

Université de Montréal

2M11. 2715. 10

Effet d'un supplément alimentaire à base de cartilage de requin sur
la cicatrisation chez l'homme

Par

Patricia Barbari

Département de Chirurgie

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 Sciences biomédicales

Décembre, 1998

©Patricia Barbari, 1998



W
4
U58
1999
V.104

Université de Montréal

Effet d'un supplément alimentaire à base de...
la répartition chez l'homme

Par

Pascal Bédard

Département de Chirurgie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître en sciences (M.Sc.)

en Sciences biomédicales

Déposé le 1999



Reçu le 1999

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

ce mémoire intitulé :

Effet d'un supplément alimentaire à base de cartilage de requin sur
la cicatrisation chez l'homme

Présenté par :

Patricia Barbari

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Paul Brazeau : président-rapporteur
Dr. Dominique Garrel : directeur de recherche
Dr. Louise Caouette-Laberge : membre du jury

Mémoire accepté le : 19 mars 1999

SOMMAIRE

Le contrôle de l'angiogenèse pendant la cicatrisation permettrait de traiter les phénomènes prolifératifs pathologiques. Le cartilage de requin contient des facteurs antiangiogéniques.

Le but de ce projet est de mesurer l'effet d'un extrait de cartilage de requin sur la formation du tissu de granulation chez l'homme. Au cours d'une étude randomisée et contrôlée, 36 volontaires ont reçu oralement un placebo(P) ou de l'extrait de cartilage de requin à 2 doses différentes (D1,D2) pendant 23 jours. Un implant de polyvinyle alcool inséré dans un tube de silicone a été introduit sous la peau à J12 et retiré à J23, pour la mesure du collagène (hydroxyproline (OH)) et des cellules endothéliales (marquage du facteur VIIIa); cette dernière mesure a été effectuée en cotant l'abondance des cellules endothéliales de dix échantillons par implant, de 1 à 5.

Les résultats suivants ont été obtenus : la quantité de collagène était similaire dans les 3 groupes ; OH : P : 1.2 ± 0.4 ; D1 : 1.8 ± 1.9 ; D2 : 1.41 ± 0.6 nmol/mg d'éponge. La densité du tissu de granulation en cellules endothéliales s'est avérée diminuée de façon significative chez les patients des groupes D1 et D2 par rapport à ceux du groupe P ; cotes moyennes : P : 3.14 ± 1 ; D1 : 2.5 ± 0.8 ; D2 : 2.2 ± 1 .

Nous concluons que l'extrait de cartilage de requin ne modifie pas la quantité de collagène produite pendant les 2 premières semaines de

la cicatrisation. Par contre, il diminue la densité de cellules endothéliales.

Cette étude montre pour la première fois une inhibition in vivo de l'angiogenèse cicatricielle chez l'homme.

Mots clés : angiogenèse, cartilage, cancer, cicatrisation, maladies angiogénodépendantes.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---------------------------------------|------|
| TITRE | |
| IDENTIFICATION DU JURY | |
| SOMMAIRE | I |
| TABLE DES MATIÈRES | IV |
| LISTE DES TABLEAUX | VII |
| LISTE DES FIGURES | VIII |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS | IX |
| LISTES DES ANNEXES | XI |
| REMERCIEMENTS | XII |
| | |
| I. INTRODUCTION | 1 |
| | |
| II. REVUE DE LITTÉRATURE | 4 |
| 1. ANGIOGENÈSE | 5 |
| 1.1 Définition : | 5 |
| 1.2 Historique : | 6 |
| 1.3 Anatomie des vaisseaux sanguins : | 7 |
| 1.4 Étapes de l'angiogenèse : | 8 |
| 1.5 Études de l'angiogenèse | 11 |
| 1.5.1 Modèles in vivo | 11 |
| 1.5.2 Modèles in vitro | 12 |
| 1.6 Marqueurs d'angiogenèse | 13 |
| 1.7 Les substances angiogéniques : | 15 |
| 1.7.1 Le bFGF | 15 |
| 1.7.2 Le VEGF | 16 |
| 1.7.3 Les MMPs | 17 |
| 1.8 Facteurs antiangiogéniques : | 18 |
| 1.8.1 L'angiostatine : | 19 |
| 1.8.2 Le TNF α | 20 |
| 1.8.3 Le PF4 | 20 |
| 1.8.4 La suramine | 21 |
| 1.8.5 Héparine et cortisone | 21 |
| 1.9 La cicatrisation | 22 |
| 1.9.1 Physiologie | 22 |
| 1.9.2 La synthèse du collagène | 26 |
| 2. Maladies angiogénodépendantes | 28 |
| 2.1 Maladies Dermatologiques | 28 |
| 2.2 Maladies rhumatologiques | 29 |

| | |
|--|----|
| 2.3 Maladies oculaires | 31 |
| 2.4 Maladies cardiovasculaires | 33 |
| 2.4.1 L'ASO | 34 |
| 2.4.2 L'IAM | 35 |
| 2.5 L'angiogenèse tumorale | 36 |
| 2.5.1 Le cancer du sein | 37 |
| 2.5.2 Autres cancers | 39 |
| 3. LE CARTILAGE | 40 |
| 3.1 Histologie du cartilage | 40 |
| 3.2 Ossification endochondrale | 41 |
| 3.3 Le cartilage de veau | 42 |
| 3.4 Le cartilage de requin | 44 |
| 3.5 Essais portant sur la poudre de cartilage | 45 |
| 4 JUSTIFICATION DE L'ÉTUDE | 45 |
| 4.1 Implication thérapeutique de l'angiogenèse | 45 |
| | |
| III ARTICLE | 48 |
| Abstract | 49 |
| Introduction | 50 |
| Methods | 52 |
| Study design. | 52 |
| Subjects and clinical procedures. | 52 |
| Analytical method. | 53 |
| Histology. | 53 |
| Bivariate statistical analysis. | 54 |
| Multivariate statistical analysis. | 55 |
| Results | 56 |
| Discussion | 58 |
| Acknowledgments | 61 |
| References | 62 |
| Figure references and legends | 66 |
| | |
| IV DISCUSSION | 73 |
| 1 Caractéristiques des sujets | 74 |
| 2 Matériel et méthodes | 75 |
| 2.1 Supplément alimentaire à base de cartilage de requin | 75 |
| 2.3 Tissu de granulation | 76 |
| 3 Déroulement de l'étude | 78 |
| 3.1 Étape clinique | 78 |
| 3.2 Étape technique | 78 |
| 3.2.1 Évaluation histologique | 79 |
| 3.2.1.1 Coloration | 79 |
| 3.2.1.2 Quantification | 79 |

| | |
|---|------|
| | VI |
| 3.2.2 Biochimie | 80 |
| 3.2.3 Cultures cellulaires | 81 |
| 4 RÉSULTATS | 81 |
| 4.1 Densité des cellules endothéliales | 81 |
| 4.2 Biochimie du collagène | 82 |
| 4.3 Appréciation des effets secondaires | 83 |
| V CONCLUSION | 84 |
| VI. BIBLIOGRAPHIE | 86 |
| VII. ANNEXES | XIII |

LISTE DES TABLEAUX**Article**

| | |
|--|----|
| 1. Moyenne des densités de cellules endothéliales dans les 3 groupes | 69 |
| 2. Signification statistique des données | 69 |
| 3. Moyennes de l'effet du traitement | 70 |
| 4. Erreurs types | 70 |
| 5. Intervalles de confiance | 71 |
| 6. Nombre de sujets de chaque groupe dans chaque grade | 71 |

LISTE DES FIGURES**Article**

- | | |
|--|----|
| 1. Classification des densités de cellules endothéliales, grades1-5 | 65 |
| 2. Distribution des sujets selon la cote de densité de cellules endothéliales | 68 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- ACE : « Angiotensin Converting Enzyme »
- ADN : Acide Déoxyribonucléique
- ANOVA : « Analysis of Variance »
- ARNm : Acide Ribonucléique, messenger
- ASO : Artériosclérose Oblitérante
- bFGF : « basic Fibroblast Growth Factor »
- CAM : « Chorioallantoic Membrane »
- CID : « Cartilage Inhibitory Derivative »
- ECG : Électrocardiogramme
- EGF : « Epidermal Growth Factor »
- FSC : Formule Sanguine Complète
- GAG : Glycosaminoglycan
- H&E : Hématoxylin Éosine
- HPLC : « High Pressure Liquid Chromatography »
- Hpro : Hydroxyproline
- HPS : « Hématoxilin Phloxine Saphran »
- HUVEC : « Human Umbilical Vein Endothelial Cell »
- IAM : Infarctus Aigu du Myocarde
- IL 12 : Interleukine 12
- IMD : « Intratumoral Microvascular Density »
- INF γ : Interféron γ
- MCAS : Maladie Cardiaque Athérosclérotique
- MMP : « Membrane Metalloproteinase2 »
- MPOC : Maladie Pulmonaire Obstructive Chronique
- NO : « Nitric Oxyde »
- PAR : Polyarthrite Rhumatoïde
- PDGF : « Platelet Derived Growth Factor »

PET : « Positron Emission Tomography »

PF4 : « Platelet Factor 4 »

PGE : « Prostaglandin E »

RCC : « Renal Cell Carcinoma »

SNC : Système Nerveux Central

STOP-ROP : « Supplemental Therapeutic Oxygen for Prethreshold
Retinopathy of Prematurity »

TAF : « Tumor Angiogenic Factor »

TGF $_{\alpha}$: « Tumor Growth Factor α »

TIMP : « Tissue Inhibitor of Metalloproteinase »

TNF $_{\alpha}$: « Tumor Necrosis Factor α »

VEGF : « Vascular Endothelial Growth Factor »

VIH : Virus d'Immunodéficience Humain

VPF : « Vascular Permeability Factor »

LISTES DES ANNEXES

1. Figure 3: Fioles contenant l'extrait congelé de cartilage de requin XIV
2. Figure 4: Technique stérile d'insertion de l'implant au niveau du bras XV
3. Figure 5: Déroulement de l'étude XVI
4. Figure 6: Section de cordon ombilical contrôle démontrant la coloration des cellules endothéliales XVII
5. Figure 7: Aspect de l'implant (éponge en PVA) en microscopie XVIII
6. Figure 8: Histogramme de densités des néovaisseaux dans l'implant XIX
7. Figure 9: Histogramme des concentrations de collagène dans l'implant XX

REMERCIEMENTS

Merci à tous ceux qui m'ont aidé sur le plan académique et surtout moral à mettre en application ce projet de recherche durant mes premières années de résidence en chirurgie. Le chemin a été parsemé d'obstacles, le choix entre les tâches cliniques et la rédaction n'étant pas facile.

Merci pour la confiance du Dr Garrel de m'avoir donné la chance de réaliser ce projet dans des conditions temporelles très insolites (travail surtout nocturne après les journées de chirurgie), grâce à l'aide précieuse de Michel et de Stéphane mes collègues.

Merci au docteur Cadotte pour son aide avec les photos d'histologie.

Merci à mon amie Leila pour la supervision de syntaxe.

Merci à Nathalie et Anna du laboratoire de recherche de l'Hôtel Dieu de Montréal.

Un très grand merci à mon époux Joe qui a participé activement au côté technique du mémoire et qui a démontré de la patience tout au long de la création de ce travail.

I.INTRODUCTION

L'angiogenèse, ou la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (tel que défini depuis 1935) (Folkman, 1987), est un phénomène nécessaire lors de l'embryogenèse . Une fois formé, le réseau vasculaire est un système stable qui se renouvelle lentement ; ainsi chez les individus adultes l'angiogenèse est un phénomène occasionnel qui se retrouve au moment de la guérison des plaies ou de l'ovulation. Lorsque des situations pathologiques se présentent, l'angiogenèse s'effectue de façon excessive et non contrôlée comme dans le cas des tumeurs solides et des maladies angiogénodépendantes telles que regroupées par Folkman.

L'intérêt porté à l'angiogenèse depuis les années 70 s'explique par le potentiel thérapeutique de son inhibition d'autant plus qu'elle touche plusieurs spécialités , notamment : l'oncologie (la progression tumorale), l'ophtalmologie (le glaucome, la rétinopathie diabétique), l'orthopédie (la guérison des fractures), la dermatologie (le psoriasis, les cicatrices hypertrophiques), etc.

La formation de nouveaux vaisseaux est un processus complexe qui comporte plusieurs évènements cellulaires déterminants.

De nombreux modèles in vivo et in vitro existent et permettent d'étudier l'angiogenèse. Parmi les modèles animaux figurent : la chambre antérieure de l'œil de mammifère (lapin, rat), la membrane chorioallantoïque de l'embryon de poulets et le derme de mammifères. Ils ont permis de saisir le phénomène de néovascularisation de façon globale mais, à cause de la multiplicité des paramètres confondants, il a fallu recourir aux modèles de culture de cellules (cellules endothéliales de veines ombilicales)

pour quantifier les vaisseaux et évaluer de façon tridimensionnelle la croissance tumorale subséquente.

Les facteurs stimulateurs et inhibiteurs d'angiogénèse testés avec un modèle n'ont pas nécessairement le même effet lorsque testés avec les autres modèles. De plus, l'extrapolation des résultats chez l'être humain n'est pas réalisable à cause de la non-disponibilité de modèles humains d'angiogénèse fiables et reproductibles, d'où l'intérêt de trouver de nouveaux outils de recherche.

Le cartilage de requin possède des propriétés antiangiogéniques tel que démontré avec le modèle de cornée de lapins. Il inhibe aussi la migration et la progression des cellules endothéliales dans la culture de veines ombilicales humaines.

Le but de ce travail est d'étudier l'effet d'un extrait naturel de cartilage de requin sur le tissu de granulation chez l'homme. Nous avons choisi un modèle de guérison de plaies pour étudier l'angiogénèse humaine.

II. REVUE DE LITTÉRATURE

1. ANGIOGENÈSE

1.1 Définition :

L'angiogenèse est un phénomène qui comprend plusieurs étapes menant à la formation d'un nouveau réseau de capillaires à partir de vaisseaux sanguins préexistants (Folkman, 1987). Ce processus complexe est normalement quiescent ; Cependant, de façon comparable au système de coagulation (Camez,1987, Volpert, 1995), il est rapidement activé comme dans le cas de la guérison des plaies, de la formation du corps jaune et du placenta, et de la régénération de l'utérus. L'angiogenèse a un rôle fondamental dans le remodelage myocardique et vasculaire périphérique post-ischémie, ainsi que dans les ulcères duodénaux et les plaies chroniques (Fan, 1995).

Par ailleurs, une néovascularisation non contrôlée et excessive, ou au contraire, une incapacité de monter une réponse angiogénique adéquate créent des états pathologiques. À titre d'exemple d'angiogenèse excessive, je cite la progression des tumeurs solides, la formation de métastases et la création de maladies angiogénodépendantes, telles que nommées par Folkman (1987). Parmi ces maladies figurent les troubles oculaires (rétinopathie diabétique, glaucome), articulaires (les arthrites, le lupus), cutanés (les hémangiomes infantiles, le psoriasis, les cicatrices hypertrophiques, les tumeurs cutanées), orthopédiques (les

fractures) et vasculaires (formation de la plaque athéromateuse dans l'artériosclérose).

1.2 Historique :

En 1863, Virchow fait mention pour la première fois de l'existence d'un nombre anormal de vaisseaux dans les tumeurs. Plusieurs études descriptives d'angiogenèse tumorale ont surgi de façon éparses par la suite, comme : l'étude anatomique vasculaire sur des tumeurs de cadavres humains et animaux, en 1907, par Goldman et l'étude sur des lapins vivants ayant des tumeurs, en 1934, par Hasegawa.

Finalement, Shubik, en 1968, mentionne pour la première fois la présence d'une substance angiogénique diffusible en utilisant un modèle de chambre millipore implantée dans la joue de hamsters (Folkman et Cotran, 1975). Un siècle après Virchow, le concept de l'angiogenèse resurgit grâce à Folkman, vers les années 1970; ce dernier a mis au point un modèle de cornée de lapin pour démontrer la néovascularisation. Dix ans plus tôt, l'intérêt de Folkman pour l'angiogenèse avait été suscité par ses expériences sur des tumeurs transplantées dans des organes en perfusion isolée. Ce n'est que récemment que les essais cliniques ont débuté chez l'homme, parallèlement à des études biomoléculaires. Cependant, il n'existe pas encore de résultats concluants (Folkman, 1992).

1.3 Anatomie des vaisseaux sanguins :

Les cellules endothéliales sont d'origine mésodermique (Kelly D.E. et coll., 1984). Elles bordent la lumière des vaisseaux sanguins et lymphatiques en formant une couche unique de cellules polarisées. Leur rôle ne se limite pas à constituer une barrière physique entre le sang circulant et les tissus sous-endothéliaux. Malgré leur structure relativement simple, elles jouent un rôle synthétique et métabolique important dans l'élaboration de molécules anticoagulantes et antithrombotiques (prostacyclines, activateurs du plasminogène), et de molécules prothrombotiques (facteur VIIIa de Von Willebrand). Les cellules endothéliales règlent aussi le flot sanguin par leur élaboration de facteurs vasorelaxants (oxyde nitrique) ou vasoconstricteurs (synthèse d'ACE, qui est l'enzyme servant à la conversion de l'Angiotensine I en Angiotensine II). Des cytokines telle l'interleukine-1 et des molécules d'adhérence comme les intégrines sont synthétisées par l'endothélium. Certaines de ces cytokines jouent un rôle dans l'inflammation et l'immunité. D'autres modulent la croissance cellulaire (le PDGF, FGF ou TGF β).

Les cellules endothéliales constituent une membrane semi-perméable et contrôlent le passage des molécules à travers la paroi des vaisseaux. Elles ont des jonctions intercellulaires complexes et sont entourées d'une membrane basale. Elles ont aussi des propriétés contractiles.

Grâce à toutes ces propriétés, les cellules endothéliales ne constituent pas une membrane passive : elles ont un rôle actif dans l'interaction sang-tissus (Robbins et coll., 1989).

1.4 Étapes de l'angiogenèse :

Grâce à l'isolation et à la culture des cellules endothéliales, les différentes étapes de l'angiogenèse ont pu être étudiées ; celles qui sont facilement identifiables sont les suivantes : la lyse de la membrane basale par des protéases, la prolifération et la migration des cellules endothéliales, la différenciation des cellules endothéliales en des structures tubulaires, l'anastomose de ces tubules et finalement, la formation d'une lumière, suivie de l'initiation de la circulation du flot. Le phénomène est inactivé par la suite («downregulation») (Fan, 1995). Le texte qui suit explique ces étapes en détail.

À la suite d'une lésion tissulaire, plusieurs facteurs vasoactifs sont relâchés, comme l'histamine ou la sérotonine; ils s'attacheront à des récepteurs membranaires de l'endothélium des veinules post-capillaires. Les jonctions intercellulaires se relâcheront, permettant une déviation du flot sanguin vers le tissu interstitiel. Selon certaines études, les cellules endothéliales activées sont impliquées dans la dissolution de la membrane basale grâce à leur propre sécrétion de protéases (Clark et coll., 1988).

La matrice extracellulaire participe aussi à la stimulation des cellules endothéliales grâce aux cytokines qu'elle contient. Des substances chimiotactiques, relâchées par les produits de dégradation de la matrice faciliteront ensuite la migration des cellules endothéliales.

