, and formation of vascular tubes and networks (15). These events are activated by growth factors binding to endothelial cell surface receptors (9).

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is known to be a potent stimulator of proliferation, migration, and differentiation of endothelial cells in vitro (17, 59). It has the ability to trigger the entire sequence of events leading to new vessel growth (18, 26, 69) and can stimulate angiogenesis in vivo in different animal models such as in the rat and rabbit cornea (8, 40), the chorioallantoic membrane (14), and the rabbit bone graft model (8). VEGF binding to endothelial cell receptors also induces the production of nitric oxide (NO), which is considered to be a mediator of VEGF-induced vasodilation and angiogenesis in vivo (29, 35, 49, 61, 64, 66).

The biological activities of VEGF are mediated through two high-affinity receptor tyrosine kinases that are fms-like-tyrosine kinase-1 (Flt-1) or VEGF receptor 1 (VEGFR-1), and fetal liver kinase-1 (Flk-1), or VEGFR-2 (13), whose expressions are mainly restricted to endothelial cells (54). Flt-1 binds VEGF with high affinity but is weakly expressed by endothelial cells, which makes it difficult to detect. On the other hand, Flk-1 binds VEGF with a lower affinity, although Flk-1 is highly expressed on endothelial cells and easier to detect (4, 62). In addition, Flk-1 appears to be the major transducer of VEGF signals in endothelial cells, which result in cell proliferation, migration, differentiation, tube formation, increase of vascular permeability, and maintenance of vascular integrity (70). As for Flt-1, it seems to have a role in endothelial cell assembly (6).

Inhibition of angiogenesis has emerged as a promising strategy for the treatment of pathological conditions that are dependent on new blood vessel formation (16). Targeting either VEGF and/or its receptors might be potential avenues for the inhibition of angiogenesis because their expression is upregulated in numerous metastatic tumors (5) in regenerating liver after injury

Address for reprint requests and other correspondence: M. G. Sirois, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger St., Montreal, Quebec, Canada, H1T 1C8 (E-mail: mgsirois@icm.umontreal.ca).

**AQ: 4**

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.



(44), in hypoxic vasculature (42, 60), and in the diabetic retina (25).

Recent studies in our laboratory (3) using antisense (AS) oligonucleotides directed against the mRNA of VEGF receptors Flk-1 and Flt-1 demonstrated that in vitro VEGF-induced endothelial cell proliferation, migration, and platelet activating factor (PAF) synthesis is mediated through the Flk-1 receptor. In contrast, Flt-1 receptor does not seem to be involved in these VEGF-mediated activities in vitro (3). The aim of the present study was to assess if the use of AS targeting Flk-1 or Flt-1 mRNA could inhibit in vivo VEGF-induced angiogenesis.

#### MATERIAL AND METHODS

**Surgical procedures.** The surgical procedures were performed by one trained operator and were performed in accordance to the guidelines set by the Montreal Heart Institute animal care committee and the Canadian Council for Animal Protection. Male C57/B16 mice (18–22 g wt) (Charles River Breeding Laboratories; Saint-Constant, Quebec, Canada) were anesthetized with an injection (100 mg/kg ip) of ketamine HCl (Ketalean; MTC Pharmaceuticals; Cambridge, Ontario, Canada) and xylazine HCl 10 mg/kg (Rompun; Bayer; Etobicoke, Ontario, Canada). A diagonal incision (2 cm) of the skin was made just above the right groin after the

skin was disinfected with 0.5% chlorhexidine (Novopharm; Toronto, Ontario, Canada). The rectus abdominis muscle and transversalis fascia were dissected to get access to the peritoneal cavity (Fig. 1A). The right testis was pulled out through the inguinal canal and brought to the skin incision (Fig. 1B). A fine needle (25G5/8) was used to create a micropuncture in the visceral layer of the tunica vaginalis of the testis, near the head of the epididymis where there were no apparent vessels (Fig. 1C). A sterilized polyethylene (PE)-10 catheter (Cole-Parmer; Vernon Hills, IL) was introduced into the testis in a selected area and secured with silk 6-0 thread (Davis and Geck; Wayne, NJ) attached to the tunica vaginalis (Fig. 1, D and E). The testis was repositioned into the scrotum by passing through the inguinal canal, and the rectus sheath was sutured with silk 6-0 (Fig. 1H). The free tip of the catheter inserted in the testis was fixed with silk 6-0 to the rectus sheath to prevent unwanted movements and connected to a larger catheter PE-60 (Becton Dickinson; Sparks, MD). This latter was adapted to a miniosmotic pump (model 2002, Alza; Palo Alto, CA) with a controlled flow delivery of 0.5  $\mu$ l/h for 14 days (Fig. 1G). The pump was placed subcutaneously on the abdominal right flank. The wound was then closed with Dexon 5-0 suture (Davis and Geck) and the animals were returned to their cages. The miniosmotic pumps were pre-filled with 200  $\mu$ l of phosphate-buffered saline and bovine serum albumin (PBS-BSA; 0.1%) (Sigma; St. Louis, MO). VEGF (Pepro Tech; Rocky Hill, NJ) was added at

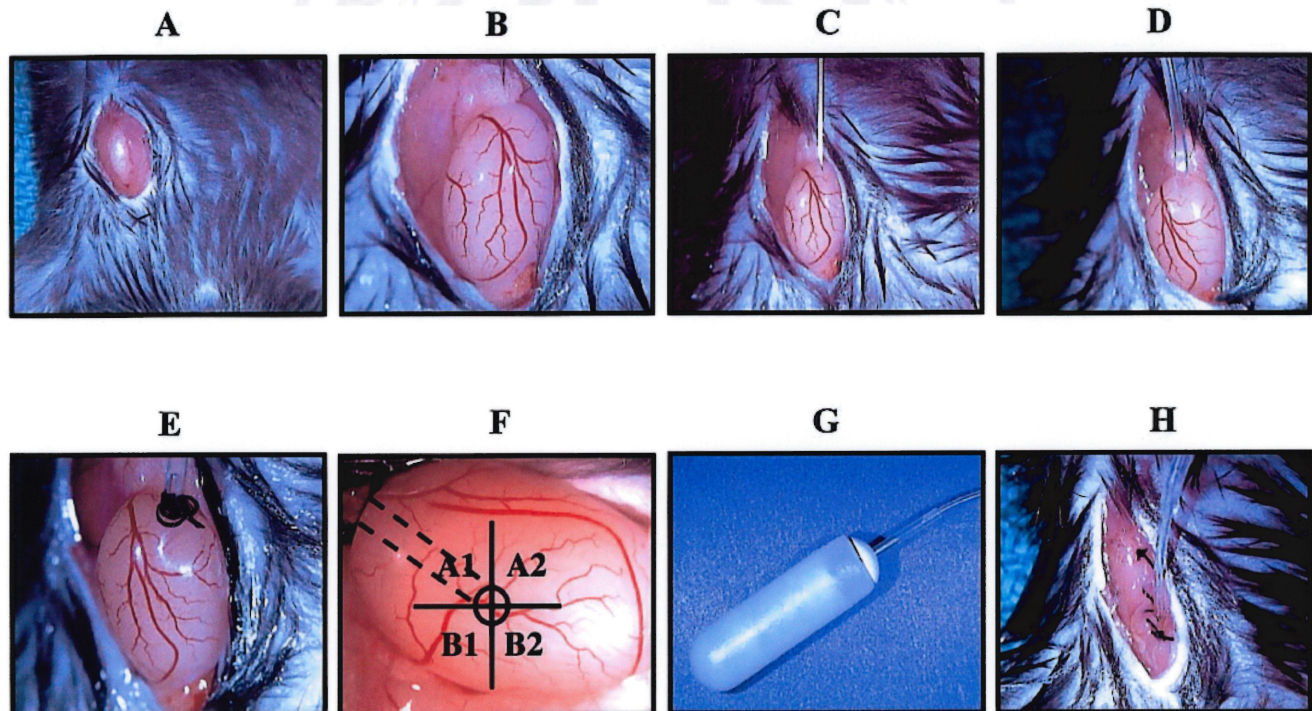


Fig. 1. During surgery, an incision of the skin is made just above the right thigh of the mouse (A), an incision of the rectus sheath is made to access the abdominal cavity, and the right testis is pulled out through the inguinal canal (B), a fine needle (model 25G5/8) is used to create a small hole at the base of the testis where there are no apparent blood vessels (C), a small polyethylene (PE)-10 catheter is inserted in the hole made at the base of the testis (D), and the catheter is fixed at the base of the testis to avoid its movement into the testis (E). At this moment, pictures of 4 different regions of the testis (A1, A2, B1, and B2) at different magnifications are taken with a digital camera (F), the testis is reinserted into the scrotum by passing through the inguinal canal, and the rectus sheath sutured, a miniosmotic pump (G) pre-filled with the substance to be infused into the testis is attached to the free extremity of the catheter. The pump is placed under the skin on the abdominal right flank and the skin is finally sutured (H).

different concentrations (1, 2.5, and 5  $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$  PBS-BSA, 0.1%) to obtain a dose-response curve on the induction of blood vessel formation. On the basis of these data (see RESULTS), a group of mice was treated with VEGF (2.5  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$  PBS-BSA 0.1%) combined to AS-Flk-1 (200  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$  PBS-BSA 0.1%), AS-Flt-1 (200  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$  PBS-BSA 0.1%) or AS scrambled (Scr) (200  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$  PBS-BSA 0.1%). Another group of mice was treated with the oligomers (200  $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$  PBS-BSA 0.1%) in absence of VEGF. Finally, in a sham-operated group of animals, the testes were manipulated as above, but without the insertion of catheter and osmotic pump. After 14 days of treatment, the animals were anesthetized and dissected as described above to bring the right testis to the skin incision for image acquisitions. Animals were then euthanized with an overdose of ketamine and xylazine.

**Image acquisition and analysis.** Pictures of various regions of the testis with inserted catheters were taken at different magnifications ( $\times 8.4$ ,  $\times 12$ ,  $\times 24$ ,  $\times 38.4$ , and  $\times 48$ ) with a color video digital camera (model DKC 5000; Sony) adapted to a binocular (model SZX12; Olympus). To assess the number of new blood vessels, the surface of the testis was divided into four sections: A1, A2, B1, and B2 (Fig. 1F). For each testis, one picture per section was taken at *day 0*. A picture of the exact same region was then taken at *day 14* after treatment. These pictures were taken at a magnification of  $\times 48$ , and the pictures at *day 0* and *day 14* were then compared. The number of new blood vessels present at *day 14* but absent at *day 0* was counted on each picture for each section. The new blood vessels counted were full-length vessels of at least 150  $\mu\text{m}$  and not the result of sprouting. The surface of the pictures taken at  $\times 48$  magnification was 1.288  $\text{mm}^2$ , and the number of new blood vessels was converted as the number of new blood vessels (in  $\text{mm}^2$ ) by dividing the number of new blood vessels per field of  $\times 48$  by the surface (1.288).

To confirm that the new blood vessels observed at *day 14* were not preexisting blood vessels that have been vasodilated by a VEGF treatment, we did another set of experiments in which pictures were taken at *day 0* and *day 14* (in VEGF-treated groups). The Alzet miniosmotic pump was then removed and a new set of pictures were taken 3 days later (*day 17*) in such, the VEGF effect was no longer involved because VEGF has a plasmatic half-life of 3 min (15).

The images taken before (*day 0*) and after treatment (*day 14* and in some cases at *day 17*) were then compared and different parameters were determined: the number of new blood vessels, the length and diameter of the new vessels, change in the diameter of preexisting vessels, and immunohistochemistry analysis. The number of new blood vessels was determined by counting directly on the pictures the number of new vessels created by various treatments. The length and diameter of the vessels were calculated by computerized digital planimetry with the use of a dedicated video binocular and customized software (NIH Image version 1.6).

**Selection of AS oligomers.** The AS oligomer sequences were selected in function of previous studies (3, 10, 58) and had specific characteristics [no more than three consecutive guanines, the incapacity to form hairpins without or minimal capacity to dimerize together, and had between 15 and 20 bases length (18 bases in the present study)]. The murine Flt-1 and Flk-1 cDNA, respectively, were obtained from GenBank (Accession Numbers D28498 and X70842). Four different AS oligonucleotide phosphorothioate backbone sequences have been selected at this time, two targeting mice Flt-1 mRNA (AS 1, AS1-Flt: 5'-AAG CAG ACA CCC gAg CAG-3'; AS 2, AS2-Flt: 5'-CCC TgA gCC ATA TCC TgT-3'), and two targeting mice Flk-1 mRNA (AS 1, AS1-Flk: 5'-AgA ACC

ACA gAg CgA CAG-3'; AS 2, AS2-Flk: 5'-AgT ATg TCT TTC TgT gTg-3'). Two Scr phosphorothioate sequences (Scr Flt, Scr2-Flt: 5'-ACT gTC CAC TCg CAG TTC-3'; Scr Flk, SCR2-Flk: 5'-TTT CTg gTA TgC ATT gTg-3') were also selected as negative controls. The oligomers were used under sterile conditions.

**Immunohistochemistry of Flk-1, Flt-1, and endothelial cell NO synthase expression.** After the animals were euthanized, the testes were isolated, fixed in 10% formalin PBS-buffered solution, and processed for standard histological procedures. Testes sections were cut into 6- $\mu\text{m}$ -long sections, deparaffinized in xylene and ethanol baths, and endogenous peroxidase activity was quenched in a solution of methanol (200 ml) plus hydrogen peroxide (30%, 50 ml). Nonspecific binding of primary antibodies was prevented by preincubating the tissues with serum 5% from the species used to raise the secondary antibodies. Testes sections were then exposed to primary antibodies for 1 h in endothelial NO synthase (ecNOS) or 2 h in Flk-1 and Flt-1. The primary antibodies used were monoclonal anti-mouse Flk-1 IgG (Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA) diluted (1:500, 1,000, and 2,500), rabbit polyclonal anti-human Flt-1 IgG (Santa Cruz Biotechnology) diluted (1:100, 250, and 500), and monoclonal anti-human ecNOS IgG (Transduction Laboratories; Mississauga, Ontario, Canada) diluted (1:2 500, 5,000, and 10,000). Purified nonspecific mouse IgG (for Flk-1 and ecNOS detection) or rabbit IgG (for Flt-1) were used as primary negative control antibodies. On incubation, the primary antibodies were washed with PBS, and the slides incubated for 60 min either with a biotinylated goat anti-rabbit (for Flt-1 detection) or a goat anti-mouse IgG (for Flk-1 and ecNOS detection) (1:400) (Vector Laboratories; Burlingame, CA). Peroxidase labeling was achieved with incubation using an avidin/ peroxidase complex (ABC kit; Vector), and antibody visualization was established after a 5-min exposure to 3,3'-diaminobenzidine solution (DAB kit; Vector). Testes were counterstained by Gill's hematoxylin #3 solution, rinsed in tap and distilled water, and were then mounted with a permount solution.

**Statistical analysis.** Data are means  $\pm$  SE. Statistical comparisons were determined by analysis of variance, followed by a paired or unpaired Student's *t*-test with Bonferroni's correction for multiple comparisons. Data were considered significantly different if a value of  $P < 0.05$  was observed.

## RESULTS

**Angiogenesis assessment.** The infusion of PBS (200  $\mu\text{l}$ ) during a 14-day period with a miniosmotic pump adapted to a catheter inserted in the testis induced the formation of  $1.86 \pm 0.37$  new blood vessels/mm (Figs. 2A and 3A). This formation of new blood vessels was not different from the one observed in control sham-operated animals:  $1.58 \pm 0.27$  new blood vessels/mm (Fig. 3A). Treatment with VEGF at different concentrations (1, 2.5, and 5  $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ ) delivered on a 14-day period increased significantly the number of new blood vessels by 236% ( $P < 0.01$ ), 246% ( $P < 0.01$ ), and 287% ( $P < 0.01$ ), respectively, compared with sham control groups (Figs. 2B and 3A).

**Effect of AS on the formation of new blood vessels.** On the basis of our data in Fig. 3A, we used VEGF at a dose of 2.5  $\mu\text{g}$  for the following experiments. As mentioned above, the infusion of VEGF (2.5  $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ ) for a period of 14 days induced the formation of  $5.48 \pm 0.96$

COLOR

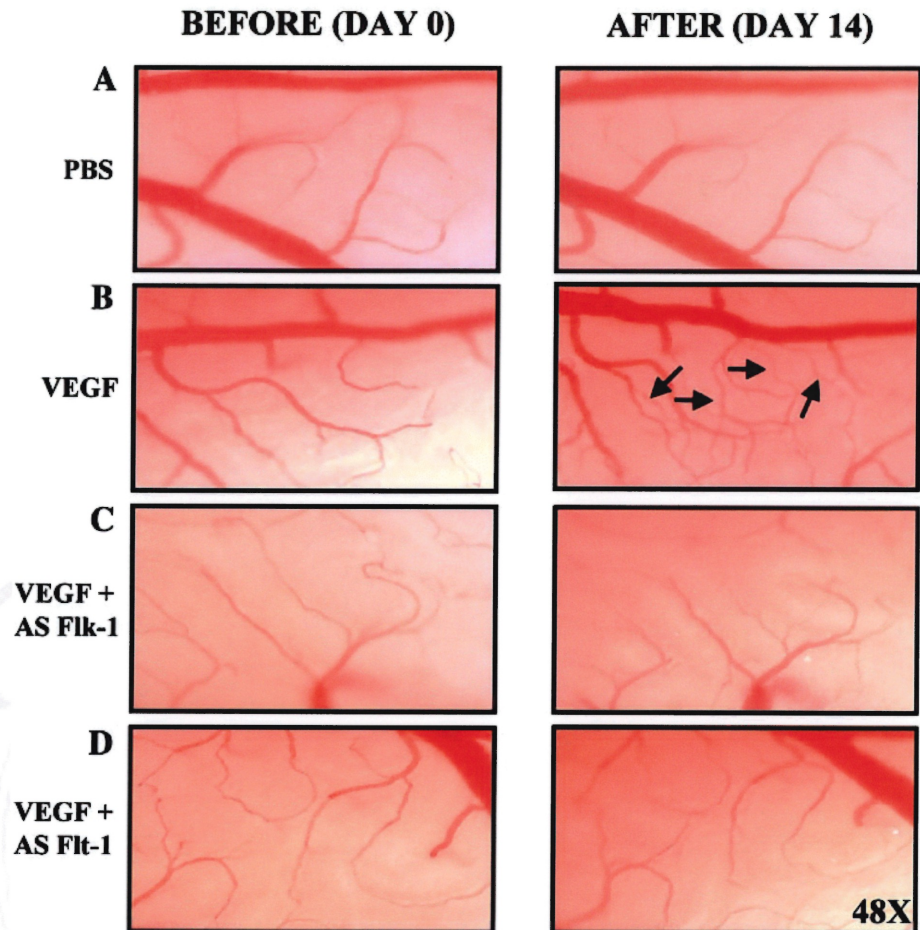


Fig. 2. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-angiogenic effect and its inhibition by antisense (AS) oligonucleotide gene therapy. A sustained infusion of control vehicle phosphate-buffered saline (PBS) had no or marginal angiogenic effect (A), VEGF-infusion for 14 days induced the formation of new blood vessels (arrows) (B), treatment with AS oligomer targeting either fetal liver kinase-1 (Flk-1) (C), or fms-like tyrosine kinase-1 (Flt-1) (D) mRNA abrogated VEGF angiogenic activity. Stereomicroscopic pictures were taken at  $\times 48$  magnification.

new blood vessels/mm<sup>2</sup> ( $P < 0.01$ ; compared with sham control group) (Fig. 3B). The combination of AS1-Flk-1 (200  $\mu$ g), AS2-Flk-1 (200  $\mu$ g), AS1-Flt-1 (200  $\mu$ g), or AS2-Flt-1 (200  $\mu$ g) to VEGF (2.5  $\mu$ g) into 200  $\mu$ l (final volume) decreased the formation of new blood vessels by 85, 87, 85, and 71%, respectively, compared with the VEGF-treated group ( $P < 0.01$ ) (Figs. 2, C and D, and 3B). The combination of AS-Scr (200  $\mu$ g) to VEGF (2.5  $\mu$ g) into 200  $\mu$ l (final volume) led to the formation of  $5.34 \pm 0.64$  new blood vessels/mm<sup>2</sup>, which was statistically not different from the group treated with VEGF alone (Fig. 3B). In another group, we tested the effect of the AS and Scr oligomers in PBS-treated mice, and these oligomers did not alter significantly the number of preexisting blood vessels and the basal formation of new blood vessels mediated by PBS (data not shown).

The length and the diameter of the new blood vessels were also determined. The average length of the new blood vessels in all studied groups fluctuated from 245 to 324  $\mu$ m. The average length of new blood vessels under VEGF treatment (2.5  $\mu$ g/200  $\mu$ l) was  $284 \pm 10$   $\mu$ m (Table 1). The diameter of the new blood vessels has been measured as well and all had a capillary-like diameter with an average diameter fluctuating from 6.30 to 9.04  $\mu$ m, including an average diameter of

$8.52 \pm 0.40$   $\mu$ m under VEGF treatment (2.5  $\mu$ g/200  $\mu$ l) (Table 1).

*Vasodilatory effect of VEGF on preexisting blood vessels.* VEGF is a vasodilatory mediator, consequently, we wanted to assess if the new blood vessels observed on a sustained infusion of VEGF were due to the dilation of preexisting capillaries or due to its angiogenic potential. First, we looked at the vasodilatory effect of VEGF on preexisting blood vessels with a diameter  $< 20$   $\mu$ m and on vessels with a diameter between 20 and 100  $\mu$ m. Pictures of the testes to be treated were taken at *day 0* before treatment and at *day 14*, then the miniosmotic pump was removed and another set of pictures taken 3 days later at *day 17*. In the control sham-operated group, there was no change in the diameter of preexisting vessels at *days 14* and *17* compared with the diameter observed at *day 0* (Fig. 4A). A treatment with VEGF (2.5  $\mu$ g/200  $\mu$ l) delivered on a period of 14 days did not mediate a vasodilation of preexisting vessels with a diameter  $< 20$   $\mu$ m. The diameter of these vessels increased by 6% at *day 14* compared with *day 0* and decreased by 3% at *day 17* compared with *day 14* ( $P = \text{NS}$ ) (Fig. 4A). However, the infusion of VEGF (2.5  $\mu$ g/200  $\mu$ l) over a period of 14 days increased by 40% the dilation of preexisting blood

T1

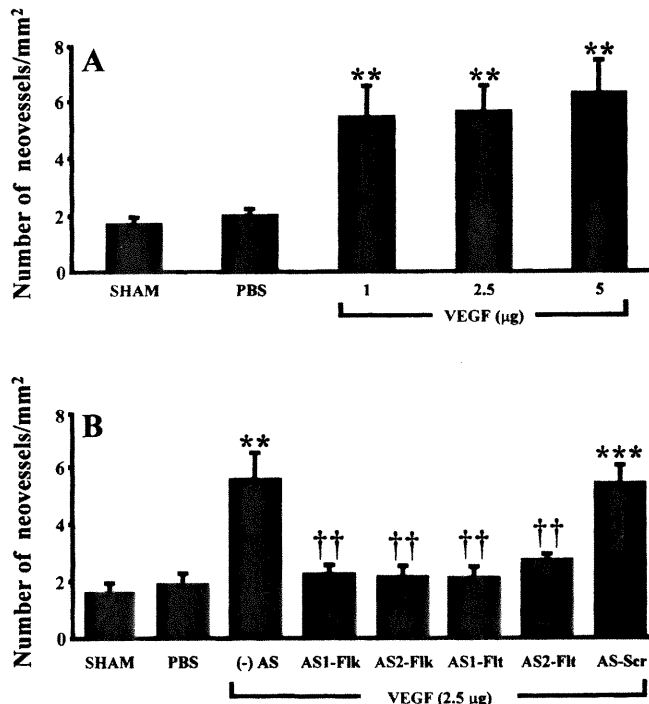


Fig. 3. VEGF-angiogenic effect and its inhibition by AS oligonucleotide gene therapy. *A*: effect of a sustained infusion of VEGF (1, 2.5, and 5 µg) on a 14-day period on the formation of new blood vessels in mouse testis compared with control sham-operated and PBS-treated groups. *B*: combination of AS oligomers targeting either Flk-1 or Flt-1 mRNA (AS-Flk-1 or AS-Flt-1; 200 µg) to VEGF (2.5 µg) abrogated the formation of new blood vessels, whereas AS-scrambled (Scr) oligomers (200 µg) did not prevent VEGF-angiogenic activity. *n* = 5–11 animals per treatment. \*\**P* < 0.01 and \*\*\**P* < 0.001 vs. sham; ‡*P* < 0.01 vs. VEGF.

vessels having a diameter between 20 and 100 µm compared with untreated arteries (*day 0*) (*P* < 0.01). However, this vasodilatory effect mediated by VEGF infusion was abrogated within a period of 3 days after the arrest of VEGF infusion (*day 17*) and was no longer significant compared with *day 0* (Fig. 4A).

**Effect of AS on VEGF-mediated vasodilation of pre-existing blood vessels.** In sham-operated mice, the diameter of preexisting blood vessels (20–100 µm in diameter) did not fluctuate significantly from *day 0* to *day 14*, and the mean diameter was set as the 100%

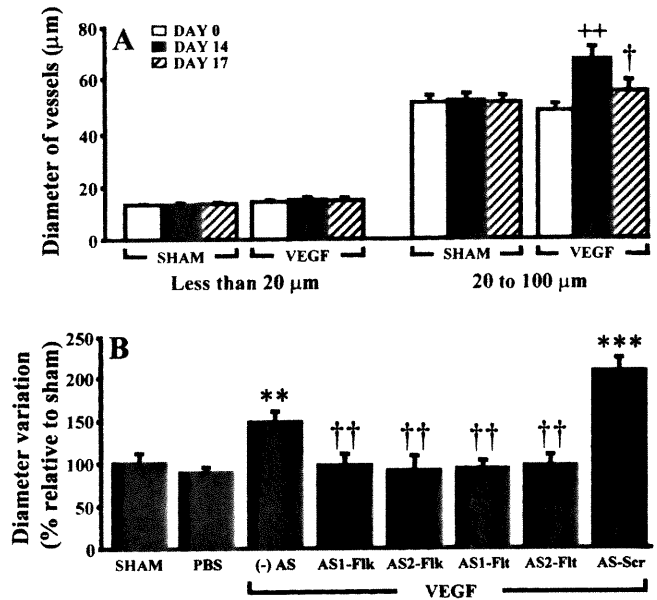


Fig. 4. VEGF-vasodilatory effect on preexisting blood vessels and its inhibition by AS oligonucleotide gene therapy. *A*: in a sham-operated control group, there is no change in the diameter of preexisting blood vessels at *days 14* and *17* post procedure. VEGF (2.5 µg) infusion on a 14-day period did not modulate the vascular tone of preexisting blood vessels with a diameter <20 µm. However, VEGF increased significantly the diameter of preexisting blood vessels with a diameter from 20 to 100 µm compared with untreated arteries (*day 0*). The arrest of VEGF infusion abrogated its vasodilatory effect within 3 days (*day 17*). *B*: combination of AS oligomers targeting either Flk-1 or Flt-1 mRNA (AS-Flk-1 or AS-Flt-1; 200 µg) to VEGF (2.5 µg) inhibited the vasodilatory effect of VEGF on preexisting vessels with a diameter from 20 to 100 µm. Addition of an Scr oligomer to VEGF did not inhibit VEGF vasodilatory effect. *n* = 4 to 11 animals per treatment. ++*P* < 0.01 vs. *day 0*; †*P* < 0.05 vs. *day 14*; \*\**P* < 0.01 and \*\*\**P* < 0.001 vs. sham; ‡*P* < 0.01 vs. VEGF.

baseline diameter. A treatment with VEGF (2.5 µg/200 µl) delivered on a 14-day period induced the vasodilation of preexisting blood vessels (20–100 µm diameter) by 48% (*P* < 0.01, compared with control sham-operated mice) (Fig. 4B). The combination of AS1-Flk-1 (200 µg), AS2-Flk-1 (200 µg), AS1-Flt-1 (200 µg), or AS2-Flt-1 (200 µg) to VEGF (2.5 µg) into 200 µl (final volume) abrogated the VEGF-vasodilatory effect of preexisting blood vessels (20–100 µm diameter) (*P* < 0.01) (Fig. 4B). Treatment with a Scr oligomer did not reduce

Table 1. Vessel density, length, and diameter of new blood vessels according to treatment

Treatment	New blood vessels, mm²	Length, µm	Diameter, µm	<i>n</i>
Sham	1.58 ± 0.27	251.2 ± 15.5	7.12 ± 0.26	6
PBS	1.86 ± 0.37	324.1 ± 17.0	6.62 ± 0.66	11
VEGF (2.5 µg)	5.48 ± 0.96	284.3 ± 10.0	8.52 ± 0.40	8
AS1-Flk-1 (200 µg)	2.17 ± 0.36	278.7 ± 13.1	7.74 ± 0.42	7
AS2-Flk-1 (200 µg)	2.08 ± 0.40	278.9 ± 13.0	6.30 ± 0.59	7
AS1-Flt-1 (200 µg)	2.15 ± 0.40	285.2 ± 13.3	9.04 ± 0.44	8
AS2-Flt-1 (200 µg)	2.71 ± 0.23	267.4 ± 13.5	8.45 ± 0.48	7
AS scrambled	5.34 ± 0.64	245.1 ± 6.4	7.94 ± 0.28	7

Values are means ± SE; *n*, no. of animals treated per group. PBS, phosphate-buffered saline; VEGF, vascular endothelial growth factor; AS, antisense; Flk-1, fetal liver kinase-1; Flt-1, fms-like tyrosine kinase-1.

the VEGF-mediated vasodilatory effect. In fact, it even increased the vasodilation of preexisting blood vessels (Fig. 4B). The combination of AS or Scr oligomers to PBS did not alter the basal diameter of the preexisting blood vessels (20–100  $\mu\text{m}$  diameter) (data not shown).

**Effect of VEGF on the number and diameter of new blood vessels.** In previous figures, we showed under sustained VEGF infusion the presence of new blood vessels within 14 days and stated that they were  $<10 \mu\text{m}$  in diameter. In addition, we observed that VEGF infusion had no vasodilatory effect on preexisting blood vessels with a diameter  $<20 \mu\text{m}$ , but induced the vasodilation of preexisting blood vessels with a diameter  $>20 \mu\text{m}$ , and that this effect was abrogated on the arrest of VEGF infusion (Fig. 4A). These results suggest that the new blood vessels observed in our study cannot be the result of a vasodilation of preexisting blood vessels with a diameter  $<20 \mu\text{m}$  because VEGF does not induce vasodilation of these small blood vessels.

Nevertheless, to ensure that the new blood vessels observed under VEGF infusion were not the result of an unexpected vasodilation of small preexisting capillaries ( $<10 \mu\text{m}$  diameter), we performed an additional study, in which we quantified the number and the diameter of new blood vessels at *day 14* and *day 17* in control sham-operated and VEGF-treated mice (Fig. 5). In control sham-operated mice, we observed the formation of  $1.71 \pm 0.40$  new blood vessels/ $\text{mm}^2$  with a mean diameter of  $8.01 \pm 0.40 \mu\text{m}$  at *day 14*, these parameters were not significantly different at *day 17* (Fig. 5). A treatment with VEGF ( $2.5 \mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ ) infused on a 14-day period induced in the present study the formation of new blood vessels ( $4.40 \pm 0.40$  vessels/ $\text{mm}^2$ ) ( $P < 0.001$ ) compared with a control group, and these new vessels had a diameter of  $7.92 \pm 0.47 \mu\text{m}$ , which is not statistically different from the diameter of new

blood vessels formed in control sham-operated group (Fig. 5). The infusion of VEGF was terminated by the removal of the miniosmotic pump at *day 14*, and the same parameters were evaluated 3 days later (*day 17*) (Fig. 5). The number and diameter of new blood vessels 3 days on the removal of VEGF were not statistically different from those obtained at *day 14* under VEGF treatment (Fig. 5).

**Effect of AS and VEGF on Flk-1 and Flt-1 protein expression.** By immunohistochemistry analysis we performed a semiquantitative analysis of Flk-1 and Flt-1 protein expression. The expression of Flk-1 and Flt-1 receptors is present on vascular endothelial cells of mouse testes under normal condition (nontreated, sham operated, or PBS infused) (Figs. 6A and 7A). Under VEGF sustained infusion ( $2.5 \mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ ; 14-day period), we observed that the protein expression of Flk-1 and Flt-1 remained similar to control sham-operated group compared with control sham-operated group (Figs. 6B and 7B). We then investigated the effect of AS1-Flk-1 (200  $\mu\text{g}$ ), AS2-Flk-1 (200  $\mu\text{g}$ ), AS1-Flt-1 (200  $\mu\text{g}$ ), or AS2-Flt-1 (200  $\mu\text{g}$ ) combined with VEGF ( $2.5 \mu\text{g}$ ) into 200  $\mu\text{l}$  (final volume). A treatment with either AS1-Flk-1 or AS2-Flk-1 blocked Flk-1 protein expression (Fig. 6C), without affecting Flt-1 protein expression (Fig. 7C), whereas a treatment with either AS1-Flt-1 or AS2-Flt-1 blocked Flt-1 protein expression (Fig. 7D), without affecting Flk-1 protein expression (Fig. 6D). Treatment with Scr oligomers did not alter the expression of Flk-1 and Flt-1 (Figs. 6E and 7E). Purified nonspecific mouse and rabbit IgG were used as primary negative control antibody, and in each case we could not detect any positive staining (data not shown).

**ecNOS protein expression.** VEGF mediated a vasodilation of preexisting blood vessels with a diameter between 20 and 100  $\mu\text{m}$ , and such vasodilation was abrogated by AS oligomers targeting either Flk-1 or Flt-1 mRNA but not with Scr oligomers (Fig. 4B). Consequently, we wanted to confirm that the inhibition of VEGF-mediated vasodilation by the AS oligomers was not due to a nonselective downregulation of ecNOS protein expression. By immunohistochemistry analysis, we confirmed the ecNOS protein expression on vascular endothelial cells of mouse testis under normal conditions (nontreated, sham operated, or PBS infused) and in VEGF-treated group (Fig. 8, A and B). The combination of AS oligomers either against Flk-1 or Flt-1 mRNA as well as Scr oligomers with VEGF did not alter the ecNOS protein expression on vascular endothelial cells of mouse testis (Fig. 8, C–E).