Bien que les leucocytes relâchent lors des réactions inflammatoires des substances chimiotactiques et des protéases, leur rôle a été écarté dans l'angiogenèse étant donné que la néovascularisation a lieu même dans des états de déplétion leucocytaire, à condition qu'il n'y ait pas d'infection (expériences de Simpson et Ross avec des sérums antineutrophiles injectés à des cochons),(Sholley, 1978, Clark et coll., 1988, Robinson, 1996).

Avec le changement du microenvironnement, les cellules endothéliales acquièrent un phénotype migratoire et mitotique actif. Le rôle de l'environnement ressort aussi, comme le démontrent les faits suivants : en culture, les cellules endothéliales forment une couche unicellulaire lorsque la matrice de culture est composée de collagène de type I ou II. Par contre, lorsqu'on utilise du collagène de type IV ou de la laminine, (composantes normales de la membrane basale), des formations tubulaires de cellules endothéliales en résultent (Clark,1988).

L'endothélium normal a un index mitotique faible. La prolifération des cellules endothéliales situées en arrière de celles qui ont migré fait suite à une stimulation par des facteurs autocrines, par des produits de dégradation de la membrane basale et par d'autres agents présents dans la matrice extracellulaire. Plusieurs facteurs de croissance jouent un rôle dans la stimulation de la prolifération

cellulaire; ils ont un rôle synergique avec l'héparine, pour laquelle ils ont une grande affinité. Le taux de renouvellement des cellules endothéliales, qui est d'environ 1000 jours, peut diminuer à 5 jours lors d'une «poussée angiogénique», comme lors de la guérison des plaies (Fan, 1995). Aussitôt le besoin disparu, la prolifération vasculaire s'éteint; cela a mené à l'association faite avec la cascade de coagulation, qui est normalement quiescente, mais capable de s'activer rapidement à la demande et de se désactiver tel que déjà mentionné dans le texte.

Il existe deux théories pour expliquer la formation de tubules par les cellules endothéliales. La première implique la fusion des membranes plasmiques des cellules contiguës qui se sont courbées pour former une lumière (Folkman, 1987), alors que la deuxième explique le mécanisme de formations tubulaires par le développement de vacuoles intracellulaires qui finissent par se vider pour engendrer un espace central luminal. Les deux théories se basent sur des expériences *in vitro* les appuyant. Ces deux mécanismes ne sont pas mutuellement exclusifs et pourraient coexister.

Après l'initiation du flot dans le nouveau réseau microtubulaire, il y a régression du phénomène angiogénique et reconstitution de la membrane basale; à ce stade l'effet des substances inhibitrices de l'angiogenèse dominerait. Le « moteur » de ces événements n'est pas encore élucidé. Il y aurait un arrêt de stimulation ou un début d'inhibition, ou même une association de ces deux phénomènes.

Donc, dans des conditions physiologiques, l'angiogenèse est un processus ordonné qui se déroule sur une période de temps limitée, et les cellules endothéliales prolifératives retrouvent rapidement leur état quiescent après l'arrêt du stimulus. Toujours est-il que plusieurs pathologies surgissent et sont maintenues par la persistance de l'angiogenèse et la perte des mécanismes de régulation.

1.5 Études de l'angiogenèse

1.5.1 Modèles *in vivo*

Le modèle de cornée de lapins a été l'un des premiers à permettre d'étudier l'angiogenèse. Dans les années 1970, Folkman a choisi la cornée parce qu'elle est un tissu avasculaire. L'implantation de cellules tumorales dans une micropoche de la cornée stimule la formation de néo-vaisseaux à partir du limbe (structure vasculaire de l'œil) (Folkman et Cotran, 1974, Gimbrone, 1972). Ultérieurement, ce modèle a permis l'étude de facteurs inhibiteurs d'angiogenèse par leur interposition entre la tumeur et le limbe. Ce modèle permet une sélection des agents administrés localement ou systémiquement dès le 3^e ou 5^e jour suivant l'implantation tumorale (O'Reilly, 1997).

La membrane chorioallantoïque de l'embryon de poulets (CAM) représente un autre modèle efficace et rapide permettant de tester différentes doses et différents agents stimulateurs ou inhibiteurs de

l'angiogenèse. Toujours est-il que cette méthode, de même que celle de la cornée de lapins, est semi-quantitative et qu'il n'existe toujours pas de correspondance entre les différents systèmes. Un inhibiteur dans un modèle *in vivo* ne l'est pas nécessairement dans un autre et encore moins nécessairement avec les essais *in vitro* (O'Reilley, 1997).

Selon O'Reilley, on utilise en premier le modèle de CAM, car il est relativement plus facile. Cependant, le modèle de cornée est plus précis et plus quantitatif.

Récemment un modèle de fenêtre mésentérique chez le rat a prouvé la biodisponibilité de la poudre de cartilage de requin (Davis, 1997)

Certains modèles impliquant des primates ont été étudiés pour déterminer une toxicité potentielle qui ne pouvait être remarquée chez les rongeurs. Ces études sont peu nombreuses et peu concluantes (O'Reilly, 1997).

L'angiogenèse n'a cependant pas été évaluée chez l'homme de façon spécifique bien que des modèles d'étude de cicatrisation soient disponibles (Germain, 1994).

1.5.2 Modèles *in vitro*

Parmi les modèles *in vitro*, les cultures de cellules endothéliales de veines ombilicales (HUVEC) ont permis de quantifier l'angiogenèse

de façon tridimensionnelle en mesurant la longueur, la circonférence et la densité des formations tubulaires. L'incorporation de thymidine tritiée pour le décompte cellulaire est une méthode plus rapide et moins chère que les essais *in vivo*.

Un extrait de protéines de membranes basales tumorales contenant du collagène et d'autres facteurs de croissance, nommé «matrigel», représente un autre modèle *in vitro* permettant d'étudier l'angiogenèse (O'Reilly, 1997). Le «matrigel» est liquide à basse température, mais il devient un gel une fois injecté à l'animal. On peut mélanger avec cette substance des substances stimulatrices ou inhibitrices d'angiogenèse pour tester leurs effets respectifs *in vivo* (Passaniti, 1992).

1.6 Marqueurs d'angiogenèse

L'immunolocalisation des vaisseaux sanguins par coloration avec des anticorps anti-récepteurs de cellules endothéliales représente une méthode fiable et sélective pour identifier les cellules endothéliales (Bossi, 1995). On peut ainsi déterminer un «index angiogénique» afin d'étudier la néovascularisation. Les récepteurs membranaires les plus visés sont le facteur VIIIa de Von Willebrand, le CD31 et le CD34. Selon Weidner (1993) et Gasparini (1995), le CD31 serait plus sensible et plus spécifique que le facteur VIIIa, étant donné que ce dernier est aussi exprimé sur les cellules endothéliales des lymphatiques. D'autres marqueurs testés sont le E9 et le TEC11.

Dans les études tumorales humaines, la détermination de l'index angiogénique s'avère une méthode simple et rapide. Les zones les plus vascularisées «hot spots» (identifiées au microscope optique 40x et 100x en périphérie du carcinome) du spécimen pathologique sont choisies pour effectuer le décompte de microvaisseaux. Deux observateurs indépendants font un décompte manuel sous microscopie avec un oculaire quadrillé ou à l'aide d'un compteur par ordinateur, méthode récente qui concorde avec le décompte manuel (Weidner, 1997).

D'autres marqueurs d'angiogenèse *in vivo* chez l'homme sont mentionnés dans la littérature médicale ; certains se basent sur l'étude du flot sanguin et identifient l'hypervascularisation tumorale au doppler en couleur, ou encore localisent l'hyperactivité métabolique au PET scan ou par imagerie en résonance magnétique, comme dans le cas des gliomes (Bicknell, 1996).

Certains facteurs de croissance excrétés dans l'urine, comme le bFGF (Nguyen, 1994), tout comme le VEGF dosé dans des extraits cytosoliques de néoplasies du sein (Brown, 1996), se sont avérés représentatifs d'angiogenèse dans plusieurs études.

O'Reilly conseille la vigilance dans l'interprétation de ces études et clame la nécessité d'un contrôle de qualité avant de critiquer les différentes techniques disponibles.

1.7 Les substances angiogéniques :

Plusieurs facteurs angiogéniques de nature protéique ou autre sont capables d'induire une réponse *in vivo*. Ce sont des substances endogènes, comme l'EGF, le TGF α , le TGF β , le TNF α , l'angiogénine, le PGE2, etc. On pourrait les diviser en 2 groupes : ceux qui agissent directement sur les cellules endothéliales (en stimulant la locomotion des cellules et leur division), et ceux qui agissent indirectement en stimulant les cellules de l'hôte, comme les macrophages, qui sécrètent des substances angiogéniques (Folkman, 1987).

Ces facteurs sont soit des polypeptides comme le bFGF, l'aFGF, le TGF α , le TGF β , l'IL 12, etc., soit des peptides comme l'angiotensine II, la substance P, soit des lipides comme les prostaglandines E1 et E2 ou d'autres composés comme l'héparine, l'histamine, etc.

1.7.1 Le bFGF

C'est le facteur le mieux connu. Il regroupe les facteurs de croissance provenant du placenta, du rein, du corps jaune et du SNC (Lioté, 1993). Il est emmagasiné dans la matrice extracellulaire et dans la membrane basale, et il est lié à l'héparan sulfate (Folkman, 1992). L'héparine libérée par les mastocytes locaux sert à sa relâche de la membrane basale. Un autre groupe de molécules

de la famille des syndécans (protéines contenant de l'héparan sulfate) lie aussi le bFGF (Arbiser, 1996).

Le bFGF est un marqueur tumoral qui est mitogène pour une grande variété de cellules (cellules endothéliales, mélanocytaires, neuronales et d'autres cellules tumorales) et stimule la formation tubulaire, ainsi que la production de protéases.

1.7.2 Le VEGF

Connu sous le nom de VPF pour ses propriétés quant à la perméabilité vasculaire (contribution à la formation d'ascite tumorale dans le cas du cancer de l'ovaire (Arbiser, 1996)), ce facteur de croissance est spécifique aux cellules endothéliales. C'est une glycoprotéine dont la structure ressemble au PDGF. Elle est constituée de 4 isomères connus, 2 courts - le VEGF(121) et le VEGF(165), qui sont des molécules solubles sécrétées pour effectuer l'action angiogénique - et 2 isomères longs - le VEGF(189) et le VEGF(206), qui sont liés aux protéoglycans contenant des héparans sulfates à la surface cellulaire ou au niveau de la membrane basale (Nakagawa, 1997). Des récepteurs transmembranaires spécifiques, le KDR/flk-1 et flt1 ou le VEGF R1 et R2, sont des tyrosines kinases exprimées de façon sélective sur les cellules endothéliales vasculaires dont le messager secondaire n'a pas encore été identifié. Cliniquement, le VEGF se retrouve dans les tumeurs hypoxiques (Gliome) et les tissus hypoxiques non néoplasiques, comme dans la rétinopathie diabétique et le psoriasis.

Kuroki a établi en 1996 une corrélation entre l'expression du VEGF (modèles d'angiogenèse tumorale et oculaire) et l'hypoxie ischémique. La formation de radicaux libres d'oxygène lors du phénomène de reperfusion post-ischémie correspond à une augmentation de l'ARNm du VEGF. Des études *in vivo* et *in vitro* (chez l'homme et le rat) confirment cette hypothèse.

Weidner a effectué des études sur le cancer du sein en 1993, et Nakagawa, sur le carcinome rénal en 1997; au cours de leurs recherches, ils se sont beaucoup penchés sur l'implication du VEGF dans l'angiogenèse tumorale. Nakagawa a utilisé trois lignées de cellules rénales cancéreuses (RCC) et, grâce à une étude immunohistochimique comprenant des anticorps monoclonaux au VEGF, il a démontré la production et l'emmagasinement du VEGF dans le cytosol des cellules de RCC. L'ajout de VEGF a stimulé la formation microtubulaire des néovaisseaux d'une façon proportionnelle («dose dependent»), alors que des anticorps anti-VEGF l'ont inhibée.

1.7.3 Les MMPs

Les MMPs constituent une famille d'endopeptidases (collagénases, gélatinases, stromelysines) qui lient le zinc dans une réaction impliquant le calcium. Elles sont impliquées dans la migration cellulaire du fait qu'avec d'autres enzymes elles dégradent les composantes de la matrice extra-cellulaire. Ces enzymes sont induites par l'héparine.

1.8 Facteurs antiangiogéniques :

Le fait que l'angiogenèse soit inhibée à la fin de l'embryogenèse a attiré l'attention sur la possibilité de trouver des facteurs antiangiogéniques, ce qui représente un espoir thérapeutique. En 1973, grâce au modèle d'implantation de cartilage dans la membrane chorioallantoïque de poulets, Eisenstein a démontré qu'il y avait une inhibition de la néovascularisation causée par l'implantation de cellules tumorales (1975). En 1975 aussi, Folkman a montré qu'on obtenait une réaction similaire lorsqu'on utilisait le modèle de la cornée de lapins; il a alors relevé l'existence d'une substance diffusant à partir du morceau de cartilage interposé entre le limbe (source des néovaisseaux) et la tumeur implantée. Cette substance, le CID, agirait de façon directe sur l'angiogenèse et ne serait pas un antagoniste du TAF (facteur angiogénique tumoral), car l'inhibition se fait après l'ébauche de néovaisseaux dans le modèle expérimental de cornée de lapins (Brem, 1975). En 1971, Folkman prévoyait déjà la présence d'une substance prolongeant la phase dormante des tumeurs.

De nombreuses substances antiangiogéniques, non reliées de prime abord, ont surgi au cours de ces 25 dernières années; selon leur classe, ces substances agissent à différents niveaux de l'angiogenèse.

Les inhibiteurs peuvent agir au niveau des récepteurs de facteurs angiogéniques, au niveau de la transmission du signal intracellulaire ou ils peuvent causer une altération de l'adhérence des cellules endothéliales à la matrice extracellulaire.

Il existe donc des inhibiteurs des métalloprotéinases; l'angiostatine, la thrombospodine, du CID et, du PF4, qui sont des inhibiteurs de polypeptides; des cytokines, comme l'IL 12 et INF_{γ} , ou des modulateurs tels que l'acide rétinoïque; certains antibiotiques angiostatiques qui ont fait partie d'essais in vivo et in vitro, comme l'analogue de fumagilline (AGM740 ou TNP470), des stéroïdes angiostatiques en association avec l'héparine et d'autres inhibiteurs comme la protamine ou la suramine.

1.8.1 L'angiostatine :

Isolée de tumeurs pulmonaires murines, l'angiostatine est un fragment du plasminogène probablement généré par l'action d'une protéase tumorale. Elle inhibe la prolifération des cellules endothéliales suscitée par le bFGF ou le VEGF in vitro ; et elle inhibe l'angiogenèse in vivo (modèle de néovascularisation stimulée par du bFGF) (O'Reilly, 1994). Sa demi-vie, supérieure à celle du VEGF, pourrait expliquer le fait qu'elle ait un rôle inhibiteur sur la croissance des métastases (Chen, 1995).

L'angiostatine n'a cependant pas été isolée dans un autre type de tumeurs animales ou humaines. Les doses nécessaires pour inhiber

l'angiogenèse sont excessives et non pharmacologiques (Bicknell, 1996). Elle a été identifiée en premier comme un produit de cellules tumorales.

1.8.2 Le TNF_α

Le TNF_α est une cytokine qui se trouve dans les états inflammatoires (sécrétée par les macrophages) et néoplasiques. Il affecte l'expression de plusieurs gènes qui stimulent ou inhibent l'angiogenèse selon le système à l'étude. Il bloque la synthèse d'ADN induite par le VEGF ou le bFGF en interagissant avec les récepteurs membranaires sur les cellules endothéliales de façon «dose dépendante» (Patterson, 1996).

Le TNF_α inhibe la migration et la prolifération des cellules endothéliales *in vitro* et l'angiogenèse tumorale *in vivo* (McGuire, 1996). Comme son nom l'indique (facteur de nécrose), il induit une destruction des capillaires tumoraux. Des concentrations minimales sont nécessaires pour son action. Sa toxicité systémique est très grande.

1.8.3 Le PF4

C'est un groupe de protéines contenues dans les granules α des plaquettes, qui ont une grande affinité avec l'héparine. Son rôle

physiologique n'est pas clair. Des essais cliniques sont en cours : le rPF4 241 est utilisé dans des cas de sarcome de Kaposi, et des rémissions partielles (57%) sont observées. Une douleur locale a été rapportée comme effet secondaire (Hawkins, 1995). Le PF4 inhibe la prolifération des cellules endothéliales *in vitro* et la néovascularisation de façon proportionnelle («dose dependent») dans le modèle de CAM (Taylor, 1982 et Folkman).

1.8.4 La suramine

La suramine, un composé polyanionique utilisé dans le traitement de la trypanosomiase africaine, inhibe la liaison des facteurs de croissance (bFGF) à leur récepteur membranaire. *In vivo*, elle empêche la croissance tumorale et l'angiogenèse, mais sa toxicité au niveau des surrénales et ses effets secondaires, comme les kératopathies et les coagulopathies, empêchent son utilisation chez l'homme. Des rémissions partielles ont été observées dans des cas de néoplasie de la prostate, de néoplasie ovarienne et de lymphomes (Gasparini, 1997).

1.8.5 Héparine et cortisone

Folkman a entrepris des essais en utilisant de l'héparine; il a démontré son action antiangiogénique. Malheureusement, les résultats obtenus n'étaient pas reproductibles et variaient selon la source d'héparine utilisée .

Le mélange d'héparine avec un corticostéroïde inhibe l'angiogenèse en agissant sur la membrane basale. Le mécanisme exact n'est pas encore identifié (Thorpe, 1993).

1.9 La cicatrisation

1.9.1 Physiologie

La guérison des plaies implique une interaction complexe entre les cellules, les médiateurs biochimiques, la matrice extracellulaire et le microenvironnement cellulaire (Knighton, 1991).

À la suite d'une lésion tissulaire, une série d'événements est déclenchée de façon chronologique. Les étapes de la cicatrisation sont les suivantes : l'inflammation, la prolifération (fibroplasie et angiogenèse) et la maturation (remodelage).

Une inflammation non spécifique fait suite à la cascade de la coagulation et représente la première phase de guérison des plaies. Les lymphocytes, les macrophages et les autres cellules inflammatoires sécrètent des cytokines (PDGF, EGF, TGF β) et d'autres facteurs qui vont nettoyer la plaie.

Le macrophage a un rôle central dans la régulation des événements subséquents. Des études utilisant des anti-séras spécifiques ont démontré que la guérison des plaies a normalement lieu en

l'absence de neutrophiles et de lymphocytes, mais que les monocytes (précurseurs des macrophages) doivent être présents pour qu'il y ait production de fibroblastes (Robinson, 1996)

Présents dès les 48 à 96 premières heures sur le site de la blessure, les macrophages participent activement à la phase d'inflammation et de débridement. Les macrophages activés relâchent 2 monokines ayant des propriétés angiogéniques *in vitro* : l'IL1 et le TNF.

L'injection de macrophages dans la cornée de lapins augmente l'angiogenèse (Clark, 1988). Ils relâchent des substances qui stimulent la formation du tissu de granulation comme le bFGF, le TGF_{α} , le TNF_{α} , le TGF_{β} , et l'IL8 (Clark, 1998). Leur absence (causée par l'injection de sérum anti-macrophage, de stéroïdes ou par augmentation de la tension en oxygène des plaies à 20% (Clark, 1998)) nuit à la formation du tissu de granulation et illustre leur rôle critique dans l'orchestration des événements subséquents - Knighton en 1981 avait rapporté l'importance du gradient en oxygène vers le centre hypoxique des plaies pour la néovascularisation - ; par contre, les neutrophiles, ne sont pas nécessaires à la guérison des plaies, sauf dans le cas d'une infection, tel que déjà mentionné.

Des macrophages isolés provenant de biopsies de membranes synoviales induisent expérimentalement une néovascularisation en l'absence d'inflammation locale. Ils stimulent aussi *in vitro* la migration des cellules endothéliales (Lioté, 1996).

La 2^e étape de la cicatrisation, qui débute 2 à 3 jours après la blessure est dominée par la formation du tissu de granulation; elle

s'opère en deux temps : la fibroplasie et la néovascularisation (ou angiogénèse).

La fibroplasie comprend la migration des fibroblastes sur le treillis de fibrine établi lors de l'hémostase. Les fibroblastes vont déposer des substances essentielles à la réparation de la plaie vers le 4^e jour post blessure, notamment les GAGs (disaccharides liés à une protéine), comme l'acide hyaluronique, la chondroïtine-4-sulfate, le dermatan sulfate, l'héparan sulfate) et le collagène, qui est synthétisé vers le 7^{ième} jour (Robinson, 1995)). La fibroplasie est l'étape clé dans la réparation du tissu conjonctif ; elle dure environ 4 semaines.

L'angiogénèse, processus qui comprend la croissance de vaisseaux dans des espaces non perfusés, est essentielle à la guérison des plaies et à la prise des greffes cutanées. À la suite d'une lésion tissulaire, la revascularisation assure l'apport en oxygène et en métabolites permettant le dépôt du collagène et la formation des protéines; en même temps, les déchets du métabolisme sont éliminés.

On voit donc à quel point il est important de connaître la cinétique de la formation des nouveaux vaisseaux pour bien comprendre la guérison des plaies; les conditions qui nuisent à l'angiogénèse nuisent aussi à la cicatrisation.

La 3^e phase de la cicatrisation, phase de maturation et de remodelage du collagène, débute environ 3 semaines après la blessure et peut s'étendre durant des mois, voire même des années.

Plusieurs facteurs sont en jeu : l'âge du patient, son hérédité, le type de blessure, la localisation de cette dernière, ainsi que la durée et l'intensité de la réponse inflammatoire.

À ce stade, il n'y a plus d'augmentation nette du collagène, car sa production s'équilibre avec sa dégradation. Par contre, les fibres de collagène déposées de façon désordonnée vont s'organiser selon les forces mécaniques locales. La cicatrice qui était indurée, prurigineuse et élevée va arriver à maturité, mais la force d'extension (« tensile ») va continuer à augmenter.

L'épithélialisation représente une étape parallèle aux 3 autres phases : elle débute dès le 1^{er} jour après la lésion.

La contraction de la plaie est le mécanisme de rapprochement des berges, et elle se déroule en même temps que la granulation. C'est le mécanisme de base de la cicatrisation, surtout en ce qui concerne la protection contre les infections.

Une petite parenthèse concernant les greffes cutanées : à l'instar de la cicatrisation des plaies, la prise des greffes d'épaisseur totale comprend 3 étapes :

L'imbibition, qui a lieu dès la pose de la greffe, où les nutriments diffusent à partir du lit receveur ; la peau d'épaisseur totale est maintenue par des liaisons de fibrine et de fibronectine.

La revascularisation débute dans les 24 à 48 premières heures et se complète après 4 à 6 jours. Elle s'explique par deux mécanismes :

l'inosculation, où des capillaires préformés de la greffe vont s'anastomoser à ceux du lit receveur, et la néovascularisation, où les cellules endothéliales des veinules du site receveur vont migrer dans un espace avasculaire pour former des tubules et s'anastomoser aux artérioles de la greffe.

Enfin, la phase d'organisation, 4 jours après la pose de la greffe, consiste en la migration des fibroblastes le long du treillis de fibrine afin de renforcer l'adhérence de la greffe. En 1995, Goretsky a proposé un modèle de polymère d'acrylique, avec des mèches de polypropylène insérées entre le site receveur et la greffe, pour étudier les étapes d'angiogenèse en microscopie électronique; ce modèle démontre très bien la cinétique de la néovascularisation. L'acrylique, qui pénètre dans les néovaisseaux et les moule, sert à les identifier au microscope. L'inosculation n'a pu être démontrée dans ce modèle de rats avec «moulage» vasculaire.

1.9.2 La synthèse du collagène

La synthèse du collagène dans le réticulum endoplasmique rugueux des fibroblastes implique l'élaboration de 3 chaînes α , qui sont des polypeptides composés d'environ 1400 acides aminés. La chaîne centrale a une structure caractérisée par la présence d'une molécule de glycine qui se répète tous les 3 acides aminés et, dans le triplé répétitif Gly-X-Y le 2^e acide aminé (X) est souvent la proline, et le (Y), l'hydroxyproline (cette dernière est hydroxylée par l'enzyme

prolyl hydroxylase, qui requiert l' α -cétoglutarate, l'oxygène moléculaire, le fer ferrique et la vitamine C pour sa formation).

La mesure de l'hydroxyproline est considérée comme un marqueur du métabolisme du collagène qui lui est spécifique. On ne la trouve qu'en faible quantité dans l'élastine (2%).

À certains sites spécifiques, on trouve de la lysine, un autre acide aminé qui subit une hydroxylation. Des ponts entre des chaînes α sont assurés par des liaisons inter-chaînes de lysine et d'hydroxyle. La glycosylation des chaînes α est l'étape qui suit; après celle-ci il y a formation d'une triple hélice, dont l'axe de rotation est vers la droite. Chaque hélice représente un filament de collagène (contenu dans les fibroblastes), dont le regroupement forme les fibrilles (étape extracellulaire), sous-unité des fibres de collagène que l'on peut observer en microscopie optique. Il existe au moins 12 types de collagène chez l'homme. La peau normale contient du collagène de type I et III. Le collagène de type III déposé initialement après une blessure est progressivement remplacé par du collagène de type I jusqu'à l'obtention du rapport 4 pour 1 retrouvé dans la peau normale. Une homéostasie du collagène est atteinte au bout de 3 semaines après l'infliction d'une blessure; le taux de sa production s'équilibre à celui de sa dégradation. C'est le collagène qui confère la force tensile à la plaie.

2. Maladies angiogénodépendantes

Une néovascularisation excessive et non contrôlée de même qu'une absence d'angiogenèse (plaies de pression, ulcères chroniques aux membres inférieurs) se retrouvent dans plusieurs pathologies touchant presque tous les domaines médicaux.

2.1 Maladies Dermatologiques

Au point de vue dermatologique, citons quelques maladies angiogénodépendantes, dont certaines sont actuellement étudiées cliniquement : les cicatrices hypertrophiques et les chéloïdes, la verrue vulgaire, les tumeurs cutanées (surtout le mélanome) et le psoriasis. Dans ce dernier cas, le stimulus initial est encore inconnu; la prolifération et la desquamation excessive de l'épiderme pourraient dépendre d'une croissance capillaire anormale au niveau du derme (Folkman, 1987). De plus, l'angiogenèse est essentielle pour le maintien des cellules inflammatoires dans la lésion.

Une hyperexpression du VEGF dans les lésions psoriasiques a été démontrée (Arbiser, 1996) et des études préliminaires sur le traitement du psoriasis avec un inhibiteur d'angiogenèse à base de cartilage de requin ont donné des résultats très prometteurs

(communication au laboratoire Aeterna, étude préliminaire non publiée).

2.2 Maladies rhumatologiques

Parmi les pathologies rhumatologiques, l'arthrite rhumatoïde ainsi que les autres arthrites (lupique, infectieuse, microcristalline) partagent une physiopathologie dominée par une néovascularisation précoce et intense. On ne sait si l'hyperplasie synoviale précède la néovascularisation ou si elle lui succède. L'oedème, l'hypertrophie endothéliale et la prolifération vasculaire sont les caractéristiques du panus synovial dans l'arthrite rhumatoïde. On soupçonne que les mastocytes jouent un rôle étant donné que leur nombre est élevé localement. Ils seraient impliqués dans la régulation de la croissance vasculaire à cause de leur production d'histamine et surtout d'héparine.

Une culture de cellules endothéliales avec des mastocytes a montré une augmentation du réseau vasculaire tubulaire dépendamment du nombre de mastocytes présents. Il y aurait une sécrétion de tryptase par les mastocytes, facteur angiogénique inconnu auparavant. Une corrélation entre le nombre de mastocytes et la densité vasculaire dans le derme a aussi été observée. Le modèle de CAM soutient ces trouvailles. Le mécanisme d'action exact reste à élucider (Blair, 1997).

Dans l'ostéoarthrose, la pénétration des vaisseaux sanguins dans le cartilage articulaire fait penser à une diminution de la fonction du CID (facteur inhibiteur contenu dans le cartilage), car il n'y a pas de poussée congestive et inflammatoire, comme dans l'arthrite rhumatoïde. L'ossification endochondrale est responsable de la formation des ostéophytes d'arthrose.

L'intérêt porté à l'angiogenèse dans ces pathologies relève aussi du fait qu'elle est une cible thérapeutique alternative ou adjuvante lors de l'échec des traitements conventionnels. Notons que certains de ces derniers, comme les sels d'or et la pénicillamine (traitement chronique de l'arthrite), ont une action antiangiogénique et antiproliférative sur les cellules endothéliales, tel que testé sur le modèle de CAM et sur la cornée de mammifères.

Les articulations hémophiliques représentent un handicap majeur secondaire à l'oblitération articulaire par du tissu de granulation post-traumatique. Des abcès non drainés, de même que des hématomes articulaires, vont superposer un état inflammatoire aigu à une inflammation chronique.

Selon Shweigere (1991), l'acide acétyl salicylique et l'indométhacine auraient en plus de leur action antinflammatoire une action antiangiogénique. Lioté ne partage pas cet avis, cependant (1993).

D'autres maladies inflammatoires ou infectieuses chroniques sont caractérisées par une néovascularisation pathologique, notamment la maladie de Crohn, la colite ulcéreuse et l'ostéomyélite.

2.3 Maladies oculaires

L'angiogenèse oculaire représente une cause importante de cécité dans le monde. On retrouve plusieurs pathologies oculaires dont le dénominateur commun est une vascularisation non contrôlée : la rétinopathie diabétique, la rétinopathie du prématuré ou la rétinopathie post-radique, la dégénérescence maculaire ou la rétinopathie de l'anémie falciforme ont en commun une hypoxie relative à un moment du développement, qui stimule une néovascularisation (Aiello, 1996).

Plusieurs études animales relèvent l'implication du VEGF dans les désordres ischémiques oculaires. Actuellement, une étude «STOP-ROP» est en cours dans plusieurs centres du monde; son but est d'évaluer le rôle de la thérapie d'oxygène dans la rétinopathie du nouveau-né. L'hypothèse d'une thérapie par hyperoxygénation se base sur la proposition suivante : la naissance est une transition d'un milieu hypoxique à un milieu relativement hyperoxygéné (l'air ambiant). Si la vasculogenèse normale requiert le VEGF comme facteur stimulateur (tel que cité dans plusieurs études animales), il y aurait lors de la naissance une inhibition de la vascularisation induite par le VEGF, de même qu'une oblitération des vaisseaux, et la rétine périphérique demeurerait avasculaire. La demande métabolique augmentant par la suite entraîne un état d'hypoxie relative, d'où la production excessive de VEGF dans la rétine périphérique et la néovascularisation, lors de la progression de la

maladie. Le traitement d'hyperoxygénation devrait agir de manière opposée et empêcher la néovascularisation (Pierce, 1996).

D'autres facteurs angiogéniques au niveau de la rétine ont été étudiés; Michaelson est le premier à avoir mentionné, en 1948, la présence d'un médiateur angiogénique dans les rétinopathies.

Une étude de Dorey (1996) fait un parallèle entre la néovascularisation rétinienne et les lésions d'ischémie-reperfusion. L'expression de l'ARNm du VEGF dans le vitré de rats nouveau-nés exposés à des alternances d'hyperoxie et d'hypoxie, montre une corrélation quantitative et spatiale entre le VEGF et les néovaisseaux.

À part le traitement expérimental par hyperoxygénation dans les rétinopathies du nouveau-né, on utilise déjà dans le cas de rétinopathie diabétique la photocoagulation au laser qui implique une inhibition de la néovascularisation. Selon une hypothèse la lésion de la rétine par brûlure stimule la réparation; celle-ci implique un pigment inhibiteur d'angiogenèse, contenu dans l'épithélium rétinien (Knighton, 1991).

La néovascularisation compromet certaines chirurgies oculaires, comme dans le cas de la cicatrisation après le traitement de glaucomes. Celle-ci est dominée par de la fibrose (néovascularisation et fibroplasie) dans l'espace sous-conjonctival. Les traitements antimétabolites actuels (5FU et Mitomycine C), sont limités à cause de leur toxicité (Wong, 1994).

2.4 Maladies cardiovasculaires

Parmi les tumeurs vasculaires, l'hémangiome - lésion proliférative de l'enfance qui croît la première année de vie (phase proliférative) et qui régresse progressivement pendant 5 ans (phase involutive) - disparaît éventuellement seul. Les hémangiomes sont caractérisés par la présence de cellules endothéliales et inflammatoires. La plupart sont bénins, mais ceux qui grossissent (hémangiomes caverneux) peuvent menacer des structures vitales (formes infiltrantes) et causer une thrombopénie par consommation des plaquettes (syndrome de Kasabach - Meritt). Ces hémangiomes contiennent une concentration accrue de VEGF, de bFGF et de collagénase de type IV (la digestion de la membrane basale étant une étape critique de la néovascularisation). Par contre, durant la phase involutive, on retrouve des mastocytes et des MMPs (étude sur du matrigel) en grande concentration.

Le traitement de première ligne comporte actuellement des corticostéroïdes et en deuxième ligne, de l' $\text{INF}_{\alpha 2a}$; dans les deux cas, les effets secondaires limitent leur utilisation.

Il existe aussi des formes systémiques, les hémangiomatoses (pulmonaires par exemple), dont le taux de mortalité est très élevé (Schweigerer, 1992).

Le traitement des lésions de sarcomes de Kaposi chez les sidéens par des inhibiteurs d'angiogenèse aboutit à des régressions partielles, tel que mentionné plus tôt.

2.4.1 L'ASO

L'artériosclérose qui touche une grande partie de la population, est un phénomène handicapant dans notre société. C'est la formation de plaques athéromateuses intravasculaires qui, en oblitérant progressivement la lumière des vaisseaux périphériques ou cardiaques, génère le ralentissement du flot sanguin ou même son arrêt subit, avec ce qui en découle comme séquelles (arrêt de l'apport nutritif et de l'apport en oxygène; accumulation des déchets métaboliques donc perturbations métaboliques vitales pour les organes concernés, entraînant le risque de perdre un membre, dans le cas d'ischémie aiguë, ou de mourir par occlusion coronarienne subite). En plus des dépôts de cellules inflammatoires, des plaquettes et des cristaux de cholestérol, l'athérome est constitué d'un réseau de néo-microvaisseaux, dont les parois sont très fragiles ; elles se détruisent facilement et perpétuent, par le saignement et la coagulation, l'accumulation de substances faisant croître la plaque ou causant une thrombose occlusive. L'origine de ces micro-vaisseaux est inconnue. Certains l'attribuent aux « vasa-vasora », alors que d'autres pensent que les cellules endothéliales bordant la lumière vasculaire sont à l'origine de cette néovascularisation.

L'étendue du réseau microvasculaire est en corrélation avec la sévérité de l'ASO. De plus, il a été observé avec l'évolution de la pathologie, que les microvaisseaux se localisent plus près de la lumière.

Des fragments de plaques athéromateuses transplantés dans des micropoches de cornées de lapins ont confirmé la relation entre l'angiogenèse et l'ASO (Kahlon, 1991).

De façon diamétralement opposée, la néovascularisation périphérique collatérale compense l'oblitération totale des artères principales. Dans des cas avancés d'ASO, les patients dépendent du réseau vasculaire secondaire pour fonctionner.

2.4.2 L'IAM

Au niveau cardiaque, la situation est similaire; la formation de caillots dans les coronaires post-saignement de plaques d'athéromes est fatale. Dans des conditions de stress, l'angiogenèse coronarienne joue un rôle important dans la réponse homéostatique. Quand l'inhibition de l'apport d'oxygène a lieu, il a été démontré que l'oxide nitrique (NO) induit une vaso-relaxation et une stimulation de l'angiogenèse in vivo (Morbidelli, 1996). In vitro, une inhibition de la NO synthase inhibe l'angiogenèse. Le rôle du NO est aussi démontré par sa production, par le VEGF, le tout menant à une prolifération des cellules endothéliales post-capillaires.

2.5 L'angiogenèse tumorale

On doit en partie la découverte de l'angiogenèse tumorale aux travaux de Virchow menés en 1863; il a rapporté pour la première fois la présence d'un nombre anormal de vaisseaux dans les masses tumorales. Cependant, on ne savait pas si cette angiogenèse représentait un épiphénomène ou si elle était liée à la croissance des tumeurs solides. Les études de Folkman ont bien démontré par la suite que l'angiogenèse est un prérequis et non un effet secondaire de la croissance des tumeurs solides.

Les modèles expérimentaux déjà cités ont permis de distinguer les deux phases de croissance tumorale : la première est la phase avasculaire, où les cellules croissent de façon linéaire dans une tumeur solide ;elles forment une ellipse ou une sphère, et dépendent de la diffusion des substances nutritives environnantes. Cette étape est limitée, en ce sens que, lorsque la masse a atteint un diamètre de 1 à 2 mm ou l'équivalent d'un million de cellules, la croissance s'arrête et un état d'équilibre s'installe : il y a nécrose centrale de la masse et prolifération des cellules périphériques (Gimbrone, 1972, Brem, 1975, Folkman, 1987). On peut aussi parler d'une phase dormante. Ultérieurement, la masse tumorale est envahie par les néovaisseaux et une croissance exponentielle s'amorce, avec malignisation de la tumeur, puis formation de métastases.

L'angiogenèse est donc nécessaire à la croissance et à l'invasion des tumeurs primaires par son action de perfusion (apport d'oxygène et de nutriments).

2.5.1 Le cancer du sein

La vascularisation des tumeurs du sein est très variable et hétérogène avec différents clones cellulaires ayant des taux de croissance différents et un potentiel métastatique différent. La moitié des cancers envahissants du sein est associée à une augmentation de la densité vasculaire intratumorale. C'est grâce aux travaux de Weidner que le concept d'«IMD», ou densité microvasculaire tumorale, a été établi comme facteur pronostic (Weidner, 1993).

L'IMD serait indépendante des autres facteurs pronostics connus (âge, statut ménopausal, type histologique, taille de la tumeur, récepteurs hormonaux), tel que démontré dans une étude comprenant 328 femmes atteintes de néoplasie du sein à ganglions négatifs (Gasparini, 1997).

Il a aussi été démontré qu'il existait une relation entre l'expression du VEGF et la vascularisation tumorale. Ce facteur de croissance pourrait donc être une cible thérapeutique (en plus de son rôle de marqueur et de son rôle pronostic pour la période de rémission et celle de survie générale). De là, le concept de résistance tumorale qui, théoriquement, ne devrait pas exister avec les traitements

antiangiogéniques : contrairement aux traitements conventionnels cytotoxiques, qui visent le parenchyme tumoral (cellules néoplasiques), les antiangiogéniques attaquent les cellules endothéliales normales, qui ne s'adapteront pas aux conditions hostiles (base de l'échec du traitement conventionnel) pour former une résistance. De plus, un autre avantage découle du fait que l'index thérapeutique des substances antiangiogéniques est large, les organes sains n'ayant pas de néovascularisation.