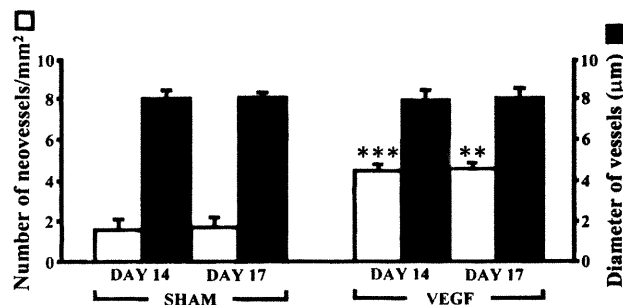


Fig. 5. The VEGF-angiogenic effect and vasodilatory effect on new blood vessels. Number and diameter ( $\mu\text{m}$ ) of new blood vessels after 14 days of treatment with VEGF ( $2.5 \mu\text{g}$ ) and at *day 17* (3 days post VEGF). In a sham-operated group, the number and diameter of new blood vessels remained the same at *days 14* and *day 17* postprocedure. A treatment with VEGF ( $2.5 \mu\text{g}$ ) for 14 days increased the formation of blood vessels compared with the control sham-operated group, and the diameter of the new blood vessels was not statistically different from those observed in control sham-operated mice. Three days after the arrest of VEGF infusion (*day 17*), the number and the diameter of the new blood vessels remained the same as observed at *day 14* under VEGF treatment.  $n = 4$ –11 animals per treatment. \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  vs. sham.

## DISCUSSION

In the present study, we developed a new model of angiogenesis in which we were able to: 1) investigate the VEGF angiogenic activity, 2) downregulate by AS oligonucleotides gene therapy the protein expression of

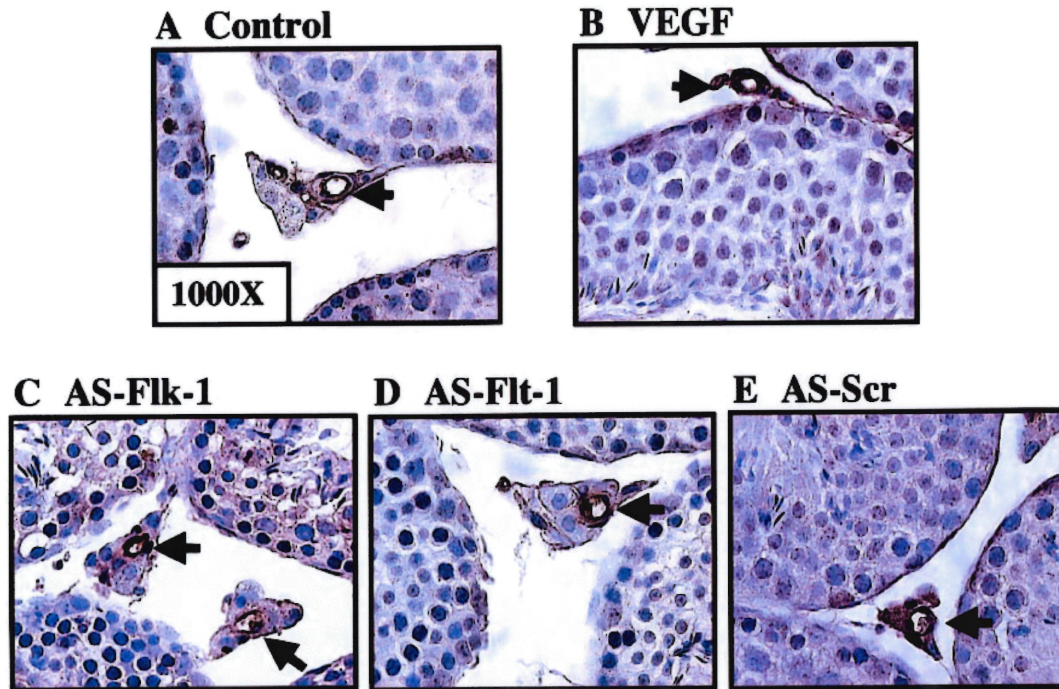


Fig. 8. Positive endothelial cell nitric oxide synthase (ecNOS) protein expression on vascular endothelial cells was detected by immunohistochemistry (cells stained in brown; arrow). Basal expression in control sham-operated mice (A) and VEGF infusion maintained the level of ecNOS protein expression (B). Treatment with AS-Flk-1 (C), AS-Flt-1 (D), or an Scr oligomer (E) did not alter the vascular ecNOS protein expression (magnification  $\times 1,000$ ).

Flk-1 and Flt-1, 3) prevent VEGF-mediated angiogenesis, and 4) demonstrate that Flt-1 and Flk-1 are required to mediate VEGF vasodilatory effect.

It is possible to mimic under in vitro conditions different activities related to angiogenesis, namely endothelial cell proliferation, migration, formation of tubule-like structures, and the release of angiogenic mediators (33). However, it remains that these in vitro experiments cannot entirely reproduce the angiogenic process obtained under in vivo conditions.

Several in vivo models of angiogenesis have been elaborated throughout the years. These models include avian chorioallantoic membrane, neovascularization in the cornea (19), matrix implants, inflammatory granuloma response (30), window models (41), cancer models (68), and wound healing (8). Each model has different advantages, disadvantages, and limitations. For instance, the chick chorioallantoic membrane model is based on the application of a disk containing a growth factor placed on the chorioallantoic membrane of a fertilized egg. This system is nonmammalian, and for certain, it is not truly considered as an in vivo model because it involves embryonic angiogenesis, which is not necessarily applicable to disease-driven angiogenesis (1, 34). Another in vivo model commonly used is the corneal neovascularization model, in which a device (pellet) releasing an angiogenic factor is implanted into the stroma of the cornea of the animals. The surgical technique is difficult and can produce undesirable inflammation by itself (2, 21). In fact, there is probably no perfect angiogenic model, and the decision

about which animal model is the most suitable to be used should be based on different variables, including the objectives, the angiogenic stimulus to be studied, the quantitative analysis, the animal species, and the practical and economical aspects.

We believe that our angiogenic model in the mouse testis offers several advantages. It provides the possibility to work with mammalian animal. The testis has a moderate vascular network at the surface of the tunica vaginalis, which is very easy to locate and to measure. Consequently, it is also very easy to see the formation of new capillarylike blood vessels under angiogenic conditions, and the results are highly reproducible. The surgical procedure is relatively easy, and produces no inflammatory response at the expected angiogenic site. Furthermore, while the testis is pulled out through the natural inguinal canal for the surgical procedure and for image acquisitions, there is consequently no scar tissue or fibrosis formation on the testis. In this model, drugs and mediators of interest can be delivered locally in the testis through a catheter adapted to a miniosmotic pump placed distally. This latter approach provides a significant advantage as it allows (if desired) to modify the treatment by the removal/replacement of the delivering miniosmotic pump on a simple skin incision at the level of the abdominal flank, and thus without having to handle the treated testis. If applicable, the angiogenic inhibitors can be given by other routes (i.e., orally and intravenously).

In our study, we observed that a sustained infusion for 14 days of VEGF in mouse testis induced the for-

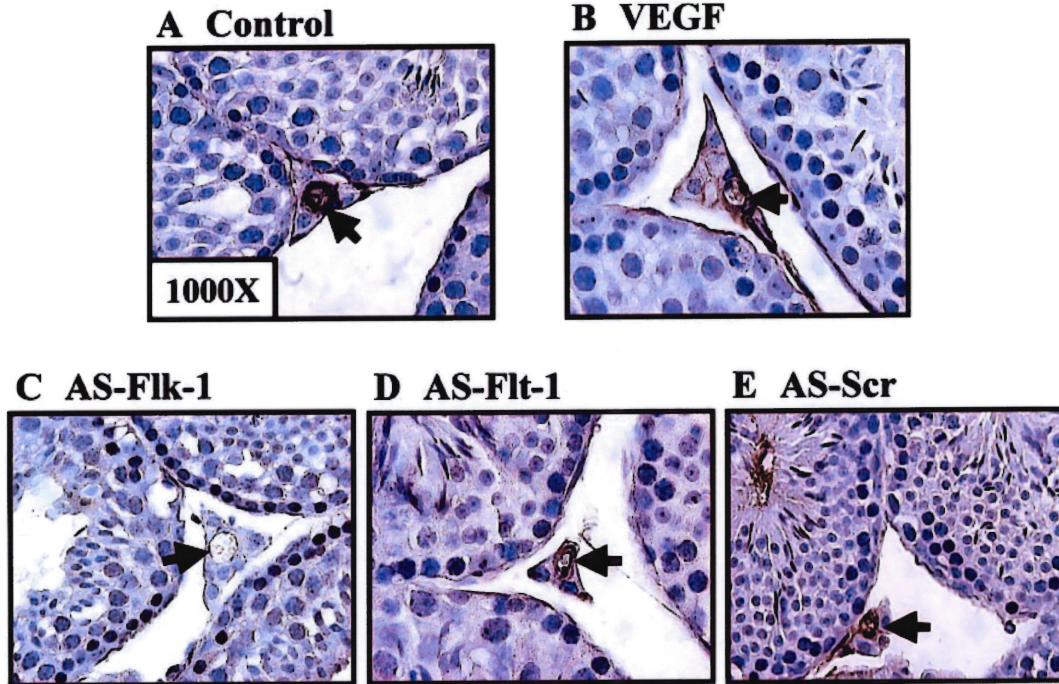


Fig. 6. Positive Flk-1 protein expression on vascular endothelial cells was detected by immunohistochemistry (cells stained in brown; arrow). Basal expression in control sham-operated mice (A), VEGF infusion maintained the level of Flk-1 protein expression (B), treatment with AS-Flk-1 prevented Flk-1 protein expression (C); whereas treatment with either AS-Flt-1 (D) or AS-Scr oligomer (E) did not alter the vascular Flk-1 protein expression (magnification  $\times 1,000$ ).

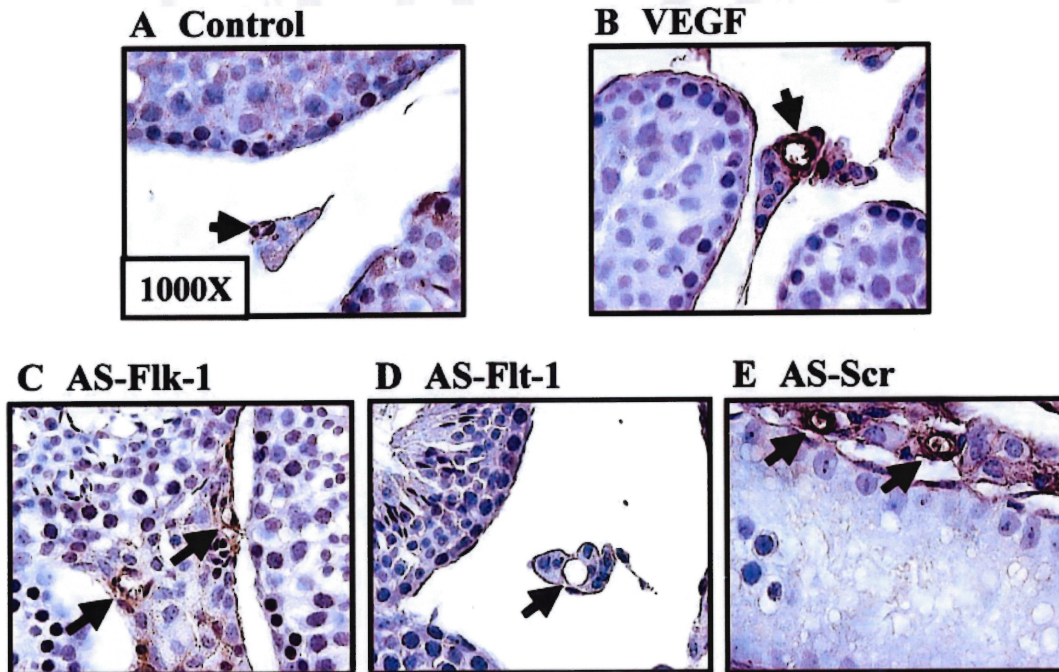


Fig. 7. Positive Flt-1 protein expression on vascular endothelial cells was detected by immunohistochemistry (cells stained in brown; arrow). Basal expression in control sham-operated mice (A); VEGF infusion maintained the level of Flt-1 protein expression (B); a treatment with AS-Flk-1 did not alter Flt-1 protein expression (C); a treatment with AS-Flt-1 prevented Flt-1 protein expression (D); whereas a Scr oligomer did not alter the vascular Flt-1 protein expression (E) (magnification  $\times 1,000$ ).

mation of new capillary-like blood vessels with a normal blood flow. In addition, we assessed that a treatment with AS directed against the mRNA of VEGF receptors Flk-1 or Flt-1 for a period of 14 days abrogated almost completely the VEGF-mediated angiogenesis. These results suggest that both VEGF receptors Flk-1 and Flt-1 are essential for VEGF *in vivo* angiogenic activity. Our results are in agreement with previous reports, in which the importance of VEGF receptors in vascular development has been illustrated using gene-targeting approaches. Indeed, targeted disruption of either Flt-1 or Flk-1 gene expression in mice prevents normal vascularization and embryonic development leading to embryonic lethality, but the two knockouts have distinctive phenotypes (62). For instance, Flk-1-deficient mice produce neither differentiated endothelial cells nor organized blood vessels and also possess no hematopoietic precursors, suggesting that this receptor is essential for development of both endothelial and hematopoietic precursors (56). In contrast, the Flt-1 knockout mice possess mature differentiated endothelial cells but have large, disorganized vessels (20). Stimulation of either receptor by VEGF triggers their phosphorylation, although the tyrosine kinase activity of Flt-1 is usually weak, about 10 times less than Flk-1 kinase, and in absence of serum starvation, VEGF-dependent Flt-1-phosphorylation is often difficult to detect (3, 55, 62). Transfection of the human Flt-1 or the Flk-1 receptor cDNA in cells that do not normally express VEGFR demonstrated that the ability of VEGF to stimulate proliferation, migration, and actin reorganization is mediated by Flk-1 but not Flt-1 (55, 62). *In vivo* VEGF-mediated vascular permeability increases are also Flk-1 dependent (32, 63). The role of Flt-1 in angiogenesis is less clear. It has recently been shown that homozygote mice without the kinase domain of Flt-1 developed almost normal blood vessels (28). These results indicate that early in embryogenesis, the extracellular domain of Flt-1 is sufficient to rescue the lethal abnormality in Flt-1 null mutant mice (20). It is proposed (57) that the major role of Flt-1 is to negatively regulate the levels of endogenous VEGF by absorbing the ligand with the extracellular domain of Flt-1. Thus the lethality of Flt-1 deficient mice would not be due to the lack of some special signaling from Flt-1, but due to the lack of negatively regulation in the growth and differentiation of hemangioblasts (20, 57). In mature animals, Flt-1 is localized to the endothelium in adult tissues (12, 42, 50, 53) and overexpressed in the vasculature of hypoxic tissues (24, 42, 60). Flt-1 activation by VEGF induces tissue factor expression and chemotaxis in monocytes; Flt-1 is also implicated in VEGF stimulation of urokinase and plasminogen activator inhibitor-1, and of metalloproteinase expression in smooth muscle cells (70). Stimulation of Flt-1 plays also a role in contact inhibition of endothelial cell growth and in endothelial cell assembly (6). All of these events support the hypothesis that Flt-1 activation is also essential to VEGF-mediated angiogenesis in mature animals.

We observed that VEGF can induce a vasodilation of blood vessels with a diameter of 20–100  $\mu\text{m}$ , such vasodilation was not observed in microvessels with a diameter  $<20 \mu\text{m}$ , this latter effect can be explained by the fact that these vessels ( $<20 \mu\text{m}$  diameter) are composed mainly of a monolayer of endothelial cells with no or sparse smooth muscle cells surrounding them, which would provide the capacity to modulate the vascular tone. What is even more interesting is that a treatment with the AS oligonucleotides against the mRNA of VEGF receptors Flk-1 or Flt-1 inhibited the vasodilation of preexisting blood vessels (20–100  $\mu\text{m}$  diameter) mediated by VEGF, whereas Scr oligomers had no such effect. This result shows that both VEGF receptors Flk-1 and Flt-1 are essential for VEGF vasodilatory effect. Previous studies (27, 61) have shown that VEGF induces a vasodilation of coronary arteries via the release of endothelial NO. Other reports have shown that NO may play a significant role in VEGF-mediated effects. NO release could mediate VEGF vascular permeability increase (45–47, 49, 64). In addition, NO may be directly involved in angiogenesis (31, 45, 49). On the other hand, other reports (23, 36–38, 48) have shown that the blockade of endogenous NO synthesis in endothelial cells is proinflammatory, can promote neutrophil-endothelial adhesion, vascular permeability and endothelial injury. Others have shown that NO has anti-angiogenic activity (51, 52), and that VEGF inflammatory and angiogenic effects are NO independent (7, 22, 39). These differences may depend on the level of NO production (48, 51). However, to the best of our knowledge, our study is the first one to establish under *in vivo* conditions the contribution of Flk-1 and Flt-1 on VEGF vasodilatory activity.

By immunohistochemistry analysis on testes sections, we confirmed that the AS oligonucleotides against the mRNA of Flk-1 and Flt-1 reduced selectively their corresponding protein expression, whereas the Scr oligomers did not alter the Flk-1 and Flt-1 protein expression. Nevertheless, because the use of AS oligomers targeting either Flk-1 or Flt-1 mRNA abrogated VEGF-vasodilatory effect, and that VEGF may mediate the release of NO, we performed an eNOS immunohistochemistry analysis to ensure that the AS oligomers did not directly or indirectly alter eNOS protein expression. Our study confirmed the eNOS protein expression on testes vasculature of control and VEGF-treated mice, and that neither the AS oligomers targeting Flt-1 or Flk-1 mRNA nor Scr oligomers altered the eNOS protein expression. These data confirm that the inhibition of VEGF-induced vasodilation and angiogenesis is not caused by the inhibition of vascular eNOS protein expression.