Gagliardi a publié en 1992 une étude démontrant les propriétés antiangiogéniques des antioestrogènes (le tamoxifène, la nafoxidine et le clomifène), propriétés indépendantes de leur rôle hormonal. Le tamoxifène serait ainsi efficace même dans des tumeurs à récepteurs négatifs. Leur rôle angiostatique serait dépendant de la dose administrée (Gagliardi, 1993). Selon Gasparini, le cancer du sein serait une des tumeurs les plus aptes à répondre au traitement antiangiogénique simple ou combiné au traitement conventionnel (1997).

Au niveau génétique, le gène suppresseur tumoral, le p53, est altéré dans le cancer du sein chez la femme. Volpert a publié une étude où il a démontré que l'acquisition d'un phénotype angiogénique par les fibroblastes mène à la progression tumorale par stimulation de l'angiogenèse (1996).

Le futur réserve des thérapies géniques par l'utilisation d'*antisens* pour viser l'expression des oncogènes (c-erbB-2, myc). Les *antisens* se lient à des régions d'ADN ou d'ARN avec une grande sélectivité (méthodes encore à l'essai).

2.5.2 Autres cancers

La densité des microvaisseaux tumoraux n'est malheureusement pas un facteur pronostic dans toutes les tumeurs, comme dans le cancer colorectal chez l'homme tel que le concluait l'étude de Bossi (1995). Des études du mélanome, du cancer du poumon, des cancers de la tête et du cou, et du cancer de la prostate ont montré une relation entre l'angiogenèse et le pronostic du patient ; cependant, seules les études sur le cancer du sein et sur celui du système nerveux central ont montré une valeur pronostique indépendante des autres facteurs connus.

Gasparini met en garde contre l'interprétation des résultats des études d'angiothérapie en cours. Selon lui, elles ne posséderaient pas toutes des critères méthodologiques qu'il recommande.

L'inhibition de l'angiogenèse et l'induction de l'apoptose sont le mécanisme central vers lequel devraient converger les mécanismes d'action des agents anticancéreux. Le moment d'administration des médicaments a son importance, et l'index thérapeutique devrait être favorable quelle que soit la cible thérapeutique visée.

3. LE CARTILAGE

3.1 Histologie du cartilage

Le cartilage est une forme spécialisée de tissu conjonctif. Il est composé de chondrocytes, qui synthétisent et sécrètent une matrice extracellulaire. La matrice est composée de collagène, d'acide hyaluronique, de protéoglycans, de plusieurs glycoprotéines et parfois d'élastine. Il existe 3 formes de cartilage : le cartilage fibreux, le cartilage élastique et le plus commun, le cartilage hyalin qui se retrouve dans l'embryon, dans les plaques épiphysaires, dans les voies respiratoires principales, dans le cartilage costal et dans les surfaces articulaires (Kelly, 1984).

Le cartilage ne comprend pas de vaisseaux sanguins à part ceux qui le traversent en allant vers d'autres tissus et au cours de situations particulières, comme dans les zones d'ossification endochondrale .

Les chondrocytes sont nourris par diffusion de nutriments grâce aux capillaires contenus dans le périchondre (tissu conjonctif adjacent) ou dans le liquide synovial des articulations. Leur activité métabolique est faible, par conséquent.

3.2 Ossification endochondrale

Il existe 4 zones dans le cartilage épiphysaire : une zone au repos, constituée de cartilage hyalin avec des chondrocytes normaux, une zone proliférative, où les cellules se multiplient rapidement et s'empilent, une zone hypertrophique et une dernière zone constituée de cartilage ossifié.

L'ossification endochondrale a lieu au niveau des plaques de croissance à partir du cartilage hyalin.

Lorsque le cartilage passe par une phase hypertrophique, il se trouve envahi par les vaisseaux sanguins (Carlevaro, 1997); une minéralisation osseuse s'en suit. Ce modèle permet la recherche de facteurs stimulateurs et inhibiteurs de l'angiogenèse, vu que la transformation d'un état angiostatique en un état angiogénique se déroule durant l'ossification endochondrale. Il a été démontré qu'en présence d'acide ascorbique l'activité stimulatrice prédomine, alors qu'en son absence les chondrocytes ne peuvent pas se différencier et s'hypertrophier. Là encore, l'interaction du milieu ambiant est impliquée dans le contrôle de l'angiogenèse. Un groupe de protéines, les transférines, semble aussi essentiel à cette transformation. Des études avec le modèle de CAM ont confirmé le rôle des chondrocytes dans la migration cellulaire et dans l'invasion de la membrane extracellulaire. Donc, en plus du rôle connu antiangiogénique du cartilage, il existe des situations où les chondrocytes stimulent l'angiogenèse.

Il existe 3 phases dans l'ossification endochondrale. En bref, lors de la première phase, les chondrocytes s'hypertrophient, puis les capillaires sanguins pénètrent les espaces entre les chondrocytes en destruction et, finalement, il y a minéralisation et formation d'os.

Un grand nombre de substances antiangiogéniques, sans relation de prime abord, a surgi depuis les dernières 25 années. Selon leur classe, ces substances agissent à différents niveaux de l'angiogenèse. Parmi ces facteurs, l'attention a surtout été portée sur le cartilage, étant donné que c'est un tissu avasculaire chez l'adulte, qu'il est relativement résistant aux tumeurs et que les chondrosarcomes sont des tumeurs très peu vascularisées. L'inhibiteur présent dans le cartilage serait acquis, car le cartilage embryonnaire est vascularisé, caractère qu'il perd lors de la période néonatale. L'extraction et la purification du CID (tel que nommé par Folkman) a démontré qu'il s'agirait d'une protéine de poids moléculaire d'environ 24000, possédant des propriétés anticollagénases. Ce serait une TIMP avec une activité antiangiogénique importante (Apte, 1997). La compréhension de l'ossification endochondrale au niveau des plaques de croissance démystifie le rôle du CID (tel que mentionné plus haut, il existe des situations où le cartilage peut acquérir un réseau microvasculaire).

3.3 Le cartilage de veau

Langer a rapporté l'isolation d'un facteur antiangiogénique extrait du cartilage scapulaire de veaux âgés de moins de 2 ans. Il en a étudié

les propriétés avec le modèle de cornée de lapin sur laquelle on a prégreffé des tumeurs V2CA (1976).

D'autres études ont suivi avec le « Catrix-S », complexe de mucopolysaccharides acides dérivés de cartilage de trachée bovine. Une de ces études a démontré *in vitro* l'inhibition de croissance de lignées cellulaires tumorales humaines avec de hautes doses de « Catrix-S ». Le composé actif est toujours inconnu cependant (Durie, 1985).

Dans une étude de phase II sur le « Catrix-S » administré par voie sous-cutanée (5.0 - 7.5g / semaine) à des patients présentant des tumeurs métastatiques, le produit a eu des résultats favorables chez 1 patient sur 9, se manifestant par la disparition de ses multiples métastases pulmonaires d'un RCC. D'autres auteurs rapportent une rémission spontanée de 8.5% sur un groupe de patients atteints de RCC (Romano, 1985).

3.4 Le cartilage de requin

En 1983 Langer publiait un article sur un extrait de cartilage de requin. Parmi les avantages de cette source d'inhibiteur d'angiogenèse par rapport au cartilage de veau on retient : l'endosquelette du requin est entièrement constitué de cartilage. Il représente 6% du poids du requin, (Lee, 1983) alors que chez le veau il représente 0.6% de son poids. De plus, un requin pèse environ 410 Kg et le potentiel antiangiogénique de l'extrait de requin est 1000 fois supérieure à celui du veau (animal pour animal). En outre, la substance exige moins de purification chez le requin. Les 2 inhibiteurs agiraient sur l'avancement des capillaires plutôt que directement sur la croissance de la masse tumorale.

On ne sait pas si tous les requins possèdent cette substance, ni si les molécules sont identiques chez le veau et le requin. On suppose que la substance bloquerait les enzymes protéolytiques responsables de la dégradation de la membrane basale, étape critique de l'angiogenèse.

L'innocuité de ces produits quant à l'absence d'effets secondaires chez les animaux ou les patients atteints de différents cancers, est déduite des résultats observés à court terme chez des patients en phase terminale.

D'autres voies d'administration de cartilage de bovins ou de requins ont été testées, comme l'application topique ou l'ingestion orale.

3.5 Essais portant sur la poudre de cartilage

Il existe d'autres formes d'extraits de cartilage, par exemple la poudre de cartilage de requin testée chez le rat pour étudier son absorption ou son assimilation par le système digestif, de même que pour vérifier la présence de toxicité. Un modèle de fenêtre mésentérique où l'angiogenèse avait été stimulée par des mastocytes chez des rats a démontré l'inhibition de l'angiogenèse par de la poudre de cartilage de requin bleu (Davis, 1997). Ces résultats laissent encore une fois la voie ouverte à la recherche pour déterminer l'identité de la substance active. Le cartilage est composé d'environ 40% de protéines, de 5 à 20 % de GAGs et de sels calciques. Contrairement aux écrits de Folkman, qui suggèrent que la substance antiangiogénique dérivée du cartilage de requin aurait une nature protéique, l'idée de glycosaminoglycans comme agents actifs devient de plus en plus populaire. Ce raisonnement découle du fait, que contrairement aux protéines qui se dégradent lors de la digestion, les GAGs sont absorbés intacts.

4 JUSTIFICATION DE L'ÉTUDE

4.1 Implication thérapeutique de l'angiogenèse

L'intérêt porté à l'angiogenèse depuis les 30 dernières années, mais plus spécifiquement depuis les années 1980, fait que ce secteur de

recherche est en pleine effervescence à l'aube de l'an 2000. Plusieurs études fondamentales et de plus en plus d'essais cliniques, sont encourageants en ce qui concerne le traitement antiangiogénique comme voie thérapeutique pour les néoplasies et les maladies angiogénodépendantes.

Les traitements cytotoxiques actuels (radiothérapie, chimiothérapie) qui visent le parenchyme tumoral, par exemple, ne sont pas sans effets secondaires incapacitants (fatigue, diarrhées, toxicité systémique). L'angiogénèse, en tant que cible thérapeutique, devient d'autant plus intéressante, grâce à sa spécificité, vu que les tissus normaux n'ont pas de néovascularisation. De plus, le problème de résistance tumorale se voit par le même raisonnement écarté, comme nous l'avons vu au préalable.

Les essais cliniques en cours sont nombreux, mais il n'existe pas encore de conduite thérapeutique concluante. Notons que le traitement des hémangiomes à l' INF_α en 1989 est le premier traitement antiangiogénique rapporté. En 1992, le TNP-470 était soumis à des essais cliniques sur des patients cancéreux. Actuellement, une quinzaine d'agents sont mis à l'essai (Gingras, 1997).

En phase III, on retrouve deux inhibiteurs, dont le Néovastat ou AE941. Il inhibe la prolifération cellulaire en culture et possède une activité anticollagénase.

Plusieurs inhibiteurs chez l'animal pourraient être testés chez l'humain; cependant, il n'existe pas encore d'études chez l'homme sain. L'article qui suit constitue la première étude d'angiogenèse chez l'homme sain, d'où son importance.

III ARTICLE

Abstract

The antiangiogenic properties of an orally administered liquid cartilage extract were studied in a human clinical trial using a wound angiogenesis model. A placebo (saline), 7 ml or 21 ml of the liquid cartilage extract were orally administered to twenty-nine healthy volunteer subjects randomized into 3 groups, on a daily basis from day 1 to day 23 of the study protocol. On day 12, a polyvinyl-alcohol implant was inserted subcutaneously on the volar side of the arm and removed on day 23. Evaluation of endothelial cell density, an indirect measurement of angiogenesis, was performed on histological sections of the implant using a semi-quantitative numerical scale ranging from 1 (low density) to 5 (high density). The mean endothelial cell density was significantly lower in groups that had received the liquid cartilage extract (grades 2.24 ± 0.10 , $P < 0.0001$ and 2.47 ± 0.10 , $P = 0.0002$ with 7 ml and 21 ml liquid cartilage extract, respectively) compared to placebo (grade 3.15 ± 0.11). Total cellular invasion, as revealed by hematoxylin/eosin/safranin staining and the collagen content of the implants, as assessed by hydroxyproline concentration, did not differ between groups. These results demonstrate that the liquid cartilage extract contains an antiangiogenic component bioavailable in humans by oral administration.

Keywords : Neovascularization, Wound healing, Endothelial cells, Intestinal absorption, Biocompatible material

Introduction

Angiogenesis is the formation of new capillary blood vessels from pre-existing ones. This process is fundamental to some physiological events during which it occurs in a controlled manner, with tightly regulated cellular and molecular events that begin and end the process in a timely fashion (1). The phenomenon of angiogenesis also exacerbates several pathological conditions. Local and metastatic progression of tumors (2), age-related macular degeneration and diabetic retinopathy (3), rheumatoid arthritis (4), and skin disorders such as psoriasis (5), hypertrophic scarring and keloids (6) are all linked to the abnormal formation of blood vessels. The importance of the inhibition of angiogenesis as a potential therapeutic modality is reflected by the large number of antiangiogenic substances currently being tested in clinical trials (7,8).

Cartilage is an avascular tissue. This absence of blood vessels has prompted several laboratories to investigate cartilage in search for inhibitors of angiogenesis. Characterization of cartilage from different species has led to the identification of various fractions and molecules capable of preventing the formation of blood vessels (9,10,11). The antiangiogenic potential of cartilage-derived products as well as inhibitors of angiogenesis of other sources were demonstrated using either *ex ovo* extraembryonic blood vessel systems (12) or other animal models of induced angiogenesis such as the corneal pocket (13) and matrigel assays (14). *In vitro* inhibition of endothelial cell proliferation is also considered an indirect indication of an antiangiogenic activity since these cells lead

the angiogenic process (15,16). Although these models are useful for screening antiangiogenic inhibitors, they can not predict the bioavailability of a given antiangiogenic substance *in vivo* in humans. The need for new investigative tools in the field of angiogenesis has been stressed (17,18).

The application of cartilage-derived products has been discussed in the context of tumor prevention (19,20). However, the systemic bioavailability of an antiangiogenic principle in human subjects has not been demonstrated. Furthermore, potential benefits of such an activity after oral absorption is also a matter of controversy (21,22). Using a wound granulation tissue model, we have shown that the antiangiogenic activity of a liquid cartilage extract was detected after oral administration and absorption in humans. This is, to our knowledge, the first demonstration in humans that an antiangiogenic substance is orally bioavailable and produces an antiangiogenic effect systemically.

Methods

Study design.

The study was a prospective, randomized, controlled, double blind trial. Twenty-nine healthy volunteer subjects were randomized into 3 groups and respectively ingested a placebo (7 ml saline) (9 subjects), approximately 7 ml (1 vial) (10 subjects) or 21 ml (2 vials) (10 subjects) of liquid cartilage extract (LCE) (23), on a daily basis from day 1 to day 23 of the study. On day 12, an inert polyvinyl alcohol (PVA) implant (a spongy material with dimensions of 1 x 1 x 60 mm) threaded into perforated silicone tubing as described by Cohen and Diegelmann (24) and modified by our group (25) was inserted subcutaneously under local anesthesia, on the volar side of the left arm, with the help of a 12 G needle as described previously (26). At the end of the study, the PVA implant was removed by pulling on a 4-0 nylon suture attached to its distal end and processed for biochemical and histological analysis. The implant was divided in 3 parts. The middle portion of each implant was preserved in formalin and used for the measurement of endothelial cells and other portions served for hydroxyproline and total protein measurements.

Subjects and clinical procedures.

Healthy male subjects (age : 27 ± 3 yrs, height : 174 ± 9 cm, weight : 72 ± 4 kg ; mean \pm SD) were recruited locally according to the inclusion and exclusion criteria of the clinical protocol. For instance, subjects with a diagnosed chronic medical condition, a surgery occurring 60 days before the beginning of the study and/or planned within 60 days from the end of the study or allergy to seafood were excluded from the study. Informed consent was obtained from all

subjects and the protocol was approved by the ethic committee of the Hôtel-Dieu Hospital, Montréal, Québec, Canada.

Subjects were given a diary in which they were instructed to report any unusual feeling or discomfort. These diaries also served to monitor compliance to LCE administration during the study. A physical examination, urine analysis (for instance, pH, sugars, acetone, RBC and albumin) and blood draw were performed on days 1, 12 and 23. Plasmatic chemistry (including, glucose, creatinine, calcium, proteins, sodium, potassium, albumin and alkaline phosphatase) and cell count (including, RBC, WBC, platelets, lymphocytes and monocytes) were obtained from the blood samples. In addition, bleeding time was measured on these same days.

Analytical method.

Hydroxyproline content of the implants was measured as follows. A section was hydrolyzed in 6 N HCL (110° C for 18 hr). After addition of internal standards, an aliquot was analyzed by cation exchange HPLC (40 x 250-mm column, 60° C) using postcolumn *ortho*-phtalaldehyde derivatization and in line conversion with sodium hypochlorite. Quantification was done according to the signal of the internal standards (27). The sensitivity of the assay was 250 pmol and the inter- and intra-assay variabilities were 8 and 9% respectively. Total protein was measured by the method of Bradford (28).

Histology.

The middle portion of the implants was embedded in paraffin and

five 5 μ m sections were examined for endothelial cell abundance as previously described (29). The sections were blocked with PBS-BSA, rinsed with PBS and incubated with mouse-antihuman FVIII Mab (Sigma) for 45 min, rinsed with PBS and incubated for 30 min with goat antimouse IgG-PAL (Molecular Probes). After rinsing with PBS, samples were incubated for 10 min in 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 1 mM Levamisol and 0.1% Tween 20, pH 9.5. The reaction was interrupted with PBS, pH 7.4. Samples were then counterstained with Phloxine B. Negative controls were carried out by omitting the primary Mab from the reaction mixture.

Endothelial cell density as revealed by the antibody staining was evaluated by two laboratory assistants, in a blind fashion, based on a non linear parametric 1-5 grading scale (Figure 1). This grading scale was established by referring the section with the highest endothelial cell density as to grade 5 and the section with the lowest density as to grade 1. Sections with intermediate endothelial cell density were then graded in comparison to the reference sections. Each of the 5 sections were evaluated twice by each observer. A total of 20 endothelial cell density assessments (5 sections x 2 observers x 2 rounds of observation) were obtained for each subject. Total cellular density of implant was evaluated after staining with Hematoxylin/Eosin/Safranin (HES).

Bivariate statistical analysis.

In order to assess differences/similarities in scores between observers, a measure of inter-observer agreement (kappa statistic) was employed. Kappa values are normalized between 0 and 1, and can estimate large discrepancies between observer gradings. The

larger the discrepancy in grading assessments, the smaller the value of kappa. Perfect agreement results in a score of 1, while maximal discordance produces a minimum kappa of 0.

Multivariate statistical analysis.

Repeated measures analysis of variance was used to evaluate the effect of LCE administration as differences in the mean grades representing the endothelial cell density. Furthermore, such methods can explain additional sources of variation including site and reproducibility of sampling. All statistical analyses were performed using the SAS software, version 6.12 (SAS, Inc., Cary, NC). Statistical difference was verified using the generalized linear model and data were considered significant if P values were < 0.05 .

Results

No toxicity or side effects related to the administration of the LCE were reported and the subcutaneous implant was well tolerated. There were no differences between the groups consuming the LCE and the control group (placebo) in blood chemistry parameters, urine analysis results, and bleeding times (data not shown).

Weighed kappa values for the endothelial cell density results of each observer ranged from 0.97 to 1. These values show the very high level of consistency in endothelial cell density evaluation between the two observers. In fact, in only one instance was there any discrepancy between the two observers. Furthermore, there was no significant observer-study group or observer-implant section or study group-round of observation interaction ($p > 0.05$ for all such interaction terms, ANOVA). Therefore, data from only one observer were considered in comparing the average endothelial cell density of the three groups.

No significant difference in the hydroxyproline content within implants was found between study groups : 1.2 ± 0.4 , 1.4 ± 0.6 and 1.8 ± 0.9 nmol/mg protein/implant, for placebo, 7 ml-LCE and 21 ml-LCE, respectively ($p > 0.05$). HES staining did not reveal a noticeable difference in total cellular density in implants from each group (data not shown).

Observation of the PVA implant sections using the semi-quantitative grading scale revealed a significant reduction of endothelial cell density in groups that were administered the LCE when compared to

placebo. Lower grades of endothelial cell density were observed in subjects from groups that received the LCE (Table 1), but there was no significant difference between the groups administered 7 ml and 21 ml LCE ($P > 0.1$). This suggests that maximal effect was attained at an intake of 7 ml/day. The distribution of endothelial cell density grades in the three study groups shows a clear shift toward lower grades in subjects who were administered the LCE. While 4 subjects belonging to the group administered 7 ml LCE and 5 subjects from the group administered 21 ml LCE were categorized in grade 1 (lowest endothelial cell density), none of the subjects receiving the placebo ranked in this category (Figure 2). On the other hand, grade 5 (highest endothelial cell density) was obtained by only one subject who happened to be in the placebo group (Figure 2).

Discussion

The antiangiogenic properties of cartilage-derivatives has been the object of great interest ever since it was shown to inhibit *ex ovo* blood vessel formation (9,10), *in vitro* endothelial cell proliferation (30) and tumor angiogenesis (11). These activities provide a rationale for the use of cartilage-derived products as potential therapeutic tools for angiogenesis-dependent diseases. However, since components of relatively high molecular weight have been enriched or isolated from cartilage and were associated with the *in vitro* antiangiogenic activity of this tissue, the potential efficacy of cartilage-derived products after their oral administration is uncertain (21). For example, the oral bioavailability of large molecules (especially proteins) seems unlikely after passage through the acidic and enzymatic environment of the digestive tract. However, there is evidence that absorption from the gastro-intestinal tract and distribution to the bloodstream of large molecules can occur (22,31,32). A demonstration of the efficacy of a cartilage-derived product after oral administration therefore remained to be made.

The main finding of the present study is a significant decrease in endothelial cell density within an inert subcutaneous implant following oral administration of a liquid cartilage extract in human subjects. The experimental model chosen here allows for the study of wound granulation tissue formation without inflammation around the implant, because of the silicone tubing coating the PVA implant (24). In the absence of inflammation, the device is well tolerated for a prolonged period of time. HES staining revealed a homogenous coloration of the cellular density of the implant sections from all study groups. Furthermore, no significant difference was observed in the

hydroxyproline content of the implants from the three experimental groups. These results suggest that the effect of LCE administration we observed was specific for the endothelial cell population. The observation of large inter-individual variations in the hydroxyproline content of the implant reported here is in agreement with earlier studies showing that deposition of collagen was variable within and between implants in the same individual (34). In contrast, such variability was not observed for endothelial cell density; indeed, there was almost no difference in density grading within implants, suggesting that the PVA implant and the grading system used are a suitable model for the study of antiangiogenic effects of test products.

The determination of the exact molecular identification of the antiangiogenic activity present in cartilage is a task that has been undertaken approximately a decade ago and is still ongoing. A 1-10 kd molecular fraction obtained from a shark cartilage guanidium extraction was shown to contain an antiangiogenic activity preventing tumor-induced blood vessel formation in a rabbit corneal pocket assay and embryonic angiogenesis in an *in ovo* system (11). A 27-kd protein isolated from bovine cartilage (CDI, cartilage-derived inhibitor) was shown to inhibit chorioallantoic membrane angiogenesis in about a third of the chick eggs tested. CDI also inhibits the activity of mammalian collagenase, a key enzyme for neovascularization (10). *In vitro*, a shark cartilage extract representing a molecular fraction < 10 kd has been shown to contain a heat-stable activity capable of inhibiting endothelial cell proliferation by 32% at the concentration tested (30). This degree of inhibition is comparable with the 29% reduction in endothelial cell

density observed in the group administered 7 ml/day of the LCE. In rats, inhibition of mesenteric window angiogenesis following oral administration of powdered shark cartilage plateaued at 45% (35) and oral administration of a water-soluble fraction of shark cartilage was shown to reduce the inflammatory response by up to 38% (36). Taken together, these results demonstrate the presence of various molecules in cartilage with the ability of inhibiting, to some extent, blood vessel formation in different experimental models. Our findings suggest that cartilage contains a molecule or several molecules that can inhibit angiogenesis after crossing the intestinal wall. Whether the actual molecule(s) present in the LCE or metabolites are responsible for the effect observed at the implant site will require further investigation.

Interestingly, the reduction in endothelial density observed in our study was not dose-dependent since values of 29% and 22% were obtained with quantities of 7 ml and 21 ml of LCE, respectively. Within the doses tested in this study, it appears that maximal effect was reached at the lower dose of 7 ml LCE. Increasing dose by 3-fold did not result in a significantly greater reduction in endothelial cell density. This phenomenon is also illustrated in figure 2 where distribution of subjects/grades and endothelial cell density median are almost identical in each of the groups administered LCE. One could propose that endothelial cell invasion within the implant was modulated rather than inhibited in the presence of the LCE.

We have reported the first evidence of bioavailability of the antiangiogenic activity of a cartilage-derived product after oral administration in humans. Due to the increasing interest in the

search for new therapeutic tools capable of inhibiting or modulating angiogenesis, demonstration of the oral bioavailability and systemic distribution of an antiangiogenic principle is an important step toward the realization of the therapeutic potential of these compounds.

Acknowledgments

We are greatly indebted to Drs. Stephen R. Behr and Marc Rivière for constructive advice and to Carey Levinton for his assistance in statistical analysis. AT was a National Sciences Engineering Research Council of Canada industrial research fellow during the course of the study. The liquid cartilage extract administered in the course of the study is commercially available under the trade mark CarTCell and was manufactured and provided by Æterna Laboratories Inc.

References

1. Iruela-Arispe, M.L., and Dvorak, H.F. 1997. Angiogenesis: a dynamic balance of stimulators and inhibitors. *Thromb. Haemost.* 78: 672-677.
2. Folkman, J. 1995. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Med.* 1: 27-31.
3. Bonn, D. 1996. Blocking angiogenesis in diabetic retinopathy. *Lancet.* 348:604.
4. Koch, A.E. 1998. Review: angiogenesis: implications for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* Jun; 41: 951-962.
5. Creamer, D., Allen, M.H., Sousa, A., Poston, R., and Barker, J.N. 1997. Localization of endothelial proliferation and microvascular expansion in active plaque psoriasis. *Br. J. Dermatol.* 136: 859-865.
6. Arbiser, J.L. 1996. Angiogenesis and the skin: a primer. *J. Am. Acad. Dermatol.* Mar; 34: 486-497.
7. Fan, T.P. 1994. Angiosuppressive therapy for cancer. *Trends Pharmacol Sci.* 15: 33-36
8. Mousa, S.A. 1998. Mechanisms of angiogenesis in vascular disorders: potential therapeutic targets. *Drugs of the Future* 23: 51-60.
9. Lee, A., and Langer, R. 1983. Shark cartilage contains inhibitors of tumor angiogenesis. *Science* 221: 1185-1187.
10. Moses, M.A., Sudhalter, J., and Langer, R. 1990. Identification of an inhibitor of neovascularization from cartilage. *Science* 248: 1408-1410.
11. Oikawa, T., Ashino-Fuse, H., Shimamura, M., Koide, U., and Iwaguchi, T. 1990. A novel angiogenic inhibitor derived from

- Japanese shark cartilage (I). Extraction and estimation of inhibitory activities toward tumor and embryonic angiogenesis. *Cancer Lett.* 51: 181-186.
12. Jakob, W., and Ross, K. 1984. Utilization of image analysis for the quantification of vascular response in the chick chorioallantoic membrane. *Exp. Pathol.* 26: 93-99.
 13. Fournier, G.A., Luty, G.A., Watt, S., Fenseleau, A., and Patz, A. 1981. A corneal micropocket assay for angiogenesis in the rat eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 21: 351-154.
 14. Passaniti, A., Taylor, R.M., Pili, R., Guo, Y., Long, P.V., Haney, J.A., Pauly, R.R., Grant, D.S., and Martin, G.R. 1992. A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor. *Lab. Invest.* Oct, 67: 519-528.
 15. Folkman, J., and Haudenschild, C. 1978. Angiogenesis *in vitro*. *Nature* 288: 551-556.
 16. Bussolino, F., Mantovani, A., and Persico, G. 1997. Molecular mechanisms of blood vessel formation. *Trends Biochem. Sci.* Jul; 22: 251-256.
 17. Eckhardt, S.G., and Pluda, J. 1997. Development of angiogenesis inhibitors for cancer therapy. *Investig. New Drug* 15: 1-3.
 18. Marshall, J.L., and Hawkins, M.J. 1995. The clinical experience with antiangiogenic agents. *Breast Cancer Res. Treat.* 36: 251-253.
 19. Cataldi, J.M., and Osbourne, D.L. 1995. Effects of shark cartilage on mammary neovascularisation *in vivo* and cell proliferation *in vitro*. *FASEB J.* 9: A135.

20. Miller. 1997. Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 16 173 (Abstr.)
21. Matthews, J. 1992. Sharks still intrigue cancer researchers. *J. of Nat. Cancer Inst.* 84: 1000-1002.
22. Blackadar, B.C. 1993. Skeptics of oral administration of shark cartilage. *J. of Nat. Cancer Inst.* 85: 1961.
23. Dupont, E., Brazeau, P., and Juneau, C. 1997. Extracts of shark cartilage having an antiangiogenic activity and an effect on tumor regression: process of making thereof. United States Patent No. 5; 618, 925.
24. Diegelman, R.F., Lindblad, W.J., and Cohen, I.K. 1986. A subcutaneous implant for wound healing studies in humans. *J. Surg. Res.* 40: 229-232.
25. Garrel, D.R., Gaudreau, P., Zhang, L., Reeves, I., and Brazeau, P. 1991. Chronic administration of growth hormone releasing factor increases wound strength and collagen maturation in granulation tissue. *J. Surg. Res.* 51: 297-302.
26. Germain, L., Jean, A., Auger, F.A., and Garrel, D.R. 1994. Human wound healing fibroblasts have greater contractile properties than dermal fibroblasts. *J. Surg. Res.* 57: 268-273.
27. Lee, K.S., and Dresher, D.G. 1978. Fluorometric amino acid analysis with orthophtalaldehyde (OPA). *Int. J. Biochem.* 9: 457-462.
28. Bradford, M. 1976. Bio-Rad Protein Assay. *Anal. Biochem.*: 72, 248.
29. L'Heureux, N., Pâquet, S., Labbé, R., Germain, L., and Auger, F.A. 1998. A complete biological tissue-engineered blood vessel. *FASEB J.* 12: 47-56.
30. McGuire, T.R., Kazakoff, P.W., Hoie, E.B., and Fienhold, M.A. 1996. Antiproliferative activity of shark cartilage with and without

tumor necrosis- α in human umbilical vein endothelium.

Pharmacotherapy. 16: 237-244.

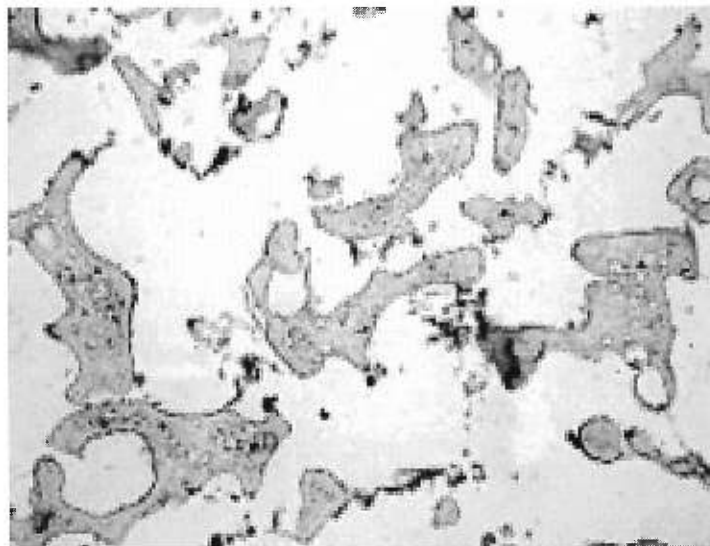
31. Billings, P.C., St Clair, W.H., Maki, P.A., and Kennedy, A.R. 1992. Distribution of the Bowman Birk protease inhibitor in mice following oral administration. *Cancer Lett.* 62: 191-197.
32. Walker, W.A. 1981. Intestinal transport of macromolecules. The Physiology of the Gastrointestinal Tract. L.R. Johnston, ed., Raven Press, New York.
33. Gardner, M.L.G. 1988. Gastrointestinal absorption of intact proteins. *Ann. Rev. Nutr.* 8: 329-350.
34. Jorgensen, L.N., Olsen, L., Kallehave, F., Karlsmark, T., Diegelman, R.F., Cohen, K., and Gottrup, F. 1995. The wound healing process in surgical patients evaluated by the expanded polytetrafluoroethylene and the polyvinyl alcohol sponge: a comparison with special reference to inpatient variability. *Wound Rep. Reg.* 3: 527-532.
35. Davis, P.F., He, Y., Furneaux, R.H., Johnston, P.S., Rüger, B.M., and Slim, G.C. 1997. Inhibition of angiogenesis by oral ingestion of powdered shark cartilage in a rat model. *Microvascular Res.* 54: 178-182.
36. Fontenele, J.B., Viana, G.S.B., Xavier-Filho, J., and de Alencar, J.W. 1996. Anti-inflammatory and analgesic activity of water-soluble fraction from shark cartilage. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29: 643-646.

Figure references and legends

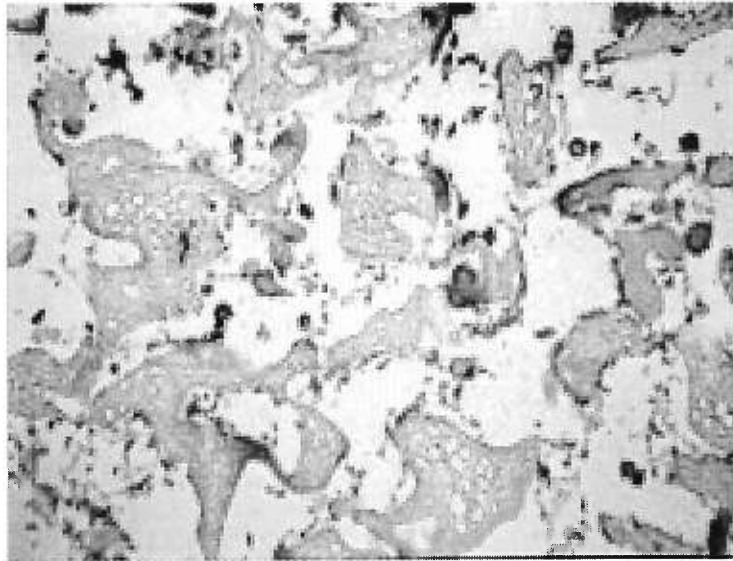
Figure 1. Semi-quantitative evaluation of endothelial cell density within implants

Sections of the PVA implant were reacted with an anti-factor VIII monoclonal antibody specific for endothelial cells. Antibody binding was revealed by an enzymatic reaction leading to a brownish staining. Staining intensity was therefore proportional to the density of endothelial cells. Endothelial cell density was evaluated based on a non linear parametric 1 to 5 semi-quantitative grading scale according to staining intensity. Representative grades 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4(D) and 5 (E) are shown. Pink areas (phloxine B) are portions of the PVA implant itself. Magnification : 330 x.

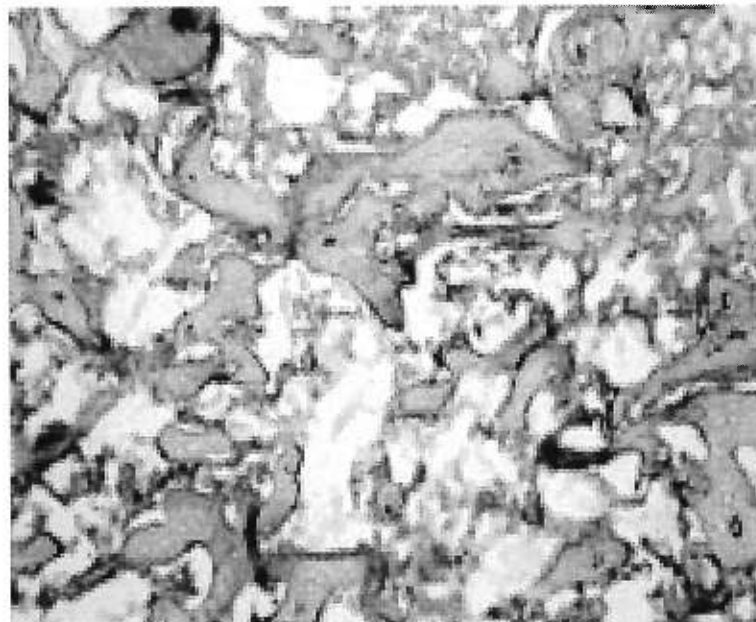
A)



B)



C)



D)



E)

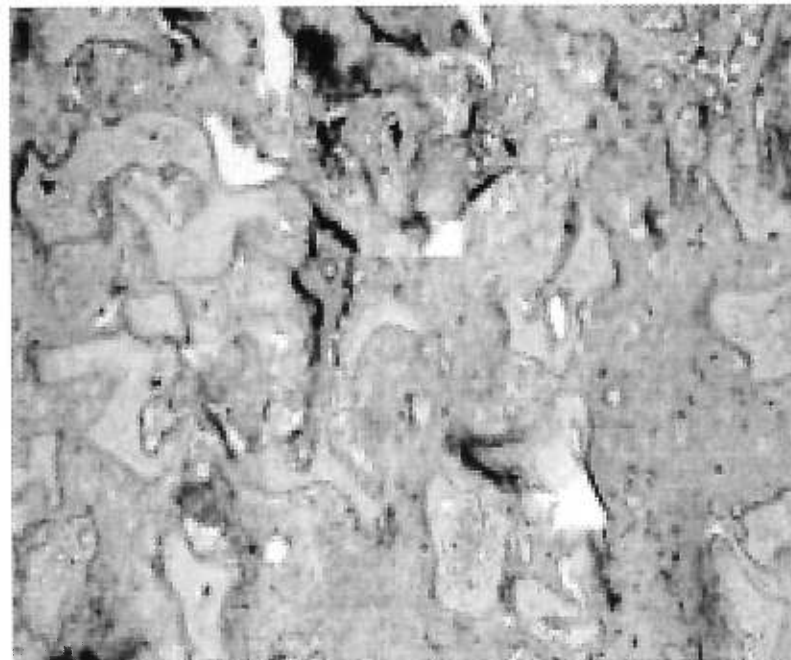


Figure 2. Subjects who received LCE have lower grades of endothelial cell density

Distribution of individuals from the 3 study groups in relation with the grade of endothelial cell density. Each dot represents one individual and the horizontal bar represents the median value of the corresponding group.