Despite the fact that VEGF induced solely a vasodilation of preexisting blood vessels with a diameter  $>20 \mu\text{m}$ , and that the diameter of the new blood vessels observed was  $<10 \mu\text{m}$ , we nevertheless wanted to confirm that the new blood vessels observed on a 14-day VEGF infusion was not due to the vasodilation of preexisting capillaries that could not be seen at *day 0* before VEGF treatment. To discard such a possibility,

AQ: 3



we infused VEGF for 14 days, then removed the miniosmotic pump, and collected additional images 3 days later (*day 17*). At *day 14*, we observed new blood vessels with a diameter  $<10\ \mu\text{m}$  and preexisting blood vessels with a diameter between 20 and  $100\ \mu\text{m}$  that were vasodilated compared with the diameter observed at *day 0*. Three days after the arrest of VEGF infusion (*day 17*), the vasodilatory effect of VEGF on preexisting blood vessels (20– $100\ \mu\text{m}$  diameter) could no longer be observed, but the new blood vessels observed at *day 14* were still present at *day 17* and their diameter was maintained ( $<10\ \mu\text{m}$ ). These data confirm that the new blood vessels observed at *day 14* were the result of VEGF-angiogenic activity in mouse testis.

In summary, the present study introduces a convenient and reproducible model which allows investigation of in vivo angiogenesis. By using AS oligonucleotides gene therapy, we have been able to downregulate the protein expression of Flk-1 and Flt-1, and in both cases we abrogated VEGF angiogenic activity. Therefore, our results suggest that the blockade of VEGF receptors expression by AS gene therapy may provide a new therapeutic approach to prevent diseases associated with pathological angiogenesis.

We thank Caroline Boucher and Véronique Philibert for technical assistance.

This study was supported by Medical Research Council of Canada Grant MT-14378, Canadian Institutes of Health Research Grant MOP-43919, and by a Heart and Stroke Foundation of Québec grant (to M. G. Sirois). M. G. Sirois is a recipient of a scholarship from the Heart and Stroke Foundation of Canada. G. S. Marchand is a recipient of a studentship from the Fonds pour la Formation de Chercheurs et d'Aide à la Recherche-Fonds de la Recherche en Santé du Québec foundation.

## REFERENCES

- Auerbach R, Auerbach W, and Polakowski I. Assays for angiogenesis: a review. *Pharmacol Ther* 51: 1–11, 1991.
- BenEzra D. Critical assessment of in vitro and in vivo assays of angiogenesis. In: *Angiogenesis: Models, Modulators and Clinical Applications*, edited by Maragoudakis M. New York: Plenum, 1998, p. 85–89.
- Bernatchez PN, Soker S, and Sirois MG. Vascular endothelial growth factor effect on endothelial cell proliferation, migration, and platelet-activating factor synthesis is Flk-1-dependent. *J Biol Chem* 274: 31047–31054, 1999.
- Bikfalvi A, Sauzeau C, Moukadiri H, Maclouf J, Busso N, Bryckaert M, Plouet J, and Tobelem G. Interaction of vasculotropin/vascular endothelial cell growth factor with human umbilical vein endothelial cells: binding, internalization, degradation, and biological effects. *J Cell Physiol* 149: 50–59, 1991.
- Brock TA, Dvorak HF, and Senger DR. Tumor-secreted vascular permeability factor increases cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  and von Willebrand factor release in human endothelial cells. *Am J Pathol* 138: 213–221, 1991.
- Carmeliet P and Collen D. Transgenic mouse models in angiogenesis and cardiovascular disease. *J Pathol* 190: 387–405, 2000.
- Cohen AW, Gratrix ML, and Schaeffer RC. VEGF-induced prolonged small “pore” endothelial barrier dysfunction is nitric oxide-independent (Abstract). *FASEB J* 13: A5, 1999.
- Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, Olander JV, Eppley BL, Delfino JJ, Siegel NR, Leimgruber RM, and Feder J. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest* 84: 1470–1478, 1989.
- Dougher M and Terman BI. Autophosphorylation of KDR in the kinase domain is required for maximal VEGF-stimulated kinase activity and receptor internalization. *Oncogene* 18: 1619–1627, 1999.
- Edelman ER, Simons M, Sirois MG, and Rosenberg RD. C-myc in vasculoproliferative disease. *Circ Res* 76: 176–182, 1995.
- Engler DA. Use of vascular endothelial growth factor for therapeutic angiogenesis. *Circulation* 94: 1496–1498, 1996.
- Ergun S, Kilic N, Fiedler W, and Mukhopadhyay AK. Vascular endothelial growth factor and its receptors in normal human testicular tissue. *Mol Cell Endocrinol* 131: 9–20, 1997.
- Ferrara N and Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 18: 4–25, 1997.
- Ferrara N and Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 161: 851–858, 1989.
- Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1: 27–31, 1995.
- Folkman J. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 333: 1757–1763, 1995.
- Folkman J and D'Amore PA. Blood vessel formation: what is its molecular basis? *Cell* 87: 1153–1155, 1996.
- Folkman J, Haudenschild CC, and Zetter BR. Long-term culture of capillary endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 5217–5221, 1979.
- Folkman J and Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 235: 442–447, 1987.
- Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, and Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 376: 66–70, 1995.
- Fromer CH and Klintworth GK. An evaluation of the role of leukocytes in the pathogenesis of experimentally induced corneal vascularization. *Am J Pathol* 79: 537–554, 1975.
- Fukumura D, Gohongi T, Ang J, Huang PL, and Jain RK. Role of type II and III NOS in VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability (Abstract). *FASEB J* 13: A9, 1999.
- Gaboury J, Woodman RC, Granger DN, Reinhardt P, and Kubes P. Nitric oxide prevents leukocyte adherence: role of superoxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 265: H862–H867, 1993.
- Gerber HP, Condorelli F, Park J, and Ferrara N. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not flk-1/KDR, is upregulated by hypoxia. *J Biol Chem* 272: 23659–23667, 1997.
- Gilbert RE, Vranes D, Berka JL, Kelly DJ, Cox A, Wu LL, Stacker SA, and Cooper ME. Vascular endothelial growth factor and its receptors in control and diabetic rat eyes. *Lab Invest* 78: 1017–1027, 1998.
- Gross JL, Moscatelli D, and Rifkin DB. Increased capillary endothelial cell protease activity in response to angiogenic stimuli in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 2623–2627, 1983.
- Hariawala MD, Horowitz JR, Esakof D, Sheriff DD, Walter DH, Keyt B, Isner JM, and Symes JF. VEGF improves myocardial blood flow but produces EDRF-mediated hypotension in porcine hearts. *J Surg Res* 63: 77–82, 1996.
- Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J, Noda T, and Shibuya M. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 9349–9354, 1998.
- Hood JD, Meininger CJ, Ziche M, and Granger HJ. VEGF upregulates eNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 274: H1054–H1058, 1998.
- Jackson JR, Seed MP, Kircher CH, Willoughby DA, and Winkler JD. The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. *FASEB J* 11: 457–465, 1997.
- Jadeski LC and Lala PK. Nitric oxide synthase inhibition by  $\text{N}^G$ -nitro-L-arginine methyl ester inhibits tumor-induced angiogenesis in mammary tumors. *Am J Pathol* 155: 1381–1390, 1999.
- Joukov V, Sorsa T, Kumar V, Jeltsch M, Claesson-Welsh L, Cao Y, Saksela O, Kalkkinen N, and Alitalo K. Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. *EMBO J* 16: 3898–3911, 1997.

33. Kitajima I, Unoki K, and Maruyama I. Phosphorothioate oligodeoxynucleotides inhibit basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis in vitro and in vivo. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 9: 233-239, 1999.
34. Knighton DR, Fiegel VD, and Phillips GD. The assay of angiogenesis. *Prog Clin Biol Res* 365: 291-299, 1991.
35. Ku DD, Zaleski JK, Liu S, and Brock TA. Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 265: H586-H592, 1993.
36. Kubes P, Kurose I, and Granger DN. NO donors prevent integrin-induced leukocyte adhesion but not P-selectin-dependent rolling in postischemic venules. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 267: H931-H937, 1994.
37. Kubes P, Suzuki M, and Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 4651-4655, 1991.
38. Kurose I, Kubes P, Wolf R, Anderson DC, Paulson J, Miyasaka M, and Granger DN. Inhibition of nitric oxide production. Mechanisms of vascular albumin leakage. *Circ Res* 73: 164-171, 1993.
39. Lee PC, Billiar TR, Watkins SC, Griffith BP, and Shears LL. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) is not required for vascular endothelial growth factor (VEGF) induced angiogenesis (Abstract). *FASEB J* 13: A1007, 1999.
40. Levy AP, Tamargo R, Brem H, and Nathans D. An endothelial cell growth factor from the mouse neuroblastoma cell line NB41. *Growth Factors* 2: 9-19, 1989.
41. Li CH, Shan S, Huang Q, Braun RD, Lanzen J, Hu K, Lin P, and Dewhirst MW. Initial stages of tumor cell-induced angiogenesis: evaluation via skin window chambers in rodent models. *J Natl Cancer Inst* 92: 143-147, 2000.
42. Li J, Brown LF, Hibber MG, Grossman JD, Morgan JP, and Simons M. VEGF, flk-1, and flt-1 expression in a rat myocardial infarction model of angiogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 270: H1803-H1811, 1996.
43. Mirshahi F, Pourtau J, Li H, Muraine M, Trochon V, Legrand E, Vannier J, Soria J, Vasse M, and Soria C. SDF-1 activity on microvascular endothelial cells. Consequences on angiogenesis in in vitro and in vivo models. *Thromb Res* 99: 587-594, 2000.
44. Mochida S, Ishikawa K, Inao M, Shibuya M, and Fujiwara K. Increased expressions of vascular endothelial growth factor and its receptors, flt-1 and KDR/flk-1, in regenerating rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 226: 176-179, 1996.
45. Montrucchio G, Lupia E, de Martino A, Battaglia E, Arese M, Tizzani A, Bussolino F, and Camussi G. Nitric oxide mediates angiogenesis induced in vivo by platelet-activating factor and tumor necrosis factor-alpha. *Am J Pathol* 151: 557-563, 1997.
46. Morbidelli L, Chang CH, Douglas JG, Granger HJ, Ledda F, and Ziche M. Nitric oxide mediates mitogenic effect of VEGF on coronary venular endothelium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 270: H411-H415, 1996.
47. Murohara T, Horowitz JR, Silver M, Tsurumi Y, Chen D, Sullivan A, and Isner JM. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin. *Circulation* 97: 99-107, 1998.
48. Okayama N, Ichikawa H, Coe L, Itoh M, and Alexander JS. Exogenous NO enhances hydrogen peroxide-mediated neutrophil adherence to cultured endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 274: L820-L826, 1998.
49. Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Madri JA, and Sessa WC. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest* 100: 3131-3139, 1997.
50. Peters KG, De Vries C, and Williams LT. Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggests a role in endothelial differentiation and blood vessel growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 8915-8919, 1993.
51. Pipili-Synetos E, Kritikou S, Papadimitriou E, Athanassiadou A, Flordellis C, and Maragoudakis ME. Nitric oxide synthase expression, enzyme activity and NO production during angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane. *Br J Pharmacol* 129: 207-213, 2000.
52. Pipili-Synetos E, Sakkoula E, and Maragoudakis ME. Nitric oxide is involved in the regulation of angiogenesis. *Br J Pharmacol* 108: 855-857, 1993.
53. Quinn TP, Peters KG, De Vries C, Ferrara N, and Williams LT. Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 7533-7537, 1993.
54. Rahimi N, Dayanir V, and Lashkari K. Receptor chimeras indicate that the vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) modulates mitogenic activity of VEGFR-2 in endothelial cells. *J Biol Chem* 275: 16986-16992, 2000.
55. Seetharam L, Gotoh N, Maru Y, Neufeld G, Yamaguchi S, and Shibuya M. A unique signal transduction from FLT tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor VEGF. *Oncogene* 10: 135-147, 1995.
56. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, and Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376: 62-66, 1995.
57. Shibuya M. Structure and dual function of vascular endothelial growth factor receptor-1 (Flt-1). *Int J Biochem Cell Biol* 33: 409-420, 2001.
58. Sirois MG, Simons M, and Edelman ER. Antisense oligonucleotide inhibition of PDGF- $\beta$  receptor subunit expression directs suppression of intimal thickening. *Circulation* 95: 669-676, 1997.
59. Terman BI and Dougher-Vermazen M. Biological properties of VEGF/VPF receptors. *Cancer Metastasis Rev* 2: 159-163, 1996.
60. Tuder RM, Flook BE, and Voelkel NF. Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk and Flt in lungs exposed to acute or to chronic hypoxia. Modulation of gene expression by nitric oxide. *J Clin Invest* 95: 1798-1807, 1995.
61. Van der Zee R, Murohara T, Luo Z, Zollmann F, Passeri J, Lekutat C, and Isner JM. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor augments nitric oxide release from quiescent rabbit and human vascular endothelium. *Circulation* 95: 1030-1037, 1997.
62. Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, and Heldin CH. Different signal transduction properties of KDR and Flt-1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 269: 26988-26995, 1994.
63. Witzienbichler B, Asahara T, Murohara T, Silver M, Spyridopoulos I, Magner M, Principe N, Kearney M, Hu JS, and Isner JM. Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C/VEGF-2) promotes angiogenesis in the setting of tissue ischemia. *Am J Pathol* 153: 381-394, 1998.
64. Wu HM, Huang Q, Yuan Y, and Granger HJ. VEGF induces NO-dependent hyperpermeability in coronary venules. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 271: H2735-H2739, 1996.
65. Yang R, Thomas GR, Bunting S, Ko A, Ferrara N, Keyt B, Ross J, and Jin H. Effects of vascular endothelial growth factor on hemodynamics and cardiac performance. *J Cardiovasc Pharmacol* 27: 838-844, 1996.
66. Yao L, Pike SE, Setsuda J, Parekh J, Gupta G, Raffeld M, Jaffe ES, and Tosato G. Effective targeting of tumor vasculature by the angiogenesis inhibitors vasostatin and interleukin-12. *Blood* 96: 1900-1905, 2000.
67. Zachary I. Signaling mechanisms mediating vascular protective actions of vascular endothelial growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol* 280: C1375-C1386, 2001.
68. Zetter BR. Migration of capillary endothelial cells is stimulated by tumour-derived factors. *Nature* 285: 41-43, 1979.
69. Zhu Z and Witte L. Inhibition of tumor growth and metastasis by targeting tumor-associated angiogenesis with antagonists to the receptors of vascular endothelial growth factor. *Invest New Drugs* 17: 195-212, 1999.
70. Ziche M, Morbidelli R, Choudhuri R, Zhang HT, Donnini S, Granger HJ, and Bicknell R. Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *J Clin Invest* 99: 2625-2634, 1997.

## 3 Discussion

### 3.1 La nécessité de développer un nouveau modèle permettant l'étude de l'angiogenèse *in vivo*

Un des principaux problèmes dans la recherche en angiogenèse est la difficulté de trouver un modèle adéquat pour évaluer la réponse angiogénique [321]. Afin de réaliser les expériences présentées dans ce mémoire, nous avons développé dans notre laboratoire un modèle *in vivo* permettant d'étudier l'angiogenèse au niveau du testicule de souris. Plusieurs modèles *in vitro* et *in vivo* présentant différents avantages et inconvénients ont été développés au cours des dernières années afin d'étudier le processus angiogénique. De façon générale, la principale limite des modèles *in vitro* est la non-disponibilité de sources de cellules endothéliales de la microcirculation et la difficulté de mimer parfaitement les conditions observées en conditions *in vivo* [321]. En ce qui concerne les modèles *in vivo*, ils sont difficiles à quantifier et à effectuer [321]. De plus, le site où est induit l'angiogenèse n'est souvent pas représentatif de la réalité [321].

Les avantages d'utiliser un modèle *in vitro* sont qu'il est possible de contrôler les variables expérimentales et de suivre les différents événements constituant ce processus [293]. Également, il est possible avec les modèles *in vitro* de disséquer le processus angiogénique en ses différentes composantes [293]. De plus, ces modèles sont de plus faibles coûts et sont plus facilement réalisables que les modèles *in vivo* [293]. Toutefois, le milieu de culture, le substrat de matrigel ou de collagène, l'origine et le passage des cellules endothéliales utilisées ainsi que les facteurs angiogéniques dans les modèles *in vitro* ne sont pas suffisamment normalisés, faisant en sorte qu'il n'est pas possible de faire des

comparaisons entre les résultats quantitatifs obtenus dans différents laboratoires [293]. De plus, toutes les cellules endothéliales ne sont pas pareilles et réagissent différemment aux facteurs de croissance et aux inhibiteurs de l'angiogenèse selon la source dont elles proviennent [307]. En effet, les cellules endothéliales microvasculaires impliquées dans l'angiogenèse diffèrent entre elles et à travers les différents organes et vaisseaux sanguins [307]. Un autre aspect important à considérer lorsque nous utilisons des modèles *in vitro*, et particulièrement lorsque nous testons des molécules anti-angiogéniques, est que les cellules endothéliales sont fragiles. En fait, le moindre changement de pH ou de l'osmolarité peut être cytotoxique pour les cellules endothéliales [321]. Finalement, un fait important à considérer est qu'une molécule pouvant stimuler ou inhiber la prolifération ou la migration *in vitro* ne pourra pas nécessairement faire de même *in vivo* [321]. Il est donc important d'être très prudent lorsque nous extrapolons des résultats obtenus *in vitro* vers une situation *in vivo*. Les modèles *in vitro* ne reflètent donc pas nécessairement ce qui se produit *in vivo* et il est essentiel de pouvoir valider les observations faites *in vitro* dans des modèles *in vivo*. Pour cette raison, beaucoup de modèles *in vivo* ont été développés, toutefois ces derniers possèdent également des limites.