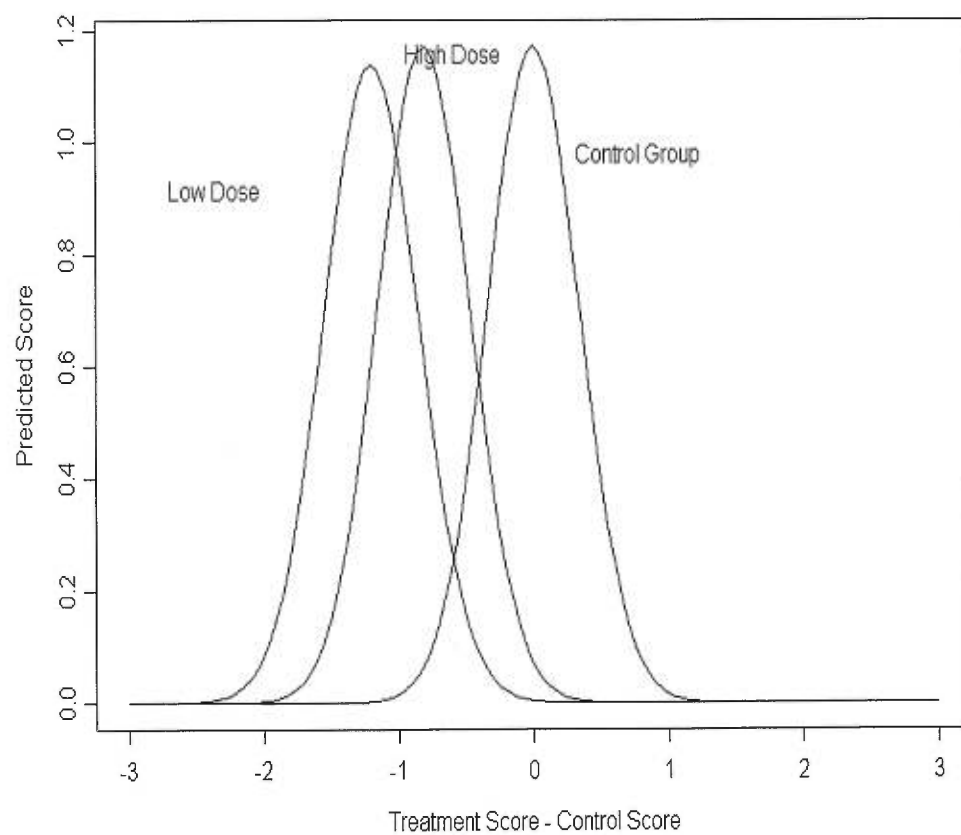


Table 1 Oral administration of the LCE reduces endothelial cell density within subcutaneous PVA implants

| Effect of oral administration of LCE | Mean endothelial cell density grade (mean \pm SE) | P value ^A |
|--------------------------------------|---|----------------------|
| Placebo | 3.15 \pm 0.11 | |
| 7 ml LCE | 2.24 \pm 0.10 | < 0.0001 |
| 21 ml LCE | 2.47 \pm 0.10 | 0.0002 |

^A Compared to placebo

Table 2 reveals that both the treatment and replicates were statistically significant with respect to score. That is, controlling for the effect of the replicate, treatment accounts for much of the variability or differences in the score (endothelial cell density).

Table 2

| SOURCE | P-VALUE |
|---------------------|----------|
| TREATMENT | < 0.0001 |
| REPLICATE | < 0.0001 |
| TREATMENT*REPLICATE | 0.63 |

Table 3 and 4 summarize the average treatment scores for each treatment without adjustment for any other factors. Table 3 indicates that the treatment groups were not statistically different. However both LOW and HIGH dose groups scored significantly lower than the control group with P-values of < 0.0001 and 0.0002 respectively

Table 3

| TREATMENT EFFECT | MEAN OF TREATMENT EFFECT | STD. ERROR |
|------------------|--------------------------|------------|
| HIGH DOSE(1) | 2.47 | 0.10 |
| LOW DOSE(2) | 2.24 | 0.10 |
| CONTROL(3) | 3.15 | 0.11 |

Table 4

| Treatment Difference | Difference | Standard error | Adjusted p-value |
|----------------------|------------|----------------|------------------|
| (1) - (2) | 0.22 | 0.14 | 0.28 |
| (1) - (3) | -0.69 | 0.15 | 0.0002 |
| (2) - (3) | -0.91 | 0.15 | < 0.0001 |

Using a generalization of the approach developed by McCullagh and Nelder results of the Generalized Estimating Equation (GEE) analysis is summarized in table 5 below. This analysis suggests under the normality assumption that both LOW and HIGH dose treatment scores are significantly lower than that of the control group(although not shown, low and high dose groups were not significantly different from each other).

Table 5

| Effect | Estimate | Std. Error | Lower c.i. | Upper c.i. | P-value |
|----------------------------|----------|------------|------------|------------|---------|
| Treat = Control (baseline) | 0.00 | _____ | _____ | _____ | _____ |
| High dose | -0.81 | 0.34 | -1.48 | -0.13 | 0.02 |
| Low dose | -1.20 | 0.35 | -1.59 | -0.51 | 0.0006 |
| Replicate 2 (baseline) | 0.000 | _____ | _____ | _____ | _____ |
| Replicate 1 | 0.70 | 0.08 | 0.54 | 0.86 | <0.0001 |

Table 6

Number of subjects from each group in each grade

| Group/Grade | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|-------------|---|---|---|---|---|
| I | 0 | 4 | 2 | 2 | 1 |
| II | 4 | 3 | 1 | 1 | 0 |
| II | 5 | 3 | 1 | 2 | 0 |

IV DISCUSSION

1 Caractéristiques des sujets

L'étude porte sur des sujets volontaires sains, âgés de 18 à 40 ans, et de sexe masculin pour ne pas interférer avec l'ovulation, processus impliquant l'angiogenèse.

Les critères d'exclusion sont les suivants :

- Sujet souffrant de toute maladie systémique chronique (MPOC, MCAS, diabète) ou tout autre sujet présentant un problème médical ou psychologique qui, selon l'opinion de l'investigateur, l'empêche de participer à cette étude.
- Sujet qui pour toute autre raison est selon l'investigateur susceptible de ne pas offrir une pleine collaboration.
- Sujet qui consomme de l'alcool régulièrement (cela interfère avec la guérison des plaies).
- Sujet qui vient de subir (moins de 60 jours auparavant) ou prévoit subir une chirurgie pendant l'étude ou dans les 60 jours suivant la fin de l'étude (afin de ne pas nuire à sa guérison).
- Tout sujet porteur d'une maladie hématologique qui, selon l'avis de l'investigateur, est susceptible d'altérer la coagulation ou d'agir sur la synthèse vasculaire.
- Sujet souffrant d'une maladie susceptible de nécessiter la prise d'anticoagulants.
- Sujet présentant une maladie susceptible d'entraîner une hémorragie (porteur d'ulcus peptique actif).
- Sujet allergique à la xylocaine et/ou au poisson.

- Sujet de race noire (risque de cicatrice chéloïde accru).
- Sujet pratiquant régulièrement un sport violent qui selon l'investigateur pourrait entraîner une blessure. Pour être admis dans l'étude, de tels sujets devront cesser la pratique de ce sport violent pendant l'étude et dans le mois qui suivra.
- Sujet présentant une séropositivité connue au virus VIH.
- Sujet qui prend ou est susceptible de prendre des médicaments pouvant altérer la coagulation, l'inflammation ou l'angiogenèse (comme l'aspirine).
- Sujet prenant tout autre médicament qui selon l'investigateur risque de modifier les résultats de l'étude.
- Sujet ayant un travail physique exigeant des efforts susceptibles de causer des blessures.
- Tout sujet cancéreux actif (l'étude se concentre sur les sujets sains).
- Sujet qui refuserait éventuellement de recevoir une ou des transfusions sanguines pour des raisons personnelles.
- Sujet qui participe déjà à une autre étude expérimentale.

2 Matériel et méthodes

2.1 Supplément alimentaire à base de cartilage de requin

Plusieurs travaux de recherche montrent que le facteur responsable de l'activité antiangiogénique du cartilage de requin est hydrosoluble. Une méthode d'extraction et de purification du

cartilage de requin a été mise au point par les laboratoires Aeterna. Un extrait liquide est manufacturé et distribué à travers le monde comme supplément diététique. L'extrait est naturel, c'est à dire qu'il est préparé sans qu'aucun réactif ou solvant ne soit utilisé.

L'extrait liquide de cartilage de requin exprime une activité hypoplasante sur des cellules transformées (*in vitro*), et antinéoplasique, sur des tumeurs induites chez le rat (*in vivo*). Il est intéressant de souligner qu'aucun signe de toxicité systémique n'a été observé chez des rats qui ont été gavés pendant de longues périodes, avec de grandes quantités de poudre de cartilage brut, ou des cellules normales qui ont été incubées avec de grandes quantités de poudre de cartilage brut. Le produit est innovateur parce que c'est un extrait liquide sans odeur ou goût particulier (à moins de rester décongelé plusieurs minutes), ce qui en facilite la consommation. Les expériences faites chez le rat avec la poudre de cartilage de requin, démontrent que le produit est absorbé par la muqueuse intestinale et distribué systématiquement. Des études réalisées chez l'humain arrivent aux mêmes conclusions.

2.3 Tissu de granulation

Plusieurs modèles ont été utilisés pour étudier la formation de nouveaux capillaires. Le modèle le plus vieux d'angiogenèse cicatricielle est celui de la chambre transparente implantée dans l'oreille de lapins (Folkman, 1987). Un autre exemple est celui de l'implantation sous-cutanée d'éponges de collagène et de cellulose

pour stimuler la formation d'un tissu de granulation. L'expérience se base sur le fait que l'éponge (corps étranger poreux) crée un espace que le système essaye de combler. Ainsi, l'envahissement de l'éponge par du tissu de granulation est comparable à celui qui se produit lors des plaies chirurgicales (Goretsky, 1995).

Dans la présente étude, le tissu de granulation humain est obtenu à partir d'implants fait d'une éponge de polyvinyle alcool de 1x1x60 mm insérés dans un tube en silicone perforé tous les 2 mm, tel que décrit précédemment (Germain, 1994) selon la méthode décrite par Diegelman et ass. (1986). À l'une des extrémités du tube est attaché un fil de suture dermalon 4-0, et les 2 extrémités sont scellées avec de la colle silastique (figure 4). Les implants sont lavés dans une solution tampon de phosphate et stérilisés par la suite à l'autoclave durant 30 min à 120°C. Après désinfection et anesthésie locale avec de la xylocaïne 1%, l'implant est introduit en sous-cutané à travers une incision en boutonnière au niveau du tiers supérieur de la face médiane du bras des sujets volontaires à l'aide d'un trocart 12G. Le fil de suture est laissé en dehors de la plaie en vue du repérage de l'implant au moment de son extraction.

3 Déroulement de l'étude

3.1 Étape clinique

La partie clinique de l'étude s'est étendue sur 23 jours. Aux jours 1, 12, et 23 les 36 hommes volontaires sains (âgés de 22 à 39 ans) ont subi un examen physique, un électrocardiogramme, ainsi que des bilans biochimique et hématologique de base. Ils ont ingéré quotidiennement dès j1 l'extrait liquide de cartilage de requin (décongelé jusqu'au moment de l'utilisation, (figure 3)), et à j12, l'implant était introduit pour être retiré à j23 (figure 5). L'extraction de l'implant se fait 12 jours après l'insertion, car c'est le délai qui correspond à la phase proliférative de la cicatrisation.

Ceci s'est déroulé conformément aux normes établies par le comité d'éthique de l'Hôtel Dieu de Montréal.

3.2 Étape technique

Une fois les implants retirés on les divise en trois parties de 1.5 cm, 3 cm et 1.5 cm afin d'effectuer des études histologiques, biochimiques et des cultures cellulaires.

3.2.1 Évaluation histologique

3.2.1.1 Coloration

Après conservation du fragment d'éponge de 1.5 cm dans du formol, deux types de coloration sont effectués sur des coupes fixées sur lames; notamment, la coloration à l'H&E pour le décompte des globules rouges, et la coloration à l'HPS avec marqueur du facteur VIIIa pour le décompte des cellules endothéliales. Dix coupes de chaque fragment d'implant, prises à des intervalles différents, ont été étalées sur 5 lames (2 par lame) par patient pour les deux types de coloration (donc 10 lames par patient au total). Une 11^e lame a servi de contrôle dans le cas de la coloration à l'HPS; elle ne comprenait pas le marqueur du facteur VIIIa (figure 7). Deux lames contenant des coupes de cordons ombilicaux, dont les cellules endothéliales ont été marquées (marquage du facteur VIIIa), ont servi de démonstrateurs (figure 6).

3.2.1.2 Quantification

La lecture des lames d'histologie, pour le décompte quantitatif effectué par deux observateurs indépendants, a été faite à un agrandissement de 40X au microscope optique. Sur les lames colorées à l'HPS avec marqueur du facteur VIIIa, des points violets, représentant le marquage des cellules endothéliales se distinguent du fond rosé, couleur imbibant l'éponge. Sur les lames colorées à

l'H&E, les globules rouges contenus dans les vaisseaux, paraissent dans le treillis de l'éponge.

Des critères préétablis pour quantifier la densité des cellules endothéliales et celle des globules rouges ont permis la lecture indépendante des lames ; d1, d2, d3, d4 et d5 représentent la concentration croissante de points sur les différents fragments d'éponge (figure 1), (d1= quelques points parsemés dans le treillis de fond ; d2= des chapelets de points parsemés sur la lame ; d3= plusieurs régions confluentes de points ; d4= une lame quasi uniforme avec très peu d'espaces vides entre les interstices d'éponge; d5= un comblement total des espaces de l'éponge). Une étude de concordance interjuges a été effectuée pour valider les résultats avant toute interprétation.

3.2.2 Biochimie

Le fragment central de 3 cm de l'éponge a été congelé à - 80°C et transporté au laboratoire de biochimie pour une étude chromatographique (HPLC en phase inversée avec détection fluorimétrique et dérivatisation par l'orthophtaldéhyde (Jorgensen, 1994)) afin d'objectiver et de quantifier le contenu en protéines, en hydroxyproline, et en proline dans le tissu de granulation formé. L'hydroxyproline est un acide aminé spécifique du collagène, dont la concentration dans une molécule de collagène est connue (tel que mentionné dans le texte qui précède). Il est ainsi possible de

mesurer la quantité de collagène qui s'est déposée dans les éponges.

3.2.3 Cultures cellulaires

Dans le but d'étudier le comportement des fibroblastes après exposition systémique à l'extrait de cartilage de requin, on a commencé des cultures cellulaires à partir du troisième fragment d'éponge, selon la méthode décrite dans l'article du Dr Germain et coll. (1994).

4 RÉSULTATS

4.1 Densité des cellules endothéliales

L'étude de concordance interjuges pour les lames d'immunohistochimie - facteur VIIIa donne un Kappa pondéré de 0.778 qui permet d'interpréter de façon fiable les lectures histologiques. On a calculé les moyennes des résultats de densité d1, d2, d3, d4 et d5, des cellules endothéliales sur les coupes histologiques d'implants. On a utilisé la moyenne des 2 coupes par lame, et la moyenne des 5 lames par patient pour une même

coloration pour la concordance de lecture des deux observateurs et pour la comparaison des trois groupes de patients D1, D2, D3.

Le test statistique ANOVA a été utilisé pour interpréter les résultats des moyennes des groupes et le test de Fischer pour la comparaison intergroupe. L'histogramme qui apparaît révèle la différence entre le groupe placebo et les groupes prenant l'extrait de cartilage de requin (figure 8).

4.2 Biochimie du collagène

En ce qui concerne le contenu en collagène des échantillons analysés en biochimie, la figure 9 démontre que la quantité totale de collagène était similaire pour D1, D2, et D3. Ceci a été calculé en comparant le contenu en hydroxyproline par milligramme d'éponge dans les trois groupes, $p = 0.63$. Le rapport hydroxyproline sur proline, reflet de la maturité du collagène déposé, ne démontre pas de modification suite à l'exposition systémique au cartilage de requin $p=0.79$. Ceci pourrait être attribué à la période limitée à 12 jours du séjour de l'implant dans la plaie, période insuffisante pour observer toutes les modifications subies par le collagène durant le processus de cicatrisation.

4.3 Appréciation des effets secondaires

Afin de mieux connaître les effets secondaires possibles du supplément alimentaire sur les sujets, un questionnaire concernant leur état de santé générale est complété aux jours 0, 12 et 23 de l'étude. En plus, un médecin participant à l'étude peut être rejoint en tout temps. Un examen médical est effectué et des prélèvements sanguins et urinaires sont réalisés à chaque rencontre.

On note que 5 sujets sur 29 se sont plaints d'une haleine de poisson, mais aucun cas de diarrhée, de nausée ou d'autres dérangements gastrointestinaux n'a été rapporté.

Un sujet a abandonné l'étude le jour de l'insertion de l'implant à la suite d'un choc vagal en voyant le trocart. Un autre sujet s'est fracturé l'avant-bras et nous l'avons exclu de l'étude conformément au protocole.

V CONCLUSION

Les faits saillants de cette étude sont les suivants :

1) Il a été démontré pour la première fois chez l'homme sain qu'un produit extrait du cartilage de requin inhibe la formation de néovaisseaux lors de la cicatrisation.

2) Il n'y a pas «d'effet dose» du produit extrait de cartilage de requin comme le démontre la différence non significative des concentrations en cellules endothéliales chez les patients ayant reçu la simple (D2) ou la double (D1) concentration d'extrait de cartilage, lorsque l'on compare cinq niveaux de densité de cellules endothéliales.

3) La quantité et la qualité du collagène déposé durant les deux premières semaines de cicatrisation ne varient pas de façon significative après ingestion systémique d'extrait de cartilage.

Des études en cours impliquant le produit sont menées auprès de patients en phase terminale, atteints de différents cancers (sein, prostate...). L'étude présentée, prospective randomisée à double insu chez des sujets sains, a permis de démontrer l'innocuité de l'extrait de cartilage . Nous n'avons pas relevé de répercussions sur la santé physique ni au niveau des bilans de laboratoire (FSC, biochimie, coagulogramme, ECG) des sujets sains tout au long du déroulement de l'étude.

VI. BIBLIOGRAPHIE

RÉFÉRENCES :

Aiello LP. Vascular endothelial growth factor and the eye. Past, present and future. Archives of Ophthalmology 1996 Oct; 114(10) : 1252-1254.

Apte AB. Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase-3. Invest Ophthalmol Vis Sci 1997 ; 38(5) 817-823.

Arbiser JL. Angiogenesis and the skin : a primer. J Am Acad Dermatol 1996 ; 34(3) : 486-497.

Assoian RK. The rôle of growth factors in tissue repair IV : Type β -Transforming growth factor and stimulation of fibrosis, 273-280. Dans The molecular and cellular biology of wound repair. Henson PM, Clark RAF eds. Plenum Press New-York, 1988.

Battegay EJ. Angiogenesis : mechanistic insights, neovascular diseases, and therapeutic prospects. Journal of Molecular Medicine 1995 Jul ; 73(7) : 333-346.

Bicknell R. Mechanisms and therapeutic implications of angiogenesis. Curr Opin Oncol 1996 ; 8(1) : 60-65.