Un des modèles d'angiogenèse *in vivo* se fait au niveau de la cornée chez des souris. Ce modèle permet de mesurer seulement les nouveaux vaisseaux sanguins puisque c'est un milieu normalement avasculaire [321]. Aussi, ce modèle est utile pour l'étude d'inducteurs et d'inhibiteurs d'angiogenèse que nous administrons oralement, de façon topique ou encore de façon systémique [321]. Toutefois, étant donné que la cornée est un milieu normalement avasculaire, elle ne contient donc pas les facteurs sanguins qui pourraient influencer la survie des cellules endothéliales. Aussi, la manipulation chirurgicale qu'implique ce modèle est plutôt difficile [321].

En ce qui concerne les modèles *in vivo* utilisant des chambres contenant des cellules, des tissus ou des éponges, ils permettent d'observer les changements progressifs se produisant au niveau de la vasculature entourant le stimulus angiogénique [31, 94, 322]. Toutefois, l'installation de la chambre et les observations subséquentes sont longues et difficiles à effectuer [321]. De plus, la manipulation chirurgicale étant assez complexe, elle peut induire des effets vasculaires reliés à la réparation tissulaire et qui peuvent influencer l'effet des molécules angiogéniques et anti-angiogéniques [321].

Un autre modèle *in vivo* beaucoup plus utilisé est celui qui se fait au niveau de la membrane chorioallantoïque chez le poulet. Ce modèle présente également certaines limites. En effet, il est difficile d'effectuer les manipulations sans toucher la membrane ce qui a pour effet de causer une réponse angiogénique non spécifique à l'agent que l'on veut tester [321]. De plus, un des problèmes majeurs avec ce modèle est la difficulté de quantifier avec précision la réponse angiogénique puisque nous sommes en condition d'embryogénèse. En effet, il s'avère difficile de distinguer les nouveaux vaisseaux se formant à partir de vaisseaux sanguins préexistants des vaisseaux se formant *de novo* (embryogénèse) [321].

Donc, malgré que plusieurs modèles *in vivo* aient été développés pour étudier l'angiogénèse, la plupart présentent différents désavantages qui limitent leur utilisation dans les études d'angiogénèse. De plus, ce sont les modèles *in vivo* qui présentent le plus d'informations quantitatives, mais ces modèles sont coûteux et difficiles à effectuer. Pour ces raisons, nous avons développé un nouveau modèle permettant d'étudier l'angiogénèse au niveau du testicule de souris.

Notre modèle permet d'induire l'angiogénèse à l'aide de facteurs de croissance insérés dans une mini-pompe osmotique qui libère l'agent de

façon graduelle sur une période de temps désirée jusqu'à 28 jours. La technique est relativement économique, reproductible, facile à effectuer et ne cause pas d'inflammation au site angiogénique. Également, c'est un modèle qui se fait chez des mammifères et qui permet une réponse angiogénique modérée qui est facilement quantifiable. De plus, il est possible de vérifier l'efficacité de différents agents anti-angiogéniques qui peuvent être administrés par voie orale, intra-veineuse ou encore à l'aide de mini-pompes osmotiques comme c'est le cas dans la présente étude. Également, il est possible de suivre la progression de l'angiogenèse dans le temps par une simple chirurgie qui permet d'observer le testicule que l'on réinsère ensuite en son endroit initial.

### **3.2 Le VEGF induit la formation de nouveaux vaisseaux sanguins *in vivo* de façon dose dépendante**

Le VEGF est bien connu pour induire l'angiogenèse dans différents modèles *in vivo*. Le VEGF est un puissant stimulateur de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales *in vitro* et de l'angiogenèse *in vivo*. Dans notre modèle au niveau du testicule de souris, on observe également qu'un traitement avec le VEGF cause une augmentation de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins par rapport à un traitement témoin avec du PBS. Le VEGF induit la formation de nouveaux vaisseaux sanguins de façon dose dépendante. La concentration de 1 µg de VEGF ne cause toutefois pas d'augmentation suffisante de vaisseaux sanguins dans l'aire de testicule étudiée et ne permet donc pas une quantification adéquate. La concentration de 2.5 µg de VEGF libérée sur une période de 14 jours induit une augmentation modérée du nombre de vaisseaux sanguins permettant ainsi une quantification adéquate. C'est pour cette raison que cette concentration a été sélectionnée pour poursuivre les expériences au niveau de notre modèle de testicule de souris. Quant à la concentration de 5 µg de VEGF, elle cause une trop grande augmentation

de vaisseaux sanguins dans l'aire de testicule étudiée rendant la quantification difficile et imprécise. De plus, mentionnons que les nouveaux vaisseaux sanguins formés ont un diamètre moyen d'environ 8  $\mu\text{m}$  et une longueur moyenne d'environ 300  $\mu\text{m}$  ce qui est caractéristique des capillaires sanguins.

### **3.3 Inhibition de l'angiogenèse *in vivo* avec des antisens dirigés contre les récepteurs Flk-1 et Flt-1**

Après avoir déterminé notre concentration adéquate de VEGF (2.5  $\mu\text{g}$ ), nous avons infusé avec ce facteur de croissance, des AS dirigés contre l'ARNm des récepteurs Flk-1 ou Flt-1. L'ajout d'AS-Flk-1 ou d'AS-Flt-1 au VEGF a inhibé dans les deux cas l'angiogenèse induite suite à l'infusion de VEGF seulement. Ceci nous indique donc que ces deux récepteurs du VEGF sont nécessaires pour induire l'angiogenèse *in vivo*. Ceci n'est pas surprenant puisque le récepteur Flk-1 est responsable de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales [153, 154] alors que le récepteur Flt-1 est impliqué dans l'assemblage des cellules endothéliales en structures tubulaires qui formeront des vaisseaux sanguins [168]. Les deux récepteurs sont donc responsables de différents événements essentiels à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Ainsi, l'inhibition des activités engendrées par l'un ou l'autre des récepteurs du VEGF empêche la formation de vaisseaux sanguins.

### **3.4 Avantages de cibler les récepteurs du VEGF**

Plusieurs évidences suggèrent que l'inhibition des récepteurs du VEGF serait une excellente cible anti-angiogénique. En effet, l'inactivation du récepteur Flk-1 inhibe la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, la croissance tumorale et la formation de métastases [46, 48, 168, 243, 323].

De plus, l'activation du récepteur Flk-1 est responsable de la réponse inflammatoire induite par le VEGF via la synthèse du PAF [4]. Le récepteur Flk-1 est celui qui est le plus souvent ciblé dans la thérapie anti-angiogénique car il est exprimé presque exclusivement sur les cellules endothéliales activées telles que celles présentes aux sites tumoraux alors que le récepteur Flt-1 est exprimé tant sur les cellules quiescentes que sur les cellules en prolifération [69, 200, 202, 262]. Ainsi, des agents ciblant le récepteur Flk-1 permettent une plus grande spécificité comparativement aux autres agents anti-tumoraux [152]. Des inhibiteurs contre Flk-1 ont également un accès facile à leur cible puisque l'endothélium tumoral est en contact direct avec le sang [152].

Le fait de cibler le récepteur Flk-1 par rapport au VEGF lui-même présente certains avantages. Tout d'abord, le récepteur Flk-1 est présent à la surface des cellules endothéliales (statique) alors que le VEGF est sécrété par différentes cellules de l'espace interstitiel des tissus ainsi que par des cellules inflammatoires migrant du sang vers l'interstitium (non-statique) faisant en sorte que le VEGF est souvent inaccessible aux agents thérapeutiques [152, 324]. Également, le nombre de récepteurs Flk-1 sur les cellules endothéliales activées permet de saturer les récepteurs avec une quantité raisonnable d'antagonistes. Le VEGF est quant à lui exprimé en grande quantité dans certaines conditions comme l'hypoxie [152]. Finalement, des agents ciblant Flk-1 permettent de bloquer non seulement les effets du VEGF mais également ceux du VEGF-C et du VEGF-D qui sont des ligands du récepteur Flk-1 alors que des agents ciblant le VEGF bloquent seulement l'action de la forme du VEGF ciblée [152].



### **3.5 Avantages d'utiliser des AS ciblant les récepteurs Flk-1 et Flt-1 comme thérapie anti-angiogénique**

Au cours de cette étude, nous avons utilisé la thérapie génique par AS qui procure divers avantages. Tout d'abord, les AS contre les récepteurs Flk-1 et Flt-1 utilisés dans la présente étude ont démontré une très bonne efficacité avec une inhibition de plus de 85% de l'angiogénèse. Également, l'utilisation d'AS permet une liaison spécifique à la séquence d'ARNm des récepteurs Flk-1 et Flt-1. La thérapie génique par antisens est donc beaucoup plus spécifique que les thérapies anti-angiogéniques conventionnelles. De plus, avec l'utilisation d'AS, il se développe peu ou pas de résistance étant donné la grande stabilité génétique des cellules endothéliales. Également, cette thérapie démontre très peu de toxicité comparativement à d'autres thérapie anti-angiogéniques.

### **3.6 Inhibition de l'effet dilatateur du VEGF à l'aide d'antisens contre les récepteurs Flk-1 et Flt-1**

Le VEGF possède également un effet dilatateur au niveau des vaisseaux sanguins [52]. Dans notre modèle au niveau du testicule de souris, nous avons observé que le VEGF cause la dilatation des vaisseaux sanguins préexistants de plus de 20  $\mu\text{m}$  de diamètre. Le VEGF ne cause toutefois pas de variation de diamètre des vaisseaux sanguins préexistants de moins de 20  $\mu\text{m}$  de diamètre. Ceci est dû au fait que ces plus petits vaisseaux sanguins sont dépourvus de cellules musculaires lisses qui permettraient leur changement de diamètre. L'effet dilatateur du VEGF est inhibé lorsque l'on ajoute des AS dirigés contre l'ARNm des récepteurs Flk-1 ou Flt-1. Ceci démontre une fois de plus, que les deux récepteurs du VEGF sont nécessaires pour induire l'effet dilatateur du VEGF *in vivo*.

### 3.7 Nécessité d'étudier l'angiogenèse à 14 et à 17 jours

Nous avons observé dans notre modèle que le VEGF cause la dilatation des vaisseaux sanguins préexistants de plus de 20  $\mu\text{m}$  de diamètre. Suite à cette observation, nous nous sommes demandés si les nouveaux vaisseaux sanguins que nous avons observés après 14 jours de traitement au VEGF, ne pourraient pas être le résultat de l'effet dilatateur du VEGF sur des petits vaisseaux sanguins contractés et donc non visibles en absence de VEGF. Afin de confirmer que nous étions bien en présence de nouveaux vaisseaux sanguins, nous avons fait une série d'expériences où le VEGF était infusé pendant 14 jours comme précédemment. Toutefois, au jour 14, la pompe contenant le VEGF était retirée et l'angiogenèse évaluée au jour 17, soit 3 jours post-VEGF. Les nouveaux vaisseaux sanguins qui avaient été observés au jour 14 étaient toujours présents au jour 17. Toutefois, l'effet dilatateur sur les vaisseaux sanguins préexistants de plus de 20  $\mu\text{m}$  était absent au jour 17. Ceci nous démontrait que les vaisseaux sanguins observés au jour 14 suite à l'infusion de VEGF étaient réellement des nouveaux vaisseaux sanguins et non pas le résultat de l'effet dilatateur du VEGF.

### 3.8 Études immunohistochimiques

Afin de confirmer que l'utilisation d'AS avait réellement réduit l'expression des protéines des récepteurs Flk-1 et Flt-1, des études immunohistochimiques ont été effectuées. Sur les testicules traités avec un AS-Flk-1, on observe une réduction de l'expression du récepteur Flk-1 alors que l'expression est présente et inchangée dans les testicules non-traités (témoin) ou traités avec VEGF, AS-Flt-1 ou AS-dégénéré (AS-scrambled). En ce qui concerne l'expression du récepteur Flt-1, elle est réduite dans les testicules traités avec un AS-Flt-1 et est présente et

inchangée dans les testicules non-traités (témoin) ou traités avec VEGF, AS-Flk-1 ou AS-dégénéré (AS-scrambled).

Une détection immunohistochimique de eNOS a également été effectuée. Ceci avait pour but de vérifier que l'inhibition de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins observés avec les AS n'était pas causée par une diminution de l'expression de eNOS, l'enzyme responsable de la formation de NO au niveau des cellules endothéliales. Dans les testicules non-traités et traités avec VEGF ou les AS-Flk-1, AS-Flt-1 et AS-dégénérés, on observe aucune baisse de l'expression de eNOS ce qui confirme que l'inhibition de l'angiogenèse n'est pas causée par une inhibition non spécifique de eNOS. De plus, ces résultats démontrent que la baisse de vasodilatation induite par le VEGF en présence des AS contre les récepteurs Flk-1 et Flt-1 n'est pas attribuable à une baisse d'expression de la protéine eNOS.

## 4 Conclusion

Depuis les 30 dernières années, beaucoup de recherche a été effectuée sur le processus de l'angiogenèse. Les molécules impliquées ainsi que les étapes nécessaires au processus sont maintenant bien connues. De plus, plusieurs méthodes ont été développées pour promouvoir l'angiogenèse dans des conditions d'ischémie du myocarde ou des membres ainsi que pour inhiber l'angiogenèse dans des conditions associées à une néovascularisation excessive telles que dans la progression tumorale, les rétinopathies, l'arthrite rhumatoïde et le psoriasis.

Au cours de ce projet de maîtrise, nous avons vérifié si l'utilisation de la thérapie génique bloquant l'expression des récepteurs du VEGF pourrait inhiber l'angiogenèse *in vivo*. Des antisens ciblant l'ARNm des récepteurs Flk-1 et Flt-1 ont inhibé l'expression protéique de ces récepteurs et l'angiogenèse induite par le VEGF dans un modèle *in vivo* au niveau du testicule de souris. Ces AS ont également inhibé l'effet dilatateur du VEGF sur les vaisseaux préexistants de plus de 20 $\mu$ m de diamètre. Ces résultats démontrent que les deux récepteurs, Flk-1 et Flt-1, sont nécessaires pour induire l'angiogenèse et causer l'effet dilatateur du VEGF. La thérapie génique inhibant l'expression des récepteurs du VEGF peut donc être considérée comme une stratégie thérapeutique pour les pathologies associées à une néovascularisation excessive.

## 5 Bibliographie

1. Folkman, J., *Tumor angiogenesis: therapeutic implications*. N Engl J Med, 1971. 285(21): p. 1182-6.
2. Senger, D.R., *et al.*, *Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid*. Science, 1983. 219(4587): p. 983-5.
3. Taylor, S. and J. Folkman, *Protamine is an inhibitor of angiogenesis*. Nature, 1982. 297(5864): p. 307-12.
4. Bernatchez, P.N., S. Soker, and M.G. Sirois, *Vascular endothelial growth factor effect on endothelial cell proliferation, migration, and platelet-activating factor synthesis is Flk-1-dependent*. J Biol Chem, 1999. 274(43): p. 31047-54.
5. Carmeliet, P. and R.K. Jain, *Angiogenesis in cancer and other diseases*. Nature, 2000. 407(6801): p. 249-57.
6. Risau, W., *Mechanisms of angiogenesis*. Nature, 1997. 386(6626): p. 671-4.
7. Savona, C., *et al.*, *[Angiogenesis and neoangiogenesis]*. Rev Prat, 1997. 47(20): p. 2239-43.
8. Folkman, J., *Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis [see comments]*. N Engl J Med, 1995. 333(26): p. 1757-63.
9. Pepper, M.S., *Positive and negative regulation of angiogenesis: from cell biology to the clinic*. Vasc Med, 1996. 1(4): p. 259-66.
10. Pepper, M.S., *Manipulating angiogenesis. From basic science to the bedside*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997. 17(4): p. 605-19.
11. Folkman, J. and Y. Shing, *Angiogenesis*. J Biol Chem, 1992. 267(16): p. 10931-4.
12. Buschmann, I. and W. Schaper, *The pathophysiology of the collateral circulation (arteriogenesis)*. J Pathol, 2000. 190(3): p. 338-42.

13. Ware, J.A. and M. Simons, *Angiogenesis in ischemic heart disease*. Nat Med, 1997. 3 (2): p. 158-64.
14. Carmeliet, P. and D. Collen, *Transgenic mouse models in angiogenesis and cardiovascular disease*. J Pathol, 2000. 190(3): p. 387-405.
15. Maragoudakis, M.E., et al., *Effects of thrombin/thrombosis in angiogenesis and tumour progression [In Process Citation]*. Matrix Biol, 2000. 19(4): p. 345-51.
16. Dvorak, H.F., et al., *Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: an important mediator of angiogenesis in malignancy and inflammation*. Int Arch Allergy Immunol, 1995. 107(1-3): p. 233-5.
17. Maglione, D., et al., *Two alternative mRNAs coding for the angiogenic factor, placenta growth factor (PlGF), are transcribed from a single gene of chromosome 14*. Oncogene, 1993. 8(4): p. 925-31.
18. Paavonen, K., et al., *Novel human vascular endothelial growth factor genes VEGF-B and VEGF-C localize to chromosomes 11q13 and 4q34, respectively*. Circulation, 1996. 93(6): p. 1079-82.
19. Neufeld, G., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors*. Faseb J, 1999. 13(1): p. 9-22.
20. Pertovaara, L., et al., *Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells*. J Biol Chem, 1994. 269(9): p. 6271-4.
21. Li, J., et al., *Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by interleukin-1 beta in rat aortic smooth muscle cells*. J Biol Chem, 1995. 270(1): p. 308-12.
22. Brogi, E., et al., *Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only*. Circulation, 1994. 90(2): p. 649-52.
23. Namiki, A., et al., *Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells*. J Biol Chem, 1995. 270(52): p. 31189-95.

24. Maniscalco, W.M., *et al.*, *Vascular endothelial growth factor mRNA increases in alveolar epithelial cells during recovery from oxygen injury*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1995. 13(4): p. 377-86.
25. Gaudry, M., *et al.*, *Intracellular pool of vascular endothelial growth factor in human neutrophils*. *Blood*, 1997. 90(10): p. 4153-61.
26. McLaren, J., *et al.*, *Vascular endothelial growth factor is produced by peritoneal fluid macrophages in endometriosis and is regulated by ovarian steroids*. *J Clin Invest*, 1996. 98(2): p. 482-9.
27. Brenchley, P.E., *Angiogenesis in inflammatory joint disease: a target for therapeutic intervention [editorial]*. *Clin Exp Immunol*, 2000. 121(3): p. 426-9.
28. Vincenti, V., *et al.*, *Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3*. *Circulation*, 1996. 93(8): p. 1493-5.
29. Soker, S., *et al.*, *Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor*. *Cell*, 1998. 92(6): p. 735-45.
30. Ferrara, N., *Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor*. *J Mol Med*, 1999. 77(7): p. 527-43.
31. Houck, K.A., *et al.*, *The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA*. *Mol Endocrinol*, 1991. 5(12): p. 1806-14.
32. Poltorak, Z., *et al.*, *VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix*. *J Biol Chem*, 1997. 272(11): p. 7151-8.
33. Burchardt, M., *et al.*, *Expression of messenger ribonucleic acid splice variants for vascular endothelial growth factor in the penis of adult rats and humans*. *Biol Reprod*, 1999. 60(2): p. 398-404.
34. Whittle, C., *et al.*, *Heterogeneous vascular endothelial growth factor (VEGF) isoform mRNA and receptor mRNA expression in human glomeruli, and the identification of VEGF148 mRNA, a novel truncated splice variant*. *Clin Sci (Colch)*, 1999. 97(3): p. 303-12.

35. Tober, K.L., *et al.*, *Comparative expression of novel vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor transcripts in skin, papillomas, and carcinomas of v-Ha-ras Tg.AC transgenic mice and FVB/N mice.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. 247(3): p. 644-53.
36. Neufeld, G., *et al.*, *Similarities and differences between the vascular endothelial growth factor (VEGF) splice variants.* *Cancer Metastasis Rev*, 1996. 15(2): p. 153-8.
37. Soker, S., *et al.*, *Characterization of novel vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors on tumor cells that bind VEGF165 via its exon 7-encoded domain.* *J Biol Chem*, 1996. 271(10): p. 5761-7.
38. Ferrara, N. and T. Davis-Smyth, *The biology of vascular endothelial growth factor.* *Endocr Rev*, 1997. 18(1): p. 4-25.
39. Sharkey, A.M., *et al.*, *Expression of mRNA for vascular endothelial growth factor in human placenta.* *J Reprod Fertil*, 1993. 99(2): p. 609-15.
40. Jackson, M.R., *et al.*, *Localization of two angiogenic growth factors (PDECGF and VEGF) in human placentae throughout gestation.* *Placenta*, 1994. 15(4): p. 341-53.
41. Shweiki, D., *et al.*, *Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis.* *J Clin Invest*, 1993. 91(5): p. 2235-43.
42. Breier, G., *et al.*, *Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation.* *Development*, 1992. 114(2): p. 521-32.
43. Shifren, J.L., *et al.*, *In the human fetus, vascular endothelial growth factor is expressed in epithelial cells and myocytes, but not vascular endothelium: implications for mode of action.* *J Clin Endocrinol Metab*, 1994. 79(1): p. 316-22.
44. Kamat, B.R., *et al.*, *Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human granulosa and theca lutein cells. Role in corpus luteum development.* *Am J Pathol*, 1995. 146(1): p. 157-65.



45. Phillips, H.S., *et al.*, *Vascular endothelial growth factor is expressed in rat corpus luteum*. *Endocrinology*, 1990. 127(2): p. 965-7.
46. Carmeliet, P., *et al.*, *Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele*. *Nature*, 1996. 380(6573): p. 435-9.
47. Holash, J., S.J. Wiegand, and G.D. Yancopoulos, *New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF*. *Oncogene*, 1999. 18(38): p. 5356-62.
48. Ferrara, N., *et al.*, *Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene*. *Nature*, 1996. 380(6573): p. 439-42.
49. Gerber, H.P., V. Dixit, and N. Ferrara, *Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells*. *J Biol Chem*, 1998. 273(21): p. 13313-6.
50. Gerber, H.P., *et al.*, *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*, 1998. 273(46): p. 30336-43.
51. Sone, H., *et al.*, *Effects of intraocular or systemic administration of neutralizing antibody against vascular endothelial growth factor on the murine experimental model of retinopathy*. *Life Sci*, 1999. 65(24): p. 2573-80.
52. Dvorak, H.F., *et al.*, *Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis*. *Am J Pathol*, 1995. 146(5): p. 1029-39.
53. Kroll, J. and J. Waltenberger, *A novel function of VEGF receptor-2 (KDR): rapid release of nitric oxide in response to VEGF-A stimulation in endothelial cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. 265(3): p. 636-9.
54. Hood, J.D., *et al.*, *VEGF upregulates ecNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells*. *Am J Physiol*, 1998. 274(3 Pt 2): p. H1054-8.

55. Enholm, B., *et al.*, *Comparison of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and Ang-1 mRNA regulation by serum, growth factors, oncoproteins and hypoxia.* Oncogene, 1997. 14(20): p. 2475-83.
56. Ferrara, N., *Vascular endothelial growth factor. The trigger for neovascularization in the eye.* Lab Invest, 1995. 72(6): p. 615-8.
57. Levy, A.P., *et al.*, *Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia.* J Biol Chem, 1995. 270(22): p. 13333-40.
58. Shweiki, D., *et al.*, *Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: implications for tumor angiogenesis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. 92(3): p. 768-72.
59. Hashimoto, E., *et al.*, *Rapid induction of vascular endothelial growth factor expression by transient ischemia in rat heart.* Am J Physiol, 1994. 267(5 Pt 2): p. H1948-54.
60. Forsythe, J.A., *et al.*, *Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1.* Mol Cell Biol, 1996. 16(9): p. 4604-13.
61. Ikeda, E., *et al.*, *Hypoxia-induced transcriptional activation and increased mRNA stability of vascular endothelial growth factor in C6 glioma cells.* J Biol Chem, 1995. 270(34): p. 19761-6.
62. Dolecki, G.J. and D.T. Connolly, *Effects of a variety of cytokines and inducing agents on vascular permeability factor mRNA levels in U937 cells.* Biochem Biophys Res Commun, 1991. 180(2): p. 572-8.
63. Frelin, C., A. Ladoux, and G. D'Angelo, *Vascular endothelial growth factors and angiogenesis.* Ann Endocrinol (Paris), 2000. 61(1): p. 70-4.
64. Dvorak, H.F., *et al.*, *Induction of a fibrin-gel investment: an early event in line 10 hepatocarcinoma growth mediated by tumor-secreted products.* J Immunol, 1979. 122(1): p. 166-74.
65. Dvorak, H.F., *et al.*, *Fibrin gel investment associated with line 1 and line 10 solid tumor growth, angiogenesis, and fibroplasia in guinea pigs.* Role

- of cellular immunity, myofibroblasts, microvascular damage, and infarction in line 1 tumor regression.* J Natl Cancer Inst, 1979. 62(6): p. 1459-72.
66. Brown, L.F., *et al.*, *Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract.* Cancer Res, 1993. 53(19): p. 4727-35.
67. Brown, L.F., *et al.*, *Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in kidney and bladder carcinomas.* Am J Pathol, 1993. 143(5): p. 1255-62.
68. Plate, K.H., *et al.*, *Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo.* Nature, 1992. 359(6398): p. 845-8.
69. Brown, L.F., *et al.*, *Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer.* Hum Pathol, 1995. 26(1): p. 86-91.
70. Senger, D.R., *et al.*, *A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines.* Cancer Res, 1986. 46(11): p. 5629-32.
71. Rak, J., *et al.*, *Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis.* Cancer Res, 1995. 55(20): p. 4575-80.
72. Grugel, S., *et al.*, *Both v-Ha-Ras and v-Raf stimulate expression of the vascular endothelial growth factor in NIH 3T3 cells.* J Biol Chem, 1995. 270(43): p. 25915-9.
73. Okada, F., *et al.*, *Impact of oncogenes in tumor angiogenesis: mutant K-ras up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is necessary, but not sufficient for tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(7): p. 3609-14.

74. Kuzuya, M., *et al.*, *Induction of angiogenesis by smooth muscle cell-derived factor: possible role in neovascularization in atherosclerotic plaque.* J Cell Physiol, 1995. 164(3): p. 658-67.
75. Klagsbrun, M. and P.A. D'Amore, *Vascular endothelial growth factor and its receptors.* Cytokine Growth Factor Rev, 1996. 7(3): p. 259-70.
76. Frank, S., *et al.*, *Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing.* J Biol Chem, 1995. 270(21): p. 12607-13.
77. Olofsson, B., *et al.*, *Genomic organization of the mouse and human genes for vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) and characterization of a second splice isoform.* J Biol Chem, 1996. 271(32): p. 19310-7.
78. Olofsson, B., *et al.*, *Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(20): p. 11709-14.
79. Migdal, M., *et al.*, *Neuropilin-1 is a placenta growth factor-2 receptor.* J Biol Chem, 1998. 273(35): p. 22272-8.
80. Makinen, T., *et al.*, *Differential binding of vascular endothelial growth factor B splice and proteolytic isoforms to neuropilin-1.* J Biol Chem, 1999. 274(30): p. 21217-22.
81. Olofsson, B., *et al.*, *Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(6): p. 2576-81.
82. Joukov, V., *et al.*, *Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C.* J Cell Physiol, 1997. 173(2): p. 211-5.
83. Joukov, V., *et al.*, *Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C.* Embo J, 1997. 16(13): p. 3898-911.
84. Wilting, J., *et al.*, *VEGF121 induces proliferation of vascular endothelial cells and expression of flk-1 without affecting lymphatic vessels of chorioallantoic membrane.* Dev Biol, 1996. 176(1): p. 76-85.

85. Jeltsch, M., *et al.*, *Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice [published erratum appears in Science 1997 Jul 25;277(5325):463].* Science, 1997. 276(5317): p. 1423-5.
86. Oh, S.J., *et al.*, *VEGF and VEGF-C: specific induction of angiogenesis and lymphangiogenesis in the differentiated avian chorioallantoic membrane.* Dev Biol, 1997. 188(1): p. 96-109.
87. Witzendichler, B., *et al.*, *Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C/VEGF-2) promotes angiogenesis in the setting of tissue ischemia.* Am J Pathol, 1998. 153(2): p. 381-94.
88. Leibovich, S.J., *et al.*, *Production of angiogenic activity by human monocytes requires an L-arginine/nitric oxide-synthase-dependent effector mechanism.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91(10): p. 4190-4.
89. Morbidelli, L., *et al.*, *Nitric oxide mediates mitogenic effect of VEGF on coronary venular endothelium.* Am J Physiol, 1996. 270(1 Pt 2): p. H411-5.
90. Ziche, M., *et al.*, *Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P.* J Clin Invest, 1994. 94(5): p. 2036-44.
91. Farnebo, F., F. Piehl, and J. Lagercrantz, *Restricted expression pattern of vegf-d in the adult and fetal mouse: high expression in the embryonic lung.* Biochem Biophys Res Commun, 1999. 257(3): p. 891-4.
92. Avantiaggiato, V., *et al.*, *Embryonic expression pattern of the murine figf gene, a growth factor belonging to platelet-derived growth factor/vascular endothelial growth factor family.* Mech Dev, 1998. 73 (2): p. 221-4.
93. Orlandini, M., *et al.*, *Identification of a c-fos-induced gene that is related to the platelet-derived growth factor/vascular endothelial growth factor family.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(21): p. 11675-80.
94. Achen, M.G., *et al.*, *Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4).* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(2): p. 548-53.

95. Marconcini, L., *et al.*, *c-fos-induced growth factor/vascular endothelial growth factor D induces angiogenesis in vivo and in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(17): p. 9671-6.
96. Taipale, J., *et al.*, *Vascular endothelial growth factor receptor-3*. Curr Top Microbiol Immunol, 1999. 237: p. 85-96.
97. Lyttle, D.J., *et al.*, *Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus*. J Virol, 1994. 68(1): p. 84-92.
98. Meyer, M., *et al.*, *A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases*. Embo J, 1999. 18(2): p. 363-74.
99. Ogawa, S., *et al.*, *A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain*. J Biol Chem, 1998. 273(47): p. 31273-82.
100. Wise, L.M., *et al.*, *Vascular endothelial growth factor (VEGF)-like protein from orf virus NZ2 binds to VEGFR2 and neuropilin-1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(6): p. 3071-6.
101. Maglione, D., *et al.*, *Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. 88(20): p. 9267-71.
102. Hauser, S. and H.A. Weich, *A heparin-binding form of placenta growth factor (PlGF-2) is expressed in human umbilical vein endothelial cells and in placenta*. Growth Factors, 1993. 9(4): p. 259-68.
103. Park, J.E., *et al.*, *Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR*. J Biol Chem, 1994. 269(41): p. 25646-54.
104. Kahn, J., *et al.*, *Gene expression profiling in an in vitro model of angiogenesis*. Am J Pathol, 2000. 156(6): p. 1887-900.

105. Folkman, J. and M. Klagsbrun, *Angiogenic factors*. Science, 1987. 235(4787): p. 442-7.
106. Moscatelli, D., M. Presta, and D.B. Rifkin, *Purification of a factor from human placenta that stimulates capillary endothelial cell protease production, DNA synthesis, and migration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. 83(7): p. 2091-5.
107. Presta, M., *et al.*, *Basic fibroblast growth factor is released from endothelial extracellular matrix in a biologically active form*. J Cell Physiol, 1989. 140(1): p. 68-74.
108. Hughes, S.E. and P.A. Hall, *Overview of the fibroblast growth factor and receptor families: complexity, functional diversity, and implications for future cardiovascular research*. Cardiovasc Res, 1993. 27(7): p. 1199-203.
109. Hughes, S.E., D. Crossman, and P.A. Hall, *Expression of basic and acidic fibroblast growth factors and their receptor in normal and atherosclerotic human arteries*. Cardiovasc Res, 1993. 27(7): p. 1214-9.
110. Nakamura, T., *et al.*, *Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor*. Nature, 1989. 342(6248): p. 440-3.
111. Gherardi, E. and M. Stoker, *Hepatocyte growth factor--scatter factor: mitogen, motogen, and met*. Cancer Cells, 1991. 3(6): p. 227-32.
112. Hayashi, S., *et al.*, *Autocrine-paracrine effects of overexpression of hepatocyte growth factor gene on growth of endothelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. 220(3): p. 539-45.
113. Sonnenberg, E., *et al.*, *Scatter factor/hepatocyte growth factor and its receptor, the c-met tyrosine kinase, can mediate a signal exchange between mesenchyme and epithelia during mouse development*. J Cell Biol, 1993. 123(1): p. 223-35.
114. Jawien, A., *et al.*, *Platelet-derived growth factor promotes smooth muscle migration and intimal thickening in a rat model of balloon angioplasty*. J Clin Invest, 1992. 89(2): p. 507-11.
115. Folkman, J. and P.A. D'Amore, *Blood vessel formation: what is its molecular basis? [comment]*. Cell, 1996. 87(7): p. 1153-5.

116. Augustin, H.G., *Antiangiogenic tumour therapy: will it work?* Trends Pharmacol Sci, 1998. 19(6): p. 216-22.
117. Maisonpierre, P.C., *et al.*, *Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis [see comments]*. Science, 1997. 277(5322): p. 55-60.
118. Sato, T.N., *et al.*, *Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation*. Nature, 1995. 376(6535): p. 70-4.
119. Davis, S., *et al.*, *Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning*. Cell, 1996. 87(7): p. 1161-9.
120. Suri, C., *et al.*, *Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis*. Cell, 1996. 87(7): p. 1171-80.
121. Roberts, A.B., *et al.*, *Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. 83(12): p. 4167-71.
122. Busse, R. and I. Fleming, *Endothelial dysfunction in atherosclerosis*. J Vasc Res, 1996. 33(3): p. 181-94.
123. Nathan, C. and Q.W. Xie, *Regulation of biosynthesis of nitric oxide*. J Biol Chem, 1994. 269(19): p. 13725-8.
124. Ziche, M., *et al.*, *Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis*. J Clin Invest, 1997. 99(11): p. 2625-34.
125. Papapetropoulos, A., *et al.*, *Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells*. J Clin Invest, 1997. 100(12): p. 3131-9.
126. Guo, N., *et al.*, *Differential roles of protein kinase C and pertussis toxin-sensitive G-binding proteins in modulation of melanoma cell proliferation and motility by thrombospondin 1*. Cancer Res, 1998. 58(14): p. 31 54-62.
127. Rastinejad, F., P.J. Polverini, and N.P. Bouck, *Regulation of the activity of a new inhibitor of angiogenesis by a cancer suppressor gene*. Cell, 1989. 56(3): p. 345-55.