Bicknell R. Vascular targeting and inhibition of angiogenesis. Ann Oncol 1994 ; 5 : 45-50.

Blair RJ. Human mast cells stimulate vascular tube formation. Tryptase is a novel, potent angiogenic factor. J Clin Invest 1997 ;

99(11) : 2691-2700.

Bossi P, Giuseppe V, Lee AKC, Alfano Rm, Coggi G, Bosari S. Angiogenesis in colorectal tumors : Microvessel quantitation in adenomas and carcinomas with clinicopathology correlations. Cancer Research 1995 Nov ; 55 : 5049-5053.

Brem H, Folkman J. Inhibition of tumor angiogenesis mediated by cartilage. The Journal of experimental Medecine 1975 ; 141 : 427-439.

Brown KJ. A novel in vitro assay for human angiogenesis. Lab Invest 1996 ; 75(4) : 539-555.

Brown PD, Giavazzi R. Matrix metalloproteinase inhibition ; a review of anti-tumor activity. Annals of Oncology 1995 Dec ; 6(10) : 967-974.

Camez A, Tobelem G. Les facteurs angiogeniques. Hématologie 1987 ; 29 : 57-79.

Carlevaro MF. Transferrin promotes endothelial cell migration and invasion : implication in cartilage neovascularization. J cell Biol 1997 ; 136(6) : 1375-1384.

Chen C. A Strategy to discover circulating angiogenesis inhibitors generated by human tumors. *Cancer Res* 1995 ; 55(19) : 4230-4233.

Clark RAF. Overview and general considerations of wound repair, 3-33. *Dans* The molecular and cellular biology of wound repair. Henson PM, Clark RAF eds. Plenum Press New-York, 1988 et 1998.

Cockerill GW, Bamble JR, Vadas MA. Angiogenesis : models and modulators. *International Review of Cytology* 1995 ; 159 : 113-160.

Cornelius LA. Human dermal microvascular endothelial cells produce matrix metalloproteinases in response to angiogenic factors and migration. *J Invest Dermatol* 1995 ; 105(2) : 170-176.

Couchman JR, Höök M. Proteoglycans and wound repair, 437-470. *Dans* The molecular and cellular biology of wound repair. Henson PM, Clark RAF eds. Plenum Press New-York, 1988.

D'Amore PA. Growth factors, angiogenesis and metastasis, 269-283. *dans* Cancer metastasis : experimental and clinical strategies. Alan R. Liss Inc eds. 1986.

Davis PF, He Y, Furneaux RH, Johnston PS, Rüger BM, Slim GC. Inhibition of angiogenesis by oral ingestion of powdered shark cartilage in a rat model. *Microvascular Research* 1997 ; 54 : 178-182.

Diegelmann RF, Limbald WJ, Cohen IK. A subcutaneous implant for wound healing studies in humans. *J. Surg. Res* 1986; 40: 229,

Dorey CK, Arouididi S, Xavier R, Dvorak HF, Brown LF. Correlation of VPF / VEGF with extra retinal neovascularization in the rat. *Archives of Ophthalmology* 1996 Oct; 114(10) : 1210-1217.

Durie BGM, Soebolen B, Prudden J. Antitumor activity of bovine cartilage extract (Catrix-S) in the human tumor stem cell assay. *J Biol resp Mod* 1985 ; 4 : 590-595.

Eckhardt SG. Development of angiogenesis inhibitors for cancer therapy. *Invest New Drugs* 1997 ; 15(1) : 1-3.

Eisenstein R, Kuettner KE, Neopolitan C, Soble LW, Sorgente N. The resistance of certain tissue to invasion III. Cartilage extracts inhibit the growth of fibroblasts and endothelial cells in culture. *Am J Pathol* 1975 ; 81 : 337-347.

Fan TPD. Controlling the vasculature L angiogenesis, anti-angiogenesis and vascular targeting of gene therapy. *Trends Pharmacol Sci* 1995 ; 16(2) : 57-66.

Fan TPD. Angiosuppressive therapy for cancer. *Trends in Pharmacol Sci* 1994 ; 15 : 33-36.

Folkman J, Cotran R. Relation of vascular proliferation to tumor growth 1975: 207-249.

Folkman J, Ingber D. Inhibition of angiogenesis. *Seminars in Cancer Biology* 1992 Apr ; 3(2) : 89-96.

Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987 Jan ; 235 : 442-448.

Folkman J. Angiogenesis - Retrospect and outlook, 4-13. *Dans Angiogenesis : Key Principles - Science - Technology - Medecine.* R Steiner, PB Weisz, R Langer eds. Switzerland, Birkhäuser Verlag Basel, 1992.

Folkman J. Angiogenesis and breast cancer. *J Clin Oncol* 1994 ; 12 : 441-443.

Folkman J. Successful treatment of angiogenic disease. *N Engl J Med* 1989 ; 320 : 1211-1212.

Folkman J. The role of angiogenesis in tumor growth. *Seminars in Cancer Biology* 1992 Apr ; 3(2) : 65-71.

Freedman MD. Pharmacodynamics, clinical indicators, and adverse effects of heparin. *J Clin Pharmacol* 1992 ; 32(7) : 584-596.

Fox GM. The rôle of growth factors in tissue repair III fibroblast growth factor, 265-271. *Dans The molecular and cellular biology of wound repair.* Henson PM, Clark RAF eds. Plenum Press New-York, 1988.

Furthmayr H. Basement membranes, 525-558. *Dans The molecular*

and cellular biology of wound repair. Henson PM, Clark RAF eds. Plenum Press New-York, 1988.

Gagliardi A. Inhibition of angiogenesis by antiestrogens. *Cancer Res* 1993 ; 53(3) : 533-535.

Garrel RD, Gaudreau P, Zhang L, Reeves I, Brazeau P. Chronic administration of growth hormone-releasing factor increases wound strength and collagen maturation in granulation tissue. *Journal of Surgical Research* 1991 : 51 : 297-302.

Gasparini G. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein in node-negative breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1997 ; 89(2) : 139-147.

Gastl G, Herman T, Steurer M, Zmija J, Gunsilius E, Unger C, Kraft A. Angiogenesis as a target for tumor treatment. *Oncology* 1997 May-Jun ; 54(3) : 177-184.

Germain L, Jean A, Auger FA, Garrel DR. Human wound healing fibroblasts have greater contractile properties than dermal fibroblasts. *Journal of Surgical Research* 1994; 57: 268-273.

Gingras D, Béliveau R. L'angiogenèse tumorale: une nouvelle cible thérapeutique anticancéreuse. *Les sélections de médecine et sciences* 1998; 9: 23-30.

Gimbrone MA, Leapman SB, Cotran RS, Folkman J. Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *J Exp Med* 1972 ; 136 : 261-276.

Goretsky MJ, Breeden M, Pisarski G, Harriger MD, Boyce ST, Greenhalgh DG. Capillary morphogenesis during healing of full-thickness skin grafts : An ultrastructural study. *Wound Repair and Regeneration* 1995 Apr-Jun; 3(2) : 213-220.

Gradishar WJ. An overview of clinical trials involving inhibitors of angiogenesis and their mechanism of action. *Investigational New Drugs* 1997 ; 15(1) : 49-59.

Guerin C, Laterra JJ, Masnyk T, Golub LM, Brem H. Selective endothelial growth inhibition by tetracyclines that inhibit collagenase. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 1992 Oct 30 ; 188(2) : 740-745.

Hirschi KK, D'Amore PA. Control of angiogenesis by the pericyte : molecular mechanisms and significance. *EXS* 1997 ; 79 : 419-428.

Hunt TK, Knighton DR, Thakral KK, Goodson III WH, Andrews WS. Studies on inflammation and wound healing : Angiogenesis and collagen synthesis stimulated in vivo by resident and activated wound macrophages. *Surgery* 1984 Jul ; 96(1) : 48-54.

Ingber DE. Extracellular matrix as a solid-state regulator in angiogenesis : identification of new targets for anti-cancer therapy. *Seminars in Cancer Biology* 1992 Apr ; 3(2) : 57-63.

Iruela Arispe ML. Angiogenesis : a dynamic balance of stimulators and inhibitors. *Thromb Haemost* 1997 ; 78(1) : 672-677.

Jorgensen LN, Olsen L, Kallehave F, Karlsmark T, Diegelmann RF, Cohen K and Gottrup F. The wound healing process in surgical patients evaluated by the expanded polytetrafluoroethylene and the polyvinyl alcohol sponge: a comparison with special reference to inpatient variability. *Wound Rep. Reg* 1995; 3:527-532.

Kahlon R. Angiogenesis in atherosclerosis. *Can J Cardiol* 1992 ; 8(1) : 60-64.

Karaiossifidi H, Kouri E, Arvaniti H, Vasilaros S. Tumor angiogenesis in node-negative breast cancer : relationship with relapse free survival. *Anticancer Research* 1996 Nov-Dec ; 16(6C) 4001-4002.

Kelly DE, Wood RL, Enders AC. *Bailey's Textbook of Microscopic Anatomy* 1984; Williams & Wilkins

Klaus E, Kuettner KE, Bendicht U, Pauli BU. Inhibition of neovascularization by a cartilage factor. ; : 163-173.

Knighton DR, Fiegel VD. Regulation of cutaneous wound healing by growth factors and the microenvironment. *Investigative Radiology* 1991 Jun; 26(6) : 604-611.

Knighton DR, Silver IA, Hunt TK. Regulation of wound healing angiogenesis-Effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentration. *Surgery* 1981; 90:262-270.

Kuroki M. Reactive oxygen intermediates increase vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 1996 ; 98(7) : 1667-1675.

Langer L, Lee A. Shark cartilage contains inhibitors of tumor angiogenesis. *Science* 1983 ; 221 : 1185-1187.

Langer R, Brem h, Falterman K, Klein M, Folkman J. Isolation of a cartilage factor that inhibits tumor neovascularization. *Science* 1976 ; 193 : 70-72.

Langer R, Conn H, Vacanti J, Haudenschild C, Falkman J. Control of tumor growth in animals by infusion of an angiogenesis inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980 ; 77 : 4331-4335.

Lee A, Langer R. Shark cartilage contains inhibitors of tumor angiogenesis. *Science* 1983 ; 221 : 1185-1187.

Lioté F. Synovial angiogenesis. *Rev Prat* 1993 ; 43(17) : 2239-2245.

Madri JA, Pratt BM. Angiogenesis, 337-358. *Dans* The molecular and cellular biology of wound repair. Henson PM, Clark RAF eds. Plenum Press New-York, 1988.

McCarthy JB, Sas DF, Furght LT. Mechanisms of parenchymal cell

migration into wounds, 281-319. *Dans* The molecular and cellular biology of wound repair. Henson PM, Clark RAF eds. Plenum Press New-York, 1988.

McCarty MF. Fish oil may impede tumor angiogenesis and invasiveness by down-regulating protein kinase C and modulating eicosanoid production. *Medical Hypotheses* 1996Feb ; 46(2) : 107-115.

Mcguire TR, Kazakoff PW, Hoie EB, Fienhold MA. Antiproliferative activity of shark cartilage with and without tumor necrosis factor- α in human umbilical vein endothelium. *Pharmacotherapy* 1996 ; 16(2) : 237-244.

Mcpherson JM, Piez KA. Collagen in dermal wound repair, 471-496. *Dans* The molecular and cellular biology of wound repair. Henson PM, Clark RAF eds. Plenum Press New-York, 1988.

Mignati P, Welgus HG, Rifkin DB. Rôle of degradative enzymes in wound healing, 497-523. *Dans* The molecular and cellular biology of wound repair. Henson PM, Clark RAF eds. Plenum Press New-York, 1988.

Miller EJ, Gay S. Structural and regulatory components of wound healing : Collagen structure and function, 130-151. *Dans* Wound healing, biochemical & clinical aspects. Cohen, Drigelmann, Lindbald eds.

Morbidelli L. Nitric Oxide mediates mitogenic effect of VEGF on

coronary venular endothelium. *Am J Physiol* 1996 ; 10(1) : 59-64.

Moses MA, Langer R. Inhibitors of angiogenesis. *Biotechnology* 1991 ; 9 : 630-634.

Moses MA, Sudhalter J, Langer R. Identification of an inhibitor of neovascularization from cartilage. *Science* 1990 Jun ; 248 : 1408-1410.

Moses MA, Sudhalter J, Langer R. Isolation and characterization of an inhibitor of neovascularization from scapular chondrocytes. *The journal of Cell Biology* 1992 Oct ; 119(2) : 475-482.

Moses MA. A cartilage-derived inhibitor of neovascularization and metalloproteinases. *Clinical & Experimental Rheumatology* 1993 Mar-Apr ; 11 Suppl 8 : S67-69.

Moses MA. The regulation of neovascularization of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Stem Cells* 1997 ; 15(3) : 180-189.

Nakagawa M. Tubulogenesis by microvascular endothelial cells is mediated by vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal cell carcinoma. *Br J Urol* 1997 ; 79(5) : 681-687.

Nguyen M, Shing Y, Folkman J. Quantitation of angiogenesis and antiangiogenesis in the chick embryo chorioallantoic membrane. *Microvascular Research* 1994 Jan ; 47(1) : 31-40.

O'Reilly MS. The preclinical evaluation of angiogenesis inhibitors.

Invest New Drugs 1997 ; 15(1) : 49-59.

Oikawa T, Ashimo Fuse H, Shimamura M, Koide U, Iwaguchi T. A novel angiogenic inhibitor derived from Japanese shark cartilage (I). Extraction and estimation of inhibitory activities toward tumor and embryonic angiogenesis. Cancer Letters 1990 ; 51 : 181-186.

Okada N, Fushimi M, Nagata Y, Fukunaga T, Tsutsumi Y, Nakagawa S, Mayumi T. Evaluation of angiogenic inhibitors with an in vivo quantitative angiogenesis method using agarose microencapsulation and mouse hemoglobin enzyme-linked immunosorbent assay. Japanese Journal of Cancer Research 1996 Sep ; 87(9) : 952-957.

Passaniti A. A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor. Lab Invest 1992 ; 67(4) : 519-528.

Patterson C. Downregulation of vascular endothelial growth factor receptors by tumor necrosis factor-alpha in cultured human vascular endothelial cells. J Clin Invest 1996 ; 98(2) : 490-496.

Pedram A. Vasoactive peptides modulate vascular endothelial cell growth factor production and endothelial cell proliferation and invasion. J Biol Chem 1997 ; 272(27) : 17097-17103.

Pierce EA, Foley ED, Smith LE. Regulation of vascular endothelial growth factor by oxygen in a model of retinopathy of prematurity.

Archives of Ophthalmology 1996 Oct; 114(10) : 1219-1228.

Plessis-Belair D. Effets du RU 486 sur la sensibilité à l'insuline et la pression artérielle chez des hommes obèses et hypertendus. Mémoire de Maîtrise, Département de Nutrition, Faculté de Médecine, Université de Montréal, 1996.

Polverini PJ. The pathophysiology of angiogenesis. Critical Reviews in Oral Biology & Medicine 1995 ; 6(3) : 230-247.

Riches DWH. The multiple Roles of Macrophages in wound healing, 213-239. *Dans* The molecular and cellular biology of wound repair. Henson PM, Clark RAF eds. Plenum Press New-York, 1988.

Robbins SL, Kumar U, Cotran RS. Robbins Pathologic Basis of Disease 1989 ; WB Saunders Company.

Robinson JB, Friedman RM. Wound Healing and Closure ; in Selected Readings in Plastic Surg. vol 8,1995.

Romano CF, et al. A phase II study of Catrx-S in solid tumors. J Biol Resp Mod 1985 ; 4 : 585-589.

Schweigerer L. Angiogenesis and angiogenesis inhibitors in paediatric diseases. Eur J Pediatr 1992 ; 151(7) : 472-476.

Sharma A, Bernacki RJ. Ovarian cancer patients with high CA-125 but no symptoms-should antiangiogenic treatments be considered ? Oncology Research 1997 ; 9(2) : 53-54.

Sipos EP. Inhibition of tumor angiogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 1994 ; 732 : 263-272.

Stern DM, Handley D, Nawroth PP. Endothelial cell regulation of coagulation, 87-114. *Dans* The molecular and cellular biology of wound repair. Henson PM, Clark RAF eds. Plenum Press New-York, 1988.

Taraboletti G. Inhibition of angiogenesis and murine hemangioma growth by batimastat, a synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases. *J Natl Cancer Inst* 1995 ; 87(4) : 293-298.

Thorgeirsson UP, Lindsay CK, Cottam DW, Gomez DE. Tumor invasion, proteolysis, and angiogenesis. *Journal of Neuro-Oncology* 1993 ; 18(2) : 89-103.

Thorpe PE. Heparin-steroid conjugates : new angiogenesis inhibitors with antitumor activity in mice. *Cancer Res* 1993 ; 53(13) : 3000-3007.

Tyagi SC. Differential regulation of extracellular matrix metalloproteinase and tissue inhibitor by heparin and cholesterol in fibroblast cells. *J Mol Cell Cardiol* 1997 ; 29(1) : 391-404.

Voest EE. Inhibitors of angiogenesis in a clinical perspective. *Anticancer Drugs* 1996 ; 7(7) : 723-727.

Volpert OV. Captopril inhibits angiogenesis and slows the growth of experimental tumors in rats. *J Clin Invest* 1996 ; 98(3) : 671-679.

Volpert OV. Sequential development of an angiogenic phenotype by human fibroblasts progressing to tumorigenicity. *Oncogene* 1997 ; 14(12) : 1495-1502.

Whalen GF, Zetter BR. Biological process involved in wound healing : Angiogenesis, 77-95. *Dans Wound healing, biochemical & clinical aspects.* Cohen, Drigelmann, Lindbald eds.

Weidner N, Carrol PR, Flax J et al. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol* 1993 ; 143 : 401-409.

Wojtowicz-Praga SM, Dickson RB, Hawkins MJ. Matrix metalloproteinase inhibitors. *Investigational New Drugs* 1997 ; 15(1) : 61-75.

Wong J. Modulation of human fibroblasts activity by selected angiogenesis inhibitors. *Exp Eye Res* 1994 ; 58(4) : 439-451.

Wu J. Apoptosis and angiogenesis : two promising tumor markers in breast cancer (review). *Anticancer Research* 1996 Jul-Aug ; 16(4B) : 2233-2239.

Yoon TJ, Yoo YC, Choi OB, Do MS, Kang TB, Lee SW, Azuma I, Kim JB. Inhibitory effect of Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) extract on tumor angiogenesis and metastasis of

haematogenous and non-haematogenous tumor cells in mice.
Cancer Letters 1995 ; 97(1) : 83-91.

Ziche M, Morbidelli L, Donnini S. Angiogenesis. Experimental
Nephrology 1996 ; 4 : 1-14.