128. Compagni, A. and G. Christofori, *Recent advances in research on multistage tumorigenesis*. Br J Cancer, 2000. 83(1): p. 1-5.
129. Bleuel, K., et al., *Tumor suppression in human skin carcinoma cells by chromosome 15 transfer or thrombospondin-1 overexpression through halted tumor vascularization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(5): p. 2065-70.
130. Streit, M., et al., *Overexpression of thrombospondin-1 decreases angiogenesis and inhibits the growth of human cutaneous squamous cell carcinomas*. Am J Pathol, 1999. 155(2): p. 441-52.
131. Streit, M., et al., *Thrombospondin-2: a potent endogenous inhibitor of tumor growth and angiogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(26): p. 14888-93.
132. Weinstat-Saslow, D.L., et al., *Transfection of thrombospondin 1 complementary DNA into a human breast carcinoma cell line reduces primary tumor growth, metastatic potential, and angiogenesis*. Cancer Res, 1994. 54(24): p. 6504-11.
133. Jones, A. and A.L. Harris, *New developments in angiogenesis: a major mechanism for tumor growth and target for therapy*. Cancer J Sci Am, 1998. 4(4): p. 209-17.
134. Folkman, J., *Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease*. Nat Med, 1995. 1(1): p. 27-31.
135. O'Reilly, M.S., et al., *Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice*. Nat Med, 1996. 2(6): p. 689-92.
136. O'Reilly, M.S., et al., *Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma [see comments]*. Cell, 1994. 79(2): p. 315-28.
137. Kruger, E.A., et al., *Endostatin inhibits microvessel formation in the ex vivo rat aortic ring angiogenesis assay*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. 268(1): p. 183-91.

138. Boehm, T., *et al.*, *Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance [see comments]*. *Nature*, 1997. 390(6658): p. 404-7.
139. O'Reilly, M.S., *et al.*, *Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth*. *Cell*, 1997. 88(2): p. 277-85.
140. Liekens, S., E. De Clercq, and J. Neyts, *Angiogenesis: regulators and clinical applications*. *Biochem Pharmacol*, 2001. 61(3): p. 253-70.
141. Mustonen, T. and K. Alitalo, *Endothelial receptor tyrosine kinases involved in angiogenesis*. *J Cell Biol*, 1995. 129(4): p. 895-8.
142. Dunk, C. and A. Ahmed, *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2-Mediated Mitogenesis Is Negatively Regulated by Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 in Tumor Epithelial Cells*. *Am J Pathol*, 2001. 158(1): p. 265-273.
143. Terman, B.I., *et al.*, *Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992. 187(3): p. 1579-86.
144. Galland, F., *et al.*, *Chromosomal localization of FLT4, a novel receptor-type tyrosine kinase gene*. *Genomics*, 1992. 13(2): p. 475-8.
145. Aprelikova, O., *et al.*, *FLT4, a novel class III receptor tyrosine kinase in chromosome 5q33-qter*. *Cancer Res*, 1992. 52(3): p. 746-8.
146. Terman, B.I., *et al.*, *The KDR gene maps to human chromosome 4q31.2---q32, a locus which is distinct from locations for other type III growth factor receptor tyrosine kinases*. *Cytogenet Cell Genet*, 1992. 60(3-4): p. 214-5.
147. Rosnet, O., *et al.*, *Close physical linkage of the FLT1 and FLT3 genes on chromosome 13 in man and chromosome 5 in mouse*. *Oncogene*, 1993. 8(1): p. 173-9.
148. Spritz, R.A., *et al.*, *A YAC contig spanning a cluster of human type III receptor protein tyrosine kinase genes (PDGFRA-KIT-KDR) in chromosome segment 4q12*. *Genomics*, 1994. 22(2): p. 431-6.

149. Millauer, B., *et al.*, *High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis*. *Cell*, 1993. 72(6): p. 835-46.
150. Mendel, D.B., *et al.*, *Development of SU5416, a selective small molecule inhibitor of VEGF receptor tyrosine kinase activity, as an anti-angiogenesis agent*. *Anticancer Drug Des*, 2000. 15(1): p. 29-41.
151. Waltenberger, J., *et al.*, *Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor*. *J Biol Chem*, 1994. 269(43): p. 26988-95.
152. Zhu, Z. and L. Witte, *Inhibition of tumor growth and metastasis by targeting tumor-associated angiogenesis with antagonists to the receptors of vascular endothelial growth factor*. *Invest New Drugs*, 1999. 17(3): p. 195-212.
153. Kendall, R.L. and K.A. Thomas, *Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(22): p. 10705-9.
154. Kendall, R.L., *et al.*, *Specificity of vascular endothelial cell growth factor receptor ligand binding domains*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994. 201(1): p. 326-30.
155. Fujii, E., *et al.*, *Role of nitric oxide, prostaglandins and tyrosine kinase in vascular endothelial growth factor-induced increase in vascular permeability in mouse skin*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1997. 356(4): p. 475-80.
156. Sun, L. and G. McMahon, *Inhibition of tumor angiogenesis by synthetic receptor tyrosine kinase inhibitors*. *Drug Discov Today*, 2000. 5(8): p. 344-353.
157. Sirois, M.G. and E.R. Edelman, *VEGF effect on vascular permeability is mediated by synthesis of platelet-activating factor*. *Am J Physiol*, 1997. 272(6 Pt 2): p. H2746-56.

158. Barleon, B., *et al.*, *Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1.* Blood, 1996. 87(8): p. 3336-43.
159. Clauss, M., *et al.*, *The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis.* J Biol Chem, 1996. 271(30): p. 17629-34.
160. Heldin, C.H., *Dimerization of cell surface receptors in signal transduction.* Cell, 1995. 80(2): p. 213-23.
161. Ito, N., *et al.*, *Identification of vascular endothelial growth factor receptor-1 tyrosine phosphorylation sites and binding of SH2 domain-containing molecules.* J Biol Chem, 1998. 273(36): p. 23410-8.
162. D'Angelo, G., *et al.*, *16K human prolactin inhibits vascular endothelial growth factor-induced activation of Ras in capillary endothelial cells.* Mol Endocrinol, 1999. 13(5): p. 692-704.
163. Guo, D., *et al.*, *Vascular endothelial cell growth factor promotes tyrosine phosphorylation of mediators of signal transduction that contain SH2 domains. Association with endothelial cell proliferation.* J Biol Chem, 1995. 270(12): p. 6729-33.
164. Brock, T.A., H.F. Dvorak, and D.R. Senger, *Tumor-secreted vascular permeability factor increases cytosolic Ca<sup>2+</sup> and von Willebrand factor release in human endothelial cells.* Am J Pathol, 1991. 138(1): p. 213-21.
165. Frelin, C., A. Ladoux, and G. D'Angelo, *Vascular endothelial growth factors and angiogenesis.* Ann Endocrinol (Paris), 2000. 61(1): p. 70-4.
166. Rousseau, S., *et al.*, *Vascular endothelial growth factor (VEGF)-driven actin-based motility is mediated by VEGFR2 and requires concerted activation of stress-activated protein kinase 2 (SAPK2/p38) and geldanamycin-sensitive phosphorylation of focal adhesion kinase.* J Biol Chem, 2000. 275(14): p. 10661-72.

167. Shibuya, M., *et al.*, *Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family.* *Oncogene*, 1990. 5(4): p. 519-24.
168. Fong, G.H., *et al.*, *Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium.* *Nature*, 1995. 376(6535): p. 66-70.
169. Soker, S., *et al.*, *Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced endothelial cell proliferation by a peptide corresponding to the exon 7-encoded domain of VEGF165.* *J Biol Chem*, 1997. 272(50): p. 31582-8.
170. Wild, R., *et al.*, *Inhibition of angiogenesis and tumour growth by VEGF121-toxin conjugate: differential effect on proliferating endothelial cells.* *Br J Cancer*, 2000. 83(8): p. 1077-83.
171. Kawasaki, T., *et al.*, *A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation.* *Development*, 1999. 126(21): p. 4895-902.
172. Kitsukawa, T., *et al.*, *Neuropilin-semaphorin III/D-mediated chemorepulsive signals play a crucial role in peripheral nerve projection in mice.* *Neuron*, 1997. 19(5): p. 995-1005.
173. Joukov, V., *et al.*, *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*, 1996. 15(2): p. 290-98.
174. Kubo, H., *et al.*, *Involvement of vascular endothelial growth factor receptor-3 in maintenance of integrity of endothelial cell lining during tumor angiogenesis.* *Blood*, 2000. 96(2): p. 546-53.
175. Dumont, D.J., *et al.*, *Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3.* *Science*, 1998. 282(5390): p. 946-9.
176. Yarden, Y. and A. Ullrich, *Molecular analysis of signal transduction by growth factors.* *Biochemistry*, 1988. 27(9): p. 3113-9.
177. Kanno, S., *et al.*, *Roles of two VEGF receptors, Flt-1 and KDR, in the signal transduction of VEGF effects in human vascular endothelial cells.* *Oncogene*, 2000. 19(17): p. 2138-46.

178. Davis-Smyth, T., *et al.*, *The second immunoglobulin-like domain of the VEGF tyrosine kinase receptor Flt-1 determines ligand binding and may initiate a signal transduction cascade.* *Embo J*, 1996. 15(18): p. 4919-27.
179. Barleon, B., *et al.*, *Mapping of the sites for ligand binding and receptor dimerization at the extracellular domain of the vascular endothelial growth factor receptor FLT-1.* *J Biol Chem*, 1997. 272(16): p. 10382-8.
180. Kaipainen, A., *et al.*, *The related FLT4, FLT1, and KDR receptor tyrosine kinases show distinct expression patterns in human fetal endothelial cells.* *J Exp Med*, 1993. 178(6): p. 2077-88.
181. Partanen, T.A., *et al.*, *Endothelial growth factor receptors in human fetal heart.* *Circulation*, 1999. 100(6): p. 583-6.
182. Charnock-Jones, D.S., *et al.*, *Vascular endothelial growth factor receptor localization and activation in human trophoblast and choriocarcinoma cells.* *Biol Reprod*, 1994. 51(3): p. 524-30.
183. Takahashi, T., *et al.*, *Protein tyrosine kinases expressed in glomeruli and cultured glomerular cells: Flt-1 and VEGF expression in renal mesangial cells.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1995. 209(1): p. 218-26.
184. Katoh, O., *et al.*, *Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation.* *Cancer Res*, 1995. 55(23): p. 5687-92.
185. Ziegler, B.L., *et al.*, *KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells.* *Science*, 1999. 285(5433): p. 1553-8.
186. Yang, K. and C.L. Cepko, *Flk-1, a receptor for vascular endothelial growth factor (VEGF), is expressed by retinal progenitor cells.* *J Neurosci*, 1996. 16(19): p. 6089-99.
187. Kaipainen, A., *et al.*, *Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(8): p. 3566-70.

188. Kukk, E., *et al.*, *VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development*. *Development*, 1996. 122(12): p. 3829-37.
189. Berse, B., *et al.*, *Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors*. *Mol Biol Cell*, 1992. 3(2): p. 211-20.
190. Li, J., *et al.*, *VEGF, flk-1, andflt-1 expression in a rat myocardial infarction model of angiogenesis*. *Am J Physiol*, 1996. 270(5 Pt 2): p. H1803-11.
191. Sellke, F.W., *et al.*, *Enhanced microvascular relaxations to VEGF and bFGF in chronically ischemic porcine myocardium*. *Am J Physiol*, 1996. 271(2 Pt 2): p. H713-20.
192. Brogi, E., *et al.*, *Hypoxia-induced paracrine regulation of vascular endothelial growth factor receptor expression*. *J Clin Invest*, 1996. 97(2): p. 469-76.
193. Gerber, H.P., *et al.*, *Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia*. *J Biol Chem*, 1997. 272(38): p. 23659-67.
194. Waltenberger, J., *et al.*, *Functional upregulation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR by hypoxia*. *Circulation*, 1996. 94(7): p. 1647-54.
195. Mandriota, S.J., P.A. Menoud, and M.S. Pepper, *Transforming growth factor beta 1 down-regulates vascular endothelial growth factor receptor 2/flk-1 expression in vascular endothelial cells*. *J Biol Chem*, 1996. 271(19): p. 11500-5.
196. Barleon, B., *et al.*, *Vascular endothelial growth factor up-regulates its receptor fms-like tyrosine kinase 1 (FLT-1) and a soluble variant of FLT-1 in human vascular endothelial cells*. *Cancer Res*, 1997. 57(23): p. 5421-5.

197. Kremer, C., *et al.*, *Up-regulation of flk-1/vascular endothelial growth factor receptor 2 by its ligand in a cerebral slice culture system.* *Cancer Res*, 1997. 57(17): p. 3852-9.
198. Shen, B.Q., *et al.*, *Homologous up-regulation of KDR/Flk-1 receptor expression by vascular endothelial growth factor in vitro.* *J Biol Chem*, 1998. 273(45): p. 29979-85.
199. Guidi, A.J., *et al.*, *Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in cervical neoplasia.* *J Natl Cancer Inst*, 1995. 87(16): p. 1237-45.
200. Olson, T.A., *et al.*, *Vascular permeability factor gene expression in normal and neoplastic human ovaries.* *Cancer Res*, 1994. 54(1): p. 276-80.
201. Guidi, A.J., *et al.*, *Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in endometrial carcinoma.* *Cancer*, 1996. 78(3): p. 454-60.
202. Berkman, R.A., *et al.*, *Expression of the vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor gene in central nervous system neoplasms.* *J Clin Invest*, 1993. 91(1): p. 153-9.
203. Westphal, J.R., *et al.*, *Angiogenic balance in human melanoma: expression of VEGF, bFGF, IL-8, PDGF and angiostatin in relation to vascular density of xenografts in vivo.* *Int J Cancer*, 2000. 86(6): p. 768-76.
204. Denekamp, J., *Review article: angiogenesis, neovascular proliferation and vascular pathophysiology as targets for cancer therapy.* *Br J Radiol*, 1993. 66(783): p. 181-96.
205. Semenza, G.L., *Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O<sub>2</sub> homeostasis.* *Curr Opin Genet Dev*, 1998. 8(5): p. 588-94.
206. Silvestre, J.S., *et al.*, *Antiangiogenic effect of interleukin-10 in ischemia-induced angiogenesis in mice hindlimb.* *Circ Res*, 2000. 87(6): p. 448-52.
207. Arras, M., *et al.*, *Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb.* *J Clin Invest*, 1998. 101(1): p. 40-50.
208. Sunderkotter, C., *et al.*, *Macrophage-derived angiogenesis factors.* *Pharmacol Ther*, 1991. 51(2): p. 195-216.



209. Ikeda, M., *et al.*, *Expression of vascular endothelial growth factor isoforms and their receptors Flt-1, KDR, and neuropilin-1 in synovial tissues of rheumatoid arthritis*. J Pathol, 2000. 191(4): p. 426-33.
210. Klagsbrun, M. and P.A. D'Amore, *Regulators of angiogenesis*. Annu Rev Physiol, 1991. 53(19): p. 217-39.
211. Koch, A.E., *et al.*, *Vascular endothelial growth factor. A cytokine modulating endothelial function in rheumatoid arthritis*. J Immunol, 1994. 152(8): p. 4149-56.
212. Qu, Z., *et al.*, *Expression of basic fibroblast growth factor in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis and degenerative joint disease*. Lab Invest, 1995. 73(3): p. 339-46.
213. Bottomley, M.J., *et al.*, *Placenta growth factor (PlGF) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion from mononuclear cells and is co-expressed with VEGF in synovial fluid*. Clin Exp Immunol, 2000. 119(1): p. 182-8.
214. Kahlon, R., J. Shapero, and A.I. Gotlieb, *Angiogenesis in atherosclerosis*. Can J Cardiol, 1992. 8(1): p. 60-4.
215. Stavri, G.T., *et al.*, *Hypoxia and platelet-derived growth factor-BB synergistically upregulate the expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells*. FEBS Lett, 1995. 358(3): p. 311-5.
216. Greenblatt, M. and P. Shubi, *Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique*. J Natl Cancer Inst, 1968. 41(1): p. 111-24.
217. Ehrmann, R.L. and M. Knoth, *Choriocarcinoma. Transfilter stimulation of vasoproliferation in the hamster cheek pouch. Studied by light and electron microscopy*. J Natl Cancer Inst, 1968. 41(6): p. 1329-41.
218. Gullino, P.M., *In vivo utilization of oxygen and glucose by neoplastic tissue*. Adv Exp Med Biol, 1976. 75: p. 521-36.
219. Weidner, N., *Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer [comment]*. Am J Pathol, 1995. 147(1): p. 9-19.

220. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. 100(1): p. 57-70.
221. Bouck, N., V. Stellmach, and S.C. Hsu, *How tumors become angiogenic*. Adv Cancer Res, 1996. 69: p. 135-74.
222. Kerbel, R.S., *Tumor angiogenesis: past, present and the near future*. Carcinogenesis, 2000. 21(3): p. 505-15.
223. Carmeliet, P., *Developmental biology. Controlling the cellular brakes [news; comment]*. Nature, 1999. 401(6754): p. 657-8.
224. Fukumura, D., et al., *Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells*. Cell, 1998. 94(6): p. 715-25.
225. Bouck, N., *Tumor angiogenesis: the role of oncogenes and tumor suppressor genes*. Cancer Cells, 1990. 2(6): p. 179-85.
226. Dameron, K.M., et al., *Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1*. Science, 1994. 265(5178): p. 1582-4.
227. Maciag, T., et al., *Heparin binds endothelial cell growth factor, the principal endothelial cell mitogen in bovine brain*. Science, 1984. 225(4665): p. 932-5.
228. Shing, Y., et al., *Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor*. Science, 1984. 223(4642): p. 1296-9.
229. Ferrara, N. and W.J. Henzel, *Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1989. 161(2): p. 851-8.
230. Fett, J.W., et al., *Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells*. Biochemistry, 1985. 24(20): p. 5480-6.
231. Cherwek, D.H., et al., *Fiber type-specific differential expression of angiogenic factors in response to chronic hindlimb ischemia*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. 279(3): p. H932-8.
232. Baffour, R., et al., *Enhanced angiogenesis and growth of collaterals by in vivo administration of recombinant basic fibroblast growth factor in a*

- rabbit model of acute lower limb ischemia: dose-response effect of basic fibroblast growth factor.* J Vasc Surg, 1992. 16(2): p. 181-91.
233. Tabata, H., M. Silver, and J.M. Isner, *Arterial gene transfer of acidic fibroblast growth factor for therapeutic angiogenesis in vivo: critical role of secretion signal in use of naked DNA [published erratum appears in Cardiovasc Res 1998 Apr;38(1):272].* Cardiovasc Res, 1997. 35(3): p. 470-9.
234. Yamakawa, K., *et al.*, *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists increase vascular endothelial growth factor expression in human vascular smooth muscle cells.* Biochem Biophys Res Commun, 2000. 271(3): p. 571-4.
235. Takeshita, S., *et al.*, *Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model.* J Clin Invest, 1994. 93(2): p. 662-70.
236. Bauters, C., *et al.*, *Physiological assessment of augmented vascularity induced by VEGF in ischemic rabbit hindlimb.* Am J Physiol, 1994. 267(4 Pt 2): p. H1263-71.
237. Sellke, F.W. and M. Simons, *Angiogenesis in cardiovascular disease: current status and therapeutic potential.* Drugs, 1999. 58(3): p. 391-6.
238. Yanagisawa-Miwa, A., *et al.*, *Salvage of infarcted myocardium by angiogenic action of basic fibroblast growth factor.* Science, 1992. 257(5075): p. 1401-3.
239. Ferrara, N. and K. Alitalo, *Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors.* Nat Med, 1999. 5(12): p. 1359-64.
240. Isner, J.M. and T. Asahara, *Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization.* J Clin Invest, 1999. 103(9): p. 1231-6.
241. Isner, J.M., *et al.*, *Arterial gene transfer for therapeutic angiogenesis in patients with peripheral artery disease.* Hum Gene Ther, 1996. 7(8): p. 959-88.

242. Baumgartner, I., *et al.*, *Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia*. *Circulation*, 1998. 97(12): p. 1114-23.
243. Kim, K.J., *et al.*, *Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo*. *Nature*, 1993. 362(6423): p. 841-4.
244. Deplanque, G. and A.L. Harris, *Anti-angiogenic agents. clinical trial design and therapies in development [In Process Citation]*. *Eur J Cancer*, 2000. 36(13 Spec No): p. 1713-24.
245. Saleh, M., S.A. Stacker, and A.F. Wilks, *Inhibition of growth of C6 glioma cells in vivo by expression of antisense vascular endothelial growth factor sequence*. *Cancer Res*, 1996. 56(2): p. 393-401.
246. Hawkins, M.J., *Clinical trials of antiangiogenic agents*. *Curr Opin Oncol*, 1995. 7 (1): p. 90-3.
247. Zhu, Z., *et al.*, *Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced receptor activation with anti-kinase insert domain-containing receptor single-chain antibodies from a phage display library*. *Cancer Res*, 1998. 58(15): p. 3209-14.
248. Brooks, P.C., *et al.*, *Antiintegrin alpha v beta 3 blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin*. *J Clin Invest*, 1995. 96(4): p. 1815-22.
249. Johansson, N., M. Ahonen, and V.M. Kahari, *Matrix metalloproteinases in tumor invasion*. *Cell Mol Life Sci*, 2000. 57(1): p. 5-15.
250. Nelson, A.R., *et al.*, *Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications*. *J Clin Oncol*, 2000. 18(5): p. 1135-49.
251. Stetler-Stevenson, W.G., *Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention*. *J Clin Invest*, 1999. 103(9): p. 1237-41.
252. Birkedal-Hansen, H., *et al.*, *Matrix metalloproteinases: a review*. *Crit Rev Oral Biol Med*, 1993. 4(2): p. 197-250.

253. Kahari, V.M. and U. Saarialho-Kere, *Matrix metalloproteinases in skin*. *Exp Dermatol*, 1997. 6(5): p. 199-213.
254. Heath, E.I. and L.B. Grochow, *Clinical potential of matrix metalloprotease inhibitors in cancer therapy*. *Drugs*, 2000. 59(5): p. 1043-55.
255. Moulton, K.S., et al., *Angiogenesis inhibitors endostatin or TNP-470 reduce intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein E-deficient mice [see comments]*. *Circulation*, 1999. 99(13): p. 1726-32.
256. Wang, Y. and D. Becker, *Antisense targeting of basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor-1 in human melanomas blocks intratumoral angiogenesis and tumor growth*. *Nat Med*, 1997. 3(8): p. 887-93.
257. Pike, S.E., et al., *Vasostatin, a calreticulin fragment, inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth*. *J Exp Med*, 1998. 188(12): p. 2349-56.
258. Bicknell, R. and A.L. Harris, *Mechanisms and therapeutic implications of angiogenesis*. *Curr Opin Oncol*, 1996. 8(1): p. 60-5.
259. Fong, T.A., et al., *SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types*. *Cancer Res*, 1999. 59(1): p. 99-106.
260. Ezekowitz, R.A., J.B. Mulliken, and J. Folkman, *Interferon alfa-2a therapy for life-threatening hemangiomas of infancy*. *N Engl J Med*, 1992. 326(22): p. 1456-63.
261. Zhang, H.T., et al., *Enhancement of tumor growth and vascular density by transfection of vascular endothelial cell growth factor into MCF-7 human breast carcinoma cells*. *J Natl Cancer Inst*, 1995. 87(3): p. 213-9.
262. Peters, K.G., C. De Vries, and L.T. Williams, *Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggests a role in endothelial differentiation and blood vessel growth*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(19): p. 8915-9.
263. Anderson, W.F., *Human gene therapy*. *Nature*, 1998. 392 (6679 Suppl): p. 25-30.

264. Patterson, C. and M.S. Runge, *Therapeutic myocardial angiogenesis via vascular endothelial growth factor gene therapy: moving on down the road*. *Circulation*, 2000. 102(9): p. 940-2.
265. Bennett, M.R. and S.M. Schwartz, *Antisense therapy for angioplasty restenosis. Some critical considerations*. *Circulation*, 1995. 92(7): p. 1981-93.
266. Phillips, M.I., *Antisense inhibition and adeno-associated viral vector delivery for reducing hypertension*. *Hypertension*, 1997. 29(1 Pt 2): p. 177-87.
267. Neckers, L., *et al.*, *Antisense inhibition of oncogene expression*. *Crit Rev Oncog*, 1992. 3(1-2): p. 175-231.
268. Stein, C.A. and Y.C. Cheng, *Antisense oligonucleotides as therapeutic agents--is the bullet really magical?* *Science*, 1993. 261(5124): p. 1004-12.
269. Khaled, Z., *et al.*, *Effects of suramin-related and other clinically therapeutic polyanions on protein kinase C activity*. *Clin Cancer Res*, 1995. 1(1): p. 113-22.
270. Yakubov, L., *et al.*, *Oligodeoxynucleotides interact with recombinant CD4 at multiple sites*. *J Biol Chem*, 1993. 268(25): p. 18818-23.
271. Stull, R.A., L.A. Taylor, and F.C. Szoka, Jr., *Predicting antisense oligonucleotide inhibitory efficacy: a computational approach using histograms and thermodynamic indices*. *Nucleic Acids Res*, 1992. 20(13): p. 3501-8.
272. Cowsert, L.M., *et al.*, *In vitro evaluation of phosphorothioate oligonucleotides targeted to the E2 mRNA of papillomavirus: potential treatment for genital warts*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1993. 37(2): p. 171-7.
273. Wakita, T. and J.R. Wands, *Specific inhibition of hepatitis C virus expression by antisense oligodeoxynucleotides. In vitro model for selection of target sequence*. *J Biol Chem*, 1994. 269(19): p. 14205-10.

274. Bennett, C.F., *et al.*, *Inhibition of endothelial cell adhesion molecule expression with antisense oligonucleotides*. J Immunol, 1994. 152(7): p. 3530-40.
275. Bacon, T.A. and E. Wickstrom, *Walking along human c-myc mRNA with antisense oligodeoxynucleotides: maximum efficacy at the 5' cap region*. Oncogene Res, 1991. 6(1): p. 13-9.
276. Wahlestedt, C., *Antisense oligonucleotide strategies in neuropharmacology*. Trends Pharmacol Sci, 1994. 15(2): p. 42-6.
277. Guvakova, M.A., *et al.*, *Phosphorothioate oligodeoxynucleotides bind to basic fibroblast growth factor, inhibit its binding to cell surface receptors, and remove it from low affinity binding sites on extracellular matrix*. J Biol Chem, 1995. 270(6): p. 2620-7.
278. Rockwell, P., *et al.*, *Cell-surface perturbations of the epidermal growth factor and vascular endothelial growth factor receptors by phosphorothioate oligodeoxynucleotides*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94(12): p. 6523-8.
279. Agrawal, S., *et al.*, *Oligodeoxynucleoside phosphoramidates and phosphorothioates as inhibitors of human immunodeficiency virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. 85(19): p. 7079-83.
280. Zhang, R., *et al.*, *In vivo stability, disposition and metabolism of a "hybrid" oligonucleotide phosphorothioate in rats*. Biochem Pharmacol, 1995. 50(4): p. 545-56.
281. Stein, C.A., *et al.*, *Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides*. Nucleic Acids Res, 1988. 16(8): p. 3209-21.
282. Tortora, G., *et al.*, *Oral antisense that targets protein kinase A cooperates with taxol and inhibits tumor growth, angiogenesis, and growth factor production*. Clin Cancer Res, 2000. 6(6): p. 2506-12.
283. Tortora, G., *et al.*, *Differentiation of HL-60 leukemia by type I regulatory subunit antisense oligodeoxynucleotide of cAMP-dependent protein kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. 88(5): p. 2011-5.

284. Yokozaki, H., *et al.*, *An antisense oligodeoxynucleotide that depletes RI alpha subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase induces growth inhibition in human cancer cells.* *Cancer Res*, 1993. 53(4): p. 868-72.
285. Nesterova, M. and Y.S. Cho-Chung, *A single-injection protein kinase A-directed antisense treatment to inhibit tumour growth.* *Nat Med*, 1995. 1(6): p. 528-33.
286. Chen, H.X., *et al.*, *A safety and pharmacokinetic study of a mixed-backbone oligonucleotide (GEM231) targeting the type I protein kinase A by two-hour infusions in patients with refractory solid tumors.* *Clin Cancer Res*, 2000. 6(4): p. 1259-66.
287. Robinson, G.S., *et al.*, *Oligodeoxynucleotides inhibit retinal neovascularization in a murine model of proliferative retinopathy.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(10): p. 4851-6.
288. Nakashima, T., J.M. Hudson, and G.L. Clayman, *Antisense inhibition of vascular endothelial growth factor in human head and neck squamous cell carcinoma.* *Head Neck*, 2000. 22(5): p. 483-8.
289. Parry, T.J., *et al.*, *Bioactivity of anti-angiogenic ribozymes targeting Flt-1 and KDR mRNA.* *Nucleic Acids Res*, 1999. 27(13): p. 2569-77.
290. Pavco, P.A., *et al.*, *Antitumor and antimetastatic activity of ribozymes targeting the messenger RNA of vascular endothelial growth factor receptors.* *Clin Cancer Res*, 2000. 6(5): p. 2094-103.
291. Usman, N. and L.M. Blatt, *Nuclease-resistant synthetic ribozymes: developing a new class of therapeutics.* *J Clin Invest*, 2000. 106(10): p. 1197-202.
292. Kong, H.L. and R.G. Crystal, *Gene therapy strategies for tumor antiangiogenesis.* *J Natl Cancer Inst*, 1998. 90(4): p. 273-86.
293. Jain, R.K., *et al.*, *Quantitative angiogenesis assays: progress and problems.* *Nat Med*, 1997. 3(11): p. 1203-8.
294. Alessandri, G., K. Raju, and P.M. Gullino, *Mobilization of capillary endothelium in vitro induced by effectors of angiogenesis in vivo.* *Cancer Res*, 1983. 43(4): p. 1790-7.



295. Alessandri, G., P. Cornaglia-Ferraris, and P.M. Gullino, *Angiogenic and angiostatic microenvironment in tumors--role of gangliosides*. *Acta Oncol*, 1997. 36(4): p. 383-7.
296. Holmgren, L., M.S. O'Reilly, and J. Folkman, *Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression*. *Nat Med*, 1995. 1(2): p. 149-53.
297. Jackson, J.R., *et al.*, *The codependence of angiogenesis and chronic inflammation*. *Faseb J*, 1997. 11(6): p. 457-65.
298. Davis, G.E. and C.W. Camarillo, *An alpha 2 beta 1 integrin-dependent pinocytic mechanism involving intracellular vacuole formation and coalescence regulates capillary lumen and tube formation in three-dimensional collagen matrix*. *Exp Cell Res*, 1996. 224 (1): p. 39-51.
299. Madri, J.A. and S.K. Williams, *Capillary endothelial cell cultures: phenotypic modulation by matrix components*. *J Cell Biol*, 1983. 97(1): p. 153-65.
300. Montesano, R., L. Orci, and P. Vassalli, *In vitro rapid organization of endothelial cells into capillary-like networks is promoted by collagen matrices*. *J Cell Biol*, 1983. 97(5 Pt 1): p. 1648-52.
301. Okamura, K., *et al.*, *A model system for tumor angiogenesis: involvement of transforming growth factor-alpha in tube formation of human microvascular endothelial cells induced by esophageal cancer cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992. 186(3): p. 1471-9.
302. Satake, S., *et al.*, *Angiogenic stimuli are essential for survival of vascular endothelial cells in three-dimensional collagen lattice*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. 244(3): p. 642-6.
303. Xin, X., *et al.*, *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands are potent inhibitors of angiogenesis in vitro and in vivo*. *J Biol Chem*, 1999. 274(13): p. 9116-21.
304. Folkman, J., C.C. Haudenschild, and B.R. Zetter, *Long-term culture of capillary endothelial cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979. 76(10): p. 5217-21.

305. Folkman, J., *Proceedings: Tumor angiogenesis factor*. Cancer Res, 1974. 34(8): p. 2109-13.
306. DeFouw, L.M. and D.O. DeFouw, *Vascular Endothelial Growth Factor Fails to Acutely Modulate Endothelial Permeability during Early Angiogenesis in the Chick Chorioallantoic Membrane*. Microvasc Res, 2000. 60(3): p. 212-221.
307. Auerbach, R., *Vascular endothelial cell differentiation: organ-specificity and selective affinities as the basis for developing anti-cancer strategies*. Int J Radiat Biol, 1991. 60(1-2): p. 1-10.
308. Knighton, D.R., V.D. Fiegel, and G.D. Phillips, *The assay of angiogenesis*. Prog Clin Biol Res, 1991. 365(3): p. 291-9.
309. Dellian, M., et al., *Quantitation and physiological characterization of angiogenic vessels in mice: effect of basic fibroblast growth factor, vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor, and host microenvironment*. Am J Pathol, 1996. 149(1): p. 59-71.
310. Nguyen, M., Y. Shing, and J. Folkman, *Quantitation of angiogenesis and antiangiogenesis in the chick embryo chorioallantoic membrane*. Microvasc Res, 1994. 47(1): p. 31-40.
311. Dvorak, H.F., et al., *Fibrin containing gels induce angiogenesis. Implications for tumor stroma generation and wound healing*. Lab Invest, 1987. 57(6): p. 673-86.
312. Jain, R.K., *Determinants of tumor blood flow: a review*. Cancer Res, 1988. 48(10): p. 2641-58.
313. Brem, S., R. Cotran, and J. Folkman, *Tumor angiogenesis: a quantitative method for histologic grading*. J Natl Cancer Inst, 1972. 48(2): p. 347-56.
314. Lewin, M., et al., *In vivo assessment of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis*. Int J Cancer, 1999. 83(6): p. 798-802.
315. Rosen, B.R., et al., *Perfusion imaging with NMR contrast agents*. Magn Reson Med, 1990. 14(2): p. 249-65.

316. Lin, W., A. Celik, and R.P. Paczynski, *Regional cerebral blood volume: a comparison of the dynamic imaging and the steady state methods*. J Magn Reson Imaging, 1999. 9(1): p. 44-52.
317. Weissleder, R., *et al.*, *Non-invasive in vivo mapping of tumour vascular and interstitial volume fractions*. Eur J Cancer, 1998. 34(9): p. 1448-54.
318. Brasch, R., *et al.*, *Assessing tumor angiogenesis using macromolecular MR imaging contrast media*. J Magn Reson Imaging, 1997. 7(1): p. 68-74.
319. Smith, L.E., *et al.*, *Oxygen-induced retinopathy in the mouse*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1994. 35(1): p. 101-11.
320. Ricci, B. and G. Calogero, *Oxygen-induced retinopathy in newborn rats: effects of prolonged normobaric and hyperbaric oxygen supplementation*. Pediatrics, 1988. 82(2): p. 193-8.
321. Auerbach, R., *et al.*, *Angiogenesis assays: problems and pitfalls*. Cancer Metastasis Rev, 2000. 19(1-2): p. 167-72.
322. Kukk, E., *et al.*, *VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development*. Development, 1996. 122(12): p. 3829-37.
323. Shalaby, F., *et al.*, *Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice*. Nature, 1995. 376(6535): p. 62-6.
324. Presta, L.G., *et al.*, *Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders*. Cancer Res, 1997. 57(20): p. 4593-9.
325. Thompson, W.D., *et al.*, *The clinical manipulation of angiogenesis: pathology, side-effects, surprises, and opportunities with novel human therapies*. J Pathol, 2000. 190: p. 330-7.
326. Carmeliet, P. And Jain, R.K., *Angiogenesis in cancer and other diseases*. Nature, 2000. 407:p. 249-57.