VII. ANNEXES



Figure 3 :Fioles contenant l'extrait congelé de cartilage de requin

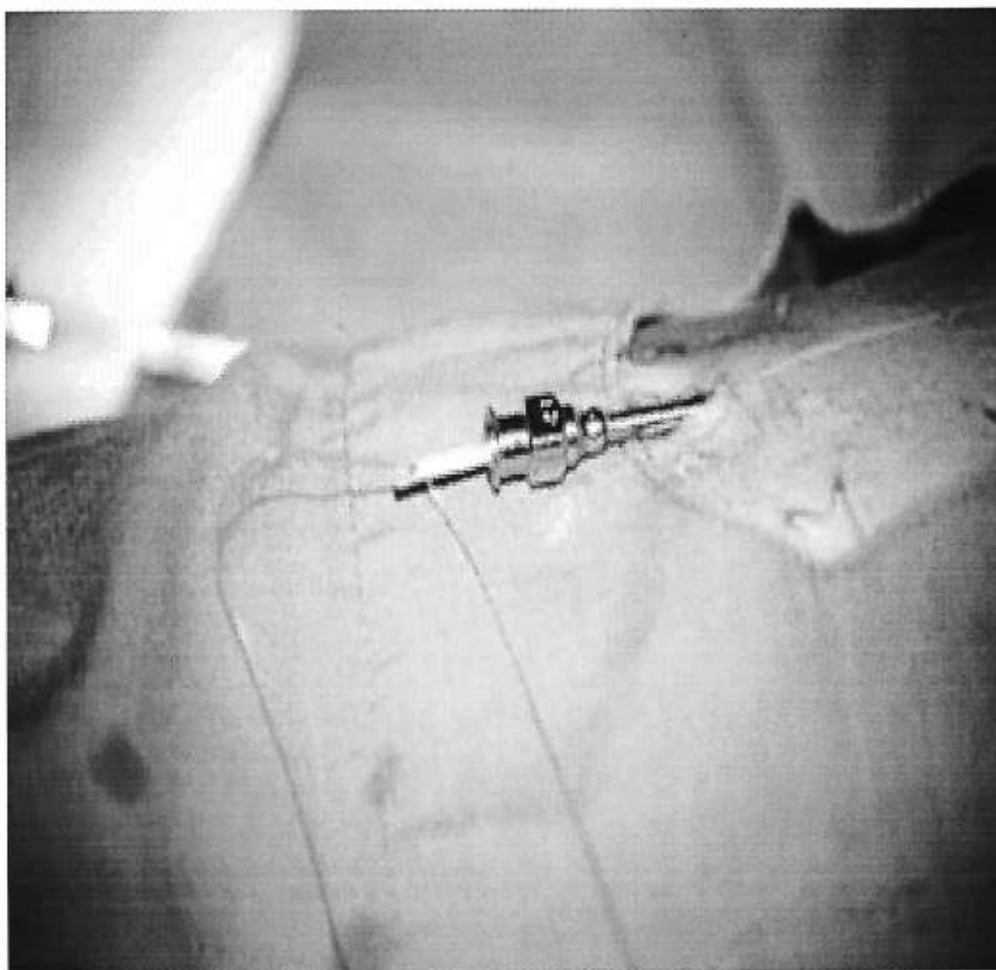


Figure 4 : Technique stérile d'insertion de l'implant au niveau du bras

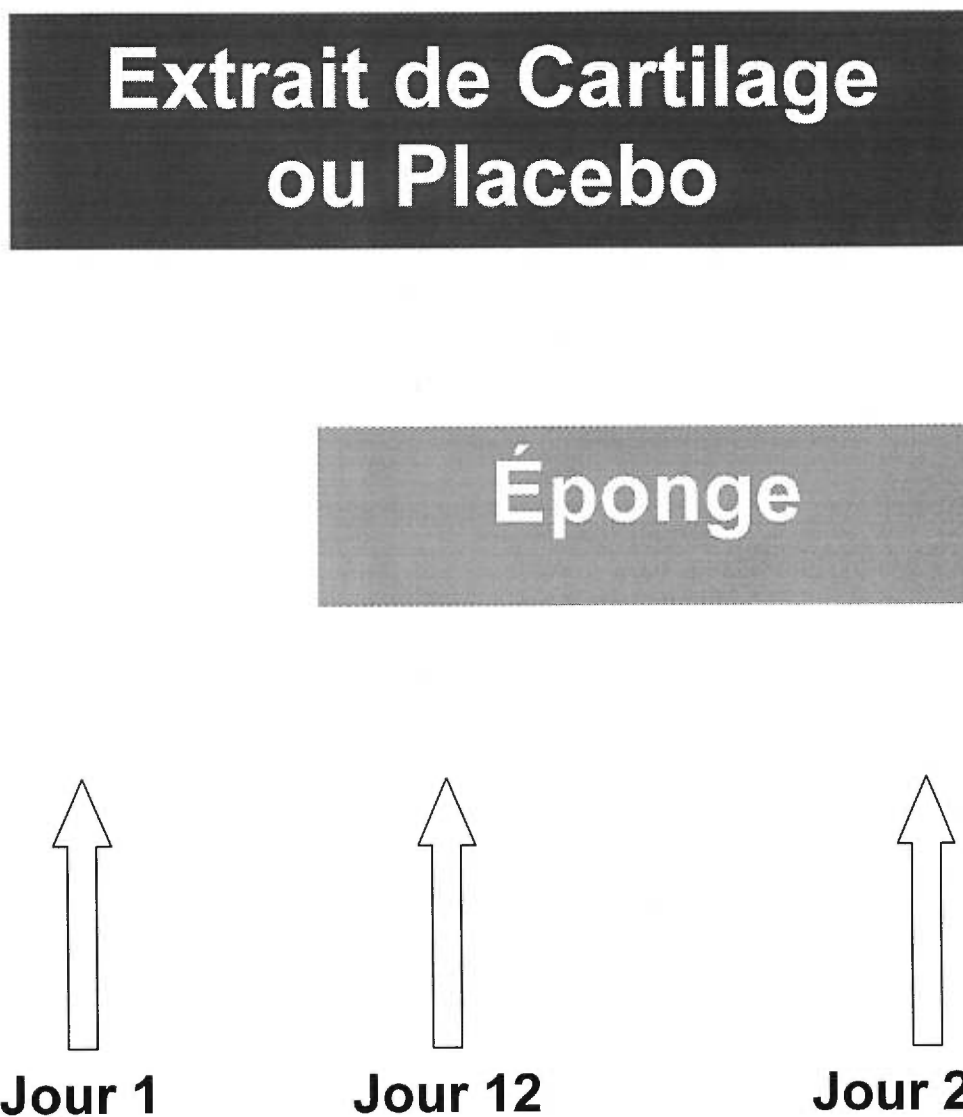


Figure 5 : déroulement de l'étude

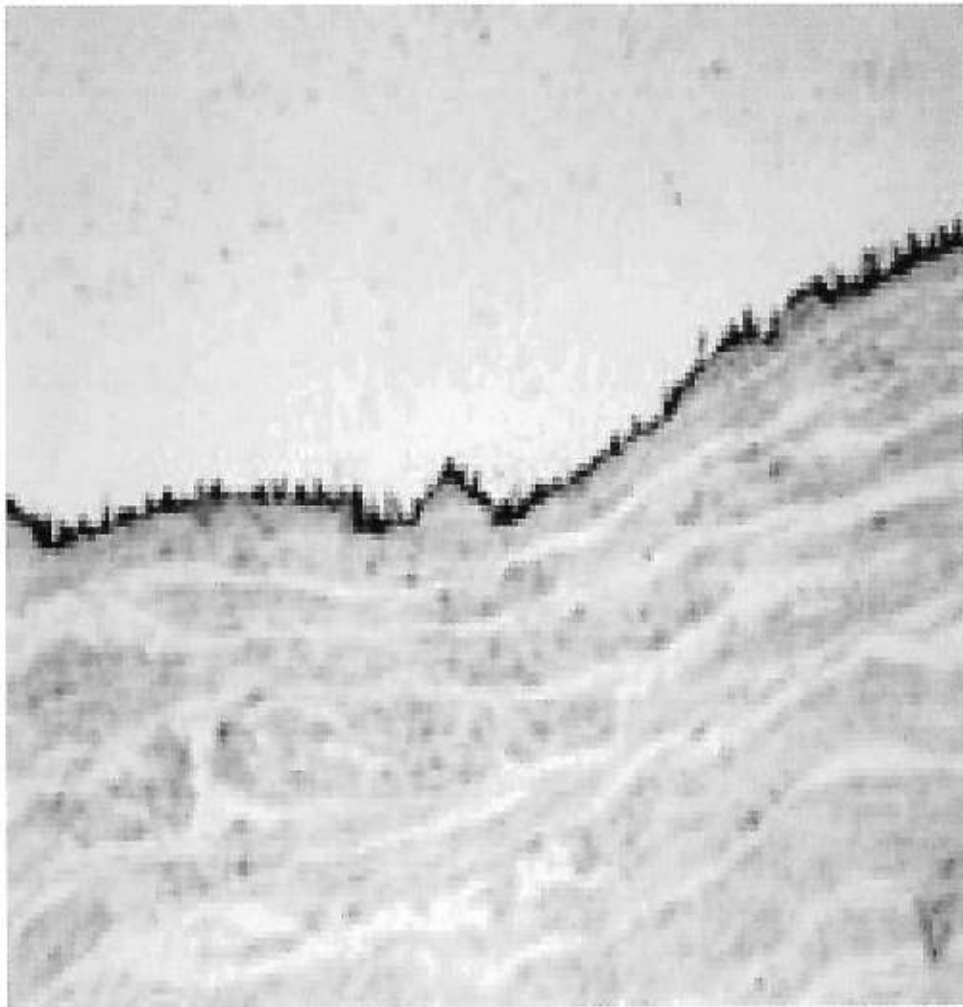


Figure 6 :Section de cordon ombilical ; contrôle démontrant la coloration des cellules endothéliales

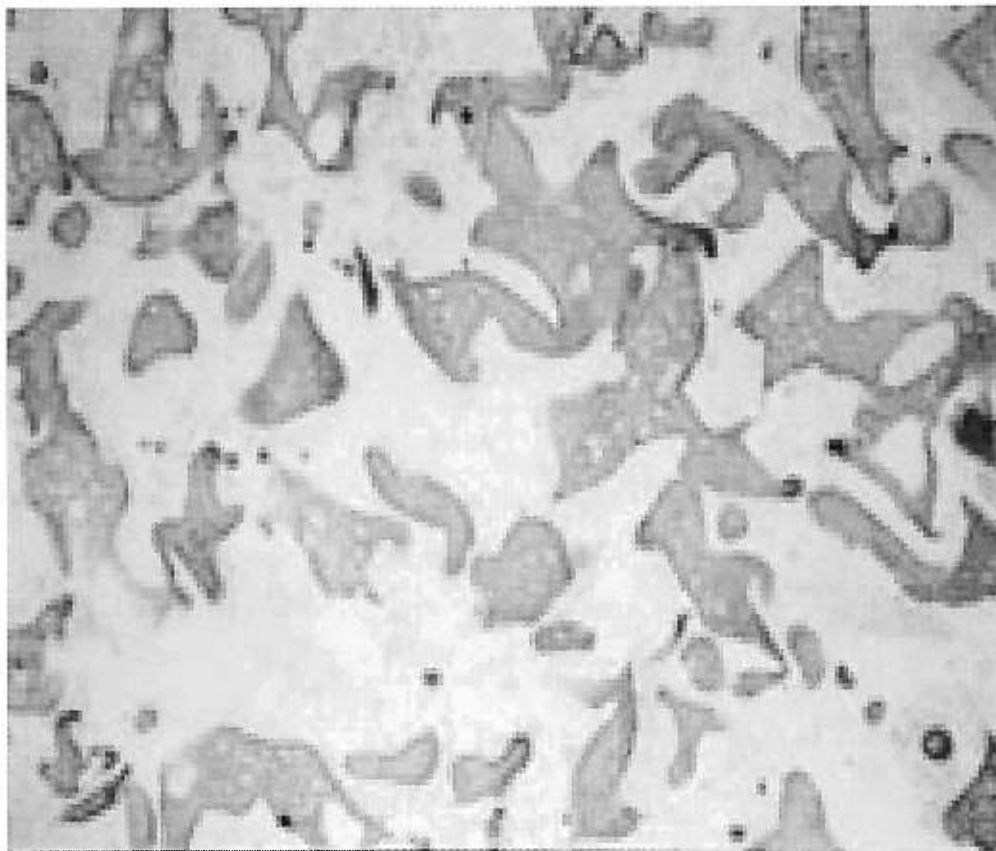
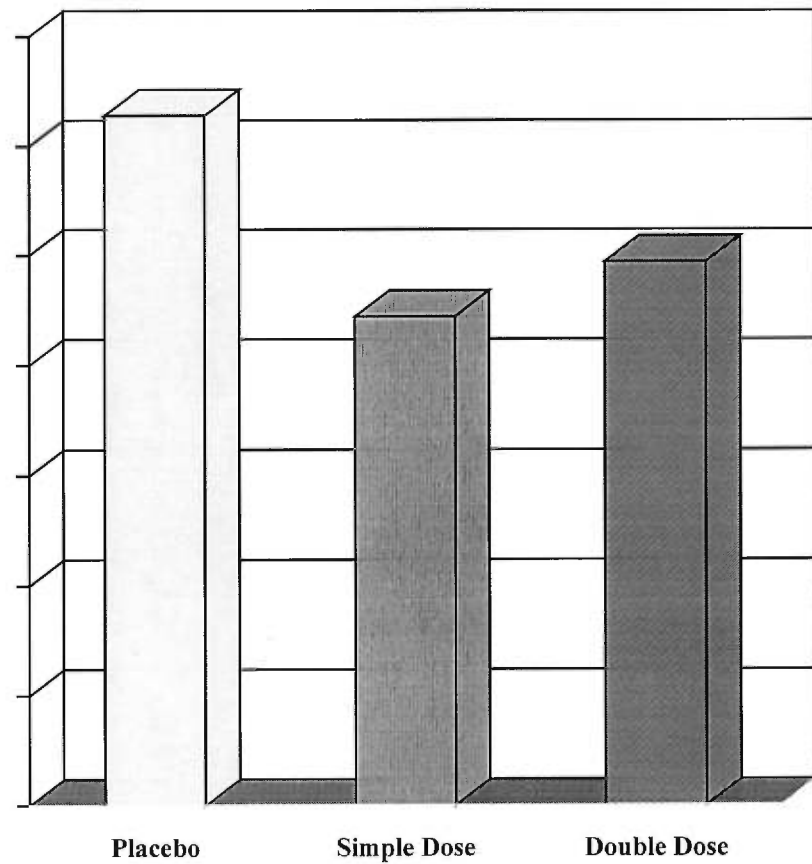


Figure7: Aspect de l'implant (éponge en PVA) en microscopie

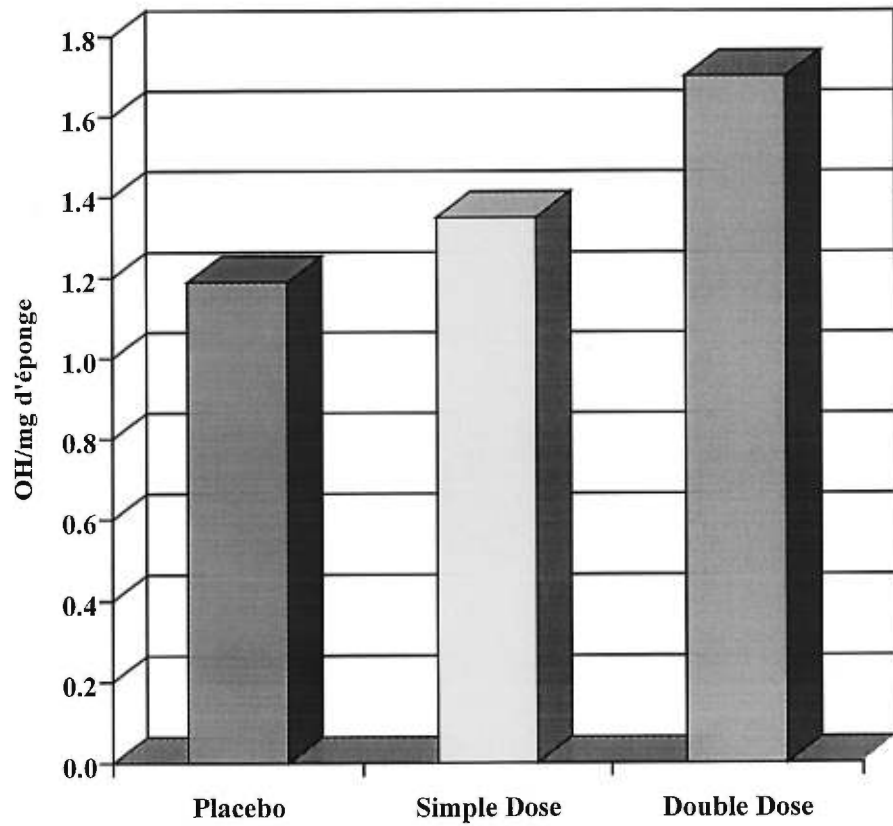
Résultats: Densité de Néovaisseaux



$P < 0.045$

Figure 8 : Il existe une différence significative entre le groupe P et D1/D2

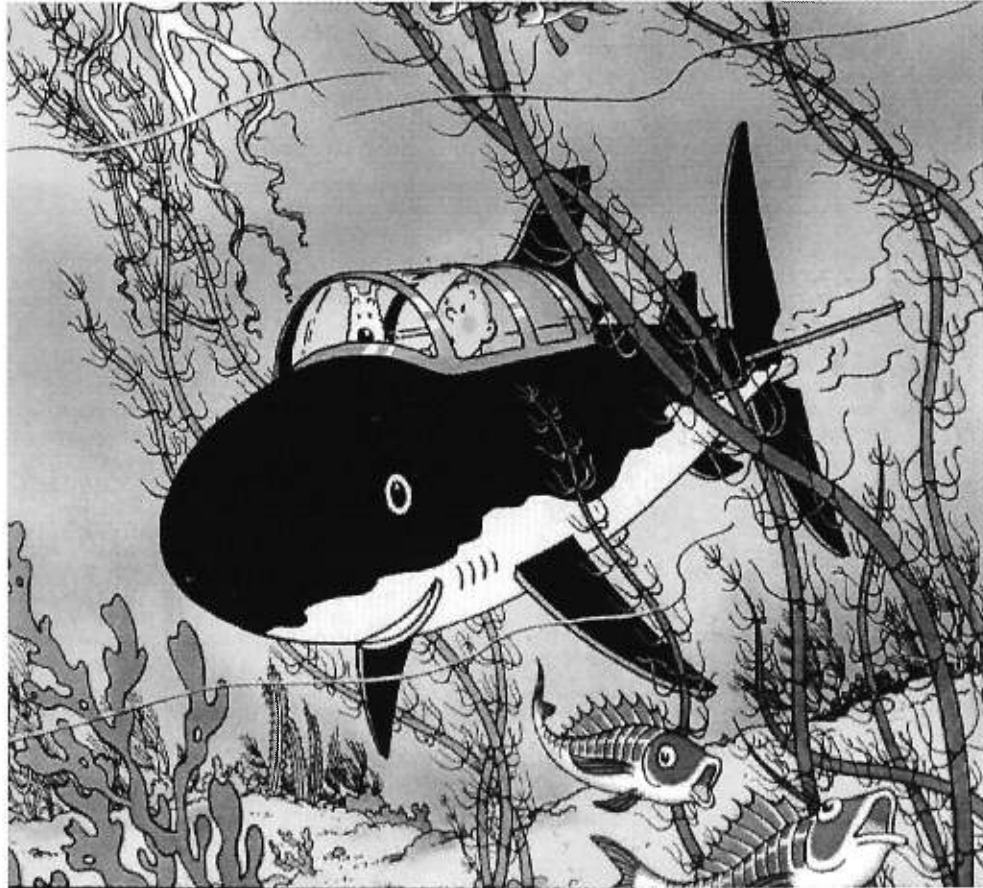
Résultats: Biochimie



$p=0.63$

Figure 9 : Il n'existe pas de différence dans la quantité de collagène déposé entre le groupe P et D1/D2

Le Cartilage de Requin....



...inhibe l'angiogenèse